

Aus dem Institut für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs
des Veterinärwissenschaftlichen Departments
der tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl: Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. mult. A. Stolle

**Vorkommen und Expression von β -Laktamase A und B
bei *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 Stämmen aus Bayern
mittels Polymerase-Ketten-Reaktion und Agardiffusionstest**

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

von
Rebecca Bonke
aus Warstein

München 2009

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Stolle
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. Wanke

Tag der Promotion: 6. Februar 2009

**Meiner Familie
in Liebe und Dankbarkeit**

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A

Abb.	Abbildung
AMC	Amoxicillin/Clavulansäure
Amo	Amoxicillin
Ampi	Ampicillin
Anw.	Anwendung
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
ATCC	American Type Culture Collection

B

B.	Bakterien
BAP	Blutagarplatte
<i>blaA</i>	β -Laktamase-Gen A
BlaA	β -Laktamase A
<i>blaB</i>	β -Laktamase-Gen B
BlaB	β -Laktamase B
bp	Basenpaare

C

CASO-Agarplatte	Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agarplatten
<i>C. freundii</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
Coryn.	Corynebakterien

D

DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	di-Nukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

E

<i>E. cloacae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESBL	Extended Spectrum β -Laktamasen
EU	Europäische Union

H

HHR	Hemmhofradius
HWZ	Halbwertszeit

I

IP	isoelektrischer Punkt
----	-----------------------

K

KbE	Kolonie bildende Einheit
kDa	Kilodalton
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

L

List.	Listerien
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität

M

MG	Molekulargewicht
MH-Agar	Müller-Hinton-Agar
MH-Bouillon	Müller-Hinton-Bouillon
mM	Millimol

N

nm	Nanometer
Nr.	Nummer
n	Anzahl der Proben

O

OD optische Dichte

P

Past. Pastorellen

PBP's Penicillin-bindende-Proteine

PC-Agar Plate-Count-Agar

PCR Polymerase-Chain-Reaction /Polymerase-Ketten-Reaktion

pmol Picomol

P. aeruginosa *Pseudomonas aeruginosa**P. cepacia* *Pseudomonas cepacia***R**

RKI Robert Koch Institut

RT Raumtemperatur

S*S. aureus* *Staphylococcus aureus*

Staph. Staphylokokken

Strep. Streptokokken

T

Tab. Tabelle

Tic Ticarcillin

Y*Y.* *Yersinia**Y. enterocolitica* *Yersinia enterocolitica* μg Mikrogramm 10^{-6} g μl Mikroliter 10^{-6} l μM Mikromol

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	S. 1
2. Literaturübersicht	S. 3
2.1 β -Laktam-Antibiotika	S. 3
2.1.1 Definition	S. 3
2.1.2 Einteilung von β -Laktam-Antibiotika	S. 3
2.1.3 Wirkungsweise von β -Laktam-Antibiotika	S. 8
2.1.4 Verbrauch von β -Laktam-Antibiotika	S. 9
2.1.5 β -Laktamase-Inhibitoren	S. 11
2.1.6 Resistenzen	S. 14
2.2 β -Laktamasen	S. 17
2.2.1 Definition	S. 17
2.2.2 Einteilung von β -Laktamasen	S. 19
2.2.2.1 Einteilung nach Ambler	S. 19
2.2.2.2 Einteilung nach Bush, Jacoby und Medeiros	S. 22
2.2.3 β -Laktamasen bei grampositiven und gramnegativen Bakterien	S. 26
2.2.4 β -Laktamasen bei <i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3	S. 27
2.2.5 Expressionsregulation der AmpC β -Laktamasen	S. 30
2.2.6 β -Laktamasen bei anderen <i>Y. enterocolitica</i> Biotypen	S. 34
2.3 <i>Y. enterocolitica</i>	S. 36
2.3.1 Einteilung von Yersinien	S. 36
2.3.2 Epidemiologie	S. 38
2.3.3 Klinik der Yersiniose	S. 41
2.3.4 Therapie von Yersiniose	S. 42
2.4 Agardiffusionstest	S. 42
2.5 Polymerase-Ketten-Reaktion	S. 45

3. Material und Methoden	S. 47
3.1 Material	S. 47
3.1.1 Herkunft und Anzahl der zu untersuchenden Bakterienstämme	S. 47
3.1.1.1 <i>Y. enterocolitica</i> Stämme	S. 47
3.1.1.2 Kontrollstämme	S. 48
3.1.2 Material für den Agardiffusionstest	S. 49
3.1.3 Material für die Polymerase-Ketten-Reaktion	S. 49
3.2 Methoden	S. 51
3.2.1 Anzuchtbedingungen für die Bakterien- und Referenzstämme	S. 51
3.2.2 Einstellung der Bakteriendichte	S. 51
3.2.3 Ergebnisse der Einstellung der Bakteriendichte	S. 55
3.2.4 Durchführung des Agardiffusionstests	S. 56
3.2.5 Polymerase-Ketten-Reaktion	S. 60
3.2.5.1 DNA-Extraktion	S. 60
3.2.5.2 PCR-Ansatz und DNA-Amplifikation	S. 60
3.2.5.3 Agarosegelelektrophorese	S. 61
4. Ergebnisse	S. 63
4.1 Ergebnisse des Agardiffusionstests	S. 63
4.2 Ergebnisse der Polymerase-Ketten-Reaktion	S. 73
4.3 Vergleich der Ergebnisse des Agardiffusionstests und der Polymerase-Ketten-Reaktion	S. 74
5. Diskussion	S. 75
6. Zusammenfassung	S. 83

7. Summary	S. 85
8. Literaturverzeichnis	S. 87
9. Tabellenverzeichnis	S. 116
10. Abbildungsverzeichnis	S. 119
11. Anhang	S. 120
12. Danksagung	S. 140
13. Lebenslauf	S. 142

1. EINLEITUNG

Mit der Entdeckung des Penicillins durch Alexander Fleming im Jahr 1929 wurde ein großer Durchbruch in der Bekämpfung bakterieller Infektionen erreicht, der zu einer schnellen Weiterentwicklung und kommerziellen Nutzung von Antibiotika seit den 40er Jahren führte. Dem großen Nutzen des Penicillins und der entwickelten β -Laktam-Antibiotika steht besonders die große Zunahme und Selektion von resistenten Mikroorganismen gegenüber, da die Entwicklung von Resistenzen die Wirksamkeit von Antibiotikatherapien erheblich einschränkt. Besonders der extensive und unkontrollierte Einsatz von β -Laktam-Antibiotika in der Human- und Veterinärmedizin wird für die rasante Zunahme der Resistenzbildung verantwortlich gemacht.

Bakterien verfügen über verschiedene Mechanismen, die sie gegen eine Antibiotikawirkung schützen. Neben einer Permeabilitätsänderung der Bakterienmembran gegenüber Antibiotika oder der Konformationsänderung Penicillin-Bindender-Proteine (PBP's) in der Bakterienzelle, stellt die Bildung von chromosomal- oder plasmidal-kodierten β -Laktamasen den bedeutendsten Resistenzmechanismus gegen β -Laktam-Antibiotika dar. Diese Enzyme sind in der Lage, die antibakterielle Wirkung der β -Laktam-Antibiotika aufzuheben, indem sie den β -Laktam-Ring dieser Antiinfektiva zerstören.

Die Bildung von β -Laktamasen ist bei grampositiven und besonders bei gramnegativen Bakterien weit verbreitet. Auch der humanpathogene *Yersinia (Y.) enterocolitica* Bioserotyp 4/O:3 besitzt diesen Resistenzmechanismus. Dieser Bioserotyp exprimiert regelmäßig zwei chromosomal-kodierte β -Laktamasen, die β -Laktamasen A und B. Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass in Europa vorkommende *Y. enterocolitica* 4/O:3-Stämme beide β -Laktamasen exprimieren, während *Y. enterocolitica* 4/O:3 Stämme aus Australien und Neuseeland nur eines der beiden Enzyme besitzen. Dennoch konnte in einer Studie eine Amoxicillin/Clavulansäure-Empfindlichkeit bei *Y. enterocolitica* Stämmen aus Bayern ermittelt werden.

Y. enterocolitica Bioserotyp 4/O:3 zählt zu den wichtigsten humanpathogenen Yersinien in Deutschland. Diese Bakteriengruppe stellt einen bedeutenden Zoonoseerreger dar, der Gastroenteritiden sowie Gelenkentzündungen hervorrufen kann. Die Epidemiologie von *Y. enterocolitica*-Infektionen ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Dennoch gilt das Schwein als Hauptreservoir. Besonders die unvollständige Entfernung der Tonsillen bei der Schweineschlachtung gilt als Hauptübertragungsursache. Somit ist *Y. enterocolitica* 4/O:3 nach *Campylobacter* und *Salmonella* einer der wichtigsten Lebensmittelinfektionserreger.

Ziel dieser Studie ist die Untersuchung des Vorkommens der β -Laktamase-Gene *blaA* und *blaB* mittels konventioneller PCR-Methode und der Nachweis der Expression der β -Laktamasen A und B mittels Agardiffusionstest bei 200 aus Bayern isolierten *Y. enterocolitica* 4/O:3 Stämmen, von denen 60 humanen und 140 Stämme porcinen Ursprungs sind. Damit sollte die in einer vorangegangenen Studie ermittelte Empfindlichkeit dieser Stämme gegen Amoxicillin/Clavulansäure (20/10 μ g) überprüft werden.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1 β -Laktam-Antibiotika

2.1.1 Definition

1929 entdeckte Alexander Flemming eine Hemmung des Bakterienwachstums durch Kulturen des Schimmelpilzes *Penicillium notatum*. Er fand heraus, dass die Pilzkulturen einen Stoff bilden, der heute als Penicillin bekannt ist. Ausgehend von diesem Natur-Antibiotikum entwickelten H. W. Florey und E. B. Chain viele Antibiotika-Derivate, denen ein einheitliches Grundgerüst zu Grunde liegt, dem 4-gliedrigen β -Laktam-Ring. Der namensgebende Ring ist für die antibiotische Wirkung dieser Antiinfektiva verantwortlich. Ihre bakterizide Wirkung beruht auf einer Hemmung der Bakterienzellwandbiosynthese bei grampositiven und gramnegativen Bakterien (KNOTT-HUNZIKER et al., 1982; MUTSCHLER und SCHÄFER-KORTING, 1996; HANDAL und OLSEN, 2000). Das Wirkspektrum der β -Laktam-Antibiotika differiert sehr stark. Während die Breitband- β -Laktam-Antibiotika gegen grampositive und gramnegative Bakterien wirken, sind die Schmalband- β -Laktam-Antibiotika oft nur gegen grampositive oder gramnegative Bakterien oder nur gegen einzelne Erreger aktiv. β -Laktam-Antibiotika zählen zu den wichtigsten Antiinfektiva in der Human- und Veterinärmedizin (LI et al., 2007). Zu den Vertretern der β -Laktam-Gruppe zählen die Penicilline, Cephalosporine, Carbapeneme und Monobactame (MUTSCHLER und SCHÄFER-KORTING, 1996).

2.1.2 Einteilung von β -Laktam-Antibiotika

Wie zuvor erwähnt umfassen die β -Laktam-Antibiotika die Substanzgruppen Penicilline, Cephalosporine, Carbapeneme und Monobactame (Abb.1 und Tab. 1). Nachfolgend werden die Charakteristika und Wirkspektren der einzelnen Klassen kurz dargestellt. Nähere Informationen zum biochemischen Aufbau können bei MUTSCHLER und SCHÄFER-KORTING (1996) oder KROKER et al. (2001) nachgelesen werden.

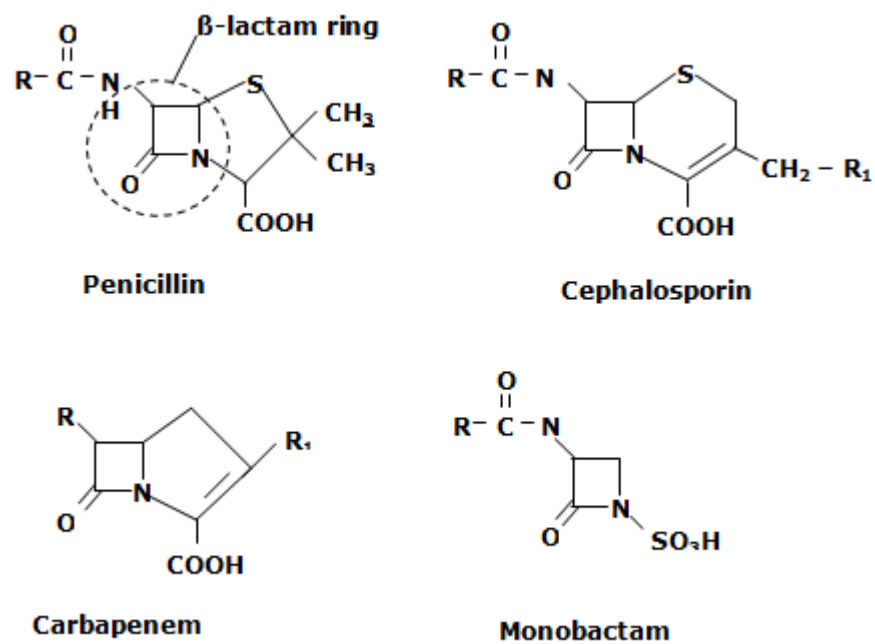


Abbildung 1: Strukturelle Darstellung der 4 Substanzgruppen der β -Laktam-Antibiotika (nach TODAR, 2008)

Penicilline

Das erste Antibiotikum dieser Gruppe ist das Penicillin G (Benzylpenicillin). Es wurde aus Schimmelpilzkulturen des *Penicillium notatum* gewonnen (LÜLLMANN et al., 2004) und als erstes Antibiotikum bereits in den Jahren 1940-41 klinisch erprobt (FLUIT et al., 2001; KROKER, 2002). Penicillin G ist nur bei grampositiven Bakterien wirksam, da es die Zellmembran gramnegativer Bakterien nicht durchdringen kann (KROKER et al., 2001). Die über 50 entwickelten Penicillin-Antibiotika-Derivate (Tab. 1) unterscheiden sich aufgrund ihrer Substituenten voneinander. Sie besitzen im Vergleich zum Penicillin G eine höhere Säurefestigkeit und können dadurch oral verabreicht werden. Wegen ihrer höheren β -Laktamase-Stabilität weisen sie zusätzlich ein breiteres Wirkspektrum auf (MUTSCHLER und SCHÄFER-KORTING, 1996). Auf diese Weise sind Penicilline, wie Amoxicillin oder Ampicillin auch gegen einige *Enterobacteriaceae*

wirksam. Trotz der großen Anzahl an Penicillinen ist Benzylpenicillin noch bei vielen Indikationen Mittel der ersten Wahl (KROKER et al., 2001). Um die Stabilität der Penicilline weiter zu erhöhen, werden sie oft in Kombination mit Penicillinase-Inhibitoren verabreicht (LÜLLMANN et al., 2004) (siehe Kapitel 2.1.5). Beim Einsatz von Penicillinen treten in der Regel keine toxischen Nebenwirkungen auf. Eine Ausnahme stellen allergische Reaktionen dar, die individuell ausgeprägt sein können (MUTSCHLER und SCHÄFER-KORTING, 1996).

Cephalosporine

Die Ursprungssubstanz der Cephalosporine ist das Cephalosporin C, welches aus dem Pilz *Acremonium chrysogenum* gewonnen wurde. Es ist wegen seiner schwach antibiotischen Wirkung therapeutisch nicht von Bedeutung (MUTSCHLER und SCHÄFER-KORTING, 1996). Cephalosporine sind aufgrund ihrer zeitlichen Entwicklung in 4 Generationen unterteilt (Tab. 1). Im Vergleich zu ihrem natürlichen Vertreter besitzen sie eine höhere Wirkungsintensität, eine größere β -Laktamasestabilität und ein breiteres Wirkungsspektrum (MUTSCHLER und SCHÄFER-KORTING, 1996; LÜLLMANN et al., 2004). Ihre Eigenschaften steigen dabei mit der Cephalosporingeneration (BERGOGNE-BEREZIN, 1989). Durch eine Hemmung der Transpeptidase während der Zellteilung wirken die halbsynthetischen Derivate der Cephalosporine wie Penicilline (KROKER, 2002). In Bezug auf ihre klinische Anwendung gelten Cephalosporine als säurestabil, aber schlecht resorbierbar (LÜLLMANN et al., 2004). Wie die Penicilline sind Cephalosporine wenig toxisch. Die bei älteren Substanzen beobachtete nierenschädigende Wirkung tritt bei neueren Präparaten nicht mehr auf (MUTSCHLER und SCHÄFER-KORTING, 1996). Trotzdem sollten Cephalosporine bei Patienten mit bereits bestehender Niereninsuffizienz nicht eingesetzt oder während einer Therapie mit diesen Substanzen zumindest regelmäßige Nierenfunktionskontrollen durchgeführt werden. Allergische Reaktionen treten bei behandelten Patienten nur gelegentlich auf (MUTSCHLER und SCHÄFER-KORTING, 1996).

Carbapeneme

Carbapeneme ähneln in ihrer Struktur stark den Penicillinen. Das Molekül basiert auf dem Naturstoff Thienamycin, der aus dem Pilz *Streptomyces cattleya* gewonnen wurde. Dieser Naturstoff erwies sich als sehr instabil, weshalb nur wenige Carbapeneme entwickelt werden konnten (EDWARDS et al., 1989). Von den β -Laktam-Antibiotika besitzen Carbapeneme das breiteste Wirkspektrum, da sie die Vorteile von Penicillinen und Cephalosporinen in sich vereinen. Ihre Empfindlichkeit gegenüber β -Laktamasen ist sehr gering. In-vivo kann ihre Aktivität dennoch herabgesetzt sein, da sie durch eine renale Dipeptidase inaktiviert werden können (MUTSCHLER und SCHÄFER-KORTING, 1996). Imipenem war das erste klinisch verfügbare Carbapenem. Aufgrund einer geringen Resistenzlage gegenüber diesem Wirkstoff gilt es als Reserve-Antibiotikum (BERGOGNE-BEREZIN, 1989; LIVERMORE und WOODFORD, 2006). Carbapeneme weisen dieselben Nebenwirkungen wie die anderen β -Laktam-Antibiotika auf, können aber bei höheren Dosierungen zusätzlich potentiell nephrotoxisch wirken (MUTSCHLER und SCHÄFER-KORTING, 1996).

Monobactame

Monobactame sind durch gramnegative Bakterien gebildete und synthetisch modifizierte monozyklische β -Laktam-Antibiotika (MUTSCHLER und SCHÄFER-KORTING, 1996). Sie wurden erst 1980 in die Gruppe der β -Laktam-Antibiotika aufgenommen (SKLAVUNU-TSURUTSOGLU et al., 1989). Der einzige Vertreter dieser Gruppe ist das vollständig synthetisch hergestellte Aztreonam. Es ist seit 1985 in Deutschland als therapeutisch zugelassenes Monobactam verfügbar (N.N., 1985). Es besitzt keinen Einfluss auf grampositive Bakterien und Anaerobier, weist aber eine hohe Wirksamkeit gegen gramnegative Bakterien auf (N.N., 1985; MUTSCHLER und SCHÄFER-KORTING, 1996). Wegen der fehlenden Wirkung auf grampositive Erreger ist die Anwendung auf Infektionen mit Monobactam-empfindlichen Enterobakterien und Pseudomonaden begrenzt (MUTSCHLER und SCHÄFER-KORTING, 1996). Da Monobactame im Magen-Darmtrakt nicht resorbierbar sind, müssen sie parenteral verabreicht werden. Neben allergischen Reaktionen können Monobactame gastrointestinale Störungen verursachen.

Tabelle 1: Einteilung der β -Laktam-Antibiotika (modifiziert nach MUTSCHLER und SCHÄFER-KORTING, 1996; KROKER et al., 2001)

β -Laktam-Antibiotika Klasse	Untergruppen	Beispielwirkstoffe	Eigenschaften/Wirksamkeit	
Penicilline	β -Laktamase-sensitive Penicilline	Penicillin G (Benzylpenicillin)	v.a. grampositive B. (Staph., Strep., Coryn., List.), auch Past.; gramnegative Anaerobier; β -Laktamase-instabil; säurelabil; keine orale Anw.; extrazelluläre Verteilung; kurze HWZ	
	β -Laktamase-resistente Penicilline	Flucloxacillin Oxacillin Methicillin	v.a. grampositive B.; β -Laktamase-stabil; gegenüber Staph. β -Laktamase 50-250fach stabiler als Penicillin G; orale Gabe möglich	
	Breitbandpenicilline	Amoxicillin Ampicillin Ticarcillin	2-5 mal schlechter gegen grampositive B., 4-10mal besser gegen gramnegative B.; β -Laktamase-instabil; orale Gabe möglich; kurze HWZ; Amo und Ampi gleiches Wirkspektrum; Ampicillin schlechter resorbierbar, Tic nicht säurestabil	
	Cephalosporine	1. Generation (ohne erhöhte β -Laktamase-Stabilität)	Cefalotin Cefradin Cefazolin	gegen grampositive B.; schwach gegen gramnegative B.; β -Laktamase-instabil; verbesserte β -Laktamase-Stabilität steigend von 1-4
		2. Generation (mit erhöhter β -Laktamase-Stabilität)	Cefalexin Cefotiam Cefoxitin	gegen grampositive B.; besser gegen Enterobakterien; z. T. gegen <i>P. aeruginosa</i> ,
		3. Generation	Cefotaxim Ceftizoxim Ceftazidim	
4. Generation			Cefpirom Cefepim	
Carbapeneme		Imipenem Ertapenem Meropenem	hohe Wirksamkeit gegen fast alle β -Laktamasen, (auch gegen <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> und Anaerobier), β -Laktamase-stabil	
	Monobactame	Aztreonam	hohe Wirksamkeit gegen β -Laktamasen	

Amo: Amoxicillin; Amp: Ampicillin; Anw.: Anwendung; B.: Bakterien; Coryn.: Corynebakterien; HWZ: Halbwertszeit; List.: Listerien; Past.: Pastorellen; *P. aeruginosa*: *Pseudomonas aeruginosa*; Staph.: Staphylokokken; *S. aureus*: *Staphylococcus aureus*; Strep.: Streptokokken; TIC: Ticarcillin

2.1.3 Wirkungsweise von β -Laktam-Antibiotika

β -Laktam-Antibiotika gelten unter der Vielzahl von antimikrobiellen Substanzen als klinisch sicher und zuverlässig und finden daher in der Human- und Veterinärmedizin große Anwendung (LIVERMORE, 1998; HANDAL und OLSEN, 2000; LIVERMORE und WOODFORD, 2006; LI et al., 2007).

Die antibakterielle Wirkung der β -Laktam-Antibiotika beruht auf der Inhibition der Zellwandsynthese während der bakteriellen Zellteilung. Bei der Zellwandsynthese ist eine D-Alanin-Transpeptidase für die Quervernetzung von Peptidoglykanketten, dem so genannten Murein, verantwortlich. Das Murein ist ein essentieller Bestandteil der bakteriellen Zellwand. Es hält die Bakterienzelle in Form und schützt sie so vor der osmotischen Lyse (JACOBS et al., 1997). β -Laktam-Antibiotika werden aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit den Peptidoglykanbausteinen von den Transpeptidasen in ihrem aktiven Zentrum gebunden. Unter Öffnung des β -Laktam-Rings blockieren die β -Laktame die Transpeptidasen, so dass die Zellwandsynthese irreversibel inhibiert wird (MUTSCHLER und SCHÄFER-KORTING, 1996; KROKER, 2002). Infolge dessen bleibt die Bildung des für die Stabilität der Bakterienzelle essentiellen Mureins aus (KROKER, 2002). Der hohe intrazelluläre osmotische Druck in der Bakterienzelle und das Fehlen der stabilisierenden Mureinschicht (KROKER et al., 2001) führt zum Anschwellen und schließlich zum Platzen der Bakterien (LÜLLMANN et al., 2004). Die β -Laktame wirken somit auf wachsende und sich vermehrende Keime bakterizid (MUTSCHLER und SCHÄFER-KORTING, 1996; LÜLLMANN et al., 2004). Da menschliche und tierische Zellen keine bakterielle Zellwand und auch kein Murein besitzen, eignen sich β -Laktam-Antibiotika besonders als Therapeutika für die Human- und Veterinärmedizin.

β -Laktam-Antibiotika können zusätzlich Verbindungen mit Enzymproteinen eingehen, die als Penicillin-Bindende-Proteine (PBP's) bezeichnet werden. Aufgrund dieser Verbindung verlieren die PBP's ihre enzymatischen Eigenschaften (MASSOVA und MOBASHERY, 1998; KROKER, 2002), was schließlich zur Zerstörung der Bakterien führt. Um eine solche Bindung eingehen zu können, müssen β -Laktam-

Antibiotika die Zellwand und den periplasmatischen Raum der Bakterienzelle durchdringen (BUSH und SYKES, 1986). Aufgrund des unterschiedlichen Zellwandaufbaues ist dies besonders bei grampositiven Bakterien möglich. Derzeit sind sieben solcher Proteine bekannt, die an der inneren Bakterienmembran lokalisiert sind (MUTSCHLER und SCHÄFER-KORTING, 1996).

2.1.4 Verbrauch von β -Laktam-Antibiotika

Die Entstehung bakterieller Resistenzen wird häufig auf einen extensiven und unkontrollierten Einsatz von Antibiotika zurückgeführt. Im Jahr 1996 wurden weltweit 270.000 Tonnen (t) veterinärmedizinische antimikrobielle Wirkstoffe verwendet, wovon 25% allein in der EU zum Einsatz kamen. Von diesem europäischen Anteil entfielen 50% auf die Therapie, 25% auf Fütterungsarzneimittel und 25% auf Futterzusatzstoffe (SCHWARZ und CHASLUS-DANCLA, 2001). Nach einer Studie der European Animal Health Association (FEDESA, 1999) lag der Gesamtverbrauch an Antiinfektiva in der EU im Jahr 1997 bei 10.493 t (Abb. 2). Davon betrug der Anteil des Humanbereiches 5.400 t (52%) und der Anteil des Veterinärbereiches 5.093 t (48%). Von den 5.093 t im Veterinärbereich sind 3.494 t (33%) für die Therapie und 1.599 t (15%) als Leistungsförderer eingesetzt worden. Die hohe Gesamtmenge an veterinärmedizinischen Antibiotika ist auf die notwendigen wirksamen Dosen pro Tier (10 bis 100 mg pro Kilogramm Körpergewicht) sowie auf die hohe Anzahl an Tieren, die in Deutschland gehalten werden, zurückzuführen. Pro Jahr werden in Deutschland ca. 41,5 Millionen (Mio.) Mastschweine zu 100 kg Körpergewicht gemästet und über 1 Mio. t Geflügelfleisch produziert. Dies entspricht rund einer Milliarde Masthähnchen. Hinzukommen über 3 Mio. Mastbullen, Kälber, Schafe und verschiedene andere Tierarten, die dem menschlichen Verzehr dienen (SCHNEIDEREIT, 2004).

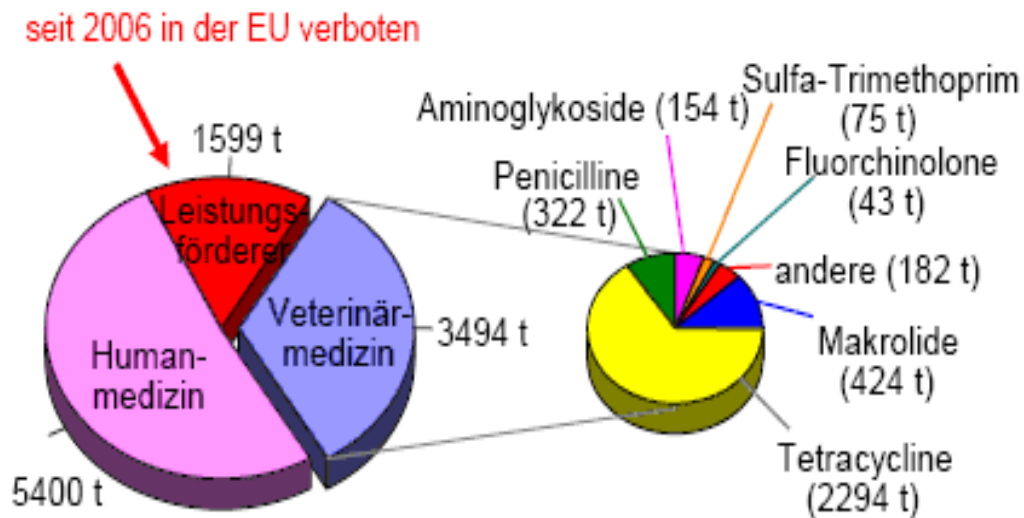


Abbildung 2: Verbrauch von antimikrobiell wirksamen Substanzen im Bereich Veterinärmedizin in der EU (inkl. Schweiz) 1997 (nach FEDESA/FEFANA, 1999)

Von den eingesetzten antimikrobiell wirksamen Substanzen wurden Tetracycline mit 66% am häufigsten verwendet, gefolgt von Makrolid-Antibiotika mit 12% und Penicillinen mit 9% (FEDESA; 1999). Tabelle 2 zeigt den Antibiotikaeinsatz in der Veterinärmedizin in Deutschland für die Jahre 2003 und 2005. Im Jahr 2003 betrug die Gesamtmenge an eingesetzten Antibiotika 742,2 t und stieg im Jahr 2005 auf insgesamt 784,4 t an.

In den Jahren 2003 und 2005 fanden die β -Laktam-Antibiotika nach den Tetracyclinen als zweithäufigste Antibiotikagruppe Anwendung. Im Jahr 1997 rangierten die Penicilline nach den Tetracyclinen und Makroliden noch an dritter Stelle (FEDESA, 1999). Im Vergleich zu 2003 stieg die β -Laktammenge zum Jahr 2005 um 44 t an. Der leichte Anstieg der Antibiotikamengen ist auf den Wegfall der antibiotischen Leistungsförderer und auf die Verschiebungen im Preisgefüge zugunsten generischer Wirkstoffe zurückzuführen. Besonders der Preisabfall bei Amoxicillinen trug zum vermehrten Einsatz der β -Laktam-Antibiotika bei (SCHNEIDERREIT, 2006).

Tabelle 2: Veterinärmedizinischer Einsatz von Antiinfektiva in Deutschland in t
(nach SCHNEIDERREIT, 2006)

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

2.1.5 β -Laktamase-Inhibitoren

Neben den β -Laktamase-stabilen β -Laktam-Antibiotika wurden β -Laktamase-Inhibitoren entwickelt, die eine weitere Möglichkeit zur Bekämpfung β -Laktamase-produzierender Bakterien bieten (COLE, 1980; KROKER et al., 2001). Derzeit gibt es die drei klinisch relevanten β -Laktamase-Inhibitoren Clavulansäure, Sulbactam und Tazobactam (KROKER et al., 2001), welche sich hinsichtlich ihres Wirkungsprinzips nicht unterscheiden (N.N., 1998). Auch hier beruht die Wirksamkeit auf dem Vorhandensein eines β -Laktam-Rings (KROKER, 2002) (Abb. 3).

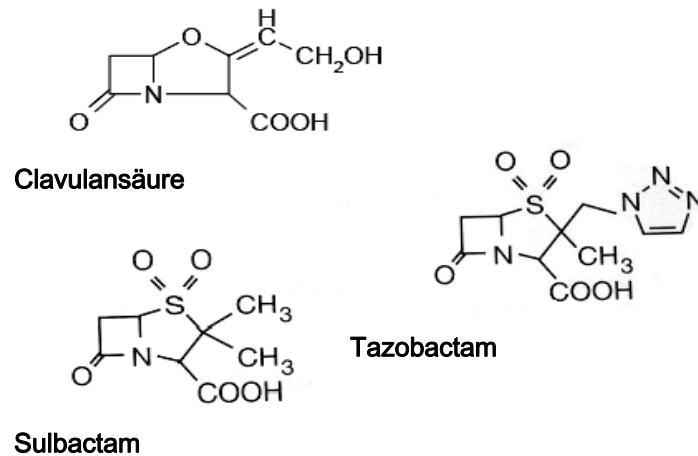


Abbildung 3: Strukturelle Darstellung der β -Laktamase-Inhibitoren
(nach MUTSCHLER und SCHÄFER-KORTING, 1996)

Im Gegensatz zu β -Laktam-Antibiotika sind β -Laktamase-Inhibitoren antibakteriell nicht wirksam. Die bakterielle Aktivität der Kombination aus β -Laktam-Antibiotika und β -Laktamase-Inhibitoren wird primär durch das Antibiotikum und nicht durch den Inhibitor bestimmt (N.N., 1998). β -Laktamase-Inhibitoren inhibieren die Wirkung von plasmid- und chromosomal-kodierten β -Laktamasen durch eine direkte und irreversible Bindung der Enzyme in ihrem aktiven Zentrum (TOMASZ, 1980; N.N., 1998; KROKER, 2002). Dadurch können β -Laktam-Antibiotika ihre volle antibakterielle Wirkung entfalten, ohne von den β -Laktamasen hydrolysiert zu werden. β -Laktamase-Inhibitoren sind besonders zur Kombination mit nicht β -Laktamase-stabilen β -Laktam-Antibiotika geeignet (MUTSCHLER und SCHÄFER-KORTING, 1996). Wirkungsvolle Kombinationen ergeben sich aus Clavulansäure mit Amoxicillin oder Ticarcillin, Sulbactam mit Piperacillin oder Ampicillin und Tazobactam mit Piperacillin (MASTERS et al., 1989; MUTSCHLER und SCHÄFER-KORTING, 1996; LIVERMORE, 1998; N.N., 1998). Die Hemmwirkung der drei β -Laktamase-Inhibitoren ist besonders bei plasmid-kodierten Enzymen ausgeprägt. Am effektivsten ist ihre hemmende Wirkung gegen β -Laktamasen von *S. aureus*, *Haemophilus influenza* und einigen *Enterobacteriaceae* (N.N., 1998), doch auch bei chromosomal-kodierten β -Laktamasen zeigen sie eine gute

hemmende Wirkung. Clavulansäure und Sulbactam sind potente Inhibitoren einer Reihe von β -Laktamasen, besonders von chromosomalen Enzymen der Klasse A, die von Aerobiern und anaeroben gramnegativen und grampositiven Bakterien gebildet werden (MASTERS et al., 1989). Klasse D β -Laktamasen werden zum Teil durch die Clavulansäure gehemmt (COLE, 1980; MUTSCHLER und SCHÄFER-KORTING, 1996). Sulbactam ist in der Lage, die meisten Formen der bakteriellen β -Laktamasen zu inhibieren, jedoch nicht die AmpC β -Laktamasen. Tazobactam hingegen hemmt die meisten plasmid-kodierten, allerdings weniger oder kaum chromosomal-kodierten Penicillinasen (MUTSCHLER und SCHÄFER-KORTING, 1996). In Tabelle 3 sind die Wirkungsgruppen der β -Laktamase-Inhibitoren und ihre möglichen Einsatzkombinationen aufgeführt.

Tabelle 3: Wirkungsgruppen der β -Laktamase-Inhibitoren und mögliche Einsatzkombinationen

β-Laktamase-Inhibitoren	Antibiotika-kombination	Inhibitionspotential
Clavulansäure	Amoxicillin Ticarcillin	fast alle Klasse A β -Laktamasen, z. T. Klasse D β -Laktamasen
Sulbactam	Piperacillin Ampicillin	fast alle β -Laktamasen, außer AmpC β -Laktamasen
Tazobactam	Piperacillin	fast alle plasmid-, kaum chromosomal-kodierte β -Laktamasen

2.1.6 Resistenzen

Der Einsatz antibakterieller Wirkstoffe bei bakteriellen Infektionen führt zu einer Hemmung des Bakterienwachstums oder gar zu einer Zerstörung der Bakterien. Bleibt der Einfluss auf die Bakterienvermehrung ohne Erfolg, spricht man von einer antimikrobiellen Resistenz (LÜLLMANN et al., 2004) gegenüber dieser Wirkstoffe.

Bei Betrachtung der Resistenzen unterscheidet man zwischen einer natürlichen und einer erworbenen Resistenz. Eine **natürliche Resistenz** beruht darauf, dass eine Bakterienart aufgrund ihrer Stoffwechseleigenschaften gegenüber antibakteriellen Wirkstoffen widerstandsfähig ist (LÜLLMANN et al., 2004). Zum Beispiel sind gramnegative Bakterien gegen Benzylpenicillin natürlich resistent, da Benzylpenicillin die Zellmembran dieser Bakterien nicht passieren kann (KROKER et al., 2001). *Y. enterocolitica* ist natürlich resistent gegen Penicilline, wie Benzylpenicillin, Carbenicillin, Oxacillin, Amoxicillin, Ampicillin, Ticarcillin und Cephalosporine, wie Cephalothin (PHAM et al., 1991a, 1991b, 1995a; PRESTON et al., 1994; STOLK-ENGELAAR et al., 1995; BOTTONI, 1997; STOCK und WIEDEMANN, 1998, 1999; BAUMGARTNER et al., 2007). Resistenzen gegen andere Antibiotika, wie Makrolide, Lincosamide, Teicoplanin, Erythromycin, Vancomycin, Rifampicin und Fusidinsäure werden ebenfalls bei ihnen beschrieben (STOCK und WIEDEMANN, 1998; Meyer, 2007).

Unter Einwirkung antibakterieller Wirkstoffe können aus ursprünglich empfindlichen Bakterienarten antibiotikaresistente Bakterienarten hervorgehen. Diese **erworbene Resistenz** kann zum einen eine Folge von Mutationen im Bakterienerbgut sein. Dabei steigt die Wahrscheinlichkeit für das Entstehen erworbener Resistenz gegen bestimmte Antibiotika an, je häufiger diese eingesetzt werden (LÜLLMANN et al., 2004). Eine solche Resistenz kann aber auch durch die Aufnahme von so genannten Resistenz-Plasmiden anderer resistenter Bakterien erfolgen (COURVALIN, 1996; LÜLLMANN et al., 2004). In diesem Fall spricht man von einer übertragbaren Resistenz, die in den meisten Fällen eine Resistenz gegenüber mehreren antibakteriellen Substanzen bewirkt

(KROKER, 2002). Die Aufnahme solcher Resistenzgene kann auf verschiedenste Weise erfolgen, wie z.B. durch die Aufnahme freier DNA (Transformation) von lysierten Bakterien, durch eine Gen-Übertragung mittels Bakteriophagen (Transduktion) oder im Anschluss an einen Zellkontakt (Konjugation) zwischen zwei Bakterien (KROKER et al., 2001).

