

**Untersuchung der Sensitivität von Chlamydien-Isolaten  
unter Verwendung verschiedener antibakterieller  
Wirkstoffe  
(Chlortetracyclin, Doxycyclin, Enrofloxacin, Difloxacin,  
Clarithromycin und Erythromycin)**



**KINNDLE MARTA BLANCO PEÑA**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

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



## **Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek**

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie;  
Detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Auflage 2007

© 2007 by Verlag: **Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH**, Gießen  
Printed in Germany

ISBN 978-3-939902-25-6

Verlag: DVG Service GmbH  
Frankfurter Straße 89  
35392 Gießen  
0641/24466  
[geschaeftsstelle@dvg.net](mailto:geschaeftsstelle@dvg.net)  
[www.dvg.net](http://www.dvg.net)

Aus der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. E. F. Kaleta

---

**Untersuchung der Sensitivität von Chlamydien-Isolaten  
unter Verwendung verschiedener antibakterieller Wirkstoffe  
(Chlortetracyclin, Doxycyclin, Enrofloxacin, Difloxacin,  
Clarithromycin und Erythromycin)**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

KINNDLE MARTA BLANCO PEÑA

Tierärztin aus San José, Costa Rica

Gießen 2007

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Dekan:** Prof. Dr. M. Reinacher

---

**Gutachter:**

Prof. Dr. E. F. Kaleta

Prof. Dr. R. Bauerfeind

**Tag der Disputation: 07. März 2007**

***Meiner Familie, meinem Freund und meinen Freunden***

## **Inhaltsverzeichnis**

### **Abkürzungen**

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Chlamydien</b>	<b>3</b>
2.1.1	Klassifikation und Differenzierungsmerkmale	3
2.1.2	Morphologie und Biologie	5
2.1.3	Epidemiologie	8
2.1.4	Pathogenese und Symptome	11
2.1.5	Diagnose	14
2.1.5.1	Isolierungsmethode und direkte Erregernachweise	14
2.1.5.2	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	16
2.1.5.3	Antikörperrnachweise	18
2.1.6	Resistenz von Chlamydien	19
2.1.6.1	Art der Keimresistenz	19
2.1.6.2	Arzneimittel-Konzentrationen verschiedener Wirkstoffe bei Vögeln	21
2.1.7	Minimale Hemmstoffkonzentration	22
<b>2.2</b>	<b>Chemoprophylaxe und Therapie der Chlamydiose bei Vögeln</b>	<b>25</b>
2.2.1	Allgemeines	25
2.2.2	Tetracycline	31
	Chemie	31
	Wirkungsmechanismus	33
	Pharmakokinetik	33
	Nebenwirkungen	34
	Resistenzen	35
2.2.2.1	Chlortetracycline	36
	Chemie	36

	Wirkungsmechanismus	36
	Pharmakokinetik	37
	Dosierung	37
2.2.2.2	Doxycyclin	38
	Chemie	38
	Wirkungsmechanismus	39
	Pharmakokinetik	40
	Dosierung	41
	Resistenzen	41
2.2.3	Quinolone	41
	Chemie	42
	Wirkungsmechanismus	43
	Pharmakokinetik	43
	Nebenwirkung	43
	Resistenzen	44
2.2.3.1	Enrofloxacin	44
	Chemie	44
	Wirkungsmechanismus	45
	Pharmakokinetik	46
	Nebenwirkung	47
	Dosierung	47
	Resistenz	47
2.2.3.2	Difloxacin	48
	Chemie	48
	Wirkungsmechanismus	48
	Pharmakokinetik	49
	Nebenwirkung	49
	Dosierung	49
	Resistenzen	50
2.2.4	Makrolide	50
	Chemie	50
	Wirkungsmechanismus	51
	Pharmakokinetik	51
	Dosierung	52



	Nebenwirkungen	52
	Resistenzen	52
2.2.4.1	Clarithromycin	53
	Chemie	53
	Wirkungsmechanismus	54
	Pharmakokinetik	55
	Nebenwirkungen	55
	Dosierung	55
	Resistenzen	56
2.2.4.2	Erythromycin	56
	Chemie	56
	Wirkungsmechanismus	57
	Pharmakokinetik	57
	Dosierung	58
	Nebenwirkungen	58
	Resistenzen	59
2.3	Fragestellung der eigenen Untersuchungen	60
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>61</b>
<b>3.1</b>	<b>Material</b>	<b>61</b>
3.1.1	Ort und Zeitraum der Untersuchungen	61
3.1.2	Herkunft der Chlamydienisolate	61
3.1.3	Direkter Erregernachweis	65
3.1.3.1	BGM-Zellkulturen	65
3.1.3.2	Zellkulturmedien	65
3.1.3.3	Verbrauchsmaterialien	67
3.1.3.4	Geräte	67
3.1.3.5	Chemikalien	68
3.1.3.6	Reagenzien, Lösungen und Puffer für die Giménez-Färbung	69
3.1.3.7	Verwendete Chemotherapeutika für die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)	70
3.1.4	Nachweis der Chlamydien mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)	70

3.1.4.1	Verbrauchsmaterialien	70
3.1.4.2	Geräte	71
3.1.4.3	Chemikalien	71
3.1.4.4	Primer	72
3.1.4.5	Puffer	72
<b>3.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>73</b>
3.2.1	Passagieren der BGM-Zellen	73
3.2.2	Nachweiskulturen	73
3.2.3	Aufbereitung der Chlamydien zum Aufbringen auf Nachweiskulturen	73
3.2.4	Nachweis der Chlamydien	74
3.2.4.1	Nachweis der Chlamydien aus Zellkulturen	74
3.2.4.1.1	Giménez-Färbung	75
3.2.4.2	Nachweis der Chlamydien mittels PCR	76
3.2.4.2.1	Aufreinigung von DNA	76
3.2.4.2.2	DNA-Amplifikation mittels PCR	77
3.2.5	Vermehrung der Chlamydien	80
3.2.5.1	Herstellen eines Erregerpellets und der Erregerstamm suspension	80
3.2.6	Herstellen der Verdünnungsreihen der zu testenden Chemotherapeutika	81
3.2.7	Positiv- und Negativkontrollen	81
3.2.8	Versuchsordnung	81
3.2.9	Mikroskopische Zählung der Chlamydien-Einschlusskörperchen	82
3.2.10	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)	82
3.2.11	Bewertung der Ergebnisse	83
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>85</b>
4.1	Nachweis von Chlamydien mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach KALTENBÖCK et al. (1991, 1992, 1997)	85
4.2	Qualitätssicherung zur Methodendurchführung bei der Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration	86
4.2.1	Negativ- und Positivkontrollen	86

4.2.2	Quantitative Bestimmung der Chlamydien-Einschlüsse	87
4.3	Minimale Hemmkonzentration von Chlortetracyclin gegen Chlamydien	89
4.4	Minimale Hemmkonzentration von Doxycyclin gegen Chlamydien	91
4.5	Minimale Hemmkonzentration von Enrofloxacin gegen Chlamydien	93
4.6	Minimale Hemmkonzentration von Difloxacin gegen Chlamydien	95
4.7	Minimale Hemmkonzentration von Clarithromycin gegen Chlamydien	97
4.8	Minimale Hemmkonzentration von Erythromycin gegen Chlamydien	99
4.9	Friedman-Test	101
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>102</b>
5.1	Tetracycline: Chlortetracyclin und Doxycyclin	103
5.2	Chinolone: Enrofloxacin und Difloxacin	106
5.3	Makrolide: Erythromycin und Clarythromycin	108
5.4	Friedman-Test	111
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>112</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b>	<b>114</b>
<b>8</b>	<b>Resumen</b>	<b>115</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>117</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung</b>	<b>137</b>

## Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
BGM	Buffalo-Green-Monkey
BME	Basal Medium Eagle's
bp	Basenpaare
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CTC	Chlortetracyclin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleinsäuretriphosphat
EBE	Einschlussbildende Einheiten
EK	Elementarkörper
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung (9,81 m/sec <sup>2</sup> )
h	Stunde
Hepes	Hydroxyethyl-piperazinyl-ethansulfonsäure
IK	Intermediärkörperchen
IKZ	Inkubationzeit
i.m.	Intramuskulär
i.v.	Intravenös
KBR	Komplement-Bindungs-Reaktion
KCl	Kaliumchlorid
Kg	Kilogramm
KGM	Kilogrammmasse
KM	Körpermasse
L	Liter
MEM	Minimum Essential Medium
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MHK	Minimale Hemmkonzentration
ml	Milliliter

## Abkürzungen

---

MOMP	Major Outer Membrane Protein
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
Nr.	Nummer
U	Umdrehungen
u.a.	unter anderem
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
p.i.	post infectionem
pk	Positivkontrolle
ppm	Pars per million
RNS	Ribonukleinsäure
RK	Retikularkörper
rRNA	Ribosomal-RNA
tRNA	Transfer-RNA
s.c.	Subkutan
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	Thermophilus aquaticus
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
Tgb.	Tagebuch
TPB	Tryptose-Phosphat-Brühe
TV	Trypsin-Versen-Lösung
UV	Ultraviolett
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem
z.T.	zum Teil

## 1 Einleitung

Chlamydien sind Gram-negative, kokkoide, unbewegliche, obligat intrazelluläre Bakterien mit einem komplexen Reproduktionszyklus (Elementar-, Retikular- und Intermediärkörperchen). Sie gehören zu den kleinsten der bekannten Bakterien und sind bei Vögeln und Säugetieren weit verbreitet (SHOLZ, 1978; UNKRIG, 1993; RYLL et al., 1994; HAFEZ und STING, 1997; ANDERSEN und VANROMPAY, 2003; KALETA und TADAY, 2003).

Der Erreger *Chlamydoiphila psittaci* ruft bei Vögeln die aviäre Chlamydiose hervor, welche bei Psittaciformes als Psittakose und bei Geflügel, Wild- und Ziervögeln als Ornithose bezeichnet wird. Die Bakterien sind Zoonoseerreger, die Krankheit ist beim Menschen als Ornithose bekannt (SELBITZ, 1992).

In jüngster Zeit wird immer häufiger auf die Problematik der Resistenzentwicklung bei bakteriellen Infektionserregern gegenüber antimikrobiell wirksamen Substanzen hingewiesen (JONES et al., 1990; LEFEVRE et al., 1998; SOMANI et al., 2000; LENART et al., 2001). Da die Resistenz bei der Behandlung von Infektionskrankheiten in der Human- und Veterinärmedizin zunehmend ein Problem darstellt, ist die Datenerhebung zur Resistenzsituation dringend geboten.

