



**KAREN SCHLEZ**

**BESTIMMUNG DER ANTIBIOTIKAEMPFINDLICHKEIT  
BEI *BRACHYSPIRA* SPP.-STÄMMEN  
VON DEUTSCHEN MASTSCHWEINEN  
AUS DEN JAHREN 2003 - 2005**

**INAUGURAL-DISSERTATION** zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**



**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2011

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2011

© 2011 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

---

Bestimmung der Antibiotikaempfindlichkeit  
bei *Brachyspira* spp.-Stämmen  
von deutschen Mastschweinen  
aus den Jahren 2003 - 2005

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

---

Eingereicht von  
**Karen Schlez**  
**Tierärztin aus Heidelberg**  
Giessen, 2011

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Dekan: Prof. Dr. M. Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer  
Prof. Dr. Dr. habil. G. Reiner

Tag der Disputation: 12.01.2011

*Meinem Mann Wolfgang Schlez, der mir allseits zur Seite gestanden hat und steht.*

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Poster:

Tagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Fachgruppe Bakteriologie und Mykologie in Wetzlar, 15. – 17.06.2006

**„Bestimmung der Antibiotikaresistenz bei *Brachyspira* spp.-Isolaten von Mastschweinen aus Deutschland“**

Karen Schlez, Werner Herbst, Georg Baljer

Drittmittelforschung am Fachbereich Veterinärmedizin, Wissenschaftliche Tagung im Rahmen der 400-Jahr-Feier der Justus-Liebig-Universität Giessen am 20.10.2007

**„Die Beteiligung von *Brachyspira hyodysenteriae* am Durchfallgeschehen des Schweines und Antibiotikaempfindlichkeit von *Brachyspira* spp.- Isolaten“**

Werner Herbst, Karen Schlez, Jörg Heuser, Georg Baljer

Vortrag:

4th Conference on Intestinal Spirochetes in Prag, Tschechische Republik, Mai 2007

**Detection rates by PCR of *Brachyspira hyodysenteriae* in German pigs and antimicrobial susceptibility of *Brachyspira* species isolates**

Werner Herbst, Karen Schlez, Jörg Heuser, Georg Baljer

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
<b>Verzeichnis der Abkürzungen .....</b>	<b>IV</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Schrifttum .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Erreger der Dysenterie .....</b>	<b>3</b>
2.1.1 Veterinärmedizinische Bedeutung von <i>Brachyspira</i> .....	4
2.1.2 Diagnostik und Speziesdifferenzierung von porcinen <i>Brachyspira</i> .....	7
2.1.2.1 Kultureller Nachweis von <i>Brachyspira</i> .....	8
2.1.2.2 Molekularbiologische Methoden zum Nachweis von <i>Brachyspira</i> .....	9
<b>2.2 Therapie der Dysenterie .....</b>	<b>10</b>
2.2.1 Zur Therapie verwendete Wirkstoffe und deren Wirkmechanismus .....	10
2.2.2 Aktuelle Daten zur Wirksamkeit beim Schwein.....	12
<b>2.3 Antibiotikaresistenz .....</b>	<b>15</b>
2.3.1 Mechanismen der Antibiotikaresistenz.....	15
2.3.2 Mechanismen der Antibiotikaresistenzen bei <i>Brachyspira</i> spp. ....	18
2.3.2.1 Resistenz gegenüber Tylosin und Lincosamiden .....	18
2.3.2.2 Resistenz gegen Pleuromutiline (Tiamulin, Valnemulin) .....	19
2.3.3 Methoden zum Nachweis der Antibiotikaempfindlichkeit von <i>Brachyspira</i> .....	20
2.3.3.1 Der Agardiffusionstest .....	20
2.3.3.2 Dilutionsmethoden .....	21
2.3.3.3 Bewertung.....	22
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>25</b>
<b>3.1 Material.....</b>	<b>25</b>
3.1.1 Bakterienstämme .....	25
3.1.2 Herkunft der Proben.....	26
<b>3.2 Kulturell-bakteriologische Methoden.....</b>	<b>26</b>
3.2.1 Kulturelle Untersuchung von Tupferproben auf <i>Brachyspira</i> spp.....	26
3.2.2 Kulturelle Untersuchung von Kotproben auf <i>Brachyspira</i> spp.....	27
3.2.3 Dunkelfeldmikroskopie .....	27
3.2.4 Anzüchtung von <i>Brachyspira</i> und Gewinnung von Reinkulturen .....	27
3.2.5 Herstellung von <i>Brachyspira</i> suspensionen .....	28
3.2.6 Archivierung von <i>Brachyspira</i> spp.-Isolaten.....	28
3.2.7 Biochemische Charakterisierung .....	28
3.2.8 Keimzahlbestimmungen.....	29
<b>3.3 Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>30</b>
3.3.1 Präparation von DNS aus Bakterienkulturen .....	30



3.3.2	Präparation von DNS aus Kotproben .....	30
3.3.3	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	30
3.3.4	Primer .....	31
3.3.5	Agarosegelelektrophorese .....	31
3.3.6	Speziesbestimmung mittels PCR-RFLP-Analyse.....	32
<b>3.4</b>	<b>Prüfung der Antibiotikaempfindlichkeit der Brachyspiren-Isolate im Agardilutions- und Mikrobouillondilutionstest.....</b>	<b>32</b>
3.4.1	Antibiotika .....	32
3.4.2	Antibiotika-Stammlösungen.....	33
3.4.3	Agardilutionstest (ADT) .....	33
3.4.4	Mikrobouillondilutionstest (MBDT).....	34
3.4.4.1	Geprüfte Antibiotikakonzentrationen.....	34
3.4.4.2	Durchführung des Mikrobouillondilutionstests .....	35
3.4.5	Bewertung der Ergebnisse .....	36
3.4.5.1	Definitionen der $MHK_{50}$ - und $MHK_{90}$ -Werte.....	36
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>37</b>
<b>4.1</b>	<b>Diagnostische Untersuchungen .....</b>	<b>37</b>
4.1.1	Ergebnisse der Dunkelfeldmikroskopie und kulturellen Untersuchungen .....	37
4.1.2	Herkunft der Brachyspiren-Isolate .....	38
4.1.3	Molekularbiologische Charakterisierung der <i>Brachyspira</i> -Feldisolate.....	39
4.1.4	Phänotypische Charakterisierung der <i>Brachyspira</i> -Feldisolate.....	40
<b>4.2</b>	<b>Antibiotikaempfindlichkeitsprüfungen.....</b>	<b>42</b>
4.2.1	Etablierung eines Mikrobouillondilutionstests für die Antibiotikaempfindlichkeitsprüfung von Brachyspiren .....	42
4.2.1.1	Vergleich der Ergebnisse des etablierten MBDT anhand der Untersuchung verschiedener Kontrollstämmen von <i>B. hyodysenteriae</i> mit bekannten $MHK$ -Werten <sup>1)</sup> .....	42
4.2.1.2	Reproduzierbarkeit des Mikrobouillondilutionstests.....	42
4.2.1.3	Einfluss der <i>in vitro</i> -Passagezahl auf die $MHK$ -Werte .....	43
4.2.2	Antibiotikaempfindlichkeit von <i>B. spp.</i> Feldisolaten im Agardilutionstest .....	44
4.2.2.1	Tiamulin.....	45
4.2.2.2	Valnemulin.....	45
4.2.2.3	Tylosin.....	47
4.2.2.4	Lincomycin .....	49
4.2.2.5	Vergleichende Darstellung der im ADT erzielten $MHK_{90}$ -Werte der Antibiotika gegenüber den <i>Brachyspira spp.</i> -Isolaten .....	50
4.2.2.6	Zusammenfassende Beurteilung der Ergebnisse der $MHK$ -Wert-Prüfung im ADT im Hinblick auf die Antibiotikaresistenz der <i>Brachyspira spp.</i> -Isolate.....	50
4.2.3	$MHK$ -Wert-Bestimmung im Mikrobouillondilutionstest (MBDT) .....	53
4.2.3.1	Tiamulin.....	53
4.2.3.2	Valnemulin.....	54
4.2.3.3	Tylosin.....	55
4.2.3.4	Lincomycin .....	56
4.2.3.5	Vergleichende Darstellung der im MBDT erzielten $MHK_{90}$ -Werte der Antibiotika gegenüber den <i>Brachyspira spp.</i> -Isolaten .....	57
4.2.4	Gegenüberstellung der im ADT und MBDT ermittelten $MHK_{50}$ - und $MHK_{90}$ -Werte von Tylosin, Lincomycin, Tiamulin und Valnemulin gegenüber den verschiedenen <i>B. spp.</i> .....	57

---

4.2.5	Gegenüberstellung der vergleichend im ADT und im MBDT ermittelten Antibiotikaempfindlichkeit (empfindlich, intermediär, resistent) der untersuchten <i>B. spp.</i> .....	58
<b>5</b>	<b>Besprechung der Ergebnisse</b> .....	<b>61</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>67</b>
	<b>Summary</b> .....	<b>69</b>
<b>7</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>71</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>81</b>
<b>9</b>	<b>Abbildungen und Tabellen</b> .....	<b>82</b>
<b>9.1</b>	<b>Abbildungen</b> .....	<b>82</b>
<b>9.2</b>	<b>Tabellen</b> .....	<b>83</b>
	<b>Danksagung</b> .....	<b>85</b>

## Verzeichnis der Abkürzungen

A. dest.	Aqua destillata
ADT	Agardilutionstest
AIS	aviäre intestinale Spirochätose
ATCC	American Type Culture Collection
<i>B.</i>	<i>Brachyspira</i>
BHI	Brain heart infusion broth
BHIF	Brain heart infusion broth mit 20 % fetalem Kälberserum
<i>B. hyo</i>	<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CLSI (ehem. NCCLS)	The Clinical and Laboratory Standards Institute National Committee of Clinical Laboratory Standards)
d	Tag
DE-Suspension	Diatomaceous Earth-Suspension
d. h.	das heisst
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
E	empfindlich
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fa.	Firma
FBS	fetal bovine serum (fetales Rinderserum)
g	Gramm
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GuSCN	Guanidinthiocyanat
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HIS	humane intestinale Spirochätose
I	intermediär
k. A.	keine Angaben
kg	Kilogramm
M	Molar
MBDT	Mikrobouillondilutionstest
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid

---

MHB	Müller-Hinton-Bouillon
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MHK <sub>50</sub>	Minimale Hemmkonzentration, die 50 % der Bakterienisolate im Wachstum hemmt
MHK <sub>90</sub>	Minimale Hemmkonzentration, die 90 % der Bakterienisolate im Wachstum hemmt
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
n. a.	neben anderem
n. b.	nicht bestimmt
n. u.	nicht untersucht
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamid-Dehydrogenase
<i>nox</i>	NADH-Oxidase-Gen
n. u.	nicht untersucht
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PBS	phosphate buffered solution (gepufferte Kochsalzlösung)
pers.	persönlich
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H <sub>3</sub> O <sup>+</sup> -Ionenkonzentration
PIS	porcine intestinale Spirochätose
R	resistent
REA	Restriktionsendonukleasenanalyse
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RT	Raumtemperatur
SD	Schweinedysenterie
sec	Sekunden
SiO <sub>2</sub>	Siliciumoxid
spp.	species
TiHo	Tierärztliche Hochschule Hannover
TSA	Tryptose-Sojabouillon-Agar
z. T.	zum Teil

U	unit
u. U.	unter Umständen
V	Volt
WBE50	wachstumsbildende Einheiten 50 je ml
w./v.	Masse pro Volumen

## 1 Einleitung

Das Genus *Brachyspira* der Familie *Brachyspiraceae* umfasst bewegliche, schraubenförmige, aerotolerante, jedoch strikt anaerob wachsende Bakterienspecies (**Olsen et al., 2000**) und gehört taxonomisch zusammen mit den Familien *Spirochaetaceae* und *Leptospiraceae* zur Ordnung der Spirochaetales. Zu den pathogenen Arten der Gattung *Brachyspira* gehören *B. hyodysenteriae* und *B. pilosicoli*, die Erreger der Schweinedysenterie und Spirochäten-diarrhoe (**Boye et al., 2001**). Die weiteren beim Schwein vorkommenden Brachyspiren gelten entweder als apathogen (*B. innocens*, *B. murdochii*) oder wurden hinsichtlich ihrer Pathogenität kontrovers diskutiert (*B. intermedia*). Bedeutung haben Brachyspiren (*B. alvinipulli*, *B. aalborgii*) als darmpathogene Erreger auch beim Geflügel und dem Menschen. *B. hyodysenteriae* ist, da sie für die Schweineproduktion weltweit eine große Bedeutung besitzt, die wohl am umfangreichsten bearbeitete Spezies. Darüber hinaus sind noch etwa 200 Spirochäten-Arten bekannt, von denen mehr als die Hälfte nicht kultivierbar sind und über die nur ein geringer Kenntnisstand vorliegt (**Paster und Dewhirst, 2000**). Die durch diesen Erreger hervorgerufene Dysenterie verläuft unter dem Bild einer katarrhalischen bis nekrotisierenden Dickdarmentzündung. Neben schweren Verlaufsformen treten häufig auch milde Verlaufsformen mit weniger deutlich ausgeprägten klinischen Symptomen und klinisch inapparenten Infektionen auf. Der Erreger kann aus der Dickdarmschleimhaut, dem Dickdarminhalt und aus Kotproben infizierter Tiere angezüchtet werden (**Dünser et al., 1997**).

Methoden zur Bekämpfung umfassen allgemein-hygienische Maßnahmen, Versuche zur Vakzination und die antibiotische Therapie. Zur Minderung der durch die Dysenterie hervorgerufenen wirtschaftlichen Schäden steht im Vordergrund der tierärztlichen Maßnahmen derzeit die antibiotische Therapie. Wie bei anderen bakteriellen Infektionen ist der Erfolg der Therapie abhängig von der Antibiotikaempfindlichkeit der *B. hyodysenteriae*-Feldstämme. Von den zur Behandlung der Dysenterie gebräuchlichsten Substanzen (Tylosin, Lincomycin, Tiamulin, Valnemulin) erwiesen sich Tylosin und Lincomycin bei bis zu 30 % der untersuchten *B. hyodysenteriae*-Feldisolate nach *in vitro* Antibiotikaempfindlichkeits-Prüfungen als nicht wirksam (**Dünser et al., 1997**). Die Pleuromutiline Tiamulin und Valnemulin waren dagegen von höherer Wirksamkeit (**Heinritzi et al., 2006; Lehmann, 2004**). Allerdings wird auch bei diesen Substanzklassen von einer zunehmenden Resistenz von *B. hyodysenteriae*-Feldstämmen berichtet (**Dünser et al., 1997; Karlsson et al., 2002**). Auf Grund der Dynamik der Resistenzentwicklung sind für ein erfolgversprechendes therapeutisches Vorgehen in regelmäßigen Abständen durchzuführende Resistenzprüfungen an

Feldisolaten von *B. hyodysenteriae* unabdingbar. Daher wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit *Brachyspira* spp. aus Kot- und Darminhaltsproben von Schweinen aus deutschen Mastbeständen im Zeitraum von 2003 – 2005 isoliert, bis zur Speziesebene charakterisiert und anschließend auf ihre Antibiotikaempfindlichkeit geprüft. Ziel der Arbeit war die Überprüfung der Antibiotikaempfindlichkeit von *Brachyspira* spp.-Feldisolaten aus deutschen Schweinebeständen gegen in der Praxis eingesetzten Chemotherapeutika (Tylosin, Lincomycin, Tiamulin, Valnemulin) in zwei unterschiedlichen Testsystemen (Agardilutionstest und Mikrobouillondilutionstest) und der Vergleich der Werte mit bereits erhobenen Daten aus dem In- und Ausland.

## 2 Schrifttum

### 2.1 Erreger der Dysenterie

Durchfallerkrankungen sind in der Schweineproduktion weltweit ein sehr häufiges und verlustreiches Gesundheitsproblem (**Hampson et al., 1997; Harris et al., 1999**). Insbesondere Infektionen mit pathogenen *Brachyspira*-Arten können zu erheblichen wirtschaftlichen Einbußen führen. Man unterscheidet die Schweinedysenterie (SD), hervorgerufen durch *Brachyspira (B.) hyodysenteriae*, und die Spirochätendiarrhoe, die durch *B. pilosicoli* verursacht wird (**Waldmann et al., 2000**). Neben den bereits genannten *Brachyspira*-Spezies kommen beim Schwein auch *B. intermedia*, *B. murdochii* und *B. innocens* vor (**Hommez et al., 1998**).

Zur Familie *Brachyspiraceae* in der Ordnung Spirochaetales gehört nur das Genus *Brachyspira* (**Olsen et al., 2000**). Aktuell beinhaltet das Genus die sieben Spezies *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli*, *B. intermedia*, *B. innocens*, *B. murdochii*, *B. aalborgii* und *B. alvinipulli* (**Hampson und La, 2006**). Fünf weitere Spezies sind vorgeschlagen worden, aber derzeit noch nicht als eigenständige Spezies anerkannt (*B. canis*, *B. christiani*, *B. corvi*, *B. pulli*, *B. suanatina*) (**Duhamel et al., 1998; Jansson et al., 2008; Jensen et al., 2001; Phillips et al., 2005; Råsbäck et al., 2007a**). Die außerdem noch vorgeschlagene Spezies *B. ibaraki* ist vermutlich *B. aalborgii* zuzuordnen (**Mikosza et al., 2004**). Die ehemaligen Bezeichnungen der Gattung *Brachyspira* waren *Serpulina*, *Serpula* oder auch *Treponema* (**Hampson und La, 2006; Ochiai et al., 1997; Stanton et al., 1991; Stanton, 1992**). In der vorliegenden Arbeit wird aus Gründen der Übersichtlichkeit ausschließlich die Bezeichnung *Brachyspira* sp. verwendet.

Brachyspiren sind ca. 0,25-0,4 x 6-9 µm groß (**Taylor und Alexander, 1971**). Die gramnegativen Erreger sind aufgrund ihrer Endoflagellen beweglich und *B. hyodysenteriae* besitzt eine positive Chemotaxis zu Mucin (**Holt, 1978; Milner und Sellwood, 1994**). Die hohe Beweglichkeit der Brachyspiren (**Kennedy und Strafuss, 1976; Rosey et al., 1996**) und ihr Vermögen zur Chemotaxis zu Muzin (**Kennedy und Yancey, 1996**) führen sie an die Oberfläche der Epithelzellen, an denen die höchste Muzinkonzentration vorliegt. Die Aerotoleranz der *Brachyspira* spp. spielt bei der Besiedlung der Dickdarmkrypten eine wichtige Rolle und garantiert so ein Überleben in geringen Sauerstoffkonzentrationen, wie sie im Darm vorherrschen. Die Vermehrung dieser Erreger erfolgt unter strikt anaeroben Bedingungen, wobei *B. hyodysenteriae* gegenüber Sauerstoff eine gewisse Toleranz durch



die im *nox*-Gen kodierte NADH-Oxidase besitzt (**Stanton und Jensen, 1993; Stanton et al., 1999**).

### 2.1.1 Veterinärmedizinische Bedeutung von Brachyspiren

Brachyspiren haben veterinärmedizinische Bedeutung beim Schwein (*B. hyodysenteriae* als Erreger der Schweinedysenterie und *B. pilosicoli* als Erreger der Spirochätendiarrhoe) und besitzen große wirtschaftliche Bedeutung. Darüber hinaus sind Brachyspiren Verursacher intestinaler Spirochätosen des Geflügels (*B. alvinipulli*, *B. pilosicoli*, *B. intermedia*) sowie des Menschen und anderer Primaten (*B. aalborgi*, *B. pilosicoli*). *B. innocens* und *B. murdochii* können den Darm verschiedener Tierarten kolonisieren, sie gelten als apathogen und sind differentialdiagnostisch zu betrachten, wenn auch dieser Umstand teilweise kontrovers diskutiert wird.

#### Durch Brachyspiren verursachte Krankheiten beim Schwein

Die Schweinedysenterie, hervorgerufen durch *B. hyodysenteriae*, ist eine infektiöse Dickdarmerkrankung, die weltweit in Ländern mit intensiver Schweineproduktion vorkommt und zu hohen wirtschaftlichen Verlusten führen kann (**Pohlenz et al., 1983**). Sie hat sich in Deutschland in den letzten Jahrzehnten zu einer zunehmend problematischen und verlustreichen Krankheit entwickelt (**Herbst et al., 2004; Verspohl et al., 2001**). Das klinische Krankheitsbild tritt vorwiegend bei wachsenden Schweinen zwischen 15 und 70 kg Körpermasse auf und ist von Durchfällen mit Fressunlust, unzureichenden Gewichtszunahmen und verlängerter Mastdauer geprägt. Die Krankheit ist charakterisiert als eine mukoide bis hämorrhagisch-nekrotisierende Colitis, die klinisch zu schleimig-blutigen Durchfällen, Anorexie, Exikkose, Gewichtsverlust und Todesfällen führen kann (**Hampson et al., 1997; Harris et al., 1999**). Die SD zählt zu den sogenannten Komplex- oder auch Faktorenkrankheiten. So spielen unter anderem die Haltung, Fütterung und das Hygienemanagement des Betriebes eine entscheidende Rolle, ob es zur klinischen Krankheitsausprägung kommt. Nach einer durchschnittlichen Inkubationszeit von 10-14 Tagen kommt es häufig zum Absatz von dünnbreiigem, blutig-schleimigem Kot, dem teilweise Pseudomembranen beigefügt sind. Diese Symptome werden in vielen Fällen gefolgt von einer deutlichen Verschlechterung des Allgemeinbefindens. Je nach Erregervirulenz, der Immunlage der Tiere und den bereits durchgeführten Bekämpfungsmaßnahmen kann es in der Folge zu einer Letalitätsrate von bis zu 50 % kommen (**Waldmann und Wendt, 2004**).

Nach der oralen Aufnahme dringt *B. hyodysenteriae* in die Becherzellen der tiefen Krypten der Dickdarmschleimhaut ein (**Kennedy et al., 1988**). Die Infektion mit *B. hyodysenteriae* bewirkt eine verstärkte Proliferation unreifer Zellen der tieferen Kryptenschichten und die

vermehrte Bildung von Schleim (**Whipp et al., 1979**). Erst durch synergistische Interaktion mit weiteren, enteral vorkommenden Bakterienarten sowie negativ auf die Schweine einwirkende Faktoren entstehen tief greifende morphologische Dickdarmalterationen in Form einer hämorrhagisch-nekrotisierenden Typhlocolitis (**Harris et al., 1978; Kinyon und Harris, 1979; Whipp et al., 1979**). Durch diese geht in den entsprechenden Darmlokalisationen die wesentliche Dickdarmfunktion der Wasser- und Elektrolytreabsorption verloren.

Histologisch wird das Bild von einer deutlichen Vermehrung und Anschwellung der Becherzellen geprägt. Durch die vermehrte Schleimproduktion kommt es zu einer Ausweitung der Kryptenlumina (**Jacobson et al., 2007**), Propriainfiltration und lymphoretikuläre Reaktionen runden das entzündliche Bild der mucoiden Form ab. Bei der hämorrhagisch-nekrotisierenden Krankheitsform überziehen blutig-schleimige Massen die Darms Oberfläche. In unterschiedlichem Ausmaße finden sich kleieartige Nekrosebereiche und die Darmlymphknoten sind auffällig vergrößert. Histologisch erkennt man deutliche Nekrosen, die an der Darms Oberfläche besonders ausgeprägt sind. Die Kryptenanordnung erscheint in diesen Bereichen aufgehoben und nicht mehr abgrenzbar (**Wilcock und Olander, 1979**). Durch die verminderte Neubildung an Becherzellen kommt es zunächst zu einer lumen-seitigen Verschiebung der Becherzellenpopulation. Letztendlich sind keine Becherzellen mehr nachweisbar. Zusätzlich findet man ausgeprägte Propria-Infiltrationen, hochgradige Vermehrung des lymphoretikulären Gewebes sowie eine unterschiedlich starke Demarkation nekrotischer Darmabschnitte (**Dünser et al., 1997**). Neben diesen klinisch ausgeprägten Krankheitsformen kommen in Abhängigkeit von den oben genannten Faktoren jedoch auch völlig inapparente Infektionsverläufe vor (**Waldmann und Wendt, 2004**).

***B. pilosicoli*** verursacht die porcine intestinale Spirochätose (PIS), eine mildere Form der Colitis und Diarrhoe als die Schweinedysenterie (**Thomson et al., 1997; Trott et al., 1996**). Das Auftreten der PIS wurde in vielen schweineproduzierenden Ländern in Europa, Südamerika und Asien beschrieben (**Barcellos et al., 2000; Møller et al., 1998; Tasu et al., 2004; Taylor et al., 1980**). Die wirtschaftlichen Schäden dieser Erkrankung beruhen insbesondere auf der reduzierten Gewichtszunahme und schlechteren Futtermittelverwertung der Ferkel während und nach der Erkrankung (**Thomson et al., 1997**). Ein typischer Befund bei der PIS ist die Ausbildung eines falschen Bürstensaumes durch die an die Epithelzellen des Kolons an einem Ende adhären Spirochäten (**Sellwood und Bland, 1997**).

Neben den beiden erstgenannten Vertretern *B. hyosenteriae* und *B. pilosicoli* wurde auch ***B. intermedia*** in Verbindung mit Colitiden und Durchfällen bei Schweinen gebracht (**Binek und Szykiewicz, 1984; Fellström und Gunnarsson, 1995; Komarek et al., 2009**). Allerdings ließen sich klinische Veränderungen nicht oder nur in deutlich reduzierter Form in experimentellen Infektionsversuchen an Schweinen reproduzieren (**Jensen et al., 2000a**;

**Neef et al., 1994b**), so dass die Pathogenität des Erregers für Schweine noch als fraglich angesehen wird.

Vor wenigen Jahren wurde eine weitere Brachyspiren-Spezies von Schweinen isoliert, die eine hohe Verwandtschaft zu Isolaten von Stockenten aufwies und vorläufig als *B. suanatina* bezeichnet wurde (**Råsbäck et al., 2006; Råsbäck et al., 2007a**). In Infektionsversuchen an abgesetzten Ferkeln wurde aber belegt, dass *B. suanatina* als pathogen für das Schwein anzusehen ist, da SD-ähnliche Symptome bei den Ferkeln ausgelöst wurden (**Råsbäck et al., 2007a**). Wie auch *B. hyodysenteriae* besitzt *B. suanatina* eine vollständige Hämolyse und ist Indol-positiv. Beide Spezies sind nur mit molekulargenetischen, nicht aber durch kulturelle und biochemische Prüfverfahren, unterscheidbar (**Råsbäck et al., 2006**).

### **Vorkommen von Brachyspiren bei anderen Tierspezies und dem Menschen**

Brachyspiren sind nicht nur beim Schwein nachweisbar, sondern wurden bereits bei vielen anderen Tierarten und auch von Menschen isoliert.

Veterinärmedizinisch relevant sind Brachyspiren-Infektionen auch beim **Vogel**. Sie verursachen die aviäre intestinale Spirochätose (AIS) und führen in Geflügelhaltungen zu hohen wirtschaftlichen Verlusten (**Stephens und Hampson, 2001**). Eine ganze Reihe von Veröffentlichungen aus mehreren europäischen Ländern wie z. B. aus Holland (**Davelaar et al., 1986**), England (**Griffiths et al., 1987**), aber auch aus den USA (**Swayne et al., 1992**) oder Australien (**Stephens und Hampson, 1999**) beschäftigten sich mit dem Vorkommen von *B. spp.* bei Vögeln. 1998 wurde eine eigenständige Brachyspiren-Spezies beschrieben, die von Hühnern isoliert wurde, sich genetisch von *B. hyodysenteriae*, *B. innocens*, *B. pilosicoli*, *B. murdochii* und *B. intermedia* abgrenzen ließ, und als *B. alvinipulli* bezeichnet wurde (**Stanton et al., 1998**). Auch beim Geflügel gibt es eine akute und eine chronische Verlaufsform der AIS, die alle Altersklassen betreffen kann (**Stephens und Hampson, 2001**). In den USA, Australien und Schweden wurde bei Wildgeflügel (Wassergeflügel und Federwild) *B. pilosicoli* nachgewiesen. Möglicherweise stellen diese Tiere ein Naturreservoir für *B. pilosicoli* dar, von denen Infektionen von Hühnern ausgehen (**Jansson et al., 2001; Oxberry et al., 1998**). Ein ähnliches Bild ergab sich auch bei der Untersuchung von Zucht- und Wildenten, die zu 93 % bzw. 78 % positiv für *B. hyodysenteriae* waren. (**Jansson et al., 2004**). Doch nicht nur bei Hühnern und Wildvögeln kommen Brachyspiren vor, sondern auch viele andere Vogelarten können *Brachyspira spp.* beherbergen. So wurden bei Truthühnern *B. pilosicoli* (**Shivaprasad und Duhamel, 2005**) und bei Gänsen *B. alvinipulli* (**Nemes et al., 2006**) gefunden. Auch bei diesen Tieren können AIS-Infektionen zu einer erhöhten Mortalitätsrate von 28 % bzw. 18 % und zu einer hämorrhagisch bis nekrotisierenden Entzündung des Dickdarms (Kolon und Rektum) führen. Dass auch *B. hyodysenteriae* bei

Vögeln vorkommen kann, zeigen Berichte über an Typhlokolitis erkrankten Nandus (*Rhea americana*) (Jensen et al., 1996; Kutzer et al., 2005; Sagartz et al., 1992).

Wiederholt wurde in unterschiedlichen Untersuchungen *B. pilosicoli* bei **Hunden** nachgewiesen (Duhamel et al., 1998; Fellström et al., 2001; Manabe et al., 2004; Munshi et al., 2004; Oxberry und Hampson, 2003). Die Bedeutung von *B. pilosicoli* als Erreger der intestinalen Spirochätose bei **Hunden** scheint gering zu sein. Der Hund kann aber als möglicher Reservoirwirt für die humanpathogene Spezies *B. pilosicoli* gelten. Daneben wurden auch Brachyspiren bei Hunden nachgewiesen, die eine große Ähnlichkeit zu *B. innocens* aufwiesen. Eine genauere Untersuchung mittels Ribotypisierung (Hybridisierung *Sau3AI* restringierter chromosomaler DNS mit markierter rRNS) zeigte, dass sich die Isolate von *B. innocens* in ihrem Bandenmuster unterscheiden und somit vorläufig als „*Serpulina canis*“ bezeichnet wurden (Duhamel et al., 1998). Die Klassifizierung als eigenständige Spezies wurde aber bisher nicht bestätigt.

Auch bei **Affen** wurde das Vorkommen von intestinalen Spirochäten untersucht. Der Schwerpunkt der Untersuchung zielte auf dem Nachweis der humanpathogenen Spezies *B. aalborgi* und *B. pilosicoli*. Von insgesamt 35 Primatenaffen wurde in sechs Kotproben mittels PCR *B. aalborgi*, dagegen in keiner Probe *B. pilosicoli* detektiert (Munshi et al., 2003).

Beim **Menschen** wird das Krankheitsbild der intestinalen Spirochätose (HIS: humane intestinale Spirochätose) durch *B. pilosicoli* bzw. *B. aalborgi* hervorgerufen (Esteve et al., 2006; Kraatz et al., 2001; Mikosza et al., 1999; Mikosza et al., 2001). Bereits 1982 wurde *B. aalborgi* als neue Spezies identifiziert, die aus humanen Rektum-Biopsieproben von Patienten mit HIS aus Aalborg (Dänemark) isoliert worden war (Hovind-Hougen et al., 1982). Daneben gibt es nur noch einige vereinzelte Untersuchungen, bei denen *B. aalborgii* auch kulturell nachgewiesen wurde (Calderaro et al., 2003; Kraatz et al., 2000). In einer Studie in Bali wurde gezeigt, dass bei durchfallkranken Menschen zu einem höheren Prozentsatz *B. pilosicoli* nachweisbar ist, als bei gesunden Menschen (Margawani et al., 2004). Es ließ sich aber kein statistischer Zusammenhang mit dem Besitz oder Kontakt von Haus- oder Nutztieren als mögliches Erregerreservoir ableiten. Allerdings wiesen diejenigen Menschen vermehrt Spirochäten auf, die mit Brunnenwasser und nicht mit Leitungswasser versorgt wurden (Margawani et al., 2004).

### 2.1.2 Diagnostik und Speziesdifferenzierung von porcinen Brachyspiren

Zur Identifizierung und Differenzierung von Brachyspiren werden sowohl phänotypische als auch genotypische Methoden angewandt.

### 2.1.2.1 Kultureller Nachweis von Brachyspiren

Ein erster Schritt zur Identifizierung und phänotypischen Differenzierung porciner Brachyspiren ist die kulturelle Anzucht dieses strikt anaerob wachsenden, anspruchsvollen Bakteriums aus geeignetem Probenmaterial (Schweinekot oder Darminhalte) (**Waldmann et al., 2000**). Für eine erfolgreiche Anzucht scheint vor allem die Wahl eines geeigneten Transportmediums und eine kurze Transportdauer essentiell zu sein (**Verspohl et al., 2001**).