Da die Resistenzentwicklung eine natürliche und unausweichliche Adaptation der Bakterienzellen an eine antibakterielle Behandlung ist (DAVISON et al., 2000), hat die Resistenzhäufigkeit weltweit bei fast allen wichtigen bakteriellen Infektionserregern zugenommen (KROKER et al., 2001). Die Antibiotikaresistenz wird heute als eine große Bedrohung der menschlichen Gesundheit betrachtet (NANDIVADA und AMYES, 1990; BgVV, 1996, 1997; MEDEIROS, 1997; DAVISON et al., 2000), da eine hohe Anzahl an Mikroorganismen aufgrund ihrer Resistenz bei Menschen und Tieren schwerer zu bekämpfen sind (LEVY, 2002). Das Verbot von Leistungsförderern in der Veterinärmedizin und der Preisabfall bei den β -Laktam-Antibiotika führten zu einer höheren und extensiveren klinischen Anwendung dieser Antibiotika in der Behandlung bakterieller Infektionen (NANDIVADA und AMYES, 1990; FLUIT et al., 2001, SCHNEIDERREIT, 2006). Dieser massive Einsatz erhöhte den Druck zur Bildung bakterieller Resistenzen. Innerhalb weniger Jahre führte die schnelle Entwicklung von β -Laktam-Antibiotikaresistenzen zu einem großen Problem, besonders bei Infektionen mit gramnegativen Bakterien (NANDIVADA und AMYES, 1990; MEDEIROS, 1997; MAJIDUDDIN et al., 2002; LI et al., 2007). Diese Resistenzentwicklung ist beunruhigend, da es normalerweise unter der Therapie mit β -Laktam-Antibiotika nur langsam zur Resistenzbildung kommt (MUTSCHLER und SCHÄFER-KORTING, 1996). ABRAHAM und CHAIN (1940) fanden bereits 1940 Zerstörungen von Penicillinen durch Bakterien, noch vor der klinischen Nutzung von Antibiotika. Ferner wurden 1954 die ersten Resistenzen infolge einer Antibiotikatherapie bei *S. aureus* gegenüber Penicillinen entdeckt (LEVY, 1992). Als Benzylpenicillin 1944 auf den Markt kam, waren 95% der *S. aureus*-Stämme empfindlich gegen diesen Wirkstoff. Schon wenige Jahre später waren es nur noch 50%. Heute gelten mehr als 90% resistent gegen

Benzylpenicillin (LIVERMORE, 1998). Die Bakterien entwickelten drei Hauptstrategien gegen die antibakterielle Wirkung von Antibiotika (BRZOSTEK und HREBENDA, 1988; NEU, 1992; LIVERMOORE, 1995; MAJIDUDDIN et al., 2002; LI et al., 2007). Gramnegative Bakterien weisen im Vergleich zu grampositiven Bakterien eine dünnere Mureinschicht auf, besitzen im Gegenzug dazu aber eine äußere Membran, die bei grampositiven Bakterien nicht vorhanden ist. Diese Membran ist in der Lage eine selektive Permeabilität, z.B. durch den Einsatz von Efflux-Pumpen zu bewirken (LI et al., 1994; KROKER et al., 2001; MAJIDUDDIN et al., 2002), die es den β -Laktam-Antibiotika erschwert, in die Bakterienzelle einzudringen (BUSH UND SYKES, 1986) und sie zu zerstören (JAFFE et al., 1982; LI et al., 1994; LIVERMORE, 1998). β -Laktam-Antibiotika können somit nur durch in der Bakterienmembran eingelagerte Porine in den periplasmatischen Raum eindringen. Bei Verlust oder Veränderung dieser Porine können die β -Laktame nicht mehr zu den Zielstrukturen vordringen, was wiederum eine verringerte Antibiotika-Empfindlichkeit der Bakterien zur Folge hat (JAFFE et al., 1982).

Die Veränderung der PBP's stellt eine weitere Strategie gegen die Wirkung von β -Laktam-Antibiotika dar. Durch die strukturelle Änderung der PBP's können diese nicht mehr von den β -Laktam-Antibiotika gebunden werden, womit eine Lyse der Bakterien unterbleibt (SPRATT, 1994; LIVERMORE, 1998; MAJIDUDDIN et al., 2002). Dieser Resistenzmechanismus ist insbesondere bei grampositiven Bakterien zu beobachten (LIVERMORE, 1998; LIVERMORE und WOODFORD, 2006).

Die Hauptursache der bakteriellen Resistenz gegen β -Laktam-Antibiotika ist aber auf die bakterielle Synthese von chromosomal- oder plasmidal-kodierten β -Laktamasen zurückzuführen. Diese Enzyme können den β -Laktam-Ring der β -Laktam-Antibiotika zerstören und damit ihre antimikrobielle Wirkung aufzuheben (KNOTT-HUNZIKER et al., 1982; SEEBERG et al., 1983; BUSH et al., 1995; FRÈRE, 1995; LIVERMORE, 1995, 1998; MEDEIROS, 1997; HERITAGE et al., 2001; MAJIDUDDIN et al., 2002).

Die Überanwendung von Antibiotika in der Humanmedizin und der Einsatz von Antibiotika in der Veterinärmedizin fördern die Ausbildung von Resistenzen (BgVV, 1997). Gerade in Entwicklungsländern ist die Resistenzsteigerung in der Humanmedizin zu beobachten. Aufgrund leichter Verfügbarkeit von Antiinfektiva und infolge geringer finanzieller Mittel werden Chemotherapeutika in diesen Ländern oft unkontrolliert, zu niedrig dosiert oder nicht ausreichend lang eingenommen. Die so erzielte unvollständige Erregerelimination begünstigt die Entstehung resistenter Bakterien (MUTSCHLER und SCHÄFER-KORTING, 1996). Die extensive und falsche Handhabung antimikrobieller Wirkstoffe führte aber auch in den Industrieländern zu einem raschen Anstieg der Resistenzbildung (siehe Kapitel 2.1.4). In der Veterinärmedizin werden Fütterungsarzneimittel (KROKER et al., 2001) und antimikrobielle Wirkstoffe als Leistungsförderer (HELMUTH und PROTZ, 1997) für den rasanten Anstieg der Resistenzen verantwortlich gemacht. Aus diesem Grund wurde von der Europäischen Union (EU) 2001 die „Mitteilung der Kommission über Strategie der Gemeinschaft zur Bekämpfung der Resistenz gegen antimikrobielle Mittel“ herausgegeben, in der Vorschläge zur Überwachung und Kontrolle von Resistenzen gemacht werden.

2.2 β -Laktamasen

2.2.1 Definition

Die ersten β -Laktamasen wurden von ABRAHAM and CHAIN 1940 bereits kurz vor dem weltweiten Einsatz von Penicillinen zur Behandlung von bakteriellen Infektionen entdeckt (BUSH UND SYKES, 1986). Während 1998 erst 190 verschiedene klinisch relevante β -Laktamasen beschrieben wurden (THEURETZBACHER, 1998), sind derzeit über 340 β -Laktamasen bekannt, die eine wichtige Rolle im Resistenzgeschehen gegen antimikrobielle Wirkstoffe spielen (BUSH, 2001; THEURETZBACHER, 2004). Sie zählen zu einer heterogenen Gruppe intrazellulärer Enzyme, die von verschiedenen Bakterienarten induziert oder permanent gebildet werden (BUSH et al., 1995; LIVERMORE, 1995). In ihrer Struktur und Wirkung ähneln sie den Transpeptidasen, die

für den Zellwandaufbau verantwortlich sind. Sie sind in der Lage den β -Laktam-Ring von β -Laktam-Antibiotika zu hydrolysieren und somit deren antibakterielle Wirkung aufzuheben (FRÈRE, 1995; MUTSCHLER und SCHÄFER-KORTING, 1996; HANDAL und OLSEN, 2000) (Abb. 4). Die genetische Information zur Bildung dieser Enzyme kann auf Chromosomen oder Resistenz-Plasmiden kodiert sein (MUTSCHLER und SCHÄFER-KORTING, 1996). Eine Vielzahl dieser Enzyme ist chromosomal-kodiert und wird erst nach Induktion durch β -Laktam-Antibiotika gebildet. Eine klinische Bedeutung erhalten diese induzierbaren β -Laktamasen, wenn sie durch eine Mutation in den regulatorischen Genen permanent exprimiert werden (BUSH et al., 1995).

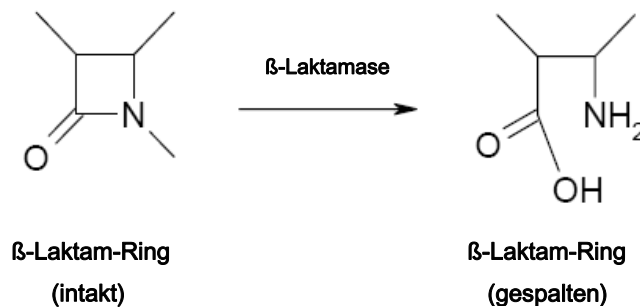


Abbildung 4: Spaltung des β -Laktam-Rings durch β -Laktamasen
(nach MUTSCHLER und SCHÄFER-KORTING, 1996)

Eine Weiterentwicklung der β -Laktamasen stellen die so genannten Extended-Spectrum- β -Laktamasen (ESBL) dar. Sie wurden erstmals 1983 beschrieben. ESBL entstehen durch Punktmutation herkömmlicher β -Laktamasen und sind in der Lage, ein größeres Spektrum an β -Laktamen zu spalten. Bakterien mit ESBL sind in der Regel gegen Penicilline, Cephalosporine und Monobactame resistent. Derzeit sind ESBL besonders bei gramnegativen Bakterien wie *Escherichia coli* (*E. coli*) und *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) bekannt (LIVERMORE und WOODFORD, 2006). Bei *Y. enterocolitica* konnte das Vorkommen von ESBL bisher nicht nachgewiesen werden. Die Gene der ESBL befinden sich hauptsächlich auf einem Plasmid, wodurch sie leicht von Bakterium zu Bakterium sowohl vertikal als auch horizontal weitergegeben werden können.

2.2.2 Einteilung von β -Laktamasen

Aufgrund ihrer Vielfältigkeit und ihrer charakteristischen enzymatischen und molekularen Eigenschaften wurden β -Laktamasen im Laufe der Jahre auf verschiedenste Weise eingeteilt. Die Einteilung begann mit der Unterscheidung der Enzyme in Penicillinasen, die eine gute Penizillinhydrolyseaktivität aufwiesen und in Cephalosporinasen, die besonders Cephalosporine hydrolysierten (BUSH et al., 1995). RICHMOND und SYKES (1973) teilten alle gramnegativen Bakterien hinsichtlich ihrer Substratspezifität in 5 Gruppen ein. Dieses Schema wurde durch SYKES und MATTHEWS (1976) erweitert, indem sie die β -Laktamasen mittels isoelektrischer Fokussierung unterschieden. Nachdem AMBLER (1980) die Einteilung der β -Laktamasen anhand ihrer Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz vornahm, fügten MITSUHASHI und INOUE (1981) zu den Kategorien Penicillinasen und Cephalosporinasen die Kategorie Cefuroxime-hydrolysierende β -Laktamasen hinzu. Erst 1989 entwickelte BUSH (1989a, 1989b, 1989c) auf der Grundlage von AMBLER (1980) eine Einteilung, die die β -Laktamasen aller Bakterien umfasste. Dabei sollte die Korrelation zwischen Substratprofil, Hemmbarkeit durch β -Laktamase-Inhibitoren und molekularer Struktur berücksichtigt werden. Aufgrund der rasanten Veränderung und Entdeckung weiterer β -Laktamasen wurde die Einteilung der Bush-Gruppen von BUSH et al. (1995) überarbeitet. Diese Einteilung gilt bisher als akzeptiertes Schema.

2.2.2.1 Einteilung nach Ambler

AMBLER (1980) unterteilte die β -Laktamasen aufgrund ihrer Aminosäure-Sequenz in die Ambler Klassen A-D (Abb. 5 und Tab. 4). Die Klassen A, C und D umfassen die Serin- β -Laktamasen und die Klasse B alle Metallo- β -Laktamasen.

Ambler Klasse A:

Diese β -Laktamasen kommen bei grampositiven und gramnegativen Bakterien vor. Zu ihren Hauptvertretern gehören die β -Laktamasen TEM und SHV. Die Bezeichnung TEM bezieht sich auf den Namen Temoniera eines griechischen Patienten, bei dem das Enzym entdeckt wurde. SHV stammt von der Bezeichnung SulpHydrylVariable (ZEBA,

2005). TEM- β -Laktamasen zählen zu den weit verbreitetsten plasmid-kodierten β -Laktamasearten. Die plasmid-kodierte β -Laktamase TEM-1 wurde bereits in den frühen 1960ern in Europa bei *E. coli*-Stämmen beschrieben (DATTA und KONTOMICHALOU, 1965). Danach wurde TEM-1 in immer mehr Bakterienstämmen, wie *P. aeruginosa*, *Haemophilus influenza* oder *Neisseria gonorrhoeae* nachgewiesen (LIVERMORE, 1998; BRADFORD, 2001). Derzeit stellt die TEM-1 β -Laktamase die häufigste isolierte β -Laktamase aus humanen klinischen Isolaten dar. Sie wird in gleichem Maße von grampositiven und gramnegativen Bakterien gebildet (LIVERMORE, 1995). Etwa 50-96% der Ofampicillin-resistenten *E. coli*-Stämme besitzen diese β -Laktamase (HUOVINEN et al, 1988; LIVERMORE, 1995). TEM-1, TEM-2 und TEM-3 gehören zu den häufigsten plasmid-kodierten β -Laktamasen bei gramnegativen Bakterien der Familie *Enterobacteriaceae* (HUOVINEN et al., 1988; BRIÑAS et al., 2002). Etwa zur selben Zeit wie das TEM-1 Enzym wurde auch das SHV-1 Enzym entdeckt, das ebenfalls plasmid-kodiert ist. SHV-1 kam ursprünglich nur bei *Klebsiella* spp. vor und war hier chromosomal-kodiert (HAEGGMAN et al., 1997; CHAVES et al., 2001; ZEBA, 2005). Infolge des massiven und intensiven Einsatzes von β -Laktam-Antibiotika entstanden aufgrund von Mutationen mehr als Hundert Variationen des ursprünglichen TEM-Enzyms und mehr als 20 Variationen des SHV-Enzyms (MAJIDUDDIN et al., 2002; LIVERMORE und WOODFORD, 2006). Die TEM-Enzymvarianten treten hauptsächlich bei *E. coli*-Stämmen auf, während SHV-Enzyme bei *K. pneumoniae* vorherrschend sind (ZEBA, 2005). Die β -Laktamase A von *Y. enterocolitica* ist chromosomal-kodiert und gehört ebenfalls zu den Ambler Klasse A Enzymen (SEOANE et al., 1992).

Ambler Klasse B:

Die Ambler Klasse B unterscheidet sich strukturell und funktionell eindeutig von den anderen drei Ambler Klassen. In ihrem aktiven Zentrum besitzen diese Enzyme ein bis zwei Zink-Ionen, während bei den anderen 3 Klassen ein Serin-Ion vorhanden ist (MAJIDUDDIN et al., 2002; ZEBA, 2005). Aus diesem Grund werden diese β -Laktamasen auch Metallo- β -Laktamasen genannt (LIVERMORE, 1995). Sie sind gegen Penicilline, Cephalosporine und Carbapeneme im gleichen Maße aktiv

(FLUIT et al., 2001). Wichtige Vertreter sind L1 von *Xanthomonas maltophilia* und CcrA von *Pseudomonas cepacia* (*P. cepacia*) (ZEBA, 2005).

Ambler Klasse C:

Die Hauptvertreter dieser Gruppe sind die chromosomal-kodierten AmpC β -Laktamasen. Diese Enzyme sind in der Regel induzierbar und hoch aktiv gegen die 1. und 2. Generation der Cephalosporine (ZEBA, 2005). Die AmpC-Familie zeichnet sich durch große genetische Diversität aus. Viele Enterobakterien besitzen von Natur aus chromosomale *ampC*-Gene. Jedem AmpC-Cluster liegt ein chromosomales „Ursprungs“-AmpC-Enzym zugrunde, von dem sich Plasmid-kodierte AmpC β -Laktamasen ableiten (PFEIFER, 2007). Die β -Laktamase B (BlaB) von *Y. enterocolitica* ist ein chromosomal-kodiertes, induzierbares Enzym und gehört daher zu den AmpC β -Laktamasen (SEOANE et al., 1992).

Ambler Klasse D:

Ihr Hauptenzym ist das OXA, das in der Lage ist, Oxacillin zu hydrolysieren (ZEBA, 2005). Diese Klasse umfasst mehr als 30 Varianten des OXA-Enzyms. In der Regel kommt es bei *P. aeruginosa* vor (FLUIT et al., 2001; ZEBA, 2005).

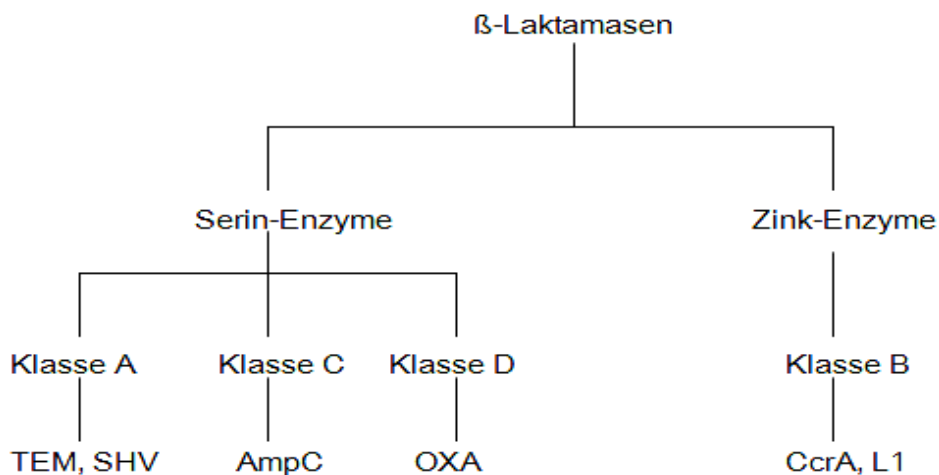


Abbildung 5: Klassifizierung der β -Laktamasen (nach AMBLER, 1980)

2.2.2.2 Einteilung nach Bush, Jacoby und Medeiros

BUSH (1989a) und BUSH et al. (1995) teilten im Vergleich zu AMBLER (1980) die bereits identifizierten β -Laktamasen aufgrund ihrer charakteristischen Funktion unter Berücksichtigung ihres Substratspektrums und ihrer Hemmbarkeit durch Inhibitoren in 4 Gruppen neu ein (Tab. 4). Da für die Auswahl eines geeigneten Antibiotikums die Substratspezifität wichtig ist, wird heute mehr auf die Einteilung der β -Laktamasen nach BUSH, JACOBY und MEDEIROS (BUSH et al., 1995) als auf die Einteilung nach AMBLER (1980) zurückgegriffen. Im Folgenden wird ein Überblick über die einzelnen Gruppen gegeben.

Bush Gruppe 1:

Die β -Laktamasen der Bush-Gruppe 1 entsprechen als einzige der Ambler Klasse C. Die Hauptvertreter dieser Gruppe sind die AmpC-Enzyme. Sie hydrolysieren fast alle Cephalosporine, außer dem Cefepim und dem Cefpirom (Wiegand, 2003). Auch Carbapeneme können nicht von ihnen hydrolysiert werden (BUSH, 1989a, 1989b; Wiegand, 2003). Um eine Wirkung hervorrufen zu können, müssen die β -Laktamasen dieser Gruppe in ausreichender Menge produziert werden (LIVERMORE, 1998). β -Laktamase-Inhibitoren zeigen bei dieser Gruppe kaum eine Wirkung (BUSH, 1989b). Die AmpC β -Laktamasen können plasmidal- oder chromosomal-kodiert sein. Da ihre Hauptvertreter überwiegend chromosomal-kodiert sind und bei gramnegativen Bakterien vorkommen (BUSH, 1989b), besitzen diese Enzyme eine große klinische Relevanz (LIVERMORE, 1995). Bei den chromosomal-kodierten *ampC*-Genen ist eine Induktion für die Bildung unbedingt nötig (BUSH, 1989b). In den späten 1980er Jahren wurden chromosomal-kodierte AmpC auch auf Plasmiden nachgewiesen (PHILIPPON et al., 2002). Diese plasmid-kodierten AmpC-Enzyme besaßen aber keine Induktionseigenschaften und wurden somit permanent exprimiert. Sie können von Bakterium zu Bakterium weitergegeben werden, die diese β -Laktamasen vorher nicht besaßen. Besonders *E. coli*, *Klebsiella* spp. und *Salmonella* spp. können Träger solcher plasmid-kodierten β -Laktamasen sein (HANSON, 2003). Die plasmid-kodierten AmpC β -Laktamasen werden in großen Mengen exprimiert (PHILIPPON et al., 2002).

Bush Gruppe 2:

Die Bush Gruppe 2 enthält eine Vielzahl von β -Laktamasen mit unterschiedlichen Substratprofilen und ist daher in die Gruppen 2a bis 2f unterteilt. Mit Ausnahme der Untergruppe 2d gehören alle β -Laktamasen der Gruppe 2 in die Ambler Klasse A (BUSH, 1989a). Alle Gruppen sind durch Clavulansäure hemmbar. Eine Ausnahme stellt die Untergruppe 2br dar. Von der Bush-Gruppe 2 sind besonders die Gruppen 2a, 2b und 2d sind bereits klinisch relevant (WIEGAND, 2003).

Die β -Laktamasen der **Gruppe 2a** zählen zu den klassischen Penicillinasen (BUSH, 1989a) und kommen hauptsächlich bei grampositiven Bakterien vor (BUSH, 1989b). Sie sind in der Lage Penicilline zu hydrolysieren und können selbst durch Clavulansäure gehemmt werden.

Die **Gruppe 2b** ist weltweit verbreitet und umfasst die traditionellen Breitband- β -Laktamasen, da sie die Fähigkeit besitzen, die meisten Penicilline und Cephalosporine zu hydrolysieren. Wie Gruppe 2a können sie durch β -Laktamase-Inhibitoren gehemmt werden. Innerhalb dieser Gruppe spielen die Enzyme TEM-1 und SHV-1 eine besondere klinische Rolle (BUSH, 1989a, 1989b). Aufgrund von Mutationen entstanden in dieser Gruppe neue β -Laktamasen, die in den Gruppen 2be und 2br zusammengefasst wurden (BUSH, 1989b).

Die **Gruppe 2c** umfasst die Carbenicillinasen aus der Gruppe der Penicillinasen. Sie können Carbenicillin gut spalten, doch Cloxacillin und Oxacillin hingegen schlecht. Eine Hemmung durch den β -Laktamase-Inhibitor Clavulansäure ist möglich. Vertreter dieser Gruppe sind die in *P. aeruginosa* vorkommenden Enzyme PSE-1, PSE-3 und PSE-4 (BUSH, 1989b). Klinisch gesehen ist diese Gruppe nicht sehr relevant (WIEDEMANN, 2003).

Die β -Laktamase **Gruppe 2d** gehört als einzige der Gruppe 2 in die Ambler Gruppe D. Zu den wichtigsten Vertretern zählen die OXA-Enzyme (BUSH, 1989b), da sie die Antibiotika Carbenicillin, Cloxacillin und Oxacillin gleich gut hydrolysieren können. Eine Hemmung der β -Laktamasen durch Clavulansäure erfolgt nur schwach.

Die beiden **Gruppen 2e und 2f** umfassen alle β -Laktamasen, die bisher selten aufgetreten sind. In der Regel sind sie durch den β -Laktamase-Inhibitor Clavulansäure hemmbar. Aufgrund ihrer Aminosäuresequenz zählen diese β -Laktamasen zu der Ambler Klasse A (BUSH, 1989b).

Bush Gruppe 3:

Die Bush Gruppe 3 umfasst die Metallo-Enzyme und entspricht der Ambler Klasse B (BUSH, 1989b). Diese Enzyme besitzen ein bis zwei Zink-Ion in ihrem aktiven Zentrum und können alle β -Laktam-Antibiotika mit Ausnahme der Monobactame spalten. Die wichtigsten β -Laktamasen stellen in dieser Gruppe die L1-Enzyme dar, die in der Lage sind, Imipenem potent zu hydrolysieren. Diese β -Laktamasen können nicht durch β -Laktamase-Inhibitoren gehemmt werden (BUSH, 1989a, 1989b).

Bush Gruppe 4:

In dieser Gruppe sind alle Penicillinasen zusammengefasst, die den anderen Gruppen nicht zugeordnet werden können. Sie sind nicht durch Clavulansäure hemmbar (BUSH, 1989a).

Tabelle 4 : Klassifizierung von β -Laktamasen (nach BUSH, 1989a, 1989b, 1989c, 1995)

Molekulare Klasse (Ambler, 1980)	Funktionelle Gruppe (Bush et al., 1995)	hemmbar durch Clavulansäure	Substratspezifität	Substratspezifität
Serin β -Laktamase	C	1	nein	alle β -Laktame besonders Cephalosporine, außer Carbapeneme, AmpC Enzyme von gramnegativen Bakterien, BlaB chromosomal- und einige plasmid-kodiert, MIR-1, BlaA
Serin β -Laktamase	A, D	2	ja	
	A	2a	ja	Penicilline Plasmiden kodierte Enzyme grampositiver Bakterien (<i>S. aureus</i>), TEM, SHV, BlaZ (bei <i>S. aureus</i>)
	A	2b	ja	Penicillinen, Breitspektrum-Cephalosporinen Breitspektrum β -Laktamasen, TEM-1, TEM-2, SHV-1
	A	2be	ja	ESBL, Cephalosporinen und Monobactamen TEM-3 bis 26, SHV-2 bis 6, K1 (<i>Klebsiella oxytoca</i>)
	A	2br	nein	Penicillinen Inhibitor-resistente Breitspektrum- β -Laktamasen, TEM-30 bis 36, SHV-10, TRC-1
	A	2c	ja	Carbencillin PSE-1, PSE-3, PSE-4 (= CARB-1)
	D	2d	ja	Cloxacillin, Oxacillin, OXA-1 bis 11, PSE-2
	A	2e	ja	Cephalosporine induzierbar, Enzyme von <i>Proteus vulgaris</i> (CepA)
	A	2f	ja	Carbapeneme SME-1 von <i>Serratia marcescens</i> , NMC-A von <i>Enterobacter cloacae</i>
Zink β -Laktamase	B	3	nein	alle β -Laktame, außer Monobactame Metallo- β -Laktamasen von gramnegativen und grampositiven Bakterien, L1 von <i>Xanthomonas maltophilia</i> , CcrA von <i>P. cepacia</i>
Serin β -Laktamase	unbekannt	4	nein	Penicilline AmpC Enzyme von gramnegativen Bakterien, BlaB chromosomal- und einige plasmid-kodiert, MIR-1,

ESBL: Extended Spectrum β -Lactamase; *P. cepacia*: *Pseudomonas cepacia*; *S. aureus*: *Staphylococcus aureus*

2.2.3 β -Laktamasen bei grampositiven und gramnegativen Bakterien

Die Bildung von β -Laktamasen ist bei grampositiven und gramnegativen Bakterien weit verbreitet, erfolgt aber bei beiden Bakterienarten unterschiedlich. Grampositive Bakterien können große Mengen an β -Laktamasen bilden (AMBLER, 1980), die zellgebunden in der Zellwand aufbewahrt oder nach außen abgegeben werden (LIVERMORE, 1995; MEDEIROS, 1997; THEURETZBACHER, 1998). Auf diese Art ist es möglich, neben der einzelnen Bakterienzelle auch die gesamte Bakterienpopulation gegen β -Laktam-Antibiotika zu schützen. Bei gramnegativen Bakterien werden die β -Laktamasen nur in sehr kleine Mengen gebildet und in den periplasmatischen Raum sezerniert (THEURETZBACHER, 1998). Da sich hier der Angriffsort der β -Laktam-Antibiotika befindet, reichen die geringen Mengen an β -Laktamasen aus, damit auch gramnegative Bakterien eine stabile Resistenz (LIVERMORE, 1995; MEDEIROS, 1997) und somit einen optimalen Schutz vor β -Laktam-Antibiotika entwickeln können (AMBLER, 1980).

Die genetische Information zur Bildung dieser Enzyme kann auf Chromosomen oder Resistenz-Plasmiden vorliegen (MUTSCHLER und SCHÄFER-KORTING, 1996). Besonders ESBL sind auf einem Plasmid kodiert, wodurch sie von Bakterium zu Bakterium sowohl vertikal als auch horizontal weitergegeben werden können. Chromosomal-kodierte β -Laktamasen kommen bei fast allen Enterobakterien, mit Ausnahme von Salmonellen, vor (MUTSCHLER und SCHÄFER-KORTING, 1996; THEURETZBACHER, 2004). Viele *Enterobacteriaceae* produzieren Klasse A und/oder Klasse C β -Laktamasen, die abhängig von der Spezies oder dem Stamm induzierbar oder permanent gebildet werden (THEURETZBACHER, 2004). Die chromosomalen AmpC β -Laktamasen gelten als typische Enzyme der *Enterobacteriaceae*. Sie sind in der Regel durch die Behandlung mit Antibiotika induzierbar. Die gebildete Enzymmenge ist von der Bakterienart, dem β -Laktamase-Typ und vom Induktionspotentials sowie der Konzentration des Antibiotikums abhängig (THEURETZBACHER, 1998). Beim Vergleich der induzierten und permanenten β -Laktamase-Expression kann die Expression aufgrund einer Induktion um das 100 bis 1.000fache höher sein als ohne

Induktion (LODGE und PIDDOCK, 1991). Dies ist aber nur gegeben, wenn die Induktion auch stark genug ist. Bei schwacher Induktion reicht die exprimierte β -Laktamasemenge für eine klinisch relevante Resistenz oft nicht aus (THEURETZBACHER, 2004). Aufgrund einer Mutation kann der Regulationsmechanismus der β -Laktamasebildung soweit gestört sein, dass eine permanente Überproduktion von vorher induzierbaren Enzymen erfolgt, so dass ständig eine hohe Resistenz dieser Bakterien erzielt wird (LINDBERG et al., 1987; LINDQUIST et al., 1993; THEURETZBACHER, 1998, 2004).

2.2.4 β -Laktamasen bei *Y. enterocolitica* 4/O:3

1975 isolierten CORNELIS und ABRAHAM (1975) zwei β -Laktamasen, nachdem sie 1973 erstmals vom Vorhandensein solcher Enzyme bei *Y. enterocolitica* berichtet haben. Sie nannten die β -Laktamasen A (BlaA) und B (BlaB). Das nicht induzierbare Breitspektrum- β -Laktamase-Enzym **BlaA** zeigte eine Resistenz gegen Penicilline und Cephalosporine. Es ist durch Cloxacillin teilweise (CORNELIS, 1975; PHAM et al., 1991b; STOCK et al., 1999) und durch Clavulansäure vollständig hemmbar (PHAM et al., 1991b; STOCK et al., 1999). Das Enzym besitzt einen isoelektrischen Punkt bei pH 8,1 und hat ein Molekulargewicht von 20 kDa. Das induzierbare β -Laktamase-Enzym **BlaB**, auch Cephalosporinase genannt, zeigt eine spezifische Resistenz gegenüber Cephalosporinen. Es ist durch Cloxacillin (CORNELIS, 1975; JIMENEZ-VALERA et al., 1986; PHAM et al., 1991b) und durch Aztreonam vollständig, aber nicht durch Clavulansäure hemmbar (STOCK et al., 1999). Im Gegensatz zu dem Enzym BlaA wurde das BlaB regelmäßig in geringeren Mengen nachgewiesen. Der isoelektrische Punkt des Enzyms BlaB liegt bei pH 5,4 und das Molekulargewicht beträgt 34 kDa. Die Induzierbarkeit der BlaB wird in der Regel durch die Anwesenheit von Antibiotika erreicht, kann aber auch durch β -Laktam-Inhibitoren erzielt werden. Mit der Bildung dieser zwei β -Laktamasen besitzen *Y. enterocolitica* 4/O:3 einen in-vivo Resistenzmechanismus gegen β -Laktam-Antibiotika (CORNELIS und ABRAHAM, 1975; HORNSTEIN et al., 1985). Tabelle 5 zeigt eine Zusammenfassung der BlaA und BlaB Eigenschaften.

Tabelle 5: β -Laktamase BlaA und BlaB bei *Y. enterocolitica*

Eigenschaft	β -Laktamase A (BlaA)	β -Laktamase B (BlaB)
Einteilung nach Ambler (1980)	Klasse A	Klasse C
Einteilung nach Bush et al. (1995)	Gruppe 2	Gruppe 1
Expression	permanent	induziert
IP	pH 8,1	pH 5,4
MG	20 kDa	34 kDa
Resistenz	Penicilline (Carbenicillin, Ticarcillin), Cephalosporine	Cephalothin, Cephalosporine
Hemmung	teilweise durch Cloxacillin, vollständig durch Clavulansäure	vollständig durch Cloxacillin und Aztreonam, nicht durch Clavulansäure

IP: isoelektrische Punkt; MG: Molekulargewicht

Taxonomisch zählt die β -Laktamase BlaA zu den Klasse A Enzymen, welche mit anderen Klasse A Enzymen von grampositiven und gramnegativen Bakterien verwandt ist. Die β -Laktamase BlaB gehört zu den induzierbaren Klasse C Enzymen, wie die AmpC β -Laktamasen der *Enterobacteriaceae* (SEOANE et al., 1992).

Wie bereits im Kapitel 2.2.3 ausgeführt, werden die genetischen Informationen zur Synthese der β -Laktamasen chromosomal oder plasmidal vererbt. CORNELIS und ABRAHAM (1975) vermuteten eine chromosomale Kodierung beider Enzyme bei *Y. enterocolitica*. Mittels isoelektrischer Fokussierung konnte eine spezifische chromosomale Kodierung für die Yersinien-Spezies bewiesen werden (MATTHEW et al., 1975, 1977; MATTHEW und HARRIS, 1976). Die isoelektrischen Ergebnisse ließen vermuten, dass die chromosomal-kodierten β -Laktamasen bei Yersinien für jede

Subspezies charakteristisch sind. Dabei hatten die Enzyme BlaA und BlaB der Serogruppen 1, 2, 3 sowie 9 und das Enzym BlaB der Serogruppe 5,27 ein enges taxonomisches Verhältnis trotz biochemischer Unterschiede (MATTHEW et al., 1977).

Obwohl Untersuchungen zeigten, dass beide chromosomale β -Laktamase-Gene bei isolierten *Y. enterocolitica* Stämmen aus Deutschland vorkommen (MATTHEW et al., 1975; MATHEW und HARRIS, 1976; MATTHEW et al., 1977), exprimieren nicht alle Stämme beide Enzyme in gleicher Weise (DE LA PRIETA et al., 1995; STOCK et al., 1999; PHAM et al., 2000). Diese Eigenschaft scheint für alle Yersinien zu gelten, welche bei menschlichen Erkrankungen vorkommen (SCHIEFER et al., 2005). DE LA PRIETA et al. (2006) und NUKAGA et al. (1995) führten dies auf Mutationen in den β -Laktamase-Genen zurück. PHAM et al. (1991a) fanden heraus, dass die Empfindlichkeit gegenüber β -Laktamasen für jeden Biotyp spezifisch ist. Während in Deutschland, Europa, Asien, Brasilien, Südafrika und Ungarn isolierte *Y. enterocolitica* 4/O:3 Stämme beide Enzyme exprimieren (CORNELIS und ABRAHAM, 1975; MATTHEW et al., 1975; MATTHEW et al., 1977; PHAM et al., 1995a; STOCK et al., 1999), die sich in der Art ihrer Empfindlichkeit gegenüber β -Laktam-Antibiotika unterscheiden (CORNELIS, 1975), exprimieren *Y. enterocolitica* 4/O:3 Stämme aus Australien und Neuseeland nur BlaA (PHAM et al., 1991b; 1995a). Die Abwesenheit des Enzyms BlaB erklärt dabei die höhere Empfindlichkeit der *Y. enterocolitica* Stämme gegenüber Amoxicillin/Clavulansäure und Cefoxitin in diesen Ländern (PHAM, et al., 1991b, 1995a).

In der Regel zeigen Bioserotyp 4/O:3 Stämme ein einheitliches Muster von Induktion und Inhibition bei den β -Laktamasen (PHAM und BELL, 1993b; BELL et al., 2006). Nicht induzierte Stämme exprimieren überwiegend BlaA und nur eine kleine Menge BlaB. Bei Induktion produzieren *Y. enterocolitica* Biotyp 4 Stämme überwiegend BlaB (STOCK et al., 1999). Die Biotyp-spezifische β -Laktam-Antibiotikaempfindlichkeit kann von der Regulation und der Expression der β -Laktamasen abhängen (STOCK et al., 1999). Während STOLK-ENGELAAR et al. (1995) keinen Zusammenhang zwischen der

Antibiotikaempfindlichkeit und den Biotypen und Serotypen fanden, zeigten AHMEDY et al. (1985), HORNSTEIN et al. (1985), KWAGA und IVERSEN (1990), PHAM et al. (1991) und PRESTON et al. (1994), dass ein Zusammenhang besteht.

KIST und SANABRIA DE ISELE (1980) untersuchten erstmals die Temperaturabhängigkeit der β -Laktamaseproduktion bei den *Y. enterocolitica* Serotypen O:3 und O:9. Dabei wiesen sie eine kontinuierliche Resistenzzunahme, sowie eine zunehmende β -Laktamaseaktivität bei abnehmender Bebrütungstemperatur von 37°C nach 22°C nach. Sie führten diese Beobachtung auf verschiedene Ursachen zurück. Ein vermehrtes Bakterienwachstum bei niedrigeren Temperaturen und damit eine scheinbar vermehrte Resistenz hielten sie ebenso für möglich, wie eine zunehmende β -Laktamaseproduktion bei abnehmender Bebrütungstemperatur. Auch eine Resistenzzunahme aufgrund anderer temperaturabhängiger Resistenzmechanismen, wie Permeabilitätsänderung der Zellwand bei gramnegativen Bakterien, schlossen sie nicht aus. Auch JIMENEZ-VALERA et al. (1986) zeigten eine höhere β -Laktamase-Expression bei *Y. enterocolitica* Kulturen bei 22°C im Vergleich zu Kulturen bei 37°C Bebrütungstemperatur.

2.2.5 Expressionsregulation der AmpC β -Laktamasen

Die AmpC β -Laktamaseregulation wurde bei den Bakterienstämmen *E. coli*, *Citrobacter freundii* (*C. freundii*), *Enterobacter cloacae* (*E. cloacae*) (LINDBERG et al., 1985, 1987; HONORÉ et al., 1986; HENIKOFF et al., 1988; KORFMANN und SANDERS, 1989; LINDQUIST et al., 1989, 1993) und *P. aeruginosa* (BAGGE et al., 2002; JUAN et al., 2006) schon weitestgehend untersucht. Für die Regulation der Induktion von AmpC β -Laktamasen sind die Gene *ampR*, *ampD*, *ampG* und *ampE* verantwortlich (LINDBERG et al., 1985, 1987; KORFMANN und SANDERS, 1989; LINDQUIST et al., 1989, 1993). In der Familie der *Enterobacteriaceae* ist die Regulation der AmpC β -Laktamase durch AmpR-Protein weit verbreitet. Untersuchungen bei *Y. enterocolitica* fanden bisher nur durch SEOANE et al. (1992) und DE LA PRIETA et al. (1995, 2006) statt.