Jeder Einsatz von Antibiotika hat zur Konsequenz, dass das Risiko einer Resistenzentwicklung besteht bzw. sich erhöht. Fundierte Daten über die Resistenzsituation der Mikroorganismen sind nötig, anhand derer wirkungsvolle Konzepte für Interventionsmaßnahmen zur Reduzierung des Resistenzentwicklungs- und Ausbreitungsrisikos erarbeitet werden können. Zugleich ist eine gezielte Chemotherapie nur möglich, wenn die Antibiotikumempfindlichkeit des Erregers bekannt ist.

Im Rahmen dieser Bemühungen war es Ziel der vorliegenden Arbeit, die minimale Hemmkonzentration (MHK) von 6 Wirkstoffen (Chlortetracyclin, Doxycyclin, Enrofloxacin, Difloxacin, Clarithromycin und Erythromycin) gegen 27 *Chlamydophila psittaci*-Isolate zu berechnen. Als Untersuchungsmethoden wurde die Anzucht des Erregers in Buffalo-Green-Monkey-Kidney-Zellkulturen (BGM-Zellkulturen) mit den Wirkstoffen durchgeführt und anschließend eine Giménez-Färbung angeschlossen.

Die Fragestellungen der eigenen Untersuchungen lauten demnach:

- Besitzen die untersuchten *Chlamydophila psittaci*-Isolate eine Resistenz gegen diese Wirkstoffe?
- Welche MHK kann für jeden Wirkstoff und jedes Chlamydien-Isolat bestimmt werden?

## **2 Literaturübersicht**

### **2.1 Chlamydien**

#### **2.1.1 Klassifikation und Differenzierungsmerkmale**

Chlamydien sind Gram-negative, kokkoide, unbewegliche, obligat intrazelluläre Bakterien, die sich nicht auf zellfreiem Medium vermehren und besondere morphologische und metabolische Eigenschaften aufweisen (FUKUSHI und HIRAI, 1992; VANROMPAY et al., 1995; ANDERSEN et al., 1997; ANDERSEN, 1998; ANDERSEN und VANROMPAY, 2003). Sie wurden in Vertebraten, Arthropoden, Coelenteraten, Mollusken und Amöben nachgewiesen (MEYER 1967; WOLKE et al., 1970; NEWCOMER et al., 1982; STORZ und KRAUSS, 1985; RODOLAKIS, 1987; JACOBSON et al., 1990; LEIBOVITZ, 1989; KREBSZ, 1995; VANROMPAY et al., 1994; ANDERSEN, 1996; KÖHLER, 1996; MUTSCHMANN, 1998; TADAY, 1998).

Chlamydien vermehren sich durch binäre Teilung in membranumhüllten Vakuolen des Zytoplasmas eukaryotischer Wirtszellen. Sie enthalten DNS und RNS, besitzen eine Zellwand und Ribosomen und können ihre Proteine, Nukleinsäuren und Fette selbständig synthetisieren (FUKUSHI und HIRAI, 1992).

EVERETT et al. stellten im Jahre 1999 einen neuen Vorschlag für die Systematik der Chlamydien vor. Grundlagen für diese Einteilung waren neben phänotypischen, morphologischen und genetischen Kriterien vor allem eine phylogenetische Analyse der 16S und 23S rRNA.



**Aktuelle Klassifizierung der Chlamydien (EVERETT et al., 1999):**

Ordnung: Chlamydiales

Familie: Chlamydiaceae

Genus: Chlamydia                      Spezies: *Chlamydia muridarum*

*Chlamydia suis*

*Chlamydia trachomatis*

Genus : Chlamydomphila              Spezies: *Chlamydomphila abortus*

*Chlamydomphila caviae*

*Chlamydomphila felis*

*Chlamydomphila pecorum*

*Chlamydomphila pneumoniae*

*Chlamydomphila psittaci*

Innerhalb der Familie der *Chlamydiaceae* werden zwei Genera, *Chlamydia* und *Chlamydomphila* unterschieden. Zum Genus *Chlamydia* gehören die drei Spezies *C. muridarum*, *C. suis* und *C. trachomatis*, während das Genus *Chlamydomphila* 6 Spezies (*C. abortus*, *C. caviae*, *C. felis*, *C. pecorum*, *C. pneumoniae* und *C. psittaci*) beinhaltet (EVERETT et al., 1999).

Die Spezies *C. psittaci* wird in sieben Biovare unterteilt, welche von A bis F plus E/B benannt sind (GEENS et al., 2005). Die Spezies *C. abortus*, *C. caviae*, *C. felis*, *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* sind klar von einander unterscheidbar (Tabelle 1) (CORSACO und VENDITTI, 2004).

**Tabelle 1.** Die Familie Chlamydiaceae und ihre Infektionserreger

Spezies	Hauptwirt	Krankheitsbild bzw. Infektionsverlauf
<i>Chlamydia muridarum</i>	Mäuse, Hamster	Meist asymptomatisch, Pneumonie
<i>Chlamydia suis</i>	Schwein	Konjunktivitis, Enteritis, Pneumonie, auch asymptomatisch
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Mensch	Trachoma, Lymphogranuloma venereum
<i>Chlamydophila abortus</i>	Wiederkäuer, Pferd, Schwein	Abort
<i>Chlamydophila caviae</i>	Meerschweinchen	Konjunktivitis
<i>Chlamydophila felis</i>	Katze	Konjunktivitis, Rhinitis
<i>Chlamydophila pecorum</i>	Wiederkäuer, Schwein	Abort, Enteritis, Encephalomyelitis, Pneumonie
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	Mensch, Perd	Pneumonie, Arthritis
<i>Chlamydophila psittaci</i>	Vögel, Mensch	Ornithose-Psittakose

### 2.1.2 Morphologie und Biologie

Die Morphologie der Chlamydien ergibt sich aus einem bei Mikroorganismen einzigartigen Entwicklungszyklus, welcher die intrazelluläre Vermehrung und das extrazelluläre Überleben ermöglicht. Während der Vermehrung der Chlamydien sind drei unterschiedliche Formen, die Elementar-, Intermediär- und Retikularkörperchen un-

terscheidbar. Diese bilden in der Wirtszelle das lichtmikroskopisch sichtbare Einschlusskörperchen.

- **Elementarkörperchen:** Das kokkoide Elementarkörperchen (EK), etwa 0,2-0,6  $\mu\text{m}$  groß, ist die extrazellulär überlebensfähige und nicht vermehrungsfähige, infektiöse Form. Die Zellwand entspricht dem Muster von gramnegativen Bakterien. Der Elementarkörper ist metabolisch minimal aktiv (Ruhephase).

- **Intermediärkörperchen:** Das kokkoide Intermediärkörperchen (IK) besitzt eine Größe von 0,3 bis 1,0  $\mu\text{m}$  und entsteht bei der Transformation von Retikular- zu Elementarkörperchen innerhalb des Einschlusskörperchens am Ende des Entwicklungszyklus.

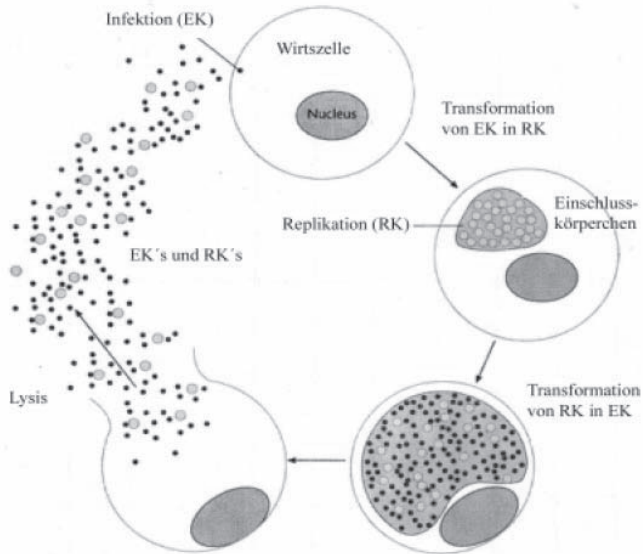
- **Retikularkörperchen:** Das Retikularkörperchen (RK) hat einen Durchmesser von 0,5 bis 1,5  $\mu\text{m}$  und ist von pleomorpher Form. Es ist nicht infektiös, intrazellulär vermehrungsfähig und das Zytoplasma ist reich an Ribosomen (SCHIEFER und KRAUSS, 1982; WYRICK und RICHMOND, 1989; GRIMES und WYRICK, 1991; KRAUSS und SCHMEER, 1992; VANROMPAY et al., 1995; ANDERSEN und VANROMPAY, 2003).

Die Infektion der Wirtszelle erfolgt durch Adsorption von Elementarkörperchen an Neuraminsäure-haltige Rezeptoren (Abbildung 1). Nach einem langsamen Endozytose-Prozess mit anschließender Lysosomenverschmelzung beginnt der Vermehrungsprozess im Phagosom. Für die Bindung an die Wirtszelle ist das Major Outer Membrane-Protein (MOMP) verantwortlich (HACKSTADT, 1986), welches bei den verschiedenen Stämmen unterschiedlich groß (bei *C. psittaci* 17-19 kDa) ist und

Grundlage für die Serotypisierung von Chlamydien ist (CALDWELL und SCHACHTER, 1982; KALTENBOECK et al., 1991). Die erste Phase besteht in der Stoffwechsel-Aktivierung der EK mit Strukturänderungen der Zellwand und dem Beginn der RNS- und Proteinsynthese. Es entwickelt sich eine vegetative, nicht-infektiöse Form, der pleomorphe Retikularkörper (RK), von 0,8-1,5 µm Größe. Nach einer Vermehrungsphase durch Querteilung kommt es stufenweise zu Kondensierungsformen, die wieder zum EK führen. Mit dem Absterben der Wirtszelle werden EK freigesetzt. In etwa 20 bis 72 Stunden ist der Zyklus abgeschlossen (BEDSON und BLAND, 1932; KRAUSS und SCHMEER, 1992).

Die Chlamydien gelten als „Energieparasiten“, weil sie energiereiche Verbindungen wie Adenosintriphosphat, Adenosindiphosphat, Guanintriphosphat und andere Nucleosidtriphosphate nicht im benötigten Umfang synthetisieren können (WARD, 1983; GRAYSTON et al., 1989; FUKUSHI und HIRAI, 1992; SELBITZ, 1992; ROLLE und MAYR, 1993; VANROMPAY et al., 1995; ANDERSEN et al., 1997; ANDERSEN, 1998; ANDERSEN und VANROMPAY, 2003).

Im ganzen Zyklus stellt die Wirtszelle verschiedene Enzyme, Nucleotide und besonders energiereiche Phosphate (ATP) zur Verfügung.



**Abbildung 1:** Replikation der Chlamydien

(<http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2004/1439/pdf/NuechterHeike-2004-01-28.pdf>)

### 2.1.3 Epidemiologie

Als obligate Parasiten von Eukaryoten haben die Chlamydien ihr Habitat überwiegend in Zellen von Warmblütern. Insekten können gelegentlich als Vektoren fungieren. Auf die mögliche Beteiligung der Arthropoden an der Verbreitung von Chlamydien deuten die Isolierungen des Erregers aus Milben und Federlingen hin (SHEWEN, 1980).