Da Brachyspiren sich nur langsam vermehren, können sie leicht von der Begleitflora in den jeweiligen Probenmaterialien überwachsen werden. Daher wurden verschiedene Versuche unternommen, die Sensitivität und Spezifität des Anzuchtverfahrens durch Zusatz von Antibiotika oder Schweinekotextrakt zu verbessern. Zudem wurde eine 48-stündige Vorinkubation der Proben in einer Brain-Heart-Infusion-Bouillon mit Zusatz von Rifampicin und Spectinomycin vorgeschlagen (**Calderaro et al., 2005**). Als Basis-Nährmedium für die Anzucht von *Brachyspira* spp. wurden Trypticase-Soja-Agar, Brain-Heart-Infusion-Agar, Diagnostik-Sensitivity-Test oder Columbiaagar mit 5 bis 10 % Rinder-, Pferde- oder Schafblut verwendet (**Calderaro et al., 2005; Feltrup et al., 1999a; Verspohl et al., 2001**). Zusätzlich wurde auch die Supplementierung mit bis zu 10 % bovinem fetalen Serum angeregt (**Joens und Kinyon, 1982**). Diesen Nährmedien wurden dann Spiramycin, Rifampicin, Spectinomycin, Vancomycin, und/oder Colistin zugegeben (**Calderaro et al., 2001a; Calderaro et al., 2005; Feltrup et al., 1999a; Kunkle und Kinyon, 1988; Verspohl et al., 2001**). Neben der Wahl des Nährmediums scheint auch die Inkubationstemperatur und -dauer einen Einfluss auf die Nachweisrate zu haben. Die Inkubationstemperatur lag in den verschiedenen Studien zwischen 37 °C und 42 °C (**Feltrup et al., 1999a; Hommez et al., 1998; Verspohl et al., 2001; Waldmann et al., 2000**). Die Dauer der Inkubation lag zwischen drei bis vier Tagen (**Feltrup et al., 1999a; Hommez et al., 1998**), drei bis sechs Tagen (**Fellström et al., 1999**), sieben Tagen (**Verspohl et al., 2001**) oder drei bis zehn Tagen (**Barcellos et al., 2000; Fellström et al., 1999**). Die Nachweisgrenze für kulturell-bakteriologische Untersuchungen schwankt demnach auch sehr von mit  $5 \times 10^2$  Zellen / g Kot bei Anwendung einer Vorinkubation (**Calderaro et al., 2005**) bis hin zu  $1 \times 10^9$  Bakterienzellen / g Kot bei direkter Anzucht ohne Voranreicherung (**Kunkle und Kinyon, 1988**).

Um die Sensitivität der kulturellen Untersuchung zu erhöhen, wurden auch Versuche unternommen, die Brachyspiren mittels Immunmagnetischer Separation (**IMS**) aus dem Probenmaterial Kot anzureichern (**Corona-Barrera et al., 2004**). Dabei zeigte sich, dass weder für den Nachweis von *B. hyodysenteriae*, noch für *B. pilosicoli* die Spezifität und Sensitivität gegenüber dem kultur-bakteriologischen Nachweis überlegen war.

Nach der Isolation der Brachyspiren wurden zur Speziesidentifizierung ein Leitfaden von Fellström, Feltrup und Stanton (1997) veröffentlicht. Die Speziesenteilung erfolgt demnach nach Auswertung der Hämolyse (stark oder schwach), Indolbildung, Hippuratspaltung sowie der  $\alpha$ -Galaktosidase- und  $\alpha$ - und  $\beta$ -Glucosidaseaktivität (siehe auch **Tabelle 4, Seite 29, Fellström et al., 1997; Feltrup et al., 1999a; Stanton et al., 1997**). Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass sowohl Indol-abbauende als auch Indol-nicht-abbauende *B. hyodysenteriae*-Isolate bei Schweinen vorkommen können, da es sich um Stämme mit identischen PFGE-Profilen handelte, die zudem identische 16S rRNS-Sequenzen besaßen (**Fellström et al., 1999**).

### 2.1.2.2 Molekularbiologische Methoden zum Nachweis von Brachyspiren

Da in der akuten Phase einer Infektion von Schweinen ca.  $1 \times 10^8$  Zellen pro Gramm Kot ausgeschieden werden, können Nachweisverfahren, die auf der Anzucht der Isolate basieren, deutlich an ihrer Nachweisgrenze liegen (**Neef et al., 1994b**). Daher befasste man sich schon frühzeitig mit den Möglichkeiten des genotypischen Nachweises. Bereits 1994 wurde eine *B. hyodysenteriae*-spezifische PCR entwickelt, die eine Nachweisrate von 10 bis 100 Organismen in 1 g Schweinekot aufwies (**Elder et al., 1994**). Inzwischen wurden etliche PCRs publiziert, mit deren Hilfe Brachyspiren-spezifische DNS, meist direkt aus Kotproben ohne Kultivierung der Bakterien, erfolgen kann.

Als Zielsequenzen für den Nachweis von *B. hyodysenteriae* diente meist das *nox*-Gen, das die NADH-Oxidase kodiert und die Aerotoleranz vermittelt (**Atyeo et al., 1999; La et al., 2003**) oder das *tlyA*-Gen (ein Hämolysin, das nahezu ausschliesslich kodiert (**Fellström et al., 2001; Jansson et al., 2004**)). Dagegen werden für den Nachweis von *B. pilosicoli* Sequenzen aus dem 16S rRNS-Gen genutzt (**La et al., 2003**). Neuere Entwicklungen favorisieren den gleichzeitigen Nachweis verschiedener *Brachyspira*-Spezies oder sogar Bakterien Genera. So wurde eine Duplex-PCR entwickelt, die parallel *B. hyodysenteriae* und *B. pilosicoli* detektiert (**La et al., 2003**) oder auch eine Multiplex-PCR für den Nachweis von *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli* und *B. intermedia* (**Song und Hampson, 2009**). Auch Multiplex-PCRs wurden publiziert, die parallel *B. hyodysenteriae*, *Lawsonia intracellularis* und *Salmonella* spp. (**Suh und Song, 2005; Suh und Song, 2005**) oder *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli* und *Lawsonia intracellularis* nachweisen (**La et al., 2006**). Eine multiplex-real-time PCR detektiert aus Schweinekotproben *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli* und *Lawsonia intracellularis* (**Willems und Reiner, 2010**).

Die Identifizierung der Brachyspiren-Spezies erfolgte lange anhand der oben beschriebenen biochemischen Marker. Allerdings erleichterte die Einführung genotypischer Methoden, die Identifizierung erheblich. Im Vordergrund stand hier die Entwicklung speziesspezifischer

PCRs auf Basis der bis dahin bekannten *nox*-Gen-Varianten von *B. hyodysenteriae*, *B. intermedia*, *B. pilosicoli*, sowie *B. innocens* und *B. murdochii* (Atyeo et al., 1999; Weissenböck et al., 2005). Eine Methode, mit der die geringeren Unterschiede einfach genutzt werden konnten, war die Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)-Analyse des *nox*-Gens. Hierfür wurde ein DNS-Fragment aus dem *nox*-Gen mittels PCR amplifiziert und anschließend mit den Restriktionsendonukleasen *Bfml* und *DpnII* verdaut (PCR-RFLP; siehe auch **Tabelle 6** auf Seite 32). Anhand der so gewonnenen Fragmente erfolgte die Zuordnung zu einer bestimmten Brachyspiren-Spezies, wobei die Spezies *B. hyodysenteriae*, *B. intermedia*, *B. innocens*, *B. murdochii*, und *B. aalborgii* eindeutig identifiziert werden konnten. *B. pilosicoli* und *B. alvinipulli* wiesen identische Restriktionsmuster auf (Rohde et al., 2002; Townsend et al., 2005). Im direkten Vergleich der Speziesidentifizierung mittels (1) biochemischer Methoden (Fellström und Gunnarsson, 1995), (2) *nox*-Gen basierter PCR-RFLP (Rohde et al., 2002) und (3) spezies-spezifischer *nox*-Gen-PCRs (Weissenböck et al., 2005) besaß die PCR-RFLP die höchste Spezifität (Ohya et al., 2008). Die Unterscheidung der Spezies *B. suanatina* von *B. hyodysenteriae* ist mittels PCR zuverlässig möglich, da bisher das Hämolysin-Gen *tlyA* ausschließlich bei *B. hyodysenteriae*-Isolaten, im Gegensatz zu den *B. suanatina*-Isolaten, gefunden wurde (Råsbäck et al., 2007a).

Die in den letzten Jahren publizierten Methoden wie der Multilokussequenztypisierung (MLST, La et al., 2009; Råsbäck et al., 2007b), Restriktionsendonukleasenanalyse (REA, La et al., 2009), Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE, La et al., 2009) oder „random amplified polymorphic DNA“ (RAPD, Fellström et al., 2008; Hidalgo et al., 2010), spielen für die Routinediagnostik von Brachyspiren keine Rolle. Diese Methoden werden nur für epidemiologische Auswertungen oder für Untersuchungen zur genetischen Diversität und der Verwandtschaft von *B. hyodysenteriae*-Isolaten eingesetzt.

## 2.2 Therapie der Dysenterie

### 2.2.1 Zur Therapie verwendete Wirkstoffe und deren Wirkmechanismus

#### Tiamulin

Bei dem Wirkstoff Tiamulin handelt es sich um ein synthetisches Derivat des trizyklischen Diterpen-Antibiotikums Pleuromutilin, das von bestimmten Basidiomyceten, wie *Pleurotus mutilis*, hergestellt wird (Novak und Schlaes, 2010). In kommerziellen Präparaten ist es meist als Tiamulinfumarat enthalten (Ungemach et al., 2010). Die bakteriostatische Wirkung wird

durch die Bindung an die 50S-Untereinheit der Ribosomen und die darauffolgende Hemmung der Peptidyltransferase vermittelt. Hieraus resultiert ein Proteinsyntheseabbruch (**Schlünzen et al., 2004**). Tiamulin findet als freie Base für die parenterale Applikation über das Futter oder Trinkwasser Verwendung. Der Wirkstoff wird gut enteral resorbiert und erreicht nach zwei bis vier Stunden seine maximale Konzentration im Serum (zitiert nach **Kessler, 2001**).

#### Valnemulin

Valnemulin ist ein semisynthetisches Derivat des Pleuromutilins Tiamulin, welches sich von diesem durch eine andere Seitenkette unterscheidet, aber ein gleiches Wirkprinzip besitzt (**Long et al., 2006**). In Form von Valnemulinhydrochlorid ist dieser Wirkstoff in Deutschland kommerziell erhältlich (**Ungemach et al., 2010**).

#### Lincomycin

Lincomycin gehört zur Gruppe der Lincosamide und ist somit ein Monoglykosid mit einer Aminosäure-ähnlichen Seitenkette (**Spížek et al., 2004**). Handelspräparate enthalten meist Lincomycinhydrochlorid (**Ungemach et al., 2010**). Lincomycin wirkt über eine reversible Bindung an die 50S-Untereinheit der bakteriellen Ribosomen bakteriostatisch, wodurch die Proteinsynthese der empfindlichen Erreger unterbunden wird (**Vazquez, 1967**).

#### Tylosin

Tylosin gehört zur Gruppe der 16-gliedrigen Makrolide (**Anadón und Reeve-johnson, 1999; Mazzei et al., 1993**). Der Wirkstoff ist schwach basisch und vom Aufbau her ein Lactonring mit 16 Atomen, der glykosidisch mit den Monosacchariden Mycinose, Mycaminose und Mycarose verbunden ist. Tylosin ist lipophil und dadurch gut membrangängig. Es ist in Reinform ein weißes bis blassgelbes Pulver, das eher schlecht in Wasser, aber sehr gut in Ethanol und Fett löslich ist. Das in Handelspräparaten enthaltene Tylosintartrat und Tylosinphosphat ist hingegen gut wasserlöslich (**Ungemach et al., 2010**). Der Wirkmechanismus ist mit dem der Lincosamide vergleichbar, da die Proteinsynthese an der 50S-Untereinheit gehemmt wird und die Bindung von Aminoacyl-tRNA blockiert wird (**Furneri und Nicoletti, 1991; Mazzei et al., 1993**). Tylosinphosphat, wie auch Lincomycin, wird nur in geringen Mengen nach oraler Gabe resorbiert, so dass der Hauptwirkort der beiden Chemotherapeutika im Darm liegt (**Waldmann und Wendt, 2004**).



### 2.2.2 Aktuelle Daten zur Wirksamkeit beim Schwein

Wie bereits in **Kapitel 1** erwähnt, steht die antibiotische Therapie zur Bekämpfung von durch Brachyspiren hervorgerufenen Erkrankungen im Vordergrund. Dabei ist die Antibiotikaempfindlichkeit der *B. spp.*-Feldisolate grundlegend für eine erfolgreiche Therapie. Die Antibiotikaempfindlichkeitsprüfung von *Brachyspira* spp. aus Schweinekot- und Darminhaltsproben wurde bereits in zahlreichen Ländern durchgeführt. Dabei erfolgte die Wirksamkeitsprüfung der verschiedenen Chemotherapeutika meist entweder mit dem Agardilutions-test (ADT) und / oder dem Mikrobouillondilutionstest (MBDT). Die **Tabelle 2** gibt einen Überblick über die für *B. hyodysenteriae* erhobenen Daten gegenüber den Chemotherapeutika Tiamulin, Valnemulin, Tylosin und Lincomycin.

Betrachtet man die für *B. hyodysenteriae* aus deutschen Schweinebeständen im MBDT erhobenen  $MHK_{50}$ - und  $MHK_{90}$ -Werte gegenüber **Tiamulin** genauer, so ist bei den meisten Publikationen eine Übereinstimmung der Werte feststellbar. In einer aktuellen Untersuchung zeigt sich, dass der  $MHK_{50}$ -Wert von 48 in Deutschland untersuchten *B. hyodysenteriae*-Isolaten bei 0,5 µg/ml lag und insgesamt 79,2 % der Isolate als sensibel eingestuft werden konnten (**Ritzmann et al., 2009**). Dies stimmt mit den Daten von 102 Stämmen überein, die im Jahr 2002 isoliert wurden, und bei denen eine  $MHK_{50}$  von 0,5 µg/ml bestimmt wurde (**Rohde et al., 2004**). In derselben Arbeit wurden auch Stämme aus jüngeren Jahren untersucht und eine Zunahme der  $MHK_{50}$ -Werte beschrieben. So wiesen Isolate aus den Jahren 1989 bis 1993 mit 0,063 µg/ml die niedrigste  $MHK_{50}$  auf, die bis zu einer  $MHK_{50}$  von 2 µg/ml im Jahr 2001 anstieg (**Tabelle 1**). Die Autoren haben für den im Jahr 2002 beobachteten Abfall der  $MHK_{50}$  von 2 µg/ml auf 0,5 µg/ml keine Erklärung (**Rohde et al., 2004**). Allerdings scheint es in den folgenden Jahren wieder zu einem Anstieg an resistenten Stämmen gekommen zu sein, denn Rohde und Kollegen konnten einen Anteil von 45,5 % resistenter Stämme mit dem ADT QuickMIC<sup>®</sup> nachweisen, wie auch **Gundlach (2001)** mit 53,2 % im ADT. Dennoch liegen insgesamt die für Isolate aus deutschen Betrieben mit dem MBDT erhobenen Daten im europäischen Durchschnitt. Bei der Überprüfung aus deutschen Betrieben waren die mit dem MBDT erhobenen Daten vergleichbar mit denen aus europäischen Ländern. Bei der Sensibilität von *B. hyodysenteriae*-Isolaten aus Spanien gegen Tiamulin wurde ein  $MHK_{50}$ -Wert von 0,25 µg/ml erreicht, wobei es in den Jahren 2000 bis 2008 zu keiner Veränderung dieses Wertes kam (**Hidalgo et al., 2009**). Auch in Tschechien ( $MHK_{50}$  0,25 µg/ml, **Lobová et al., 2004**), Schweden (0,08 µg/ml, **Karlsson et al., 2003**), und Belgien (0,125 µg/ml, **Vyt und Hommez, 2006**) wurde die überwiegende Anzahl der Stämme als sensibel gegenüber Tiamulin eingestuft.

**Tabelle 1: Bestimmung der  $MHK_{50}$  und  $MHK_{90}$  bei porcinen *B. hyodysenteriae*-Isolaten von Lincomycin, Tiamulin, Tylosin und Valnemulin (Angaben in der Literatur)**

geprüfte Antibiotika	Anzahl Stämme	Methode <sup>1)</sup>	$MHK_{50}$ [ $\mu\text{g/ml}$ ]	$MHK_{90}$ [ $\mu\text{g/ml}$ ]	geprüfter $MHK$ -Bereich [ $\mu\text{g/ml}$ ]		Land <sup>2)</sup>	Zeitraum der Stammisolierung	Referenz <sup>3)</sup>
					von	bis			
Lincomycin	10	ADT	50	100	1	100	GB	1989-1990	1
Lincomycin	37	ADT	n. b.	50	25	100	J	2002	10
Lincomycin	76	MBDT	16	64	$\leq 1$	64	A	1986-2000	4
Lincomycin	293	MBDT	16	32	2	128	D	2005-2006	8
Lincomycin	108	MBDT	16	32	2	128	ES	2000-2007	2
Tiamulin	30	ADT	0,125	0,5	$\leq 0,03$	2	B	2003	3
Tiamulin	10	ADT	0,3	1	0,025	1	GB	1989-1990	1
Tiamulin	37	ADT	n. b.	0,4	$< 0,1$	1,6	J	2002	10
Tiamulin	100	ADT	0,25	2	$\leq 0,031$	16	CZ	1997-2001	7
Tiamulin	221	ADT	0,125	1	$< 0,031$	8	D	1989-1993	6
Tiamulin	221	ADT	0,25	1	$< 0,031$	8	D	1994-1997	6
Tiamulin	221	ADT	2	8	$< 0,031$	8	D	1998-2001	6
Tiamulin	76	MBDT	0,125	1	$\leq 0,016$	2	A	1986-2000	4
Tiamulin	293	MBDT	0,5	2	$\leq 0,25$	8	D	2005-2006	8
Tiamulin	221	MBDT	0,679	3,509	0,031	8	D	1989-2002	9
Tiamulin	108	MBDT	0,09	0,443	$\leq 0,016$	$> 2$	S	k. A.	5
Tiamulin	108	MBDT	0,25	0,25	$\leq 0,016$	2	ES	2000-2007	2

Fortsetzung und Erläuterungen der auf der nächsten Seite.

Fortsetzung der Tabelle 1

geprüfte Antibiotika	Anzahl Stämme	Methode <sup>1)</sup>	MHK <sub>50</sub> [µg/ml]	MHK <sub>90</sub> [µg/ml]	geprüfter MHK-Bereich [µg/ml]		Land <sup>2)</sup>	Zeitraum der Stammsolisierung	Referenz <sup>3)</sup>
					von	bis			
Tylosin	30	ADT	> 128	> 128	4	> 128	B	2003	3
Tylosin	10	ADT	200	> 200	5	> 200	GB	1989-1990	1
Tylosin	37	ADT	n. b.	≥ 100	1	100	J	2002	10
Tylosin	76	MBDT	> 256	> 256	≤ 2	> 256	A	1986-2000	4
Tylosin	293	MBDT	> 256	> 256	≤ 4	256	D	2005-2006	8
Tylosin	108	MBDT	> 256	> 256	≤ 2	> 256	S	k. A.	5
Tylosin	108	MBDT	> 256	> 256	≤ 4	256	ES	2000-2007	2
Valnemulin	30	ADT	≤ 0,03	0,125	≤ 0,03	0,25	B	2003	3
Valnemulin	10	ADT	0,1	4	0,025	4	GB	1989-1990	1
Valnemulin	100	ADT	0,125	4	≤ 0,031	16	CZ	1997-2001	7
Valnemulin	221	ADT	≤ 0,063	0,5	< 0,031	4	D	1989-1993	6
Valnemulin	221	ADT	≤ 0,063	1	< 0,031	4	D	1994-1997	6
Valnemulin	221	ADT	1	8	< 0,031	4	D	1998-2001	6
Valnemulin	76	MBDT	0,031	0,5	≤ 0,016	2	A	1986-2000	4
Valnemulin	293	MBDT	0,125	0,25	≤ 0,016	2	D	2005-2006	8
Valnemulin	221	MBDT	0,351	2,057	0,031	4	D	1989-2002	9
Valnemulin	108	MBDT	0,125	0,25	≤ 0,016	2	ES	2000-2007	2

**Erläuterungen:**

n. b.: nicht bestimmt; k. A.: keine Angabe; **1) Methode:** ADT: Agardilutionstest; MBDT: Mikrobouillon-dilutionstest; **2) Land:** A: Australien; B: Belgien; D: Deutschland; GB: Großbritannien; J: Japan; S: Schweden; ES: Spanien; CZ: Tschechien;

**3) Referenz:** 1: Aitken et al., 1999; 2: Hidalgo et al., 2009; 3: Vyt und Hommez, 2006; 4: Karlsson et al., 2002; 5: Karlsson et al., 2003; 6: Kessler, 2001; 7: Lobová et al., 2004; 8: Ritzmann et al., 2009; 9: Rohde et al., 2004; 10: Uezato et al., 2004.

Zu Stämmen anderer *Brachyspira* spp. als *B. hyodysenteriae* liegen nur sehr wenige Daten vor. Bei *B. pilosicoli*-Isolaten ergab sich im QuickMIC-Test® eine Resistenzrate von 6,13 % gegenüber Tiamulin (Rohde, 2006). Auch in weiteren Untersuchungen erwies sich *B. pilosicoli* im MBDT in der MHK<sub>50</sub> oder MHK<sub>90</sub> entweder vollständig (Kessler, 2001) oder zu über 70 % empfindlich (Ritzmann et al., 2009). Es zeigte sich, dass die im ADT erhobenen MHK<sub>50</sub>- oder MHK<sub>90</sub>-Werte jeweils um eine Konzentrationsstufe höher lagen, als im MBDT (Kessler, 2001). Für die Spezies *B. intermedia*, *B. innocens* und *B. murdochii* lagen die ermittelten Werte jeweils im empfindlichen Bereich und häufig sogar unterhalb der niedrigsten, gemessenen Konzentrationsstufe für Tiamulin (Karlsson et al., 2003; Kessler, 2001; Ritzmann et al., 2009).

Im europäischen Vergleich lagen die im ADT ermittelten minimalen Hemmkonzentrationen wesentlich niedriger und verhielten sich mit MHK<sub>50</sub>-Werten zwischen 0,125 µg/ml – 0,3 µg/ml in ihrer Antibiotikaempfindlichkeitsprüfung ähnlich hoch wie die *B. hyodysenteriae*-Feldstämmen von Keßler. So ergab die Untersuchung von 100 tschechischen *B. hyodysenteriae*-Isolaten eine MHK<sub>50</sub> von 0,25 µg/ml und 90 % der getesteten Stämme konnten mit einer Konzentration von 2,0 µg/ml Tiamulin gerade noch in ihrem Wachstum gehemmt werden (Lobová et al., 2004). In Belgien lagen die im ADT geprüften 30 *B. hyodysenteriae*-Isolate nur bei 0,125 bzw. 0,5 µg/ml in ihren MHK<sub>50</sub> und MHK<sub>90</sub>-Werten (Vyt und Hommez, 2006).

## 2.3 Antibiotikaresistenz

### 2.3.1 Mechanismen der Antibiotikaresistenz

#### Allgemeines

Der Begriff „Resistenz“ beschreibt eine graduell variierende Unempfindlichkeit von Mikroorganismen gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen (Schwarz und Kehrenberg, 2000). Der Grad der Unempfindlichkeit hängt dabei von den jeweiligen Wirkstoffen, den zu untersuchenden Bakterien und den spezifisch vorliegenden Resistenzmechanismen ab.

Grundsätzlich unterscheidet man zwischen der intrinsischen und der erworbenen Resistenz eines Mikroorganismus. Die intrinsische oder auch natürliche Resistenz bezeichnet eine für eine bestimmte Bakteriengattung oder -art spezifische Eigenschaft, bei der entweder die Wirkorte der Antibiotika ganz fehlen oder verändert sind. Im Gegensatz dazu stellt die erworbene Resistenz eine für einzelne Bakterienstämme spezifische Eigenschaft dar, die

entweder auf resistenzvermittelnden Mutationen chromosomaler Gene oder auf dem Erwerb von Resistenzgenen beruht. Die Produkte der Resistenzgene können entweder Resistenz gegenüber (1) einzelnen Wirkstoffen oder Vertretern der gleichen Wirkstoffklasse (z. B.  $\beta$ -Laktamantibiotika, Tetracycline oder Aminoglykoside), (2) unterschiedlichen Wirkstoffklassen, die jedoch die gleiche zelluläre Angriffsstelle besitzen (z. B. Makrolide, Lincosamide und B-Komponenten der Streptogramine) oder aber (3) gegenüber strukturell und funktionell verschiedenen antimikrobiellen Wirkstoffen, nukleinsäurebindenden Substanzen und Detergenzien (z. B. „Multidrug-Transporter“) vermitteln.

Durch die Anwendung von antimikrobiellen Wirkstoffen kann es zur Selektion resistenter Bakterien kommen. Grundlagen für eine rasche Ausbreitung von Resistenzen sind die Lokalisation der Resistenzgene auf mobilen genetischen Elementen (Plasmide, Transposons, Genkassetten) sowie ein enger Kontakt der Bakterien in einem polymikrobiellen Umfeld. Neben den Transferprozessen, die in Bakterienpopulationen eines einzigen Wirtes (Tier oder Mensch) erfolgen können, stellt die Übertragung resistenter Bakterien zwischen verschiedenen Menschen, sowie unterschiedlichen Tieren und Menschen einen wichtigen Gesichtspunkt bei der Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen dar. Doch nicht nur das Eindringen und Haften, sondern auch die zumindest zeitweise Vermehrung der resistenten Bakterien im neuen Wirt bilden eine Voraussetzung der Antibiotikaresistenz (**Schwarz, 2001**). Eine Gefährdung des Menschen durch resistente Bakterien beim Tier beruht prinzipiell auf zwei Möglichkeiten: der Übertragung resistenter Zoonoseerreger und dem Transfer von Resistenzgenen im Menschen zwischen für den Menschen apathogenen, vom Tier stammenden Erregern und humanpathogenen Bakterien. In beiden Fällen spielt der notwendige Selektionsdruck eine entscheidende Rolle.

Eine Vielzahl antimikrobieller Resistenzen werden bei Staphylokokken, wie auch bei anderen grampositiven und gramnegativen Bakterien, auf Plasmiden oder in Transposons kodiert. Plasmide sind extrachromosomale, doppelsträngige DNS-Moleküle unterschiedlicher Größe und können sich autonom replizieren. Transposons sind doppelsträngige DNS-Elemente, die aufgrund ihrer Transposase- und Resolvasefunktionen zum eigenständigen Ortswechsel befähigt sind, aber -im Gegensatz zu Bakterien- keine Replikationsfunktionen besitzen und zu ihrer Vermehrung in Vektormoleküle mit intaktem Replikationsapparat integrieren müssen (**Werckenthin und Schwarz, 1997**).

Zum effektiven *in-vitro*-Gentransfer werden die Transformation, Transduktion und Konjugation beschrieben. Dabei beschreibt die Transformation die Übertragung von DNS in kompetente, d.h. für die Aufnahme von Fremd-DNS bereite Empfängerzellen. Bei der Transduktion handelt es sich um den Transfer chromosomaler bzw. extrachromosomaler DNS mit Hilfe von Bakteriophagen. Wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Transduktion ist die

Infektion der Spenderzelle mit einem lytischen Phagen bzw. die Induktion eines Prophagen und das Vorhandensein der für die Phagenanheftung erforderlichen Oberflächenrezeptoren auf der Empfängerzelle (**Werckenthin und Schwarz, 1997**). Die Konjugation stellt einen gerichteten Gentransfer aus einer Spenderzelle in eine entsprechende Empfängerzelle dar. Die hierzu notwendigen Transfergene sind bei grampositiven Bakterien auf konjugativen Plasmiden oder Transposons lokalisiert (**Werckenthin und Schwarz, 1997**). Betrachtet man die Ergebnisse der Antibiotikaempfindlichkeitsprüfung von *B. hyodysenteriae*-Isolaten gegenüber **Valnemulin**, so wurden in Deutschland im MBDT meist niedrigere MHK-Werte für *B. hyodysenteriae* gemessen als bei Tiamulin. Die  $MHK_{50}$ - als auch die  $MHK_{90}$ -Werte lagen jeweils im empfindlichen Bereich (**Ritzmann et al., 2009; Rohde et al., 2004**). Auch im ADT erwiesen sich die Isolate gleich empfindlich gegenüber Valnemulin. Ein Anstieg der  $MHK_{90}$  von 0,5 µg/ml auf 8 µg/ml im zeitlichen Verlauf der Isolation (zwischen 1989 – 2001) war auch bei diesem Wirkstoff feststellbar (**Kessler, 2001**). Die mit Abstand höchste Resistenzrate von 31,4 % wurde von Gundlach gemessen (**Gundlach, 2001**). Eine geringfügig niedrigere Resistenzrate von 28,55 % wurde mit dem ADT QuickMIC® erreicht (**Rohde, 2006**).

Im europäischen Vergleich wurden die niedrigsten MHK-Werte in Belgien gemessen (**Vyt und Hommez, 2006**). So lag die  $MHK_{90}$  mit 0,125 µg/ml Valnemulin in einem sehr geringen Konzentrationsbereich. Dagegen wurden in England und Tschechien höhere  $MHK_{50}$ - bzw.  $MHK_{90}$ -Werte von 0,125 und 4,0 µg/ml gemessen (**Aitken et al., 1999; Lobová et al., 2004**). In australischen, schwedischen und spanischen Untersuchungen im Mikrobouillontest sowie in Japan im Agardilutionstest erhobene MHK-Werte lagen für Valnemulin ebenfalls im empfindlichen Bereich (**Hidalgo et al., 2009; Karlsson et al., 2003; Karlsson et al., 2004a; Uezato et al., 2004**).

Die übrigen *B. spp.* waren nach Untersuchungen im ADT als auch im MBDT empfindlich gegenüber Valnemulin (**Kessler, 2001**).

Das in der Praxis zur Behandlung der Schweinedysenterie eingesetzte Makrolidantibiotikum **Tylosin** lag sowohl in Schweden (**Karlsson et al., 2002; Karlsson et al., 2003**) als auch in Spanien (**Hidalgo et al., 2009**) in jeweils beiden  $MHK_{50}$  und  $MHK_{90}$ -Werten im resistenten Bereich. Daten aus Deutschland liegen hierzu nicht vor.

Im Agardilutionstest ermittelte minimale Hemmkonzentrationen von Tylosin gegenüber dem Erreger der Schweinedysenterie ergaben ähnlich hohe Werte wie im MBDT. Mit beiden Prüfmethode lagen die  $MHK_{50}$  und  $MHK_{90}$ -Werte in Europa, Australien und Japan im resistenten Bereich (**Aitken et al., 1999; Hidalgo et al., 2009; Karlsson et al., 2002; Karlsson et al., 2003; Uezato et al., 2004; Vyt und Hommez, 2006**). Auf Deutschland

bezogen erwies die Rate resistenter Stämme Werte von rund 99 % (**Rohde, 2006**). Der Anteil empfindlicher *B. hyodysenteriae*-Isolate betrug lediglich 0,13 %. In einer weiteren deutschen Studie wurde mit 99,25 % ein ähnlich hoher Anteil resistenter Stämme gemessen (**Gundlach, 2001**).

Das Lincosamidantibiotikum **Lincomycin** wird in Deutschland seit vielen Jahren zur Behandlung der Schweinedysenterie eingesetzt und wurde bereits in zahlreichen Studien, ebenso wie die bisher genannten Chemotherapeutika, auf seine *in-vitro*-Wirksamkeit gegenüber Brachyspiren geprüft. Insgesamt zeigte sich in Untersuchungen der letzten Jahre, dass *B. hyodysenteriae*-Isolate aus deutschen Schweinebeständen zu 90 % bis 95,1 % resistent gegenüber Lincomycin sind (**Gundlach, 2001; Rohde, 2006**).

Im europäischen Vergleich lagen dazu die im MBDT getesteten *B. hyodysenteriae*-Isolate aus Spanien bei einer  $MHK_{50}$  von 16 µg/ml und einer  $MHK_{90}$  von 32 µg/ml und sind somit als intermediär zu beurteilen (**Hidalgo et al., 2009**). Eine log-Stufe höher lag die im selben Testverfahren bei einem gleich hohen  $MHK_{50}$ -Wert in Schweden ermittelte  $MHK_{90}$  (**Karlsson et al., 2002**). In Belgien konnten noch höhere Werte mit einem  $MHK_{50}$ -Wert von 64 µg/ml bzw. einem  $MHK_{90}$ -Wert von 128 µg/ml gezeigt werden (**Vyt und Hommez, 2006**). In Japan wiesen die Isolate im Agardilutionstest eine  $MHK_{90}$  von 50 µg/ml auf (**Uezato et al., 2004**) und diese lagen damit unter dem Wert ihres belgischen Kollegen Hommez, der das gleiche Testsystem verwendete.