AmpR

Die Induktion von chromosomalen AmpC β -Laktamasen durch β -Laktame ist bei gramnegativen Bakterien von der Aktivität des 32 kDa große Transkriptionsregulator-Proteins AmpR (LODGE und PIDDOCK, 1991) und dem Transport von zerstörten Mureinproteinen ins Zytosol abhängig. Je mehr zerstörte Produkte vorhanden sind, umso eher wird AmpR gebildet, das wiederum die Expression von AmpC β -Laktamasen induziert (JACOBS et al., 1994; DIETZ et al., 1997). Muropeptide, welche von den bakteriellen Peptidoglykanen gebildet werden, werden mittels Transmembran-Permease AmpG ins Zytosol transportiert (LODGE und PIDDOCK, 1991; DIETZ et al., 1996). Im Zytosol wirken die Muropeptide als Signal zur Bildung von AmpR-Proteinen, das wiederum die *ampC*-Gen-Transkriptionsregulation aktivieren (LINDQUIST et al., 1989). AmpR dient somit als Aktivator für die Synthese von AmpC β -Laktamasen (JACOBS et al., 1997). Von den 4 Regulationsproteinen wurde das AmpR Protein am meisten untersucht (LINDQUIST et al., 1993). Die Bindung von AmpR an den Genregionen *ampC* und *ampR* wurde bereits 1989 bewiesen. Die Bindungsstelle besitzt eine Größe von 38 bp und schließt den Promotor des *ampR*-Gens mit ein. Sie liegt 2 bp neben dem *ampC*-Promotorbereich. Durch diese enge räumliche Verbindung ist es dem AmpR möglich, die Transkription beider Gene zu steuern (LINDQUIST et al., 1989). Bei Anwesenheit eines Inducers bindet AmpR an die DNA Sequenz des *ampC*-Promotors, wirkt als Repressor seiner eigenen Expression und als Aktivator der *ampC*-Transskription. Ist kein Inducer anwesend, wirkt es für beide Gene als Repressor (LINDBERG et al., 1985; HONORÉ et al., 1986; LINDQUIST et al., 1989). Das *ampR*-Gen kommt nur in Stämmen vor, die ein induzierbares *ampC*-Gen besitzen (LINDBERG et al., 1985; HONORÉ et al., 1986; LINDBERG et al., 1987). In Bakterienstämmen wie *E. coli* wurde das *ampR*-Gen infolge einer Mutation deletiert, wodurch die β -Laktamase bei ihnen nicht induzierbar ist (HONORÉ et al., 1986; SEOANE et al., 1992).

AmpD

Das *ampD*-Gen kodiert eine zytoplasmatische Amidase, die ebenfalls auf die AmpC-Expression Einfluss nimmt. Sie ist essentiell für die Bildung und das Recycling von Muroproteinen. Zusätzlich fungiert es als Repressor der AmpC-Expression. Mutationsbedingte Inaktivierung des *ampD*-Gen gilt als Hauptursache für eine AmpR-abhängige permanente Hyperproduktion von AmpC β -Laktamasen und führt zu vermehrten Resistenzen bei *Enterobacteriaceae* (LINDBERG et al., 1987; LINDQUIST et al., 1993; FLUIT et al., 2001). Im Vergleich zu den Ursprungs-Stämmen verursachten Mutationen im *ampD*-Gen eine Zunahme der Resistenzen (LINDBERG et al., 1987; LODGE und PIDDOCK, 1991).

AmpG

Die Induktion von β -Laktamasen ist außerdem von einem Membranprotein abhängig, das auf dem *ampG*-Gen kodiert ist. Es dient ebenfalls als Signalmolekül. Ohne dieses Gen ist eine Induktion nicht möglich (KORFMANN und SANDERS, 1989; DIETZ et al., 1997). Die *ampD* und *ampG* Loci sind nicht mit dem *ampR* verbunden. Ihre vorherrschende Funktion besteht in der Aktivierung des *ampR*-Gens, sofern ein Inducer anwesend ist (SEOANE et al., 1992).

AmpE

Das *ampE*-Gen kodiert ein Zytoplasmamembranprotein. Dies fungiert als erforderliches Signalmolekül in der AmpC-Regulation (LINDBERG et al., 1987). Die genaue Funktionsweise des *ampE*-Gen ist allerdings bisher noch nicht genau geklärt.

Bei *Y. enterocolitica* ist die *ampC*-Gen-Regulierung vom AmpR-Protein abhängig, wie es auch in anderen Stämmen der Familie der *Enterobacteriaceae* der Fall ist (SEOANE et al., 1992). Für die Induzierbarkeit der β -Laktamase-Expression ist das AmpR-Protein unbedingt erforderlich (LINDBERG et al., 1985; SEOANE et al., 1992). Das *ampR*-Gen ist immer auf der 5' Seite des *ampC*-Gens lokalisiert. Auch bei *Y. enterocolitica* befindet sich das *ampR*-Gen in der Nähe des *ampC*-Gens. Das gebildete

AmpR-Regulationsprotein von *Y. enterocolitica* ist mit dem AmpR-Protein von *E. cloacae* und *C. freundii* fast identisch. PHAM et al. (2000) zeigten hingegen, dass ein auffälliger Unterschied zwischen den chromosomalen, induzierbaren Cephalosporinase BlaB der *Y. enterocolitica* Stämme und der Enzyme aus der Familie der *Enterobacteriaceae* besteht, da *Y. enterocolitica* empfindlich auf Antibiotika der dritten Cephalosporingeneration reagierten, während die anderen Bakterien der Familie *Enterobacteriaceae* resistent waren. Dies ist auf eine falsche Funktion oder gar eine Deletion eines funktionierenden *ampR*-Gens zurückzuführen. Wird AmpR-Protein nur unzureichend gebildet, wird AmpC nur gering exprimiert (SEOANE et al., 1992). Ist das *ampR*-Gen aufgrund einer Mutation aber deletiert, kann keine induzierte AmpC β -Laktamase gebildet werden. Eine Beteiligung von AmpD und AmpG an der BlaB-Expression bei *Y. enterocolitica* konnte noch nicht nachgewiesen werden.

Der Unterschied zwischen der Expression nicht induzierbaren Spezies wie *E. coli* und anderen Mitgliedern der Familie der *Enterobacteriaceae* ist nicht das Resultat von Mutationen im *ampC*-Gen, sondern der Verlust der Regulation durch AmpR (LINDBERG et al., 1985; HONORÉ et al., 1986). *Y. enterocolitica* Y56 z.B. bildet nur BlaA (SEOANE und LOBO, 1991; DE LA PRIETA et al., 2006), da aufgrund von gleich zwei Mutationen im *ampR*-Gen die Aminosäuresequenz des AmpR-Proteins soweit verändert ist, dass keine BlaB-Exprimierung mehr möglich ist (SEOANE et al., 1992; DE LA PRIETA et al., 2006). Dies gilt nicht für den *Y. enterocolitica* Stamm IP97. Dieser kann keine BlaA bilden, da es wegen einer 51 bp großen Deletion im *blaA*-Gen zu einer kompletten Inaktivierung der β -Laktamaseproduktion gekommen ist (SEOANE ET AL., 1992). Eine Mutation im *ampR*-Gen wurde auch bei den Stämmen Y60, H6 und H14 gefunden, da bei ihnen keine Aktivität von AmpC vorhanden ist (SEOANE et al., 1992). Auch andere Bakterien aus der Familie der *Enterobacteriaceae* produzieren keine BlaA, was vermutlich auf eine Mutation im *blaA*-Gen zurück zuführen ist (PHAM et al., 1999).

2.2.6 β -Laktamasen bei anderen *Y. enterocolitica* Biotypen

Die bereits beschriebenen chromosomal-kodierten Enzyme BlaA und BlaB kommen in der Regel bei allen *Y. enterocolitica* Biotypen vor. Jedoch werden diese β -Laktamasen nicht bei allen Biotypen in gleicher Weise exprimiert. Das unterschiedliche Vorkommen der *blaA*- und *blaB*-Gene sowie die ungleiche Expression der BlaA und BlaB führt zu einer heterogenen β -Laktam-Antibiotikaempfindlichkeit innerhalb der *Y. enterocolitica* Biotypen (AHMEDY et al., 1985; HORNSTEIN et al., 1985; KWAGA und IVERSEN, 1990; PHAM et al., 1991, 1999; PRESTON et al., 1994; STOCK et al., 1999, 2000).

Tabelle 6 zeigt eine Zusammenfassung über die BlaA und BlaB Verteilung bei den verschiedenen *Y. enterocolitica* Biotypen, die durch Studien von PHAM et al. (1991a, 1991b, 1995b, 1999, 2000), SHARMA et al. (2004, 2006) und STOCK et al. (1999, 2000) ermittelt wurden. Insgesamt betrachtet wurden bei allen 6 *Y. enterocolitica* Biotypen beide β -Laktamase-Gene *blaA* und *blaB* und damit eine Expression dieser Enzyme nachgewiesen. Bei den Biotypen 1B und 5 konnte bei allen untersuchten Stämmen das Vorkommen beider β -Laktamasen gezeigt werden. Der Biotyp 1A besitzt ebenfalls beide β -Laktamasen, jedoch wurde ein Unterschied im *blaA*-Gen entdeckt, so dass dieses 'A-like'-Gen nur mit spezifischen Primern zu amplifizieren ist (SHARMA et al., 2004, 2006). Ähnlich verhält es sich beim BlaB des Biotyps 1A. Dieses Enzym zeigte bei Untersuchungen mittels isoelektrischer Fokussierung einen anderen isoelektrischen Punkt als die bisher beschriebene β -Laktamase B. Beim Biotyp 2 kommen beide Enzyme nur beim Serotyp O:9 vor. Die Serotypen O:5 und O:5,27 besitzen hingegen nur BlaB. Der Biotyp 3 besitzt ebenfalls BlaA und BlaB. Bei Stämmen aus Japan und USA konnte hingegen nur BlaA nachgewiesen werden. Auch Stämme des Bioserotyps 4/O:3 aus Australien besitzen keine BlaA, während Biotyp 4/O:3 Stämme aus Deutschland, Europa, Asien, Brasilien, Südafrika und Ungarn beide β -Laktamasen aufwiesen. PHAM et al. (1995b, 2000) konnten weiterhin nachweisen, dass die β -Laktamase-Expression auch innerhalb des Bioserotyps 4/O:3 zwischen den Phagentypen variiert. Bei 2 Stämmen aus Neukaledonien mit dem Phagentyp O:3/VIII wurde ein Fehlen der BlaA ermittelt, während sich beim Phagentyp O:3/IXb/A kein Enzym B nachweisen lies.

Tabelle 6: Zusammenfassung der nachgewiesenen BlaA und BlaB bei verschiedenen *Y. enterocolitica* Biotypen

Biotyp	Serotyp/ Phagentyp	β-Laktamase		IP		Nachweis	Herkunft	Autor
		BlaA	BlaB	BlaA	BlaB			
1A	verschieden	A	'B-like'	8,3	6,2	IF	weltweit	PHAM et al., 1991a, 1991, 1999b, 2000
		A	B			AD	Indien	SHARMA et al., 2004
		'A-like'	B			PCR	Europa, Indien, USA	STOCK et al., 2000 SHARMA et al., 2006
1B	O:8	A	B				weltweit	PHAM et al., 1999
		A	B				Deutschland	STOCK et al., 2000
		(2 Stämme)						
2	O:9	A	B			IF	weltweit	PHAM et al., 1999, 2000
	O:5,27; O:5	-	B			AD		PHAM et al., 1999, 2000
	O:5; O:5,27;	A	B			IDT, PCR	USA, Japan	STOCK et al., 1999
	O:9	(bei nicht Induktion)	(bei Induktion)					
3	O:3; O:5;	A	B	8,1	5,4	IF, AD	weltweit	PHAM et al., 1999; 2000
	O:1,2a-3	-	B	5,4	5,6	IF, IDT	Australien	STOCK et al., 2000 PHAM et al., 1991a, 1991b
4	O:3	A	B			AD, IF, PCR	weltweit	PHAM et al., 1995b, 1999; STOCK et al, 1999
		A	-	8,3		Inhibitionstest, IP	Australien, Neuseeland, Kanada	PHAM et al., 1991b, 1995b
	O:3/VIII	A	B				weltweit	PHAM et al., 2000
	O:3/VIII ^a	-	B					
	O:3/IXa	A	B					
	O:3/IXb/A	A	-					
	O:3/lxb/AB	A	B					
5	O:2a; O:2b; O:3	A	B				weltweit	PHAM et al., 1999, 2000; STOCK et al, 1999

O:3/VIII^a: zwei Stämme aus Neukaledonien; AD: Agardiffusion; IF: isoelektrische Fokussierung; IP: isoelektrischer Punkt; IDT: Induktionstest

2.3 *Yersinia enterocolitica*

2.3.1 Einteilung von Yersinien

Yersinien sind nach ihrem Entdecker A. J. E. Yersin (1863-1943) benannt, der 1894 erstmalig *Yersinia pestis* in Hongkong isolierte (ROLLE und MAYER, 2002). Sie gehören zur Familie der *Enterobacteriaceae*, einer Gruppe gramnegativer, oxidasenegativer und fakultativ anaerober Bakterien. Mit der Wahl des Gattungsnamen *Yersinia* (Y.) wurden die nah verwandten Erreger *Pasteurella pestis* und *Pasteurella pseudotuberculosis* aufgenommen (KNAPP et al., 1973).

Zur Gattung *Yersinia* gehören derzeit vierzehn verschiedene Spezies (SPRAGNE und NEUBAUER, 2005; MERHEJ et al., 2008; SPRAGUE et al., 2008), die in der Abbildung 6 aufgeführt sind.

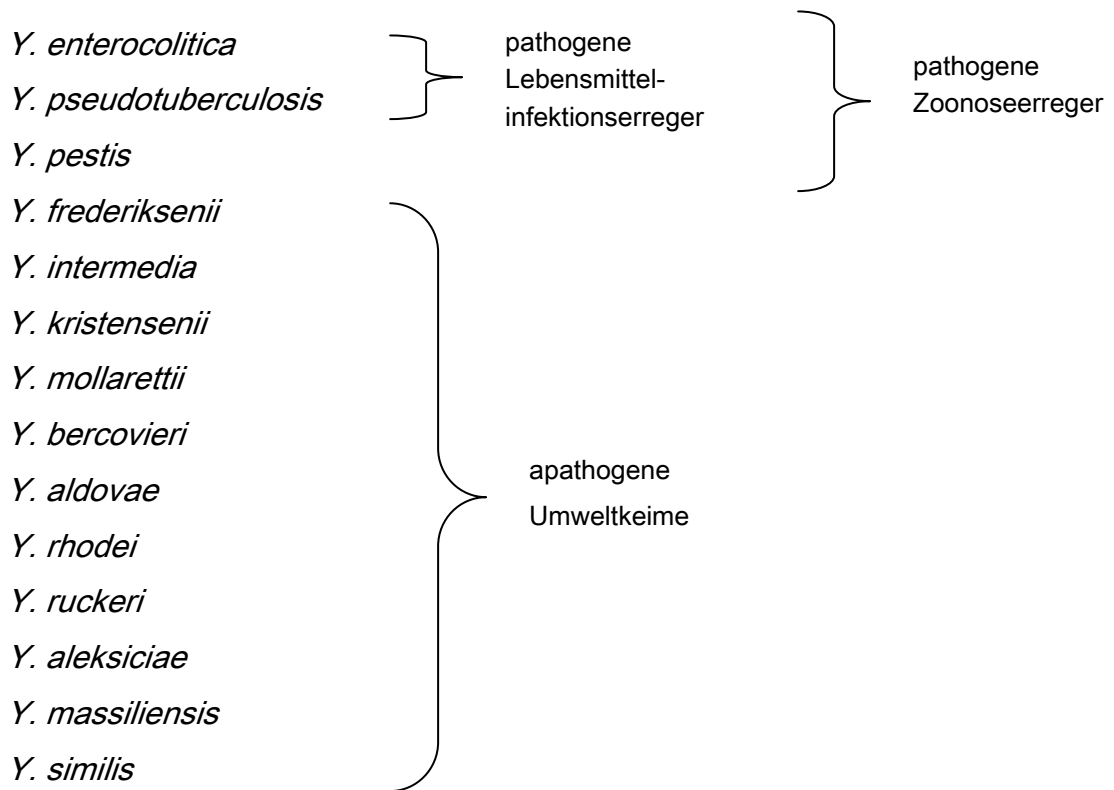


Abbildung 6: Gattung *Yersinia* mit ihren 14 verschiedenen Spezies

Y. enterocolitica und verwandte Spezies wurden in vielen Ländern aus verschiedenen Lebensmitteln isoliert (KAPPERUD, 1991). Von den *Yersinia* Spezies sind nur *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* sowie *Y. pestis* pathogen. *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* gelten als Erreger der Yersiniose (BOTTONNE, 1999). Die Mehrheit der Lebensmittelisolate unterscheidet sich in ihren biochemischen und serologischen Eigenschaften von den typisch klinischen Stämmen. Sie werden als apathogene Yersinien Stämme zusammengefasst. Zu ihnen gehören: *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii*; *Y. intermedia*, *Y. aldovae*, *Y. rhodei*, *Y. aleksiciae*, *Y. mollaretti* und *Y. bercovieri*. Sie kommen ubiquitär vor und sind ohne klinische Bedeutung (KAPPERUD, 1991). Eine Ausnahme stellt *Y. ruckeri* als Erreger der „enteric redmouth disease“ bei Salmoniden dar, der zu hohen Verlusten führen kann (TOBBACK et al., 2007). Erst kürzlich wurden die Yersinien-Spezies *Y. similis* und *Y. massiliensis* als Yersinien-Spezies entdeckt (MERHEJ et al., 2008; SPRAGUE et al., 2008).

Die heterogene Gruppe *Y. enterocolitica* besteht aus den 6 Biotypen 1A, 1B, 2, 3, 4 und 5 sowie aus mehr als 50 Serotypen. Die Einteilung in die Bio- und Serotypen erfolgt anhand ihrer biochemischen Eigenschaften (BOTTONNE, 1999). Die unterschiedlichen Biotypen und Serotypen differieren sowohl in ihrer geographischen Verteilung als auch in ihren pathogenen Eigenschaften (STOCK und WIEDEMANN, 1999). Die Serotypen 1B/O:8, 2/O:9, 2/O:5,27 und 4/O:3 gelten als humanpathogen, was auf ihre Fähigkeit zur Zellpenetration zurückgeführt wird (BOTTONNE, 1997). In Europa kommen besonders die Serotypen O:3 und O:9 als menschenpathogene Erreger vor, wobei O:3 der bekannteste klinische Serotyp ist (DE BOER, 1992; STOCK et al., 1999). Der Bioserotyp 2/O:5,27 wurde überwiegend in den USA und Japan isoliert, wo sie mit humanen Yersiniosen assoziiert sind. In Europa sind Infektionen mit Biotyp 2 nicht selten, werden aber von dem Serotyp O:9 verursacht (STOCK et al., 1999). Serotyp O:8 ist besonders in Nordamerika bekannt (DE BOER, 1992). In der Europäischen Union (EU), Japan, Asien, Kanada und in den USA ist *Y. enterocolitica* Bioserotyp 4/O:3 als Yersinioseauslöser von besonderer Bedeutung (BOTTONNE, 1999). Pham et al. (1991a) zeigten, dass auch in Australien der überwiegende Teil an klinischen Yersinien dem Biotyp 4/O:3 entsprechen.

2.3.2 Epidemiologie

Y. enterocolitica ist ein pathogenes Bakterium, welches in der Lage ist, sich auch bei niedrigen Temperaturen zu vermehren. Dies führt zu einer weltweiten Bedeutung als Lebensmittelinfektionserreger (NESBAKKEN und BORCH, 1995; BOCKEMÜHL und ROGGENTIN, 2004). *Y. enterocolitica* können bei Menschen, nahezu allen Wild- und Haustieren und seltener bei Reptilien, Fischen und Muscheln nachgewiesen werden (BOCKEMÜHL und ROGGENTIN, 2004).

Bisher ist die Epidemiologie von Infektionen mit *Y. enterocolitica* nicht vollständig geklärt. Die meisten Yersiniosefälle traten sporadisch ohne ersichtliche Quelle auf (KAPPERUD, 1991; OSTROFF, 1995; BOTTONE, 1999; FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2006a, 2006b). Mehrere Studien konnten belegen, dass die Kontamination von Lebensmitteln wie Schweinefleisch, Schweinezungen, Milch sowie kontaminiertes Wasser wichtige Übertragungswege darstellen (COVER und ABER, 1989; KAPPERUD, 1991; DE BOER, 1992; BOTTONE, 1999). In den USA konnten verschiedene Yersinioseausbrüche auf infizierte Schokoladenmilch, Milchpulver, Tofu, pasteurisierte Milch, Sojabohnen und Kutteln zurückgeführt werden (KAPPERUD, 1991). In Europa gilt das Schwein als Hauptreservoir für pathogene *Y. enterocolitica* Stämme (DE BOER und NOUWS, 1991; STOCK et al., 1999; FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2001, 2006a, 2006b) und stellt damit die größte Infektionsquelle des Menschen dar (DE BOER und NOUWS, 1991; NESBAKKEN und BORCH, 1995; BOTTONE, 1999; BOCKEMÜHL und ROGGENTIN, 2004; FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2001, 2006a). Die Tatsache, dass isolierte *Y. enterocolitica* Stämme bei Mensch und Tier dieselben DNA-Muster aufweisen (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2006a), bestätigt diese Hypothese. Bisher konnte aber nur bei einem Yersinioseausbruch das Schwein eindeutig als Infektionsquelle identifiziert werden (MARJAI et al., 1987). Schweine sind oft symptomlose Träger, die den Erreger besonders in den Tonsillen beherbergen (KAPPERUD, 1991; FREDRIKSSON-AHOMAA, 2001, 2003; BOCKEMÜHL und ROGGENTIN, 2004) oder mit den Faeces ausscheiden (NESBAKKEN und BORCH, 1995; FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2001). In einer Studie zur Untersuchung von

isolierten *Y. enterocolitica* Stämmen aus dem Münchener Raum lag die Prävalenz des Bioserotyps 4/O:3 in den Tonsillen bei 60% und in den Faeces bei 10 % (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2003). Weitere Untersuchungen aus Deutschland und den Niederlanden legten eine Prävalenz von 40-80% pathogener *Y. enterocolitica* Stämme in Maulhöhlen geschlachteter Schweine dar, von denen die meisten zur Serogruppe O:3 gehörten (DE BOER und NOUWS, 1991; FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2001). Die Kontamination des Schlachtkörpers erfolgt hauptsächlich durch das Ausschneiden der Zunge und Tonsillen, aber auch durch ungenügend entfernte Tonsillen während der Schlachtung (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2004). Dies ist unvermeidbar, da ein gewisser Kontaminationsgrad während des hochtechnisierten Schlachtungs- und Zerlegungsprozesses nicht verhindert werden kann (STOLLE, 1989). In Folge von Gruppenerkrankungen in Krankenhäusern, Kindergärten und Schulen wird der Kontakt von Mensch zu Mensch als weiterer Übertragungsweg diskutiert (ALEKSIC und BOCKEMÜHL, 1990).

Erst seit 2001 besteht in Deutschland eine bundesweite Meldepflicht nach dem Infektionsschutzgesetz (§7) für Erkrankungen mit *Y. enterocolitica*. Seither liegen beim Robert-Koch-Institut (RKI) statistische Daten über Erkrankungen mit *Y. enterocolitica* vor. Es muss aber von einer höheren Dunkelziffer ausgegangen werden, da nur gemeldete Erkrankungen erfasst werden können (Tab. 7). Während Salmonellose bis 2004 noch als wichtigste Lebensmittelinfektion galt, rangiert derzeit die Campylobacteriose an erster Stelle. Die Zahlen des RKI zeigen weiterhin, dass im Vergleich zur Campylobacteriose und Salmonellose nur etwa ein Zehntel Yersinioseerkrankungen auftraten, bei denen der Serotyp O:3 der Haupterreger war.

Tabelle 7: Anzahl der beim RKI gemeldeten Erkrankungen mit *Y. enterocolitica*, *Campylobacter* und *Salmonella* in Deutschland von 2001-2007
(nach RKI 2002, 2003, 2004, 2005, 2006, 2007)

Jahr	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Campylobacter</i>	<i>Salmonella</i>
2001	7213	54616	77386
2002	7525	56372	72379
2003	6573	47906	63066
2004	6182	55796	56976
2005	5627	62133	52267
2006	5162	55050	52575
2007	4987	66107	55400

Wie in Deutschland zählt *Y. enterocolitica* auch in Finnland (HALLANVUO et al., 2002; FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2003), Norwegen und Schweden zu den 3 wichtigsten bakteriellen Lebensmittelinfektionserregern, obgleich in diesen Ländern *Salmonella* vor *Campylobacter* und *Yersinia* in der Häufigkeit der Erkrankungen steht (NESBAKKEN und BORCH, 1995).

2.3.3 Klinik der Yersiniose

Yersiniosen werden beim Menschen nur von wenigen *Yersinia* Bioserotypen verursacht. Zu diesen Bioserotypen zählen 1/O:8, 2/O:5,27, 2/O:9 und 4/O:3 (BOTTONNE, 1997). Die Übertragung erfolgt hauptsächlich oral-alimentär über kontaminierte Lebensmittel und Wasser (BOCKEMÜHL und ROGGENTIN, 2004). Nach einer Inkubationszeit von 7-10 Tagen (ALEKSIC und BOCKEMÜHL, 1990) verursacht *Y. enterocolitica* verschiedene akute, seltener subakute gastrointestinale Probleme, wie akute Diarrhoe, Ileitis terminalis acuta und Appendicitis mit mesenterialer Lymphadenitis. Alle Erkrankungsformen können von einer reaktiven Arthritis oder einem Erythema nodosum gefolgt bzw. begleitet sein (KNAPP et al., 1973; BOTTONNE, 1999; BOCKEMÜHL und ROGGENTIN, 2004). Die häufigste Manifestation der Yersiniose stellt aber die Gastroenteritis mit selbstlimitierendem Durchfall dar (ALEKSIC und BÖCKEMÜHL, 1990). Selten treten schwere, z. T. tödliche, septische Verlaufsformen auf (KNAPP et al., 1973), die bei Erwachsenen mit schweren Grunderkrankungen assoziiert sind und dann zu Meningitis, Endokarditis und zu fokalen Abszessen in Leber und Milz führen können (BOCKEMÜHL und ROGGENTIN, 2004). Auch eine jahrelange Persistenz des Erregers in Lymphknoten und darmassoziierten-lymphatischen Geweben ist möglich (HEESEMANN und KARCH, 1995).

Y. enterocolitica spielt als Krankheitserreger beim Tier eher eine untergeordnete Rolle, da Tiere selten an einer *Y. enterocolitica*-Infektion erkranken (ALESKIC und BOCKEMÜHL, 1996). In Ausnahmefällen können klinische Yersiniosen bei Ferkeln auftreten und zu Gastroenteritiden führen. Auch Sauen können erkranken und Fertilisationsstörungen und Aborte zeigen (NEUBAUER et al., 2001). Bei Rindern erkranken in der Regel nur Jungtiere und zeigen Symptome wie Durchfall und Kümern (NEUBAUER et al., 2001). Infektionen mit *Y. enterocolitica* sind aber auch bei Hund und Katze bekannt, die sich über die Aufnahme von kontaminierten rohen oder nicht vollständig erhitztem Fleisch infizieren (NEUBAUER et al., 2001, EFFENBERGER, 2008).

2.3.4 Therapie von Yersiniosen

Unkomplizierte intestinale *Y. enterocolitica*-Infektionen werden in der Regel nicht therapiert, da Studien belegen, dass die Dauer und der Verlauf der Gastroenteritis nicht immer positiv durch Antibiotika beeinflussbar ist (COVER und ABER, 1989). Zur Behandlung einer klinischen Yersiniose eignen sich Cephalosporine der 3. Generation allein oder in Kombination mit Aminoglykosiden, Tetrazykline, Fluorchinolone, Trimethoprim/Sulfamethoxazol und Doxycyclin (STOLK-ENGELAAR et al., 1995; BOTTONE, 1997; BOCKEMÜHL und ROGGENTIN, 2004) sowie Chloramphenicol (STOLK-ENGELAAR et al., 1995). Bei immunsupprimierten Patienten wird die Gabe von Doxycyclin und Trimethoprim/Sulfamethoxazol und bei Bakteriämien die Verabreichung von Doxycyclin in Kombination mit Aminoglykosiden empfohlen (COVER und ABER, 1989). Ein früher Therapiebeginn mit Ciprofloxacin hat gute Ergebnisse bei der Behandlung der reaktiven Arthritis erzielt (ZHANG et al., 1997; HOOGKAMP-KORSTANJE et al., 2000).

Hinsichtlich der Antibiotikaempfindlichkeit können die einzelnen *Yersinia* Biotypen unterschiedlich reagieren, was bei der Therapie beachtet werden sollte (WHITE et al., 2002). Ein Unterschied in der Empfindlichkeit zwischen menschlichen und tierischen Stämmen besteht in der Regel aber nicht (PRESTON et al., 1994; MEYER, 2007).

2.4 Agardiffusionstest

Untersuchungen zur Erregeridentifizierung und Antibiotika-Empfindlichkeitsprüfungen zählen zu den wichtigsten Aufgaben im mikrobiologisch-diagnostischen Labor, da die Ergebnisse die Grundlage einer gezielten Antibiotikatherapie bilden. Auch im Hinblick auf die weltweit zunehmende Antibiotikaresistenz kommt der schnellen und sachgerechten Empfindlichkeitsprüfung klinischer Isolate immer größere Bedeutung zu (GEISS et al., 2004). Solche Prüfungen werden anhand von Agardiffusionstests durchgeführt, die auf einer Hemmung bakteriellen Wachstums in Gegenwart von Antibiotika bei definierten in-vitro-Bedingungen basieren (GEISS et al., 2004).

Agardiffusionstests gelten als einfache Testverfahren, die routinemäßig eingesetzt werden können (KOLBERT und SHAH, 2002). Um verlässliche und reproduzierbare Ergebnisse erzielen zu können, sollten diese Verfahren standardisiert sein (STOCK und WIEDEMANN, 1998). Unterschiedliche Ergebnisse in veröffentlichten Empfindlichkeitsstudien sind darauf zurückzuführen, dass es bei der Durchführung Abweichungen in den verwendeten Testmedien, Inokulum, Beschickungsmenge der Testplättchen, Inkubationsbedingungen, Ableseverfahren sowie bei der Festlegung von Grenzwerten gibt (STOCK und WIEDEMANN, 1998; GEISS et al., 2004). Erste Vorschläge zur Standardisierung der Empfindlichkeitstestung wurden bereits in den 50er Jahren publiziert, die zur weltweiten Etablierung des Agardiffusionsverfahrens führten (GEISS et al., 2004). Der CLSI-Untersuchungsausschuss für veterinärmedizinische antimikrobielle Empfindlichkeitsprüfung empfahl mit Hilfe des Dokumentes M31-A2 (2002) eine bisher gültige sowie standardisierte Methode.

Obwohl Agardiffusionstests bei der Empfindlichkeitsprüfung routinemäßig zum Einsatz kommen, stimmt der therapeutische Erfolg nicht immer mit den *in-vitro* erhaltenen Testergebnissen überein (HOOGKAMP-KORSTANJE und KONING, 1990).

Der Agardiffusionstest wird auf festen Nährmedien durchgeführt, die mit Bakterienmaterial definierter Dichte mittels sterilem Spatel oder Wattetupfer homogen beimpft werden. Für die Empfindlichkeitsprüfung bei *Enterobacteriaceae* wird speziell die Müller-Hinton-Agarplatte empfohlen (CLSI, 2002). Die Antibiotika werden in handelsüblichen Wirkstoffträgern, den Antibiotikatestplättchen, mit definierter Beschickungsmenge eingesetzt. Sie werden auf die Agarplatte aufgebracht. Während der Bebrütung erfolgt eine Hemmung des Wachstums empfindlicher Stämme, da der antibiotische Wirkstoff von den Testplättchen in den Agar diffundiert, wobei ein Konzentrationsgradient entsteht, bei dem die höchste Antibiotikakonzentration in unmittelbarer Nähe des Testplättchen zu finden ist. Je nach Empfindlichkeit bzw. Unempfindlichkeit der Keime gegenüber dem eingesetzten antibakteriellen Wirkstoff

ergeben sich unterschiedlich große Hemmhöfe um die einzelnen Testplättchen. Die Größe der Hemmhöfe werden entweder manuell anhand eines Lineals Millimeter genau ausgemessen oder durch Verwendung entsprechender Geräte von AURA, OSIRIS, BIOMIC oder SIRSCAN ausgewertet (KOLBERT und SHAH, 2002). Die Bewertung erfolgt in den Kategorien 'sensibel', 'intermediär' und 'resistent', weshalb nur eine qualitative Aussage möglich ist.

Der Agardiffusionstest dient nicht nur der Empfindlichkeitsprüfung, sondern auch dem Nachweis von β -Laktamasen. Der Doppelplättchenagardiffusionstest ist ein einfacher Test zur Detektion der BlaA und BlaB von *Y. enterocolitica*, der routinemäßig im Diagnostiklabor eingesetzt werden kann. Diese Testmethode geht auf SANDERS und SANDERS (1979) zurück und wurde von PHAM et al. (1993a, 1999) modifiziert. In diesem Testverfahren werden nur 2 Antibiotikatestplättchen auf die Agarplatte aufgebracht und die Hemmhofgröße sowie die Synergie zwischen diesen beiden Testplättchen zur Beurteilung herangezogen (Kapitel 3.2.4). Um die BlaA und BlaB bei *Y. enterocolitica* nachzuweisen, werden dafür die Testplättchen Ticarcillin 75 μ g und Amoxicillin/Clavulansäure 3 μ g verwendet. Der Test basiert auf der Resistenz der BlaA gegen Ticarcillin und einer hohen Inhibition desselben Enzyms durch Clavulansäure. Die Expression der BlaA wird durch eine charakteristische Synergiezone zwischen den Hemmhöfen um Ticarcillin und Amoxicillin/Clavulansäure angezeigt. Ein Hemmhof von > 9 mm um Ticarcillin ohne diese charakteristische Synergiezone zwischen den Antibiotikatestplättchen zeigt eine BlaB-Expression bei gleichzeitiger Abwesenheit einer BlaA-Expression an (PHAM et al., 1999). Werden BlaA und BlaB gleichzeitig exprimiert, tritt ebenfalls eine Synergiezone auf, die sich zwischen dem Hemmhof um Ticarcillin durch die BlaA und um Amoxicillin/Clavulansäure durch die BlaB bildet. Der HHR um Amoxicillin/Clavulansäure ist dabei maximal 3 mm groß. Neben dem Doppelplättchenagardiffusionstest kann die Expression der BlaB auch lediglich mit einem Amoxicillin/Clavulansäure-Antibiotikatestplättchen detektiert werden. Ein HHR um Amoxicillin/Clavulansäure von kleiner 3 mm zeigt eine BlaB-Expression an, während ein HHR größer 6 mm keine BlaB-Expression bedeutet (PHAM et al., 1995b).

Neben der Detektion der β -Laktamase-Expression ist es möglich, *Y. enterocolitica* von anderen Bakterien der Familie der *Enterobacteriaceae* in diesem Test zu unterscheiden, da diese keine β -Laktamase A produzieren. Bei diesen Stämmen liegt der HHR um Ticarcillin ebenfalls zwischen 2 bis 8 mm, aber eine charakteristische Synergiezone zwischen den Antibiotikatestplättchen tritt dabei nicht auf, da diese Zone spezifisch für BlaA ist (PHAM et al., 1999).

Zum Nachweis der β -Laktamase B steht ein weiteres Agardiffusionstestverfahren mit den Antibiotikatestplättchen Cefotaxime 5 μ g und Imipenem 10 μ g zur Verfügung. Dieser Inhibitionstests beruht auf einer Induktion der β -Laktamase B mittels Imipenem und Cefotaxime als Substrat. Ein positiver Induktionstest zeigt eine charakteristische Inhibitionszone um Cefotaxime. Bei einem negativen Ergebnis und damit einer Abwesenheit des Enzyms stellt sich der Hemmhof um beide Antibiotikatestplättchen symmetrisch dar (PAHM und BELL, 1993a).

2.5 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine *in-vitro* Methode zur selektiven, enzymatischen Amplifikation von DNA-Sequenzen um den Faktor 10^6 - 10^9 , die 1987 von K. B. Mullis entwickelt wurde. Synthetische Oligonucleotide (Primer) ermöglichen die Vervielfältigung des zwischen ihnen liegenden Bereichs, der so genannten Template-DNA, durch eine thermostabile Polymerase. Die Reaktion verläuft in mehreren Zyklen (BANGSOW et al., 2002). Durch die Wiederholung von einzelnen Reaktionsschritten in einem Zyklus wird die Template-DNA exponentiell amplifiziert. Die Spezifität hängt von der Anlagerung der Primer an die DNA sowie von der notwendigen Anlagerungstemperatur ab (BANGSOW et al., 2002). Ein PCR Zyklus beginnt mit der thermischen Denaturierung des zu amplifizierenden DNA-Dopplestranges (Template-DNA) durch Erhitzen auf 94°C , wodurch der Doppelstrang in Einzelstränge getrennt wird. Die folgende Primer-Hybridisierung (Annealing) wird üblicherweise bei einer Temperatur von über 50°C durchgeführt. Der 3. Schritt umfasst die Synthesephase

(Elongation), bei der die Amplifikation der DNA durch die thermostabile DNA-Polymerase bei einer Temperatur von 72°C stattfindet. Ein Amplifikationszyklus aus Denaturierung, Annealing und Elongation wird in der Regel 25- bis 35-mal wiederholt (BANGSOW et al., 2002).

Bei der Anwendung der konventionellen PCR-Methode erfolgt die Detektion der DNA-Amplifikate anhand der Agarosegelelektrophorese und Anfärbung der DNA-Amplifikate mittels Ethidiumbromid. In diesem Fall wandern die DNA-Moleküle in Abhängigkeit von ihrer Größe und aufgrund ihrer negativen Ladung von der Kathode zur Anode, wobei die kleinsten DNA-Moleküle das Gel am weitesten durchlaufen. Zur Bestimmung der Fragmentgröße dienen definierte Größenstandards, die bei jeder Auftrennung mitgeführt werden (DECHERT, 2002).