Empfänglich für die Infektion sind Vögel jeden Alters und wahrscheinlich alle Vogelarten. Bei den *Chlamydiaceae* sind bisher insgesamt 469 Vogelarten, darunter Tau-

ben, wildlebende Vögel, Greifvögel und Eulen als Chlamydienträger und ausscheider bekannt (KALETA und TADAY, 2003). Es wird allgemein angenommen, dass alle Chlamydien-Arten weltweit verbreitet sind. Die Infektiosität ist in der Regel sehr hoch; es kommt aber nicht immer zur klinischen Manifestation. Vielmehr führen klinisch inapparente, chronische Infektionen zum Trägertum und zur Ausscheidung mit Kontamination der Umgebung (BRAND, 1989; KALETA und TADAY, 2003).

Die Tenazität der Elementarkörper von Chlamydien außerhalb des Körpers ist abhängig von dem sie umgebenden Milieu und den auf sie einwirkenden Temperaturen und Lichtverhältnissen. FRITZSCHE und GERRIETS (1962) berichten, dass die Chlamydien bei höheren Temperaturen schneller inaktiviert werden. Die Autoren fanden eine Überlebensfähigkeit dieser Bakterien bei +4 °C von 15 Tagen, während sie bei 56 °C innerhalb von fünf Minuten zerstört werden. Außerdem können die Chlamydien durch dreiminütige UV-Bestrahlung inaktiviert werden.

Die Infektion wird bei Psittaziden als Psittakose, bei anderen Vogelarten als Ornithose bezeichnet. Der Verlauf der Infektion (Morbidity und Mortalität) ist von der Virulenz des Erregers, dem Übertragungsweg, der Infektionsdosis, der Immunitätslage, dem Lebensalter der Tiere und der betroffenen Vogelart abhängig (ANDERSEN und TAPPE, 1989; TAPPE et al., 1989; GRIMES und WYRICK, 1991). Experimentelle Infektionen mit hochvirulenten Putenstämmen bei Hühnern, Tauben und Sperlingen führen zu keinen oder nur geringfügigen Erkrankungen, während Kakadus und Papageien schwer erkranken und hohe Mortalitätsraten aufweisen (ANDERSEN et al., 1989; TAPPE et al., 1989; GRIMES und WYRICK, 1991).

Als wichtigster Virulenzfaktor gilt bei Chlamydien das MOMP. Es hat antigenen Charakter, ist hitzelabil und vermittelt die Bindung an die Wirtszelle. Das Molekulargewicht des MOMP korreliert mit der Virulenz; je geringer das Molekulargewicht, desto virulenter ist der betreffende Erregerstamm (WINSOR und GRIMES, 1988). Eine

Virulenzsteigerung kann jedoch auch durch schnelle Passagierung erfolgen, wobei es zum Erscheinen von neuen heterologen Antigenen auf der Oberfläche der Elementarkörperchen kommen kann (KRAUSS und SCHMEER, 1992; GERLACH, 1994; GYLSTORFF und GRIMM, 1998). Die unterschiedlichen Vermehrungsraten der Chlamydienisolate bei verschiedenen Körpertemperaturen können auf stamm-spezifische Virulenzmechanismen hindeuten. So vermehren sich z.B. Chlamydienstämme, die für Tauben und Sperlinge virulent sind, noch bei 43 °C, was der Körpertemperatur dieser Tiere entspricht (PAGE, 1966, 1971). In aviären Chlamydien wurden Plasmide nachgewiesen, welche ebenfalls Einfluss auf Virulenzeigenschaften nehmen können (McCLENAGHAN et al., 1986; VANROMPAY et al., 1995). ANDERSEN und VANROMPAY (2003) unterscheiden generell zwei „Virulenz-Kategorien“:

1. Hoch virulente Chlamydien-Stämme, welche akut verlaufende Epidemien beim Geflügel mit Mortalitätsraten von 5 bis 30 % auslösen.
2. Geringer virulente Chlamydienstämme, welche langsame, aber progressiv verlaufende Epidemien beim Geflügel mit Mortalitätsraten unter 5 % hervorrufen.

Hoch virulente Stämme werden sehr oft aus Puten und gelegentlich aus klinisch unauffälligen Wildvögeln isoliert. Das *Chlamydoxiphila-psittaci*-Serovar D ist fast immer an schweren Ornithose-Ausbrüchen mit Organläsionen und hohen Mortalitätsraten bei Mensch und Puten beteiligt. Bei langsam und progressiv verlaufenden Ornithose-Erkrankungen mit niedrigen Mortalitätsraten sind meist die Serovare B oder E beteiligt. Diese sind häufig aus Tauben, Enten und gelegentlich aus Puten, Sperlingen und Wildvögeln zu isolieren (ANDERSEN und VANROMPAY, 2003).

Die Infektion erfolgt durch direkten Kontakt oder aerogen. Sowohl klinisch erkrankte als auch latent infizierte Vögel scheiden den Erreger mit Kot, Tränenflüssigkeit, Nasensekret, Kropfmilch sowie Schnabel- und Rachenschleim aus. Besonders gefährdet sind Vögel aus Vogelhandlungen, Reisetauben, Stadttauben, Truthahn- und Entenzuchtbestände. Die Erregerausscheidung kann regelmäßig bis intermittierend verlaufen, aber sie ist meistens latent (KRAUSS und SCHMEER, 1992; ROLLE und MAYR, 1993; GERLACH, 1994; VANROMPAY et al., 1994; HOLZINGER, 1996; GYLSTORFF und GRIMM, 1998; BÖNNER, 2006).

Die Letalität ist sehr unterschiedlich (VANROMPAY et al., 1995). *Chlamydophila psittaci*-Isolate weisen sehr unterschiedliche Virulenz bzw. Pathogenität auf. Die Pathogenitätsunterschiede sind nicht nur zwischen Stämmen unterschiedlicher Serovare vorhanden, sondern auch zwischen Stämmen innerhalb derselben Serovare (HAFEZ, 2003).

Obwohl Chlamydien aus Bruteiern bzw. Embryonen einzelner Vogelarten (Huhn, Schneegans, Ente und Möwen) isoliert werden konnten, ist die Bedeutung der vertikalen Übertragung noch nicht ausreichend geklärt. Sie spielt wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle (ILLNER, 1962; LEHNERT, 1962; WILT et al., 1972; WITTENBRINK et al., 1993; VANROMPAY et al., 1995).

### **2.1.4 Pathogenese und Symptome**

Nach Aufnahme der Elementarkörperchen beginnt die Vermehrung innerhalb weniger Stunden in Makrophagen der Atmungsorgane, einschließlich der Lungen und Luftsäcke. Binnen ein bis zwei Tagen p. i. gelangt der Erreger über die Blutbahn in Milz, Leber und Herz. Am dritten Tag p. i. ist er in der Nase und im Darm nachweisbar (VANROMPAY et al., 1995; HAFEZ, 2003).



Die pathologisch-anatomischen Veränderungen bei Puten bestehen aus Rhinitis, Konjunktivitis, Sinusitis, Pneumonie, Aerosacculitis, Myo- und Perikarditis, Hepato- und Splenomegalie sowie Hepatitis, Enteritis, Nephrose, Nephritis, Orchitis, Epididymitis, Knochenmarksatrophie, Meningoenzephalitis und Polyserositis (HAFEZ, 2003). Das Sektionsbild zeigt fibrinöse Exsudate in Luftsäcken, Perikard und Leibeshöhle sowie eine Pneumonie (VANROMPAY et al., 1995). Puten können klinisch vollkommen unauffällig sein und gesund erscheinen, in der Sektion aber dennoch typische Organveränderungen zeigen (ANDERSEN et al., 1997; TADAY, 1998).

Es können fibrinöse Exsudationen auf serösen Häuten (Milz, Perikard, Leberserosa, Peritoneum, Epikard) und eine Verdickung und Trübung der Luftsäcke festgestellt werden (GRATZL und KÖHLER, 1968; TAPPE et al., 1989). Eine nicht eitrig Myokarditis, diffuse Pneumonien, Lungenödeme, Blutungen und Adhäsionen vor allem am Epikard sind keine Seltenheit. Die Leber ist geschwollen, weist Nekroseherde und häufig eine grünliche Farbe auf. Die Milz kann vergrößert und brüchig sein sowie feine Nekroseherde aufweisen. Auch kommen eine katarrhalische Enteritis und Nierenschwellung häufig vor. Die Ovarien sind meist atrophisch manchmal sogar nekrotisch. Bei weiblichen Tieren befindet sich in der Leibeshöhle häufig eine wässrige, braune Flüssigkeit, die von rupturierten Eifollikeln herrührt. Bei männlichen Tieren sind die Hoden atrophisch (HILBRICH, 1978; KRAUSS und SCHMEER, 1992). Aufgrund der makroskopischen Veränderungen kann jedoch nur eine Verdachtsdiagnose gestellt werden. Bei Masthühnern können keine typischen Sektionsbefunde festgestellt werden. Makroskopische Veränderungen sind z.B. Abmagerung, Tracheitis, Konjunktivitis, Luftsackentzündungen, Meningoenzephalitis, Perikarditis, Perihepatitis, Hepatomegalie und Splenomegalie (GRATZL und KÖHLER, 1968; BARR et al., 1986; SUWA et al., 1990; ANDERSEN et al., 1997).

ARZEY und ARZEY (1990) beschreiben allerdings Tracheitis, Perikarditis, Perihepatitis und Splenomegalie bei Legehühnern (ARZEY und ARZEY, 1990).

Eine Infektion mit *Chlamydophila psittaci* kann klinisch ganz unterschiedlich verlaufen, es existieren keine pathognomonischen Symptome. Bei klinischer Manifestation kann es zu respiratorischen Symptomen, Konjunktivitis, Schnupfen, mukopurulentem Ausfluss aus Nase und Augen, Husten, Dyspnoe, Pneumonie sowie zum Absatz von hellgrünem bis grauem wässrigen Kot kommen. Weitere Symptome sind Apathie, Mattigkeit, plötzliche Todesfälle, Kümmeren, gesträubtes Federkleid, gestörte Befiedering, verminderte Futter- und Wasseraufnahme, Anorexie und Kachexie (GRIMES and WYRICK, 1991; BECKER et al., 1992; KRAUS und SCHMEER, 1992; ROLLE und MAYR, 1993; VANROMPAY et al., 1993, 1995 und 1997). Bei einigen betroffenen Papageien können zentralnervöse Erscheinungen auftreten (HARRISON, 1989; HAFEZ, 2003).