### 2.3.2 Mechanismen der Antibiotikaresistenzen bei *Brachyspira* spp.

#### 2.3.2.1 Resistenz gegenüber Tylosin und Lincosamiden

Bei *Brachyspira* spp.-Isolaten ist die Resistenz gegenüber Makroliden weit verbreitet. Isolate mit hohen MHK-Werten gegenüber Makrolidantibiotika wie z. B. Tylosin zeigen häufig auch höhere MHK-Werte gegenüber Lincomycin (**Pringle et al., 2006**). Dies liegt darin begründet, dass sowohl Makrolide als auch Lincosamide überlappende Bindungsstellen an den Ribosomen besitzen. Um die Grundlage dieser Resistenz zu ermitteln, wurden *B. hyodysenteriae*-Stämme mit Hilfe der DNS-Sequenzierung der Peptidyltransferaseregion der 23S-rDNS untersucht (**Karlsson et al., 1999**). Die hierfür untersuchten *B. hyodysenteriae*-Isolate waren zuvor entweder als resistent ( $n = 7$ ) oder als empfindlich ( $n = 7$ ) eingestuft worden. Dabei zeigte sich, dass die Resistenz der *B. hyodysenteriae*-Isolate gegenüber Tylosin, Erythromycin und Clindamycin mit einer Transversionsmutation von Adenin zu Thymin an der Nukleotidposition 2058 (Positionsangaben gemäß des 23S rRNS-Gens von *E. coli*) assoziiert war. Bei empfindlich eingestuften Isolaten konnte *in vitro* die Resistenz durch die

Subkultivierung auf Tylosin-haltigem Agar (*f.c.* 4 µg/ml) provoziert werden. Bei diesen Stämmen wurde an der Position 2058 des 23S rRNS-Gens eine Substitution des Adenin durch Guanin nachgewiesen. Dies zeigt, dass die Resistenz von *B. hyodysenteriae* auf der Mutation eines einzigen Nukleotids beruhen kann. Da Tylosin weit verbreitet in der Schweinehaltung sowohl als Therapeutikum als auch ehemals als Wachstumsförderer eingesetzt wurde, ist das vermehrte Auftreten von Resistenzen der Brachyspiren gegenüber dem Chemotherapeutikum nicht weiter verwunderlich (**Karlsson et al., 1999**).

Auch an *B. pilosicoli*-Isolaten wurden Untersuchungen zur Antibiotikaresistenz gegenüber Lincosamiden und Makroliden durchgeführt (**Karlsson et al., 2004b**). Zur genaueren Prüfung der Antibiotikaresistenz führten sie nach der vorangegangenen Resistenzprüfung bei zehn Tylosinresistenten (als resistent wurden die Isolate innerhalb dieser Studie eingestuft, wenn ihr MHK-Wert > 32 µg/ml Tylosin lag) und zehn Tylosinempfindlichen *B. pilosicoli*-Isolaten eine Sequenzierung durch. Die hierdurch erhaltenen Ergebnisse waren leider etwas widersprüchlich. So wiesen sechs der zehn Tylosin-resistenten Stämme an Position 2058 eine Transversion von Adenin zu Thymin und an der Position 2059 den Austausch von Adenin mit Guanin bzw. Cytosin auf. Bei den vier übrigen Tylosin-resistenten Stämmen waren diese Mutationen allerdings nicht nachweisbar. Da aber in dieser Studie nur die Bindungsstelle der Makrolid- und Lincosamidantibiotika, also ein kleiner Teil der Domäne V des 23S rRNS-Gens, genauer auf Mutationen untersucht wurde, vermuteten Karlsson und Kollegen, dass eine Mutation im nachfolgenden, nicht untersuchten Teil des Gens vorliegen könnte. Dies wurde bereits bei *Streptococcus pneumoniae* an der Position 2610 – 2611 des 23S rRNS-Gens und am ribosomalen Protein L4 als Ursache einer Makrolidresistenz beschrieben (**Tait-Kamradt et al., 2000**). Nach den Ergebnissen einer schwedischen Studie stellte man fest, dass *B. pilosicoli*-Isolate mit hohen Tylosin MHK-Werten auch hohe MHK-Werte gegen Lincomycin zeigten, was auf der Tatsache beruht, dass die Makrolide und Lincosamide an überlappenden Stellen der Ribosome binden (**Pringle et al., 2006**).

### 2.3.2.2 Resistenz gegen Pleuromutiline (Tiamulin, Valnemulin)

Bei *E. coli* binden Tiamulin und Valnemulin an die 50S Untereinheit des Ribosoms der Bakterien und inhibieren durch Interaktion mit dem Bereich der Peptidyltransferase die Proteinbiosynthese (**Bøsling et al., 2003**). Untersuchungen zur Wirkungsweise bei Brachyspiren wurden erst vor wenigen Jahren durchgeführt. Dabei wurde sowohl mittels Sequenzierung als auch einem chemischen „footprinting“ eine Mutation am ribosomalen Protein L3 und der 23S-rRNS am Peptidyltransferasezentrum als Ursache der Resistenz von *Brachyspira* spp. gegenüber den Pleuromutilinen nachgewiesen (**Pringle et al., 2004**).



Karlsson et al. (2004) untersuchte die Verwandtschaft von zuvor im MBDT als resistent gegenüber dem Pleuromutilin Tiamulin eingruppierten *B. hyodysenteriae*-Isolaten aus Deutschland, Schweden und England mittels Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE). Die Autoren vermuteten, dass die Resistenz der Stämme durch einzelne Mutationen in der Domäne V der 23S rRNS hervorgerufen wird. Eine Auswirkung auf die PFGE-Profile war aber nicht nachweisbar (Karlsson et al., 2004a).

### 2.3.3 Methoden zum Nachweis der Antibiotikaempfindlichkeit von Brachyspiren

Zum phänotypischen Nachweis der Empfindlichkeit eines Erregers gegenüber Chemotherapeutika gibt es mehrere verschiedene Testsysteme. Ziel ist es, den Erreger als „empfindlich“, „intermediär“ oder „resistent“ gegen die geprüften antimikrobiellen Wirkstoffe zu beurteilen, um einen geeigneten Wirkstoff für eine Therapie auswählen zu können. Am häufigsten verwendet werden der Agardiffusionstest oder der Dilutionstest in verschiedenen Ausführungen der Reihenverdünnung (Schwarz, 2001).

#### 2.3.3.1 Der Agardiffusionstest

Im Verfahren des Agardiffusionstests erfolgt die Diffusion der Wirksubstanzen aus einem mit einer definierten Wirkstoffmenge beschickten Testblättchen in den Agar hinein, so dass ein Wirkstoffgradient entsteht. Je nach Grad der Empfindlichkeit der zu untersuchenden Bakterien wird das Bakterienwachstum in einen mehr oder minder großen Bereich um das Plättchen (Hemmhof) unterdrückt. Der Durchmesser des Hemmhofes gilt dabei als Maß für die Beurteilung der Bakterien als resistent oder empfindlich und richtet sich individuell nach dem getesteten Wirkstoff in Bezug zu dem jeweiligen Bakterium (Schwarz et al., 2003).

Der Agardiffusionstest hat sich als semiquantitative Bestimmungsmethode weltweit durchgesetzt, da mit geringem Aufwand, preisgünstig und relativ schnell ein Übersichtsergebnis erzielt wird (Altreuther et al., 1997; Kolbert und Shah, 2002). Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erreichen empfiehlt es sich, vor der Durchführung einer Resistenzstudie alle Parameter (verwendetes Nährmedium, pH-Wert und Schichtdicke des Agars, Inokulum, verwendete Testblättchen, Inkubation, Auswertung und Qualitätssicherung mit Hilfe von Kontrollkeimen, die bei jeder Prüfung mitzuführen sind) exakt zu definieren und damit für jedes beteiligte Labor verbindlich festzuschreiben. Doch selbst bei bestmöglicher Standardisierung bleibt der Agardiffusionstestverfahren ein semiquantitativer Test und verfügt damit nicht über die für allgemeine Aussagen zur Resistenzsituation erforderliche Präzision (Altreuther et al., 1997). Aufgrund des langsamen und nur anhand der Hämolyse

erkennbaren Wachstums der *B. spp.*, ist dieses Testsystem zur Empfindlichkeitsprüfung von Brachyspiren ungeeignet.

Der Epsilonmeter-Test, oder auch kurz E-Test, stellt eine Sonderform des Agardiffusionstests dar, der eine quantitative Aussage zur Empfindlichkeit der zu untersuchenden Bakterien erlaubt. Beim E-Test wird ein mit einem Wirkstoffgradienten beschickter Streifen auf eine Agarplatte aufgelegt. Die Auswertung der ellipsoiden Hemmzone ermöglicht dabei Aussagen über den Grad der Empfindlichkeit der Bakterien und es kann auch bei diesem Testverfahren anhand fortlaufender Konzentrationsstufen die minimale Hemmkonzentration eines Antibiotikums gegenüber eines Bakteriums festgestellt werden (**Baker et al., 1991; Schwarz, 2001**). Beim E-Test handelt es sich um ein gut durchzuführendes Verfahren, welches auch bei nicht optimaler Standardisierung kritischer Parameter wie z. B. der Inokulationsdichte, reproduzierbare Ergebnisse liefert. Daneben weisen die mit dem E-Test ermittelten MHK-Werte auch eine Korrelation mit MHK-Werten, die mit Hilfe der klassischen Dilutionsmethode erzielt wurden, auf. Auch langsam wachsende und anspruchsvolle Keime wie *Haemophilus spp.* und Anaerobier können zuverlässig getestet werden. Jedoch stehen die hohen Kosten für die Wirkstoffstreifen sowie das fehlende Angebot von Chemotherapeutika, die speziell in der Veterinärmedizin eingesetzt werden, einem breiten Einsatz des E-Testes entgegen (**Altreuther et al., 1997**).

### 2.3.3.2 Dilutionsmethoden

Während mit dem Agardiffusionstest im Wesentlichen nur qualitative Aussagen möglich sind, erlauben Reihenverdünnungstests auch quantitative Aussagen zum Grad der Empfindlichkeit der Bakterien gegenüber Chemotherapeutika (**Schwarz, 2001**). Bereits 1978 empfehlen Hanson und Martin den Agardilutionstest zur Empfindlichkeitsprüfung anaerober Bakterien. Der Agardiffusionstest ist für einige Anaerobier ungeeignet und zum anderen werden durch den Dilutionstest MHK-Werte ermittelt (**Hanson und Martin, 1978**). Diese MHK-Werte liefern am ehesten einen korrekten Wert für die Empfindlichkeit von Mikroorganismen (**Altreuther et al., 1997**). Die sogenannten Reihenverdünnungstests können unter Verwendung fester Medien in Form der Agardilution (ADT) oder unter Verwendung flüssiger Medien in Röhrchen (Makrodilution) oder Mikrotiterplatten (Mikrodilution) durchgeführt werden. Hierbei wird eine definierte Menge an Bakterien mit jeweils aufsteigenden Konzentrationen des zu untersuchenden Wirkstoffs auf die Agaroberfläche (ADT) bzw. in die Nährbouillon (MBDT) zugegeben und der Ansatz inkubiert. Bei der Anzucht der zu prüfenden Bakterien in flüssigen Nährmedien kommen häufig miniaturisierte Systeme wie die sogenannten Mikrodilutionsteste zum Einsatz, die meist industriell vorgefertigt und standardisiert sind. Dadurch können bei der Testdurchführung Arbeitszeit und -kosten eingespart werden. Für

die Antibiotikaempfindlichkeitsprüfung von anspruchsvollen Bakterien wie den Brachyspiren fehlt jedoch meist ein entsprechendes, kommerziell erhältliches Angebot.

Ein Nachteil der Dilutionstests im flüssigen Nährmedium stellt die Tatsache dar, dass eine Kontamination oder eine Mischkultur nur schwer zu erkennen ist, da das Wachstum der Keime lediglich eine Trübung des Nährmediums verursacht. Das Mitführen einer Reinheitskontrolle ist daher unerlässlich und das Problem des Nichterkennens einer Kontaminante kann so auf einfache Weise ausgeschlossen werden. Es sollte darauf geachtet werden, dass die Konzentrationsbereiche so gewählt werden, dass der Übergang von Wachstum zu Hemmung der Bakterien durch das Chemotherapeutikum erkennbar ist, da sonst keine Endpunktbestimmung erfolgen kann (**Kolbert und Shah, 2002**).

Auch aus Sicht der Durchführung eines Resistenzmonitorings ist das Dilutionsverfahren den Diffusionstesten vorzuziehen. Grundvoraussetzung für die Interpretation der dabei ermittelten MHK-Werte sind aber auch hier valide Grenzwerte (**Altreuther et al., 1997**).

Zur Durchführung der Antibiotikaempfindlichkeit von Brachyspiren sind Dilutionstests gut geeignet. Am häufigsten erfolgten Antibiotikaempfindlichkeitsprüfungen mit dem Agardilutionstest. Bouillondilutionstechniken fanden weniger häufig Anwendung, da die Durchführung in 96-well Platten (Miniaturisierung) auf Grund der hohen Wachstumsansprüche des Erregers nicht gelang. Für eine erfolgreiche Durchführung waren mindestens 24-well Platten erforderlich (**Karlsson et al., 2003**).

### 2.3.3.3 Bewertung

Die „Minimale Hemmkonzentration (MHK-Wert)“ stellt die niedrigste Konzentration eines antimikrobiellen Wirkstoffes dar, ab der – unter standardisierten *in vitro*-Bedingungen – eine bakteriostatische Hemmung eintritt (**NCCLS, 2002**). Es wird also die Wirkstoffkonzentration ermittelt, die den Erreger am Wachstum hindert oder abtötet (**Altreuther et al., 1997**). Dabei ist der Trübungsgrad in den Vertiefungen der Mikrotiterplatten beim MBDT bzw. das Wachstum der Bakterien im Bereich des aufgetragenen Inokulums beim ADT mit der Wachstumskontrolle (enthält Bakteriensuspension ohne die Hemmsubstanzen des antimikrobiellen Wirkstoffes) zu vergleichen und in die Auswertbarkeit des Testsystems mit einzubeziehen. Der Vergleich zwischen der „MHK *in vitro*“ und den erreichbaren „Wirkstoffspiegeln *in vivo*“ bildet die Grundlage der bakteriologischen Resistenzbestimmung. Dabei wird, unabhängig vom verwendeten Testsystem, die Antibiotikaempfindlichkeit als „empfindlich“ eingestuft, wenn die MHK des Erregers kleiner ist als die bei üblicher, niedriger Dosierung am Infektionsort erreichbare Antibiotikakonzentration. Als „intermediär“ oder „mäßig empfindlich“ wird der Erreger bezeichnet, wenn seine MHK nur durch die hohe, vom

Hersteller aber noch empfohlene Dosierung des Chemotherapeutikums erreicht wird. Ist ein Erreger „resistent“ gegenüber einem Antibiotikum, so liegt die MHK des Erregers außerhalb der vom Hersteller des antimikrobiell wirksamen Wirkstoffs empfohlenen und von amtlicher Seite zugelassenen therapeutischen Breite und ist somit *in vivo* nicht realisierbar (**Forth et al., 1996**). Für die Einstufung des Erregers als „empfindlich“ oder „resistent“ sind therapeutisch relevante Grenzwerte (sogenannte „Breakpoints“) notwendig (**Kietzmann et al., 2004**). Bei der Festlegung der Breakpoints müssen mikrobiologische Kriterien, chemisch-physikalische Eigenschaften des Antibiotikums, dessen pharmakokinetisches und toxikologisches Profil sowie klinische Kenntnisse berücksichtigt und in Einklang gebracht werden. In diesem Zusammenhang stellt die Unterscheidung von konzentrationsabhängig und zeitabhängig wirksamen Antibiotika eine wesentliche Grundlage der Behandlungsplanung dar. Für konzentrationsabhängig (z. B. Fluorchinolone, Aminoglykoside) wirksame Antibiotika gilt, dass ihre Wirksamkeit in erster Linie vom Erreichen einer ausreichend hohen Spitzenkonzentration abhängig ist. Für die übrigen, derzeit verwendeten Antibiotika, die zeitabhängig wirken, ist die Zeitspanne entscheidend, innerhalb derer die Wirkstoffkonzentration im Zielgewebe ausreichend weit oberhalb der MHK des zu bekämpfenden bakteriellen Erregers liegt. Dabei müssen Breakpoints, die als Grundlage der Entscheidung über den therapeutischen Einsatz eines Antibiotikums und über die jeweiligen Behandlungskriterien dienen sollen, so festgelegt werden, dass ein Behandlungserfolg gewährleistet wird (**Kietzmann, 2003; Kietzmann et al., 2004**).

Da die tatsächlichen Antibiotikakonzentrationen am Infektionsort nicht messbar sind, werden bei der bakteriologischen Resistenzbestimmung leicht messbare „Näherungswerte“ benutzt. Dies sind die durchschnittlichen, in der Mitte eines Applikationsintervalls vorliegenden Plasmakonzentrationen. Diese werden anhand von Normen mit „niedriger und hoher Dosierung realisierbaren Wirkstoffspiegel *in vivo*“ als die Grenzwerte für die therapeutische Beurteilung der minimalen Hemmkonzentration anerkannt. Jedoch setzen diese Beurteilungsmaßstäbe akute Infektionen in gut durchbluteten Organen bei Patienten mit intakter Immunabwehr voraus. Liegen ungünstigere therapeutische Bedingungen vor, z. B. eine chronische Infektion, Diffusionsbarrieren oder eine Immunschwäche, so muss dies ärztlich speziell berücksichtigt werden, z. B. durch relative Dosiserhöhung oder Wahl einer synergistischen Antibiotikakombination (**Forth et al., 1996**). Für Brachyspiren schlugen Ronne und Szancer 1990 bereits ein Schema zur MHK-Grenzwertfestlegung in die Empfindlichkeitsstufen sensibel, intermediär und resistent vor, dass auf Kolongewebekonzentrationen nach Standarddosierung für Tiamulin, Lincomycin, Tylosin und Dimetridazol basierte. Dieses Schema wurde in der vorliegenden Arbeit zur Einteilung der ermittelten MHK-Werte verwendet. Keßler fügte eine Eingruppierung für Valnemulin hinzu und verwandte als Basis die Konzentration an Valnemulin im Koloninhalt bei

Höchstdosierung (**Kessler, 2001**). Jedoch gibt es für Brachyspiren bislang keine international festgelegten Breakpoints, was die Vergleichbarkeit erhobener Bewertungen erschwert.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Bakterienstämme

Als Kontrollstämme für molekularbiologische Fragestellungen wurden von Frau Dr. J. Rohde (Institut für Mikrobiologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover) 13 *Brachyspira* sp.-Isolate zur Verfügung gestellt (**Tabelle 2**). Als Kontrollen für die Antibiotikaempfindlichkeitsprüfung wurden die von der CLSI bzw. DIN vorgegebenen Referenzstämme mitgeführt. Diese Stämme und ihre relevanten Eigenschaften sind in **Tabelle 3** aufgeführt.

**Tabelle 2: Verwendete *Brachyspira* sp.-Kontrollstämme**

Stamm-Bezeichnung	Spezies	Herkunft
B204	<i>B. hyodysenteriae</i>	TiHo
84999-19x/99	<i>B. hyodysenteriae</i>	TiHo
84221/99	<i>B. hyodysenteriae</i>	TiHo
84814/99	<i>B. hyodysenteriae</i>	TiHo
84253-1x/99	<i>B. hyodysenteriae</i>	TiHo
84850-1x/99	<i>B. hyodysenteriae</i>	TiHo
84996-3x/99	<i>B. hyodysenteriae</i>	TiHo
2943	<i>B. hyodysenteriae</i>	TiHo
2933	<i>B. innocens</i>	TiHo
2981	<i>B. pilosicoli</i>	TiHo
2142	<i>B. murdochii</i>	TiHo
2334	<i>B. intermedia</i>	TiHo

**Erläuterungen:** **TiHo** = Dr. J. Rohde, Institut für Mikrobiologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover.

**Tabelle 3: Als Kontrollen für die Antibiotikaempfindlichkeitsprüfung (MBDT) verwendeten Bakterienspezies**

Bakterien-Spezies	ATCC®- Bezeichnung	MHK- Werte* Tylosin [µg /ml]	MHK-Werte* Lincomycin [µg /ml]
<i>Staphylococcus aureus</i>	29213	k. A.	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	25913	0,5 - 4	k. A.
<i>Escherichia coli</i>	25922	> 32 (Soll)	k. A.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	> 32 (Soll)	k. A.

**Erläuterungen:** \* gemäß den Vorgaben der CLSI M31-A2; k. A. = keine Angabe.

### 3.1.2 Herkunft der Proben

Das zur Isolierung von Brachyspiren dienende Probenmaterial stammte aus 75 verschiedenen Schweinebeständen aus Nord-, Süd- und Westdeutschland. Das Material wurde von praktizierenden Tierärzten, Züchtergemeinschaften, Tiergesundheitsdiensten und Einrichtungen der Justus-Liebig-Universität Giessen (Klinik für Wiederkäuer und Schweine, Veterinärpathologie) eingeschickt. Zur Untersuchung auf Brachyspiren dienten Kotproben, Kottupferproben und Darminhalte von überwiegend durchfallkranken Schweinen, die von praktizierenden Tierärzten zu diagnostischen Fragestellungen an das hiesige Institut im Zeitraum von Ende 2003 bis Anfang 2005 eingesandt wurden. Insgesamt wurden 1.549 Kot- und Darminhaltsproben auf TSA<sup>SC</sup>-Agar mit Spectinomycin- und Colistinzusatz ausgestrichen und inkubiert.

## 3.2 Kulturell-bakteriologische Methoden

### 3.2.1 Kulturelle Untersuchung von Tupferproben auf *Brachyspira* spp.

Tupferproben wurden auf TSA<sup>SC</sup>-Agar ausgestrichen und anschließend für fünf bis sieben Tage bei 37 °C unter anaeroben Bedingungen (Anaerobiertopf, Oxoid, Wesel) inkubiert. Zur Erzeugung von Reinkulturen wurden, wenn möglich unter mikroskopischer Kontrolle (Invertoskop, Leica, Darmstadt), verdächtige „Kolonien“ mit einer Impföse entnommen und erneut mittels Verdünnungsausstrich auf TSA<sup>SC</sup>-Agar subkultiviert und anaerob bebrütet. Diese Prozedur wurde so oft wiederholt, bis nach makroskopischer und mikroskopischer Beurteilung die Kulturen frei von „Fremdkolonien“ erschienen. Eine abschließende Beurteilung auf „Reinheit“ erfolgte mittels Dunkelfeld- bzw. Phasenkontrastmikroskopie (DMR, Leica, Darmstadt).

### 3.2.2 Kulturelle Untersuchung von Kotproben auf *Brachyspira* spp.

Kotproben wurden in einer annähernden Konzentration von 20 % [w/v] in fetalem Kälberserum (FKS) suspendiert, niedertourig geklärt (5 min, bei 5.000 U/min) und vom Überstand 50 µl auf eine TSA<sup>SC</sup>-Agar beimpft und mit einer Öse ausgestrichen. Alle weiteren Schritte erfolgten analog der Untersuchung der Tupferproben.

### 3.2.3 Dunkelfeldmikroskopie

Kot- und Darminhaltsproben wurden im Verhältnis von 1:10 [w/v] in 0,89 %-iger NaCl-Lösung suspendiert und 15 µl dieser Suspension anschließend auf dem Objektträger mit Deckglas für einen Zeitraum von durchschnittlich 5 min, aber mindestens 3 min, auf das Vorhandensein von spiralig geformten Bakterien durchmustert. Insgesamt wurden 1.101 Proben (Kotproben und Darminhalte von Schweinen) im Dunkelfeldmikroskop (DMR, Leica, Wetzlar) auf das Vorkommen von Spirochäten untersucht.

### 3.2.4 Anzuchtung von Brachyspiren und Gewinnung von Reinkulturen

In der Dunkelfeldmikroskopie positiv beurteilte Proben wurden auf TSA<sup>SC</sup>-Agar ausgestrichen und unter anaeroben Verhältnissen (Anaerobiertopf, Oxoid, Wesel und Anaerogen-c<sup>®</sup>, Oxoid, Wesel) fünf Tage lang bei 37 °C inkubiert. Die Platten wurden makroskopisch auf das Auftreten einer schwachen oder starken Hämolyse untersucht und im Bereich der Hämolysezonen mikroskopisch (Invertoskop) auf Vorhandensein des für Brachyspiren typischen Wachstums in Form flächig ausgebreiteter, an den Randbereichen unregelmäßiger „Kolonien“ kontrolliert. Im Verdachtsfall wurde mit der Impföse Material unter mikroskopischer Kontrolle entnommen und auf TSA<sup>SC</sup>-Agar im Verdünnungsausstrich beimpft (Subkultur). Diese Prozedur wurde so oft wiederholt, bis die Kulturen nach makroskopischer und mikroskopischer Beurteilung frei von Kolonieförmigkeiten waren, die von denen der Brachyspiren abwichen.

Zur weiteren Prüfung auf Reinheit wurden mehrere Abstriche mit der Impföse in ca. 25 µl 0,89 %-iger NaCl-Lösung suspendiert und im Dunkelfeld- und Phasenkontrastmikroskop untersucht.

Als endgültiges Kriterium für eine Reinkultur galt die Abwesenheit makroskopisch und mikroskopisch (Invertoskop) erkennbarer, von für Brachyspiren abweichenden Kolonieförmigkeiten sowie der ausschließliche Nachweis schlanker, spiralig geformter Bakterien im Dunkelfeld- und Phasenkontrastmikroskop.



### 3.2.5 Herstellung von Brachyspirensuspensionen

Jede auf Reinheit überprüfte Bakterienkultur wurde mit sterilem Aqua dest. von der Platte abgeschwemmt und jeweils 200 µl dieser Bakteriensuspension in Reaktionsgefäße aus Kunststoff (Eppendorf Nr. 3810, Hamburg) einpipettiert. Diese Ansätze wurden für spätere Untersuchungen in der Polymerasekettenreaktion bei -20 °C gelagert.

### 3.2.6 Archivierung von *Brachyspira* spp.-Isolaten

Bis zur weiteren Untersuchung wurden die Brachyspiren-Isolate in dem für Anaerobier geeigneten Transportmedium Port-A-Cul™ (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) bei -70 °C gelagert. Hierzu wurden die Kulturen unter der Reinraumwerkbank von einer mit Brachyspiren bewachsenen TSA<sup>SC</sup>-Agarplatte mit einem sterilen Watteträger (Greiner bio-one, Frickenhausen) entlang des Impfstrichs vorsichtig abgenommen und der Kopf des Watteträgers vollständig in das Port-A-Cul™-Transportmedium eingetaucht. Die beimpften Röhrchen wurden anschließend sofort bei -70 °C eingefroren. Nach Vorversuchen war unter diesen Bedingungen der Erhalt der Vermehrbarkeit der Brachyspiren für einen Zeitraum von mindestens sechs Monaten gewährleistet.

Zur Stammhaltung wurden die Isolate in flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagert. Dazu wurde eine mit Brachyspiren bewachsene TSA<sup>SC</sup>-Agarplatte mit 2 ml sterilem PBS (pH 7,2) unter der Reinraumbank abgeschwemmt und die Bakteriensuspension auf sterile 1 ml Cryogefäße (MAGV, Lohndorf-Rabenau) verteilt und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren.

### 3.2.7 Biochemische Charakterisierung

Die phänotypische Charakterisierung der Isolate erfolgte anhand der in **Tabelle 4** aufgeführten Kriterien. Zum Nachweis der α-Galactosidase, der α-Glucosidase und der β-Glucosidase wurde der rapid ID32A-Teststreifen als Identifizierungssystem für Anaerobier (Biomérieux, Nürtingen) eingesetzt. Zum Nachweis der Indolbildung wurden zusätzlich die Difco DMACA Tropfpipetten (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) verwendet, da diese sensitiver waren, als der rapid ID32A-Teststreifen. Zur Untersuchung auf Vorhandensein von Hippurathydrolasen dienten BBL Taxo Hippurat-Differenzierungsblättchen (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg). Alle Untersuchungsschritte erfolgten nach Angaben der Hersteller. Zur Beurteilung der Hämolyseform (stark bzw. schwach) dienten beimpfte TSA<sup>SC</sup>-Agar nach einer fünftägigen Inkubation unter anaeroben Bedingungen.

**Tabelle 4:** Differenzierung intestinaler Brachyspiren anhand kulturell-biochemischer Merkmale (nach Fellström et al., 1997; Feltrup et al., 1999a; Stanton et al., 1997)

Spezies	Hämolyse	Indol- bildung	Hippurat- hydrolyse	α-Galakto- sidase	α-Gluko- sidase	β-Gluko- sidase
<i>B. hyodysenteriae</i>	stark	- / +	-	-	- / +	+
<i>B. intermedia</i>	schwach	+	-	-	+	+
<i>B. murdochii</i>	schwach	-	-	-	- / +	+
<i>B. innocens</i>	schwach	-	-	+	- / +	- / +
<i>B. pilosicoli</i>	schwach	- / +	+	- / +	- / +	- / +

### 3.2.8 Keimzahlbestimmungen

Zur Bestimmung der Lebendkeimzahl wurde nach jeder Anzucht eine Titration mit anschließender Auswertung nach Spaerman und Kärber durchgeführt (Kärber, 1931; Spearman, 1908). Dafür wurde eine log<sub>10</sub>-Verdünnungsreihe über acht Stufen hergestellt. Je Verdünnungsstufe wurden vier 10 µl-Tropfen auf eine TSA<sup>SC</sup>-Agar (mit Zusatz von Spectinomycin und Colistin) aufgebracht. Nach fünf Tagen Inkubation (anaerob, 37 °C) erfolgte die Auswertung makroskopisch anhand der Hämolyseplaques. Die je nach Verdünnungsstufe entstandenen, vollständigen oder unvollständigen Hämolyseplaques wurden protokolliert und hieraus der Titer der Wachstum-bildenden Einheiten 50 je ml (WbE<sub>50</sub>/ml) geschätzt.

**Optische Dichte.** Die Bestimmung der optischen Dichte von Bakteriensuspensionen erfolgte in einem Spektralphotometer (DU640, Fa. Beckman, Fullerton) bei einer Wellenlänge von 625 nm.

**Zellzählung.** Die Bestimmung der Zellzahl von Brachyspirensuspensionen erfolgte mit Hilfe der Zählkammer nach Thoma. Nach Befüllen der Zählkammer wurden insgesamt mindestens 400 Zellen gezählt. Die Vorverdünnung der Brachyspirensuspension wurde so gewählt, dass je Kleinquadrat zwischen zwei und zwölf Bakterienzellen vorlagen. Die Zellzahl pro Milliliter unverdünnter Mikroorganismensuspension wurde dann nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\text{Gesamtzahl der gezählten Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 4 \times 10^8}{\text{Zahl der ausgezählten Kleinquadrate} \times \text{gemessene Kammertiefe in } \mu\text{m}}$$

### 3.3 Molekularbiologische Methoden

#### 3.3.1 Präparation von DNS aus Bakterienkulturen

Zur DNS-Extraktion wurden 200 µl Brachysporensuspension (siehe Kapitel 3.2.5) in 1 ml Lysispuffer (6 M Guanidinthiocyanat [Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim], 22 mM EDTA, 100 mM Tris HCl [Merck KGaA, Darmstadt], pH 6,4) gegeben, gut geschüttelt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 16.000 x g für eine Minute und der Überstand wurde in ein steriles Eppendorfgefäß mit 50 µl DE-Suspension (20 % [w/v] Kieselgur [SiO<sub>2</sub>, Sigma-Aldrich Chemie GmbH] in 0,17 M HCl) überführt. Nach Inkubation (10 min, RT) und gutem Mischen (30 sek, RT) erfolgte erneut eine Zentrifugation (16.000 x g). Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet nach folgendem Schema gewaschen: zweimal mit 200 µl Waschpuffer (6 M GuSCN, 100 mM Tris-HCl, pH 6,4), zweimal mit 200 µl eiskaltem Ethanol (Merck KGaA, Darmstadt) und zweimal mit 200 µl eiskaltem Aceton (Merck KGaA, Darmstadt). Bei jedem Waschschrift wurde der Ansatz gut geschüttelt (30 s) und zentrifugiert (16.000 x g, 1 min). Nach dem letzten Waschschrift mit Aceton wurde das Pellet getrocknet (15 min, 56 °C), 75 µl Lagerungspuffer (5 mM TrisHCl (pH 8,4), 0,5 mM EDTA) zugegeben und der Ansatz geschüttelt (30 sec) und zentrifugiert (16.000 x g, 1 min). Der Überstand wurde in ein neues, steriles Eppendorfgefäß überführt und die DNS bei -20 °C gelagert.