Das Vorkommen von *blaA*- und *blaB*-Genen bei *Y. enterocolitica* 4/O:3 Stämmen kann anhand dieser konventionellen PCR-Methode untersucht werden. Zur Amplifikation der entsprechenden Template-DNA dienen spezielle Primer, die diese speziellen Genabschnitte amplifizieren. Das *blaA*-Gen wird durch ein 479 bp großes DNA-Amplifikat nachgewiesen, während ein 827 bp großes DNA-Amplifikat für das Vorliegen eines *blaB*-Gens spricht (STOCK et al., 1999). Diese Primer können ebenfalls die *blaA*- und *blaB*-Gene der Biotypen 1B, 2, 3 und 5 amplifizieren. Aufgrund einer anderen Basensequenz bei dem *blaA*-Gen des Biotyps 1A können diese Primer nicht zur Amplifikation genutzt werden. Hierfür sind spezielle Primer entwickelt worden (SHARMA et al., 2006).

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

Im Folgenden wird ein kurzer Überblick über die wichtigsten verwendeten Materialien gegeben. Alle laborüblichen Materialien und Geräte sind im Anhang gesondert aufgeführt (Kapitel 11).

3.1.1 Herkunft und Anzahl der zu untersuchenden Bakterienstämme

3.1.1.1 *Y. enterocolitica* Stämme

In dieser Studie wurden 200 *Y. enterocolitica* Stämme des Bioserotyps 4/O:3 untersucht (Tab. 8). 140 der *Y. enterocolitica* Stämme wurden aus porcinem Untersuchungsmaterial in den Jahren 1999 bis 2004 am Institut für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs des veterinärwissenschaftlichen Departments der tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München isoliert. 60 *Y. enterocolitica* Stämme wurden im Rahmen einer Dissertation des oben genannten Instituts in den Jahren 2001 bis 2002 in einem humanmedizinischen Diagnostiklabor in München isoliert. Die *Y. enterocolitica* Stämme wurden im Mikrobank-System® bei -80°C gelagert.

Tabelle 8: Herkunft und Anzahl der untersuchten *Y. enterocolitica* Stämme des Bioserotyp 4/O:3

Herkunft der Stämme	Untersuchungsmaterial	Anzahl der Stämme
Mensch	Stuhl	60
Schwein	Kot	17
	Tonsillen	63
	Ferkel	2
Schweinefleischprodukte	Fleischstücke	17
	Innereien	14
	Zungen	5
	Hackfleisch	22
Summe		200

3.1.1.2 Kontroll- und Referenzstämmen

Das CLSI Dokument M31-A2 (CLSI, 2002) empfiehlt die Verwendung von Kontrollstämmen zur Überprüfung der Durchführung des Agardiffusionstests und der Zuverlässigkeit der eingesetzten Reagenzien. Diese Kontrollstämmen sollten aus der American Type Culture Collection (ATCC) oder der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) oder einer vergleichbaren Einrichtung stammen (Tab. 9). Anhand der Bakterienstämme *E. coli* DSM® 1103 (ATCC® 25922) und *S. aureus* DSM® 1104 (ATCC® 25923) wurde die Zuverlässigkeit der Agardiffusionstestdurchführung kontrolliert. Der β -Laktamase-produzierende *Y. enterocolitica* 108-c 4/O:3 Stamm aus dem Max von Pettenkofer Institut, München sowie der *E. coli*-Stamm ATCC® 35218 (DSM® 5564) vom DoenitzLab dienen der Positivkontrolle des *blaA*- und *blaB*-Genachweises in der PCR und der β -Laktamase-Expression der BlaA und BlaB im Agardiffusionstest.

Tabelle 9: Verwendete Kontrollstämmen

Kontrollstamm	Verwendung
<i>E. coli</i> DSM® 1103 (ATCC® 25922)	Qualitätskontrolle Agardiffusion
<i>S. aureus</i> DSM® 1104 (ATCC® 25923)	Qualitätskontrolle Agardiffusion
<i>E. coli</i> ATCC® 35218 (DSM® 5564)	Positivkontrolle Agardiffusion
<i>Y. enterocolitica</i> 108-c 4/O:3	Positivkontrolle Agardiffusion und PCR

3.1.2 Material für den Agardiffusionstest

Die bei der Agardiffusion eingesetzten antimikrobiellen Testplättchen wurden nach der Veröffentlichung von Pham et al. (1999) ausgewählt. Zum Einsatz kamen die Antibiotikatestplättchen Ticarcillin 75 µg (Oxoid) und Amoxicillin/Clavulansäure 3 µg (2µg/1µg) (OXOID). Zur Anzucht der *Y. enterocolitica* Stämme und der Kontrollstämme wurden Blutagarplatten (BAP) (Oxoid) und Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agarplatten (CASO-Agarplatten) (Oxoid) verwendet. Für die Durchführung des Agardiffusionstest kamen Müller-Hinton-Agarplatten (MH-Agarplatten) (Oxoid) sowie Müller-Hinton-Bouillon (MH-Bouillon) (Oxoid) zum Einsatz.

3.1.3 Material für die PCR

DNA-Extraktion

Die Extraktion der chromosomalen Bakterien-DNA erfolgte mit DNase freiem Wasser (Eppendorf) in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße (Eppendorf).

Primer

In der PCR wurden zur Detektion des *blaA*-Gens die Primer blaA3 und blaA5 (eurofind MWG GmbH) und zur Detektion des *blaB*-Gens die Primer blaB3 und blaB5 (eurofind MWG GmbH) verwendet (Tab. 10). Im PCR-Ansatz wurden die Primer mit einer Konzentration von 200 nmol/l eingesetzt.

Tabelle 10: Sequenz der Primer für die Amplifikation von *blaA* und *blaB*

β-Laktamase-Gen	Primer	Primer-Sequenz	Amplifikatgröße
<i>blaA</i>	blaA3	5'-AGT GGT GGT ATC ACG TGG GT-3'	479 bp
	blaA5	5'-AAA TGC GCT ACC GGC TTC AG-3'	
<i>blaB</i>	blaB3	5'-GAA CAT ATC TCC TGC CTG GAA AT-3'	827 bp
	blaB5	5'-CCC ACT TTA TAC CTT GGC ACA AA-3'	

Polymerase

Für die PCR wurde der Eppendorf® Master-Mix (2,5x) (Eppendorf®) eingesetzt. Die Zusammensetzung des Master-Mix (2,5x) und die Konzentrationen der einzelnen Reagenzien sind in der Tabelle 11 zusammengefasst. Die PCR wurde mit dem PCR-Cycler iCycler (BioRad) durchgeführt.

Tabelle 11: Zusammensetzung des Eppendorf® Master-Mix (2,5x)

Reagenzien	Konzentration 2,5x
dNTP's	200 µM
Taq-Polymerase	1,25 U
MgCl ₂	1,5 mM

Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese mit anschließender Anfärbung der DNA-Amplifikate mittels Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) fand zur optischen Darstellung der DNA-Amplifikate statt. Für das 1% Agarosegel wurde die Agarose, BioRad Molecular Biology verwendet. Als Gel-Laufpuffer diente der Nucleid Acid Sample Loading Buffer, (5x,) (BioRad). Die visuelle Auswertung der Gele erfolgte anhand des DNA-Markers 100 bp Molecular Ruler EZ Load™ 80 µg/ml (Oxoid).

3.2 Methoden

3.2.1 Anzuchtbedingungen für die Bakterien- und Referenzstämme

Zu Beginn wurden die 200 untersuchten *Y. enterocolitica* Stämme aus der Mikrobank auf Blutagarplatten (BAP) sowie auf Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agarplatten (CASO-Agarplatten) ausgestrichen und bei 30°C für 24-30 Stunden bebrütet. Die Qualitätskontrollstämme *E. coli* DSM® 1103 und *S. aureus* DSM® 1104 wurden ebenfalls direkt aus der Mikrobank auf BAP und CASO-Agarplatten ausgestrichen. Diese wurden bei 37°C für 24-30 Stunden bebrütet. Der BlaA- und BlaB-produzierende *Y. enterocolitica* 108-c 4/O:3 aus dem Max von Pettenkofer Institut, München kam als Positivkontrolle im Agardiffusionstest und in der PCR zum Einsatz. Dazu wurde dieser Stamm auf BAP und CASO-Agarplatten ausgestrichen und ebenfalls bei 30°C für 24-30 Stunden bebrütet. Der ebenfalls β -Laktamase-produzierende Positivkontrollstamm *E. coli* ATCC® 35218 wurde von der Firma DoenitzLab bezogen und nach Anweisung des Herstellers auf BAP und CASO-Agarplatten angezüchtet.

Für den Agardiffusionstest kamen sämtliche BAP als Ausgangsagarplatten zum Einsatz, während die CASO-Agarplatten für die PCR verwendet wurden.

3.2.2 Einstellung der Bakteriendichte

Grundlage für den Agardiffusionstest bildete eine Ausgangsbakteriendichte von $1-4 \times 10^7$ KbE/ml (Pham et al., 1999). Zur Erlangung dieser Ausgangskonzentration wurde in einem Vorversuch ein Trübungsstandard nach McFarland von 0,5 ermittelt. Dieser Trübungsstandard entspricht einer Bakteriendichte von $1-4 \times 10^8$ KbE/ml und einer optischen Dichte von 0,125 bei 600 nm. Die Keimzahldichte von $1-4 \times 10^8$ KbE/ml ist mit Hilfe der photometrischen Bestimmung und mit Hilfe des Tropfplattenverfahrens ermittelt worden (N.N., 1984). Dieses Inokulum wurde anschließend für den Agardiffusionstest 1:10 verdünnt, um die Ausgangsbakteriendichte von $1-4 \times 10^7$ KbE/ml zu erhalten (Abb. 7).

Vorgehensweise:

Tag 1: Zwei der zu untersuchenden *Y. enterocolitica* Stämme und der *Y. enterocolitica*-Positivkontrollstamm wurden auf BAP ausgestrichen und bei 30°C für 24-30 Stunden bebrüht. Die Qualitätskontrollstämme *E. coli* DSM® 1103 und *S. aureus* DSM® 1104 und der Positivkontrollstamm *E. coli* ATCC® 35218 wurden ebenfalls auf BAP ausgestrichen und bei 37°C für 24-30 Stunden bebrüht.

Tag 2: Am folgenden Tag wurden im Dreifach-Ansatz von jeder BAP 5 Kolonien mittels Impföse in ein Reagenzglas mit 5 ml Müller-Hinton-Bouillon (MH-Bouillon) überführt und durch einen Vortex-Mixer homogenisiert. Die anschließende Bebrütung der MH-Bouillons der zwei zu untersuchenden *Y. enterocolitica* Stämme und des *Y. enterocolitica*-Positivkontrollstammes erfolgte bei 30°C für 16-20 Stunden (Kontrollstämme bei 37°C) = **0 Lösung**.

Tag 3: Die Bakteriensuspension (0-Lösung) diente zur Anfertigung einer Verdünnungsreihe bis 10^{-9} . Dafür wurde aus dem 5 ml MH-Bouillon-Röhrchen mit der 0-Lösung 1 ml Suspension entnommen und in ein 9 ml MH-Bouillon-Röhrchen überführt. Nach dem Homogenisieren wurden hieraus wieder 1 ml Suspension entnommen und in ein neues Reagenzglas mit 9 ml MH-Bouillon gegeben und anschließend gut homogenisiert. Die Verdünnungsreihe wurde so bis zur Verdünnungsstufe 10^{-9} fortgesetzt.

Photometrische Bestimmung der Bakterienzeldichte:

Die photometrische Bestimmung der Bakterienzeldichte erfolgte bei der 0-Lösung sowie bei den Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-3} . Zur Bestimmung der optischen Dichte wurden 100 µl der jeweiligen 0-Lösung (Dreifach-Ansatz) in eine Küvette pipettiert und bei 600 nm im Photometer gemessen. Im Anschluss daran erfolgte die photometrische Bestimmung der Verdünnungsstufen 10^{-1} , 10^{-2} und 10^{-3} . Als Blank-Wert diente eine unbeimpfte MH-Bouillon. Zur Vermeidung von Messfehlern innerhalb des Dreifach-Ansatzes wurden alle drei Messungen mit derselben Küvette vorgenommen. Diese wurde zwischen jedem Ansatz mit einer unbeimpften MH-Bouillon gespült.

Keimzahlbestimmung mittels Tropfplattenverfahren:

Die Keimzahlbestimmung mittels Tropfplattenverfahren erfolgte anhand der 'Amtlichen Sammlung' von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB (N. N., 1984). Dazu erfolgte zu Beginn eine Beschriftung der Müller-Hinton-Agarplatten (MH-Agarplatten) im Doppelansatz mit 6 Verdünnungsstufen (10^{-4} bis 10^{-9}). Aus der jeweiligen MH-Bouillon-Verdünnungsstufe wurden anschließend 50 μl pro beschriftetes Feld auf die MH-Agarplatte pipettiert und mit der Pipettenspitze vorsichtig nach innen verstrichen. Nachdem die Flüssigkeit von dem Nährboden aufgenommen wurde, erfolgte eine Bebrütung der MH-Agarplatten bei 30°C für 18-24 Stunden (Kontrollstämmen bei 37°C).

Tag 4: Zur Auswertung der Tropfplatten wurden jeweils zwei Sektoren auf den MH-Agarplatten im Doppelansatz ausgezählt, die zwischen 5 und 50 Kolonien aufwiesen. Die Berechnung der Bakteriendichte erfolgte anhand folgender Formel (N.N., 1984):

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

\bar{c} = gewichteter Mittelwert der Koloniezahlen

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

n_1 = Anzahl der Sektoren der niedrigsten auswertbaren Verdünnungsstufe

n_2 = Anzahl der Sektoren der nächst höheren Verdünnungsstufe

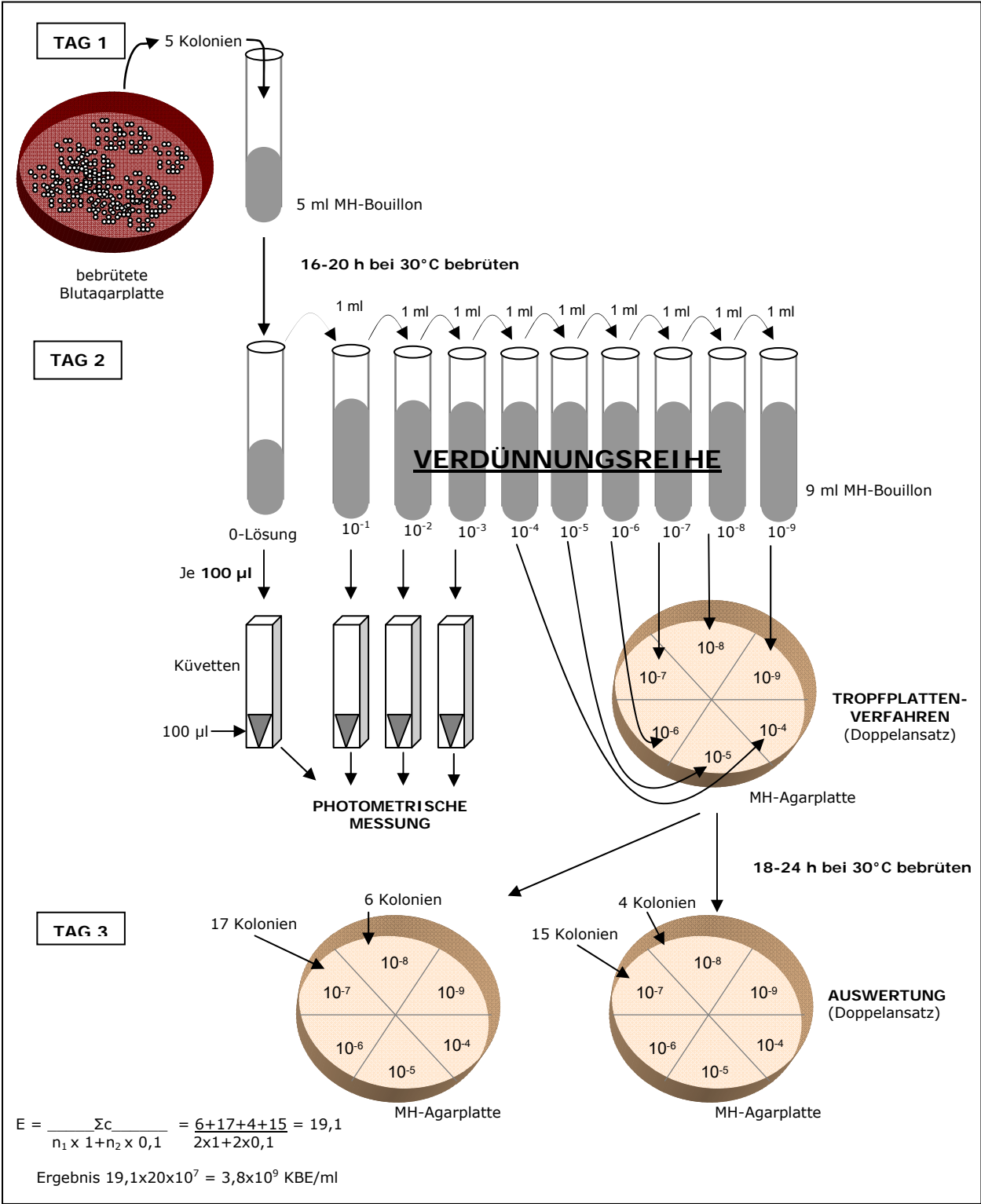


Abbildung 7: Schematische Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte zur Einstellung der Bakteriendichte auf 10⁷ KbE/ml mit Beispielauswertung (modifiziert nach Meyer, 2007)

3.2.3 Ergebnisse der Einstellung der Bakteriendichte

Tabelle 12: Durchschnittliche Ergebnisse der photometrischen Dichtebestimmung sowie der Keimzählung mittels Tropfplattenverfahren

Stamm	Verdünnung	Optische Dichte bei 600 nm	Bakterienzeldichte
<i>Y. enterocolitica</i>	0	1,082	3,6 x 10 ⁹ KbE/ml
HYE 9297	10 ⁻¹	0,127	
	10 ⁻²	0,019	
	10 ⁻³	0,001	
<i>Y. enterocolitica</i>	0	1,116	3,7 x 10 ⁹ KbE/ml
HYE 2093	10 ⁻¹	0,126	
	10 ⁻²	0,018	
	10 ⁻³	0,002	
<i>E. coli</i>	0	1,282	6,5 x 10 ⁹ KbE/ml
DSM® 1103	10 ⁻¹	0,157	
	10 ⁻²	0,020	
	10 ⁻³	0,003	
<i>S. aureus</i>	0	1,101	4,9 x 10 ⁹ KbE ml
DSM® 1104	10 ⁻¹	0,155	
	10 ⁻²	0,024	
	10 ⁻³	0,004	
<i>Y. enterocolitica</i>	0	1,068	3,8 x 10 ⁹ KbE/ml
108-c	10 ⁻¹	0,126	
	10 ⁻²	0,020	
	10 ⁻³	0,002	
<i>E. coli</i>	0	1,280	6,2 x 10 ⁹ KbE/ml
ATCC® 35218	10 ⁻¹	0,153	
	10 ⁻²	0,024	
	10 ⁻³	0,004	

Die Bestimmung der Bakteriendichte mittels Tropfplattenverfahren zeigte, dass die 0-Lösung bei den getesteten *Y. enterocolitica* Stämmen zwischen $3,6\text{-}3,8 \times 10^9$ KbE/ml enthielt. Bei den Qualitätskontrollstämmen lag die Bakteriendichte in der 0-Lösung bei *E. coli* DSM® 1103 im Durchschnitt bei $6,5 \times 10^9$ KbE/ml und bei *S. aureus* DSM® 1104 durchschnittlich bei $4,9 \times 10^9$ KbE/ml. Bei den Positivkontrollen zeigte *Y. enterocolitica* 108-c 4/O:3 eine Dichte von $3,8 \times 10^9$ KbE/ml und *E. coli* ATTC® 35218 eine Durchschnittsbakteriendichte von $6,2 \times 10^9$ KbE/ml.

Die photometrische Dichtebestimmung der 1:10 Verdünnung wies eine durchschnittliche optische Dichte (OD) von 0,126 bis 0,127 bei den *Y. enterocolitica* Stämmen und eine OD von 0,126 beim *Y. enterocolitica* 108-c Positivstamm auf. Die Ergebnisse der OD-Bestimmung bestätigen damit die Bakteriendichte von 10^9 KbE/ml in der 0-Lösung. Bei einer 1:100 Verdünnung der 0-Lösung ist dementsprechend eine Bakteriendichte von $1\text{-}4 \times 10^7$ KbE/ml bei *Y. enterocolitica* zu erwarten. Daher wurde diese Verdünnungsstufe zum Beimpfen der MH-Agarplatten im Agardiffusionstest verwendet. Die durchschnittlichen Ergebnisse sind in Tabelle 12 dargestellt.

3.2.4 Durchführung des Agardiffusionstests

Die Durchführung des Agardiffusionstests erfolgte in Anlehnung an die Veröffentlichung von Pham et al. (1993a, 1999) und nach den Richtlinien des CLSI-Dokument M31-A2 aus dem Jahre 2002. Zu Beginn der Tests wurden die 200 *Y. enterocolitica* Stämme von der Mikrobank auf BAP ausgestrichen und über Nacht bei 30°C (Positivkontrolle bei 30°C, Kontrollstämmen bei 37°C) bebrütet. Zur Herstellung des Inokulums mit einer Bakteriendichte von $1\text{-}4 \times 10^7$ KbE/ml wurden von den jeweiligen beimpften BAP vom Vortag 5 Kolonien mit der Impföse in 5 ml MH-Bouillon überimpft, mittels Vortex-Mixer gut homogenisiert und für 16-20 Stunden bei 30°C (Positivkontrolle bei 30°C, Kontrollstämmen bei 37°C) bebrütet. Aus der Flüssigkultur wurde eine 1:100 Verdünnung hergestellt, indem 1 ml von der Flüssigkultur in ein 9 ml MH-Bouillon-Röhrchen und von diesem wieder 1 ml in ein neues 9 ml MH-Bouillon-Röhrchen überführt wurde. Mit Hilfe

des Vortex-Mixers sind die Suspensionen gut gemischt worden. Anschließend wurde jedes verdünnte Inokulum visuell mit dem McFarland 0,5 Standard verglichen und gegebenenfalls mit MH-Bouillon angepasst. Zur Beimpfung der MH-Agarplatten wurde diese 1:100 Verdünnung verwendet. Dazu wurde ein steriler Tupfer in die Bakteriensuspension eingetaucht und anschließend überschüssiges Inokulum aus dem Tupfer entfernt, indem der Tupfer oberhalb des Flüssigkeitsspiegels an die Röhrchenwand gedrückt wurde. Mit diesem befeuchteten Tupfer erfolgte ein gleichmäßiger Dreifach-Ausstrich über die gesamte MH-Agarplatte, wobei die MH-Agarplatte jedes Mal um 60° gedreht wurde. Zum Antrocknen des Inokulums wurde die beimpfte Agarplatte für 5 Minuten bei Raumtemperatur (RT) stehen gelassen. Danach wurden die antibiotikahaltigen Testplättchen im Doppelansatz mit Hilfe einer sterilen Pinzette in einem Abstand von 22 mm mittig auf die Agaroberfläche aufgebracht. Zur Überprüfung der BlaA-Expression wurden die Antibiotikatestplättchen Ticarcillin (75 µg) und Amoxicillin/Clavulansäure (3 µg) auf die MH-Agarplatte und zur Überprüfung der BlaB nur ein Amoxicillin/Clavulansäure-Antibiotikatestplättchen (3 µg) auf die MH-Agarplatte aufgebracht. Anschließend wurden die Platten 20-22 Stunden bei 30°C (Positivkontrolle bei 30°C, Kontrollstäme bei 37°C) bebrütet.

Um eine mögliche Temperaturabhängigkeit der β -Laktamasebildung zu überprüfen (KIST und SANABRIA DE ISELE, 1980; JIMENEZ-VALERA et al., 1986), wurden die gleichen Untersuchungen im Doppelansatz bei 25°C (Kontrollstäme bei 25°C und 30°C) durchgeführt.

Nach der Inkubation wurde der Hemmhof bei jedem Testplättchen mit einem Lineal auf den Millimeter genau ausgemessen. In Abbildung 8 ist die Durchführung des Agardiffusionstests schematisch dargestellt. Der Auswertung liegt der Auswerteschlüssel von Pham et al. (1995b, 1999) zu Grunde. Dabei wurde von der Größe des HHR um Ticarcillin und Amoxicillin/Clavulansäure auf die Expression der BlaA oder BlaB geschlossen (Tab. 13). Der HHR entsprach dabei der Strecke des

Hemmhofs vom Rand des Antibiotikaplättchen bis zum Ende der Hemmhofzone. Bei ungleichmäßigen Hemmhöfen wurde die breiteste Fläche gemessen. Eine BlaA-Expression liegt vor, wenn der HHR um Ticarcillin zwischen 2 und 8 mm beträgt und eine charakteristische Synergiezone zwischen den Hemmhöfen um Ticarcillin und Amoxicillin/Clavulansäure besteht. Eine BlaB-Expression hingegen besteht, wenn der Hemmhof um Ticarcillin größer 9 mm beträgt und keine charakteristische Synergiezone zwischen den Antibiotikatestplättchen vorhanden ist (PHAM et al., 1999). Die Anwesenheit der BlaB kann auch anhand des Amoxicillin/Clavulansäure-Antibiotikatestplättchen allein bestimmt werden. Bei einem HHR um Amoxicillin/Clavulansäure von kleiner 3 mm liegt eine BlaB-Expression vor, während eine Expression bei einem HHR von größer 6 mm nicht existiert (PHAM et al., 1995b).

Tabelle 13: Bewertungsschlüssel zur Bestimmung der Expression der β -Laktamase A und B im Agardiffusionstest (nach Pham et al., 1995b, 1999)

β -Laktamase	positive Expression
BlaA	HHR TIC 2-8 mm + einen charakteristische Synergiezone zwischen TIC und AMC; HHR AMC > 6 mm
BlaB	HHR > 9 mm um TIC und keine Synergiezone um AMC; HHR AMC < 3 mm

AMC: Amoxicillin/Clavulansäure; HHR: Hemmhofradius; TIC: Ticarcillin

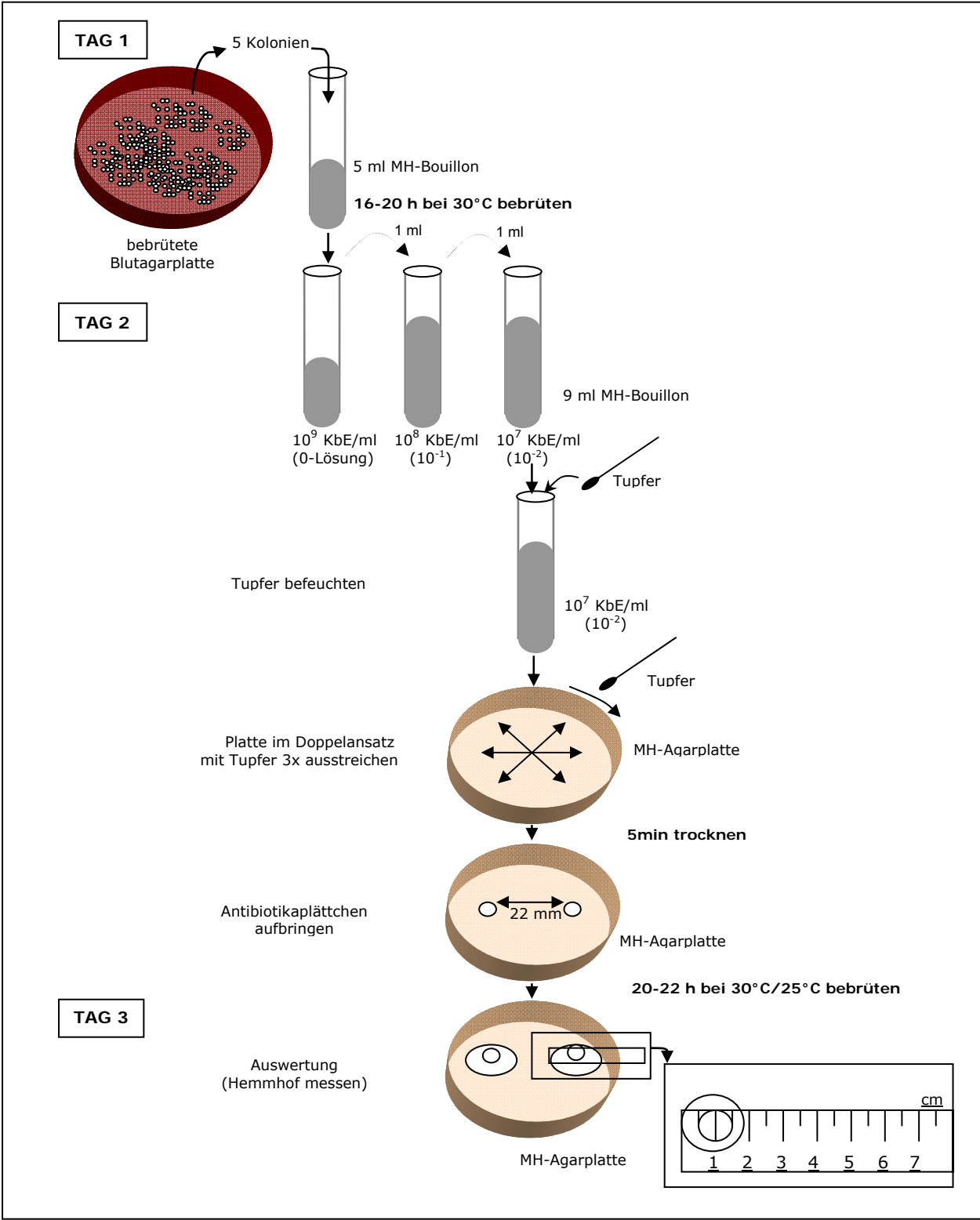


Abbildung 8: Durchführung des Agardiffusionstests (modifiziert nach Meyer, 2007)

3.2.5 Polymerase-Ketten-Reaktion

3.2.5.1 DNA-Extraktion

Die Untersuchung auf Vorliegen der β -Laktamase-Gene *blaA* und *blaB* mittels PCR wurde bei allen 200 *Y. enterocolitica* Stämmen durchgeführt. Dazu wurden die *Y. enterocolitica* Stämme und die Referenzstämme, wie im Kapitel 3.2.1 beschrieben, auf CASO-Agarplatten (Oxoid) angezüchtet. Zur Extraktion der DNA wurde von jeder CASO-Agarplatte eine kleine Bakterienkolonie mittels Impföse entnommen und in sterile 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäße mit 100 μ l DNase freiem Wasser (Eppendorf) suspendiert. Anschließend wurden die Proben mittels Vortex-Mixer kurz gemischt. Durch eine Erhitzung der Proben für 10 min bei 99°C wurde die Zellwände zerstört und damit die Bakterien-DNA freigesetzt. Durch eine kurze Zentrifugation sind anschließend Wasserkondensate aus dem Deckel der Eppendorfggefäße entfernt worden. Die freigesetzte Bakterien-DNA wurde im Anschluss als Template-DNA verwendet.

3.2.5.2 PCR-Reaktionsansätze und DNA-Amplifikation

Die PCR-Reaktionsansätze wurden unter der Sicherheitswerkbank (NUNC™) auf Eis in 0,5 ml Eppendorfggefäße pipettiert (Tab. 14). Der Reaktionsansatz bestand dabei aus dem Eppendorf-Mastermix® (2,5x), DNase freiem Wasser (Eppendorf®), den jeweiligen Primern, sowie der Template-DNA. Das Reaktionsvolumen pro Probe betrug insgesamt 25 μ l.

Tabelle 14: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes pro Probe

Reagenz	Volumen
DNase freies Wasser (Eppendorf®)	12 μ l
Eppendorf-Master-Mix (2,5x®)	10 μ l
Primer (<i>blaA</i> oder <i>blaB</i>)	1 μ l
Template-DNA	2 μ l
Summe	25 μl

Die Eppendorfgefäße wurden in den Thermocycler (iCycler BioRad) eingesetzt und die DNA-PCR-Amplifikation bei folgendem Programm gestartet:

Tabelle 15: PCR-Protokoll

Protokollschritt	Laufzeit	Temperatur	Zyklen
Primärdenaturierung	5 min	95°C	1
Denaturierung	30 sec	95°C	35
Annealing	1 min	54°C	
Elongation	2 min	72°C	
Schlusselongation	4 min	72°C	1

Zur Kontrolle der Kontaminationsfreiheit wurde bei jedem Gel in eine Gel-Tasche eine Negativkontrolle mitgeführt, die alle Reagenzien außer der Template-DNA enthielt. Als Positivkontrolle wurde der *Y. enterocolitica* 108-c 4/O:3 Stamm mitgeführt.

3.2.5.3 Agarosegelelektrophorese

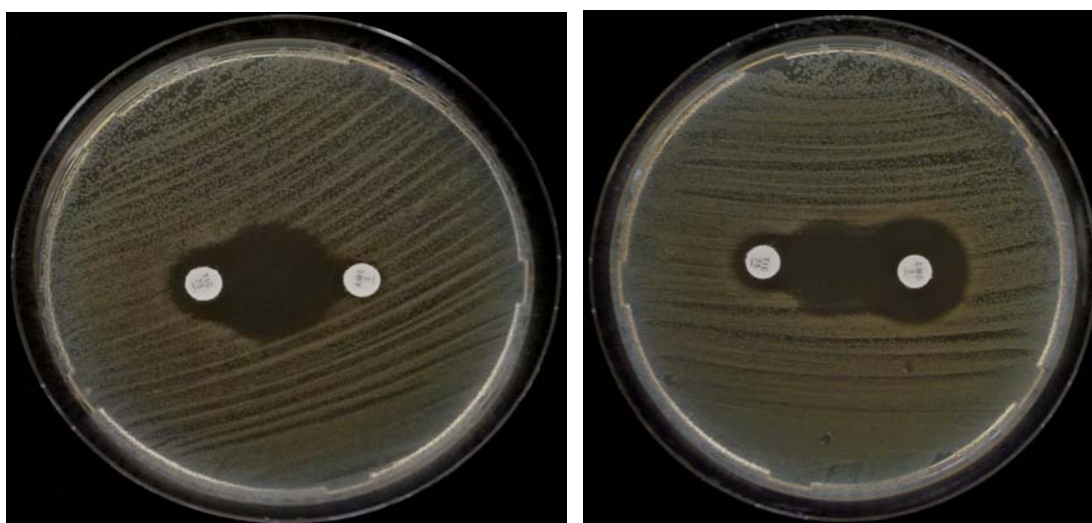
Die Analyse der PCR-Amplifikate erfolgte mit einem 1%igen Agarosegel. Dazu wurden 0,3 g Agarose (BioRad) in einem 100 ml Erlenmeyerkolben eingewogen und mit 1,5 ml 10x TSE-Puffer (BioRad) ad 30 ml Aqua bidest. gemischt. Um die Agarose vollständig zu lösen, wurde die Lösung für ca. 2 min in der Mikrowelle erhitzt. Anschließend wurde ein Gelschlitten in die dazugehörige Gießvorrichtung eingespannt und die gelöste Agarose hineingegeben. Sofort wurde ein Gelkamm mit 15 Zinken in die Gießvorrichtung eingehängt. Das Agarosegel stand für 45 Minuten bis zur Polymerisation bei RT. Nach der Polymerisation der Agarose konnte der Gelkamm entfernt und das Gel mit dem Gelschlitten in die Laufkammer eingehängt werden. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die Geltaschen zum Negativpol der Laufkammer zeigten. Die Laufkammer wurde mit 0,5x TSE-Puffer gefüllt, bis das Agarosegel

ausreichend mit dem Puffer bedeckt war. Zur Erleichterung des Einbringens der PCR-Ansätze sowie zur optischen Verfolgung des Elektrophoreselaufs wurden je 4 μ l eines PCR-Ansatzes mit 4 μ l des Gel-Laufpuffers (BioRad), bestehend aus Glycerin, TBE-Puffer sowie Bromphenolblau vermischt und 4 μ l davon in die Geltaschen eingebracht. In die erste und in die letzte Geltasche wurden 4 μ l des DNA-Markers (BioRad) pipettiert. Anschließend wurde die Laufkammer geschlossen und die Gelelektrophorese bei 120 Volt für 30 Minuten gestartet. Nach Beendigung wurde das Gel für 15 Minuten in ein Ethidiumbromidbad (25 μ l/500 ml) eingelegt. Zur Entfernung von überschüssigem Ethidiumbromid wurde das Gel anschließend für 5 Minuten in Aqua bidest. gewässert. Unter UV-Licht wurde das Gel betrachtet und zur Dokumentation digital fotografiert. Die Auswertung erfolgte visuell mit Hilfe der Längenstandards (BioRad) sowie des Positivkontrollstamms.

4. ERGEBNISSE

4.1 Ergebnisse des Agardiffusionstests

Die Expression von β -Laktamasen wurde bei 200 aus Bayern isolierten *Y. enterocolitica* 4/O:3 Stämmen mittels Doppelplättchenagardiffusionstest untersucht. 60 der untersuchten Stämme sind humane Stuhlproben. 140 Stämme sind porcinen Ursprungs und wurden aus Kot (17), Tonsillen (63), Ferkeln (2), Fleischstücken (17), Innereien (14), Zungen (5) und Hackfleisch (22) isoliert. Die Auswertung erfolgte nach PHAM et al. (1995b, 1999). Zur Bewertung wurde der HHR um das Ticarcillin- und Amoxicillin/Clavulansäure-Antibiotikatestplättchen, wie in Kapitel 3.2.4 beschrieben, herangezogen (Abb. 9).



BlaA und BlaB

BlaA ohne BlaB

Abbildung 9: Expression und Synergiezone von BlaA mit BlaB-Expression (links) bzw. ohne BlaB-Expression (rechts) im Agardiffusionstest bei *Y. enterocolitica* 4/O:3

Antibiotikatestplättchen je Platte: links: Ticarcillin (75 µg); rechts: Amoxicillin/Clavulansäure (3 µg)

Im Agardiffusionstest wiesen insgesamt 99,5 % der 200 untersuchten *Y. enterocolitica* 4/O:3 Stämme eine BlaA-Expression auf. Die 199 BlaA-positiven Stämme zeigten dabei einen HHR von 2 bis 5 mm um Ticarcillin sowie eine charakteristische Synergiezone zwischen den Antibiotikatestplättchen. Nur bei einem einzigen aus Schweine-Tonsillen isolierten Stamm war die Interpretation des Ergebnisses fraglich. Dieser Stamm besaß im Agardiffusionstest einen HHR von 9 mm um Ticarcillin, womit er außerhalb des HHR-Bereiches für ein BlaA-positives Ergebnis lag. Trotzdem zeigte dieser Stamm eine Synergiezone zwischen den Antibiotikatestplättchen, die charakteristisch für eine BlaA-Expression ist.