Bei der Blutuntersuchung fällt vorwiegend bei größeren Papageien häufig eine massive Leukozytose (Heterophilie, Basophilie, Monozytose) auf. Blutchemisch sind oft die Aspartataminotransferase (AST), Laktatdehydrogenase (LDH), Kreatinphosphokinase (CK) und die Gallensäuren erhöht (PEES, 2004).

Es können 5 Formen des Infektionsverlaufs bei Papageien und Sittichen unterschieden werden (KALETA, 1997):

1. Die letale, akute, systemische Krankheit entsteht nach massiver Infektion mit vollvirulenten Erregern bei Jungtieren. Die Inkubationszeit (IKZ) liegt bei 3-7 Tagen. Die Krankheitsdauer liegt bei 8-14 Tagen.
2. Die subakute bis protrahierte Krankheit entwickelt sich nach Infektion mit vollvirulenten bis mäßig virulenten Erregern bei erwachsenen Vögeln jeglicher Art. Die IKZ liegt bei 7-14 Tagen, die Krankheitsdauer bei bis zu 3 Wochen oder

länger. Die Symptome sind Apathie, Kachexie, Konjunktivitis, Nasenausfluss bis zur nervalen Symptomatik. Eine Heilung bei Behandlung ist möglich, ansonsten tritt der Tod ein.

3. Die chronische Infektion ist meist symptomlos, kann aber mit Symptomen wie unter dem Punkt 2. genannt einhergehen. Die IKZ liegt bei 3 Monaten und die Dauer der Erkrankung bei 2 Monaten und mehr.
4. Die subklinische persistierende Infektion der erwachsenen Psittaziden ist die häufigste Form. Die Tiere bleiben über Jahre bis Jahrzehnte gesund, aber ein Erregernachweis (z.B. über Rachenabstriche) ist gegeben.
5. Die aktivierte, persistierende Infektion geht aus der subklinischen Infektion hervor. Durch endogene oder exogene Faktoren beginnt eine Erregervermehrung, die dann zu Symptomen, wie unter dem Punkt 2. beschrieben, führt.

## **2.1.5 Diagnose**

### **2.1.5.1 Isolierungsmethode und direkter Erregernachweis**

Für die Erregerisolierung ist es wichtig, dass die Proben frisch sind und in einem geeigneten Transportmedium transportiert werden. Die Proben können sein:

- Tupferproben von Nase, Rachen, Kloake, Konjunktiven oder Nasen- und Konjunktivalsekret sowie Peritonealflüssigkeit bei Aszites (PAGE und GRIMES, 1984, GRIMES und WYRICK, 1991; VANROMPAY et al., 1992; ROLLE und MAYR, 1993; GERBERMANN, 1998; ANDERSEN, 1996, 2000).

- Gewebeproben und Organproben von Luftsäcken, Lungen, Milz, Perikard, Herz, Leber, Peritoneum und Niere (KRAUS und SCHMEER, 1992; VANROMPAY et al., 1992).

Als Transportmedien können Hirn-Herz-Bouillon, Saccharose-Phosphat-Lösung und Succrose-Phosphat-Lösung mit jeweils 10 % fetalem Kälberserum (FKS), sowie PBS (Phosphate Buffered Saline), MEM (Minimum Essential Medium Eagle) oder BME (Basal Medium Eagle's) mit einem Zusatz von 6 % FKS verwendet werden (BOVARNICK et al., 1950; GYLSTORFF und GRIMM, 1998). Den Lösungen werden Antimykotika und Antibiotika zugesetzt, um eine Kontamination mit Fremdkleimen zu vermeiden (ANDERSEN et al., 1989; MCELNEA und GROSS, 1999).

Chlamydien können nur in eukaryotischen Zellen isoliert und vermehrt werden. Die Isolierung und Vermehrung von Chlamydien wird häufig auf verschiedenen Zellkulturrarten (Hühnerembryo-Fibroblasten, Buffalo-Green-Monkey-Kidney-Zellkulturen, HeLa-Zellen, McCoy-Zellen, Vero-Zellen, L929-Zellen, Mäusemilzzellen) durchgeführt (MEISSLER, 1980; HUH, 1991; VANROMPAY et al., 1992; ARIZMEDI und GRIMES, 1995; EVERETT und ANDERSEN, 1997).

Der Reinigungs- und Konzentrierungsschritt des Erreger-Inokulums mittels Zentrifugation wird für die Steigerung der Zelladsorption während der Zellinfektion durchgeführt (ALLAN und PEARCE, 1979; MEISSLER und KRAUSS, 1980; ARENS und WEINGARTEN, 1981; WARD und MURRAY, 1984; FINLAYSON et al., 1985; ANDERSEN und VANROMPAY, 2003). Die Behandlung der Zellkultur durch Zusatz von Substanzen, welche die Protein- und Nukleinsäure-Synthese der Wirtszellen hemmen, u.a. Cycloheximid, wird auch verwendet (LINDENSTRUTH und FROST, 1993; UNKRIG, 1995; ANDERSEN, 1996; BOGNER et al., 1997; ANDERSEN and VANROMPAY, 2003).

Der Nachweis von Chlamydien kann dann auf Abklatschpräparaten mittels spezieller Färbungen (Giemsa, Castañeda, Macchiavello, Stamp, Giménez), durch Immunfluoreszenz oder mit monoklonalen und polyklonalen Antikörpern erfolgen (GIEMSA, 1902; CASTAÑEDA, 1930; MACCHIAVELLO, 1937; STAMP et al., 1950; GIMÉNEZ, 1964; KRAUSS und SCHMEER, 1992; ROLLE und MAYR, 1993; SATALOWICH et al., 1994; UNKRIG, 1995; VANROMPAY et al., 1995; GYLSTORFF und GRIMM, 1998).

Die Erregerisolierung in der Zellkultur ist jedoch nicht uneingeschränkt zu empfehlen, da die Anzüchtung und Vermehrung des Erregers relativ schwierig ist und mit Verkeimung und/oder toxischen Reaktionen der Zellen gerechnet werden muss. Zudem ist der Anzüchtungs- und Vermehrungsprozess relativ zeitaufwendig (1 bis 2 Wochen) (KRAUSS, 1980; MEISLER, 1980; ARENS und WEINGARTEN, 1981; GERBERMANN und ERBER, 1985; NÜCHTER, 2004).

### **2.1.5.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)**

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren zur Vermehrung von DNA *in vitro*. Sie besteht im Wesentlichen aus drei Schritten: Trennen des DNA-Doppelstranges, Anheften synthetischer Start-DNA und Vervielfältigung der gesuchten DNA (NEWTON und GRAHAM, 1994).

Ein bis zu 3.000 Basenpaare langes DNA-Fragment wird bei hoher Temperatur in seine Einzelstränge aufgeschmolzen. Anschließend lagern sich bei einer niedrigeren Temperatur spezifische Startsignale, so genannte Primer, an bekannte Stellen der Einzelstränge an (INNIS und GELFAND, 1990; MÜHLHARDT, 2002).

Zur Neubildung des noch fehlenden, komplementären Stranges sind nun Enzyme notwendig. Da Enzyme normalerweise bei höheren Temperaturen degenerieren,

müssten sie nach jedem Temperaturzyklus neu hinzugefügt werden. Um dies zu vermeiden, wird bei der PCR eine hitzestabile DNA-Polymerase benutzt. Sie setzt hinter dem Primer an und bildet unter Zugabe von "Basenbausteinen", den Nukleotiden, den zum Einzelstrang komplementären DNA-Strang neu. Dieser spiegelbildliche Kopiervorgang wird 20-40 mal wiederholt. Mit jedem neuen Zyklus steigt die Anzahl der DNA-Fragmente exponentiell an, so dass diese nach Ablauf der PCR in millionenfacher Kopie vorliegen.

Vollautomatische "Thermocycler", in denen verschiedene Temperaturzyklen unabhängig voneinander im selben Gerät ablaufen können, erlauben inzwischen die rasche Vervielfältigung in nur ein paar Stunden (NEWTON und GRAHAM, 1994; MÜHLHARDT, 2002).

Sowohl der Nachweis als auch die Identifizierung werden am besten mittels PCR oder mittels PCR-Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (PCR-RFLP) durchgeführt. Chlamydiennachweise können durch Detektion des *omp1*-Genlokus (KALTENBOECK et al., 1997; HEWINSON et al., 1991; OLSEN et al., 1998; YOSHIDA et al., 1998; SACHSE und HOTZEL, 2003), des *ompB*-Gens (MCELNEA und CROSS, 1999), der 16S-RNA (MESSMER et al., 1997; MORONEY et al., 1998) sowie den 16S- und 23S-rRNA-Genen (EVERETT et al., 1999 und 1999a) geführt werden. Für eine PCR können wie bei der Erregerisolierung Tupfer-, Kot- sowie Gewebeproben eingesetzt werden. Kotproben eignen sich besser für die PCR als für die Erregerisolierung in der Zellkultur. Es sind auch vermehrungsunfähige Erreger nachweisbar, da nur deren Nukleinsäure benötigt wird. Diese Methode erlaubt den spezies-spezifischen Nachweis bei Chlamydien. Das Testergebnis liegt nach ein bis zwei Tagen vor, eine zeitaufwendige Anzucht des Erregers in der Zellkultur entfällt. Große Probenmengen können leicht bewältigt werden. Die PCR ist ein sensibles und schnelles Verfahren und ist in vielerlei Hinsicht der Erregerisolierung in Zell-

kulturen überlegen (MC ELNEA und GROSS, 1999; SACHSE et al., 2003; NÜCHTER, 2004). Jedoch ist ein positives PCR-Ergebniss kein Beweis für lebendige und replikative Chlamydien, da mit dieser Methode nicht aussagekräftig ist ob, eine persistierende Infektion, ein akuter Krankheitsverlauf, eine symptomlose Infektion, die Anwesenheit der DNA nach einer erfolgreichen immunologischen Schutzantwort oder die Anwesenheit der DNA nach einer erfolgreichen antibiotischen Therapie vorliegt (VANROMPAY, 2000).

### **2.1.5.3 Antikörpernachweise**

Es stehen verschiedene Antikörpernachweissysteme zur Verfügung: Antigen-ELISA, und serologische Methoden wie Komplement-Bindungs-Reaktion (KBR) und Antikörper-ELISA. Prinzipielle Probleme beim Einsatz der Antikörper-Nachweismethoden ergeben sich bei niedrigen oder spät erscheinenden Antikörpertitern, beispielsweise bei klinisch unauffälligen Ausscheidern, sowie infolge des hohen allgemeinen Durchseuchungsgrades der Nutztiere und Vögel mit Chlamydien, wodurch sich die Interpretation der Befunde erschwert. Einmalige Untersuchungen geben Hinweise auf den Infektionsstatus. Um einen Bezug zur Krankheitsdiagnostik herzustellen, müssen Serumpaare im Abstand von 2-4 Wochen untersucht werden und die gemessenen Titer miteinander verglichen werden. Ist der Antikörpertiter der zweiten Probe deutlich höher als der Titer der ersten Probe, so kann eine kausale Beziehung zwischen Chlamydien-Infektion und Symptomatik angenommen werden (SACHSE und GROßMANN, 2002).