#### 3.3.2 Präparation von DNS aus Kotproben

Die DNS-Präparation aus Kotproben erfolgte analog der Präparation der Gesamt-DNS (siehe Kapitel 3.1.1), wobei als Ausgangsmaterial 0,2 g Kot in 1 ml Lysispuffer aufgenommen wird.

#### 3.3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

**Bnox-PCR.** Zum Spezies-übergreifenden Nachweis von Brachyspiren wurde die Bnox-PCR, modifiziert nach **Rohde et al. (2002)** verwendet. Hierbei enthielt ein 25 µl-Reaktionsansatz 1 U Platinum *Taq* DNA Polymerase, je 0,1 µM der Primer Bnox<sub>f</sub> und Bnox<sub>r</sub>, 200 µM je Nukleotid (Fa. PAN Systems, Aidenbach), 1 x PCR-Puffer (Fa. Invitrogen, Karlsruhe), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> (50 mM, Fa. Invitrogen, Karlsruhe) und 1 µl Template-DNS. Die Amplifikation erfolgte in einem Thermocycler T-1-Thermoblock (Fa. Biometra, Göttingen) dabei wie folgt. Bei einer Heizdeckeltemperatur von 110 °C wurde ein initialer Denaturierungsschritt (60 sek, 95 °C), gefolgt von 35 Zyklen mit 30 sec Denaturierung bei 94 °C, 40 sec Anlagerung bei

59 °C und 54 sec Verlängerung bei 72 °C, sowie einer finalen Verlängerungsphase (10 min, 72 °C) durchgeführt. Abschließend wurden die Proben bis zur Entnahme auf 4 °C gekühlt.

**Bhyo-PCR.** Für den spezifischen Nachweis von *B. hyodysenteriae*-DNS in Kotproben wurde die Bhyo-PCR eingesetzt (**Herbst et al., 2004**). Ein 25 µl-Reaktionsansatz entsprach dabei dem der Bnox-PCR bis auf die Verwendung der Primer Bhyo1 und Bhyo2 und dem Amplifikationsmuster, das nach dem folgenden Profil ablief: Bei einer Heizdeckeltemperatur von 110 °C wurde ein initialer Denaturierungsschritt (60 sec, 95 °C), gefolgt von 35 Zyklen mit 30 sec Denaturierung bei 94 °C, 30 sec Anlagerung bei 61 °C und 30 sec Verlängerung bei 72 °C, sowie einer finalen Verlängerungsphase (10 min, 72 °C) durchgeführt.

### 3.3.4 Primer

Alle verwendeten Primer wurden von der Firma MWG Biotech AG (Ebersberg) hergestellt. Die Primer wurden als Stocklösungen (100 µM) bei -70 °C und als Gebrauchslösungen (20 µM) bei -20 °C gelagert.

**Tabelle 5: Verwendete Primer**

Primer-name	Sequenz (5'→3)' <sup>1)</sup>	Gen	Organismus	Position <sup>2)</sup>
Bnox f	TAGCYTGC GG TATYGCWCTTTGG	<i>nox</i>	<i>B. hyodysenteriae</i> Stamm B204	345-367
Bnox r	CTTCAGACCAYCCAGTAGAAGCC			<u>1261-1283</u>
Bhyo1	GCTAGTCCTGAAAGTTTGAGAGG	<i>nox</i>	<i>B. hyodysenteriae</i> Stamm B204	407-429
Bhyo2	AGCTTCATCAGTGATTCTTTATCA			<u>817-841</u>

**Erläuterungen:** **bp** = Basenpaare; **2)** Positionsangaben bezogen auf Eintrag U19610 in der NCBI-Datenbank, Gegenstrangprimer sind unterstrichen.

### 3.3.5 Agarosegelelektrophorese

Für die Agarosegelelektrophorese wurden horizontale Flachbettgele mit 1 – 2 % Agarose (Fa. Serva Electrophoresis, Heidelberg) und 1 x TAE als Elektrophoresepuffer eingesetzt. Der Probenauftrag fand nach der Mischung der Einzelproben mit Ladepuffer im Verhältnis 1:5 statt. Zudem wurde ein Molekularmassenstandard (Gene Ruler™ 100 bp DNS Ladder Plus, Fa. Fermentas, St. Leon Roth) mitgeführt. Für die Auftrennung der Proben wurde eine Spannung von ca. 10 V pro cm Elektrodenabstand für 40 bis 120 min angelegt. Die Visualisierung und Fotodokumentation erfolgte mittels Bilddokumentationssystem E.A.S.Y. RH (Typ RH-3) unter UV-Beleuchtung nach Zusatz von Ethidiumbromid (Fa. Serva Electrophoresis,

Heidelberg). Bei der Untersuchung linearer DNS wurde Ethidiumbromid direkt der Agarose zugesetzt (0,02 µg/ml).

### 3.3.6 Speziesbestimmung mittels PCR-RFLP-Analyse

Die Speziesbestimmung erfolgte durch RFLP-Analyse des *nox*-Gens der Isolate. *Nox*-Genfragmente wurden mittels *Bnox*-PCR amplifiziert und jeweils mit dem Restriktionsenzym *DpnII* (New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main) und dem Enzym *Bfml* (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) verdaut. Die Restriktionsansätze (20 µl), bestehend aus 1 x Puffer (enzymspezifisch NEBuffer *DpnII* bzw. Buffer Tango™), 3 U *DpnII* bzw. *Bfml*, sowie 10 µl des PCR-Amplifikats wurden kurz zentrifugiert (16.000 x g, 30 s) und danach inkubiert (37 °C, 16 h). Die Visualisierung erfolgte nach Auftrennung der Fragmente in einem 2 %-igen Agarosegel mit Ethidiumbromid, die Speziesbestimmung anhand der in **Tabelle 6** aufgeführten DNS-Fragmentgrößen.

**Tabelle 6:** RFLP der *nox*-Genfragmente verschiedener *B. spp.* nach Verdau mit *DpnII* und *Bfml* (modifiziert nach Rohde et al., 2002; Townsend et al., 2005).

Spezies	Muster und erwartete Fragmentgrößen [bp] des <i>nox</i> -Amplifikats nach Restriktion			
	Nr.	<i>DpnII</i>	Nr.	<i>Bfml</i>
<i>B. hyodysenteriae</i>	I	43, 212, 684	B	197, 742
<i>B. „suanatina“</i>	I	43, 212, 684	C	248, 691
<i>B. murdochii</i>	II	43, 55, 157, 684	A	27, 197, 211, 504
<i>B. innocens</i>	I	43, 212, 684	A	27, 197, 211, 504
<i>B. pilosicoli</i> identisch mit <i>B. alvinipulli</i>	III	43, 896	B	197, 742
<i>B. intermedia</i>	I	43, 212, 684	D	197, 238, 504
<i>B. aalborgii</i>	IV	939	E	238, 248, 453

## 3.4 Prüfung der Antibiotikaempfindlichkeit der Brachyspiren-Isolate im Agardilutions- und Mikrobouillondilutionstest

### 3.4.1 Antibiotika

Sowohl für den ADT wie auch für den MBDT wurden Tylosintartrat (Sigma Aldrich, Schnelldorf), Lincomycinhydrochlorid (MP Biomedicals, Eschwege), Tiamulinhydrogenfumarat (San-

doz GmbH, Kundl, Österreich) und Valnemulinhydrochlorid (Sandoz GmbH, Kundl, Österreich) verwendet.

### 3.4.2 Antibiotika-Stammlösungen

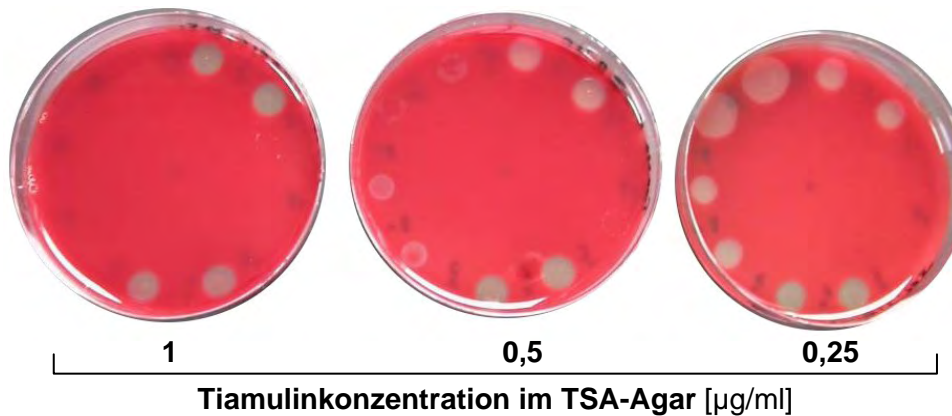
Zur Herstellung der Antibiotika-Stammlösungen wurden die Chemotherapeutika mit der Analysen-Feinwaage (Mettler AE 163, Mettler-Waagen GmbH, Giessen) abgewogen und in sterilem A. dest. vollständig gelöst. Die Stammlösungen beinhalteten die Konzentrationen 100 mg/ml Tylosin, 51,2 mg/ml Lincomycin, 50 µg/ml Valnemulin und 250 µg/ml Tiamulin. Die Antibiotika-Stammlösungen wurden bis zur Verwendung bei 4 °C für einen Zeitraum von maximal sieben Tagen aufbewahrt.

### 3.4.3 Agardilutionstest (ADT)

Die Durchführung des ADT erfolgte in sterilen Petrischalen (Durchmesser 92 mm, 16 mm hoch; Fa. Nerbe plus, Winsen, Luhe) mit TSA-Agar (Merck). Die Mischung der jeweils zwölf in der Konzentration abnehmenden Antibiotikalösungen mit den vorbereiteten TSA-Blutagarsuspensionen erfolgte bei einer Temperatur von 45 °C. Danach wurde der Agar in Petrischalen gegossen und bis zum vollständigen Erstarren des Agars eine Stunde bei RT gehalten und bis zur Verwendung jedoch nicht länger als 48 h bei vier °C aufbewahrt. Die zu untersuchenden Brachyspiren-Isolate wurden auf TSA<sup>SC</sup>-Agar vermehrt, mit 0,15 M NaCl abgeschwemmt und auf eine Dichte entsprechend Mc Farland Standard 1 eingestellt (Inokulum). Von dieser Suspension wurden 10 µl im Doppelansatz auf TSA-Blutagarplatten verimpft und bei 37 °C unter anaeroben Verhältnissen (Anaerobierbox Genbox, Fa. Biomérieux, Nürtingen und Anaerogen-c, Fa. Oxoid, Wesel) für fünf Tage inkubiert. Aus **Abbildung 1** wird die Platzierung der Inokula auf den Testplatten ersichtlich. Als Kontrollen dienten beimpfte TSA-Agarplatten ohne Antibiotikazusatz, die für fünf Tage anaerob (Wachstumskontrolle) und aerob (Kontaminationskontrolle) inkubiert wurden.

**Tabelle 7: Im ADT geprüfte Konzentrationsbereiche der Antibiotika**

Antibiotikum	Konzentrationsbereich der Antibiotika im TSA-Agar [µg/ml]	
	von	bis
Tylosin	2	1024
Lincomycin	1	512
Tiamulin	18,75 x 10 <sup>-4</sup>	4
Valnemulin	18,75 x 10 <sup>-4</sup>	4



**Abbildung 1: Agardilutionstest, 5 d nach anaerober Inkubation und Beimpfung Tiamulin-haltiger TSA-Agar**

Als minimale Hemmkonzentration (MHK) galt die niedrigste Konzentration eines Chemotherapeutikums, die das Wachstum (Hämolyse) der *Brachyspira* spp. in beiden Ansätzen hemmte.

#### 3.4.4 Mikrobouillondilutionstest (MBDT)

Beim MBDT erfolgte die Prüfung der Wirksamkeit der Antibiotika in Nährbouillon. Hierzu wurden verschiedene Verdünnungen des Antibiotikums in Nährbouillon mit *Brachyspiren* beimpft, anaerob inkubiert und die niedrigste Konzentration ermittelt, die das Wachstum der Bakterien hemmte (MHK).

##### 3.4.4.1 Geprüfte Antibiotikakonzentrationen

Von den Antibiotikastammlösungen wurden zunächst Vorverdünnungen in brain heart infusion broth (BHI) mit einem Anteil von 20 % fetalem Kälberserum (FBS), im Folgenden bezeichnet als BHIF, hergestellt. Die weitere Verdünnung mit BHIF in log<sub>2</sub>-Schritten führte zu den in **Tabelle 8** dargestellten Konzentrationsbereichen über 23 Verdünnungsstufen.

**Tabelle 8: Im MBDT geprüfte Antibiotikakonzentrationen**

Antibiotikum	Konzentrationsbereich der Antibiotika [ $\mu\text{g/ml}$ ]	
	von	bis
Tylosin	$9,55 \times 10^{-4}$	$4,0 \times 10^3$
Lincomycin	$4,86 \times 10^{-4}$	$2,0 \times 10^3$
Tiamulin	$5,23 \times 10^{-7}$	$2,5 \times 10^0$
Valnemulin	$2,40 \times 10^{-8}$	$1,0 \times 10^{-1}$

### 3.4.4.2 Durchführung des Mikrobouillondilutionstests

Die Durchführung des MBDT erfolgte in Mikrotiterplatten mit 96 flachen Vertiefungen (Fa. TPP, Schweiz). Je Ansatz dienten zwei Platten, die in Längsrichtung hintereinander positioniert wurden. Zunächst wurden die Vertiefungen mit jeweils 100 µl der Nährbouillon (BHIF) befüllt. Anschließend erfolgte die Zugabe der Antibiotikavorverdünnungen in BHIF im Doppelansatz zu den Reihen A – H der Platte 1. Daraufhin wurden die Antibiotikavorverdünnungen in BHIF über 23 Verdünnungsstufen in log<sub>2</sub>-Schritten über beide Platten bis Reihe 11 der Platte 2 verdünnt (**Abbildung 2**). Reihe 12 der Platte 2 diente als Wachstumskontrolle. Im Anschluss erfolgte die Zugabe der Inokula (in 0,15 M NaCl abgeschwemmte *B. spp.*-Suspension mit einer Dichte entsprechend Mc Farland Standard 1, 1:20 [v/v] in BHIF verdünnt) in Mengen von jeweils 100 µl je Vertiefung. Unter anaeroben Bedingungen (Anaerobierbox Fa. Biomérieux, Nürtingen) wurden die Platten daraufhin auf dem Schüttelinkubator bei leicht kreisender Bewegung für fünf Tage bei 37 °C inkubiert. Bei Auswertung der Testansätze auf dem Leuchttisch zeigte sich im Falle des Wachstums der Bakterien eine deutlich sichtbare, nebelartige Trübung der Nährbouillon. Die Grenze zu nicht-bewachsenen Vertiefungen (durchscheinende, gelbe Färbung) war deutlich erkennbar. Zur Kontrolle wurden von den Ansätzen im Grenzbereich zwischen Wachstum und Nicht-Wachstum als auch von der Wachstumskontrolle Präparate angefertigt und im Dunkelfeldmikroskop begutachtet. Als MHK-Wert wurde die niedrigste Verdünnung des Antibiotikums protokolliert, die in beiden Testansätzen zu einer Hemmung des Wachstums führte.

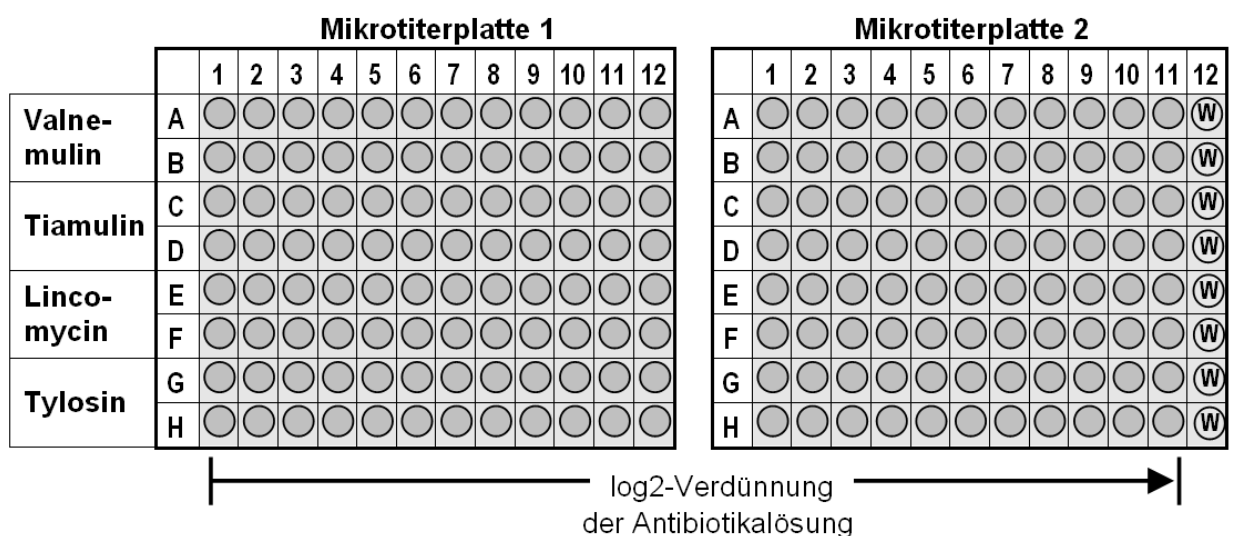


Abbildung 2:

#### Platzierung und Verdünnung der Antibiotika im MBDT

W = Wachstumskontrolle (Vertiefung mit Bakteriensuspension, aber ohne antimikrobiellen Wirkstoff).



### 3.4.5 Bewertung der Ergebnisse

Für die Bewertung des Resistenzverhaltens der Brachyspiren in die Stufen empfindlich, intermediär und resistent wurden die aufgrund der ermittelten Wirkstoffkonzentrationen der Antibiotika im Gewebe empfohlenen „Breakpoints“ herangezogen (**Tabelle 9**).

#### 3.4.5.1 Definitionen der MHK<sub>50</sub>- und MHK<sub>90</sub>-Werte

Die MHK<sub>50</sub> gibt die Konzentration eines Antibiotikums in µg/ml an, die 50 % der getesteten *Brachyspira* spp.-Isolate in ihrem Wachstum zu hemmen vermag. Entsprechend gibt die MHK<sub>90</sub> die Menge eines Antibiotikums in µg/ml an, die 90 % der *Brachyspira* spp.-Isolate in ihrem Wachstum hemmt.

**Tabelle 9:** Gewebekonzentrationen und MHK-Grenzwerte für verschiedene gegen Brachyspiren wirksame Antibiotika (zitiert nach Keßler, 2001).

Antibiotikum	Serum [µg/ml]	Kolon- gewebe [µg/g]	Koloninhalt [µg/g]	MHK-Grenzwerte		
				empfind- lich	inter- mediär	resistent
Lincomycin <sup>1</sup>	0,6 - 1	2	36	≤ 4	> 4 ≤ 36	> 36
Tylosin <sup>1</sup>	7	1	–	≤ 1	> 1 ≤ 4	> 4
Tiamulin <sup>1</sup>	1	2 - 4	8 - 13 <sup>2</sup>	≤ 1	> 1 ≤ 4	> 4
Valnemulin	–	0,16 <sup>3</sup>	1,68 <sup>3</sup>	≤ 1	> 1 ≤ 5	> 5
Valnemulin	–	0,48 <sup>4</sup>	5,20 <sup>4</sup>	≤ 1	> 1 ≤ 5	> 5

**Erläuterungen:** **1)** nach Ronne und Scanzer (1990); **2)** nach Scanzer (2001); **3)** 3,8 mg/kg KGW (n. Fa. Novartis); **4)** 11,7 mg/kg KGW (n. Fa. Novartis)

**empfindlich** = MHK-Wert < halbe Wirkstoffkonzentration im Kolongewebe bzw. Serum bei Standarddosierung;

**intermediär** = MHK-Wert > halbe Wirkstoffkonzentration im Kolongewebe bzw. Serum bei Standarddosierung;

**resistent** = MHK-Wert > Wirkstoffkonzentration im Kolongewebe bzw. -inhalt oder Serum bei Standarddosierung.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Diagnostische Untersuchungen

#### 4.1.1 Ergebnisse der Dunkelfeldmikroskopie und kulturellen Untersuchungen

Von den 1.084 mittels Dunkelfeldmikroskopie direkt auf das Vorkommen von Spirochäten untersuchten Proben wurden in 481 (44,4 %) der Proben Spirochäten nachgewiesen. Unter Verwendung der *B. hyodysenteriae*-spezifischen Bhyo-PCR wurden 318 der 1.361 Proben (23,4 %) positiv getestet. In 94 Fällen gelang es, *Brachyspira* spp.-Feldisolate zu kultivieren und nach mehreren Passagen in Reinkultur darzustellen. In 45 der 94 Proben (47,9 %) waren bereits im Dunkelfeldmikroskop Spirochäten sichtbar gewesen und 43 der 94 Proben (45,7 %) waren mittels Bhyo-PCR als positiv für *B. hyodysenteriae* bestimmt worden (Tabelle 10).

Alle Isolate wiesen auf dem TSA<sup>SC</sup>-Agar nur unter dem Invertoskop erkennbares Wachstum in Form flächig am Impfstrich ausgebreiteter Kolonien auf. Einziges makroskopisch erkennbares Wachstumskriterium war das Auftreten einer entweder vollständigen oder unvollständigen Hämolyse. Im Dunkelfeldmikroskop waren sehr schlanke, spiralig geformte Bakterien nachweisbar.

**Tabelle 10: Nachweis von *B. spp.* bzw. schraubenförmigen Bakterien in 1549 Kot- und Darminhaltsproben mittels Dunkelfeldmikroskopie, Bhyo-PCR und kultureller Untersuchung**

Dunkelfeldmikroskopie zum Nachweis von Spirochäten	Anzahl Proben	PCR-Nachweis von <i>B. hyodysenteriae</i> in Kotproben [n]			Kultureller Nachweis von <i>B. spp.</i> [n]	
		positiv	negativ	n. u.	positiv	negativ
<b>Positiv</b>	481	159	268	54	45	436
<b>Negativ</b>	603	60	494	49	2	601
<b>nicht untersucht</b>	465	99	281	85	47	418
<b>Insgesamt</b>	<b>1.549</b>	<b>318</b>	<b>1.043</b>	<b>188</b>	<b>94</b>	<b>1.455</b>

**Erläuterung:** n. u. = nicht untersucht.

#### 4.1.2 Herkunft der Brachyspiren-Isolate

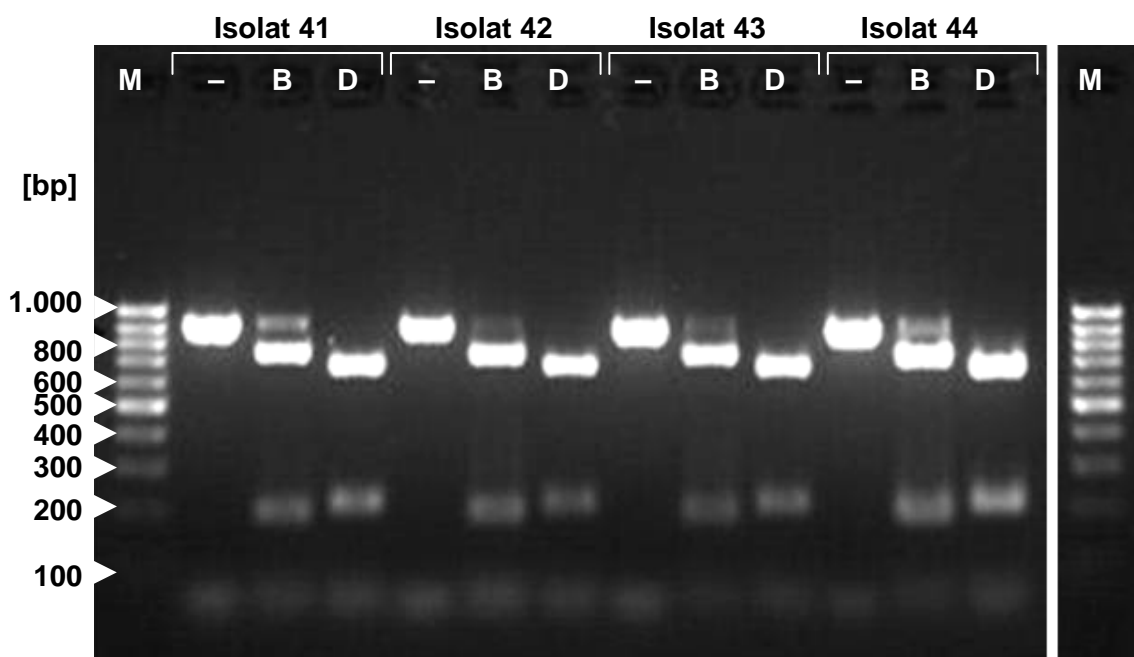
Alle 94 Brachyspiren-Isolate stammten ausschließlich aus den alten Bundesländern. Prozentual waren die Anteile aus Hessen (44,4 %), Schleswig-Holstein (23,5 %) und Niedersachsen (8,6 %) am höchsten (**Abbildung 3**). Allerdings standen auch Isolate aus Rheinland-Pfalz (2,5 %), Nordrhein-Westfalen (6,2 %), Baden-Württemberg (3,7 %) und Bayern (7,4 %) zur Verfügung. Bei 3,7 % der Isolate war die Herkunft innerhalb Deutschlands nicht genauer nachvollziehbar, sie wurden von Tiergesundheitsdiensten in Hessen eingeschickt.



Abbildung 3: Herkunft der 94 *B. spp.*-Feldisolate von Schweinen aus Deutschland.  
● = ein Isolat.

#### 4.1.3 Molekularbiologische Charakterisierung der *Brachyspira*-Feldisolate

Was die molekularbiologische Differenzierung der Isolate anbetrifft, so konnte von allen Isolaten (n = 94) mit Verwendung der *nox*-Gen-spezifischen Primer in der Bnox-PCR ein Amplifikat von jeweils ca. 939 bp generiert werden. Bei der Analyse der Restriktionsfragmente nach Verdau der *nox*-Gen-Fragmente mit *DpnII* und *Bfml* wiesen die erhaltenen Muster in allen Fällen Übereinstimmungen mit den nach **Tabelle 6** (Seite **32**) zu erwartenden Mustern auf. In keinem Fall trat ein abweichendes Muster auf. Ein Beispiel für diese Analyse ist der **Abbildung 4** zu entnehmen. Insgesamt wurden 48 (51,1 %) Isolate als *B. hyodysenteriae*, acht (8,5 %) als *B. pilosicoli*, 33 als *B. innocens* (35,1 %), zwei Isolate als *B. intermedia* (2,1 %) und drei Isolate als *B. murdochii* (3,2 %) identifiziert.



**Abbildung 4:** Speziesbestimmung der *Brachyspira*-Isolate 41 bis 44 anhand der Restriktionsmuster der *nox*-Gen-Fragmente nach *DpnII*- und *Bfml*-Verdau.

Dargestellt sind jeweils das (-) unverdaute, (B) *Bfml*- und (D) *DpnII*-verdaute Amplifikat der DNS der Bnox-PCR; 2 % Agarosegel nach Etidiumbromidfärbung.

M: Gene Ruler™ 100 bp.

#### 4.1.4 Phänotypische Charakterisierung der *Brachyspira*-Feldisolate

Die Ergebnisse der phänotypischen Charakterisierung der Isolate bis zur Speziesebene differierten zum Teil erheblich von den Resultaten der molekularbiologischen Differenzierung. Darüber hinaus liessen sich sieben Isolate durch Bestimmung ihrer biochemischen Leistungen nicht eindeutig zuordnen (siehe **Tabelle 11**).

Bei der Beurteilung der Hämolyse zeigte sich, dass es bei Zunahme der Keimmenge, wie sie in sehr üppig gewachsenen Kulturen vorkommt, zu einer unterschiedlichen Ausprägung der Hämolyseform kommen konnte. So gingen *Brachyspira* spp. mit unvollständiger Hämolyse in sehr dicht bewachsenen Arealen zu einer vollständigen Hämolyse über.

Von den nach ihren biochemischen Leistungen als *B. hyodysenteriae* charakterisierten Isolaten (n = 44) wurden mittels PCR/RFLP 42 übereinstimmend als *B. hyodysenteriae* und jeweils ein weiteres Isolat als *B. innocens* und *B. murdochii* identifiziert. Bei den nach ihrem Phänotyp als *B. pilosicoli* beurteilten Stämmen (n = 17) lagen nach dem RFLP-Muster neben *B. pilosicoli* (n = 7) sowohl *B. hyodysenteriae* (n = 3) und *B. innocens* (n = 7)-Isolate vor. Von den 24 phänotypisch als *B. innocens* diagnostizierten Isolaten wurden 22 mittels RFLP bestätigt, je ein weiteres erwies sich jedoch als *B. pilosicoli* bzw. *B. murdochii*. Die beiden, nach dem Phänotyp als *B. murdochii*, eingeordneten Isolate wiesen in einem Fall die in der RFLP für *B. hyodysenteriae* zu erwartenden Bandenmuster auf, das andere Isolat die für *B. hyodysenteriae*. Sieben Isolate waren mit den klassischen Methoden (Biochemie) nicht zuzuordnen. In jeweils zwei Fällen handelte es sich nach der molekularbiologischen Analyse um *B. hyodysenteriae* und *B. intermedia*, in drei Fällen um *B. innocens*. Die hämolytische Aktivität erwies sich ausschließlich bei allen mittels PCR/RFLP als *B. hyodysenteriae* identifizierten Isolaten als stark. Alle übrigen Stämme wiesen eine schwache Hämolyse auf.

Eine Gegenüberstellung der nach phänotypischen Kriterien und den Ergebnissen der RFLP erfolgten Speziesdifferenzierung ist in **Tabelle 11** dargestellt.

Im Folgenden wird lediglich die Speziesdifferenzierung gemäß den Ergebnissen der RFLP berücksichtigt.

**Tabelle 11: Vergleichende Speziesdifferenzierung von 94 *Brachyspira* spp.-Isolaten mittels biochemischer Methoden und PCR/RFLP**

Ergebnis der Speziesdifferenzierung mittels biochemischer Parameter		Ergebnis der Speziesdifferenzierung mittels PCR/RFLP	
<i>Brachyspira</i> sp.	[n]	<i>Brachyspira</i> sp.	[n]
<i>B. hyodysenteriae</i>	44	<i>B. hyodysenteriae</i>	42
		<i>B. murdochii</i>	1
		<i>B. innocens</i>	1
<i>B. pilosicoli</i>	17	<i>B. hyodysenteriae</i>	3
		<i>B. pilosicoli</i>	7
		<i>B. innocens</i>	7
<i>B. innocens</i>	24	<i>B. pilosicoli</i>	1
		<i>B. innocens</i>	22
		<i>B. murdochii</i>	1
<i>B. murdochii</i>	2	<i>B. hyodysenteriae</i>	1
		<i>B. murdochii</i>	1
nicht zuzuordnen	7	<i>B. hyodysenteriae</i>	2
		<i>B. innocens</i>	3
		<i>B. intermedia</i>	2

## 4.2 Antibiotikaempfindlichkeitsprüfungen

### 4.2.1 Etablierung eines Mikrobouillondilutionstests für die Antibiotikaempfindlichkeitsprüfung von Brachyspiren

#### 4.2.1.1 Vergleich der Ergebnisse des etablierten MBDT anhand der Untersuchung verschiedener Kontrollstämme von *B. hyodysenteriae* mit bekannten MHK-Werten<sup>1)</sup>

Wie aus **Tabelle 12** hervorgeht, stimmen die mit dem in Giessen entwickelten MBDT in 96 Wellplatten ermittelten MHK-Werte tendentiell mit dem QuickMIC<sup>®</sup>-assay (Bouillondilutionstest in 24-Wellplatten) überein. Insgesamt ist der Giessener MBDT jedoch sensitiver, dies bedeutet, dass die MHK-Werte niedriger waren gegenüber den im QuickMIC<sup>®</sup> bestimmten Werten. Dies trifft besonders für die Pleuromutiline Tiamulin und Valnemulin zu.