Von den 200 untersuchten Proben zeigten 196 (98,0 %) Stämme im Agardiffusionstest eine Expression von BlaB. 57 dieser BlaB-positiven Stämme waren humanen und 139 porciner Herkunft. Bei allen 196 BlaB-positiven Stämmen wurden gleichzeitig auch BlaA exprimiert. Bei dem Stamm mit fraglicher BlaA-Expression erfolgte eine BlaB-Expression. In Tabelle 16 sind die BlaA- und BlaB-positiven Stämme zur Veranschaulichung dargestellt. Der HHR um Amoxicillin/Clavulansäure war bei allen 196 (98,0 %) BlaB-positiven Stämmen kleiner 3 mm. Bei den 4 (2,0 %) BlaB-negativen Stämmen lag der HHR zwischen 6 und 8 mm. Drei dieser Stämme waren humanen und ein Stamm porcinen Ursprungs (Tab. 22).

PHAM et al. (1999) erklärten die positive BlaA-Expression mit einem HHR um Ticarcillin von 2 bis 8 mm und mit einer gleichzeitigen charakteristischen Synergiezone zwischen dem Hemmhof um Ticarcillin und Amoxicillin/Clavulansäure. Im durchgeführten Agardiffusionstest wiesen alle 200 untersuchten Stämmen eine solche Synergiezone auf, von denen aber nicht alle Stämme auch einen Hemmhof um Amoxicillin/Clavulansäure zeigten. Bei 30°C Bebrütungstemperatur zeigten nur 20 (10,0 %) von 200 Stämmen eine charakteristische Synergiezone mit gleichzeitigem Hemmhofradius um Ticarcillin und Amoxicillin/Clavulansäure (Abb. 9). Bei der Bebrütungstemperatur von 25°C konnte dies bei 15 (7,5 %) Stämmen beobachtet werden. Dabei wurde ein HHR von größer 2 mm als Hemmhof um

Amoxicillin/Clavulansäure als positiv für diese Zone gewertet. Bei den übrigen 180 (90,0 %) Stämmen bei der Bebrütungstemperatur von 30°C und den 185 (92,5 %) Stämmen bei der Bebrütungstemperatur von 25°C konnte eine Synergiezone zwischen den beiden Antibiotikatestplättchen beobachtet werden, bei dem der Hemmhof um Amoxicillin/Clavulansäure kleiner 1 mm war (Abb. 9).

Tabelle 16: Anzahl der BlaA- und BlaB-positiven Stämme im Agardiffusionstest

Herkunft der Stämme		untersuchte Stämme (%)	BlaA positiv (%)	BlaB positiv (%)
Mensch	Stuhl	60 (30,0)	60 (30,0)	57 (28,5)
Schwein	Kot	17 (8,5)	17 (8,5)	17 (8,5)
	Tonsillen	63 (31,5)	62 (31,0)	62 (31,0)
	Ferkel	2 (1,0)	2 (1,0)	2 (1,0)
Schweinefleisch	Fleischstücke	17 (8,5)	17 (8,5)	17 (8,5)
	Innereien	14 (7,0)	14 (7,0)	14 (7,0)
	Zungen	5 (2,5)	5 (2,5)	5 (2,5)
	Hackfleisch	22 (11,0)	22 (11,0)	22 (11,0)
Summe		200 (100,0)	199 (99,5)	196 (98,0)

Ergebnisse des HHR um Ticarcillin und der Synergie im Agardiffusionstest bei 30°C Bebrütungstemperatur

Im Agardiffusionstest zeigten 59 der BlaA-positiven humanen *Y. enterocolitica* 4/O:3 Stämme einen HHR um Ticarcillin von 2 bis 4 mm. Nur 1 Stamm besaß einen größeren HHR von 5 mm. Der HHR um Ticarcillin lag bei 61 der 62 BlaA-positiven Stämme aus Schweine-Tonsillen ebenfalls zwischen 2 und 4 mm. Bei einem Stamm war der HHR kleiner 1 mm. Bei den Stämmen aus Kot, Ferkeln, Fleischstücken, Innereien und Zungen wurden alle BlaA-positiven Stämme mit einem HHR von 2 bis 4 mm gemessen. 21 der 22 Hackfleischstämmen zeigten ebenfalls diese HHR-Größe. Lediglich 1 Stamm wies mit 5 mm einen größeren HHR auf. Die Ergebnisse der Verteilung der HHR-Größe um Ticarcillin bei den BlaA-positiven Stämmen sind in Tabelle 17 zusammengefasst.

Tabelle 17: Verteilung der HHR-Größe um Ticarcillin der BlaA-positiven Stämme
(30°C Bebrütungstemperatur)

Herkunft der Stämme (n)		BlaA positiv (n)	≤ 1 mm	2-4 mm	5 mm
Mensch	Stuhl (60)	60	-	59	1
Schwein	Kot (17)	17	-	17	-
	Tonsillen (63)	62	1	61	-
	Ferkel (2)	2	-	2	-
Schweinefleisch	Fleischstücke (17)	17	-	17	-
	Innereien (14)	14	-	14	-
	Zungen (5)	5	-	5	-
	Hackfleisch (22)	22	-	21	1
Summe	200	199	1	196	2

n: Anzahl der Proben

Die von PHAM et al. (1999) beschriebene charakteristische Synergiezone zwischen dem Hemmhof um Ticarcillin und gleichzeitigem Hemmhof um Amoxicillin/Clavulansäure von größer 2 mm konnte nur bei 20 (10,0 %) der 200 untersuchten Stämme beobachtet werden. Von diesen 20 Stämmen waren 7 Stämme humanen und 13 Stämme porcinen Ursprungs (2 aus Kot, 9 aus Tonsillen, 1 aus Innereien, 1 aus Hackfleisch) (Tab. 18). Bei den übrigen 180 (90,0 %) Stämmen zeigte sich eine Synergiezone zwischen den Antibiotikatestplättchen, aber der HHR um Amoxicillin/Clavulansäure war kleiner 1 mm (Abb. 9).

Die Synergiezone zeigte sich bei den einzelnen Stämmen in ihrer Ausprägung unterschiedlich groß. Bei der Mehrheit der Stämme reichte die Synergiezone vom Rand des Ticarcillin-Antibiotikaplättchen 16 bis 22 mm weit bis zum Amoxicillin/Clavulansäure-

Antibiotikatestplättchen. Nur bei 17 Stämmen reichte die Synergiezone weniger als 16 mm weit. Einen Zusammenhang zwischen der HHR-Größe um Ticarcillin oder Amoxicillin/Clavulansäure und der Synergiezonen-Größe war dabei ebenso wenig zu erkennen wie ein Zusammenhang zwischen der Synergiezonen-Größe und des Ursprungs der untersuchten Stämme.

Tabelle 18: Anzahl der BlaA positiven Stämme mit charakteristischer Synergiezone und HHR von >2 mm um AMC bzw. HHR von ≤ 1 mm um AMC (30°C Bebrütungstemperatur)

Herkunft der Stämme (n)		BlaA positiv (%)	Synergiezone	
			HHR AMC > 2 mm (%)	HHR AMC ≤ 1 mm (%)
Mensch	Stuhl (60)	60 (30,0)	7 (3,5)	53 (26,5)
Schwein	Kot (17)	17 (8,5)	2 (1,0)	15 (7,5)
	Tonsillen (63)	62 (31,0)	9 (4,5)	53 (26,5)
	Ferkel (2)	2 (1,0)	-	2 (1,0)
Schweinefleisch	Fleischstücke(17)	17 (8,5)	-	17 (8,5)
	Innereien (14)	14 (7,0)	1 (0,5)	13 (6,5)
	Zungen (5)	5 (2,5)	-	5 (2,5)
	Hackfleisch (22)	22 (11,0)	1 (0,5)	21 (10,5)
Summe	200	199 (99,5)	20 (10,0)	179 (89,5)

n: Anzahl der Proben; AMC: Amoxicillin/Clavulansäure

Ergebnisse des HHR um Ticarcillin und der Synergie im Agardiffusionstest bei 25°C Bebrütungstemperatur

Bei 25°C Bebrütungstemperatur lag der HHR um Ticarcillin bei 190 der BlaA-positive Stämme zwischen 2 und 4 mm. Nur 2 humane Stämme zeigten einen größeren HHR von 5 mm und 1 humaner Stamm einen HHR von 6 mm. Bei den porcinen Stämmen wiesen drei Stämme aus Schweine-Tonsillen einen HHR von kleiner 1 mm auf, wobei einer dieser beiden Stämme bereits bei 30°C diese HHR-Größe zeigte. Lediglich ein Stamm aus Schweine-Tonsillen wies einen größeren HHR von 5 mm auf. Der größte HHR der BlaA-positiven Stämme lag bei einem aus Hackfleisch isoliertem Stamm bei 7 mm (Tab. 19).

Tabelle 19: Verteilung der HHR-Größe um Ticarcillin der BlaA-positiven Stämme (25°C Bebrütungstemperatur)

Herkunft der Stämme (n)		BlaA positiv (n)	≤ 1 mm	2-4 mm	5 mm	6 mm	7 mm
Mensch	Stuhl (60)	60	-	57	2	1	-
Schwein	Kot (17)	17	-	16	-	1	-
	Tonsillen (63)	62	3	58	1	-	-
	Ferkel (2)	2	-	2	-	-	-
Schweinefleisch	Fleischstücke(17)	17	-	17	-	-	-
	Innereien (14)	14	-	14	-	-	-
	Zungen (5)	5	-	5	-	-	-
	Hackfleisch (22)	22	-	21	-	-	1
Summe	200	199	3	190	3	2	1

n: Anzahl der Proben

Bei einer Bebrütungstemperatur von 25°C zeigten 15 (7,5 %) der 200 untersuchten Stämme eine charakteristische Synergiezone zwischen den Antibiotikatestplättchen mit gleichzeitigem Hemmhof von größer 2 mm um Amoxicillin/Clavulansäure. Von diesen Stämmen waren 9 humanen und 6 porcinen Ursprungs. Von diesen porcinen Stämmen waren 4 Stämme aus Schweine-Tonsillen und je 1 Stamm aus Ferkeln und Hackfleisch. Bei den übrigen 184 Stämmen zeigte sich eine Synergiezone mit einem HHR von kleiner 1 mm um das Amoxicillin/Clavulansäure-Antibiotikatestplättchen (Tab. 20). Bei 25°C reichte die Synergiezone vom Rand des Ticarcillin-Antibiotikaplättchen 6 bis 22 mm weit bis zum Amoxicillin/Clavulansäure-Antibiotikatestplättchen. Nur bei 19 Stämmen reichte die Synergiezone weniger als 16 mm weit. Einen Zusammenhang zwischen der HHR-Größe um Ticarcillin oder Amoxicillin/Clavulansäure und der Synergiezonen-Größe sowie ein Zusammenhang zwischen der Synergiezonen-Größe und des Ursprungs der untersuchten Stämme war auch hier nicht zu erkennen.

Tabelle 20: Anzahl der BlaA positiven Stämme mit charakteristischer Synergiezone und HHR von >2 mm um AMC bzw. HHR von \leq 1 mm um AMC (25°C Bebrütungstemperatur)

Herkunft der Stämme (n)		BlaA positiv (%)	Synergiezone	
			HHR AMC > 2 mm (%)	HHR AMC \leq 1 mm (%)
Mensch	Stuhl (60)	60 (30,0)	9 (4,5)	51 (25,5)
Schwein	Kot (17)	17 (8,5)	-	17 (8,5)
	Tonsillen (63)	62 (31,0)	4 (2,0)	58 (29)
	Ferkel (2)	2 (1,0)	1 (0,5)	1 (0,5)
Schweinefleisch	Fleischstücke(17)	17 (8,5)	-	17 (8,5)
	Innereien (14)	14 (7,0)	-	14 (7,0)
	Zungen (5)	5 (2,5)	-	5 (2,5)
	Hackfleisch (22)	22 (11,0)	1 (0,5)	21 (10,5)
Summe	200	199 (99,5)	15 (7,5)	184 (92,0)

n: Anzahl der Proben

Vergleich der Ergebnisse bei 30°C und 25°C Bebrütungstemperatur

Die Agardiffusionstestergebnisse der beiden Bebrütungstemperaturen 30°C und 25°C differierten besonders in der Anzahl der unterschiedlichen HHR-Größen (Tab. 21). Beim Vergleich der einzelnen HHR-Größen in mm zeigte sich, dass bei 30°C insgesamt 64 Stämme (32,0 %) einen HHR von 2 mm um Ticarcillin aufwiesen, während es bei 25°C insgesamt 104 (52,0 %) Stämme waren. Anders verhält es sich bei der HHR-Größe von 3 mm. Diese HHR-Größe wiesen bei 30°C insgesamt 102 (52,0 %) Stämme auf, während dies bei 25°C nur 21 Stämme taten. Ähnlich ist das Ergebnis bei einem HHR von 4 mm. Während bei 30°C 30 (15,0 %) Stämme diese HHR-Größe hatten, waren es bei 25°C nur 15 (7,5 %). Bei den anderen HHR-Größen zeigten sich nur geringfügige Unterschiede.

Die charakteristische Synergiezone bildete sich zwischen den Antibiotikatestplättchen bei den unterschiedlichen *Y. enterocolitica* Stämmen unterschiedlich groß aus. Bei der Mehrheit der Stämme reichte die Synergiezone vom Rand des Ticarcillin-Antibiotikaplättchen 16 bis 22 mm weit bis zum Amoxicillin/Clavulansäure-Antibiotikatestplättchen. Während bei 30°C Bebrütungstemperatur 17 Stämme eine kleinere Größe dieser Synergiezone zeigten, waren es bei 25°C 19 Stämme. Einen Zusammenhang zwischen der HHR-Größe um Ticarcillin oder Amoxicillin/Clavulansäure und der Größe der Synergiezone war dabei nicht zu erkennen. Ebenso ließ sich kein Zusammenhang zwischen der Synergiezonen-Größe und des Ursprungs der untersuchten Stämme erkennen. Ein Einfluss der Temperatur auf die Synergiegröße lag nicht vor.

Insgesamt wiesen alle 200 untersuchten *Y. enterocolitica* 4/O:3 Stämme eine charakteristische Synergiezone zwischen den beiden Antibiotikatestplättchen Ticarcillin und Amoxicillin/Clavulansäure auf. Dabei unterschieden sie sich insbesondere in der Größe des HHR um Amoxicillin/Clavulansäure. Während bei der Bebrütungstemperatur von 30°C 20 (10,0 %) Stämme unterschiedlichen Ursprungs eine charakteristische Synergiezone mit gleichzeitigem HHR von größer 2 mm um Amoxicillin/Clavulansäure zeigten, waren es bei 25°C Bebrütungstemperatur von diesen 20 Stämmen insgesamt nur 15 (7,5 %) Stämme. 179 (89,5 %) Stämme unterschiedlichen Ursprungs zeigten bei 30°C neben der Synergiezone lediglich einen HHR um Amoxicillin/Clavulansäure von kleiner 1 mm. Bei 25°C waren es hingegen 184 (92,0 %).

Tabelle 21: Vergleich des HHR um Ticarcillin in mm bei den BlaA-positiven Stämmen bei den Bebrütungstemperaturen 30°C und 25°C

BlaB-positive Stämme (n)	≤ 1 mm		2 mm		3 mm		4 mm		5 mm		6 mm		7 mm	
	30	25	30	25	30	25	30	25	30	25	30	25	30	25
Stuhl (60)	-	-	15	26	31	27	13	4	1	2	-	1	-	-
Kot (17)	-	-	6	8	7	5	4	3	-	-	-	1	-	-
Tonsillen (62)	1	3	25	36	29	18	7	4	-	1	-	-	-	-
Ferkel (2)	-	-	-	1	2	-	-	1	-	-	-	-	-	-
Fleischstücke (17)	-	-	3	7	12	8	2	2	-	-	-	-	-	-
Innereien (14)	-	-	9	11	5	3	-	-	-	-	-	-	-	-
Zungen (5)	-	-	1	3	2	2	2	-	-	-	-	-	-	-
Hackfleisch (22)	-	-	5	12	14	8	2	1	1	-	-	-	-	1
Summe	1	3	64	104	102	71	30	15	2	3	-	2	-	1

n: Anzahl der Proben

Ergebnisse des HHR um Amoxicillin/Clavulansäure zur Detektion der BlaB-Expression im Agardiffusionstest

Die Detektion der BlaB-Expression erfolgte im Agardiffusionstest anhand des HHR um Amoxicillin/Clavulansäure. Dieser lag bei insgesamt 196 (98,0 %) der 200 Stämme zwischen kleiner 1 mm und 3 mm (Tab. 22). Bei lediglich 4 (2,0 %) Stämmen betrug der HHR 6 bis 8 mm. Diese 4 Stämme zeigten damit keine BlaB-Expression im Agardiffusionstest. Von diesen 4 BlaB-negativen Stämmen waren 3 humanen und 1 Stamm porcinen Ursprungs. Ein wesentlicher Unterschied zwischen den HHR-Größen um Amoxicillin/Clavulansäure konnte beim Vergleich der beiden Bebrütungs-temperaturen 30°C und 25°C nicht festgestellt werden.

Tabelle 22: Vergleich des HHR um Amoxicillin/Clavulansäure in mm
(30°C und 25°C Bebrütungstemperatur)

Herkunft der Stämme (n)	≤ 1 mm		2 mm		3 mm		4 mm		5 mm		6 mm		7 mm		8 mm	
	30	25	30	25	30	25	30	25	30	25	30	25	30	25	30	25
Stuhl (60)	53	51	3	3	1	3	-	-	-	-	1	-	1	1	1	2
Kot (17)	15	17	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tonsillen (63)	54	59	8	3	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-
Ferkel (2)	2	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fleischstücke (17)	17	17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Innereien (14)	13	14	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Zungen (5)	5	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hackfleisch (22)	21	21	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Summe	180	185	15	8	1	3	-	-	-	-	2	1	1	1	1	2

n: Anzahl der Proben

4.2 Ergebnisse der PCR

Die Überprüfung des Vorliegens der β -Laktamase-Gene *blaA* und *blaB* für die Expression von BlaA und BlaB wurde bei 200 *Y. enterocolitica* 4/O:3 Stämmen unter Verwendung einer konventionellen PCR-Methode nach STOCK et al. (1999) untersucht. Als Positivstamm wurde der bereits von STOCK et al. (1999) verwendete *Y. enterocolitica* 108-c 4/O:3 Stamm eingesetzt.

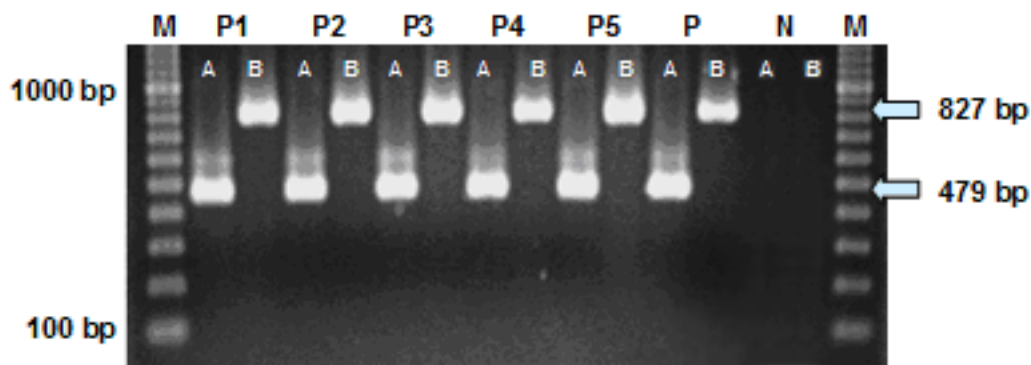


Abbildung 10: PCR Amplifikate im Agarosegel

M: 100 bp DNA-Marker; P: Positivkontrolle *Y. enterocolitica* 108-c 4/O:3; N: Negativkontrolle;
P1 bis P5 : *Y. enterocolitica* 4/O:3 Nr. 1 bis 5; A: PCR-Amplifikat für *blaA*; B: PCR-Amplifikat für *blaB*;

Unter Verwendung spezifischer Primer für die *Y. enterocolitica* 4/O:3 β -Laktamase-Gene *blaA* und *blaB* (siehe Kapitel 3.1.3) wurden für *blaA* ein DNA-Amplifikat von 479 bp und für die *blaB* ein DNA-Amplifikat von 827 bp detektiert (Abb. 10). Ein DNA-Amplifikat von 479 bp für das *blaA*-Gen konnte in 199 (99,5 %) der 200 untersuchten *Y. enterocolitica* 4/O:3 Stämmen nachgewiesen werden. Lediglich ein Stamm aus einer Hackfleischprobe enthielt kein DNA-Amplifikat für das Gen *blaA*. Bei allen untersuchten Stämmen konnte ein DNA-Amplifikat von 827 bp für das *blaB*-Gen nachgewiesen werden.

4.3 Vergleich der Ergebnisse des Agardiffusionstests und der PCR

Ein Vergleich der Ergebnisse beider Methoden zeigt, dass 199 (99,5 %) der 200 untersuchten *Y. enterocolitica* 4/O:3 Stämme das Gen *blaA* besitzen. Von diesen 199 *blaA*-positiven Stämmen exprimierten 198 Stämme auch BlaA im Agardiffusionstest. Lediglich 1 Stamm aus Schweine-Tonsillen wies in der PCR das Gen *blaA* auf, exprimierte im Agardiffusionstest aber nur BlaB. In der PCR konnte bei einem Stamm aus Hackfleisch kein *blaA*-Gen nachgewiesen werden. Trotz fehlendem Gennachweis exprimierte dieser Stamm BlaA in der Agardiffusion.

Das *blaB*-Gen zur Expression der BlaB konnte anhand der PCR bei allen untersuchten Stämmen nachgewiesen werden. Trotz Vorliegen des Gens bei allen Stämmen exprimierten nur 196 (98,0 %) Stämme die BlaB im Agardiffusionstest. Bei 4 (2,0 %) Stämmen konnte keine BlaB-Expression festgestellt werden (Tab. 23). Von diesen Stämmen waren 3 humanen und ein Stamm porcinen Ursprungs. Neben der BlaB exprimierten alle 196 BlaB-positiven *Y. enterocolitica* Stämme gleichzeitig auch BlaA.

Tabelle 23: Darstellung der abweichenden Ergebnisse zwischen dem Vorkommen der *blaA*- und *blaB*-Gene und der Expression der BlaA und BlaB aus PCR und Agardiffusion bei *Y. enterocolitica* 4/O:3

Herkunft der Stämme (n)		Agardiffusion		PCR	
		BlaA-positiv	BlaB-positiv	<i>blaA</i> -positiv	<i>blaB</i> -positiv
Mensch	Stuhl (60)	60	57	60	60
Schwein	Tonsillen (63)	62	62	63	63
Schweinefleisch	Hackfleisch (22)	22	22	21	22

5. DISKUSSION

Antibakterielle Resistenzen stellen ein zunehmendes Problem in der antimikrobiellen Therapie dar. Besonders der extensive und unkontrollierte Einsatz von Antibiotika in der Human- und Veterinärmedizin wird für dieses Problem verantwortlich gemacht. Bei β -Laktam-Antibiotikaresistenzen resultieren diese hauptsächlich aus der bakteriellen Fähigkeit zur β -Laktamasebildung. Bisher haben sich nur wenige Studien mit der Prävalenz der chromosomalen β -Laktamasen bei *Y. enterocolitica* 4/O:3 Stämmen befasst (CORNELIS und ABRAHAM, 1975; MATTHEW et al., 1977; PHAM et al., 1991b, 1995b, 1999; STOCK et al., 1999). Unter diesen wurde bei einer Studie das Vorkommen von β -Laktamasen bei *Y. enterocolitica* 4/O:3 aus Deutschland untersucht (STOCK et al., 1999). In der vorliegenden Studie sollte das Vorkommen der β -Laktamase-Gene *blaA* und *blaB* sowie die Expression der β -Laktamasen A und B bei *Y. enterocolitica* 4/O:3 Stämmen aus Bayern mittels konventioneller PCR-Methode und Agardiffusionstest untersucht werden. Die Ergebnisse beider Testverfahren werden im Folgenden diskutiert.

Insgesamt betrachtet konnte im **Agardiffusionstest** bei 199 (99,5 %) der 200 untersuchten *Y. enterocolitica* Stämme eine BlaA-Expression nachgewiesen werden. Bei einem Stamm aus Schweine-Tonsillen war hinsichtlich widersprüchlicher Ergebnisse im Agardiffusionstest die Interpretation einer BlaA-Expression fraglich. Aufgrund eines HHR um Ticarcillin von 9 mm gilt dieser Stamm eigentlich als BlaA-negativ. Da er aber eine charakteristische Synergiezone aufwies und diese eigentlich eine BlaA-Expression anzeigt, müsste der Stamm als BlaA-positiv beurteilt werden. Vermutlich exprimierte dieser Stamm BlaA in so geringer Menge, dass er aufgrund des HHR sensitiv und damit als BlaA-negativ erschien, aber dennoch eine charakteristische Synergiezone bewirken konnte. Ebenso ist es möglich, dass eine fehlende Expression durch eine Mutation im *blaA*-Gen verursacht wurde. DE LA PRIETA et al. (2006) und SEOANE et al. (1992) zeigten beim Stamm IP97 eine fehlende BlaA-Expression aufgrund einer 51 bp großen Basenmutation im *blaA*-Gen. Somit könnte bei einer Mutation zwar eine DNA-Amplifikation des *blaA*-Gens erfolgen,

die Funktion des Gens aber soweit eingeschränkt sein, dass die Expression gar nicht oder nur in sehr geringem Umfang stattfand. Eine Expression von BlaB konnte bei 196 (98,0 %) der 200 untersuchten Stämme detektiert werden. All diese 196 Stämme zeigten neben der BlaB- auch eine BlaA-Expression. Somit exprimierten nicht alle untersuchten *Y. enterocolitica* 4O:3 Stämme beide β -Laktamasen. Diese Ergebnisse decken sich im Wesentlichen mit Ergebnissen anderer Studien bei *Y. enterocolitica* 4/O:3. Während Studien über in Europa vorkommende *Y. enterocolitica* 4/O:3 Stämme eine Expression beider β -Laktamasen bei allen untersuchten Stämmen belegen konnten (CORNELIS und ABRAHAM, 1975; MATTHEW et al., 1975, 1977; PHAM et al., 1995b, 1999, 2000; STOCK et al., 1999), wurden in Dänemark, Kanada, Neuseeland, Australien und USA nicht bei allen *Y. enterocolitica* 4/O:3 Stämmen beide β -Laktamasen nachgewiesen (PHAM et al., 1991b, 1999, 2000; PRESTON et al., 1994; HARIHARAN et al., 1995; AARESTRUP et al., 1998).

Aufgrund dieser β -Laktamasebildung gelten *Y. enterocolitica* 4/O:3 Stämme gegen die meisten β -Laktam-Antibiotika resistent. Studien belegten eine Resistenz von *Y. enterocolitica* gegen Penicilline, wie Benzylpenicillin, Carbenicillin, Oxacillin, Amoxicillin, Amoxicillin/Clavulansäure, Ampicillin, Carbenicillin, Ticarcillin und Cephalosporine, wie Cephalothin (PHAM et al., 19991a, 1991b, 1995a; PRESTON et al., 1994; STOLK-ENGELAAR et al., 1995; BOTTONE, 1997; STOCK und WIEDEMANN, 1998, 1999; BAUMGARTNER et al., 2007). Die Ergebnisse dieser Studie belegen eine 99,5 %ige Resistenz der untersuchten *Y. enterocolitica* 4/O:3 Stämme gegenüber Ticarcillin (75 μ g) aufgrund einer BlaA-Bildung und eine 98 %ige Resistenz gegen Amoxicillin/Clavulansäure (2/1 μ g) aufgrund einer BlaB-Bildung. Eine Resistenz gegenüber Amoxicillin/Clavulansäure wurde bereits von STOLK-ENGELAAR et al. (1995) sowie von KWAGA und IVERSEN (1990) ermittelt. Auch PRESTON et al. (1994) fanden eine 90 %ige Resistenz von *Y. enterocolitica* Stämmen gegen Ticarcillin und eine 73 %ige Resistenz gegen Amoxicillin/Clavulansäure. PHAM et al. (1991a) hingegen diagnostizierten bei aus Australien isolierten *Y. enterocolitica* 4/O:3 Stämmen eine Amoxicillin/Clavulansäure-Empfindlichkeit. Nach weiteren Studien führten sie diese

Empfindlichkeit auf eine Abwesenheit des *blaB*-Gens und damit der Abwesenheit einer BlaB-Expression in australischen Stämmen zurück (PHAM et al., 1993b, 1995b). MEYER (2007) ermittelte bei ihren Resistenzstudien mit denselben Stämmen dieser Studie ebenfalls eine 100 %ige Empfindlichkeit gegenüber Amoxicillin/Clavulansäure. Zu diesen Ergebnis kommt auch eine Studie von STOCK und WIEDEMANN (1999), die die Antibiotikaempfindlichkeit bei *Y. enterocolitica* 4/O:3 Stämmen gegenüber Amoxicillin/Clavulansäure mittels Mikrodilution erforschten. Im Gegensatz zu dem in dieser Studie durchgeführten Agardiffusionstest mit einer Amoxicillin/Clavulansäure Testplättchenbeschickung von 3 µg, verwendete MEYER (2007) in ihrer Resistenzstudie eine Beschickung von 30 µg (20 µg/10 µg), da diese Beschickung die derzeit therapeutisch eingesetzte Menge an Amoxicillin/Clavulansäure repräsentiert. Somit ist zu vermuten, dass die Empfindlichkeitsprüfung und in Folge dessen die Resistenz gegenüber β-Laktam-Antibiotika von der Wirkstoffkonzentration abhängig ist. Wahrscheinlich hat die 10fach höhere Menge an Amoxicillin/Clavulansäure die β-Laktamase A in ihrer Aktivität soweit gehemmt, dass die induzierbare β-Laktamase B allein keine ausreichende Resistenz bewirken konnte. Hinzu kommt, dass die BlaB nur bei einer sehr starken Induktion für eine klinisch relevante Resistenz in ausreichender Menge gebildet wird, so dass die eingesetzte Menge an Clavulansäure zwar zu einer Expression der BlaB im Agardiffusionstest geführt hat, aber die Menge an Enzym nicht ausreichend für die therapeutische Dosis an Amoxicillin/Clavulansäure ist (LODGE und PIDDOCK, 1991; PHAM et al., 1999; STOCK et al., 1999, 2002). Die von STOLK-ENGELAAR et al. (1995), KWAGA und IVERSEN (1990) sowie PRESTON et al. (1994) ermittelte Resistenz gegen Amoxicillin/Clavulansäure wurde ebenfalls mit einer Testplättchenbeschickung von 3 bzw. 4 µg ermittelt, was die Vermutung einer Konzentrationsabhängigkeit des Wirkstoffes bestärkt. Schon STOCK und WIEDEMANN (1998, 1999) wiesen darauf hin, dass die Verwendung von unterschiedlichen Beschickungen der Antibiotikatestplättchen zu unterschiedlichen Ergebnissen in Empfindlichkeitstests führen können und dass aufgrund unterschiedlicher β-Laktamase-Expression keine allgemeingültige Aussage über die natürliche Antibiotika-Empfindlichkeit von *Y. enterocolitica* gegen Penicilline und

Cephalosporine getroffen werden kann. PHAM et al. (1999) erklärten eine BlaA-Expression im Agardiffusionstest mit einer charakteristischen Synergiezone zwischen den Hemmhöfen um Ticarcillin und Amoxicillin/Clavulansäure und die BlaB-Expression durch das Fehlen einer solchen Synergiezone. Die charakteristische Synergiezone erklärten sie mit einer Inhibition des Bakterienwachstums um Ticarcillin und zwischen den Antibiotikatestplättchen durch die Expression von BlaA. Die Hemmung des Wachstums um Amoxicillin/Clavulansäure erklärten sie durch eine fehlende Expression von BlaB. Im Gegensatz dazu zeigt ein HHR von kleiner 3 mm um Amoxicillin/Clavulansäure eine BlaB-Expression an, wenn das Testplättchen eine Beschickung von 3 µg aufweist. PHAM et al. (1995b, 1999) detektieren in ihren Untersuchungen zur Prävalenz der chromosomalen β -Laktamasen A und B bei *Y. enterocolitica* 4/O:3 bei all ihren Stämmen eine charakteristische Synergiezone zwischen den Hemmhöfen um Ticarcillin und Amoxicillin/Clavulansäure. Von den in dieser Studie untersuchten 200 Stämmen aus Bayern zeigten bei der Bebrütungstemperatur von 30°C nur 20 (10,0 %) Stämme eine solche charakteristische Synergiezone (Abb. 9), während die übrigen 180 (90,0 %) Stämme zwar eine Synergiezone zwischen den Antibiotikatestplättchen, aber keinen Hemmhof um Amoxicillin/Clavulansäure aufwiesen. Bei 25°C zeigten nur 15 dieser 20 Stämme eine charakteristische Synergiezone. Auch SHARMA et al. (2004, 2006) konnten bei ihren Untersuchungen des Bioserotyps 1A lediglich bei 34 % der untersuchten Stämme eine charakteristische Synergiezone nachweisen. Wie der Bioserotyp 4/O:3 bildet auch der Bioserotyp 1A beide chromosomalen Enzyme. Da PHAM et al. (1989, 1993a, 1995a) aber *Y. enterocolitica* 4/O:3 Stämme aus Australien untersuchten und diese nur BlaA bilden, konnten sie eine Hemmung des Bakterienwachstums um Amoxicillin/Clavulansäure aufgrund einer fehlenden BlaB-Expression detektieren.

KIST und SANABRIA (1980) sowie JIMENEZ-VALERA et al. (1986) belegten bei ihren untersuchten Stämmen eine höhere β -Laktamase-Expression und damit eine Resistenzzunahme bei geringeren Bebrütungstemperaturen. Zur Überprüfung dieser

Ergebnisse wurde der Agardiffusionstest in dieser Studie mit den beiden Bebrütungstemperaturen 30°C und 25°C durchgeführt. Der Vergleich der HHR-Größe um Ticarcillin bei 30°C und 25°C Bebrütungstemperatur zeigte, dass bei 30°C 64 Stämme unterschiedlichen Ursprungs einen HHR von 2 mm und 102 Stämme einen HHR von 3 mm aufwiesen. Im Gegensatz dazu zeigten bei 25°C 104 Stämme einen HHR von 2 mm um Ticarcillin, während 71 Stämme einen HHR von 3 mm aufwiesen. Somit scheint eine vermehrte BlaA-Expression bei 25°C zu kleineren HHR geführt zu haben, was die Ergebnisse von KIST und SANABRIA (1980) sowie JIMENEZ-VALERA et al. (1986) bestätigen würde. Weiterhin zeigten bei 30°C nur 2 Stämme einen HHR von 5 mm, während bei 25°C 3 Stämme einen HHR von 5 mm, 2 Stämme einen HHR von 6 mm und 1 Stamm einen HHR von 7 mm aufwiesen. Vermutlich führte bei diesen Stämmen die geringere Bebrütungstemperatur zu keiner höheren β -Laktamaseproduktion der BlaA. Im Gegensatz dazu konnte kein Einfluss der Temperatur auf die Expression der BlaB ermittelt werden. Auch auf die eigentliche β -Laktamase-Expression hatte die Bebrütungstemperatur keinen Einfluss, da sowohl bei 30°C wie auch bei 25°C 199 Stämme BlaA und 196 Stämme BlaB exprimierten.

Beim Vergleich der temperaturabhängigen β -Laktamase-Expression mittels Agardiffusionstest muss beachtet werden, dass neben der Zunahme der β -Laktamaseproduktion bei niedrigeren Temperaturen auch eine vermehrte Bakterienbildung zu einer scheinbar vermehrten Resistenz geführt haben kann (KIST und SANABRIA, 1980). Des Weiteren können Messfehler bei der manuellen Bestimmung des HHR sowie nicht ganz exakt eingehaltene Bebrütungszeiten zu falschen Ergebnissen führen. Zur Vermeidung von Messfehlern und zur Überprüfung der Einhaltung der exakten Bebrütungszeit wurden in dieser Studie zwei Kontrollstämme mitgeführt, die bei jedem Messvorgang dieselben HHR-Größen aufwiesen. Wäre es aufgrund einer zu langen Bebrütungszeit zu einer Abnahme der Antibiotikawirkung und damit zu einer Zunahme des Bakterienwachstums gekommen, wäre es bei den Kontrollstämmen zu kleineren Hemmhöfen um die Antibiotikatestplättchen gekommen.

Das Vorkommen der chromosomalen β -Laktamase-Gene *blaA* und *blaB* erfolgte mittels **konventioneller PCR-Methode**. Dabei wurden das *blaA*-Gen bei 199 und das *blaB*-Gen bei allen 200 untersuchten Stämmen nachgewiesen. Bei einem aus Hackfleisch isolierten Stamm konnte kein *blaA*-Gen nachgewiesen werden, obwohl dieser im Agardiffusionstest eine BlaA-Expression aufwies. Dass dieses *blaA*-Gen nicht nachweisbar war, aber trotzdem eine Expression bewiesen wurde, kann durch eine fehlerhafte Testdurchführung oder aufgrund von falschen oder defekten Primern erfolgt sein. Da aber der mitgeführte Positivstamm während der Untersuchung eine Funktionsweise der Primer bestätigte und auch bei zweimaliger Wiederholung der PCR dasselbe Ergebnis erzielt wurde, ist dies eher unwahrscheinlich. Infolge einer Mutation ist es jedoch möglich, dass bei diesem Stamm die Primer für das *blaA*-Gen nicht an der komplementären Template-DNA binden konnten, die Funktion des Gens aber nicht eingeschränkt war, so dass die BlaA-Expression noch erfolgen konnte. Da dieser Stamm aus einer Hackfleischprobe isoliert wurde und die Herkunft dieser Probe nicht mehr nachvollziehbar ist, könnte der Stamm auch nicht aus Deutschland stammen. Die genetische Variabilität im *blaA*-Gen bei den unterschiedlichen *Y. enterocolitica* Bioserotyp 4/O:3 Phagentypen kann ebenfalls die Primerbindung an die Template-DNA des *blaA*-Gens verhindern. Dies würde das heterogene Vorkommen von *blaA* bei den unterschiedlichen *Y. enterocolitica* Biotyp 4/O:3 Phagentypen belegen (PHAM et al., 1995b, 2000). Zur Bestätigung einer abweichenden Gensequenz im *blaA*-Gen müsste dieser Stamm einer Gensequenzierung unterzogen werden.