## **2.1.6 Resistenz von Chlamydien**

Ein pathogener Mikroorganismus muss dann als resistent bezeichnet werden, wenn die *in vitro* ermittelte minimale Hemmkonzentration (MHK) höher ist als die *in vivo* am Infektionsort erreichbare Serum- bzw. Gewebekonzentration. Sie ist entweder durch eine primäre Unempfindlichkeit der Bakterien gegenüber dem Chemotherapeutikum oder durch eine Inaktivierung des Antibiotikums durch bakterielle Enzyme bedingt (FORTH et al., 1990).

### **2.1.6.1 Art der Keimresistenz**

Die natürliche Resistenz ist eine vorhandene Unempfindlichkeit bzw. Widerstandsfähigkeit von Mikroorganismen gegenüber einem bestimmten Wirkstoff (z.B. Antibiotika bzw. Chemotherapeutika). Die erworbene Resistenz ist eine Widerstandsfähigkeit (genetische und biochemische Mechanismen) von Mikroorganismen nach Exposition eines bestimmten Wirkstoffs (z.B. Antibiotika bzw. Chemotherapeutika) (ROLLE und MAYR, 1993; PSCHYREMBEL, 1994). Die Gefahr einer sekundären Resistenzbildung kann gegeben sein, wenn Antibiotika unterdosiert verabreicht oder intermittierend und zu kurz eingenommen werden. Es lässt sich hierbei ein rascher Resistenzanstieg, d.h. die sogenannte „one-step-mutation“, und ein langsamer Resistenzanstieg, die sogenannte „multiple-step-mutation“ unterscheiden. Weiterhin gibt es eine übertragbare Resistenz, die auf der Übertragung genetischen Materials von einer Bakterienzelle auf eine andere beruht. Diese Resistenz geht von Resistenz (R-) Faktoren aus, die auch als Resistenzplasmide bezeichnet werden. Die R-Faktoren umfassen häufig mehrere Gene, die zur gleichen Zeit eine Resistenz gegenüber verschiedenen Antibiotika aufweisen (FORTH et al., 1990).



Es gibt grundsätzlich drei Möglichkeiten, wie genetisches Material weitergegeben werden kann: durch Konjugation, Transduktion oder Transformation.

- **Konjugation:** Für die Übertragung durch Konjugation ist ein direkter Zell-zu-Zell-Kontakt notwendig, der über einen Proteinfaden geknüpft wird. Bei gramnegativen Bakterien wird meist dieser Weg eingeschlagen. Er ist nicht speziesspezifisch und so können R-Faktoren auch von einer Art auf eine andere übertragen werden und nicht nur innerhalb einer Bakterienart (FORTH et al., 1990).

Da im Darm ständig Plasmide unter den Bakterien ausgetauscht werden, ist es möglich, dass die Darmbakterien ihre R-Faktoren auch wieder einbüßen, was für ihr klinisches Verhalten entscheidend sein kann (FORTH et al., 1990).

- **Transduktion:** Phagen transportieren die R-Faktoren von der Donator- in die Akzeptorzelle. Plasmide mit dieser Eigenschaft können durch bestimmte Phagen auf andere Bakterien übertragen werden, d.h. die Transduktion ist speziesspezifisch (FORTH et al., 1990).

- **Transformation:** Dabei gibt die Donatorzelle DNA an eine Akzeptorzelle (FORTH et al., 1990).

Bei den meisten Bakterien ist die Bestimmung der natürlichen und erworbenen Resistenz gegen Antibiotika auf Nährböden möglich. Bei Chlamydien kommen wegen ihrer obligat intrazellulären Vermehrung nur lebende Systeme wie Zellkulturen, embryonierte Hühnereier oder Versuchstiere in Betracht (HENNING und KRAUSS, 1986; BUTAYE et al., 1997; DONATI et al., 2002).

### 2.1.6.2 **Arzneimittel-Konzentrationen verschiedener Wirkstoffe bei Vögeln**

FLAMMER et al. (1989) fanden eine Chlortetracyclin-Blutkonzentration von 1-2 µg/ml in Aras, die mit Pellets mit 1-1,5 %iger CTC-Lösung für 30 oder 45 Tage gefüttert wurden.

Die Pharmakokinetikparameter für Doxycyclin wurden in Puten nach 250 mg/L Wasser bei SANTOS et al. (1997) beschrieben. Die maximale Plasmakonzentration war 4,9 (+/-1,4) bis 5,7 (+/-1,0) µg/ml. LACZAY et al. (2001) haben die Doxycyclin-Pharmakokinetik in Broilern nach einer oralen Dose von 10,0 mg/kg untersucht. Sie haben eine maximale Plasmakonzentration von 4,47 +/- 0,16 µg/ml.

JUNG (1992) erzielte während einer Enrofloxacin-Dauermedikation über das Futter die folgenden mittleren Blutspiegel: Wellensittiche 0,40 µg/ml bei 250 ppm und 0,83 µg/ml bei 500 ppm, Kanarienvogelsittiche 1,9 µg/ml bei 500 ppm, Alexandersittiche 0,72 µg/ml bei 500 ppm und bei 1000 ppm stark schwankende Werte von 0,08-2,1 µg/ml, Mohrenkopfpapageien 0,56 µg/ml bei 500 ppm und 0,66 µg/ml bei 1000 ppm Dosierung. LINDENSTRUTH (1992) fand, dass die ermittelten Enrofloxacin-Blutspiegel bei einer Futterdosis von 500 ppm im Gruppendurchschnitt (Kongo-Graupapageien, Timneh-Graupapageien, Aras, Blaustirn-Amazonen, Gelbwangen-Amazonen, Weißstirn-Amazonen, Gelbnacken-Amazonen und Mohrenkopfpapageien) zwischen 0,66 und 4,10 µg/ml lagen.

Leider gibt es nicht viele verfügbare Informationen über die Plasmakonzentration von Difloxacin. Nach oraler Difloxacin-Behandlung von Hühnern mit 5 mg/kg wurde eine Serumkonzentration von 0,96-3,61 µg/ml (INUI et al., 1998) festgestellt.

GOUDAH et al. (2004) erzielten eine Erythromycin-Plasmakonzentration in Broilern von 5,0-6,9 µg/ml, wenn die Tiere mit 30 mg Erythromycin/kg i.v., s.c., i.m. und oral behandelt wurden. Bei einer Arbeit mit Tauben fand man heraus, dass Erythromycin

keine gute Pharmakokinetik zeigt. Bei einer Konzentration im Wasser von 1 g/l wurde 1,6 µg/ml in Lungen und Trachea und eine niedrige Konzentration im Plasma detektiert (VANHAECKE et al., 1990).

Es wurden keine Informationen über die Pharmakokinetik von Clarithromycin bei Vögeln gefunden.

### **2.1.7 Minimale Hemmstoffkonzentration**

Zur Überprüfung der Wirksamkeit von antimikrobiellen Substanzen gegen *Chlamydomophila psittaci* kann die Ermittlung der minimalen Hemmstoffkonzentration (MHK, engl.: minimum inhibitory concentration [MIC]) dienen. HENNING und KRAUSS (1986, 1986a) definieren die MHK als die niedrigste Konzentration einer antimikrobiell wirksamen Substanz, bei der keine Einschlüsse mittels Giménez-Färbung zu finden sind.

Zur Bestimmung der MHK wurden Zellkulturen mit *Chlamydomophila psittaci* infiziert und antimikrobielle Substanzen zugesetzt, wobei der Antibiotika-Zusatz je nach Untersucher teils vor und teils nach der Aufzentrifugation des Erregers auf die Zellen erfolgte (HENNING und KRAUSS, 1986). Es wurden McCoy-Zellen (RIDGWAY et al., 1978; HENNING und KRAUSS, 1986), HeLa-Zellen, L-229-Zellen (KUO et al., 1977), Mäusefibroblasten (TRIBBY et al., 1973), Nierenzelllinie des Rhesusaffen (DONATI et al., 2002) und BGM-Zellen (HENNING und KRAUSS, 1986; THEIS, Dissertation in Vorbereitung) für diese Untersuchungen verwendet (siehe 2.1.5.1).

Je nach Autor wurden die Zellen mit unterschiedlichen Substanzen wie Cycloheximid, Diäthylenaminoäthylidextran (DEAE-Dextran), 5-Jod-2-Desoxyuridin (IUDR) oder einer Kombination aus DEAE-Dextran und IUDR vorbehandelt (KUO et al., 1977; LEE et al., 1978; RIDGWAY et al., 1978; MOURAD, 1980; HENNING und KRAUSS,

1986; DONATI et al., 2002) (siehe 2.1.5.1). Die Untersuchung der infizierten Zellen auf Chlamydien-Einschlüsse im Zytoplasma findet meist 48 bis 72 Stunden nach der Infektion der Zellkulturen statt (siehe 2.1.5.1).

Die quantitative Bestimmung der MHK ist bei obligat intrazellulären Bakterien wie *Chlamydomphila psittaci* schwieriger als bei extrazellulären Bakterien. Die Methoden zur Ermittlung der MHK sind bis jetzt nicht standardisiert und werden durch methodische und technische Unterschiede bei ihrer Ermittlung beeinflusst (BUTAYE et al., 1997; SUCHLAND et al., 2003).

HENNING und KRAUSS (1986) ermittelten die MHK für Doxycyclin gegen 12 *Chlamydomphila psittaci*-Isolate. Hierfür wurden ein bis drei Tage alte BGM-Zellkulturen und McCoy-Monolayer, welche mit 0,5 ml Chlamydien-Suspension und 0,5 ml Doxycyclin-Lösung in verschiedenen Verdünnungsstufen beschickt wurden, verwendet. Die beimpften Zellen wurden eine Stunde bei 35 °C mit 2000 g zentrifugiert und dann je nach Zellkultur 40 bis 90 Stunden (37 °C) inkubiert. Die BGM-Zellen und McCoy-Zellen wurden nach GIMÉNEZ (1964) gefärbt. Die MHK betrug im Mittel 0,03 µg/ml (0,01-0,05 µg/ml). Alle untersuchten *Chlamydomphila psittaci*-Isolate waren voll empfindlich.