**Tabelle 12: Im MBDT (Giessen) und QuickMIC<sup>®</sup> bestimmte MHK-Werte unterschiedlicher Antibiotika gegenüber verschiedenen *B. hyodysenteriae*-Kontrollstämmen (n = 6)**

Stamm-Name	MHK-Werte [ $\mu\text{g/ml}$ ] in MBDT (Giessen)				MHK-Werte [ $\mu\text{g/ml}$ ] in MBDT (QuickMIC <sup>®</sup> )			
	Tylosin	Linco-mycin	Tiamulin	Valnemulin	Tylosin	Linco-mycin	Tiamulin	Valnemulin
84999-19x/99	128	2	$\leq 0,0156$	$\leq 0,0039$	n.u.	n.u.	0,125 <sup>2)</sup>	0,063 <sup>2)</sup>
84221/99 <sup>1)</sup>	32	1	0,5	0,0625	n.u.	n.u.	2-4 <sup>2)</sup>	2 <sup>2)</sup>
84814/99	64	2	$\leq 0,0156$	$\leq 0,0039$	n.u.	n.u.	0,063 <sup>2)</sup>	0,063 <sup>2)</sup>
84253-1x/99	128	4	2,0	0,125	> 128	8	2	1
84850-1x/99	32	1	$\leq 0,0156$	$\leq 0,0039$	> 128	8	0,125	< 0,031
84996-3x/99	64	2	0,0625	0,0625	64	4	0,25	0,25

**Erläuterung:** <sup>1)</sup> Dieser Stamm vermehrte sich in Bouillon sehr schlecht, Ablesung und Auswertung erfolgte mikroskopisch.

<sup>2)</sup> Nach Angaben von Dr. J. Rohde, Tierärztliche Hochschule Hannover

#### 4.2.1.2 Reproduzierbarkeit des Mikrobouillondilutionstests

Um die Reproduzierbarkeit des Mikrobouillondilutionstests zu überprüfen, wurde ein *B. hyodysenteriae*-Teststamm wiederholt an verschiedenen Arbeitstagen auf seine Antibiotikaempfindlichkeit gegenüber Tylosin, Lincomycin, Tiamulin und Valnemulin überprüft (siehe **Tabelle 13**).

Es zeigte sich, dass für die vier geprüften Antibiotika eine sehr gute Reproduzierbarkeit vorlag, da es nur zu Abweichungen um maximal eine Verdünnungsstufe bei den MHK-Werten für Lincomycin, Tiamulin und Valnemulin gab. Alle sechs für Tylosin ermittelten Werte ergaben stets den gleichen MHK-Wert.

**Tabelle 13:** Im MBDT gegenüber dem *B. hyodysenteriae*-Stamm B 204 ermittelte MHK-Werte verschiedener Antibiotika in zeitlich unterschiedlichen Versuchsansätzen (n = 6)

Versuch-Nr.	MHK-Werte [ $\mu\text{g/ml}$ ]			
	Tylosin	Lincomycin	Tiamulin	Valnemulin
1	64	4	0,125	0,125
2	64	2	0,125	0,125
3	64	2	0,125	0,125
4	64	2	0,125	0,125
5	64	2	0,125	0,125
6	64	2	0,0625	0,0625

#### 4.2.1.3 Einfluss der *in vitro*-Passagezahl auf die MHK-Werte

Um zu überprüfen, ob eine *in vitro*-Kultivierung der Isolate einen Einfluss auf die MHK-Werte hat, wurden die Referenzstämme für die untersuchten *Brachyspira*-Spezies wiederholt auf festen Nährmedien subkultiviert und anschließend die MHK im MBDT ermittelt. Die getesteten Kulturen differierten hierbei um mindestens drei (*B. pilosicoli*-Stamm 2981) bis maximal 57 (*B. hyodysenteriae*-Stamm B204) Passagen (**Tabelle 14**).

Bei einem der drei getesteten *B. hyodysenteriae*-Stämme, dem Stamm 2943, wurden MHK-Werte gegenüber einem Antibiotikum gemessen, die um mehr als zwei Verdünnungsstufen differierten. So nahm die Sensibilität gegenüber Lincomycin, Tiamulin und Valnemulin mit zunehmender Passagezahl um vier, acht bzw. sieben Verdünnungsstufen zu. Bei den beiden anderen *B. hyodysenteriae*-Stämmen B204 und B8044 variierte die MHK trotz deutlich höherer Passageunterschiede dagegen um maximal eine Verdünnungsstufe.

Bei allen vier weiteren, getesteten Stämmen zeigten sich insbesondere Änderungen in den MHK-Werten gegenüber Valnemulin. Während bei dem *B. pilosicoli*- und dem *B. murdochii*-Stamm nach drei bzw. 16 Passagen die MHK-Werte um vier bzw. fünf Stufen fielen, nahm er Wert bei dem *B. innocens*-Stamm nach 16 Passagen um vier Verdünnungsstufen zu.



**Tabelle 14: Einfluss der Passagezahl auf die MHK-Werte der *B.*-Spezies-Referenzstämme (Ergebnisse aus dem MBDT).**

Spezies	Stamm	Pas- sage <sup>1</sup>	MHK-Werte [ $\mu\text{g/ml}$ ]			
			Tylosin	Lincomycin	Tiamulin	Valnemulin
<i>B. hyodysenteriae</i>	B204	0	> 125	8	$\leq 0,0195$	$\leq 0,00313$
		+42	> 125	8	0,039	0,00313
		+57	> 125	16	0,039	$\leq 0,00313$
<i>B. hyodysenteriae</i>	B8044	0	> 125	8	$\leq 0,0195$	$\leq 0,00313$
		+42	> 125	16	0,039	$\leq 0,00313$
<i>B. hyodysenteriae</i>	2943	0	500	32	$\geq 2,5$	0,1
		+15	250	8	0,3125	0,1
		+28	250	2	0,0098	0,00078
<i>B. pilosicoli</i>	2981	0	$\geq 4000$	64	0,078	0,013
		+3	$\geq 4000$	32	0,0195	0,00078
<i>B. intermedia</i>	2334	0	1,95	0,125	0,0098	0,00039
		+12	1000	16	0,0195	0,000195
<i>B. innocens</i>	2933	0	0,975	0,0625	0,00122	0,000024
		+16	0,244	0,0625	0,00488	0,00039
<i>B. murdochii</i>	2142	0	1000	32	0,039	0,00078
		+16	0,975	0,0156	0,00488	0,000024

**Erläuterung:** 1) Die Passagezahl bezieht sich auf die Anzahl der Passagen im Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, da für einige Isolate keine Angaben zur vorherigen Passagierung vorhanden waren.

#### 4.2.2 Antibiotikaempfindlichkeit von *B. spp.* Feldisolaten im Agardilutionstest

Die unterschiedliche Anzahl der *Brachyspira spp.*-Feldisolate, die im Agardilutionstest bzw. im Mikrobouillondilutionstest auf ihre Antibiotikaempfindlichkeit hin geprüft wurden, resultiert in Mängeln bei der Anzucht auf festem Nährboden (ADT) oder flüssiger Nährbouillon (MBDT). Eine visuelle Veranschaulichung der Ergebnisse zur MHK-Wert-Bestimmung im ADT ist beispielhaft für Tiamulin in **Abbildung 1** dargestellt. Wie aus der Abbildung hervorgeht, ist die Grenze zwischen Wachstum und Nicht-Wachstum durch die bei Vermehrung der *Brachyspiren* auftretende Hämolyse makroskopisch eindeutig nachweisbar.

Die für Tylosin, Lincomycin, Tiamulin und Valnemulin ermittelten MHK-Werte gegenüber den verschiedenen *B. spp.* sind getrennt nach Antibiotikum in den folgenden Abbildungen und als  $\text{MHK}_{50}$ - und  $\text{MHK}_{90}$ -Werte tabellarisch dargestellt. Die verwendeten Grenzwerte zur

Einstufung der Bakterien als sensibel, intermediär bzw. resistent orientieren sich an den von Keßler festgelegten MHK-Grenzwerten (siehe **Tabelle 9**, Seite 36).

#### 4.2.2.1 Tiamulin

Wie aus **Abbildung 5** hervorgeht, reichten die für Tiamulin ermittelten MHK-Werte im ADT von  $< 0,001875$  bis  $> 4$   $\mu\text{g/ml}$ . Der überwiegende Anteil der Stämme lag dabei im empfindlichen und drei Isolate von *B. hyodysenteriae* im intermediären Bereich. Lediglich zwei Isolate von *B. hyodysenteriae* bzw. drei der sonstigen *B. spp* erforderten zur Hemmung ihres Wachstums eine Tiamulinkonzentration von  $> 4$   $\mu\text{g/ml}$  (resistent).

Bei Zusammenfassung der für Tiamulin ermittelten MHK-Werte waren mit Ausnahme von drei *B. hyodysenteriae*- und *B. intermedia*-Isolaten 90 % aller untersuchten Spezies durch Tiamulinkonzentrationen im Wachstum hemmbar, die im Gewebe erreicht werden können. Bezogen auf die Hälfte der untersuchten Isolate war dies bei allen geprüften Spezies der Fall (**Tabelle 15**).

#### 4.2.2.2 Valnemulin

Die im ADT für Valnemulin ermittelten MHK-Werte gegenüber den *B. hyodysenteriae* und den weiteren, vom Schwein isolierten *B. spp.* sind in **Abbildung 6** dargestellt. Bis auf insgesamt vier Isolate (drei Isolate *B. hyodysenteriae*, ein Isolat sonstige *B. spp.*) wies Valnemulin bei allen anderen geprüften Isolaten MHK-Werte auf, die zur Einstufung dieser Stämme als Valnemulin-empfindlich führte. Keines der untersuchten Isolate wurde als resistent bewertet.

Nach Analyse der bei den einzelnen Spezies nachgewiesenen MHK-Werte von Valnemulin lagen die  $\text{MHK}_{50}$ -Werte insgesamt im empfindlichen Bereich. Mit Ausnahme von *B. intermedia* waren auch die  $\text{MHK}_{90}$ -Werte entsprechend zu bewerten. Mit dem Ziel einer Wachstumshemmung von mindestens 90 % aller *B. intermedia*-Isolate waren dagegen Hemmstoffkonzentrationen von 2  $\mu\text{g/ml}$  Valnemulin (intermediärer Bereich) erforderlich (**Tabelle 16**).

## Anzahl Isolate

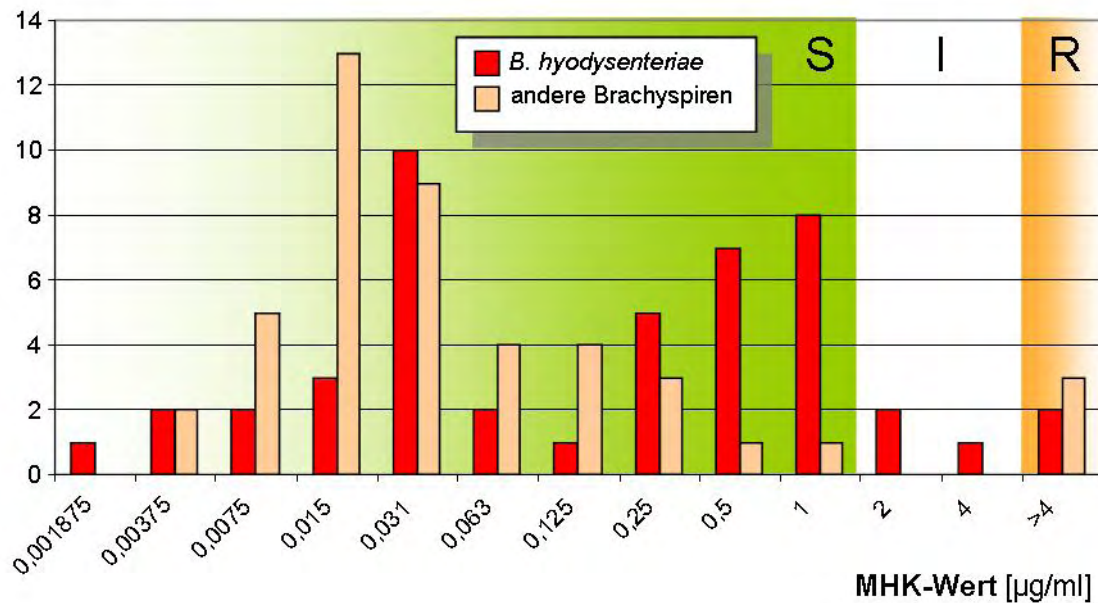
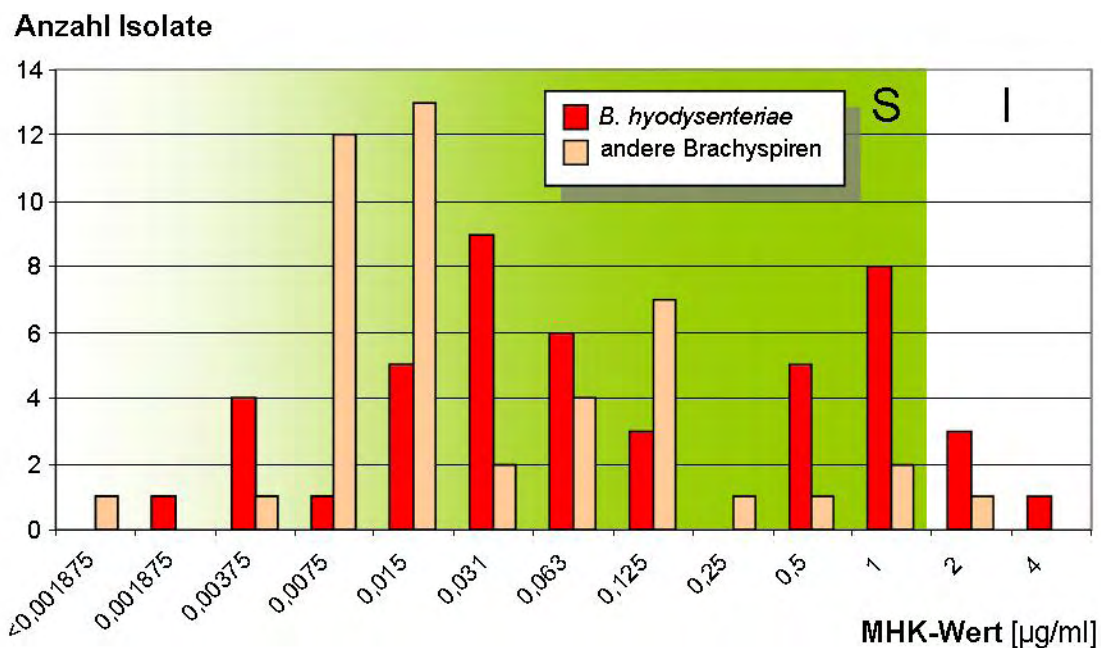


Abbildung 5: Im Agardilutionstest gegenüber *B. spp.*-Isolate ermittelte MHK-Werte von Tiamulin  
 Einstufung der Bakterien: S (sensibel):  $MHK \leq 1$ ,  
 I (intermediär):  $MHK > 1$  und  $< 4$ ; R (resistent):  $MHK \geq 4$  µg/ml.

Tabelle 15: Für Tiamulin im ADT ermittelte  $MHK_{50}$ - und  $MHK_{90}$ -Werte gegenüber den verschiedenen *B. spp.*

<i>Brachyspira</i> spp.	Anzahl Isolate	MHK-Werte von Tiamulin [µg/ml]	
		$MHK_{50}$	$MHK_{90}$
<i>B. hyodysenteriae</i>	46	0,25	2
<i>B. pilosicoli</i>	8	0,031	0,125
<i>B. intermedia</i>	2	0,015	>4
<i>B. innocens</i>	32	0,015	0,25
<i>B. murdochii</i>	3	0,031	0,5



**Abbildung 6:** Im Agardilutionstest ermittelte MHK-Werte für Valnemulin von *B. spp.*-Isolaten  
 Einstufung der Bakterien: S (sensibel): MHK  $\leq$  1,  
 I (intermediär): MHK  $>$ 1 und  $<$  5; R (resistent): MHK  $\geq$  5 µg/ml.

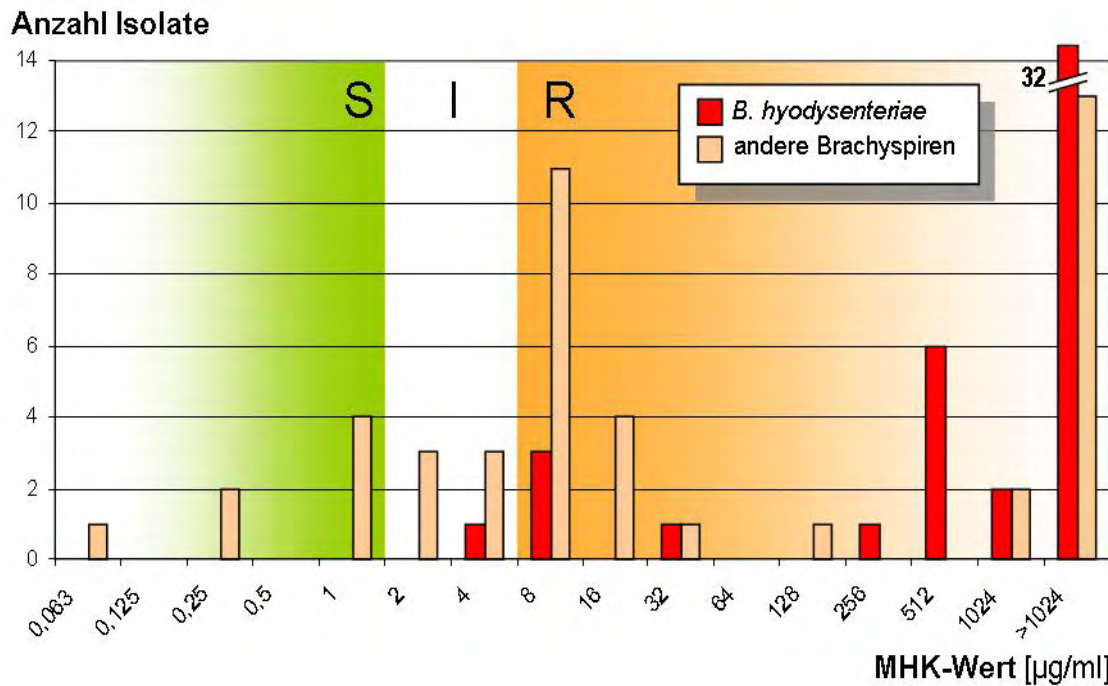
**Tabelle 16:** Für Valnemulin im ADT ermittelte MHK<sub>50</sub> und MHK<sub>90</sub>-Werte gegenüber den verschiedenen *B. spp.*

<i>Brachyspira</i> spp.	Anzahl Isolate	MHK-Werte von Valnemulin [µg/ml]	
		MHK <sub>50</sub>	MHK <sub>90</sub>
<i>B. hyodysenteriae</i>	46	0,063	1
<i>B. pilosicoli</i>	7	0,015	0,125
<i>B. intermedia</i>	4	1	2
<i>B. innocens</i>	31	0,015	0,125
<i>B. murdochii</i>	3	0,125	0,5

#### 4.2.2.3 Tylosin

Ein Großteil der Isolate wies im Agardilutionstest MHK-Werte auf, die oberhalb des für Tylosin gewählten Konzentrationsbereichs ( $>$ 1024 µg/ml) lagen (**Abbildung 7**). So waren 45 der *B. hyodysenteriae*-Isolate gegen Tylosin resistent und ein Isolat intermediär. Von den sonstigen *B. spp.*-Isolaten (außer *B. hyodysenteriae*) wurden 32 Isolate als resistent, sechs Isolate als intermediär und sieben als empfindlich getestet.

Die  $MHK_{50}$  und  $MHK_{90}$ -Werte von Tylosin wiesen bei *B. hyodysenteriae*, *B. intermedia* und *B. murdochii* jeweils vergleichbare Höhen auf und lagen im resistenten Bereich. Lediglich der  $MHK_{50}$ -Wert gegenüber den *B. pilosicoli*-Isolaten war deutlich niedriger und lag im empfindlichen Bereich (Tabelle 17).



**Abbildung 7:** Im Agardilutionstest gegenüber *B. spp.*-Isolate ermittelte MHK-Werte von Tylosin  
Einstufung der Bakterien: S (sensibel):  $MHK \leq 1$ ,  
I (intermediär):  $MHK > 1$  und  $< 4$ ; R (resistent):  $MHK \geq 4$  µg/ml.

**Tabelle 17:** Für Tylosin im ADT ermittelte  $MHK_{50}$  und  $MHK_{90}$ -Werte gegenüber den verschiedenen *B. spp.*

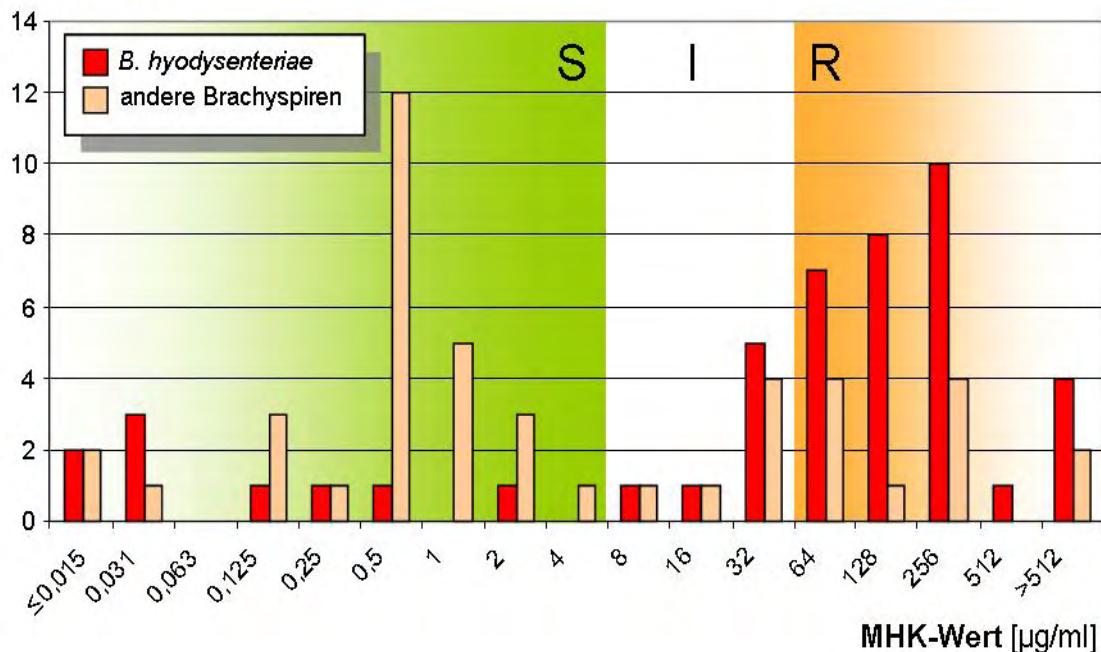
<i>Brachyspira</i> spp.	Anzahl Isolate	MHK-Werte von Tylosin [µg/ml]	
		$MHK_{50}$	$MHK_{90}$
<i>B. hyodysenteriae</i>	46	>1024	>1024
<i>B. pilosicoli</i>	8	2	8
<i>B. intermedia</i>	2	1024	>1024
<i>B. innocens</i>	32	16	>1024
<i>B. murdochii</i>	3	>1024	>1024

#### 4.2.2.4 Lincomycin

Bei den im ADT gegen Lincomycin geprüften *Brachyspira* spp. fällt eine breite Verteilung der MHK-Werte auf. Bei den *B. hyodysenteriae*-Isolaten lagen 30 im resistenten, sieben im intermediären und neun im empfindlichen Bereich. Bei den sonstigen *B. spp.* wurde der überwiegende Teil als empfindlich bewertet ( $n = 28$ ), vier Isolate waren intermediär und 13 Isolate resistent.

Was den  $MHK_{50}$ -Wert von Lincomycin anbetrifft fällt auf, dass dieser Wert lediglich für die *B. hyodysenteriae*-Stämme im resistenten Bereich gemessen wurde. Bei den anderen *B. spp.* liegt der  $MHK_{50}$ -Wert darunter (intermediärer bzw. empfindlicher Bereich). Unter Zugrundelegung einer Wirksamkeit gegen 90 % aller Isolate waren für *B. hyodysenteriae*, *B. innocens* und *B. murdochii* Lincomycinkonzentrationen erforderlich, die mit in dem Bereich liegen, der im Gewebe nach **Tabelle 9** nicht erreicht wird. Lediglich für *B. pilosicoli* und *B. intermedia* waren die  $MHK_{90}$ -Werte von Lincomycin dem empfindlichen bzw. intermediären Konzentrationsbereich zuzuordnen.

Anzahl Isolate



**Abbildung 8:** Im Agardilutionstest gegenüber *B. spp.*-Isolate ermittelte MHK-Werte von Lincomycin  
 Einstufung der Bakterien: S (sensibel):  $MHK \leq 4$ ,  
 I (intermediär):  $MHK > 4$  und  $< 36$ ; R (resistent):  $MHK \geq 36 \mu\text{g/ml}$ .

**Tabelle 18:** Für Lincomycin im ADT ermittelte MHK<sub>50</sub> und MHK<sub>90</sub>-Werte gegenüber den verschiedenen *B. spp.*

<i>Brachyspira</i> spp.	Anzahl Isolate	MHK-Werte von Lincomycin [ $\mu\text{g/ml}$ ]	
		MHK <sub>50</sub>	MHK <sub>90</sub>
<i>B. hyodysenteriae</i>	46	64	512
<i>B. pilosicoli</i>	8	1	2
<i>B. intermedia</i>	2	16	32
<i>B. innocens</i>	32	0,5	256
<i>B. murdochii</i>	3	32	128

#### 4.2.2.5 Vergleichende Darstellung der im ADT erzielten MHK<sub>90</sub>-Werte der Antibiotika gegenüber den *Brachyspira* spp.-Isolaten

In **Tabelle 19** sind die Ergebnisse der Antibiotikaempfindlichkeitsprüfung der *B. spp.*-Isolate dargestellt als MHK<sub>90</sub>-Werte der zur Prüfung verwendeten Antibiotika vergleichend gegenübergestellt. Tylosin wies gegenüber den meisten geprüften Stämmen übereinstimmend sehr hohe MHK<sub>90</sub>-Werte (jeweils  $>1024 \mu\text{g/ml}$ ) auf. Die geprüften *B. pilosicoli*-Isolate erreichten einen deutlich niedrigeren MHK<sub>90</sub>-Wert (8  $\mu\text{g/ml}$ ).

Die übrigen Antibiotika zeigten dagegen speziesabhängige Unterschiede in der Wirksamkeit (ausgedrückt als MHK<sub>90</sub>-Wert). Bei Lincomycin war der MHK<sub>90</sub>-Wert gegenüber *B. pilosicoli* um ein Vielfaches niedriger als gegenüber den übrigen Spezies. Im Gegensatz hierzu wiesen die Pleuromutiline Tiamulin und Valnemulin ihre niedrigsten MHK<sub>90</sub>-Werte gegenüber *B. innocens* und *B. pilosicoli* auf. Die jeweils höchsten Werte wurden für *B. intermedia* ermittelt.

#### 4.2.2.6 Zusammenfassende Beurteilung der Ergebnisse der MHK-Wert-Prüfung im ADT im Hinblick auf die Antibiotikaresistenz der *Brachyspira* spp.-Isolate

Gegenüber **Tylosin** waren alle *B. hyodysenteriae*-, *B. intermedia*- und *B. murdochii*-Isolate im Agardilutionstest resistent (**Tabelle 20**). Von den *B. pilosicoli*- und *B. innocens*-Isolaten erwiesen sich dagegen 25 bzw. 15 % als empfindlich.

Bei **Lincomycin** traten die größten Unterschiede im Resistenzverhalten zwischen den getesteten *Brachyspira* spp. auf. Die Resistenzraten reichten von 0 bis 65 % (*B. hyodysenteriae*). Von den *B. innocens*- und *B. murdochii*-Isolaten wurden 31 % der Stämme als resistent eingestuft.

Gegenüber **Tiamulin** erwiesen sich ca. vier Prozent der *B. hyodysenteriae*-Isolate und 50 % der *B. intermedia*- bzw. *B. innocens*-Stämme als resistent. Im Gegensatz hierzu war bei keinem der untersuchten *B. pilosicoli*- und *B. murdochii*-Isolate eine Tiamulinresistenz vorhanden.

Bei den Untersuchungen mit **Valnemulin** als Antibiotikum lagen die MHK-Werte im empfindlichen und z. T. im intermediären Bereich (10 % der *B. hyodysenteriae* und 50 % der *B. intermedia*-Isolate). MHK-Werte im resistenten Bereich waren nicht nachweisbar.

**Tabelle 19: MHK<sub>90</sub>-Werte von Tylosin, Lincomycin, Tiamulin und Valnemulin gegenüber den *Brachyspira* spp.-Isolaten.**

<i>Brachyspira</i> spp.	Anzahl Isolate	MHK <sub>90</sub> -Werte [ $\mu\text{g/ml}$ ]			
		Tylosin	Lincomycin	Tiamulin	Valnemulin
<i>B. hyodysenteriae</i>	46	>1024	512	2	1
<i>B. pilosicoli</i>	8	8	2	0,125	0,125
<i>B. intermedia</i>	2	>1024	32	>4	2
<i>B. innocens</i>	32	>1024	256	0,25	0,125
<i>B. murdochii</i>	3	>1024	128	0,5	0,5



**Tabelle 20: Antibiotikaresistenz von *Brachyspira* spp.-Isolaten von Mastschweinen aus den Jahren 2003 bis 2005 gemessen an den im ADT ermittelten MHK-Werten.**

Antibiotikum	Beurteilung der MHK im ADT	<i>Brachyspira</i> spp.-Isolate [%]				
		<i>B. hyodysenteriae</i>	<i>B. pilosicoli</i>	<i>B. intermedia</i>	<i>B. innocens</i>	<i>B. murdochii</i>
		[n = 46]	[n = 8]	[n = 2]	[n = 32]	[n = 3]
Tylosin	empfindlich	0	25,0	0	15,6	0
	intermediär	0	50,0	0	6,3	0
	resistent	100	25,0	100	78,1	100
Lincomycin	empfindlich	19,6	87,5	0	59,4	33,3
	intermediär	15,2	12,5	100	9,4	33,3
	resistent	65,2	0	0	31,3	33,3
Tiamulin	empfindlich	86,9	100	50	93,8	100
	intermediär	8,7	0	0	0	0
	resistent	4,4	0	50	6,2	0
Valnemulin	empfindlich	89,1	100	50	100	100
	intermediär	10,9	0	50	0	0
	resistent	0	0	0	0	0

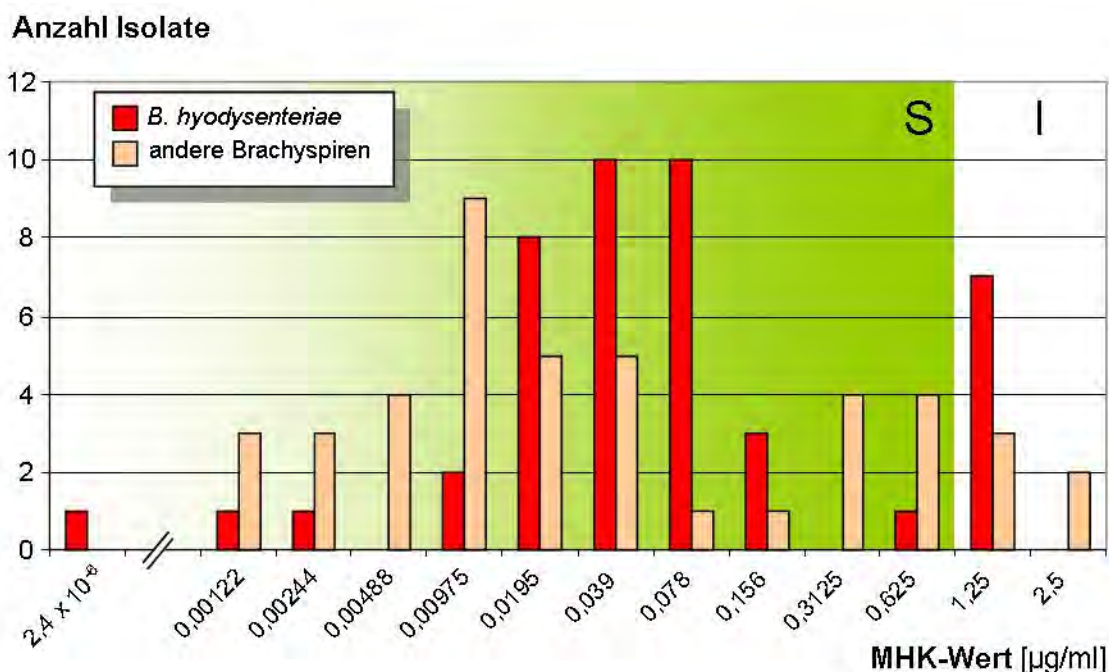
### 4.2.3 MHK-Wert-Bestimmung im Mikrobouillondilutionstest (MBDT)

#### 4.2.3.1 Tiamulin

Gegen Tiamulin waren die *B. murdochii*-Isolate am empfindlichsten. Diesen schlossen sich die MHK-Ergebnisse der *B. pilosicoli*-Isolate an. Den höchsten MHK<sub>90</sub>-Wert von 1,25 µg/ml wiesen die *B. hyodysenteriae*-, *B. intermedia*- und *B. innocens*-Isolate auf.