Bei allen 200 untersuchten *Y. enterocolitica* Stämmen konnte das Gen *blaB* nachgewiesen werden. Eine BlaB-Expression wurde mit Ausnahme von 4 Stämmen bei allen untersuchten Yersinien nachgewiesen. BlaB ist ein chromosomal-kodiertes, induzierbares Enzym, das nur durch eine starke Induktion exprimiert wird (LODGE und PIDDOCK, 1991; PHAM et al., 1999, STOCK et al., 1999, 2002). Bei einer schwachen Induktion erfolgt eine sehr geringe Expression, die im Agardiffusionstest zu einem

negativen Ergebnis führen kann (STOCK et al., 2002). Zur Überprüfung der Induktion schließt sich dieser Studie der Induktionstest mittels Imipenem für BlaB nach PHAM et al. (1993) und die Ermittlung der Expressionsmenge mittels β -Laktamase-Assay an. Die fehlende BlaB-Expression kann auch die Folge einer Mutation im *ampR*-Gen sein, wodurch eine BlaB-Expression nicht mehr möglich ist (DE LA PRIETA et al., 2006; SEOANE et al., 1992). Sollten die Ergebnisse des Induktionstests negativ ausfallen oder eine nicht messbare β -Laktamasemenge im β -Laktamase-Assay ermittelt werden, empfiehlt sich auch hier eine Gensequenzierung zur Ermittlung einer möglichen Mutation.

Der Doppelplättchenagardiffusionstest ist eine geeignete Methode zur routinemäßigen β -Laktamase-Detektion bei *Y. enterocolitica* 4/O:3. Die Durchführung dieses Testverfahrens ist einfach, kostengünstig und relativ sicher. Nachteile ergeben sich aus zu langen Bearbeitungszeiten und mögliche Verfälschungen der Ergebnisse aufgrund einer fehlerhaften Durchführung. So kann es bei einer zu langen Bebrütungszeit zu einer Abnahme der Antibiotikawirkung und damit zu einer Zunahme des Bakterienwachstums kommen, was zu scheinbar kleineren Hemmhöfen führen würde. Weiterhin können Stämme mit geringer β -Laktamase-Expression als falsch-negativ eingestuft werden. Demzufolge können gerade im oberen Grenzbereich von 8 mm fehlerhafte Interpretationen der Ergebnisse erfolgen. Ebenso ist die temperaturabhängige β -Laktamasebildung mit dem Agardiffusionstest nicht eindeutig bestimmbar. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass eine mögliche Zunahme der β -Laktamasekonzentration bei niedriger Bebrütungstemperatur wahrscheinlich ist, diese sich aber nur in der Abnahme des HHR um 1 mm zeigte. Für eine genaue und gesicherte Aussage einer Temperaturabhängigkeit sollte auf eine quantitative β -Laktamasekonzentrationsbestimmung mittels β -Laktamase-Assay zurückgegriffen werden.

Die konventionelle PCR ist eine schnelle, einfache und sichere Methode zur Detektion der β -Laktamase-Gene. Nachteilig sind der hohe Kostenaufwand sowie die Tatsache, dass nur eine Aussage über das Vorkommen der β -Laktamase-Gene *blaA* und *blaB* getroffen werden kann. Eine Expression der entsprechenden β -Laktamasen kann dagegen mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden.

Schlussfolgerungen

- Nahezu alle (199/200) aus Bayern isolierten und untersuchten *Y. enterocolitica* 4/O:3 Stämme besitzen die Gene *blaA* und *blaB* für die chromosomalen β -Laktamasen A und B.
- Die überwiegende Anzahl der aus Bayern isolierten und untersuchten *Y. enterocolitica* 4/O:3 Stämme exprimieren auch die chromosomalen β -Laktamasen A (199) und B (196).
- Die Bebrütungstemperatur zeigte keinen Einfluss auf die eigentliche β -Laktamase-Expression, lässt aber einen Einfluss auf die Expressionsmenge vermuten.
- Der Nachweis der β -Laktamase-Gene *blaA* und *blaB* mittels konventioneller PCR-Methode lässt keinen Rückschluss auf die eigentliche Expression und damit auf die Resistenz zu. Ein β -Laktamase-Expressionsnachweis ist mit hoher Zuverlässigkeit anhand des Agardiffusionstests möglich.
- Die β -Laktam-Antibiotikaresistenz ist abhängig von der Wirkstoffkonzentration der eingesetzten Antibiotika. Die momentan eingesetzte therapeutische Wirkstoffkonzentration bei Amoxicillin/Clavulansäure ist für eine Empfindlichkeit derzeit ausreichend.
- Die Ergebnisse dieser Studie decken sich weitestgehend mit anderen weltweiten Studien über β -Laktamasen bei *Y. enterocolitica* 4/O:3 Stämmen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die vermehrte Anwendung antimikrobieller Wirkstoffe in der Human- und Veterinärmedizin hat zu einer Zunahme und Selektion antibakteriell resistenter Zoonoseerreger, wie *Yersinia enterocolitica* geführt. Resistenzmechanismen dieser Bakterien beruhen auf der Bildung chromosomal-kodierter β -Laktamasen (A und B). Aufgrund unterschiedlichen Vorkommens der β -Laktamase-Gene und der Expression dieser Enzyme innerhalb der einzelnen *Y. enterocolitica* Biotypen weisen diese eine heterogene Antibiotikaempfindlichkeit auf. In Deutschland stehen besonders Infektionen mit *Y. enterocolitica* Bioserotyp 4/O:3 an erster Stelle. Obwohl dieser Bioserotyp beide chromosomalen β -Laktamasen bildet, wurden bei *Y. enterocolitica* Stämmen aus Bayern eine Amoxicillin/Clavulansäure-Antibiotika-Empfindlichkeit belegt.

Ziel dieser Studie war das Vorkommen der Gene und die Expression für β -Laktamase A und B bei 200 aus Bayern isolierten *Y. enterocolitica* 4/O:3 Stämmen mittels PCR und Agardiffusionstest zu untersuchen. Von den untersuchten Stämmen waren 60 humanen und 140 porcinen Ursprungs. Für den Nachweis der β -Laktamase-Expression wurden im Doppelplättchenagardiffusionstest pro Stamm je zwei Müller-Hinton-Agarplatten mit einer Bakteriendichte von 10^7 KbE/ml beimpft und zusammen mit den zwei Antibiotikatestplättchen Ticarcillin (75 μ g) und Amoxicillin/Clavulansäure (2/1 μ g) bebrütet. Anschließend wurde die Expression der β -Laktamase A und B anhand der Hemmhofgrößen um Ticarcillin und Amoxicillin/Clavulansäure bestimmt. Zur Überprüfung einer temperaturabhängigen β -Laktamase-Expression wurde der Doppelplättchenagardiffusionstest bei den Bebrütungstemperaturen 30°C und 25°C durchgeführt. Im Anschluss wurden dieselben Stämme mittels konventioneller PCR-Methode auf das Vorliegen der β -Laktamasegene *blaA* und *blaB* überprüft.

Die Auswertung der PCR Ergebnisse zeigte, dass bei 199 (99,5 %) der 200 untersuchten *Y. enterocolitica* 4/O:3 Stämme das *blaA*-Gen vorlag. Von diesen 199 Stämmen zeigten 198 Stämme auch eine BlaA-Expression in der Agardiffusion. Nur ein aus Schweine-Tonsillen isolierter Stamm zeigte trotz *blaA*-Gen keine BlaA-Expression. Bei einem der 200 untersuchten Stämme konnte mit Hilfe der PCR kein *blaA*-Gen nachgewiesen werden. Trotzdem zeigte dieser aus Hackfleisch isolierte Stamm im Agardiffusionstest eine BlaA-Expression. Das *blaB*-Gen wurde bei allen untersuchten *Y. enterocolitica* 4/O:3 Stämmen nachgewiesen. Im Agardiffusionstest exprimierten 3 humane und 1 porciner Stamm keine BlaB. Der Vergleich der Bebrütungs-temperaturen 30°C und 25°C zeigte einen Unterschied in der HHR-Größe um Ticarcillin. Während bei 30°C die meisten Stämme einen HHR von 3 mm aufwiesen, hatten die meisten Stämme bei 25°C einen HHR von 2 mm.

Die durchgeführte Studie zeigt, dass nahezu alle (199/200) der aus Bayern isolierten und untersuchten *Y. enterocolitica* 4/O:3 Stämme die chromosomalen Gene für *blaA* und *blaB* besitzen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass fast alle dieser Stämme beide β -Laktamasen auch exprimieren. Die in einer vorangegangenen Studie ermittelte Empfindlichkeit dieser Stämme gegen Amoxicillin/Clavulansäure (20/10 μ g) ist einerseits auf den 10fach höher konzentrierten Wirkstoff, andererseits auf eine geringere Expressionsmenge der β -Laktamase B zurückzuführen. Die Bebrütungstemperatur zeigte keinen Einfluss auf die eigentliche β -Laktamase-Expression, lässt aber einen Einfluss auf die Expressionsmenge vermuten.

7. SUMMARY

Detection of *blaA* and *blaB* genes and expression of β -lactamase A and B of *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 strains from Bavaria by PCR and disc diffusion methods

Emerging antimicrobial resistance has been recognised among multiple zoonotic pathogens, including *Yersinia enterocolitica*, due to frequent use of antimicrobial agents in veterinary and human medicine. The differences in antimicrobial susceptibility among *Y. enterocolitica* strains of different biotypes are largely attributed to β -lactamase resistance, which is mediated by production of two chromosomally mediated β -lactamases (A and B). *Y. enterocolitica* strains are generally resistant to β -lactamase sensitive antimicrobials, however, some differences have been detected among different strains. Most of the Bavarian *Y. enterocolitica* 4/O:3 strains, which is the dominating type among human disease and pig carriers, have shown to be sensitive to amoxicillin/clavulanic acid.

The aim of this work was to study the distribution of *blaA* and *blaB* genes and the expression of β -lactamase A and B among *Y. enterocolitica* 4/O:3 strains isolated from human and porcine sources in Bavaria. Additionally, the influence of two different temperatures on the expression of β -lactamase A and B was studied.

Total of 200 *Y. enterocolitica* 4/O:3 strains, 60 from human and 140 from porcine origin, were studied. The *blaA* and *blaB* genes were detected by PCR and the expression of β -lactamases A and B were studied by double disc diffusion method using ticarcillin (75 μ g) and amoxicillin/clavulanic acid (2/1 μ g) discs. Expression of β -lactamases A and B was compared in 25 and 30°C.

Most (199/200) of the strains were *blaA* positive and only one strain, isolated from minced meat, was *blaA* negative. However, this strain expressed β -lactamase A. Only one out of 200 strains, a pig tonsil strain, did not express β -lactamase A. All 200 strains carried the *blaB* gene and 196 (98,0 %) strains expressed β -lactamase B. Three human strains and one pig tonsil strain did not produce β -lactamase B. Expression of β -lactamase A was slightly higher in 25°C compared to 30°C.

This study shows that both *blaA* and *blaB* genes are widely distributed among *Y. enterocolitica* 4/O:3 strains from human and porcine origin and that most of these strains express both β -lactamase A and B even though all these strains have shown to be sensitive to amoxicillin/clavulanic acid (20/10 μ g) probably due to low amount of β -lactamase B.

8. LITERATURVERZEICHNIS

ABRAHAM, E. P.; E. CHAIN (1940)

An enzyme from Bacteria able to Destroy Penicillin
Nature; **146**, 837

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

Antimicrobial Susceptibilities of Food-Isolated Strains of *Yersinia enterocolitica*,
Y. intermedia, *Y. frederiksenii*, and *Y. kristensenii*
Antimicrobial. Agents Chemoth.; **28**, 351-353

ALEKSIC, S.; J. BOCKEMÜHL (1990)

Mikrobiologie und Epidemiologie der Yersiniosen
Immun. Infect.; **18**, 178-185

AMBLER, R. P. (1980)

The structure of β -lactamases
Phil. Trans. R. Soc. Lond.; **289**, 321-331

**AARESTRUP F. M.; F. BAGER; N. E. JENSEN; M. MADSEN; A. MEYLING; H.
WEGENER (1998)**

Resistance to antimicrobial agents used for animal therapy in pathogenic-,
zoonotic- and indicator bacteria isolated from different food animals in
Denmark: a baseline study for the Danish Integrated Atimicrobial Resistance
Monitoring Programme (DANMAP)
APMIS; **106**, 745-770

BAGGE, N.; O. CIOFU; M. HENTZER; J. I. A. CAMPBELL; M. GIVSKOV; N. HØIBY (2002)

Constitutive High Expression of Chromosomal β -Lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* Caused by a New Insertion Sequence (IS 1669) Located in *ampD*
Antimicrob. Agents Chemoth.; **46**, 3406-3411

BANGSOW, T.; R. HUCH; D. MALE; S. MÜLLER (2002)

Polymerase-Ketten-Reaktion

In: G. Schimpf (Hrsg.): Gentechnische Methoden; 3. Auflage
Spektrum Akadem. Verlag, Berlin, Heidelberg, 147-167

BAUER, A. W.; W. M. M. KIRBY; J. C. SHERRIS; M. TURCK (1966)

Antimicrobial susceptibility testing by a standardized single disc method
Am. J. Clin. Pathol.; **45**, 493-496

BAUMGARTNER, A.; M. KÜFFER; D. SUTER; T. JEMMI; P. ROHNER (2007)

Antimicrobial resistance of *Yersinia enterocolitica* strains from human patients, pigs and retail pork Switzerland
Int. J. Food. Microbiol.; **115**, 110-114

BELL, S. M.; B. J. GATUS; J. N. PHAM; D. L. RAFFERTY (2006)

Antibiotic Susceptibility Testing by the CDS Method - A Manual for Medical and Veterinary Laboratories 2006 (Fourth Edition); 1-92
<http://web.med.unsw.edu.au/pathology-cds>; Zugriff: 25.08.2008

BERGOGNE-BEREZIN, B. (1989)

Current Trends and New Perspectives in Antibiotic Therapy
J. of Chemoth.; **1**, 285-292

**BgVV-BUNDESINSTITUT FÜR GESUNDHEITLICHEN VERBRAUCHERSCHUTZ
UND VETERINÄRMEDIZIN (1996)**

Leichter Anstieg der Resistenz gegen "neue" Tierarzneimittel zu beobachten
Pressemitteilung 04/1996; 13.02.1996

**BgVV-BUNDESINSTITUT FÜR GESUNDHEITLICHEN VERBRAUCHERSCHUTZ
UND VETERINÄRMEDIZIN (1997)**

BgVV fordert zu zurückhaltendem und sorgsamem Umgang mit Tierarzneimitteln
und Futterzusatzstoffen auf
Pressemitteilung 07/1997; 14.04.1997

BOCKEMÜHL, J.; P. ROGGENTIN (2004)

Enterale Yersiniosen, Klinische Bedeutung, Epidemiologie, Diagnostik und
Prävention

Bundesgesundheitsbl.-Gesundheitsforsch.-Gesundheitsschutz; **47**, 685-691

BOTTONE, E. J. (1997)

Yersinia enterocolitica: The Charisma Continues

Clin. Microbiol. Rev.; **10**, 257-276

BOTTONE, E. J. (1999)

Yersinia enterocolitica: overview and epidemiologic correlates

Microb. Infec.; **1**, 323-333

BRADFORD, P. A. (2001)

Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st Century: Characterization,
Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat

Clin. Microbiol. Rev.; **14**, 933-951

BRIÑAS, L.; M. ZARAZAGA; Y. SÁENZ; F. RUIZ-LARREA; C. TORRES (2002)

β -Lactamases in Ampicillin-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Foods, Humans, and Healthy Animals

Antimicrob. Agents Chemoth.; **46**, 3156-3163

BUSH, K.; R. B. SYKES (1986)

Methodology for the Study of β -Lactamases

Antimicrob. Agents Chemoth.; **30**, 6-10

BUSH, K. (1989a)

Characterization of β -Lactamases

Antimicrob. Agents Chemoth.; **33**, 259-263

BUSH, K. (1989b)

Classification of β -Lactamases: Group 1, 2a, 2b, and 2b'

Antimicrob. Agents Chemoth.; **33**, 264-270

BUSH, K. (1989c)

Classification of β -Lactamases: Group 2c, 2d, 2e, 3, and 4

Antimicrob. Agents Chemoth.; **33**, 271-276

BUSH, K.; G. A. JACOBY; A. A. MEDEIROS (1995)

A functional classification scheme for β -Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure

Antimicrob. Agents Chemoth.; **39**, 1211-1233

BUSH, K. (2001)

New beta-lactamases in gram-negative bacteria: Diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy

Clin. Inf. Dis.; **32**, 1085-1089

BRZOSTEK, K.; HREBENDA, J. (1988)

Outer-membrane Permeability to β -Lactam Antibiotics in *Yersinia enterocolitica*
J. Gen. Microb.; **134**, 1535-1540

CHAVES, J.; M. G. LADONA; C. SEGURA; A. COIRA; R. REIG; C. AMPURDANÉS (2001)

SHV-1 β -Lactamases Is Mainly a Chromosomally Encoded Species-Specific Enzyme in *Klebsiella pneumoniae*
Antimicrob. Agents Chemoth.; **45**, 2856-2861

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) (2002)

Durchführungsvorschriften für antimikrobielle Empfindlichkeitsprüfungen mittels Agardiffusions- und Dilutionstest von Bakterien tierischer Herkunft; empfohlener Standard- Zweite Ausgabe
NCCLS-Dokument M31-A2 (ISBN 1-56238-000-0)
NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA

COLE, M. (1980)

' β -Lactams' as β -lactamase inhibitors
Phil. Trans. R. Soc. London; **289**, 207-223

CORNELIS, G. (1975)

Distribution of β -Lactamases A and B in some Groups of *Yersinia enterocolitica* and their Role in Resistance
J. Gen. Microb.; **91**, 391-402

CORNELIS, G.; E. P. ABRAHAM (1975)

β -Lactamases from *Yersinia enterocolitica*
J. Gen. Microb.; **87**, 273-284

COURVALIN, P. (1996)

The Garrod Lecture: Evasion of antibiotic action by bacteria
J. Antimicrob. Chemoth.; **37**, 855-869

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

Yersinia enterocolitica
New Engl. J. Med.; **321**, 16-24

DATTA, N.; P. KONTOMICHALOU (1965)

Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae
Nature; **208**, 239-244

DAVISON, H. C.; J. C. LOW; M. E. J. WOOLHOUSE (2000)

What is antibiotic resistance and how can we measure it?
Trends in Microbiol.; **8**, 554-559

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

Slaughter pigs and pork as a source of human pathogenic *Yersinia enterocolitica*
Int. J. Food Microb.; **12**, 375-378

DE BOER, E. (1992)

Isolation of *Yersinia enterocolitica* from foods
Int. J. Food Microb.; **17**, 75-84

DECHERT, U. (2002)

Polymerase-Gelelektrophorese
In: G. Schimpf (Hrsg.): Gentechnische Methoden; 3. Auflage
Spektrum Akadem. Verlag, Berlin, Heidelberg, 39-88

- DE LA PRIETA, M. C.; A. SEOANE; J. DIAZ; J. NAVAS; J. M. GARCIA-LOBO (1995)**
Beta-Lactamase Genes and Beta-Lactamic Susceptibility in *Yersinia enterocolitica*
In: Ravagnan G., Chiesa C (eds): Yersiniosis: Present and Future
Contrib. Microbiol. Immunol.; **13**, 184-187
- DE LA PRIETA, M. C.; M. V. FRANCIA; A. SEOANE; J. M. GARCIA LOBO (2006)**
Characterization of defective β -lactamase genes in *Yersinia enterocolitica*
J. Antimicrob. Chemoth.; **58**, 661-664
- DIETZ, H.; D. PFEIFLE; B. WIEDEMANN (1996)**
Location of N-Acetylmuramyl-L-Alanyl-D-Glutamylmesodiaminopimelic Acid, Presumed Signal Molecule for β -Lactamase Induction, in the Bacterial Cell
Antimicrob. Agents Chemoth.; **40**, 2173-2177
- DIETZ, H.; D. PFEIFLE; B. WIEDEMANN (1997)**
The Signal Molecule for β -Lactamase Induction in *Enterobacter cloacae* Is the Anhydromuramyl-Pentapeptide
Antimicrob. Agents Chemoth.; **41**, 2113-2120
- EDWARDS, J. R.; P. J. TURNER; C. WANNOP; E. S. WITHNELL; A. J. GRINDEY; K. NAIRN (1989)**
In vitro antibacterial activity of SM-7338, a carbapenem antibiotic with stability to dehydropeptidase I
Antimicrob. Agents Chemoth.; **33**, 215-222
- EFFENBERGER, T. (2008)**
Durchfallerkrankungen von Haustieren mit lebensmittelrelevanten pathogenen Bakterien
Vet. Med. Diss., LMU

EU (2001)

Mitteilung der Kommission über eine Strategie der Gemeinschaft zur Bekämpfung der Resistenz gegen antimikrobielle Mittel

Kom/2001/0333 endg. Band I

<http://eur-lex.europa.eu/Notice.do?val=256421:cs&lang=de&list=256422:cs,256421:cs,&pos=2&page=1&nbl=2&pgs=10&hwords=kom/2001/0333~&checktexte=checkbox&visu=#texte>; Zugriff: 15.09.2008

FEDESA-EUROPEAN FEDERATION OF ANIMAL HEALTH (IFAH) (1999)

Antibiotics for Animals – A FEDESA Perspective on Antibiotics, Animal Health and Resistance Debate

<http://www.ifah.be/Europe/Topics/antibio/pdf/Dossier9.pdf>; Zugriff: 15.09.2008

FEDESA/FEFANA (1999)

Verbrauch an antimikrobiell wirksamer Substanzen im Bereich Veterinärmedizin in der EU (inkl. Schweiz) 1997
Deutsches. Tierärzteblatt; **11/98**, 1093

FLUIT, A. C.; M. R. VISSER; F.-J. SCHMITZ (2001)

Molecular Detection of Antimicrobial Resistance
Clin. Microbiol. Rev.; **14**, 836-871

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

High Prevalence of *Yersinia enterocolitica* 4:O3 on Pig Offal in Southern Germany: A Slaughtering Technique Problem
System. Appl. Microbiol.; **24**, 457-463

**FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; T. NISKANEN; M.; M. BUCHER; T. KORTE;
A. STOLLE; H. KORKEALA (2003)**

Different *Yersinia enterocolitica* 4:O3 Genotypes Found in Pig Tonsils in
Southern Germany and Finland
System. Appl. Microbiol.; **26**, 132-137

FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; U. KOCH; C. KLEMM; M. BUCHER, A. STOLLE (2004)

Different genotypes of *Yersinia enterocolitica* 4:O3 strains widely distributed in
butcher shops in the Munich area
Int. J. Food Microbiol.; **95**, 89-94

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

Molecular epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infections
FEMS Immunol. Med Microbiol.; **27**, 315-329

FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; A. STOLLE; A. SIITONEN; H. KORKEALA (2006b)

Sporadic human *Yersinia enterocolitica* infections caused by bioserotype 4/O:3
originate mainly from pigs
J. Med. Microbiol.; **55**, 747-749

FRÈRE, J.-M, (1995)

Beta-lactamases and bacterial resistance to antibiotics
Mol. Microbiol.; **16**, 385-395

GEISS, H. K.; D. MACK; H. SEIFERT (2004)

Identifizierung von speziellen Resistenzmechanismen und Interpretation von
Ergebnissen bei grampositiven und gramnegativen Erregern
Chemoth. J.; **13**; 1-16

HAEGGMAN, S; S. LÖFDAHL; L. G. BURMAN (1997)

An Allelic Variant of the Chromosomal Gene for Class A β -Lactamase K2, Specific for *Klebsiella pneumoniae*, Is the Ancestor of SHV-1
Antimicrob. Agents Chemoth.; **41**, 2705-2709

HALLANVUO, S.; M. SKURNIK; K. ASPLUND; A. SIITONEN (2002)

Detection of a novel repeated sequence useful for epidemiological typing of pathogenic *Yersinia enterocolitica*
Int. J. Med. Microbiol.; **292**, 215-225

HANDAL, T; I. OLSEN (2000)

Antimicrobial resistance with focus on oral beta-lactamases
Eur. J. Oral Sci.; **108**, 163-174

HANSON, N. D. (2003)

AmpC beta-lactamases: what do we need to know for the future?
J. Antimicrob. Chemoth.; **52**, 2-4

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

Isolation, serotypes, and virulence-associated properties of *Yersinia enterocolitica* from the tonsils of slaughter hogs
Can. J. Vet. Res.; **59**, 161-166

HELMUTH, R.; D. PROTZ (1997)

How to Modify Conditions Limiting Resistance in Bacteria in Animals and Other Reservoirs
Clin. Inf. Dis.; **24 (Suppl 1)**, 136-138

HENIKOFF, S.; G. W. HAUGHN; J. M. CALVO; J. C. WALLACE (1988)

A large family of bacterial activator proteins

Proc. Natl. Acad. Sci. USA; **85**, 6602-6606

HERITAGE, J.; N. RANSOME; P. A. CHAMBERS; M. H. WILCOX (2001)

A comparison of culture and PCR to determine the prevalence of ampicillin-resistant bacteria in the faecal flora of general practice patients

J. Antimicrob. Chemoth.; **48**, 287-289

HEESEMANN, J.; H. KARCH (1995)

Diagnostik von Yersiniosen und Infektionen mit enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC)

Internist; **36**, 102-105

HOOGKAMP-KORSTANJE, J. A. A.; J. DE KONING (1990)

Klinik, Diagnostik und Therapie von *Yersinia-enterocolitica*-Infektionen

Immun. Infekt.; **18**, 192-197

HOOGKAMP-KORSTANJE, J. A. A.; H. MOESKER; G. A. W. BRUYN (2000)

Ciprofloxacin v placebo for treatment of *Yersinia enterocolitica* triggered reactive arthritis

Ann. Rheum. Dis.; **59**, 914-917

HONORÉ, N.; M. H. NICOLAS; S. T. COLE (1986)

Inducible Cephalosporinase production in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* is controlled by regulatory gene that has been from *Escherichia coli*

The EMBO J.; **5**, 3709-3714

**HORNSTEIN, M. J.; A. M. JUPEAU; M. R. SCAVIZZI; A. M. PHILIPPON;
P. A. D. GRIMONT (1985)**

In Vitro Susceptibilities of 126 Clinical Isolates of *Yersinia enterocolitica* to 21 β -Lactam Antibiotics
Antimicrob. Agents Chemoth.; **27**, 806-811

HUOVINEN, S; P. HUOVINEN; G. A. JACOBY (1988)

Detection of Plasmid Mediated β -lactamases with DNA probes
Antimicrob. Agents Chemoth.; **32**, 175-179

JACOBS, C.; L.-J. HUANG; E. BARTOWSKY; S. NORMARK; J. T. PARK (1994)

Bacterial cell wall recycling provides cytosolic muropeptides as effectors for β -lactamase induction
The EMBO J.; **13**, 4684-4694

JACOBS, C.; J.-M. FRÈRE; S. NORMARK (1997)

Cytosolic Intermediates for Cell Wall Biosynthesis and Degradation Control
Inducible β -Lactam Resistance in Gram-Negative Bacteria
Cell; **88**, 823-832

JAFFE, A.; Y. A. CHABBERT; O. SEMONIN (1982)

Role of Porcin Proteins OmpF and OmpC in the Permeation of β -Lactams
Antimicrob. Agents Chemoth.; **22**, 942-948

JIMENEZ-VALERA, M.; A. RUIZ-BRAVO; A. RAMOS-CORMENZANA (1986)

Synergistic Effects of Dicloxacillin or Clavulanic Acid in combination with Penicillin G or Cephalothin against *Yersinia Enterocolitica*
Antimicrob. Agents Chemoth.; **29**, 104-106

JONES, R. N.; H. W. WILSON; W. J. NOVICK (1982)

In Vitro Evaluation of Pyridine-2-Azo-*p*-Dimethylaniline Cephalosporin, a New Diagnostic Chromogenic Reagent, and Comparison with Nitrocefin, Cephacetrile, and Beta-Lactam Compounds
J. Clin. Microbiol.; **15**, 677-683

JUAN, C.; B. MOYÁ; J. L. PÉREZ; A. OLIVER (2006)

Stepwise Up regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* Chromosomal Cephalosporinase Conferring High-Level β -Lactam Resistance Involves Three AmpD Homologues
Antimicrob. Agents Chemoth.; **50**, 1780-1787

KAPPERUD, G. (1991)

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

KIST, M.; E. SANABRIA DE ISELE (1980)

Yersinia enterocolitica: Einfluss der Bebrütungstemperatur auf Antibiotika-Resistenz, Beta-Laktamaseproduktion und Wachstumsverhalten
Zbl. Bakt. Hyg.; I. Abt. Orig. A **247**, 353-363

KNAPP, W.; J. LYSY; C. KNAPP; W. STILLE; U. GOLL (1973)

Enterale Infektionen beim Menschen durch *Yersinia enterocolitica* und ihre Diagnose
Infection I; **2**, 13-125

KNOTT-HUNZIKER, V.; S. PETURSSON; G. S. JAYATILAKE; S. G. WALEY; B. JAURIN; T. GRUNDSTRÖM (1982)

Active sites of β -lactamases
Biochem. J.; **201**, 621-627

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

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

KORFMANN, G.; C. C. SANDERS (1989)

ampG Is Essential for High-Level Expression of AmpC β -Lactamase in
Enterobacter cloacae
Antimicrob. Agents Chemoth.; **33**, 1946-1951

KROKER, R.; R. SCHERKL; F. R. UNGEMACH (2001)

Chemotherapie bakterieller Infektionen
In: H.-H. Frey, W. Löscher (Hrsg.): Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie
für die Veterinärmedizin
2. völlig neu bearbeitete Auflage
Enke Verlag, Stuttgart, 353-366

KROKER, R. (2002)

Pharmaka zur Behandlung und Verhütung bakterieller Infektionen
In: W. Löscher, F. R. Ungemach, R. Kroker: Pharmakotherapie bei Haus- und
Nutztieren
5. neu bearbeitete Auflage
Parey Verlag, Berlin, 205-220

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

In Vitro Antimicrobial Susceptibilities of *Yersinia enterocolitica* and Related
Species Isolated from Slaughtered Pigs and Porks Products
Antimicrob. Agents Chemoth.; **34**, 2423-2425

LEVY, S. B. (1992)

The antibiotic paradox: how miracle drugs are destroying the miracle
Plenum Press, 233 Spring Street, New York 1992, 1-279

LEVY, S. B. (2002)

Factors impacting on the problem of antibiotic resistance
J. Antimicrob. Chemoth.; **49**, 25-30

LI, X.-Z.; D. MA; D. M. LIVERMORE; H. NIKAIDO (1994)

Role of Efflux Pump(s) in Intrinsic Resistance of *Pseudomonas aeruginosa*.
Active Efflux as a Contributing Factor to β -Lactam Resistance
Antimicrob. Agents Chemoth.; **38**, 1742-1752

LI, X.-Z.; M. MEHROTRA; S. GHIMIRE; L. ADEWOYE (2007)

β -Lactam resistance and β -lactamases in bacteria of animal origin
Vet. Microbiol.; **121**, 197-214

LINDBERG, F.; L. WESTMAN; S. NORMARK (1985)

Regulatory components in *Citrobacter freundii ampC* β -lactamase induction
Proc. Antl. Acad. Sci.; **82**, 4620-4624

LINDBERG, F.; S. LINDQUIST; S. NORMARK (1987)

Inactivation of the *ampD* Gene Cause Semiconstitutive Overproduction of the
Inducible *Citrobacter freundii* β -Lactamase
J. Bacteriol.; **169**, 1923-1928

LINDQUEST, S.; F. LINDBERG; S. NORMARK (1989)

Binding of the *Citrobacter freundii* AmpR Regulator to a Single DNA Site Provides
Both Autoregulation and Activation of the Inducible *ampC* β -Lactamase Gene
J. Bacteriol.; **171**, 3746-3753

**LINDQUIST, S.; K. WESTON-HAFER; H. SCHMIDT; C. PUL; G. KORFMANN;
J. ERICKSON; C. SANDERS; H. H. MARTIN; S. NORMARK (1993)**

AmpG, a signal transducer in chromosomal β -lactamase induction
Mol. Microbiol.; **9**, 703-715

LIVERMORE, D. M. (1995)

β -Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance
Clin. Microbiol. Rev.; **8**, 557-584

LIVERMORE, D. M. (1998)

β -Lactamase-mediated resistance and opportunities for its control
J. Antimicrob. Chemoth.; **41**, 25-41

LIVERMORE, D. M.; N. WOODFORD (2006)

The β -lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*
Trends in Microbiol.; **14**, 413-420

LODGE, J. M.; L. J. V. PIDDOCK (1991)

The control of class I β -lactamase expression in Enterobacteriaceae and
Pseudomonas aeruginosa
J. Antimicrob. Chemoth.; **28**, 167-172

LÜLLMANN, H.; K. MOHR; L. HEIN (2004)

Taschenatlas der Pharmakologie
5. überarbeitete und erweiterte Auflage
Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 270-275

MAJIDUDDIN, F. K.; I. C. MATERON; T. G. PALZKILL (2002)

Molecular analysis of beta-lactamase structure and function
Int. J. Med. Microbiol.; **292**, 127-137

MARJAI, E.; M. KÁLMÁN; I. KAJÁRY; A. BÉLTEKY; M. RODLER (1987)

Isolation from food and characterization by virulence tests of
Yersinia enterocolitica associated with an outbreak

Acta Microbiol. Hung.; **34**, 97-109

MASSOVA, I.; S. MOBASHERY (1998)

Kinship and Diversification of Bacterial Penicillin-Binding Proteins and β -
Lactamases

Antimicrob. Agents Chemoth.; **42**, 1-17

**MASTERS, P. J.; C. E. COOPER; K. E. GRIFFIN; B. SLOCOMBE; R. SUTHERLAND
(1989)**

Comparative activities *in vitro* of Amoxicillin/clavulanic acid and
ampicillin/sulbactam

J. Chemoth.; **1 (Suppl 4)**, 67-69

MATTHEW, M.; A. M. HARRIS; M. J. MARSHALL; G. W. ROSS (1975)

The Use of Analytical Isoelectric Focusing for Detection and Identification of
 β -Lactamases

J. Gen. Microb.; **88**, 169-178

MATTHEW, M.; A. M. HARRIS (1976)

Identification of β -Lactamases by Analytical Isoelectric Focusing: Correlation with
Bacterial Taxonomy

J. Gen. Microb.; **94**, 55-67

MATTHEW, M.; G. CORNELIS; G. WAUTERS (1977)

Correlation of Serological and Biochemical Groupings of *Yersinia enterocolitica*
with the β -Lactamases of the Strains

J. Gen. Microb.; **102**, 55-59

MEDEIROS, A. A. (1997)

Evolution and Dissemination of β -Lactamases Accelerated by Generations of β -Lactam Antibiotics
Clin. Inf. Dis.; **24 (Suppl 1)**, 19-45

MERHEJ, V.; T. ADÉKAMBI; I. PAGNIER; D. RAOULT; M. DRANCOURT (2008)

Yersinia massiliensis sp. nov., isolated from fresh water
Int. J. Syst. Evol. Microbiol.; **58**, 779-784

MEYER, C. (2007)

Antibakterielle Resistenz bei *Yersinia enterocolitica* Stämmen aus verschiedenen Quellen mittels Agardiffusionstest und Bouillon-Mikrodilutionsverfahren
Vet. Med. Diss., LMU

MITSUHASHI, S; M. INOUE (1981)

Epidemiology and Genetics of Resistance to β -Lactam Antibiotics
In: S. Mitsuhashi: Beta-Lactam Antibiotics, 15-37
Japan Scientific Societies Press, Tokyo
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

MUTSCHLER, E.; M. SCHÄFER-KORTING (1996)

Antiinfektiva
In: E. Mutschler, M. Schäfer-Korting: Arzneimittelwirkungen
7., völlig neu bearbeitete und erweiterte Auflage
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 651-675

NANDIVADA, L. S.; S. G. B. AMYES (1990)

Plasmid-mediated β -lactam resistance in pathogenic Gram-negative bacteria isolated in South India
J. Antimicrob. Chemoth.; **26**, 279-290

NESBAKKEN, T.; E. BORCH (1995)

Prophylactic Measures in Order to Reduce Contamination of Pig Carcasses *with Yersinia enterocolitica* during Slaughter

In: Ravagnan G.; Chiesa C. (eds): Yersiniosis: Present and Future
Contrib. Microbiol. Immunol., Basel; Karger; **13**, 62-66

NEU, H. C. (1992)

The Crisis in Antibiotic Resistance

Sci.; **257**, 1064-1073

NEUBAUER, H.; L. D. SPRAGUE; H. SCHOLZ; A. HENSEL (2001)

Yersinia enterocolitica-Infektionen: 1. Bedeutung bei Tieren

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.; **114**, 1-7

N.N. (1984)

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB

Untersuchung von Lebensmitteln, Methode L 06.00-19: Bestimmung der
aeroben Keimzahl bei +30°C in Fleisch und Fleischerzeugnissen

Tropfplattenverfahren

N.N. (1985)

Aztreonam - welche Bedeutung haben Monobactame?