BUTAYE et al. (1997) testeten *Chlamydomphila psittaci*-Isolate auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Doxycyclin und Enrofloxacin. Hierbei handelt es sich um *Chlamydomphila psittaci*-Isolate aus Feldinfektionen von 14 europäischen Mastputen. Für die Anzucht des Erregers und die Durchführung des Tests wurden BGM-Zellkulturen verwendet, diese wurden in einem Medium ohne Antibiotika-Zusätze angezchtet. Die Zellen wurden vor der Verimpfung des Erregers zweimal (ohne Antibiotika-Zusätze) subkultiviert. Doxycyclin wurde in einer Konzentration von 0,2 bis 0,00625 µg/ml und Enrofloxacin in einer Konzentration von 1 bis 0,03125 µg/ml eingesetzt. Bei Doxycyclin lag die MHK bei 0,05 bis 0,2 µg/ml mit einem Mittelwert von 0,1 µg/ml und bei

Enrofloxacin, bei 0,25 mg/ml. Resistenzen von *Chlamydophila psittaci* gegen Doxycyclin und Enrofloxacin konnten nicht entdeckt werden.

DONATI et al. (2002) bestimmten die MHK für Doxycyclin und Erythromycin gegen 20 *C. psittaci*-Isolate. LLC-MHZ-Zellen wurden mit dem Erreger infiziert und für eine Stunde mit 1700 g zentrifugiert. Am Ende wurde das Medium entfernt und die Zellen mit neuem Medium, welches verschiedene Konzentrationen der Antibiotika enthält, bedeckt. Die MHK für Doxycyclin beträgt 0,03-0,06 µg/ml, während die MHK für Erythromycin 0,125-0,25 war.

Ein Problem, welches mit der Behandlung von Vögeln mit einer *Chlamydophila psittaci*-Infektion assoziiert ist, ist die Möglichkeit der Persistenz des Erregers im Körper nach Beendigung der Therapie. THEIS (Dissertation in Vorbereitung) testete daher die MHK von verschiedenen Antibiotika bei 19 *Chlamydophila psittaci*-Isolaten von Psittaziden, Tauben und Enten nach einer Behandlung der Tiere mit Tetracyclinen. Die MHK für Chlortetracyclin und Doxycyclin lag bei 1,0 bis 10,0 µg/ml und die MHK für Enrofloxacin und Difloxacin bei 0,5 bis 1,0 µg/ml. Die MHK für Tetracycline und Doxycycline waren bei mit Tetracyclinen vorbehandelten und unbehandelten Vögeln gleich hoch. Dies bedeutet, dass bei keinem der getesteten Isolate eine Resistenz gegen diese beiden Antibiotika vorhanden war.

## **2.2 Chemoprophylaxe und Therapie der Chlamydiose bei Vögeln**

### **2.2.1 Allgemeines**

Chlamydien sind sehr empfindlich gegenüber Chemikalien, die die Lipidkomponenten der Zellwand beeinflussen. Hingegen erweisen sich die Elementarkörperchen außerhalb des Wirtes als hoch resistent, sodass ihre Infektiösität in Staub auch nach Monaten noch erhalten ist.

Chlamydien besitzen eine primäre Resistenz gegen Rifamycin, Gentamicin, Kanamycin, Vancomycin, Streptomycin, Ristocetin, Neomycin, Mycostatin, Nystatin, Amphotericin B, Bacitracin und Sulfonamiden (Tabelle 2) (KESHISHYAN et al., 1973; SPEARS und STORZ, 1979; MOULDER, 1984; HENNING, 1985; GRIMES and WYRICK, 1991; KRAUSS und SCHMEER, 1992; GERLACH, 1994; GYLSTORFF und GRIMM, 1998; BINET und MAURELLI, 2005).

Chloramphenicol wirkt in therapeutischen Dosen chlamydiostatisch, weist jedoch eine 3-10-fach geringere Aktivität als die Tetracycline auf (Tabelle 3) (LÜTHGEN, 1972; STORZ und KRAUSS, 1985; WEHR und BEER, 1987).

Chlamydien sind empfindlich gegenüber Tetracyclinen (z.B. Chlortetracyclin, Oxytetracyclin) und Makrolid-Antibiotika (z.B. Erythromycin), Chloramphenicol, Chinolone sowie Clindamycin (SELBITZ, 1992; ROLLE und MAYR, 1993; ANDERSEN et al., 1997; ANDERSEN, 1998; THEURETZBACHER und SEEWALD, 1999), aber weniger empfindlich gegen Penicillin (ANDERSEN und VANROMPAY, 2003). Tetracycline, Erythromycin und Chloramphenicol verhindern die Proteinsynthese des Erregers (ANDERSEN et al., 1997), während Penicillin mit der Zellwandsynthese der Chlamydien interferiert (Tabelle 2 und 3). Es entstehen abnorm große Retikularkörperchen,

da die Transformation von Retikular- in Elementarkörperchen gestört wird (ANDERSEN und VANROMPAY, 2003).

**Tabelle 2.** Wirksame oder unwirksame antibakterielle Wirkstoffe zur Therapie der klinisch manifesten Chlamydiose (Psittakose)

Name des Wirkstoffs	Entdeckung	Zur Therapie der Chlamydiose oder Psittakose	
		Wirksam	unwirksam
Penicillin	1928	(x)*	
Sulfonamide	1935		x
Bacitracin	ca. 1940		x
Ristocetin	1944		x
Streptomycin	1944		x
Chloramphenicol	1947	x	
Tetracycline	1948	x	
Erythromycin	1949	x	
Neomycin	1949		X
Vancomycin	1956		X
Nystatin	1950		X
Amphotericin B	1955		X
Kanamycin	1957		X
Rifamycin	1957		X
Gentamicin	1963		X
Clindamycin	1970	x	
Enrofloxacin	1980	x	
Difloxacin	ca. 1980	x	
Clarithromycin	1984	x	

\*wenig wirksam gegen Chlamydien

**Tabelle 3.** Pharmakologische Eigenschaften von Wirkstoffen zur Therapie der Psittakose

<b>Wirkstoffe</b>	<b>Pharmakologische Eigenschaften</b>
Penicillin	Störung der Zellwandsynthese der Chlamydien
Chloramphenicol*	Verhinderung der Proteinsynthese der Chlamydien
Tetracycline	Verhinderung der Proteinsynthese der Chlamydien
Chinolone	Veränderung des Verdrillungszustandes der Chlamydien-DNA
Makrolide	Verhinderung der Proteinsynthese der Chlamydien

\*seit 22.08.1994 nicht mehr zugelassen

Gemäß Psittakose-VO vom 31. Dezember 2005 gelten als „wirksame Mittel“ zur Therapie der klinisch manifesten Psittakose folgende Arzneimittel: Chlortetracyclin (CTC), Doxycyclin und Enrofloxacin (Tabelle 4). Putenbestände können für die Therapie der Ornithose mit Chlor- oder Oxytetracyclin behandelt werden (KRAUSS und SCHMEER, 1992; ROLLE und MAYR, 1993; ANDERSEN et al., 1997), während bei Einzeltierbehandlung Doxycyclin verabreicht werden kann. ANDERSEN et al. (1997) geben an, dass die Therapie der Chlamydiose bei Puten auch bei anderem Geflügel, z.B. bei Hühnern, angewendet werden kann. In Tabelle 5 sind weitere Informationen über Indikationen der Wirkstoffe Tetracyclin (Chlortetracyclin, Doxycyclin), Chinolone (Enrofloxacin, Difloxacin) und Makrolide (Clarithromycin, Erythromycin) zusammengefasst.



**Tabelle 4.** Wirksame Mittel zur Therapie der Psittakose sowie zur Metaphylaxe von Psittaziden in Quarantänestationen gemäß Psittakose-VO vom 14. Oktober 1999 und 31. Dezember 2005

Wirkstoff	Vogel	Dosierung	Dauer der Behandlung
CTC	Amazona, Poicephalus, Psittacula, Eclectus, Loriculus, Micrositta, Lathamus, Psittrichas	5000 mg/kg Futter	45 Tage
	Agapornis, Cyanoramphus, Eupsittacula, Myiopsitta, Nandayus, Neophema, Nymphicus, Platycercus, Poicephalus, Psephotus	2500 mg/kg Futter	45 Tage
	Brotogeris, Melopsittacus, Kanarienvogel, Finken, Weibervogel	500 mg/kg Futter	30 Tage
	Tauben	5 mg/g Futter	25 Tage
Doxycyclin	Mittelgroße und größere Psittaziden	75 mg/kg KGW i.m.	6 Injektionen in 5 Tagen plus 3 weitere Injektionen in viertägigen
Enrofloxacin	Amazona, Poicephalus, Psittacula, Eclectus, Loriculus, Micrositta, Lathamus, Psittrichas, Agapornis, Cyanoramphus, Eupsittacula, Myiopsitta, Nandayus, Neophema, Nymphicus, Platycercus, Poicephalus, Psephotus	0,5 mg/g Futter	14 Tage

**Tabelle 5:** Indikationen der Wirkstoffe Chlortetracyclin, Doxycyclin, Enrofloxacin, Difloxacin, Clarithromycin und Erythromycin bei Vögeln

Wirkstoff- gruppe	Wirkstoff	Vogelgruppe	Wirksam bei	Literatur
Tetracycline	CTC	Hausgeflügel	Salmonellose, Kokzidiose	RIVIERE und SPOO, 1995
		Psittaziden	Chlamydiose	DORRESTEIN, 1995; KROKER, 1999
	Doxycyclin	Hausgeflügel	Atemwegserkrankungen bakterieller Ursachen	RIVIERE und SPOO, 1995
		Psittaziden	Chlamydiose	SHAW und RUBIN, 1986; RIVIERE und SPOO, 1995 RIOND, 1988; DORRESTEIN, 1995; RIVIERE und SPOO, 1995; KROKER, 1999; PLUMB, 1999; FLAMMER et al., 2001; RÜBEL und ISENBÜGEL, 2001

Wirkstoffgruppe	Wirkstoff	Vogelgruppe	Wirksam bei	Literatur
Chinolone	Difloxacin	Hausgeflügel	Pasteurellose, Colibazilliose, Mykoplasmosen	KROKER, 1999; OLCHOWY et al., 2000
		Hausgeflügel	Colibazilliose, Salmonellose, Mykoplasmosen, Haemophilose, Rotlauf	SPOO und RIVIERE, 1995; KROKER, 1999
	Enrofloxacin	Psittaziden	Pseudomonadose, Klebsielliose, Colibazilliose	BAUMGARTNER und ISENBÜGEL, 1998; RÜBEL und ISENBÜGEL, 2001
	Clarithromycin	Nur bei Hund und Meerschweinchen beschrieben	Streptokokkose, Staphylokokkose, Mykoplasmosen, Toxoplasmose, Cryptosporidose, Plasmodiose, Legionellose, Chlamydiose, Borreliose	KAPUSNIK-UNER et al., 1995; FITZGEORGE et al., 1993
Makrolide		Geflügel	Mykoplasmosen	EMEA, 1995
	Erythromycin	Papageien und Sittiche	Grampositive Keime und Kokken	RÜBEL und ISENBÜGEL, 1998, 2001
		Wellensittich	Grampositive Keime, Kokken, Mykoplasmosen	BAUMGARTNER und ISENBÜGEL, 1998

### 2.2.2 Tetracycline

Sie gehören neben den Penicillinen zu den wichtigsten Breitspektrumantibiotika. Sie sind seit 1952 auf dem Markt (RIVIERE und SPOO, 1995; KROKER, 1999).