**Tabelle 21:** Für Tiamulin im MBDT ermittelte MHK<sub>50</sub>- und MHK<sub>90</sub>-Werte gegenüber den verschiedenen *B. spp.*

<i>Brachyspira</i> spp.	Anzahl Isolate	MHK-Werte von Tiamulin [µg/ml]	
		MHK <sub>50</sub>	MHK <sub>90</sub>
<i>B. hyodysenteriae</i>	46	0,039	1,25
<i>B. pilosicoli</i>	6	0,039	0,625
<i>B. intermedia</i>	2	0,625	1,25
<i>B. innocens</i>	31	0,0098	1,25
<i>B. murdochii</i>	3	0,039	0,3125



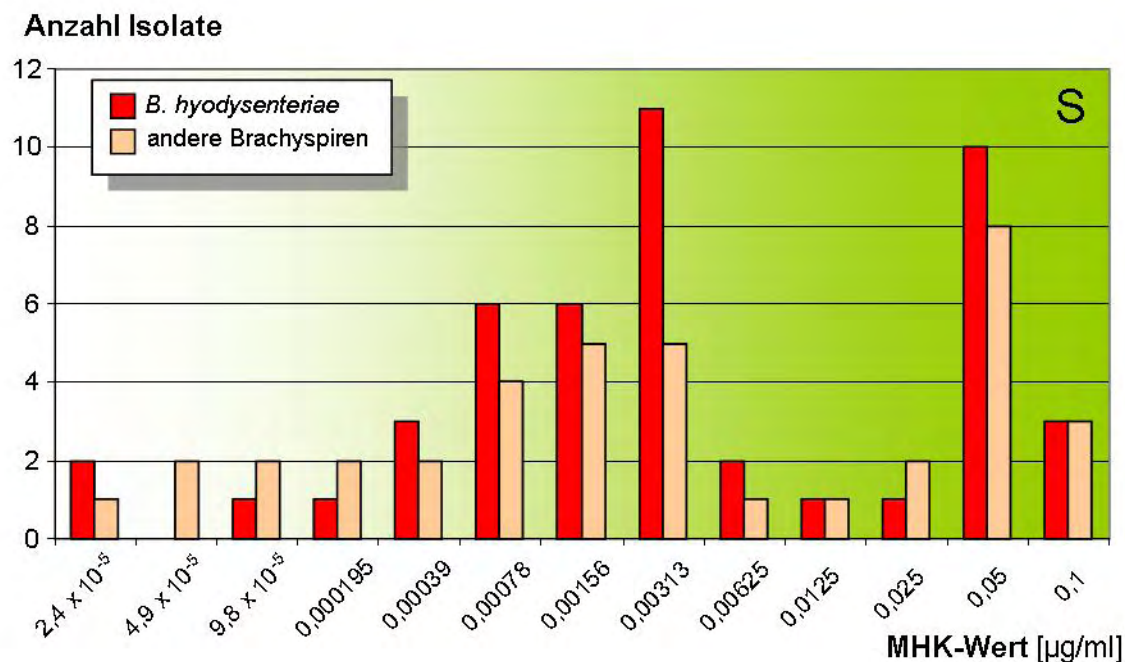
**Abbildung 9:** Im Mikrobouillondilutionstest ermittelte MHK-Werte in µg / ml gegenüber Tiamulin  
 Einstufung der Bakterien: S (sensibel): MHK ≤ 1,  
 I (intermediär): MHK >1 und < 4; R (resistent): MHK ≥ 4 µg/ml.

#### 4.2.3.2 Valnemulin

Gegen Valnemulin wurden bei allen *Brachyspira*-Isolaten im MBDT die niedrigsten MHK<sub>50</sub>- und MHK<sub>90</sub>-Werte ermittelt. Besonders niedrige Konzentrationsstufen erreichten die Isolate von *B. innocens*. Die MHK<sub>50</sub>- und MHK<sub>90</sub>-Werte für *B. pilosicoli* und *B. intermedia* waren identisch.

**Tabelle 22:** Für Valnemulin im MBDT ermittelte MHK<sub>50</sub> und MHK<sub>90</sub>-Werte gegenüber den verschiedenen *B. spp.*

<i>Brachyspira</i> spp.	Anzahl Isolate	MHK-Werte von Valnemulin [ $\mu\text{g/ml}$ ]	
		MHK <sub>50</sub>	MHK <sub>90</sub>
<i>B. hyodysenteriae</i>	46	0,00313	0,05
<i>B. pilosicoli</i>	6	0,05	0,1
<i>B. intermedia</i>	2	0,05	0,1
<i>B. innocens</i>	31	0,00156	0,025
<i>B. murdochii</i>	3	0,05	0,05



**Abbildung 10:** Im Mikrobouillondilutionstest ermittelte MHK-Werte in  $\mu\text{g/ml}$  gegenüber Valnemulin

Einstufung der Bakterien: S (sensibel): MHK  $\leq 1$ , I (intermediär):

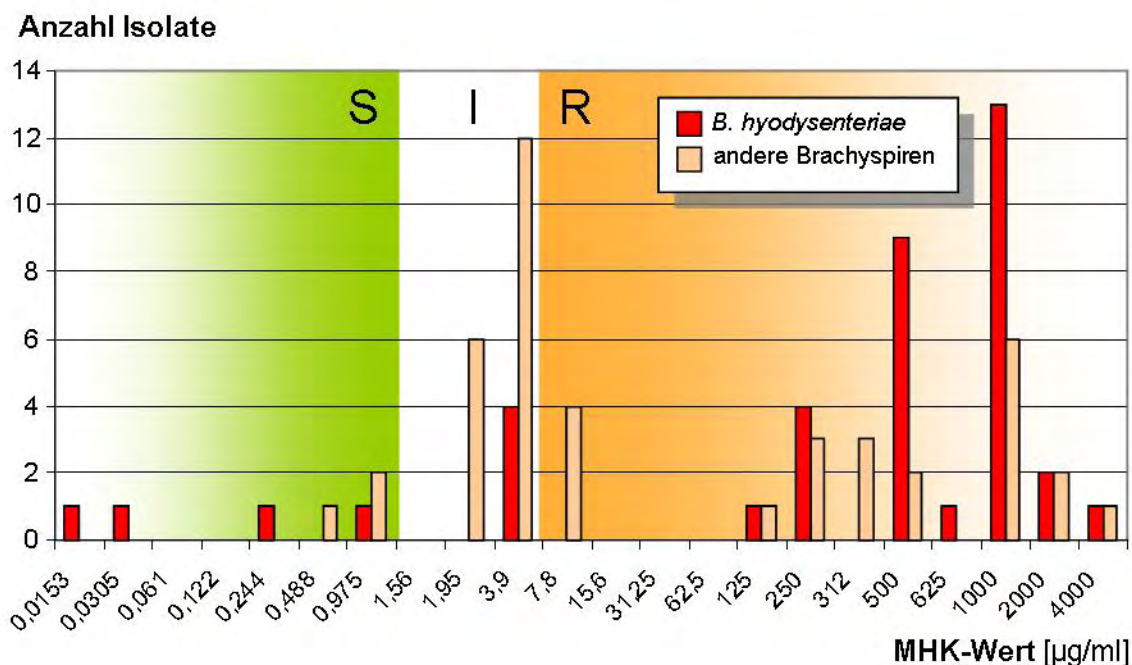
MHK  $> 1$  und  $< 4$ ; R (resistent): MHK  $\geq 4 \mu\text{g/ml}$  (nach Tiamulinangaben)

### 4.2.3.3 Tylosin

Die im MBDT getesteten *B. pilosicoli*- und *B. innocens*-Isolate zeigten gleiche MHK<sub>50</sub>- und MHK<sub>90</sub>-Werte. Die *B. hyodysenteriae*- und *B. murdochii*-Isolate ähneln sich auch in ihren MHK<sub>50</sub>- und MHK<sub>90</sub>-Werten, wohingegen die *B. intermedia*-Isolate besonders hohe MHK<sub>90</sub>-Werte zeigten.

**Tabelle 23:** Für Tylosin im MBDT ermittelte MHK<sub>50</sub> und MHK<sub>90</sub>-Werte gegenüber den verschiedenen *B. spp.*

<i>Brachyspira</i> spp.	Anzahl Isolate	MHK-Werte von Tylosin [µg/ml]	
		MHK <sub>50</sub>	MHK <sub>90</sub>
<i>B. hyodysenteriae</i>	46	500	1.000
<i>B. pilosicoli</i>	6	3,9	1.000
<i>B. intermedia</i>	2	250	2.000
<i>B. innocens</i>	31	3,9	1.000
<i>B. murdochii</i>	3	250	1.000



**Abbildung 11:** Im Mikrobouillondilutionstest ermittelte MHK-Werte in µg / ml gegenüber Tylosin  
 Einstufung der Bakterien: S (sensibel): MHK ≤ 1,  
 I (intermediär): MHK >1 und < 4; R (resistent): MHK ≥ 4 µg/ml.

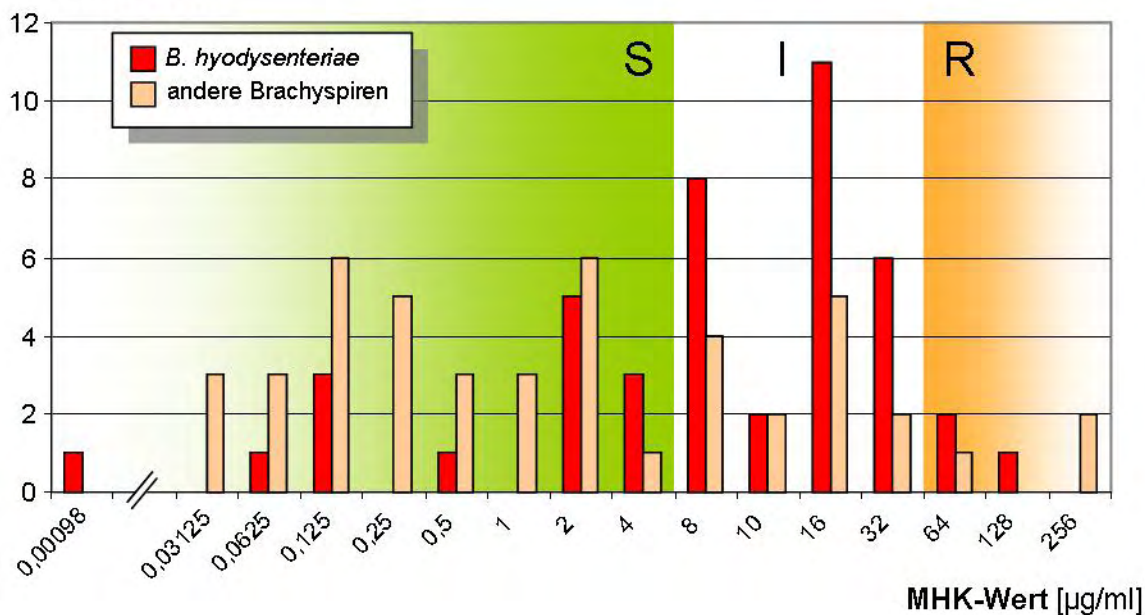
#### 4.2.3.4 Lincomycin

Am empfindlichsten gegenüber Lincomycin zeigten sich die *B. pilosicoli*-Isolate, gefolgt von den *B. intermedia*-Isolaten.

**Tabelle 24:** Für Lincomycin im MBDT ermittelte  $MHK_{50}$  und  $MHK_{90}$ -Werte gegenüber den verschiedenen *B. spp.*

<i>Brachyspira</i> spp.	Anzahl Isolate	MHK-Werte von Lincomycin [ $\mu\text{g/ml}$ ]	
		$MHK_{50}$	$MHK_{90}$
<i>B. hyodysenteriae</i>	46	10	32
<i>B. pilosicoli</i>	6	0,006	0,050
<i>B. intermedia</i>	2	0,625	1,25
<i>B. innocens</i>	31	0,5	16
<i>B. murdochii</i>	3	8	16

Anzahl Isolate



**Abbildung 12:** Im Mikrobouillondilutionstest ermittelte MHK-Werte in  $\mu\text{g/ml}$  gegenüber Lincomycin  
 Einstufung der Bakterien: S (sensibel):  $MHK \leq 4$ ,  
 I (intermediär):  $MHK > 4$  und  $< 36$ ; R (resistent):  $MHK \geq 36$   $\mu\text{g/ml}$ .

#### 4.2.3.5 Vergleichende Darstellung der im MBDT erzielten $MHK_{90}$ -Werte der Antibiotika gegenüber den *Brachyspira* spp.-Isolaten

In **Tabelle 25** sind die Ergebnisse der Antibiotikaempfindlichkeitsprüfung der *B. spp.*-Isolate dargestellt als  $MHK_{90}$ -Werte der zur Prüfung verwendeten Antibiotika vergleichend gegenübergestellt.

Tylosin wies gegenüber den meisten geprüften Stämmen übereinstimmend sehr hohe  $MHK_{90}$ -Werte (jeweils  $\geq 1.000 \mu\text{g/ml}$ ) auf, die im resistenten Bereich angesiedelt waren. Dagegen wurden sehr niedrige  $MHK_{90}$ -Werte gegen Valnemulin und Tiamulin ermittelt. Die  $MHK_{90}$ -Werte gegen Valnemulin lagen bei allen *Brachyspira* Spezies im sensiblen Bereich. Dagegen lagen die  $MHK_{90}$ -Werte gegen Tiamulin bei *B. hyodysenteriae*, *B. intermedia* und *B. innocens* im intermediären Bereich, die bei *B. pilosicoli* und *B. murdochii* aber auch im sensiblen Bereich. Gegenüber Lincomycin wurden für alle *Brachyspira* Spezies  $MHK_{90}$ -Werte im intermediären Bereich an der Grenze zum resistenten Bereich festgestellt.

**Tabelle 25:** Die im MBDT ermittelten  $MHK_{90}$ -Werte von Tylosin, Lincomycin, Tiamulin und Valnemulin gegenüber den *Brachyspira* spp.-Isolaten.

<i>Brachyspira</i> spp. *	$MHK_{90}$ -Werte [ $\mu\text{g/ml}$ ]			
	Tylosin	Lincomycin	Tiamulin	Valnemulin
<i>B. hyodysenteriae</i>	1.000	32	1,25	0,05
<i>B. pilosicoli</i>	1.000	64	0,625	0,1
<i>B. intermedia</i>	2.000	16	1,25	0,1
<i>B. innocens</i>	1.000	16	1,25	0,025
<i>B. murdochii</i>	1.000	16	0,3125	0,05

\* Die Anzahl der jeweils untersuchten Stämme sind den vorgehenden Tabellen zu entnehmen.

#### 4.2.4 Gegenüberstellung der im ADT und MBDT ermittelten $MHK_{50}$ - und $MHK_{90}$ -Werte von Tylosin, Lincomycin, Tiamulin und Valnemulin gegenüber den verschiedenen *B. spp.*

Die im MBDT ermittelten  $MHK_{50}$ -Werte fielen in der überwiegenden Zahl der Fälle z. T. beträchtlich niedriger aus, als die im ADT ermittelten Werte. Besonders ausgeprägt waren diese Unterschiede bei Prüfung des Antibiotikums Valnemulin. Nur vereinzelt lagen umgekehrte Verhältnisse vor (**Tabelle 26**).

Was die nach den Ergebnissen im ADT und MBDT errechneten  $MHK_{90}$ -Werte anbetrifft, so waren in der überwiegenden Zahl der Fälle die im MBDT bestimmten Werte vergleichbar den

Ergebnissen der  $MHK_{50}$ -Bestimmung niedriger. Auch hier lag nur vereinzelt die umgekehrte Situation vor (**Tabelle 27**).

#### **4.2.5 Gegenüberstellung der vergleichend im ADT und im MBDT ermittelten Antibiotikaempfindlichkeit (empfindlich, intermediär, resistent) der untersuchten *B. spp.***

Bei der Prüfung auf Übereinstimmung zwischen den nach den Ergebnissen des ADT und des MBDT vorgenommenen Bewertungen als empfindlich, intermediär und resistent fällt auf, dass die Übereinstimmungsraten zwischen beiden Testsystemen bei den Pleuromutilinen Tiamulin und Valnemulin weitaus grösser waren als bei Tylosin und besonders Lincomycin (**Tabelle 26**). Unter ausschliesslicher Berücksichtigung der Bewertungen empfindlich und resistent ergibt sich bei dem Vergleich der Testsysteme für die einzelnen Antibiotika folgende Situation.

##### **Tylosin**

Ein übereinstimmendes Ergebnis (resistent bzw. empfindlich) lag in 57 Fällen vor. Vier nach dem MBDT als resistent beurteilte Stämme erwiesen sich im ADT als empfindlich. Umgekehrt waren drei nach dem ADT als resistent beurteilte Isolate im MBDT als empfindlich beurteilt worden. Bezogen auf die Bewertungen resistent und empfindlich machten die diskrepanten Ergebnisse einen Anteil von 10,9 % aus.

##### **Lincomycin**

In 19 bzw. drei Fällen führten die Untersuchungen im ADT und MBDT zu gleichlautenden Ergebnissen: empfindlich bzw. resistent. Widersprüchliche Resultate lagen in insgesamt 15 Fällen (40,54 %) vor. Hierauf entfielen elf Stämme, die im ADT, nicht aber im MBDT und vier weitere, die zuvor im MBDT aber nicht im ADT, als resistent beurteilt wurden.

##### **Tiamulin**

Gegenüber Tiamulin erwiesen sich 72 Isolate nach den Ergebnissen beider Testsysteme als empfindlich. Lediglich in zwei Fällen (2,7 %) kam es zu einem konträren Ergebnis. Diese Stämme waren nach den Ergebnissen des ADT Tiamulin-resistent, jedoch im MBDT empfindlich.

**Valnemulin**

Bei Verwendung von Valnemulin war mit 81 gleichlautenden Ergebnissen (empfindlich) die Übereinstimmungsrate zwischen beiden Testsystemen am höchsten.

**Tabelle 26: Vergleichende Darstellung der im ADT und im MBDT ermittelten MHK<sub>50</sub>-Werte der Antibiotika gegenüber den verschiedenen *B. spp.***

Antibiotikum	MHK-Wert-Bestimmung	MHK <sub>50</sub> -Werte [ $\mu\text{g/ml}$ ] *				
		<i>B. hyodysenteriae</i>	<i>B. pilosicoli</i>	<i>B. intermedia</i>	<i>B. innocens</i>	<i>B. murdochii</i>
Tylosin	ADT	1024	4	> 1024	16	8
	MBDT	500	3,9	250	3,9	250
Lincomycin	ADT	128	<b>0,125</b>	<b>0,015</b>	1	<b>0,25</b>
	MBDT	10	<b>2</b>	<b>1</b>	0,5	<b>8</b>
Tiamulin	ADT	0,25	0,015	> 4	0,031	0,031
	MBDT	0,039	0,039	0,625	0,0098	0,039
Valnemulin	ADT	0,063	0,015	32	0,015	0,125
	MBDT	0,00313	0,05	0,05	0,00156	0,05

\* Die Anzahl der untersuchten Stämme sind den vorgehenden Tabellen zu entnehmen.

**Tabelle 27: Vergleichende Darstellung der im ADT und MBDT ermittelten MHK<sub>90</sub>-Werte der Antibiotika gegenüber den verschiedenen *B. spp.***

Antibiotikum	MHK-Wert-Bestimmung	MHK <sub>90</sub> -Werte [ $\mu\text{g/ml}$ ] *				
		<i>B. hyodysenteriae</i>	<i>B. pilosicoli</i>	<i>B. intermedia</i>	<i>B. innocens</i>	<i>B. murdochii</i>
Tylosin	ADT	>1.024	>1.024	>1.024	>1.024	>1.024
	MBDT	1.000	1.000	2.000	1.000	1.000
Lincomycin	ADT	512	2	4	>512	128
	MBDT	32	64	16	16	16
Tiamulin	ADT	2	0,063	>4	1	0,031
	MBDT	1,25	0,625	1,25	1,25	0,3125
Valnemulin	ADT	1	0,25	0,25	0,25	0,125
	MBDT	0,05	0,1	0,1	0,025	0,05

\* Die Anzahl der untersuchten Stämme sind den vorgehenden Tabellen zu entnehmen.

78 *B. spp.*-Isolate waren gegen **Valnemulin** im ADT und MBDT empfindlich. Ein Isolat war im ADT empfindlich und im MBDT resistent. Keines der Isolate war im ADT oder MBDT resistent.



**Tabelle 28: Vergleichende Darstellung der in ADT und MBDT ermittelten Antibiotikaempfindlichkeit verschiedener *B. spp.*-Isolate (n= 88) von Schweinen**

Antibiotikum	ADT- Beurteilung	MBDT-Beurteilung [Anzahl der Stämme]		
		empfindlich	intermediär	resistent
Tylosin	empfindlich	<b>0</b>	3	5
	intermediär	0	<b>3</b>	3
	resistent	3	15	<b>56</b>
Lincomycin	empfindlich	<b>19</b>	14	2
	intermediär	4	<b>11</b>	1
	resistent	11	23	<b>3</b>
Tiamulin	empfindlich	<b>71</b>	7	0
	intermediär	6	<b>0</b>	0
	resistent	2	2	<b>0</b>
Valnemulin*	empfindlich	<b>78</b>	0	1
	intermediär	8	<b>1</b>	0
	resistent	0	0	<b>0</b>

\* Für die Beurteilung der Antibiotikaresistenz gegenüber Valnemulin wurden die für Tiamulin etablierten „Breakpoints“ herangezogen.

## 5 Besprechung der Ergebnisse

Bei der Prüfung der Antibiotikaempfindlichkeit von Brachyspiren liegen wenig Untersuchungen vor, weil die Gewinnung von Feldisolaten mit einem hohen Aufwand verbunden ist und die Kultivierung der Erreger sehr anspruchsvoll ist.

Im Rahmen der eigenen Untersuchungen war eine unerwartet hohe Probenzahl für die Isolierung der 94 Feldisolate erforderlich. Nur von in etwa jeder zwanzigsten untersuchten Kotprobe konnten *B. spp.* schließlich in Reinkultur vermehrt werden. Dies steht in krassem Gegensatz zu Angaben anderer Autoren (**Dünser et al., 1997; Hommez et al., 1998**), die über eine weitaus höhere Isolierungsrate berichteten. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die genannten Autoren entweder Probenmaterial von klinisch Dysenterie-auffälligen Tieren in die Untersuchung einbezogen oder auf Material, bei dem nur ein kurzer Zeitraum von der Entnahme bis zur Kultivierung vorlag, zurückgreifen konnten. Die in der vorliegenden Studie verwendeten Proben, die in der überwiegenden Zahl der Fälle von praktizierenden Tierärzten eingesandt wurden, stammten nicht ausschließlich von durchfallkranken Schweinen, sondern auch von gesunden Tieren, bei denen zu Kontrollzwecken Untersuchungen auf Durchfallerreger in Auftrag gegeben worden waren.

Ferner ist zu berücksichtigen, dass die meisten Proben auf dem Postweg versandt wurden. Dies bedingt eine Transportzeit von in der Regel 48 h. Bei einer Überlebenszeit der Brachyspiren unter strikt aeroben Bedingungen von maximal 15 h (Richter, pers. Mitteilung) ist somit von einer erheblichen Reduzierung der Vermehrungsfähigkeit der Erreger in dem Probenmaterial auszugehen. Die nachgewiesene Isolierungsrate von 5,7 % dürfte daher ein sehr realistischer Wert bei der kulturellen Untersuchung auf Brachyspiren für ein mikrobiologisch-diagnostisches Labor sein. In Anbetracht der Dauer der Kultivierung unter anaeroben Bedingungen wurden für die Isolierung Selektivnährböden verwendet. Auch von anderen Untersuchern wurden meist Tryptikase-Soja-Agarplatten mit Rinder- oder Schafblutanteil sowie Zusatz an Antibiotika verwendet. So verwendeten Calderaro et al. 2001 den sogenannten BAM-SR (Agar auf Blutagarbasis mit Rinderextrakt, Peptonzusatz, Pferdeblut, Spectinomycin und Rifampin) als Nährmedium und reicherten vor der kulturellen Anzucht die Brachyspiren mittels der Suspension BHI-SR (BHI mit 10 %FKS, Spectinomycin und Rifampin und Schweinekotextrakt) an. Feltrup et al. verwandten 1999 zur Anzucht von Brachyspiren Columbia- oder TSA-Agar mit Schaf- oder Rinderblut und Spectinomycinzusatz und es gelang ihnen dadurch eine eindeutige Beurteilung der Hämolysestärke. Auch wurde von der Verwendung von bis zu fünf gleichzeitig zugegebenen Antibiotika (Spiramycin,

Rifampicin, Vancomycin, Colistin und Spectinomycin) berichtet (**Verspohl et al., 2001**). Auch über den Zusatz von Hefeextrakt zum TSA-Agar wurde berichtet (**Hommez et al., 1998**).

Da in fast allen Fällen der vorliegenden Studie in der Primärkultur eine reiche Begleitflora vorhanden war, ist zu schlußfolgern, dass die verwendeten Antibiotikazusätze in ihrer Wirksamkeit unzureichend waren. Für künftige Untersuchungen ist eine Erweiterung des Spektrums nach Literaturangaben (**Verspohl et al., 2001**) zu empfehlen. Bei der Subkultivierung mit dem Ziel der Gewinnung von Reinkulturen erwies sich die mikroskopisch kontrollierte (Invertoskop) Entnahme von Material im Bereich von Hämolysezonen als sehr vorteilhaft. Dies ist eine empfehlenswerte Technik, über die in der Literatur bisher keine Hinweise gefunden wurden. Insgesamt erklärt der für Brachyspiren im Vergleich zu anderen Bakterienspezies besondere Aufwand der Isolierung die sehr überschaubare Zahl an Berichten zu der gestellten Fragestellung.

Für die Speziesdifferenzierung der Isolate wurden phänotypische und genotypische Charakteristika herangezogen. Die Differenzierung nach biochemischen Stoffwechselleistungen führte, wie auch von anderen Untersuchern berichtet (**Feltrup et al., 1999a**), nicht in allen Fällen zu einem eindeutigen Ergebnis. Sehr wahrscheinlich ist dies mit dem anspruchsvollen Wachstum der Brachyspiren in Verbindung zu bringen. Auch ist zu berücksichtigen, dass bestimmte Stoffwechselleistungen nicht existieren, wie z. B. der Abbau von Tryptophan (Nachweis von Indol) bei einem hohen Anteil belgischer und deutscher Feldisolate (**Feltrup et al., 1999a; Gundlach, 2001**). Daher stützte sich die Differenzierung in der vorliegenden Studie auf die RFLP-Analyse eines 939 bp-langen Fragments des *nox*-Gens (**Rohde et al., 2002**).

Methodisch stehen für die *in vitro*-Antibiotikaempfindlichkeitsprüfung von Bakterien Testsysteme unter Verwendung fester und flüssiger Nährböden zur Verfügung. Der Agardiffusionstest auf festen Nährböden ist bis heute ein gebräuchliches Verfahren für zahlreiche Bakterienspezies. Dieses Verfahren besticht durch seine Einfachheit in der Durchführung, ist jedoch für Brachyspiren aufgrund ihrer langen Generationszeit wenig gut geeignet. Als Alternative ist für die Resistenzprüfung bei Brachyspiren ein Agardilutionstest beschrieben (**Meier et al., 1984**). Bereits 1978 wurde ein modifizierter Agardilutionstest zur schnellen Antibiotikaempfindlichkeitsprüfung anaerober Bakterien empfohlen (**Hanson und Martin, 1978**). Dieses Verfahren wurde und wird von mehreren Arbeitsgruppen angewandt (**Råsbäck et al., 2005**). Vorteil der Agardilutionstechnik ist im Gegensatz zum Agardiffusionstest die Möglichkeit der Ermittlung von MHK-Werten. Im Zuge der Standardisierung der Antibiotikaempfindlichkeitsprüfung von Tieren stammender Erreger wird vom „National Committee for Clinical Laboratory Standards“ (NCCLS, jetzt CLSI genannt) eine Mikrobouillondilutionsmethodik (Durchführungsvorschrift M31-A2) empfohlen (**Schwarz et al., 2003**). Weitgehend basierend

auf diesem Standard wurde für die eigenen Versuche ein Mikrotestsystem entwickelt und die hierbei erzielten Ergebnisse mit denen des nach Literaturangaben (**Kessler, 2001; Uezato et al., 2004**) durchgeführten Agardilutionstests verglichen. Zwar existierten bereits Berichte zur Prüfung der Antibiotikaresistenz von Brachyspiren in flüssigen Nährmedien (**Karlsson et al., 2001; Karlsson et al., 2003; Kessler, 2001**), jedoch ist bisher eine Miniaturisierung (Durchführung in 96-well Platten) dieser Technik nie gelungen. Zur Überprüfung der Wiederholbarkeit der mit dem MBDT ermittelten Ergebnisse wurden Prüfungen an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen unter Verwendung des *B. hyodysenteriae*-Referenzstammes B204 jeweils im Doppelansatz durchgeführt. Nach der hohen Übereinstimmung der Ergebnisse ist der Test als sehr präzise und aus dieser Hinsicht zur Bestimmung der Antibiotikaempfindlichkeit als gut geeignet anzusehen. Zur Beurteilung des MBDT's benötigt man aufgrund des langsamen Wachstums der Brachyspiren vom Ansatz des Testsystems bis zur Ablesung eine Inkubationszeit von fünf Tagen. Die im Mikrobouillontest durchgeführten Prüfungen nach den CLSI-Vorgaben werden in der Regel jedoch bereits nach 24 h abgelesen. Dies berechtigt zu der Frage, ob in dieser vergleichbar langen Zeitspanne von fünf Tagen nicht u. U. mit einem Wirkungsverlust der Antibiotika zu rechnen ist. Um dieser Kritik vorzubeugen, wurden alle vier verwendeten Antibiotika in Verdünnungen, die den Prüfbedingungen entsprachen, für insgesamt fünf Tage bei 37 °C (Inkubationstemperatur für die Prüfung) vorinkubiert und erst anschließend auf ihre Wirksamkeit geprüft. Der Vergleich der Ergebnisse mit jenem aus einem Versuchsansatz mit frisch verdünnten Antibiotikallösungen ergab keine Unterschiede (in den Ergebnissen nicht mitgeteilt). Hieraus ist zu schliessen, dass Tylosin, Lincomycin, Tiamulin und Valnemulin in BHI mit 20 % FKS (Inkubationsmedium) bei 37 °C über fünf Tage keinen Wirkungsverlust aufweisen. Somit dürften durch das zu der CLSI Methodik veränderte Prozedere der Prüfung keine negativen Auswirkungen auf die Testergebnisse zu befürchten sein.

Bei dem Vergleich der im ADT und MBDT ermittelten MHK-Werte waren in der überwiegenden Zahl der Fälle mit dem MBDT niedrigere Werte nachweisbar. Eine Antwort auf die Frage nach möglichen Ursachen für das Vorliegen der in einigen Fällen beobachteten, umgekehrten Situation bleibt offen. Insgesamt jedoch sprechen die Ergebnisse dafür, dass der MBDT als das sensiblere Verfahren zu bewerten ist. Die geringere Empfindlichkeit des ADT könnte auf eine Behinderung der freien Diffusion oder einer Reduzierung der Wirksamkeit des Antibiotikums durch Inhaltstoffe des Nährbodens, insbesondere Blut, zurückzuführen sein. Für den Agardiffusionstest werden dafür z. B. Blutagarplatten aufgrund möglicher Wechselwirkungen der zu prüfenden Antibiotika mit roten Blutkörperchen generell abgelehnt. Das Medium für den MBDT enthält dagegen weder Blut noch Agar-Agar und das Antibiotikum kann theoretisch in dem flüssigen Medium frei diffundieren. Es ist jedoch nicht vollständig auszuschließen, dass auch dieses Milieu die Wirksamkeit des Antibiotikums

beeinträchtigt, bedingt durch den hohen Anteil organischer Verbindungen im Medium. Nach den vorliegenden Ergebnissen ist dies jedoch, wenn auch mit Ausnahmen, in einem weitaus geringeren Umfang der Fall, als beim ADT. Für die Bewertung der Resistenzsituation ist daher zu empfehlen, mit Bouillondilutionsmethoden bestimmte MHK-Werte zugrunde zu legen.

Die Bewertungen empfindlich, intermediär und resistent orientieren sich an der, nach Therapie in der vom Hersteller vorgeschlagenen Dosierung, im Gewebe der Tiere vorliegenden Wirkspiegel (siehe **Kapitel 3.4.5.1**). Bei der Dysenterie und Spirochätendiarrhoe sind dies besonders die im Kolongewebe und -inhalt auftretenden Konzentrationen des Wirkstoffs. Unter Einbezug eines Sicherheitszuschlags wurden auf Basis dieser Daten die Bewertungsbereiche angesetzt. Ob diese sogenannten „Breakpoints“ als realistisch anzusehen sind, ist fraglich, da die *in vitro*-Ergebnisse oft nicht in Übereinstimmung mit den Erfahrungen *in vivo* stehen (**Hellwig, 2002**). Für die vergleichende Beurteilung der vorliegenden Untersuchungsergebnisse ist jedoch festzuhalten, dass die Bewertung der MHK-Werte unter Zugrundelegung von „Breakpoints“ erfolgte, die auch von anderen Untersuchern als Maß verwendet wurden (**Kessler, 2001**).