Zeitschrift für Chemotherapie; Heft 2

www.zct-berlin.de/neueinfuehrungen/aztreonam.html; Zugriff: 16.05.2008

N.N. (1998)

β-Lakamase-Inhibitoren

Zeitschrift für Chemotherapie; **19**, 1-3

**NUKAGA, M.; S. HARUTA; K. TANIMOTO; K. KOGURE; K. TANIGUCHI; M. TAMAKI;
T. SAWAI (1995)**

Molecular Evolution of the Class C β -Lactamase Extending Its Substrate Specificity
J. Biochem. Chem.; **270**, 5729-5735

OLSEN, H. T. (2000)

Antimicrobial resistance with focus on oral beta-lactamases
Eur. J. Oral Sci.; **108**, 163-174

OSTROFF (1995)

Yersinia as an Emerging Infection: Epidemiologic Aspects of Yersiniosis
In: Ravagnan G., Chiesa C. (eds): Yersiniosis: Present and Future
Contrib. Microbial. Immunol., Basel, Karger; **13**, 5-10

PFEIFER; Y. (2007)

ESBL und AmpC: β -Laktamasen als eine Hauptursache der Cephalosporin-Resistenz bei Enterobakterien
Epidemiologisches Bulletin, Robert-Koch-Institut; **28**, 247-250

PHAM, J. N.; S. M. BELL; J. Y. M. LANZARONE (1991a)

Biotype and antibiotic sensitivity of 100 clinical isolates of *Yersinia enterocolitica*
J. Antimicrob. Chemoth.; **28**, 13-18

PHAM, J. N.; S. M. BELL; J. Y. M. LANZARONE (1991b)

A study of the β -lactamases of 100 clinical isolates of *Yersinia enterocolitica*
J. Antimicrob. Chemoth.; **28**, 19-24

PHAM, J. N.; S. M. BELL (1992)

β -Lactamase induction by imipenem in *Yersinia enterocolitica*

Pathology; **24**, 201-204

PHAM, J. N.; S. M. BELL (1993a)

The detection by a disc diffusion technique of inducible β -lactamase in *Yersinia enterocolitica*

J. Antimicrob. Chemoth.; **31**, 1004-1005

PHAM, J. N.; S. M. BELL (1993b)

The prevalence of inducible β -lactamase in clinical isolates of *Yersinia enterocolitica*

Pathology; **25**, 385-387

PHAM, J. N.; S. M. BELL; M. J. HARDY; L. MARTIN; A. GUIYOULE; E. CARNIEL (1995a)

Susceptibility to β -lactam agents of *Yersinia enterocolitica* biotype 4, serotype O3 isolated in various parts of the world

J. Med. Microbiol; **43**, 9-13

PHAM, J. N.; S. M. BELL; M. J. HARDY; L. MARTIN; A. GUIYOULE; E. CARNIEL (1995b)

Comparison of Beta-Lactamase Production by *Yersinia enterocolitica* 4, Serotyp O:3 Isolated in Eleven Countries

In: Ravagnan G., Chiesa C. (eds): Yersiniosis: Present and Future

Contrib. Microbial. Immunol., Basel, Karger; **13**, 180-183

PHAM, J. N.; S. M. BELL; L. MARTIN; E. CARNIEL (1999)

The Detection Of Enzyme A Of *Yersinia Enterocolitica* By A Disc Diffusion Method

Pathology; **31**, 268-270

PHAM, J. N.; S. M. BELL; L. MARTIN; E. CARNIEL (2000)

The β -lactamases and β -lactam antibiotic susceptibility of *Yersinia enterocolitica*
J. Antimicrob. Chemoth.; **46**, 951-957

PHILIPPON, A.; G. ARLET; G. A. JACOBY (2002)

Plasmid-Determined AmpC-Type β -Lactamases

Antimicrob. Agents Chemoth.; **46**, 1-11

PRESTON, M. A.; S. BROWN; A. A. BORCZYK; G. RILEY; C. KRISHNAN (1994)

Antimicrobial Susceptibility of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* Isolated in
Canada from 1972 to 1990

Antimicrob. Agents Chemoth.; **38**, 2121-2124

RICHMOND, M. H.; R. B. SYKES (1973)

The β -Lactamases of Gram-Negative Bacteria and their Possible Physiological
Role

In: A. H. Rose; D. W. TEMPEST: Advances in Microbial Physiology; **9**, 31-88

Academic Press, London and New York

RKI-ROBERT KOCH INSTITUT (2002)

Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2002

http://www.rki.de/cln_100/nn_196882/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahresstatistik_ik__2002,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/Jahresstatistik_2002.pdf

Zugriff: 27.09.2008

RKI-ROBERT KOCH INSTITUT (2003)

Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2003
http://www.rki.de/cln_100/nn_196882/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahresstatistik_2003,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/Jahresstatistik_2003.pdf
Zugriff: 27.09.2008

RKI-ROBERT KOCH INSTITUT (2004)

Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2004
http://www.rki.de/cln_100/nn_196882/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahresstatistik_2004,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/Jahresstatistik_2004.pdf
Zugriff: 27.09.2008

RKI-ROBERT KOCH INSTITUT (2005)

Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2005
http://www.rki.de/cln_100/nn_196882/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahresstatistik_2005,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/Jahresstatistik_2005.pdf
Zugriff: 27.09.2008

RKI-ROBERT KOCH INSTITUT (2006)

Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2006
http://www.rki.de/cln_100/nn_196882/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahresstatistik_2006,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/Jahresstatistik_2006.pdf
Zugriff: 27.09.2008

RKI-ROBERT KOCH INSTITUT (2007)

Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2007
http://www.rki.de/cln_100/nn_196882/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahresstatistik_2007,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/Jahresstatistik_2007.pdf
Zugriff: 27.09.2008

ROLLE, M.; A. MAYR (2002)

Yersinia

In: M. Rolle, A. Mayer (Hrsg.): Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre; 7., völlig neu bearbeitete Auflage
Enke Verlag, Stuttgart; 478-481

SANDERS, C. C.; W. E. SANDERS (1979)

Emergence of resistance to cefamandole: possible role of cefoxitin-inducible beta-lactamases

Antimicrob. Agents Chemoth.; **15**, 792-797

SCHIEFER, A. M.; I. WIEGAND; K. J. SHERWOOD; B. WIEDEMANN; I. STOCK (2005)

Biochemical and genetic characterization of the β -lactamases of *Y. aldovae*, *Y. bercovieri*, *Y. frederiksenii* and *Y. ruckeri* strains

Int. J. Antimicrob. Agents; **25**, 496-500

SCHNEIDEREIT, M. (2004)

Aktuelle Studie: Verbrauchsmengen von Tierarzneimitteln

Bundesverband für Tiergesundheit e.V. (Bft), Bonn; 14. September 2006

<http://www.bft-online.org/Schwerpunktthemen>; Zugriff: 08.09.2008

SCHNEIDEREIT, M. (2006)

Antibiotikaeinsatz in der Veterinärmedizin: Situation in Deutschland und anderen europäischen Veredelungsregionen; UBA-Symposium–Arzneimittel in der Umwelt, Berlin 29./30.09.2004

Bundesverband für Tiergesundheit e.V. (Bft), Bonn

<http://www.bft-online.org/Schwerpunktthemen>; Zugriff: 08.09.2008

SCHWARZ, S.; E. CHASLUS-DANCLA (2001)

Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance
Vet. Res.; **32**, 201-225

SEEBERG, A. H.; R. M. TOLXDORFF-NEUTZLING; B. WIEDEMANN (1983)

Chromosomal β -Lactamases of *Enterobacter cloacae* Are Responsible for
Resistance to Third-Generation Cephalosporin
Antimicrob. Agents Chemoth.; **23**, 918-925

SEOANE, A.; J. M. GARCIA LOBO (1991)

Cloning of chromosomal β -lactamase genes from *Yersinia enterocolitica*
J. Gen. Microb.; **137**, 141-146

SEOANE, A.; M. V. FRANZIA; J. M. GARCIA LOBO (1992)

Nucleotide sequence of the ampC-ampR region from the chromosome of *Yersinia enterocolitica*
Antimicrob. Agents Chemoth.; **36**, 1049-1052

SHARMA, S.; S. MITTAL; S. MALLIK; J. S. VIRDI (2004)

Molecular characterization of β -lactamase genes *blaA* and *blaB* of
Yersinia enterocolitica Biovar 1A
FEMS Microbiol. Letters.; **257**, 319-327

SHARMA, S.; P. RAMNANI; J. S. VIRDI (2006)

Detection and assay of β -lactamases in clinical and non-clinical strains of
Yersinia enterocolitica biovar 1A
J. Antimicrob. Chemoth.; **54**, 401-405

SKLAVUNU-TSURUTSOGLU, S.; M. GATZOLA-KARAVELI; K. HATZIOANNIDIS; G. TSURUTSOGLU (1989)

Aztreonam treatment of neonatal sepsis
J. of Chemoth.; **1** (Suppl. n. 4), 687-688

SPRAGUE, L. D.; H. NEUBAUER (2005)

Yersinia aleksiciae sp. nov.
Int. J. Syst. Evol. Micr.; **55**, 831-835

SPRAGUE, L. D.; H. C. SCHOLZ; S. AMANN; H. J. BUSSE; H. NEUBAUER (2008)

Yersinia similis sp. nov.
Int. J. Syst. Evol. Microbiol.; **58**, 952-958

SPRATT, B. G. (1994)

Resistance to Antibiotics Mediated by Target Alterations
Sci.; **264**, 388-393

STOCK, I.; B. WIEDEMANN (1998)

Die Bestimmung der natürlichen Antibiotika-Empfindlichkeit
Chemoth. J.; **7**, 127-135

STOCK, I.; B. WIEDEMANN (1999)

An in-vitro study of the antimicrobial susceptibilities of *Yersinia enterocolitica*
and the definition of a database
J. Antimicrob. Chemoth.; **43**, 37-45

STOCK, I.; P. HEISIG; B. WIEDEMANN (1999)

Expression of β -lactamases in *Yersinia enterocolitica* strains of biovars 2, 4,
and 5
J. Med. Microbiol.; **48**, 1023-1027

STOCK, I.; P. HEISIG; B. WIEDEMANN (2000)

β -lactamase expression in *Yersinia enterocolitica* biovars 1A, 1B and 3
J. Med. Microbiol.; **49**, 403-408

STOCK, I.; B. HENRICHFREISE; B. WIEDEMANN (2002)

Natural antibiotic susceptibility and biochemical profiles of *Yersinia enterocolitica*-like strains: *Y. bercovieri*, *Y. mollaretti*, *Y. aldovae* and *Y. ruckeri*
J. Med. Microbiol.; **51**, 56-69

STOLK-ENGELAAR, V. M. M.; J. F. G. M. MEIS; J. A. MULDER; F. L. A. LOEFFEN; J. A. A. HOOGKAMP-KORSTANJE (1995)

In-vitro antimicrobial susceptibility of *Yersinia enterocolitica* isolates from stools of patients in The Netherlands from 1982-1991
J. Antimicrob. Chemoth.; **36**, 839-843

STOLLE, A. (1989)

Die hygienischen Rahmenbedingungen während des Schlachtvorganges
Prakt. Tierarzt; **12**, 5-15

SYKES, R. B.; M. MATTHEW (1976)

The β -lactamases of Gram-negative bacteria and their rôle in resistance to β -lactam antibiotics
J. Antimicrob. Chemoth.; **2**, 115-157

THEURETZBACHER, U. (1998)

Beta-Lactamasen und Beta-Lactamase-Inhibitoren
Chemoth. J.; **7**, 136-142

THEURETZBACHER, U. (2004)

Beta-Lactamasen und Beta-Lactamase-Inhibitoren
Chemoth. J.; **13**, 206-217

TOBBACK, E.; A. DECOSTERE; K. HERMANS; F. HAESEBROUCK; K. CHIERS (2007)

Yersinia ruckeri infections in salmonid fish
J. Fish Dis.; **30**, 257-268

TODAR, K. (2008)

Antimicrobial Agents Used in Treatment of Infectious Disease
Todar's Online Textbook of Bacteriology; University of Wisconsin-Madison
Department of Bacteriology
<http://images.google.de/imgres?imgurl=http://www.textbookofbacteriology.net/>;
Zugriff: 26.08.2008

TOMASZ, A. (1980)

On the mechanism of the irreversible antimicrobial effects of β -lactams
Phil. Trans. R. Soc. London; **289**, 303-308

WHITE, D. G.; S. ZHAO; S. SIMJEE; D. D. WAGNER; P. F. MCDERMOTT (2002)

Antimicrobial resistance of foodborne pathogens
Microb. Infec.; **4**, 405-412

WIEGAND, I. (2003)

Molekulare und biochemische Grundlagen der Beta-Lactam-Resistenz durch
Beta-Lactamasen
Chemoth. J.; **12**, 151-167

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

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

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

ZEBA, B. (2005)

Overview of β -lactamase incidence on bacterial drug resistance

Afr. J. Biotechn.; **4**, 1559-1562

9. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Einteilung der β -Laktam-Antibiotika (modifiziert nach MUTSCHLER und SCHÄFER-KORTING, 1996; KROKER et al., 2001)	S. 7
Tabelle 2:	Veterinärmedizinischer Einsatz von Antiinfektiva in Deutschland in t (nach SCHNEIDEREIT, 2006)	S. 11
Tabelle 3:	β -Laktamase-Inhibitoren und mögliche Antibiotika-kombinationen	S. 13
Tabelle 4:	Klassifizierung von β -Laktamasen (modifiziert nach BUSH, 1989a, 1989b, 1989c; 1995)	S. 25
Tabelle 5:	β -Laktamase A und B bei <i>Y. enterocolitica</i>	S. 28
Tabelle 6:	Zusammenfassung der nachgewiesenen BlaA und BlaB bei verschiedenen <i>Y. enterocolitica</i> Biotypen	S. 35
Tabelle 7:	Anzahl der bei RKI gemeldeten Erkrankungen mit <i>Y. enterocolitica</i> , <i>Campylobacter</i> und <i>Salmonella</i> in Deutschland von 2001-2007 (nach RKI 2002, 2003, 2004, 2005, 2006, 2007)	S. 40
Tabelle 8:	Herkunft und Anzahl der untersuchten <i>Y. enterocolitica</i> Stämme des Bioserotyp 4/O:3	S. 47
Tabelle 9	verwendeten Kontrollstämme	S. 48
Tabelle 10:	Sequenz der Primer für die Amplifikation von <i>blaA</i> und <i>blaB</i>	S. 49

Tabelle 11:	Zusammensetzung des Eppendorf® Master-Mix (2,5x)	S. 50
Tabelle 12:	Durchschnittliche Ergebnisse der photometrischen Dichtebestimmung sowie der Keimzählung mittels Tropfplattenverfahren	S. 55
Tabelle 13:	Bewertungsschlüssel zur Bestimmung der Expression der β -Laktamase A und B im Agardiffusionstest (nach Pham et al., 1995b, 1999)	S. 58
Tabelle: 14	Zusammensetzung des PCR-Ansatzes pro Probe	S. 60
Tabelle 15:	PCR-Protokoll	S. 61
Tabelle 16:	Anzahl der BlaA- und BlaB-positiven Stämme im Agardiffusionstest	S. 65
Tabelle 17:	Verteilung der HHR-Größe um Ticarcillin der BlaA-positiven Stämme (30°C Bebrütungstemperatur)	S. 66
Tabelle 18:	Anzahl der BlaA positiven Stämme mit charakteristischer Synergiezone und HHR von >2 mm um AMC bzw. HHR von \leq 1 mm um AMC (30°C Bebrütungstemperatur)	S. 67
Tabelle 19:	Verteilung der HHR-Größe um Ticarcillin der BlaA-positiven Stämme (30°C Bebrütungstemperatur)	S. 68
Tabelle 20:	Anzahl der BlaA positiven Stämme mit charakteristischer Synergiezone und HHR von >2 mm um AMC bzw. HHR von \leq 1 mm um AMC (25°C Bebrütungstemperatur)	S. 69
Tabelle 21:	Vergleich des HHR um Ticarcillin in mm bei den BlaA-positiven Stämmen bei den Bebrütungstemperaturen 30°C und 25°C	S. 71

Tabelle 22:	Vergleich des HHR um Amoxicillin/Clavulansäure in mm (30°C und 25°C Bebrütungstemperaturen)	S. 72
Tabelle 23:	Darstellung der abweichenden Ergebnisse zwischen dem Vorkommen der <i>blaA</i> - und <i>blaB</i> -Gene und der Expression der BlaA und BlaB aus PCR und Agardiffusion bei <i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3	S. 74
Tabelle 24:	Herkunft der untersuchten <i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3 Stämme	S. 125
Tabelle 25:	Agardiffusionstestergebnisse der untersuchten <i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3 Stämme	S. 127
Tabelle 26:	Vorkommen <i>blaA</i> - und <i>blaB</i> -Gene bei den untersuchten <i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3 Stämme	S. 139

10. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Strukturelle Darstellung der 4 Substanzgruppen der β -Laktam-Antibiotika (nach TODAR, 2008)	S. 4
Abbildung 2:	Verbrauch von antimikrobiell wirksamen Substanzen im Bereich Veterinärmedizin in der EU (inkl. Schweiz) 1997 (nach FEDESA/FEFANA, 1999)	S. 10
Abbildung 3:	Strukturelle Darstellung der β -Laktamase-Inhibitoren (nach MUTSCHLER und SCHÄFER-KORTING, 1996)	S. 12
Abbildung 4:	Spaltung des β -Laktam-Rings durch β -Laktamasen (nach MUTSCHLER und SCHÄFER-KORTING, 1996)	S. 18
Abbildung 5:	Klassifizierung der β -Laktamasen (nach AMBLER, 1980)	S. 21
Abbildung 6:	Gattung <i>Yersinia</i> mit ihren 14 verschiedenen Spezies	S. 36
Abbildung 7:	Schematische Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte zur Einstellung der Bakteriendichte auf 10^7 KbE/ml mit Beispielauswertung (modifiziert nach Meyer, 2007)	S. 54
Abbildung 8:	Durchführung des Agardiffusionstests (modifiziert nach Meyer, 2007)	S. 59
Abbildung 9:	Expression und Synergiezone von BlaA mit BlaB-Expression (links) bzw. ohne BlaB-Expression (rechts) im Agardiffusionstest bei <i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3	S. 63
Abbildung 10:	PCR-Amplifikate im Agarosegel	S. 73

PCR und Gelelektrophorese

Agarose, BioRad Molecular Biology	BIORAD
DNA-Marker, EZ Load™ 80 µg/ml, 100bp Molecular Ruler	BIORAD
Eppendorf® Master-Mix (2,5x)	EPPENDORF
Ethidiumbromidbad (250 µg/500 ml)	
25 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml)	BIORAD
500 µl Aqua bidest.	
Primer	EUROFINS MWG GMBH
Primer blaA3 (Sequenz: 5'-AGT GGT GGT ATC ACG TGG GT-3')	
Primer blaA5 (Sequenz: 5'-AAA TGC GCT ACC GGC TTC AG-3')	
Primer blaB3 (Sequenz: 5'-GAA CAT ATC TCC TGC CTG GAA AT-3')	
Primer blaB5 (Sequenz: 5'-CCC ACT TTA TAC CTT GGC ACA AA-3')	
Gel-Laufpuffer, Nucleid Acid Sample Loading Buffer, 5x	BIORAD
10x TBE-Puffer	BIORAD
Water molecular biology grade	EPPENDORF

Allgemeine MaterialienAludeckel

Aludeckel Ø 8 cm	MERCK
Aludeckel Ø 10 cm	MERCK
Aludeckel Ø 13 cm	MERCK

Aufbewahrungsgefäße

Messzylinder 20 ml, 100 ml, 500 ml, 1000 ml	BRAND
Erlenmeyerkolben 100 ml, 200 ml, 500 ml, 1000 ml	MERCK
Petrischalen Nr. 100 (steril)	WALDECK

Autoklav

Hochdruckdampf-Sterilisator Typ 112 KSG	STERILISATOREN GmbH
Trockensterilisator SLM 500	MEMMERT

Brutschränke

Typ B 6060, Typ B 6200

HERAEUS INSTRUMENTS

Dispensierhilfe

Dispensette ® 0-10 ml

BRAND

Pipetus® akku

HIRSCHMANN LABORGERÄTE

Glaspipetten

Silberbrand-Eterna, Klasse B, 20 ml

BENDER & HOBEIN

Gelelektrophorese

Gelform

EPPENDORF

Gelkamm 15 Zinken

BIORAD

Gellaufkammer

BIORAD

BioRad Power Pac Basic

BIORAD

BioRad Mini-SOB Cell GT

BIORAD

UV-Kammer

BIORAD

Handschuhe

Einmal-Handschuhe PE gehämmert , Gentle Skin classic®

MERCK

Nitril Handschuhe

ROTH

Heizblöcke

Thermomixer comfort

EPPENDORF

Thermostat plus

EPPENDORF

Impfösen

Platinum/Iridium-Ösen 90/10

BENDER & HOBEIN

Kühlschränke

Kühl-Gefrier-Kombination Typ „Premium“

LIEBHERR

FKS 5000 Index 10C Typ 200071

LIEBHERR

Economic cooler automatic

BOSCH

Küvetten

UVette® EPPENDORF

Magnetrührer mit Heizplatte

Magnetrührwerk MR 2002 HEIDOLPH
Typ RCT Janke und Kunkel IK LABORTECHNIK

McFarland Standard 0,5

BIO MÉRIEUX

Mikrobank

PRO-LAB DIAGNOSTICS

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

Mikrowelle

MICROMAXX

micromaxx®

PCR-Cycler

BioRad iCycler BIORAD

pH-Meter

pH 535 Multical mit Temperaturabgleich WTW

Photometer

Bio Photometer 6131 EPPENDORF

Pipetten

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

Glaspipetten, Silberbrand-Eterna, Klasse B, 20 ml BENDER&HOBEIN

Pipettenspitzen

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

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

Tabelle 24: Herkunft der untersuchten *Y. enterocolitica* 4/O:3 Stämme

Nr.	Stamm	Herkunft	Nr.	Stamm	Herkunft
1	HYE 9297	Mensch-Stuhl	51	6M 3 1D	Schwein
2	HYE 2093	Mensch-Stuhl	52	6M 11 2D	Fleischstück
3	HYE 8205	Mensch-Stuhl	53	3M 12 1M	Schwein-Fleischstück
4	HYE 6452	Mensch-Stuhl	54	4M 14 1ITC	Schwein-Leber
5	HYE 8443	Mensch-Stuhl	55	5M 25 1MRB	Ferkel
6	T 17 1M	Schwein-Tonsillen	56	HYE 731	Mensch-Stuhl
7	T 36 1D	Schwein-Tonsillen	57	HYE 914	Mensch-Stuhl
8	STY 28 1D	Schwein-Tonsillen	58	HYE 6989	Mensch-Stuhl
9	MYT 50 1ITC	Schwein-Tonsillen	59	HYE 7301	Mensch-Stuhl
10	MYK 29 1ITC	Schwein-Kot	60	HYE 7264	Mensch-Stuhl
11	YEF 183 1ITC	Schwein-Kopffleisch	61	YEF 46 1I2	Hackfleisch
12	4M 12 2M	Schwein-Schlegel	62	YEF 53 1I1	Hackfleisch
13	5M 18 1D	Schwein-Schlegel	63	YEF 9 1I1	Hackfleisch
14	FYE 84 ITC	Hackfleisch	64	YEF 12 2I2	Hackfleisch
15	FYE 248 1ITC	Schwein-Schין	65	YEF 25 1D	Hackfleisch
16	HYE 6940	Mensch-Stuhl	66	YEF 40 1I2	Hackfleisch
17	HYE 5661	Mensch-Stuhl	67	YEF 183 2I1	Schwein-Kopffleisch
18	HYE 6388	Mensch-Stuhl	68	YEF 188 1D	Schwein-Speck
19	HYE 10742	Mensch-Stuhl	69	YEF 297 1I1	Hackfleisch
20	HYE 12031	Mensch-Stuhl	70	YEF 5 1I1	Hackfleisch
21	MYT 2 1D	Schwein-Tonsillen	71	T 8 1M	Schwein-Tonsillen
22	MYK 2 1D	Schwein-Kot	72	S 1 1D	Schwein-Kot
23	MYK 3 1D	Schwein-Kot	73	S 4 1D	Schwein-Kot
24	MYT 6 1ITC	Schwein-Tonsillen	74	T 12 1D	Schwein-Tonsillen
25	MYT 8 1D	Schwein-Tonsillen	75	S 3 1ON	Schwein-Kot
26	YEF 4 1I1	Hackfleisch	76	T10 1ON	Schwein-Tonsillen
27	YEF 12 2I1	Hackfleisch	77	T 9 1D	Schwein-Tonsillen
28	YEF 159 2I1	Hackfleisch	78	T 5 1M	Schwein-Tonsillen
29	YEF 289 1I1	Hackfleisch	79	T 20 1I	Schwein-Tonsillen
30	YEF 5 1I2	Schwein-Kopffleisch	80	T 19 1M	Schwein-Tonsillen
31	HYE 1302	Mensch-Stuhl	81	T 18 1I	Schwein-Tonsillen
32	HYE 5955	Mensch-Stuhl	82	S 18 1ON	Schwein-Kot
33	HYE 6620	Mensch-Stuhl	83	S 14 1ON	Schwein-Kot
34	HYE 7269	Mensch-Stuhl	84	T 23 1M	Schwein-Tonsillen
35	HYE 7271	Mensch-Stuhl	85	T 27 1M	Schwein-Tonsillen
36	SKY 25 1D	Schwein-Kot	86	HYE 7428	Mensch-Stuhl
37	SKY 27 1D	Schwein-Kot	87	HYE 11434	Mensch-Stuhl
38	STY 30 1D	Schwein-Tonsillen	88	HYE 12247	Mensch-Stuhl
39	STY 13 1ON	Schwein-Tonsillen	89	HYE 9426	Mensch-Stuhl
40	SKY 36 1D	Schwein-Kot	90	HYE 3337	Mensch-Stuhl
41	STY 36 2ITC	Schwein-Tonsillen	91	YEF 131 1I1	Hackfleisch
42	STY 42 1D	Schwein-Tonsillen	92	FYE 39 1D2	Hackfleisch
43	STY 47 1D	Schwein-Tonsillen	93	FYE 95 1D2	Hackfleisch
44	STY 19 2ITC	Schwein-Tonsillen	94	FYE 120 1ITC	Hackfleisch
45	1M 1 1D	Ferkel	95	FYE 246 1I2	Schwein
46	1M 5 1D	Schwein	96	HYE 6078	Mensch-Stuhl
47	5M 18 1D	Schwein-Schlegel	97	HYE 8822	Mensch-Stuhl
48	7MV 1 1D	Schwein-Leber	98	HYE 8926	Mensch-Stuhl
49	7MV 2 1D	Schwein-Niere	99	HYE 10088	Mensch-Stuhl
50	7MV 4 1D	Schwein-Zunge	100	HYE 4230	Mensch-Stuhl

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

Nr.	Stamm	Herkunft
101	STY 12 1D	Schwein-Tonsillen
102	STY 17 1D	Schwein-Tonsillen
103	STY 18 1D	Schwein-Tonsillen
104	STY 10 1D	Schwein-Tonsillen
105	SKY 26 1D	Schwein-Kot
106	STY 29 1D	Schwein-Tonsillen
107	1M 5 1ITC	Schwein
108	4M 22 1ITC	Schwein-Leber
109	6M 11 1ITC	Schwein-Fleischstück
110	5M 19 ITC	Schwein-Schlegel
111	HYE 8444	Mensch-Stuhl
112	HYE 8442	Mensch-Stuhl
113	HYE 7555	Mensch-Stuhl
114	HYE 695	Mensch-Stuhl
115	HYE 3757	Mensch-Stuhl
116	HYE 6413	Mensch-Stuhl
117	HYE 9363	Mensch-Stuhl
118	HYE 5721	Mensch-Stuhl
119	HYE 1455	Mensch-Stuhl
120	HYE 1091	Mensch-Stuhl
121	T 1 1D	Schwein-Tonsillen
122	T 4 1M	Schwein-Tonsillen
123	T 11 1D	Schwein-Tonsillen
124	T 3 1D	Schwein-Tonsillen
125	T 15 1M	Schwein-Tonsillen
126	T 14 1I	Schwein-Tonsillen
127	T 28 1D	Schwein-Tonsillen
128	T 22 1D	Schwein-Tonsillen
129	T 21 1D	Schwein-Tonsillen
130	T 34 1D	Schwein-Tonsillen
131	SHY 11 4ON(B)	Schwein-Herz
132	SHY 12 1M(B)	Schwein-Zunge
133	SHY 11 7M(B)	Schwein-Niere
134	SHY 13 4M(A)	Schwein-Herz
135	SHY 14 4M	Schwein-Herz
136	SHY 16 1M(A)	Schwein-Zunge
137	YEF 25 1M	Hackfleisch
138	YEF 26 1I	Hackfleisch
139	YEF 97 1D	Hackfleisch
140	YEF 188 1M	Schwein-Speck
141	YEF 91 1M	Hackfleisch
142	YEF 92 1I	Hackfleisch
143	HYE 12658	Mensch-Stuhl
144	HYE 4117	Mensch-Stuhl
145	HYE 3738	Mensch-Stuhl
146	HYE 3963	Mensch-Stuhl
147	HYE 2792	Mensch-Stuhl
148	HYE 7839	Mensch-Stuhl
149	HYE 6328	Mensch-Stuhl
150	HYE 11187	Mensch-Stuhl

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

Nr.	Stamm	Herkunft
151	MYT 9 1ITC	Schwein-Tonsillen
152	MYT 11 1D	Schwein-Tonsillen
153	MYT 16 1D	Schwein-Tonsillen
154	MYT 13 1D	Schwein-Tonsillen
155	MYT 19 1D	Schwein-Tonsillen
156	MYK 13 2ITC	Schwein-Kot
157	MYK 16 ITC	Schwein-Kot
158	MYK 17 2ITC	Schwein-Kot
159	MYT 21 1D	Schwein-Tonsillen
160	MYT 27 1D	Schwein-Tonsillen
161	HYE 8750	Mensch-Stuhl
162	HYE 2502	Mensch-Stuhl
163	HYE 4273	Mensch-Stuhl
164	HYE 8602	Mensch-Stuhl
165	HYE 8611	Mensch-Stuhl
166	HYE 8616	Mensch-Stuhl
167	SHY 2,4 M(B)	Schwein-Herz
168	SHY 3,3 M(A)	Schwein-Lunge
169	SHY 1,1 D(A)	Schwein-Zunge
170	SHY 1,4 M(B)	Schwein-Herz
171	SHY 4,1 M(A)	Schwein-Herz
172	SHY 8,1 M(A)	Schwein-Zunge
173	SHY 10,3 I(A)	Schwein-Lunge
174	SHY 8,6 OM(A)	Schwein-Leber
175	STY 23 1D	Schwein-Tonsillen
176	STY 46 2ITC	Schwein-Tonsillen
177	STY 50 1ITC	Schwein-Tonsillen
178	MYT 32 1D	Schwein-Tonsillen
179	MYT 33 1D	Schwein-Tonsillen
180	MYT 34 1D	Schwein-Tonsillen
181	MYT 41 1ITC	Schwein-Tonsillen
182	HYE8798	Mensch-Stuhl
183	HYE 1950	Mensch-Stuhl
184	HYE 6316	Mensch-Stuhl
185	HYE 6370	Mensch-Stuhl
186	HYE 7635	Mensch-Stuhl
187	HYE 8051	Mensch-Stuhl
188	SHY 1,2 M(B)	Schwein-Tonsillen
189	SHY 3,2 D(B)	Schwein-Tonsillen
190	SHY 4,2 M(B)	Schwein-Tonsillen
191	SHY 7,2 D(A)	Schwein-Tonsillen
192	SHY 15,2 M(A)	Schwein-Tonsillen
193	SHY 11,2 M(B)	Schwein-Tonsillen
194	SHY 12,2 I(A)	Schwein-Tonsillen
195	SHY 14,2 M	Schwein-Tonsillen
196	MYK 36 1D	Schwein-Kot
197	MYK 41 1D	Schwein-Kot
198	MYT 60 1D	Schwein-Tonsillen
199	MYT 64 1D	Schwein-Tonsillen
200	MYT 58 ITC	Schwein-Tonsillen

Tabelle 25: Agardiffusionstestergebnisse der untersuchten *Y. enterocolitica* 4/O:3 Stämme

Nr.	Ansatz	Ticarcillin (75 µg) und Amoxicillin/Clavulansäure (3 µg)											
		30 °C Bebrütungstemperatur						25 °C Bebrütungstemperatur					
		HHR TIC	HHR AMC	Syn Form	Syn a	Syn b	Syn Hof	HHR TIC	HHR AMC	Syn Form	Syn a	Syn b	Syn Hof
1	a	3	2	2	22	17	3	2	2	2	22	19	3
	b	3	2	2	22	17	3	2	2	2	22	19	3
2	a	4	3	2	22	18	3	3	2	2	22	22	3
	b	4	3	2	22	18	3	3	2	2	22	22	3
3	a	4	-	2	22	22	3	2	-	3	18	16	3
	b	4	-	2	22	22	3	2	-	3	18	16	3
4	a	3	1	3	14	18	3	2	-	3	16	12	3
	b	3	1	3	14	18	3	2	-	3	16	12	3
5	a	4	1	2	22	19	3	3	-	3	20	18	3
	b	4	1	2	22	18	3	3	-	3	20	18	3
6	a	4	-	3	19	16	3	2	-	3	18	15	3
	b	4	-	3	19	16	3	2	-	3	18	15	3
7	a	3	1	3	19	19	3	2	1	3	17	16	3
	b	3	1	3	19	19	3	2	1	3	17	16	3
8	a	3	2	3	21	18	3	2	1	2	22	17	3
	b	3	2	3	21	18	3	2	1	2	22	17	3
9	a	3	-	3	19	16	3	2	-	3	18	15	3
	b	3	-	3	19	16	3	2	-	3	18	15	3
10	a	3	-	3	18	18	3	3	-	3	17	16	3
	b	3	-	3	18	18	3	3	-	3	17	16	3
11	a	3	-	3	18	15	3	3	-	3	19	15	3
	b	3	-	3	18	15	3	3	-	3	20	15	3
12	a	3	-	2	22	19	3	3	-	2	22	19	3
	b	3	-	2	22	19	3	3	-	2	22	19	3
13	a	3	-	3	19	26	3	3	-	3	18	19	3
	b	3	-	3	19	26	3	3	-	3	18	19	3
14	a	3	-	3	18	20	3	2	-	3	18	21	3
	b	3	-	3	18	20	3	2	-	3	18	21	3
15	a	3	-	3	19	26	3	2	-	3	18	24	3
	b	3	-	3	19	26	3	2	-	3	18	24	3
16	a	3	-	3	19	22	3	3	-	3	17	20	3
	b	3	-	3	19	22	3	3	-	3	17	20	3
17	a	3	-	3	19	18	3	3	-	3	17	16	3
	b	3	-	3	19	18	3	3	-	3	17	16	3
18	a	3	2	2	22	18	3	3	2	2	22	22	3
	b	3	2	2	22	18	3	3	2	2	22	20	3
19	a	3	1	3	21	19	3	3	1	3	21	20	3
	b	3	1	3	21	19	3	3	1	3	21	20	3
20	a	2	8	2	22	18	3	4	8	2	22	31	3
	b	2	8	2	22	18	3	4	8	2	22	31	3
A	a	12	4	-	-	-	-	12	3	-	-	-	-
	b	12	4	-	-	-	-	12	3	-	-	-	-
B	a	21	12	-	-	-	-	23	12	-	-	-	-
	b	21	12	-	-	-	-	23	12	-	-	-	-

Nr.= Laufende Nummer der *Y. enterocolitica* Stämme; AMC: Amoxicillin/Clavulansäure (3 µg); HHR: Hemmhofradius in mm; TIC: Ticarcillin (75 µg);

Syn a: Abstand Synergie horizontal; Syn b: Höhe Synergie vertikal; Syn Hof: Größe des Synergierings; Syn Form: 1: Ausbuchtung;; 2: Verbindung;

3: Blase; A: *E. coli*: DSM® 1103; B: *S. aureus*: DSM® 1104; C: *E. coli* ATCC® 35218; D: *Y. enterocolitica* 108-c 4/O:3

Ticarcillin (75 µg) und Amoxicillin/Clavulansäure (3 µg)													
	30 °C Bebrütungstemperatur							25 °C Bebrütungstemperatur					
Nr.	Ansatz	HHR TIC	HHR AMC	Syn Form	Syn a	Syn b	Syn Hof	HHR TIC	HHR AMC	Syn Form	Syn a	Syn b	Syn Hof
C	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	a	3	2	3	12	13	3	3	1	3	14	14	3
	b	3	2	3	12	13	3	3	1	3	14	14	3
21	a	3	1	2	22	20	3	4	1	2	22	23	3
	b	3	1	2	22	20	3	4	1	2	22	21	3
22	a	2	-	3	19	25	3	3	1	3	18	21	3
	b	2	-	3	19	25	3	3	1	3	18	21	3
23	a	4	2	3	20	31	3	3	1	3	21	30	3
	b	4	2	3	20	31	3	3	1	3	21	30	3
24	a	3	1	3	18	16	3	3	-	3	20	20	3
	b	3	1	3	18	16	3	3	-	3	20	20	3
25	a	2	-	3	16	15	3	2	-	3	20	19	3
	b	2	-	3	16	15	3	2	-	3	20	19	3
26	a	2	-	3	16	15	3	2	-	3	18	22	3
	b	2	-	3	16	15	3	2	-	3	18	22	3
27	a	3	1	3	20	18	3	2	-	3	21	25	3
	b	3	1	3	20	18	3	2	-	3	21	25	3
28	a	3	-	3	20	24	3	3	-	3	19	23	3
	b	3	-	3	20	24	3	3	-	3	19	23	3
29	a	3	-	2	22	26	3	2	-	3	20	26	3
	b	3	-	2	22	26	3	2	-	3	20	26	3
30	a	4	1	3	19	17	3	4	-	3	17	19	3
	b	4	1	3	19	17	3	4	-	3	17	19	3
31	a	3	-	3	16	24	3	5	-	3	17	24	3
	b	3	-	3	16	24	3	5	-	3	17	24	3
32	a	4	-	3	15	29	3	6	-	3	17	26	3
	b	4	-	3	16	30	3	6	-	3	17	26	3
33	a	5	6	2	22	19	3	5	7	2	22	29	3
	b	5	6	2	22	19	3	5	7	2	22	29	3
34	a	3	-	3	18	24	3	3	-	3	18	24	3
	b	3	-	3	18	24	3	3	-	3	18	24	3
35	a	4	-	3	19	24	3	4	1	3	18	23	3
	b	4	-	3	19	24	3	4	1	3	18	23	3
36	a	4	-	3	19	26	3	6	-	3	19	27	3
	b	4	-	3	19	26	3	6	-	3	19	27	3
37	a	4	1	3	19	26	3	4	1	3	19	26	3
	b	4	1	3	19	26	3	4	1	3	19	26	3
38	a	9	2	2	22	33	3	9	2	2	22	34	3
	b	9	2	2	22	33	3	9	2	2	22	34	3

Nr.= Laufende Nummer der *Y. enterocolitica* Stämme; AMC: Amoxicillin/Clavulansäure (3 µg); HHR: Hemmhofradius in mm; TIC: Ticarcillin (75 µg);
 Syn a: Abstand Synergie horizontal; Syn b: Höhe Synergie vertikal; Syn Hof: Größe des Synergierings ; Syn Form: 1: Ausbuchtung;; 2: Verbindung;
 3: Blase; A: *E. coli*: DSM® 1103; B: *S. aureus*: DSM® 1104; C: *E. coli* ATCC® 35218; D: *Y. enterocolitica* 108-c 4/O:3