Die Tetracycline, insbesondere Chlortetracyclin (CTC) und Doxycyclin, nehmen in der Ornithose/Psittakose-Therapie eine dominierende Stellung ein. Dies spiegelt sich deutlich im Psittakoserecht wider. Ihr Wirkungsspektrum umfasst neben einer Vielzahl grampositiver und gramnegativer, aerober und anaerober Bakterien - wie Clostridien, Bruzellen, Salmonellen, Leptospiren - auch Mykoplasmen, Rickettsien, Chlamydien und Spirochäten – wie Borrelien und Treponemen - (ADAM und CHRIST, 1987; MCEVOY, 1992; KROKER, 1999; PLUMB, 1999).

Der therapeutische Wert der Tetracycline wird durch die weit verbreitete Resistenz stark eingeschränkt. Besonders häufig sind Erreger wie *Streptococcus* sp., *Salmonella* sp., *E. coli*, Pasteurellen und *Pseudomonas* sp. resistent geworden, die oft auch extrachromosomale Mehrfach-Resistenz-Faktoren aufweisen. Innerhalb der Gruppe der Tetracycline liegen fast immer Kreuzresistenzen vor. Deswegen sind Tetracycline nur noch bei Infektionen durch Chlamydien, Mykoplasmen, Rickettsien und *Campylobacter* spp. primär indiziert. Ansonsten ist der Einsatz von Tetracyclinen gegenwärtig nur nach erfolgtem Nachweis der Erregersensitivität zu empfehlen (KROKER, 1999).

#### ❖ Chemie

Die Tetracycline sind tetrazyklische biogene Arzneistoffe, die von *Streptomyces*-Arten synthetisiert werden. *Streptomyces aureofaciens* konnte bereits im Jahr 1948

als ein Produzent von Chlortetracyclin identifiziert werden. Wird dieses Bakterium in einem chloridarmen Medium gezüchtet, so produziert es das therapeutisch genutzte Tetracyclin. Weitere Tetracycline, wie z.B. Doxycyclin, sind partialsynthetische Derivate, die aus anderen Tetracyclinen hergestellt werden. Sie unterscheiden sich von anderen Tetracyclinen insbesondere in ihren pharmakokinetischen Eigenschaften, wie z.B. der Anreicherung im Zentralnervensystem und in der Haut (MC EVOY, 1992; KROKER, 1999; PLUMB, 1999).

Die Grundstruktur der Tetracycline, ein viergliedriges Ringsystem, das so genannte Tetracen, dient als Wortstamm für die Bezeichnung dieser Antibiotika-Gruppe (FRIMMER, 1986).

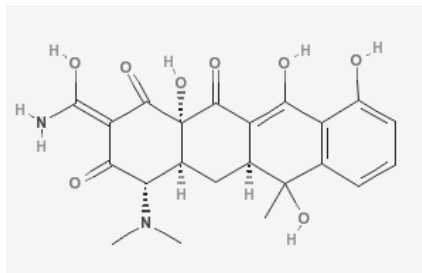


Abbildung 2: Grundstruktur der Tetracycline (aus <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Tetracycline besitzen einen amphoteren Charakter, kann Salze und Basen bilden, und ist in Wasser kaum löslich (KROKER, 1999; MC EVOY, 1992). Es hat ein Molekulargewicht von 444,43 und einen  $pK_a$ -Wert von 8,3 bzw. 10,2 (RIVIERE, 1995). Unter UV-Licht zeigen alle Tetracycline eine gelbe, brillante Fluoreszenz (MC EVOY, 1992).

❖ **Wirkungsmechanismus**

Tetracyclin wirkt bakteriostatisch durch Hemmung der Proteinsynthese. Es gelangt durch energieabhängige Transportsysteme in die Bakterienzelle. Dort bindet es an die ribosomale 30-S-Untereinheit und behindert die Bindung von Aminoacyl-tRNA an der Akzeptorstelle am mRNA-Ribosomen-Komplex. Die Proteinsynthese ist somit unterbrochen und es bleiben Polypeptidstücke zurück. In hohen Konzentrationen kann es auch bakterizid wirken, sowie die Proteinsynthese bei Säugetierzellen verhindern (MC EVOY, 1992; PLUMB, 1999). Die Affinität zu den ribosomalen 80-S-Untereinheiten von Eukaryonten ist zwar geringer, trotzdem ist bei Langzeitanwendung und Überdosierung Vorsicht geboten. Es hat eine intra- und extrazelluläre Wirkung (KAPUSNIK-UNER et al., 1995; RIVIERE und SPOO, 1995; PLUMB, 1999; ROSIN und HENSCHLER, 1998).

❖ **Pharmakokinetik**

***Absorption***

Nach oraler Gabe von Tetracyclin werden vom Gastrointestinaltrakt 75-80% absorbiert (MC EVOY, 1992), wobei die enterale Resorption stark fütterungsabhängig ist. Sie kann nach Futteraufnahme um bis zu 50% reduziert sein (MC EVOY, 1992; PLUMB, 1999).

***Verteilung***

Tetracyclin besitzt eine gute Gewebegängigkeit: in Leber, Milz, Lunge, Niere, Knochen, Galle (MC EVOY, 1992; EMEA, 1995; PLUMB, 1999). Nur ein kleiner Teil erreicht das ZNS, erzielt dort aber keinen therapeutischen Spiegel (RIVIERE, 1995). Tetracyclin passiert die Plazenta, dringt in den fetalen Kreislauf ein und kann sich

auch in der Muttermilch in der gleichen Konzentration wie im maternalen Serum verteilen (MC EVOY, 1992; PLUMB, 1999).

Tetracycline können durch mehrwertige Metallionen (z.B.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{Fe}^{3+}$ ) gebunden werden. Sie sollten daher nicht zusammen mit Kalzium-Trägern eingenommen werden, um ihre Aufnahme im Darm nicht zu behindern. Auch Magnesium, Eisen und Aluminium bilden Komplexverbindungen mit den Tetracyclinen (KROKER, 1999).

Weitere Nachteile der Tetracyclintherapie sind niedrige intrazelluläre Wirkstoffkonzentrationen, Immunsuppression, Hemmung der autochtonen Darmflora und Begünstigung der Vermehrung von Pilzen (GERLACH, 1986; BEHR, 1986; HAHN, 1986).

### ***Elimination***

Tetracyclin wird über den Gastrointestinaltrakt zu 40 % im Kot und über glomeruläre Filtration zu 60% im Urin ausgeschieden (RIVIERE, 1995). Durch Chelatbildung mit fäkalem Material wird es inaktiviert (MC EVOY, 1992; PLUMB, 1999).

### **❖ Nebenwirkungen**

Nach oraler, aber auch parenteraler Anwendung kommt es relativ häufig zu gastrointestinalen Störungen. Bei zu schneller intravenöser Applikation wurden beim Hund Blutdruckabfall, Schweißausbruch und Unruhe beobachtet, wobei aber eine Beteiligung der verwendeten Lösungsvermittler wahrscheinlich ist. Intramuskulär zu verabreichende Präparate sind lokal reizend und können zu Gewebnekrosen führen. Insbesondere bei vorgeschädigter Leber sind nach mehrmaliger Anwendung von Tetracyclinen fettige Leberzelldegenerationen beobachtet worden, die beim Vorlie-

gen renaler Ausscheidungsstörungen besonders häufig auftreten. Bei feuchter Lagerung oder hohen Temperaturen entstehen über Dehydratationen Epianhydro- oder Anhydroprodukte, die nephrotoxisch wirken (KROKER, 1999).

Da Tetracycline mit zwei- und dreiwertigen Kationen Chelate bilden und die insbesondere mit Dentin eingegangenen Verbindungen zu gelblichen Pigmentierungen führen, sollte die Gabe während der Mineralisationsphase der Zähne vermieden werden (KROKER, 1999).

### ❖ **Resistenzen**

*Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Providencia* sp. und *Serratia* sp. sind als natürlich Tetracyclin-resistent anzusehen. Hohe erworbene Resistenzquoten bestehen bei *E. coli*, Enterobacter, Klebsiellen, Salmonellen, Shigellen und Enterokokken. Bei Bacteroides, Mykobakterien, Clostridium, Eubacterium, anaeroben Streptokokken und einigen Mykoplasmen sind Resistenzen zu beobachten (ADAM und CHRIST, 1987; FORTH et al., 1990; SPEER et al., 1992).

Zwischen fast allen Tetracyclinen besteht eine komplette Parallelresistenz. Eine Ausnahme stellen Doxycyclin und Minocyclin in ihrer Aktivität gegenüber *Staphylococcus aureus* dar (FORTH et al., 1990).

Die plasmidübertragene Resistenz beruht auf einer Hemmung des Tetracyclin-Transportes in die Bakterienzelle. Die Plasmide kodieren ein Transportsystem, welches das bereits aufgenommene Tetracyclin wieder aus der Zelle schleust und die Penetrationsgeschwindigkeit von neueintretendem Tetracyclin herabsetzt. Außerdem können Proteine eine Bindung von Tetracyclin am Chlamydien-Ribosom verhindern oder es kann zu einer enzymatisch bedingten Inaktivierung des Wirkstoffes



kommen (MANDELL und PETRI, 1995; SOEDARMANTO et al., 1995; ROSIN, 1998; PLUMB, 1999).

### 2.2.2.1 Chlortetracyclin

#### ❖ Chemie

Chlortetracyclin wurde als erstes Tetracyclin entdeckt (SHAW und RUBIN, 1986, RIVIERE und SPOO, 1995). Es handelt sich um gelbe, geruchlose Kristalle, die in Wasser schwer löslich sind (PLUMB, 1999). Das Molekulargewicht beträgt 478,88 (RIVIERE und SPOO, 1995).

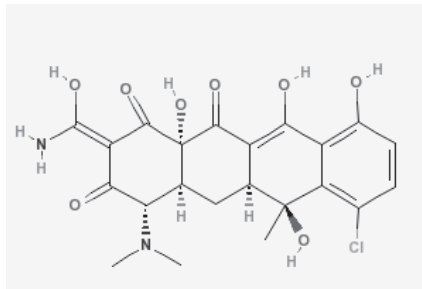


Abbildung 3: Grundstruktur des Chlortetracyclins

(aus <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

#### ❖ Wirkungsmechanismus

Chlortetracyclin verfügt über einen ähnlichen Wirkungsmechanismus wie Tetracyclin (PLUMB, 1999).