Die ermittelte Resistenzsituation gegenüber Tylosin und Lincomycin steht weitgehend in Übereinstimmung mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen aus dem deutschen Raum (**Kessler, 2001**). Auch aus anderen Ländern (**Vyt und Hommez, 2006**, Belgien; **Lobová et al., 2004**, Tschechische Republik; **Karlsson et al., 2003**, Schweden; **Karlsson et al., 2002**, *Brachyspira* spp.-Isolaten aus Australien; **Uezato et al., 2004**, Japan) wird über einen hohen Anteil resistenter *B. hyodysenteriae*-Stämme bei diesen Antibiotika berichtet. Die für Tylosin bestimmten, extrem hohen MHK-Werte sprechen für eine vollständige Unwirksamkeit dieses Wirkstoffes gegenüber *B. spp.*. Als Resistenzmechanismus wurde eine Mutation im Bereich der Bindungsstelle des Tylosins am Ribosom (Position 2058) von *B. hyodysenteriae* beschrieben (**Karlsson et al., 1999**). Die außerordentliche Höhe der ermittelten MHK-Werte macht das Vorliegen derartiger Mutationen bei den geprüften *B. hyodysenteriae*-Stämmen sehr wahrscheinlich. Auffällig war jedoch der im MBDT ermittelte, deutlich niedrigere MHK<sub>50</sub>-Wert der *B. innocens*-Isolate (3,9 µg/ml) gegenüber den *B. hyodysenteriae*-Isolaten (500 µg/ml). Ein Grund hierfür könnte die unterschiedliche Pathogenität der verschiedenen *Brachyspira*-Spezies und dadurch bedingt der vermehrte Antibiotikaeinsatz bei Vorliegen einer Schweindeysenterie sein. Durch den verstärkten Einsatz an Chemotherapeutika wird die Entstehung von Resistenzen gefördert, was wiederum zu erhöhten MHK-Werten führt.

Da auch bei den anderen *B. spp.* (außer *B. hyodysenteriae*) sehr hohe MHK-Werte gegenüber Tylosin vorlagen, ist davon auszugehen, dass auch bei diesen Stämmen entsprechende Mutationen vorliegen. Bei Lincomycin sind die Mechanismen der

Antibiotikaresistenz nicht bekannt. Die aber auch bei diesem Antibiotikum, zwar nicht in gleichem Umfang wie bei Tylosin, vorliegenden hohen MHK-Werte sprechen für das Vorliegen vergleichbarer Resistenzmechanismen bei den untersuchten Feldstämmen. Gegenüber Tiamulin und Valnemulin erwiesen sich alle geprüften Isolate aus der Zeit von 2003 bis 2005 als empfindlich. Dies steht in Widerspruch zu vorhergehenden Untersuchungen aus dem deutschen Raum. Nach Berichten von **Keßler (2001)** wurden immerhin 26,7 % der *B. hyodysenteriae*-Isolate gegenüber Tiamulin und 16,7 % der *B. hyodysenteriae*-Isolate gegenüber Valnemulin als resistent eingestuft. **Gundlach (2001)** berichtete sogar von noch höheren Resistenzraten bei *B. hyodysenteriae*-Isolaten. Die Anteile resistenter Isolate betragen 83,8 % (Lincomycin), 98,5 % (Tylosin), 57,4 % (Tiamulin) und 47,1 % (Valnemulin).

An dieser Stelle ist zu hinterfragen, ob nicht u. U. auch die unterschiedlichen Vorgeschichten der geprüften Isolate in den verschiedenen Laboratorien, über die in der Regel selten berichtet wird, Einfluss auf die Ergebnisse nehmen können. Im wesentlichen sind hierbei unterschiedliche Passagezahlen der verwendeten Stämme von Bedeutung. Zur Beantwortung dieser Frage wurden verschiedene *B. spp.* unterschiedlich häufig passagiert und die Ergebnisse zur Antibiotikaempfindlichkeit verglichen (siehe **Tabelle 14**). Die Ergebnisse sind nicht übereinstimmend von gleicher Tendenz und daher außerordentlich schwer zu interpretieren. Die Antibiotikaempfindlichkeit blieb mit zunehmender Passagezahl je nach Prüfstamm unbeeinflusst, wurde erheblich geringer aber auch erheblich größer. Diese Tendenzen waren überwiegend einheitlich bei allen geprüften Antibiotika. Das bedeutet, daß bei Abnahme des MHK-Wertes von Tylosin (siehe z. B. **Tabelle 14** unter *B. murdochii*) in höheren Passagezahlen auch mit einer Verringerung der MHK-Werte der anderen Antibiotika zu rechnen ist. Dies erscheint logisch. Anscheinend werden während der Passagen, die ja jeweils mit einer außerordentlichen Vermehrung der Bakterien einhergeht, die nicht „resistenten“ Keime selektiert, da sie sich unbeschwert von einem Resistenzmechanismus vorteilhafter vermehren können. Eine Zunahme der MHK-Werte könnte dagegen auf Selektionsmechanismen beruhen, bei denen eine Beteiligung der Antibiotika in den Selektivnährböden nicht auszuschließen ist. Es bleibt aber unerklärlich, warum diese Beobachtung anscheinend nur auf einzelne Stämme zutrifft. Insgesamt ist trotz mangelnder Erklärung festzuhalten, dass die Ergebnisse einer Antibiotikaempfindlichkeitsprüfung von der Passagezahl der Prüfstämme, möglicherweise auch von der Art der Antibiotika in den Selektivplatten, beeinflusst werden kann. Es erscheint lohnenswert, die hier erhobenen Befunde und Hypothesen eingehender zu prüfen. Auf die vorliegenden Untersuchungsergebnisse haben die Beobachtungen aller Voraussicht nach aber nur unbedeutenden Einfluss, da wahrscheinlich erst bei höheren Passagezahlen ( $n > 10$ ) mit einem messbaren Effekt zu rechnen ist.

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Versuche zur Antibiotikaempfindlichkeit von *B. hyodysenteriae* basieren auf Isolaten aus dem Zeitraum von 2003 bis 2005. Die eigenen Ergebnisse belegen, dass die in diesem Zeitraum gewonnenen Isolate in der überwiegenden Zahl der Fälle gegenüber Tiamulin und Valnemulin außerordentlich empfindlich waren. Dies steht im Widerspruch zu Berichten aus anderen Teilen Deutschlands, besonders jenen Regionen in Norddeutschland mit intensiver Schweineproduktion. Da mittlerweile (2009, 2010) ein hoher Anteil von Isolaten auch aus hessischen Schweinebetrieben als resistent gegenüber Tiamulin und Valnemulin zu bewerten sind (**Herbst, pers. Mitteilung**), ist nicht auszuschliessen, dass sich resistente Stämme von Nord nach Süd ausbreiteten. Eine andere Erklärung könnte an Unterschieden im Verbrauch der entsprechenden Antibiotika liegen. Auch hier ist die Situation im Norden Deutschlands mit einer hohen Konzentration an Schweinen sicherlich förderlicher für die Entstehung von Resistenzen zu bewerten, als jene in Hessen.

## 6 Zusammenfassung

Die Schweinedysenterie hat nach wie vor grosse Bedeutung für die Schweineproduktion. Neben prophylaktischen Massnahmen steht die antibiotische Therapie im Vordergrund. Für den Therapieerfolg spielt die Antibiotikaempfindlichkeit des Erregers *Brachyspira* (*B.*) *hyodysenteriae* gegenüber den eingesetzten Chemotherapeutika eine entscheidende Rolle. Die Bestimmung der Antibiotikaempfindlichkeit von Brachyspiren, die vorab aus deutschen Schweinebeständen isoliert und anschließend im Labor charakterisiert wurden (Speziesbestimmung), war Ziel der vorliegenden Arbeit.

Von 481 mittels Dunkelfeldmikroskopie vorgeprüften Kotproben von Schweinen wurden in 94 Fällen Brachyspiren kultiviert. RFLP-Analysen identifizierten 48 (51,1 %) der Isolate als *B. hyodysenteriae*, acht (8,5 %) als *B. pilosicoli*, 33 als *B. innocens* (35,1 %), zwei der Isolate als *B. intermedia* (2,1 %) und drei als *B. murdochii* (3,2%). Die phänotypischen Charakterisierungsversuche ergaben hiervon abweichende Ergebnisse und wurden wegen ihrer mutmaßlich geringen Sensitivität nicht berücksichtigt. Die Antibiotikaempfindlichkeitsprüfung der *B. hyodysenteriae*-Isolate (n = 48) als auch der weiteren Spezies (n = 46), im Folgenden als „andere *B. spp.*“ bezeichnet, erfolgte im Agardilutionstest (ADT) und in einem Mikrobouillon-dilutionstest (MBDT), der in Anlehnung an CLSI-Normen für die Prüfung von Brachyspiren modifiziert wurde.

Insgesamt waren die unter Anwendung des MBDT für Tylosin, Lincomycin, Tiamulin und Valnemulin ermittelten MHK-Werte niedriger als die mit dem ADT bestimmten Werte. Aufgrund dieser höheren Sensitivität wurden den nachfolgenden Aussagen die MBDT-Ergebnisse zugrunde gelegt. Bei vergleichender Betrachtung aller MHK-Werte war eine weitaus geringere Empfindlichkeit gegenüber Tylosin und Lincomycin als gegenüber den Pleuromutilinen Tiamulin und Valnemulin auffällig. Die *B. hyodysenteriae*-Isolate unterschieden sich hierbei in ihrer Antibiotikaempfindlichkeit nur unwesentlich von den anderen *B. spp.*. Die MHK<sub>90</sub>-Werte von Tylosin gegenüber *B. hyodysenteriae* und den „anderen *B. spp.*“ reichten von 1.000 bis 20.000 µg/ml, die von Lincomycin von 16 - 64 µg/ml, die von Tiamulin von 0,31 - 1,25 µg/ml und jene von Valnemulin von 0,025 - 0,1 µg/ml. Gemessen an aktuellen „Breakpoints“ war ein sehr grosser Anteil der Isolate aus den Jahren 2003 bis 2005 als intermediär und resistent gegenüber Tylosin (97%) und Lincomycin (61%) zu bewerten.

Die entsprechenden Prozentzahlen für Tiamulin und Valnemulin betragen dagegen lediglich 10 % und 2 %.



Anhand der durchgeführten Untersuchungen ist der MBDT aufgrund seiner höheren Empfindlichkeit, Praktikabilität, Reproduzierbarkeit und methodischen Anlehnung an die bestehende CLSI-Norm zur Prüfung der Antibiotikaempfindlichkeit von *Brachyspira* spp. dem ADT als auch Bouillondilutionstesten in grösseren Volumenansätzen vorzuziehen. Nach der ermittelten Antibiotikaempfindlichkeit von *B. hyodysenteriae*-Feldisolaten ist von Tylosin und Lincomycin keine bzw. eine geringe klinische Wirksamkeit zu erwarten. Bezüglich der Pleuromutiline ist in dem genannten Probenentnahmezeitraum dagegen von einer guten therapeutischen Wirksamkeit auszugehen. Eine entsprechende Wirksamkeit ist auch gegenüber den anderen beim Schwein vorkommenden *Brachyspira* spp. zu erwarten.

## Summary

Swine dysentery (SD) caused by *Brachyspira (B.) hyodysenteriae* is one of the most important enteric diseases in swine production. Improvement of farm-hygiene combined with a specific treatment and antibiotic therapy are the primary actions to contain the disease. The intention of this study was the isolation of *B. spp.* from feces of German pigs, their characterisation with biochemical and molecular-biochemical methods and evaluating the antimicrobial susceptibility in two different test systems.

*Brachyspira* spp. were successfully cultivated in 94 cases out of 481 dark-field microscopy pre-tested porcine fecal samples. As a result of RFLP analysis, a number of 48 (51.1 %) isolates were identified as *B. hyodysenteriae*, eight (8.5 %) as *B. pilosicoli*, 33 (35.1%) as *B. innocens* and three (3.2 %) as *B. murdochii*. Deviating results from phenotypical characterisation attempts were not taken into account due to assumed low susceptibility. The *B. hyodysenteriae* isolates (n = 48) and other *B. species* (n = 46), were tested for antimicrobial susceptibility by use of agar dilution (ADT) and microbroth dilution (MBDT) which was modified to reflect CLSI standards in testing *B. spp.*.

While MBDT treatments for Tylosin, Lincomycin, Tiamulin and Valnemulin were leading to an overall lower level of MIC values than those tested by ADT, the following conclusions are based on the MBDT values because of its higher sensitivity. On a comparative examination of all MIC results it was noticeable that the susceptibility to Tylosin and Lincomycin was much lower than to Tiamulin and Valnemulin, both derivatives of pleuromutilin. In contrast, there is only a marginal difference between the antibiotal susceptibility of *B. hyodysenteriae* isolates and other *B. spp.*. The MIC<sub>90</sub> values of Tylosin against *B. hyodysenteriae* and other *B. spp.* range from 1.000 to 20.000 µg/ml, while Lincomycin range from 16 – 64 µg/ml, Tiamulin from 0,31 – 1,25 µg/ml and those of Valnemulin from 0,025 – 0,1 µg/ml. As measured by current breakpoints a huge portion of isolates from 2003 to 2005 were classified as intermediate and resistant against Tylosin (97 %) and Lincomycin (61 %).

However the relevant percentages of Tiamulin and Valnemulin were only 10 % and 2 %, respectively.

Based on the findings of this study, MBDT has been proven to be the preferred method compared to ADT and broth microdilution testings of large volumes due to its higher sensitivity, practicality, reproducibility and due to its methodical approach orientated on existing CLSI standards in testing antimicrobial susceptibility of *Brachyspira* spp..

Based on the determined antimicrobial susceptibility of *B. spp.* field isolates, it is assumed that a clinical effectiveness of Tylosin and Lincomycin is only marginal. In contrast, it is feasible that the pleuromutilins show a good therapeutic efficiency in the sampling period. A similar effectiveness is also to be expected against the remaining swine-based *Brachyspira spp.*

## 7 Literatur

- Aitken, I. A., J. H. Morgan, R. Dalziel, D. G. Burch und P. H. Ripley.** 1999. Comparative in vitro activity of valnemulin against porcine bacterial pathogens. *Vet. Rec.* 144: 128.
- Altreuther, P., A. Bottner, M. Scheer, P. Schmid, W. Traeder und S. Weiskopf.** 1997. Anmerkungen zum Resistenzmonitoring in der Tiergesundheit. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 110: 418-421.
- Anadón, A. und L. Reeve-johnson.** 1999. Macrolide antibiotics, drug interactions and microsomal enzymes: implications for veterinary medicine. *Res. Vet. Sci.* 66: 197-203.
- Atyeo, R. F., S. L. Oxberry und D. J. Hampson.** 1999. Analysis of *Serpulina hyodysenteriae* strain variation and its molecular epidemiology using pulsed-field gel electrophoresis. *Epidemiol. Infect.* 123: 133-138.
- Baker, C. N., S. A. Stocker, D. H. Culver und C. Thornsberry.** 1991. Comparison of the E Test to agar dilution, broth microdilution, and agar diffusion susceptibility testing techniques by using a special challenge set of bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 29: 533-538.
- Barcellos, D. E., M. R. Mathiesen, M. de Uzeda, I. Kader und G. E. Duhamel.** 2000. Prevalence of *Brachyspira* species isolated from diarrhoeic pigs in Brazil. *Vet. Rec.* 146: 398-403.
- Binek, M. und Z. M. Szykiewicz.** 1984. Physiological properties and classification of strains of *Treponema* sp. isolated from pigs in Poland. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 7: 141-148.
- Bøsling, J., S. M. Poulsen, B. Vester und K. S. Long.** 2003. Resistance to the peptidyl transferase inhibitor tiamulin caused by mutation of ribosomal protein I3. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 2892-2896.
- Boye, M., S. B. Baloda, T. D. Leser und K. Moller.** 2001. Survival of *Brachyspira hyodysenteriae* and *B. pilosicoli* in terrestrial microcosms. *Vet Microbiol* 81: 33-40.
- Calderaro, A., G. Merialdi, S. Perini, P. Ragni, R. Guegan, G. Dettori und C. Chezzi.** 2001a. A novel method for isolation of *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae* from pigs with swine dysentery in Italy. *Vet. Microbiol.* 80: 47-52.
- Calderaro, A., V. Villanacci, M. Conter, P. Ragni, G. Piccolo, C. Zuelli, S. Bommezzadri, R. Guégan, C. Zambelli, F. Perandin, M. C. Arcangeletti, M. C. Medici, N. Manca, G. Dettori und C. Chezzi.** 2003. Rapid detection and identification of *Brachyspira aalborgi* from rectal biopsies and faeces of a patient. *Res. Microbiol.* 154: 145-153.
- Calderaro, A., S. Bommezzadri, G. Piccolo, C. Zuelli, G. Dettori und C. Chezzi.** 2005. Rapid isolation of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* from pigs. *Vet. Microbiol.* 105: 229-234.
- Corona-Barrera, E., D. G. Smith, T. La, D. J. Hampson und J. R. Thomson.** 2004. Immunomagnetic separation of the intestinal spirochaetes *Brachyspira pilosicoli* and *Brachyspira hyodysenteriae* from porcine faeces. *J. Med. Microbiol.* 53: 301-307.
- Davelaar, F. G., H. F. Smit, K. Hovind-Hougen, R. M. Dwars und P. C. Vandervalk.** 1986. Infectious typhlitis in chickens caused by spirochetes. *Avian Pathology* 15: 247-258.
- Duhamel, G. E., D. J. Trott, N. Muniappa, M. R. Mathiesen, K. Tarasiuk, J. I. Lee und D. J. Hampson.** 1998. Canine intestinal spirochetes consist of *Serpulina pilosicoli* and a

newly identified group provisionally designated "*Serpulina canis*" sp. nov. J. Clin. Microbiol. 36: 2264-2270.

- Dünser, M., H. Schweighardt, R. Pangerl, M. Awad-Masalmeh und M. Schluh.** 1997. Schweinedysenterie und Spirochaetendiarrhoe - vergleichende Untersuchungen serpulinenbedingter Enteritiden. Wien. Tierärztl. Monatsschr. 84: 151-161.
- Elder, R. O., G. E. Duhamel, R. W. Schafer, M. R. Mathiesen und M. Ramanathan.** 1994. Rapid detection of *Serpulina hyodysenteriae* in diagnostic specimens by PCR. J. Clin. Microbiol. 32: 1497-1502.
- Esteve, M., A. Salas, F. Fernández-Bañares, J. Lloreta, M. Mariné, C. I. Gonzalez, M. Forné, J. Casalots, R. Santaolalla, J. C. Espinós, M. A. Munshi, D. J. Hampson und J. M. Viver.** 2006. Intestinal spirochetosis and chronic watery diarrhea: clinical and histological response to treatment and long-term follow up. J. Gastroenterol. Hepatol. 21: 1326-1333.
- Fellström, C. und A. Gunnarsson.** 1995. Phenotypical characterisation of intestinal spirochaetes isolated from pigs. Res. Vet. Sci. 59: 1-4.
- Fellström, C., B. Pettersson, J. Thomson, A. Gunnarsson, M. Persson und K. E. Johansson.** 1997. Identification of *Serpulina* species associated with porcine colitis by biochemical analysis and PCR. J. Clin. Microbiol. 35: 462-467.
- Fellström, C., M. Karlsson, B. Pettersson, U. Zimmerman, A. Gunnarsson und A. Aspan.** 1999. Emended descriptions of indole negative and indole positive isolates of *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae*. Vet. Microbiol. 70: 225-238.
- Fellström, C., B. Pettersson, U. Zimmerman, A. Gunnarsson und R. Feinstein.** 2001. Classification of *Brachyspira* spp. isolated from Swedish dogs. Anim. Health Res. Rev. 2: 75-82.
- Fellström, C., U. Zimmerman, A. Aspan und A. Gunnarsson.** 2001. The use of culture, pooled samples and PCR for identification of herds infected with *Brachyspira hyodysenteriae*. Anim. Health Res. Rev. 2: 37-43.
- Fellström, C., T. Råsbäck, K. E. Johansson, T. Olofsson und A. Aspan.** 2008. Identification and genetic fingerprinting of *Brachyspira* species. J. Microbiol. Methods 72: 133-140.
- Feltrup, C., J. Verspohl und G. Amtsberg.** 1999a. Zur Diagnostik von Schweinedysenterie und Spirochaetendiarrhoe. 1. Mitteilung: Kulturell-biochemische Differenzierung intestinaler Serpulinen in der Routinediagnostik. Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 106: 200-207.
- Forth, W., D. Hentschler, W. Rummel und K. Starke.** 1996. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 7. Aufl. ed.: Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Furneri, P. M. und G. Nicoletti.** 1991. Macrolides: present and future. An appraisal of *in-vitro* activity and pharmacokinetic behavior. J. Chemother. 3 Suppl 1: 24-27.
- Griffiths, I. B., B. W. Hunt, S. A. Lister und M. H. Lamont.** 1987. Retarded growth rate and delayed onset of egg production associated with spirochaete infection in pullets. Vet. Rec. 121: 35-37.
- Gundlach, S.** Year. Differenzierung und Resistenzprüfung von Brachyspiren aus dem Untersuchungsgut der Landwirtschaftskammer Westfalen-Lippe. 20. AVID-Tagung in Kloster Banz.
- Hampson, D. J., R. F. Atyeo und B. G. Combs.** 1997. Swine dysentery. In: Intestinal spirochaetes in domestic animals and humans. Herausgeber: Hampson, D. J. und T. B. Stanton. Seiten 175-209. Wallingford, England: CAB International

- Hampson, D. J. und T. La.** 2006. Reclassification of *Serpulina intermedia* and *Serpulina murdochii* in the genus *Brachyspira* as *Brachyspira intermedia* comb. nov. and *Brachyspira murdochii* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 1009-1012.
- Hanson, C. W. und W. J. Martin.** 1978. Modified agar dilution method for rapid antibiotic susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 13: 383-388.
- Harris, D. L., T. J. Alexander, S. C. Whipp, I. M. Robinson, R. D. Glock und P. J. Matthews.** 1978. Swine dysentery: studies of gnotobiotic pigs inoculated with *Treponema hyodysenteriae*, *Bacteroides vulgatus*, and *Fusobacterium necrophorum*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 172: 468-471.
- Harris, D. L., D. J. Hampson und R. D. Glock.** 1999. Swine Dysentery. *In: Diseases of Swine.* Herausgeber: Straw, B. E., S.D.'Allaire, W.L.Mengelling, D.J.Taylor. Seiten 579-600. Blackwell, Oxford:
- Heinritzi, K., H. P. Gindele, G. Reiner und U. Schnurrbusch.** 2006. Schweinekrankheiten. Herausgeber: 158-160. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer
- Hellwig, E. G.** 2002. Die Resistenzergebnisse von *Brachyspira hyodysenteriae* richtig bewerten, Anmerkungen zur Resistenzsituation von Tiamulin und Valnemulin. *Nutztierpraxis aktuell*
- Herbst, W., H. Willems und G. Baljer.** 2004. Verbreitung von *Brachyspira hyodysenteriae* und *Lawsonia intracellularis* bei gesunden und durchfallkranken Schweinen. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 117: 493-498.
- Hidalgo, A., A. Carvajal, C. García-Feliz, J. Osorio und P. Rubio.** 2009. Antimicrobial susceptibility testing of Spanish field isolates of *Brachyspira hyodysenteriae*. *Res. Vet. Sci.* 87: 7-12.
- Hidalgo, A., A. Carvajal, M. Pringle, P. Rubio und C. Fellström.** 2010. Characterization and epidemiological relationships of Spanish *Brachyspira hyodysenteriae* field isolates. *Epidemiol. Infect.* 138: 76-85.
- Holt, S. C.** 1978. Anatomy and Chemistry of Spirochetes. *Microbiol. Rev.* 42: 114-160.
- Hommez, J., F. Castryck, F. Haesebrouck und L. A. Devriese.** 1998. Identification of porcine *Serpulina* strains in routine diagnostic bacteriology. *Vet. Microbiol.* 62: 163-169.
- Hovind-Hougen, K., A. Birch-Andersen, R. Henrik-Nielsen, M. Orholm, J. O. Pedersen, P. S. Teglbjaerg und E. H. Thaysen.** 1982. Intestinal spirochetosis: morphological characterization and cultivation of the spirochete *Brachyspira aalborgi* gen. nov., sp. nov. *J. Clin. Microbiol.* 16: 1127-1136.
- Jacobson, M., R. Lindberg, R. Jonasson, C. Fellström und M. J. Waern.** 2007. Consecutive pathological and immunological alterations during experimentally induced swine dysentery - a study performed by repeated endoscopy and biopsy samplings through an intestinal cannula. *Res. Vet. Sci.* 82: 287-298.
- Jansson, D. S., C. Bröjer, D. Gavier-Widén, A. Gunnarsson und C. Fellström.** 2001. *Brachyspira* spp. (*Serpulina* spp.) in birds: a review and results from a study of Swedish game birds. *Anim. Health Res. Rev.* 2: 93-100.
- Jansson, D. S., K. E. Johansson, T. Olofsson, T. Råsbäck, I. Vågsholm, B. Pettersson, A. Gunnarsson und C. Fellström.** 2004. *Brachyspira hyodysenteriae* and other strongly beta-haemolytic and indole-positive spirochaetes isolated from mallards (*Anas platyrhynchos*). *J. Med. Microbiol.* 53: 293-300.
- Jansson, D. S., C. Fellström und K. E. Johansson.** 2008. Intestinal spirochetes isolated from wild-living jackdaws, hooded crows and rooks (genus *Corvus*): provisionally designated "*Brachyspira corvi*" sp. nov. *Anaerobe* 14: 287-295.

- Jensen, N. S., T. B. Stanton und D. E. Swayne.** 1996. Identification of the swine pathogen *Serpulina hyodysenteriae* in rheas (*Rhea americana*). *Vet. Microbiol.* 52: 259-269.
- Jensen, T. K., K. Møller, M. Boye, T. D. Leser und S. E. Jorsal.** 2000a. Scanning electron microscopy and fluorescent in situ hybridization of experimental *Brachyspira* (*Serpulina*) *pilosicoli* infection in growing pigs. *Vet. Pathol.* 37: 22-32.
- Jensen, T. K., M. Boye, P. Ahrens, B. Korsager, P. S. Teglbjærg, C. F. Lindboe und K. Møller.** 2001. Diagnostic examination of human intestinal spirochetosis by fluorescent in situ hybridization for *Brachyspira aalborgi*, *Brachyspira pilosicoli*, and other species of the genus *Brachyspira* (*Serpulina*). *J. Clin. Microbiol.* 39: 4111-4118.
- Joens, L. A. und J. M. Kinyon.** 1982. Isolation of *Treponema hyodysenteriae* from wild rodents. *J. Clin. Microbiol.* 15: 994-997.
- Kärber, G.** 1931. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie* 162: 480-483.
- Karlsson, M., C. Fellström, M. U. Heldtander, K. E. Johansson und A. Franklin.** 1999. Genetic basis of macrolide and lincosamide resistance in *Brachyspira* (*Serpulina*) *hyodysenteriae*. *FEMS Microbiol Lett* 172: 255-260.
- Karlsson, M., A. Gunnarsson und A. Franklin.** 2001. Susceptibility to pleuromutilins in *Brachyspira* (*Serpulina*) *hyodysenteriae*. *Anim. Health Res. Rev.* 2: 59-65.
- Karlsson, M., S. L. Oxberry und D. J. Hampson.** 2002. Antimicrobial susceptibility testing of Australian isolates of *Brachyspira hyodysenteriae* using a new broth dilution method. *Vet. Microbiol.* 84: 123-133.
- Karlsson, M., C. Fellström, A. Gunnarsson, A. Landén und A. Franklin.** 2003. Antimicrobial susceptibility testing of porcine *Brachyspira* (*Serpulina*) species isolates. *J. Clin. Microbiol.* 41: 2596-2604.
- Karlsson, M., A. Aspán, A. Landén und A. Franklin.** 2004a. Further characterization of porcine *Brachyspira hyodysenteriae* isolates with decreased susceptibility to tiamulin. *J. Med. Microbiol.* 53: 281-285.
- Karlsson, M., C. Fellström, K. E. Johansson und A. Franklin.** 2004b. Antimicrobial resistance in *Brachyspira pilosicoli* with special reference to point mutations in the 23S rRNA gene associated with macrolide and lincosamide resistance. *Microb. Drug Resist.* 10: 204-208.
- Kennedy, G. A. und A. C. Strafuss.** 1976. Scanning electron microscopy of the lesions of swine dysentery. *Am J Vet Res* 37: 395-401.
- Kennedy, M. J., D. K. Rosnick, R. G. Ulrich und R. J. Yancey, Jr.** 1988. Association of *Treponema hyodysenteriae* with porcine intestinal mucosa. *Journal of Genetic Microbiology* 134: 1565-1576.
- Kennedy, M. J. und R. J. Yancey, Jr.** 1996. Motility and chemotaxis in *Serpulina hyodysenteriae*. *Vet. Microbiol.* 49: 21-30.
- Kessler, C.** 2001. Resistenzprüfung von *Brachyspira hyodysenteriae* gegenüber Tiamulin und Valnemulin mit dem Agardilutions- und Bouillondilutionstest. Diss. med. vet. aus dem Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Tierärztlichen Hochschule.
- Kietzmann, M.** 2003. Die Resistenzprüfung aus Sicht der Pharmakologen. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 110: 430.
- Kietzmann, M., A. Bottner, H. M. Hafez, C. Kehrenberg, D. Klarmann, P. Krabisch, T. Kuhn, G. Luhofer, A. Richter, S. Schwarz, W. Traeder, K. H. Waldmann, J. Wallmann und C. Werckenthin.** 2004. Empfindlichkeitsprüfung bakterieller Infektionserreger von Tieren gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen: Überlegungen

- zur Festlegung von Grenzwertkonzentrationen (breakpoints) aus klinisch-pharmakologischer Sicht. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 117: 81-87.
- Kinyon, J. M. und D. L. Harris.** 1979. *Treponema innocens*, a new species of intestinal bacteria and emended description of the type strain of *Treponema hyodysenteriae*. Int J Syst Bacteriol 29: 102-109.
- Kolbert, M. und P. M. Shah.** 2002. Diffusion oder Dilution: Antimikrobielle Empfindlichkeitsprüfung im Routinelabor. J. Lab. Med. 26: 420-424.
- Komarek, V., A. Maderner, J. Spergser und H. Weissenböck.** 2009. Infections with weakly haemolytic *Brachyspira* species in pigs with miscellaneous chronic diseases. Vet. Microbiol. 134: 311-317.
- Kraatz, W., U. Thunberg, B. Pettersson und C. Fellström.** 2001. Human intestinal spirochetosis diagnosed with colonoscopy and analysis of partial 16S rDNA sequences of involved spirochetes. Anim. Health Res. Rev. 2: 111-116.
- Kraatz, W., B. Pettersson, U. Thunberg, L. Engstrand und C. Fellström.** 2000. *Brachyspira aalborgi* infection diagnosed by culture and 16S ribosomal DNA sequencing using human colonic biopsy specimens. J. Clin. Microbiol. 38: 3555-3560.
- Kunkle, R. A. und J. M. Kinyon.** 1988. Improved selective medium for the isolation of *Treponema hyodysenteriae*. J Clin Microbiol 26: 2357-2360.
- Kutzer, P., C. Schulze und G. Neumann.** Year. *Brachyspira hyodysenteriae*-assoziierte Typhlokolitis bei Nandus. 24. Arbeits- und Fortbildungstagung des AVID in Kloster Banz.
- La, T., N. D. Phillips und D. J. Hampson.** 2003. Development of a duplex PCR assay for detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* in pig feces. J. Clin. Microbiol. 41: 3372-3375.
- La, T., A. M. Collins, N. D. Phillips, A. Oksa und D. J. Hampson.** 2006. Development of a multiplex-PCR for rapid detection of the enteric pathogens *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae*, and *Brachyspira pilosicoli* in porcine faeces. Lett. Appl. Microbiol. 42: 284-288.
- La, T., N. D. Phillips, B. L. Harland, P. Wanchanthuek, M. I. Bellgard und D. J. Hampson.** 2009. Multilocus sequence typing as a tool for studying the molecular epidemiology and population structure of *Brachyspira hyodysenteriae*. Vet. Microbiol. 138: 330-338.
- Lehmann, H. U.** Year. Application of Tiamutin against mixed infection with *Lawsonia intracellularis* and *Brachyspira* spp. in a closed system. 18<sup>th</sup> Congress of the International Pig Veterinary Society in Hamburg. 304.
- Lobová, D., J. Smola und A. Cizek.** 2004. Decreased susceptibility to tiamulin and valnemulin among Czech isolates of *Brachyspira hyodysenteriae*. J. Med. Microbiol. 53: 287-291.
- Long, K. S., L. H. Hansen, L. Jakobsen und B. Vester.** 2006. Interaction of pleuromutilin derivatives with the ribosomal peptidyl transferase center. Antimicrob. Agents Chemother. 50: 1458-1462.
- Manabe, M., I. Suenaga, Y. Ogawa und Y. Adachi.** 2004. *Brachyspira pilosicoli* isolated from two beagles and one mongrel in Japan. J. Vet. Med. Sci. 66: 589-592.
- Margawani, K. R., I. D. Robertson, C. J. Brooke und D. J. Hampson.** 2004. Prevalence, risk factors and molecular epidemiology of *Brachyspira pilosicoli* in humans on the island of Bali, Indonesia. J. Med. Microbiol. 53: 325-332.
- Mazzei, T., E. Mini, A. Novelli und P. Periti.** 1993. Chemistry and mode of action of macrolides. J. Antimicrob. Chemother. 31 Suppl C: 1-9.