Ticarcillin (75 µg) und Amoxicillin/Clavulansäure (3 µg)													
	30 °C Bebrütungstemperatur							25 °C Bebrütungstemperatur					
Nr.	Ansatz	HHR TIC	HHR AMC	Syn Form	Syn a	Syn b	Syn Hof	HHR TIC	HHR AMC	Syn Form	Syn a	Syn b	Syn Hof
39	a	4	2	2	22	33	3	4	1	3	19	21	3
	b	4	2	2	22	33	3	4	1	3	19	21	3
40	a	3	2	2	22	26	3	4	1	3	20	21	3
	b	3	2	2	22	26	3	4	1	3	20	21	3
A	a	12	4	-	-	-	-	12	3	-	-	-	-
	b	12	4	-	-	-	-	12	3	-	-	-	-
B	a	21	12	-	-	-	-	23	12	-	-	-	-
	b	21	12	-	-	-	-	23	12	-	-	-	-
C	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	a	3	2	3	12	13	3	3	1	3	14	14	3
	b	3	2	3	12	13	3	3	1	3	14	14	3
41	a	3	-	2	22	33	3	3	-	2	22	31	4
	b	3	-	2	22	33	3	3	-	2	22	31	4
42	a	4	-	3	18	18	3	3	-	3	17	23	3
	b	4	-	3	18	22	4	3	-	3	17	21	3
43	a	2	-	3	17	19	2	2	-	3	18	21	3
	b	2	-	3	17	19	2	2	-	3	18	21	3
44	a	2	1	2	19	20	3	3	-	3	18	18	3
	b	2	1	2	20	20	3	3	-	3	18	18	3
45	a	3	-	3	18	16	2	2	-	3	18	17	2
	b	3	-	3	18	16	2	2	-	3	18	17	2
46	a	2	-	3	17	19	3	2	-	3	19	19	2
	b	2	-	3	17	19	3	2	-	3	19	19	2
47	a	3	-	3	17	19	2	2	-	3	18	20	3
	b	3	-	3	17	19	2	2	-	3	18	20	3
48	a	3	1	2	21	19	3	2	-	3	20	18	3
	b	3	1	2	21	19	3	2	-	3	20	18	3
49	a	3	-	3	14	18	3	3	-	3	16	17	3
	b	3	-	3	14	18	3	3	-	3	16	22	3
50	a	4	-	3	19	20	3	3	-	3	18	20	3
	b	4	-	3	19	20	3	3	-	3	18	20	3
51	a	3	1	2	22	22	2	2	-	3	17	18	2
	b	3	1	2	22	19	2	2	-	3	17	18	2
52	a	3	-	3	18	21	3	3	-	3	18	18	3
	b	3	-	3	18	21	3	3	-	3	18	18	3
53	a	3	1	2	22	22	3	3	-	3	19	18	2
	b	3	1	2	22	22	3	3	-	3	19	18	2
54	a	2	1	2	22	16	3	3	1	2	22	21	3
	b	2	1	2	22	16	3	3	1	2	22	21	3

Nr.= Laufende Nummer der *Y. enterocolitica* Stämme; AMC: Amoxicillin/Clavulansäure (3 µg); HHR: Hemmhofradius in mm; TIC: Ticarcillin (75 µg);

Syn a: Abstand Synergie horizontal; Syn b: Höhe Synergie vertikal; Syn Hof: Größe des Synergierings ; Syn Form: 1: Ausbuchtung;; 2: Verbindung;

3: Blase; A: *E. coli*: DSM® 1103; B: *S. aureus*: DSM® 1104; C: *E. coli* ATCC® 35218; D: *Y. enterocolitica* 108-c 4/O:3

Ticarcillin (75 µg) und Amoxicillin/Clavulansäure (3 µg)													
	30 °C Bebrütungstemperatur							25 °C Bebrütungstemperatur					
Nr.	Ansatz	HHR TIC	HHR AMC	Syn Form	Syn a	Syn b	Syn Hof	HHR TIC	HHR AMC	Syn Form	Syn a	Syn b	Syn Hof
55	a	3	1	2	21	19	3	4	1	2	22	16	3
	b	3	1	2	22	18	3	4	1	2	21	16	3
56	a	4	-	3	22	20	3	3	-	3	19	19	3
	b	4	-	3	22	20	3	3	-	3	19	19	3
57	a	3	-	3	17	17	3	3	-	3	20	20	3
	b	3	-	3	17	17	3	3	-	3	18	18	3
58	a	3	1	2	22	21	3	3	1	2	22	20	3
	b	3	1	2	22	21	3	3	1	2	22	20	3
59	a	4	-	3	18	17	3	3	-	3	18	23	3
	b	4	-	3	18	17	3	3	-	3	18	23	3
60	a	4	-	3	19	19	3	3	-	3	18	29	3
	b	4	-	3	19	19	3	3	-	3	18	29	3
A	a	12	4	-	-	-	-	12	3	-	-	-	-
	b	12	4	-	-	-	-	12	3	-	-	-	-
B	a	21	12	-	-	-	-	23	12	-	-	-	-
	b	21	12	-	-	-	-	23	12	-	-	-	-
C	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	a	3	2	3	12	13	3	3	1	3	14	14	3
	b	3	2	3	12	13	3	3	1	3	14	14	3
61	a	3	-	3	14	16	3	3	-	3	17	18	3
	b	3	-	3	14	16	3	3	-	3	15	18	3
62	a	3	-	3	14	12	3	3	-	3	15	14	3
	b	3	-	3	14	12	3	3	-	3	15	14	3
63	a	2	-	3	15	16	3	2	-	3	16	16	3
	b	2	-	3	15	16	3	2	-	3	16	16	3
64	a	2	-	3	15	13	3	2	-	3	13	14	3
	b	2	-	3	15	14	3	2	-	3	13	14	3
65	a	3	-	3	22	24	3	3	-	3	21	23	3
	b	3	-	3	22	24	3	3	-	3	21	23	3
66	a	3	-	3	17	13	3	2	-	3	18	13	3
	b	3	-	3	17	13	3	2	-	3	18	13	3
67	a	3	-	3	19	14	3	2	-	3	18	15	3
	b	3	-	3	19	14	3	2	-	3	18	15	3
68	a	3	-	3	13	13	3	3	-	3	20	14	3
	b	3	-	3	13	13	3	3	-	3	20	14	3
69	a	4	2	2	22	25	3	3	2	3	22	35	3
	b4	4	2	2	22	24	3	3	2	3	22	35	3
70	a	3	-	2	22	23	3	4	-	2	22	24	3
	b	3	-	2	22	23	3	4	-	2	22	24	3

Nr.= Laufende Nummer der *Y. enterocolitica* Stämme; AMC: Amoxicillin/Clavulansäure (3 µg); HHR: Hemmhofradius in mm; TIC: Ticarcillin (75 µg);
 Syn a: Abstand Synergie horizontal; Syn b: Höhe Synergie vertikal; Syn Hof: Größe des Synergierings ; Syn Form: 1: Ausbuchtung;; 2: Verbindung;
 3: Blase; A: *E. coli*: DSM® 1103; B: *S. aureus*: DSM® 1104; C: *E. coli* ATCC® 35218; D: *Y. enterocolitica* 108-c 4/O:3

Ticarcillin (75 µg) und Amoxicillin/Clavulansäure (3 µg)													
	30 °C Bebrütungstemperatur							25 °C Bebrütungstemperatur					
Nr.	Ansatz	HHR TIC	HHR AMC	Syn Form	Syn a	Syn b	Syn Hof	HHR TIC	HHR AMC	Syn Form	Syn a	Syn b	Syn Hof
71	a	3	-	3	15	17	3	3	-	3	16	17	3
	b	3	-	3	15	17	3	3	-	3	16	17	3
72	a	2	-	3	16	14	3	2	-	3	17	13	3
	b	2	-	3	16	14	3	2	-	3	17	13	3
73	a	3	-	3	15	17	3	3	-	3	19	20	3
	b	3	-	3	15	17	3	3	-	3	19	20	3
74	a	2	-	3	17	14	3	2	-	3	17	13	3
	b	2	-	3	17	14	3	2	-	3	17	13	3
75	a	2	-	3	18	15	3	2	-	3	19	16	3
	b	2	-	3	18	14	3	2	-	3	19	16	3
76	a	3	-	3	16	13	3	2	-	3	16	16	3
	b	3	-	3	16	13	3	2	-	3	16	20	3
77	a	2	-	3	14	14	3	2	-	3	17	16	3
	b	2	-	3	14	14	3	2	-	3	17	16	3
78	a	3	-	3	16	14	3	2	-	3	17	16	3
	b	3	-	3	16	14	3	2	-	3	17	16	3
79	a	3	-	2	22	17	3	2	-	3	18	16	3
	b	3	-	2	21	17	3	2	-	3	18	16	3
80	a	3	-	3	19	19	3	2	-	3	20	16	3
	b	3	-	3	19	19	3	2	-	3	19	16	3
A	a	12	4	-	-	-	-	12	3	-	-	-	-
	b	12	4	-	-	-	-	12	3	-	-	-	-
B	a	21	12	-	-	-	-	23	12	-	-	-	-
	b	21	12	-	-	-	-	23	12	-	-	-	-
C	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	a	3	2	3	12	13	3	3	1	3	14	14	3
	b	3	2	3	12	13	3	3	1	3	14	14	3
81	a	3	-	3	17	17	3	2	-	3	15	17	3
	b	3	-	3	19	17	3	2	-	3	15	17	3
82	a	4	1	3	18	19	3	4	1	3	17	22	3
	b	4	1	3	18	20	3	4	1	3	17	22	3
83	a	3	1	3	21	20	3	3	-	3	21	21	3
	b	3	1	3	21	20	3	3	-	3	21	21	3
84	a	3	-	3	17	19	3	3	-	3	17	20	3
	b	3	-	3	17	19	3	3	-	3	17	20	3
85	a	4	2	2	22	21	3	5	2	2	22	21	3
	b	4	2	2	22	21	3	5	2	2	22	21	3
86	a	3	1	3	18	18	3	3	1	3	17	19	3
	b	3	1	3	18	18	3	3	1	3	17	19	3

Nr.= Laufende Nummer der *Y. enterocolitica* Stämme; AMC: Amoxicillin/Clavulansäure (3 µg); HHR: Hemmhofradius in mm; TIC: Ticarcillin (75 µg);

Syn a: Abstand Synergie horizontal; Syn b: Höhe Synergie vertikal; Syn Hof: Größe des Synergierings ; Syn Form: 1: Ausbuchtung;; 2: Verbindung;

3: Blase; A: *E. coli*: DSM® 1103; B: *S. aureus*: DSM® 1104; C: *E. coli ATCC*® 35218; D: *Y. enterocolitica* 108-c 4/O:3

Ticarcillin (75 µg) und Amoxicillin/Clavulansäure (3 µg)													
30 °C Bebrütungstemperatur								25 °C Bebrütungstemperatur					
Nr.	Ansatz	HHR TIC	HHR AMC	Syn Form	Syn a	Syn b	Syn Hof	HHR TIC	HHR AMC	Syn Form	Syn a	Syn b	Syn Hof
87	a	3	-	3	17	17	3	2	-	3	18	19	3
	b	3	-	3	17	17	3	2	-	3	18	19	3
88	a	4	-	3	17	17	3	3	-	3	18	19	3
	b	4	-	3	17	18	3	3	-	3	17	19	3
89	a	3	-	3	18	19	3	3	-	3	17	18	3
	b	3	-	3	18	19	3	3	-	3	17	18	3
90	a	4	-	3	18	20	3	3	-	3	18	21	3
	b	4	-	3	18	20	3	3	-	3	18	21	3
91	a	3	1	3	16	19	3	2	1	3	17	18	3
	b	3	1	3	16	19	3	2	1	3	17	18	3
92	a	3	-	3	21	18	3	3	-	3	20	18	3
	b	3	-	3	21	18	3	3	-	3	20	18	3
93	a	3	-	3	18	16	3	3	-	3	17	18	3
	b	3	-	3	18	16	3	3	-	3	17	18	3
94	a	5	-	1	12	13	3	7	-	1	14	20	3
	b	5	-	1	12	13	3	7	-	1	14	20	3
95	a	3	-	3	17	18	3	3	-	3	16	18	3
	b	3	-	3	17	18	3	3	-	3	16	18	3
96	a	3	-	3	19	18	3	4	-	3	18	16	3
	b	3	-	3	19	18	3	4	-	3	18	16	3
97	a	3	1	2	22	20	3	3	1	2	22	19	3
	b	3	1	2	22	20	3	3	1	2	22	19	3
98	a	3	7	2	22	15	3	3	8	2	22	19	3
	b	3	7	2	22	15	3	3	8	2	22	19	3
99	a	3	1	3	16	14	3	2	1	3	17	19	3
	b	3	1	3	16	14	3	2	1	3	17	19	3
100	a	3	-	3	19	18	3	3	-	3	18	20	3
	b	3	-	3	19	18	3	3	-	3	18	20	3
A	a	12	4	-	-	-	-	12	3	-	-	-	-
	b	12	4	-	-	-	-	12	3	-	-	-	-
B	a	21	12	-	-	-	-	23	12	-	-	-	-
	b	21	12	-	-	-	-	23	12	-	-	-	-
C	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	a	3	2	3	12	13	3	3	1	3	14	14	3
	b	3	2	3	12	13	3	3	1	3	14	14	3
101	a	3	2	2	22	16	3	3	1	3	21	17	3
	b	3	2	2	22	17	3	3	1	3	21	17	3
102	a	4	-	3	19	20	3	3	-	3	19	18	3
	b	4	-	3	18	18	3	3	-	3	19	18	3

Nr.= Laufende Nummer der *Y. enterocolitica* Stämme; AMC: Amoxicillin/Clavulansäure (3 µg); HHR: Hemmhofradius in mm; TIC: Ticarcillin (75 µg);
 Syn a: Abstand Synergie horizontal; Syn b: Höhe Synergie vertikal; Syn Hof: Größe des Synergierings ; Syn Form: 1: Ausbuchtung;; 2: Verbindung;
 3: Blase; A: *E. coli*: DSM® 1103; B: *S. aureus*: DSM® 1104; C: *E. coli* ATCC® 35218; D: *Y. enterocolitica* 108-c 4/O:3

Ticarcillin (75 µg) und Amoxicillin/Clavulansäure (3 µg)													
	30 °C Bebrütungstemperatur							25 °C Bebrütungstemperatur					
Nr.	Ansatz	HHR TIC	HHR AMC	Syn Form	Syn a	Syn b	Syn Hof	HHR TIC	HHR AMC	Syn Form	Syn a	Syn b	Syn Hof
103	a	3	-	3	18	17	3	2	-	3	19	19	3
	b	3	-	3	18	17	3	2	-	3	19	19	3
104	a	4	1	2	22	18	3	4	1	2	22	20	3
	b	4	1	2	22	20	3	4	1	2	22	21	3
105	a	3	-	2	22	17	3	2	-	3	20	16	3
	b	3	-	2	22	17	3	2	-	3	20	18	3
106	a	3	2	2	22	18	3	2	1	3	21	18	3
	b	3	2	2	22	19	3	2	1	3	21	19	3
107	a	3	-	3	20	19	3	3	-	3	20	19	3
	b	3	-	3	20	19	3	3	-	3	20	19	3
108	a	2	-	3	19	17	3	2	-	3	18	18	3
	b	2	-	3	19	17	3	2	-	3	18	18	3
109	a	2	-	3	17	17	3	2	-	3	18	19	3
	b	2	-	3	17	17	3	2	-	3	18	19	3
110	a	4	1	2	22	18	3	4	1	2	22	20	3
	b	4	1	2	22	18	3	4	1	2	22	20	3
111	a	4	1	2	22	17	3	3	1	2	22	19	3
	b	4	1	2	22	17	3	3	1	2	22	19	3
112	a	3	1	2	22	17	3	3	1	2	22	17	3
	b	3	1	2	22	18	3	3	1	2	22	17	3
113	a	3	1	2	22	16	3	2	1	2	22	19	3
	b	3	1	2	22	18	3	2	1	2	22	19	3
114	a	3	-	3	20	18	3	3	-	3	17	17	3
	b	3	-	3	20	18	3	3	-	3	17	19	3
115	a	3	-	3	17	17	3	3	-	3	16	18	3
	b	3	-	3	17	17	3	3	-	3	16	18	3
116	a	2	-	3	19	16	3	2	-	3	17	15	3
	b	2	-	3	19	16	3	2	-	3	17	15	3
117	a	3	-	3	17	15	3	2	-	3	18	17	3
	b	3	-	3	17	17	3	2	-	3	18	17	3
118	a	2	-	3	17	15	3	2	-	3	19	16	3
	b	2	-	3	17	17	3	2	-	3	19	16	3
119	a	2	1	2	22	16	3	2	1	2	22	17	3
	b	2	1	2	22	16	3	2	1	2	22	17	3
120	a	2	-	3	18	16	3	2	-	3	18	19	3
	b	2	-	3	18	16	3	2	-	3	18	19	3
A	a	12	4	-	-	-	-	12	3	-	-	-	-
	b	12	4	-	-	-	-	12	3	-	-	-	-
B	a	21	12	-	-	-	-	23	12	-	-	-	-
	b	21	12	-	-	-	-	23	12	-	-	-	-

Nr.= Laufende Nummer der *Y. enterocolitica* Stämme; AMC: Amoxicillin/Clavulansäure (3 µg); HHR: Hemmhofradius in mm; TIC: Ticarcillin (75 µg);
 Syn a: Abstand Synergie horizontal; Syn b: Höhe Synergie vertikal; Syn Hof: Größe des Synergierings ; Syn Form: 1: Ausbuchtung;; 2: Verbindung;
 3: Blase; A: *E. coli*: DSM® 1103; B: *S. aureus*: DSM® 1104; C: *E. coli* ATCC® 35218; D: *Y. enterocolitica* 108-c 4/O:3

		Ticarcillin (75 µg) und Amoxicillin/Clavulansäure (3 µg)											
		30 °C Bebrütungstemperatur						25 °C Bebrütungstemperatur					
Nr.	Ansatz	HHR TIC	HHR AMC	Syn Form	Syn a	Syn b	Syn Hof	HHR TIC	HHR AMC	Syn Form	Syn a	Syn b	Syn Hof
C	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	a	3	2	3	12	13	3	3	1	3	14	14	3
	b	3	2	3	12	13	3	3	1	3	14	14	3
121	a	3	-	3	19	16	2	2	-	3	18	17	3
	b	3	-	3	19	16	2	2	-	3	18	17	3
122	a	2	-	3	18	14	3	2	-	3	19	15	3
	b	2	-	3	18	16	3	2	-	3	19	15	3
123	a	2	-	3	18	14	3	3	-	3	16	18	3
	b	2	-	3	18	14	3	3	-	3	16	16	3
124	a	3	-	3	18	20	3	3	-	3	17	16	3
	b	3	-	3	17	20	3	3	-	3	17	16	3
125	a	3	-	3	16	13	3	3	-	3	15	15	3
	b	3	-	3	16	13	3	3	-	3	15	15	3
126	a	4	-	3	19	19	3	3	-	3	18	20	3
	b	4	-	3	19	19	3	3	-	3	18	20	3
127	a	2	-	3	19	15	3	2	-	3	15	15	3
	b	2	-	3	19	15	3	2	-	3	15	15	3
128	a	2	-	3	18	15	3	2	-	3	19	14	3
	b	2	-	3	18	15	3	2	-	3	19	14	3
129	a	2	-	3	17	15	3	2	-	3	18	17	3
	b	2	-	3	17	15	3	2	-	3	18	17	3
130	a	2	-	3	17	16	3	2	-	3	16	13	3
	b	2	-	3	18	14	3	2	-	3	16	13	3
131	a	2	-	3	1	18	3	2	-	3	20	16	3
	b	2	-	3	18	18	3	2	-	3	20	16	3
132	a	4	-	3	20	20	3	2	-	3	17	20	3
	b	4	-	3	20	20	3	2	-	3	17	20	3
133	a	3	-	3	21	16	2	2	-	3	17	16	3
	b	3	-	3	21	15	2	2	-	3	17	16	3
134	a	2	-	3	20	17	3	2	-	3	17	18	3
	b	2	-	3	20	17	3	2	-	3	17	18	3
135	a	2	-	3	20	17	3	2	-	3	20	18	3
	b	2	-	3	20	16	3	2	-	3	20	18	3
136	a	3	-	3	22	19	3	2	-	3	19	15	3
	b	3	-	3	22	16	3	2	-	3	19	17	3
137	a	4	-	3	22	19	4	3	-	3	18	18	3
	b	4	-	3	22	19	4	3	-	3	18	18	3
138	a	3	-	3	16	10	3	2	-	3	15	12	3
	b	3	-	3	16	13	3	2	-	3	15	12	3

Nr.= Laufende Nummer der *Y. enterocolitica* Stämme; AMC: Amoxicillin/Clavulansäure (3 µg); HHR: Hemmhofradius in mm; TIC: Ticarcillin (75 µg);

Syn a: Abstand Synergie horizontal; Syn b: Höhe Synergie vertikal; Syn Hof: Größe des Synergierings ; Syn Form: 1: Ausbuchtung;; 2: Verbindung;

3: Blase; A: *E. coli*: DSM® 1103; B: *S. aureus*: DSM® 1104; C: *E. coli* ATCC® 35218; D: *Y. enterocolitica* 108-c 4/O:3

		Ticarcillin (75 µg) und Amoxicillin/Clavulansäure (3 µg)											
		30 °C Bebrütungstemperatur						25 °C Bebrütungstemperatur					
Nr.	Ansatz	HHR TIC	HHR AMC	Syn Form	Syn a	Syn b	Syn Hof	HHR TIC	HHR AMC	Syn Form	Syn a	Syn b	Syn Hof
139	a	3	-	3	19	15	3	2	-	3	19	16	3
	b	3	-	3	19	15	3	2	-	3	19	16	3
140	a	2	-	3	17	17	3	2	-	3	15	16	3
	b	2	-	3	17	16	3	2	-	3	15	15	3
A	a	12	4	-	-	-	-	12	3	-	-	-	-
	b	12	4	-	-	-	-	12	3	-	-	-	-
B	a	21	12	-	-	-	-	23	12	-	-	-	-
	b	21	12	-	-	-	-	23	12	-	-	-	-
C	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	a	3	2	3	12	13	3	3	1	3	14	14	3
	b	3	2	3	12	13	3	3	1	3	14	14	3
141	a	2	-	3	17	18	3	2	-	3	16	19	3
	b	2	-	3	17	18	3	2	-	3	16	19	3
142	a	2	-	3	19	16	3	2	-	3	17	19	3
	b	2	-	3	19	16	3	2	-	3	17	19	3
143	a	3	-	3	15	17	3	2	-	3	17	19	3
	b	3	-	3	15	17	3	2	-	3	17	19	3
144	a	3	1	3	20	17	3	3	1	3	16	17	3
	b	3	1	3	20	17	3	3	1	3	16	17	3
145	a	2	1	3	18	16	3	2	1	3	16	15	3
	b	2	1	3	18	16	3	2	1	3	16	15	3
146	a	2	-	3	17	15	3	2	-	3	16	15	3
	b	2	-	3	17	16	3	2	-	3	16	15	3
147	a	3	1	3	18	17	4	3	-	3	18	18	4
	b	3	1	3	18	17	4	3	-	3	18	17	4
148	a	2	-	3	18	19	3	2	-	3	17	16	3
	b	2	-	3	18	19	3	2	-	3	17	16	3
149	a	4	-	3	16	16	4	2	-	3	16	16	4
	b	4	-	3	16	18	4	2	-	3	16	16	4
150	a	3	2	2	22	18	3	2	1	3	18	18	3
	b	3	2	2	22	17	3	2	1	3	18	18	3
151	a	3	-	3	18	12	3	3	-	3	16	16	3
	b	3	-	3	18	12	3	3	-	3	16	16	3
152	a	3	1	3	16	12	3	2	1	3	14	12	3
	b	3	1	3	16	12	3	2	1	3	14	12	3
153	a	3	2	3	18	16	3	3	2	3	17	18	3
	b	3	2	3	18	16	3	3	2	3	17	17	3
154	a	2	1	3	11	9	3	2	-	3	12	8	3
	b	2	1	3	11	9	3	2	-	3	12	8	3

Nr.= Laufende Nummer der *Y. enterocolitica* Stämme; AMC: Amoxicillin/Clavulansäure (3 µg); HHR: Hemmhofradius in mm; TIC: Ticarcillin (75 µg);

Syn a: Abstand Synergie horizontal; Syn b: Höhe Synergie vertikal; Syn Hof: Größe des Synergierings; Syn Form: 1: Ausbuchtung;; 2: Verbindung;

3: Blase; A: *E. coli*: DSM® 1103; B: *S. aureus* DSM® 1104; C: *E. coli* ATCC® 35218; D: *Y. enterocolitica* 108-c 4/O:3

Ticarcillin (75 µg) und Amoxicillin/Clavulansäure (3 µg)													
30 °C Bebrütungstemperatur								25 °C Bebrütungstemperatur					
Nr.	Ansatz	HHR TIC	HHR AMC	Syn Form	Syn a	Syn b	Syn Hof	HHR TIC	HHR AMC	Syn Form	Syn a	Syn b	Syn Hof
155	a	2	-	3	15	14	3	2	-	3	13	10	3
	b	2	-	3	15	14	3	2	-	3	13	10	3
156	a	2	1	3	13	9	3	2	-	3	14	14	3
	b	2	1	3	13	9	3	2	-	3	14	14	3
157	a	3	-	3	17	13	3	2	-	3	15	14	3
	b	3	-	3	17	13	3	2	-	3	15	14	3
158	a	3	-	3	16	12	3	2	-	3	17	16	3
	b	3	-	3	16	12	3	2	-	3	17	16	3
159	a	3	1	3	17	13	3	2	-	3	18	13	3
	b	3	1	3	17	13	3	2	-	3	17	13	3
160	a	3	1	3	15	12	3	2	1	3	16	15	3
	b	3	1	3	15	13	3	2	1	3	16	15	3
A	a	12	4	-	-	-	-	12	3	-	-	-	-
	b	12	4	-	-	-	-	12	3	-	-	-	-
B	a	21	12	-	-	-	-	23	12	-	-	-	-
	b	21	12	-	-	-	-	23	12	-	-	-	-
C	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	a	3	2	3	12	13	3	3	1	3	14	14	3
	b	3	2	3	12	13	3	3	1	3	14	14	3
161	a	3	-	3	17	16	3	2	-	3	17	18	3
	b	3	-	3	17	18	3	2	-	3	17	19	3
162	a	3	-	3	18	16	3	2	-	3	15	18	3
	b	3	-	3	18	16	3	2	-	3	15	18	3
163	a	3	-	3	19	15	3	2	-	3	17	17	3
	b	3	-	3	19	15	3	2	-	3	17	17	3
164	a	4	-	3	17	16	3	3	-	3	18	19	3
	b	4	-	3	17	17	3	3	-	3	18	19	3
165	a	2	-	3	18	17	4	3	-	3	17	16	3
	b	2	-	3	18	17	4	3	-	3	17	16	3
166	a	3	-	3	21	23	3	2	-	3	18	24	3
	b	3	-	3	21	23	3	2	-	3	18	24	3
167	a	2	-	3	19	14	3	2	-	3	18	16	3
	b	2	-	3	18	14	3	2	-	3	18	16	3
168	a	3	-	3	18	15	3	2	-	3	18	16	3
	b	3	-	3	18	16	3	2	-	3	18	16	3
169	a	2	-	3	16	14	3	2	-	3	16	17	3
	b	2	-	3	16	14	3	2	-	3	16	17	3
170	a	2	-	3	18	17	3	2	-	3	17	16	3
	b	2	-	3	18	17	3	2	-	3	17	16	3

Nr.= Laufende Nummer der *Y. enterocolitica* Stämme; AMC: Amoxicillin/Clavulansäure (3 µg); HHR: Hemmhofradius in mm; TIC: Ticarcillin (75 µg);
 Syn a: Abstand Synergie horizontal; Syn b: Höhe Synergie vertikal; Syn Hof: Größe des Synergierings ; Syn Form: 1: Ausbuchtung;; 2: Verbindung;
 3: Blase; A: *E. coli*: DSM® 1103; B: *S. aureus*: DSM® 1104; C: *E. coli* ATCC® 35218; D: *Y. enterocolitica* 108-c 4/O:3

Ticarcillin (75 µg) und Amoxicillin/Clavulansäure (3 µg)													
	30 °C Bebrütungstemperatur							25 °C Bebrütungstemperatur					
Nr.	Ansatz	HHR TIC	HHR AMC	Syn Form	Syn a	Syn b	Syn Hof	HHR TIC	HHR AMC	Syn Form	Syn a	Syn b	Syn Hof
171	a	2	-	3	17	15	3	2	-	3	16	19	3
	b	2	-	3	17	17	3	2	-	3	17	16	3
172	a	3	-	3	18	19	3	3	-	3	16	17	3
	b	3	-	3	18	19	3	3	-	3	16	17	3
173	a	3	2	3	17	18	3	3	2	3	16	19	3
	b	3	2	3	17	18	3	3	2	3	16	19	3
174	a	2	-	3	17	15	3	2	-	3	17	18	3
	b	2	-	3	17	15	3	2	-	3	17	18	3
175	a	3	2	2	22	19	3	3	1	2	22	21	3
	b	3	2	2	22	19	3	3	1	2	22	21	3
176	a	3	-	3	20	21	3	4	-	3	18	20	3
	b	3	-	3	20	21	3	4	-	3	18	20	3
177	a	2	-	3	17	16	3	2	-	3	20	20	3
	b	2	-	3	17	16	3	2	-	3	20	20	3
178	a	2	1	3	18	14	3	2	-	3	16	17	3
	b	2	1	3	18	14	3	2	-	3	16	16	3
179	a	2	-	3	16	17	3	2	-	3	16	19	3
	b	2	-	3	16	17	3	2	-	3	16	19	3
180	a	2	-	3	16	19	3	3	-	3	17	19	3
	b	2	-	3	16	19	3	3	-	3	17	20	3
A	a	12	4	-	-	-	-	12	3	-	-	-	-
	b	12	4	-	-	-	-	12	3	-	-	-	-
B	a	21	12	-	-	-	-	23	12	-	-	-	-
	b	21	12	-	-	-	-	23	12	-	-	-	-
C	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	a	3	2	3	12	13	3	3	1	3	14	14	3
	b	3	2	3	12	13	3	3	1	3	14	14	3
181	a	2	-	3	17	16	3	2	-	3	16	22	3
	b	2	-	3	17	16	3	2	-	3	16	22	3
182	a	2	-	3	17	18	3	2	-	3	16	18	3
	b	2	-	3	17	18	3	2	-	3	16	18	3
183	a	2	-	3	19	19	3	2	-	3	17	20	3
	b	2	-	3	19	19	3	2	-	3	17	20	3
184	a	2	-	3	16	18	3	2	-	3	16	17	3
	b	2	-	3	16	18	3	2	-	3	16	17	3
185	a	2	1	3	17	18	3	2	-	3	17	16	3
	b	2	1	3	17	18	3	2	-	3	17	16	3
186	a	2	-	3	17	17	3	3	-	3	18	21	3
	b	2	-	3	17	17	3	3	-	3	18	21	3

Nr.= Laufende Nummer der *Y. enterocolitica* Stämme; AMC: Amoxicillin/Clavulansäure (3 µg); HHR: Hemmhofradius in mm; TIC: Ticarcillin (75 µg);
 Syn a: Abstand Synergie horizontal; Syn b: Höhe Synergie vertikal; Syn Hof: Größe des Synergierings ; Syn Form: 1: Ausbuchtung;; 2: Verbindung;
 3: Blase; A: *E. coli*: DSM® 1103; B: *S. aureus*: DSM® 1104; C: *E. coli* ATCC® 35218; D: *Y. enterocolitica* 108-c 4/O:3

Ticarcillin (75 µg) und Amoxicillin/Clavulansäure (3 µg)													
30 °C Bebrütungstemperatur								25 °C Bebrütungstemperatur					
Nr.	Ansatz	HHR TIC	HHR AMC	Syn Form	Syn a	Syn b	Syn Hof	HHR TIC	HHR AMC	Syn Form	Syn a	Syn b	Syn Hof
187	a	2	-	3	18	18	3	2	-	3	17	20	3
	b	2	-	3	18	18	3	2	-	3	17	20	3
188	a	2	-	3	17	18	3	3	-	3	18	20	3
	b	2	-	3	17	18	3	3	-	3	18	20	3
189	a	2	-	3	17	16	3	2	-	3	16	16	3
	b	2	-	3	17	16	3	2	-	3	16	16	3
190	a	1	-	3	19	18	3	-	-	3	17	18	3
	b	1	-	3	19	16	3	-	-	3	17	18	3
191	a	2	-	3	16	12	3	3	-	3	9	13	3
	b	2	-	3	16	12	3	3	-	3	9	13	3
192	a	2	-	3	14	12	3	2	-	3	14	13	3
	b	2	-	3	14	12	3	2	-	3	14	13	3
193	a	3	-	3	17	15	3	2	-	3	17	12	3
	b	3	-	3	17	15	3	2	-	3	17	12	3
194	a	2	1	3	17	13	3	2	-	3	16	16	3
	b	2	1	3	17	13	3	2	-	3	16	16	3
195	a	2	-	3	19	14	3	1	-	3	11	14	3
	b	2	-	3	19	14	3	1	-	3	11	14	3
196	a	2	1	3	14	12	3	2	-	3	15	14	3
	b	2	1	3	14	12	3	2	-	3	15	14	3
197	a	2	-	3	17	15	3	2	-	3	18	16	3
	b	2	-	3	17	15	3	2	-	3	18	16	3
198	a	3	5	2	22	16	3	2	6	2	22	16	3
	b	3	5	2	22	16	3	2	6	2	22	16	3
199	a	3	1	2	22	13	3	3	-	3	21	16	3
	b	3	1	2	22	14	3	3	-	3	21	16	3
200	a	2	-	3	8	9	3	2	-	3	10	11	3
	b	2	-	3	8	9	3	2	-	3	10	11	3
A	a	12	4	-	-	-	-	12	3	-	-	-	-
	b	12	4	-	-	-	-	12	3	-	-	-	-
B	a	21	12	-	-	-	-	23	12	-	-	-	-
	b	21	12	-	-	-	-	23	12	-	-	-	-
C	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	a	3	2	3	12	13	3	3	1	3	14	14	3
	b	3	2	3	12	13	3	3	1	3	14	14	3

Nr.= Laufende Nummer der *Y. enterocolitica* Stämme; AMC: Amoxicillin/Clavulansäure (3 µg); HHR: Hemmhofradius in mm; TIC: Ticarcillin (75 µg);

Syn a: Abstand Synergie horizontal; Syn b: Höhe Synergie vertikal; Syn Hof: Größe des Synergierings; Syn Form: 1: Ausbuchtung;; 2: Verbindung;

3: Blase; A: *E. coli*: DSM® 1103; B: *S. aureus*: DSM® 1104; C: *E. coli* ATCC® 35218; D: *Y. enterocolitica* 108-c 4/O:3

Tabelle 26: Vorkommen *blaA*- und *blaB*-Gene bei den untersuchten *Y. enterocolitica* 4/O:3 Stämme

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

BlaA: β -Laktamase A; BlaB: β -Laktamase B; Nr.= Laufende Nummer der *Y. enterocolitica* Stämme;

ja: Gen vorhanden; nein: Gen nicht vorhanden

12. DANKSAGUNG

Besonders bedanken möchte ich mich allen voran bei **Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. mult. A. Stolle** für die freundliche Aufnahme am Institut und der Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie der Schaffung des nötigen Freiraumes zur Anfertigung dieser Arbeit.

Ganz herzlich danken möchte ich **Frau Dr. C. Meyer** für die Aufnahme in ihr Forschungsprojekt, die intensive Betreuung, die zahlreichen Ratschläge und hilfreichen Anregungen und nicht zuletzt für die geduldige Korrektur der Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bei **Frau Dr. M. Frederiksson-Ahomaa** und **Frau Dr. E. Stüber** für die immer gewährte Hilfe und kompetente Betreuung sowie für die intensive Einarbeitung in die Molekularbiologie bedanken. Bedanken möchte ich mich ebenso für die schnelle Korrektur dieser Arbeit.

Ein ganz besonderes Dankeschön an **Frau H. Dietz**, **Frau S. Holzmann**, **Frau M. Gross** und **Frau I. Fitzek** für ihre stetig gewährte Hilfsbereitschaft, besonders während der hektischen Phase dieser Arbeit sowie für die nette Arbeitsatmosphäre und die vielen aufmunternden Worte und Ratschläge.

Einen besonderen Dank möchte ich an **Frau Dr. S. Wacheck** und **Frau Dr. B. Sperner** sowie **Frau Dr. C. Finke** und allen **Kolleginnen des Instituts** für ihre großzügige Unterstützung und ihre Bereitschaft zur Hilfestellung sowie für die viele freie Zeit besonders in der hektischen Endphase dieser Arbeit richten. Ein großes Dankeschön an **Frau Dr. S. Wacheck** und **Dr. M. Frederiksson-Ahomaa** für die Anfertigung der Summary.

Mein Dank gilt **Herrn Prof. Dr. Dr. Heesemann** und **Frau Dr. E. Schriefer** vom Max von Pettenkoferinstitut, München für die großzügige zur Verfügungsstellung von Referenzstämmen. Dieser Dank gilt auch **Frau Dr. Doenitz** für ihre nette und kompetente Hilfsbereitschaft bei der Wahl eines geeigneten Referenzstammes.

Danke an meine Freundinnen **Frau K. Waldecker** und **Frau P. Kepper** für die vielen Jahre ihrer Unterstützung und der Bestärkung zur Aufnahme meines Studiums, sowie an **Frau M. Dobler** für ihre Aufmunterung während der Arbeit und die Ablenkung durch viele nette Frühstücke.

Mein größter Dank gilt meiner **Familie** für ihre stetige Unterstützung und den Glauben an meine Fähigkeiten, besonders wenn ich ihn selbst nicht aufbringen konnte. Besonders Danken möchte ich meinen **Eltern** für ihre Geduld und Unterstützung, besonders in Form von stetiger Telefonseelsorge seit Beginn meines Studiums. Danken möchte ich ganz besonders meiner **Schwester S. Bonke** für ihre Geduld, ihre Hilfe bei der graphischen Gestaltung einiger Teile dieser Arbeit, die Korrektur dieser Arbeit sowie für die vielen Nerven, die sie während des Studiums und der Anfertigung dieser Arbeit aufbringen musste. Nicht zuletzt möchte ich mich ganz herzlich und besonders bei meinem Bruder **M.-A. Bonke** für seine gern geleistete Hilfe und Unterstützung bedanken, ohne die die Beendigung meines Studiums und somit die Anfertigung dieser Arbeit nie möglich gewesen wäre. Nicht vergessen möchte ich meine **Schwester R. Walgenbach und ihrer Familie** einfach dafür, dass sie da sind.

Mein besonderer Dank gilt **Herrn Dr. T. Rothmann**, der vor langer Zeit den Stein erst ins Rollen brachte. Danke.

13. LEBENS LAUF

Name: Rebecca Bonke
Geburtsdatum: 16. August 1977
Geburtsort: Warstein
Eltern: Wilfried Bonke, Stahl- und Maschinenbauschlosser
 Ingrid Bonke (geb. Buddeus), Einzelhandelskauffrau

Ausbildung

1984-1988 Grundschole, R then
 1988-1994 Maximilian-Kolbe-Hauptschole, R then
 1994-1997 Archi-Gymnasium, Soest
 1997-1999 Berufskolleg Olsberg, Staatl. Berufsfachschule für BTA
 10/2002-03/2008 Studium der Tiermedizin an der tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
 2003-2007 verschiedene Praktika
 03/2008 Tier rztliches Staatsexamen
 05/2008 Approbation als Tierärztin

Berufliche Tätigkeit

1999-2002 Beschäftigung als BTA bei der Firma Qiagen, Hilden
 2005-2008 Studentische Hilfskraft am Institut für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs des Veterinär-wissenschaftlichen Departments der tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
 05/2008 Beginn der Doktorarbeit am Institut für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs des Veterin rwissenschaftlichen Departments der tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
 seit 05/2008 Technische Assistentin am Institut für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs des Veterin rwissenschaftlichen Departments der tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München