- Meier, C., G. Amtsberg, A. Rubekeil, W. Bisping und J. Hartung.** 1984. Untersuchungen zum Vorkommen von Treponemen bei Schweinen. 1. Mitteilung: Kultureller Nachweis und Resistenzprüfung. Berliner und Müncher Tierärztliche Wochenschrift 97: 131-134.
- Mikosza, A. S., T. La, C. J. Brooke, C. F. Lindboe, P. B. Ward, R. G. Heine, J. G. Guccion, W. B. de Boer und D. J. Hampson.** 1999. PCR amplification from fixed tissue indicates frequent involvement of *Brachyspira aalborgi* in human intestinal spirochetosis. J. Clin. Microbiol. 37: 2093-2098.
- Mikosza, A. S., T. La, K. R. Margawani, C. J. Brooke und D. J. Hampson.** 2001. PCR detection of *Brachyspira aalborgi* and *Brachyspira pilosicoli* in human faeces. FEMS Microbiol. Lett. 197: 167-170.
- Mikosza, A. S., M. A. Munshi und D. J. Hampson.** 2004. Analysis of genetic variation in *Brachyspira aalborgi* and related spirochaetes determined by partial sequencing of the 16S rRNA and NADH oxidase genes. J. Med. Microbiol. 53: 333-339.
- Milner, J. A. und R. Sellwood.** 1994. Chemotactic response to mucin by *Serpulina hyodysenteriae* and other porcine spirochetes: potential role in intestinal colonization. Infect. Immun. 62: 4095-4099.
- Møller, K., T. K. Jensen, S. E. Jorsal, T. D. Leser und B. Carstensen.** 1998. Detection of *Lawsonia intracellularis*, *Serpulina hyodysenteriae*, weakly beta-haemolytic intestinal spirochaetes, *Salmonella enterica*, and haemolytic *Escherichia coli* from swine herds with and without diarrhoea among growing pigs. Vet. Microbiol. 62: 59-72.
- Munshi, M. A., N. M. Taylor, A. S. Mikosza, P. B. Spencer und D. J. Hampson.** 2003. Detection by PCR and isolation assays of the anaerobic intestinal spirochete *Brachyspira aalborgi* from the feces of captive nonhuman primates. J. Clin. Microbiol. 41: 1187-1191.
- Munshi, M. A., R. J. Traub, I. D. Robertson, A. S. Mikosza und D. J. Hampson.** 2004. Colonization and risk factors for *Brachyspira aalborgi* and *Brachyspira pilosicoli* in humans and dogs on tea estates in Assam, India. Epidemiol. Infect. 132: 137-144.
- NCCLS.** 2002. M31-A2 - Vol. 22 No. 6 - Durchführungsvorschriften für antimikrobielle Empfindlichkeitsprüfung mittels Agardiffusions- und Dilutionstests von Bakterien tierischer Herkunft; Empfohlener Standard - zweite Ausgabe.
- Neef, N. A., R. J. Lysons, D. J. Trott, D. J. Hampson, P. W. Jones und J. H. Morgan.** 1994b. Pathogenicity of porcine intestinal spirochetes in gnotobiotic pigs. Infect. Immun. 62: 2395-2403.
- Nemes, C. S., R. Glávits, M. Dobos-Kovács, E. Ivanics, E. Kaszanyitzky, A. Beregszászi, L. Szeredi und L. Dencso.** 2006. Typhlocolitis associated with spirochaetes in goose flocks. Avian Pathology 35: 4-11.
- Novak, R. und D. M. Shlaes.** 2010. The pleuromutilin antibiotics: a new class for human use. Curr. Opin. Investig. Drugs 11: 182-191.
- Ochiai, S., Y. Adachi und K. Mori.** 1997. Unification of the genera *Serpulina* and *Brachyspira*, and proposals of *Brachyspira hyodysenteriae* Comb. Nov., *Brachyspira innocens* Comb. Nov. and *Brachyspira pilosicoli* Comb. Nov. Microbiol. Immunol. 41: 445-452.
- Ohya, T., H. Araki und M. Sueyoshi.** 2008. Identification of weakly beta-hemolytic porcine spirochetes by biochemical reactions, PCR-based restriction fragment length polymorphism analysis and species-specific PCR. J. Vet. Med. Sci. 70: 837-840.
- Olsen, I., B. J. Paster und F. E. Dewhirst.** 2000. Taxonomy of spirochetes. Anaerobe 6: 39-57.

- Oxberry, S. L., D. J. Trott und D. J. Hampson.** 1998. Serpulina pilosicoli, waterbirds and water: potential sources of infection for humans and other animals. *Epidemiol. Infect.* 121: 219-225.
- Oxberry, S. L. und D. J. Hampson.** 2003. Colonisation of pet shop puppies with *Brachyspira pilosicoli*. *Vet. Microbiol.* 93: 167-174.
- Paster, B. J. und F. E. Dewhirst.** 2000. Phylogenetic foundation of spirochetes. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2: 341-344.
- Phillips, N. D., T. La und D. J. Hampson.** 2005. A cross-sectional study to investigate the occurrence and distribution of intestinal spirochaetes (*Brachyspira* spp.) in three flocks of laying hens. *Vet. Microbiol.* 105: 189-198.
- Pohlenz, J. F., S. C. Whipp und I. M. Robinson.** 1983. Pathogenesis of swine dysentery caused by *Treponema hyodysenteriae*. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 90: 363-367.
- Pringle, M., J. Poehlsgaard, B. Vester und K. S. Long.** 2004. Mutations in ribosomal protein L3 and 23S ribosomal RNA at the peptidyl transferase centre are associated with reduced susceptibility to tiamulin in *Brachyspira* spp. isolates. *Mol. Microbiol.* 54: 1295-1306.
- Pringle, M., A. Landén und A. Franklin.** 2006. Tiamulin resistance in porcine *Brachyspira pilosicoli* isolates. *Res. Vet. Sci.* 80: 1-4.
- Råsbäck, T., C. Fellström, B. Bergsjö, A. Cizek, K. Collin, A. Gunnarsson, S. M. Jensen, A. Mars, J. Thomson, P. Vyt und M. Pringle.** 2005. Assessment of diagnostics and antimicrobial susceptibility testing of *Brachyspira* species using a ring test. *Vet. Microbiol.* 109: 229-243.
- Råsbäck, T., C. Fellström, A. Gunnarsson und A. Aspán.** 2006. Comparison of culture and biochemical tests with PCR for detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli*. *J. Microbiol. Methods* 66: 347-353.
- Råsbäck, T., D. S. Jansson, K. E. Johansson und C. Fellström.** 2007a. A novel enteropathogenic, strongly haemolytic spirochaete isolated from pig and mallard, provisionally designated '*Brachyspira suanatina*' sp. nov. *Environ. Microbiol.* 9: 983-991.
- Råsbäck, T., K. E. Johansson, D. S. Jansson, C. Fellström, M. Y. Alikhani, T. La, D. S. Dunn und D. J. Hampson.** 2007b. Development of a multilocus sequence typing scheme for intestinal spirochaetes within the genus *Brachyspira*. *Microbiology* 153: 4074-4087.
- Ritzmann, M., A. Palzer, J. Verspohl, S. Baier, J. Schulte-Wülwer, H. Nienhoff, J. Harlizius, W. Schulte-Grotthoff und J. Rohde.** 2009. Deutschlandweites Monitoring zum Nachweis von *Brachyspira*-Species aus Durchfallproben vom Schwein und zur Sensitivität von *Brachyspira hyodysenteriae* sowie anderer *Brachyspira*-Species gegenüber Tiamulin. *Der Praktische Tierarzt* 90: 467-476.
- Rohde, J., A. Rothkamp und G. F. Gerlach.** 2002. Differentiation of porcine *Brachyspira* species by a novel *nox* PCR-based restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.* 40: 2598-2600.
- Rohde, J., M. Kessler, C. G. Baums und G. Amtsberg.** 2004. Comparison of methods for antimicrobial susceptibility testing and MIC values for pleuromutilin drugs for *Brachyspira hyodysenteriae* isolated in Germany. *Vet. Microbiol.* 102: 25-32.
- Rohde, J.** 2006. Informationen zur Resistenzprüfung von Brachyspiren, <http://www.tiho-hannover.de/kliniken-institute/institute/institut-fuer-mikrobiologie/diagnostik/infothek/allgemein/>. Letzter Zugriff: 03.05.2010.

- Rosey, E. L., M. J. Kennedy und R. J. Yancey, Jr. 1996. Dual *flaA1 flaB1* mutant of *Serpulina hyodysenteriae* expressing periplasmic flagella is severely attenuated in a murine model of swine dysentery. *Infect. Immun.* 64: 4154-4162.
- Sagartz, J. E., D. E. Swayne, K. A. Eaton, J. R. Hayes, K. D. Amass, R. Wack und L. Kramer. 1992. Necrotizing typhlocolitis associated with a spirochete in rheas (*Rhea americana*). *Avian Dis.* 36: 282-289.
- Schlünzen, F., E. Pyetan, P. Fucini, A. Yonath und J. M. Harms. 2004. Inhibition of peptide bond formation by pleuromutilins: the structure of the 50S ribosomal subunit from *Deinococcus radiodurans* in complex with tiamulin. *Mol. Microbiol.* 54: 1287-1294.
- Schwarz, S. und C. Kehrenberg. 2000. Antimikrobielle Resistenz: Resistenzmechanismen, Resistenzgene und Übertragungswege. *Amtstierärztl. Dienst Lebensmittelkontr.* 7: 55-60.
- Schwarz, S. 2001. Antimikrobielle Resistenz: Entwicklung und Mechanismen. *Veterinärspiegel Sonderheft "Dysenterie beim Schwein"*: 2-8.
- Schwarz, S., A. Bottner, H. M. Hafez, C. Kehrenberg, M. Kietzmann, D. Klarmann, G. Klein, P. Krabisch, T. Kühn, G. Luhofer, A. Richter, W. Traeder, K. H. Waldmann, J. Wallmann und C. Werckenthin. 2003. Empfindlichkeitsprüfung bakterieller Infektionserreger von Tieren gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen: Methoden zur *in-vitro* Empfindlichkeitsprüfung und deren Eignung in Hinblick auf die Erarbeitung therapeutisch nutzbarer Ergebnisse. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 116: 353-361.
- Sellwood, R. und A. P. Bland. 1997. Ultrastructure of intestinal spirochetes. *In: Intestinal Spirochaetes in Domestic Animals and Humans.* Herausgeber: Hampson, D. und T. B. Stanton. Seiten 109-149. CAB International
- Shivaprasad, H. L. und G. E. Duhamel. 2005. Cecal spirochetosis caused by *Brachyspira pilosicoli* in commercial turkeys. *Avian Dis.* 49: 609-613.
- Song, Y. und D. J. Hampson. 2009. Development of a multiplex qPCR for detection and quantitation of pathogenic intestinal spirochaetes in the faeces of pigs and chickens. *Vet. Microbiol.* 137: 129-136.
- Spearman, C. 1908. The method of 'right and wrong cases' ('constant stimuli') without Gauss's formulae. *Brit J Psychol* 2: 227-242.
- Spížek, J., J. Novotná und T. Režanka. 2004. Lincosamides: chemical structure, biosynthesis, mechanism of action, resistance, and applications. *Adv. Appl. Microbiol.* 56: 121-154.
- Stanton, T. B., N. S. Jensen, T. A. Casey, L. A. Tordoff, F. E. Dewhirst und B. J. Paster. 1991. Reclassification of *Treponema hyodysenteriae* and *Treponema innocens* in a new genus, *Serpula* gen. nov., as *Serpula hyodysenteriae* comb. nov. and *Serpula innocens* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 41: 50-58.
- Stanton, T. B. 1992. Proposal to change the genus designation *Serpula* to *Serpulina* gen. nov. containing the species *Serpulina hyodysenteriae* comb. nov. and *Serpulina innocens* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 42: 189-190.
- Stanton, T. B. und N. S. Jensen. 1993. Purification and characterization of NADH oxidase from *Serpulina (Treponema) hyodysenteriae*. *J. Bacteriol.* 175: 2980-2987.
- Stanton, T. B., E. Fournié-Amazouz, D. Postic, D. J. Trott, P. A. Grimont, G. Baranton, D. J. Hampson und I. Saint Girons. 1997. Recognition of two new species of intestinal spirochetes: *Serpulina intermedia* sp. nov. and *Serpulina murdochii* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 1007-1012.

- Stanton, T. B., D. Postic und N. S. Jensen.** 1998. *Serpulina alvinipulli* sp. nov., a new *Serpulina* species that is enteropathogenic for chickens. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48 Pt 3: 669-676.
- Stanton, T. B., E. L. Rosey, M. J. Kennedy, N. S. Jensen und B. T. Bosworth.** 1999. Isolation, oxygen sensitivity, and virulence of NADH oxidase mutants of the anaerobic spirochete *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae*, etiologic agent of swine dysentery. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 5028-5034.
- Stephens, C. P. und D. J. Hampson.** 1999. Prevalence and disease association of intestinal spirochaetes in chickens in eastern Australia. *Avian Pathology* 28: 447-454.
- Stephens, C. P. und D. J. Hampson.** 2001. Intestinal spirochete infections of chickens: a review of disease associations, epidemiology and control. *Anim. Health Res. Rev.* 2: 83-91.
- Suh, D. K. und J. C. Song.** 2005. Simultaneous detection of *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae* and *Salmonella* spp. in swine intestinal specimens by multiplex polymerase chain reaction. *J. Vet. Sci.* 6: 231-237.
- Suh, D. K. und J. C. Song.** 2005. Prevalence of *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae* and *Salmonella* in swine herds. *J. Vet. Sci.* 6: 289-293.
- Swayne, D. E., A. J. Bermudez, J. E. Sagartz, K. A. Eaton, J. D. Monfort, J. W. Stoutenburg und J. R. Hayes.** 1992. Association of cecal spirochetes with pasty vents and dirty eggshells in layers. *Avian Dis.* 36: 776-781.
- Tait-Kamradt, A., T. Davies, M. Cronan, M. R. Jacobs, P. C. Appelbaum und J. Sutcliffe.** 2000. Mutations in 23S rRNA and ribosomal protein L4 account for resistance in pneumococcal strains selected in vitro by macrolide passage. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 2118-2125.
- Tasu, C., T. Tanaka, T. Tanaka und Y. Adachi.** 2004. *Brachyspira pilosicoli* isolated from pigs in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 66: 875-877.
- Taylor, D. J. und T. J. Alexander.** 1971. The production of dysentery in swine by feeding cultures containing a spirochaete. *Br. Vet. J.* 127: 58-61.
- Taylor, D. J., J. R. Simmons und H. M. Laird.** 1980. Production of diarrhoea and dysentery in pigs by feeding pure cultures of a spirochaete differing from *Treponema hyodysenteriae*. *Vet. Rec.* 106: 326-332.
- Thomson, J. R., W. J. Smith, B. P. Murray und S. McOrist.** 1997. Pathogenicity of three strains of *Serpulina pilosicoli* in pigs with a naturally acquired intestinal flora. *Infect. Immun.* 65: 3693-3700.
- Townsend, K. M., V. N. Giang, C. Stephens, P. T. Scott und D. J. Trott.** 2005. Application of *nox*-restriction fragment length polymorphism for the differentiation of *Brachyspira* intestinal spirochetes isolated from pigs and poultry in Australia. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17: 103-109.
- Trott, D. J., C. R. Huxtable und D. J. Hampson.** 1996. Experimental infection of newly weaned pigs with human and porcine strains of *Serpulina pilosicoli*. *Infect Immun* 64: 4648-4654.
- Uezato, K., E. Kinjo und Y. Adachi.** 2004. *In vitro* susceptibility of 21 antimicrobial agents to 37 isolates of *Brachyspira hyodysenteriae* isolated from pigs in Okinawa Prefecture. *J. Vet. Med. Sci.* 66: 307-309.
- Ungemach, F. R., I. Emmerich, J. Preuß, P. Hajek und H. Otilie.** 2010. Vetidata - Veterinärmedizinische Informationsdienst für Arzneimittelanwendung, Toxikologie und Arzneimittelrecht. <http://www.vetidata.de/>. Letzter Zugriff: 09.02.2010.

- Vazquez, D.** 1967. Inhibitors of protein synthesis at the ribosome level. Studies on their site of action. *Life Sci.* 6: 381-386.
- Verspohl, J., C. Feltrup, S. Thiede und G. Amtsberg.** 2001. Zur Diagnostik von Schweinedysenterie und Spirochaetendiarrhoe. 3. Mitteilung: Ergebnisse kulturell-biochemischer Differenzierung intestinaler Brachyspiren in der Routinediagnostik der Jahre 1997 bis 1999. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 108: 67-69.
- Vyt, P. und J. Hommez.** 2006. Antimicrobial susceptibility of *Brachyspira hyodysenteriae* isolates compared with the clinical effect of treatment. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 75: 279-285.
- Waldmann, K. H., M. Wendt und G. Amtsberg.** 2000. Untersuchungen zur *Brachyspira*-Diagnostik und Behandlungsstrategien bei der Schweinedysenterie. *Dtsch. tierärztl. Wschr.* 107: 486-489.
- Waldmann, K. H. und M. Wendt.** 2004. Lehrbuch der Schweinekrankheiten. 4. Auflage ed. Berlin: Parey Verlag.
- Weissenböck, H., A. Maderner, A. M. Herzog, H. Lussy und N. Nowotny.** 2005. Amplification and sequencing of *Brachyspira* spp. specific portions of *nox* using paraffin-embedded tissue samples from clinical colitis in Austrian pigs shows frequent solitary presence of *Brachyspira murdochii*. *Vet. Microbiol.* 111: 67-75.
- Werckenthin, C. und S. Schwarz.** 1997. Resistenzen gegenüber Proteinbiosyntheseinhibitoren bei Staphylokokken: Resistenzgene und ihre Ausbreitung - Übersichtsreferat. *Berliner und Müncher Tierärztliche Wochenschrift* 110: 324-332.
- Whipp, S. C., I. M. Robinson, D. L. Harris, R. D. Glock, P. J. Matthews und T. J. Alexander.** 1979. Pathogenic synergism between *Treponema hyodysenteriae* and other selected anaerobes in gnotobiotic pigs. *Infect. Immun.* 26: 1042-1047.
- Wilcock, B. P. und H. J. Olander.** 1979. Studies on the pathogenesis of swine dysentery. II. Search for a cytotoxin in spirochetal broth cultures and colon content. *Vet. Pathol.* 16: 567-573.
- Willems, H. und G. Reiner.** 2010. A multiplex real-time PCR for the simultaneous detection and quantitation of *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli* and *Lawsonia intracellularis* in pig faeces. *Berliner und Müncher Tierärztliche Wochenschrift* 123: 205-209.

## 8 Anhang

**In dieser Arbeit verwendete Medien, Puffer und Gebrauchslösungen:****B-Cult (*Brachyspira* Transport- und Einfriermedium)**

Caso-Agar: Fa. Merck, Darmstadt, Kat.Nr.: 1.05458.0500	350 ml
Agarose	4,2 ml
Natriumthioglycolat	0,2 %
Spectinomycin	87,5 g
Colistin	87,5 g

**BHI-Medium**

Fa. Merck, Darmstadt, Kat.Nr.: 10493	37 g
A. dest.	ad 1.000 ml

**BHIF<sup>CVSSR</sup>-Medium**

Fa. Merck, Darmstadt, Kat.Nr.: 10493	37 g
Colistin (62,25 mg in 125 ml A. dest.)	12,5 ml
Vancomycin (60 mg in 125 ml A. dest.)	12,5 ml
Spectinomycin (1.000 mg in 125 ml A. dest.)	25 ml
Spiramycin (152,5 mg in 25 ml Äthanol und 100 ml A. dest.)	12,5 ml
Rifampicin (125 mg in 25 ml Äthanol und 100 ml A. dest.)	12,5 ml
A. dest.	ad 1.000 ml
FKS (Fötale Kälberserum) – immer frisch zugesetzt	20 %

**Blut-Agar**

Fa. Merck, Darmstadt, Kat.Nr.: 1.10886.0500	40 g
defibriniertes Schafblut	50 ml
A. dest.	ad 1.000 ml

**Elektrophorese-Stammlösung (50 x TAE)**

Tris	242 g
Eisessig	57,1 g
Na-EDTA x 2 H <sub>2</sub> O (0,5 M, pH 8,0)	100 ml
A. dest.	ad 1.000ml

**Ladepuffer**

Bromphenolblau	12,5 mg
Xylencyanol FF	12,5 mg
Glycerin (30 %)	2,6 ml
A. dest.	7,4 ml

**Loading Dye-DNS Ladder Gebrauchsverdünnung**

Gene Ruler™ 100 bp DNS Ladder Plus	0,01 ml
6x Loading Dye Solution (Fa. Fermentas, St. Leon-Roth, Kat.Nr. R0611)	0,03 ml
A. dest.	0,12 ml

**TSA<sup>SC</sup>-Agar mit Spectinomycin und Colistin (mit Schafblut)**

Caso-Agar: Fa. Merck, Darmstadt, Kat.Nr.: 1.05458.0500	40 g
defibriniertes Schafblut	50 ml
Spectinomycin	400 mg
Colistin	400 mg
A. dest.	ad 1.000 ml

## 9 Abbildungen und Tabellen

### 9.1 Abbildungen

Abbildung 1: Agardilutionstest, 5 d nach anaerober Inkubation und Beimpfung Tiamulin-haltiger TSA-Agar .....	34
Abbildung 2: Platzierung und Verdünnung der Antibiotika im MBDT. ....	35
Abbildung 3: Herkunft der 94 <i>B. spp.</i> -Feldisolate von Schweinen aus Deutschland.....	38
Abbildung 4: Speziesbestimmung der <i>Brachyspira</i> -Isolate 41 bis 44 anhand der Restriktionsmuster der <i>nox</i> -Gen-Fragmente nach <i>DpnII</i> - und <i>Bfml</i> - Verdau.....	39
Abbildung 5: Im Agardilutionstest gegenüber <i>B. spp.</i> -Isolate ermittelte MHK-Werte von Tiamulin. ....	46
Abbildung 6: Im Agardilutionstest ermittelte MHK-Werte für Valnemulin von <i>B. spp.</i> - Isolaten.....	47
Abbildung 7: Im Agardilutionstest gegenüber <i>B. spp.</i> -Isolate ermittelte MHK-Werte von Tylosin. ....	48
Abbildung 8: Im Agardilutionstest gegenüber <i>B. spp.</i> -Isolate ermittelte MHK-Werte von Lincomycin.....	49
Abbildung 9: Im Mikrobouillondilutionstest ermittelte MHK-Werte in µg / ml gegenüber Tiamulin.....	53
Abbildung 10: Im Mikrobouillondilutionstest ermittelte MHK-Werte in µg / ml gegenüber Valnemulin.....	54
Abbildung 11: Im Mikrobouillondilutionstest ermittelte MHK-Werte in µg / ml gegenüber Tylosin. ....	55
Abbildung 12: Im Mikrobouillondilutionstest ermittelte MHK-Werte in µg / ml gegenüber Lincomycin. ....	56

## 9.2 Tabellen

Tabelle 1:	Bestimmung der $MHK_{50}$ und $MHK_{90}$ bei porcinen <i>B. hyodysenteriae</i> -Isolaten von Lincomycin, Tiamulin, Tylosin und Valnemulin (Angaben in der Literatur).....	13
Tabelle 2:	Verwendete <i>Brachyspira</i> sp.-Kontrollstämme .....	25
Tabelle 3:	Als Kontrollen für die Antibiotikaempfindlichkeitsprüfung (MBDT) verwendeten Bakterienspezies .....	26
Tabelle 4:	Differenzierung intestinaler Brachyspiren anhand kulturell-biochemischer Merkmale (nach Fellström et al., 1997; Feltrup et al., 1999a; Stanton et al., 1997).....	29
Tabelle 5:	Verwendete Primer .....	31
Tabelle 6:	RFLP der <i>nox</i> -Genfragmente verschiedener <i>B. spp.</i> nach Verdau mit <i>DpnII</i> und <i>Bfml</i> (modifiziert nach Rohde et al., 2002; Townsend et al., 2005).....	32
Tabelle 7:	Im ADT geprüfte Konzentrationsbereiche der Antibiotika .....	33
Tabelle 8:	Im MBDT geprüfte Antibiotikakonzentrationen.....	34
Tabelle 9:	Gewebekonzentrationen und $MHK$ -Grenzwerte für verschiedene gegen Brachyspiren wirksame Antibiotika (zitiert nach Keßler, 2001).....	36
Tabelle 10:	Nachweis von <i>B. spp.</i> bzw. schraubenförmigen Bakterien in 1549 Kot- und Darminhaltsproben mittels Dunkelfeldmikroskopie, Bhyo-PCR und kultureller Untersuchung .....	37
Tabelle 11:	Vergleichende Speziesdifferenzierung von 94 <i>Brachyspira</i> spp.-Isolaten mittels biochemischer Methoden und PCR/RFLP .....	41
Tabelle 12:	Im MBDT (Giessen) und QuickMIC <sup>®</sup> bestimmte $MHK$ -Werte unterschiedlicher Antibiotika gegenüber verschiedenen <i>B. hyodysenteriae</i> -Kontrollstämmen (n = 6).....	42
Tabelle 13:	Im MBDT gegenüber dem <i>B. hyodysenteriae</i> -Stamm B 204 ermittelte $MHK$ -Werte verschiedener Antibiotika in zeitlich unterschiedlichen Versuchsansätzen (n = 6) .....	43
Tabelle 14:	Einfluss der Passagezahl auf die $MHK$ -Werte der <i>B.</i> -Spezies-Referenzstämme (Ergebnisse aus dem MBDT). .....	44
Tabelle 15:	Für Tiamulin im ADT ermittelte $MHK_{50}$ - und $MHK_{90}$ -Werte gegenüber den verschiedenen <i>B. spp.</i> .....	46
Tabelle 16:	Für Valnemulin im ADT ermittelte $MHK_{50}$ und $MHK_{90}$ -Werte gegenüber den verschiedenen <i>B. spp.</i> .....	47
Tabelle 17:	Für Tylosin im ADT ermittelte $MHK_{50}$ und $MHK_{90}$ -Werte gegenüber den verschiedenen <i>B. spp.</i> .....	48
Tabelle 18:	Für Lincomycin im ADT ermittelte $MHK_{50}$ und $MHK_{90}$ -Werte gegenüber den verschiedenen <i>B. spp.</i> .....	50
Tabelle 19:	$MHK_{90}$ -Werte von Tylosin, Lincomycin, Tiamulin und Valnemulin gegenüber den <i>Brachyspira</i> spp.-Isolaten. ....	51



Tabelle 20:	Antibiotikaresistenz von <i>Brachyspira</i> spp.-Isolaten von Mastschweinen aus den Jahren 2003 bis 2005 gemessen an den im ADT ermittelten MHK-Werten.....	52
Tabelle 21:	Für Tiamulin im MBDT ermittelte MHK <sub>50</sub> - und MHK <sub>90</sub> -Werte gegenüber den verschiedenen <i>B. spp.</i> .....	53
Tabelle 22:	Für Valnemulin im MBDT ermittelte MHK <sub>50</sub> und MHK <sub>90</sub> -Werte gegenüber den verschiedenen <i>B. spp.</i> .....	54
Tabelle 23:	Für Tylosin im MBDT ermittelte MHK <sub>50</sub> und MHK <sub>90</sub> -Werte gegenüber den verschiedenen <i>B. spp.</i> .....	55
Tabelle 24:	Für Lincomycin im MBDT ermittelte MHK <sub>50</sub> und MHK <sub>90</sub> -Werte gegenüber den verschiedenen <i>B. spp.</i> .....	56
Tabelle 25:	Die im MBDT ermittelten MHK <sub>90</sub> -Werte von Tylosin, Lincomycin, Tiamulin und Valnemulin gegenüber den <i>Brachyspira</i> spp.-Isolaten. ....	57
Tabelle 26:	Vergleichende Darstellung der im ADT und im MBDT ermittelten MHK <sub>50</sub> -Werte der Antibiotika gegenüber den verschiedenen <i>B. spp.</i> .....	59
Tabelle 27:	Vergleichende Darstellung der im ADT und MBDT ermittelten MHK <sub>90</sub> -Werte der Antibiotika gegenüber den verschiedenen <i>B. spp.</i> .....	59
Tabelle 28:	Vergleichende Darstellung der in ADT und MBDT ermittelten Antibiotikaempfindlichkeit verschiedener <i>B. spp.</i> -Isolate (n= 88) von Schweinen.....	60

## Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei allen denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. habil. Georg Baljer für die Überlassung des Themas, den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz, die Bereitstellung aller für diese Promotion benötigten Mittel sowie für die immer gewährte Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Bei der Firma Boehringer bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung der Arbeit.

Meinem Betreuer Dr. Werner Herbst danke ich ganz herzlich für seine Geduld, die Korrekturen und die vielen netten Gespräche.

Frau Dr. Stefanie Barth danke ich ganz besonders für die stete Ermunterung zum Schreiben mit vielen Ratschlägen zur Erstellung der Dissertationsschrift und die schier unermüdlichen Computerkenntnisse, ohne die ich so manches Mal ratlos geblieben wäre!

Desweiteren geht mein Dank an die Mitarbeiter meiner Arbeitsgruppe, Jörg Heuser und Regina Weil, die mich durch ihre Diskussionsbereitschaft, Anregungen, Tipps und die Einarbeitung in die Methoden der PCR unterstützt und positiv begleitet haben.

Den Doktoranden des Instituts danke ich für den Zusammenhalt und die schöne und lehrreiche Zeit, die weit über das normale Arbeitspensum hinausging.

Allen übrigen Mitarbeitern des Instituts danke ich für die stets freundliche und hilfsbereite Unterstützung.

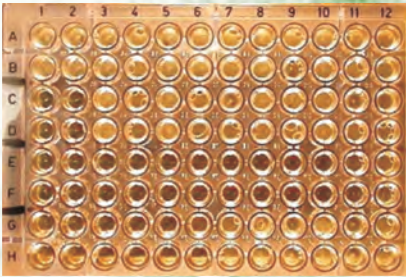
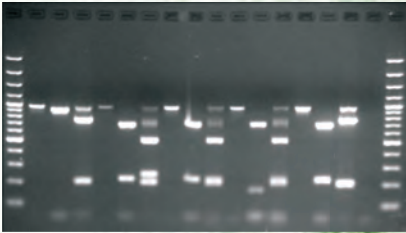
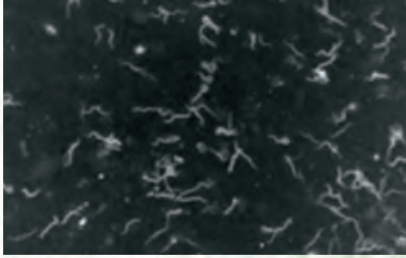
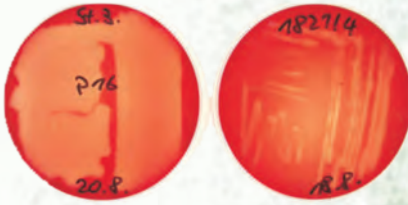
An die praktizierenden Tierärzte, Einrichtungen und Institutionen, die mich durch die Einsendung von Schweinekotproben als Basis des Aufbaus einer *B. spp.*-Stammsammlung unterstützt haben, geht ein ganz großer Dank. Ohne Ihre Hilfe hätten die Untersuchungen nicht durchgeführt werden können.

Im Rahmen meiner Dissertation spielte mein Mann Wolfgang Schlez eine große Rolle, denn er hat mich jederzeit mit voller Kraft unterstützt, wofür ich ihm von Herzen danke.

Und schließlich danke ich meinen Eltern, die mich durch ihren seelischen und finanziellen Beitrag während des Studiums zu dem Menschen gemacht haben, der ich heute bin. Vielen Dank!

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Karen Schlez



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

||| 11 1001 001001 100100 |||

ISBN: 978-3-8359-5721-3



9 17 8 3 8 3 5 19 5 7 2 1 3