## ❖ **Pharmakokinetik**

### **Absorption**

Chlortetracyclin wird von allen Tetracyclin am langsamsten absorbiert (EMEA, 1995).

### **Verteilung**

Nach oraler Gabe von Chlortetracyclin sind die höchsten Konzentrationen in der Leber und Niere zu finden, wobei die Niere 3- bis 4-fach höhere Werte aufweist (DYER, 1988). Es sind keine hohen Konzentrationen im Liquor, im Kammerwasser der Augen und im Fett vorhanden (RIVIERE und SPOO, 1995).

### **Elimination**

Nach i.v. Gabe von 0,9 mg/kg werden bei der Pute in 4 Stunden 8,5 % über die Galle ausgeschieden (DYER, 1988). Die Eliminationshalbwertszeit liegt bei Hühnern und Kanarien bei 2 Stunden (KROKER, 1999).

## ❖ **Dosierung**

Zur Prophylaxe der Erkrankung müssen sämtliche frisch importierten Papageien und Sittiche (außer Wellensittiche) 45 Tage lang mit 2500-5000 ppm Chlortetracyclin (CTC) mediziertes Futter verabreicht bekommen; bei Wellensittichen sind es 30 Tage mit 500 ppm CTC im Futter (WEDEL, 1999; PEES, 2004; Ausführungshinweise der Psittakoseverordnung).

Zur Psittakosebehandlung erhalten lediglich Wellensittiche, Schmalschnabelsittiche (*Brotogeris* spp.) und Singvögel eine Konzentration von nur 500 mg CTC / kg Futter über einen Zeitraum von 30 Tagen (WEDEL, 1999), während an anderen Psittaziden zum Erreichen therapeutischer Gewebespiegel bis zu 2500-5000 mg/kg Futter oder

0,5 mg/g Futter über 30 Tage verabreicht werden muss. Diese Dosierungen gelten zugleich als Grenzbereich hepatotoxischer Wirkungen. Bei Geflügel (Huhn, Truthuhn, Fasan und Wachtel) sollen 0,9 - 11 mg/kg intravenös oder 50 – 100 mg/kg per oral benutzt werden. Bei Greifvögeln sind 6 bis 10 mg/kg einmal täglich intravenös oder 250 mg/kg per oral einmal pro Tag zu verabreichen (DYER, 1988; RIVIERE und SPOO, 1995, HEIDENREICH, 1996; BAUMGARTNER und ISENBÜGEL, 1998; KROKER, 1999).

Nektarfressende Psittaziden erhalten ihr Flüssigfutter unter Zumischung von 0,05 Prozent Chlortetracyclin. Kalziumgaben sind zu vermeiden, da sie die Tetracyclinresorption hemmen (RÜBEL und ISENBÜGEL, 1995).

Die Behandlungsdauer ist zusätzlich noch 2 Tage nach Abklingen der Symptome weiterzuführen (KROKER, 1999).

### 2.2.2.2 Doxycyclin

#### ❖ Chemie

Doxycyclin ((4S,4aR,5S,5aR,6R,12aS)- Dimethylamino- 1,4,4a,5,5a,6,11,12a- octahydro- 3,5,10,12,12a- pentahydroxy- 6-methyl- 1,11-dioxo-2-naphthacencarboxamid) ist ein Antibiotikum aus der Klasse der Tetracycline und wird aus Oxytetra- oder Methacyclin hergestellt (MC EVOY, 1992; IQBAL und RIKIHISA, 1994; RIVIERE und SPOO, 1995; PLUMB, 1999). Es besitzt ein breites Wirkspektrum und zeigt eine bakteriostatische Wirksamkeit auf grampositive, gramnegative und zellwandlose Keime. Entsprechend seines Wirkspektrums wird Doxycyclin zur Behandlung von Chlamydiosen eingesetzt.

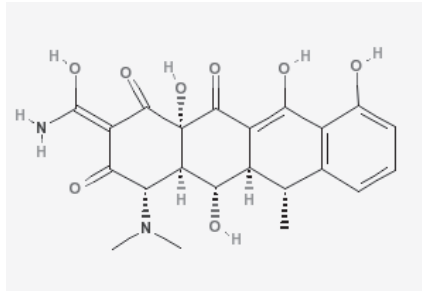


Abbildung 4: Grundstruktur des Doxycyclin (aus <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Da Doxycyclin lipophiler als andere Tetracycline ist, verfügt es über eine bessere Penetration, ein größeres Verteilungsvermögen und eine langsamere Elimination (RIOND, 1988; MC EVOY, 1992; KROKER, 1999).

Es hat ein Molekulargewicht von 462,46 (RIVIERE, 1995). Unter UV-Licht kommt es zu einer Fluoreszenz von Doxycyclin (RIOND, 1988).

#### ❖ **Wirkungsmechanismus**

Doxycyclin verfügt über einen ähnlichen Wirkmechanismus wie andere Tetracycline (s. Seite 21). Doxycyclin kann reversibel an die ribosomale 50-S-Untereinheit binden (KAPUSNIK-UNER et al., 1995; RIVIERE und SPOO, 1995; ROSIN, 1998; PLUMB, 1999).

Doxycyclin hat eine längere Wirkungsdauer als Chlortetracyclin und ist deshalb bei der Therapie von Vögeln mit Chlamydiosen besser geeignet. Es wurde z.B. bei Psittaziden, Papageien und Sittichen erfolgreich benutzt (RIOND, 1988; MCDONALD, 1989; DORRESTEIN, 1995; RIVIERE und SPOO, 1995; RÜBEL, 1998; KROKER, 1999; PLUMB, 1999; FLAMMER et al., 2001).

❖ **Pharmakokinetik**

**Absorption**

Nach oraler Applikation wird Doxycyclin zu über 90 % absorbiert (RIOND und RIVIERE, 1988; MC EVOY, 1992; PLUMB, 1999). Die gleichzeitige Futteraufnahme reduziert die Resorption von Doxycyclin nur um etwa 20 % (PLUMB, 1999). Im Vergleich zu anderen Tetracyclinen hat Doxycyclin eine längere Halbwertszeit (beim Hund bei ca. 12 Stunden) und eine höhere ZNS-Penetration (PLUMB, 1999).

**Verteilung**

Da Doxycyclin 5 bis 10-fach lipophiler ist als CTC, besitzt es eine höhere Gewebepenetration und ein höheres Verteilungsvolumen als andere Tetracycline (RIVIERE und SPOO, 1995).

**Elimination**

90 % der verabreichten Dosis werden innerhalb von 48 Stunden ausgeschieden (WILSON, 1988). Doxycyclin diffundiert aufgrund seiner hohen Lipidlöslichkeit direkt von der Blutbahn ins intestinale Lumen. Der intestinal ausgeschiedene Wirkstoff ist inaktiv und wird nicht vorher durch die Leber umgewandelt. Die biliäre Exkretion beträgt weniger als 5 % (WILSON et al., 1988).

Doxycyclin ist von der glomerulären Filtration unabhängig, da es vor allem über den Kot als inaktives Konjugat oder Chelat ausgeschieden wird (RIVIERE und SPOO, 1995).

## ❖ **Dosierung**

Bei Einzelvögeln oder in Beständen mit unzureichender Kontrolle ist eine Injektionstherapie vorzuziehen. Im Abstand von je 5 Tagen erhalten die Papageien 6-9 Injektionen mit 75 mg/kg KM Doxycyclin intramuskulär und dann 3 Injektionen im Abstand von 4 Tagen. Diese Injektionen können Muskelnekrosen verursachen, sie haben entsprechend vorsichtig zu erfolgen (PEES, 2004; WEDEL, 2004; RÜBEL und ISENBÜGEL, 1995).

HENNING (1985) bestimmte die MHK von Doxycyclin für „*Chlamydia psittaci*“ mit 0,01-0,05 µg/ml und die MHK für „*Chlamydia trachomatis*“ mit 0,03-0,04 µg/ml. Diese Werte entsprechen etwa den Angaben von HIRAI und UNE (1986) und SEGRETI et al. (1987), die MHK-Werte zwischen 0,008 bis 0,1 µg/ml gefunden haben.

Aras und Agaporniden vertragen Doxycyclin nur schlecht (RÜBEL und ISENBÜGEL, 1998).

## ❖ **Resistenzen**

Die Resistenzmechanismen sind ähnlich wie bei anderen Tetracyclinen.

### **2.2.3 Chinolone**

Fluochinolone sind allgemein gut verträglich, was sich auch in der geringen akuten Toxizität im Tierversuch zeigt. Am häufigsten treten gastrointestinale Beschwerden auf. Chinolone führen zu einem schnellen Absinken der Zahlen gramnegativer aerober Darmbakterien. Ein leichter Anstieg von Hefen im Darm ist klinisch irrelevant

(NORD, 1988). Seltener sind zentralnervöse Störungen und allergische Reaktionen. Daneben sind Kristallurie, Kreislaufreaktionen, Blutbildveränderungen, Gelenkschmerzen, Myalgien und vorübergehende Erhöhung von Leberenzymen, Bilirubin und Kreatinin im Serum von Säugetieren beobachtet worden. Alle bisher untersuchten Chinolone können bei Säugetieren im Wachstumsalter Gelenknorpelschäden wie Erosionen und Ulzerationen verursachen (KOJDA, 2002). Chinolone sind weder karzinogen noch teratogen. *In vitro* wirken sie schwach mutagen auf Bakterien (PATON und REEVES, 1988).

### ❖ **Chemie**

Chinolone sind Stoffe, welche als Wirkprinzip die Gyrasehemmung nutzen. Sie binden in der Bakterienzelle an einen Komplex, der aus dem Enzym Gyrase und der DNA besteht und verhindern dadurch das Wiederausammenfügen eines geschnittenen DNA-Strangs durch das Enzym, welches für das Supercoiling der DNA verantwortlich ist (KOJDA, 2002).

Das Verändern des Verdrillungszustandes ihrer DNA ist für Bakterien zum Kopieren ihres Erbguts während der Zellteilung unverzichtbar. Die Bakterien sind deshalb nicht mehr in der Lage sich zu vermehren, die bewirkten DNA-Strangbrüche haben wahrscheinlich direkt tödliche Wirkung auf Bakterien (MANDELL und PETRI, 1995; SPOO und RIVIERE, 1995; BROWN, 1996; ROSIN und HENSCHLER, 1998).

Die Chinolone der ersten Generation (60er/70er Jahre) wurden schlecht resorbiert und hatten ein enges Wirkspektrum. Sie sind heute kaum noch von Bedeutung, während die Gyrasehemmer der zweiten Generation vor allem dann von Bedeutung sind, wenn Resistenzen gegen andere Mittel beobachtet werden. Die Standardchinolone basieren auf der wichtigsten Verbesserung, welche chemisch an den Chinolonen der ersten Generation vorgenommen wurde: Fluor-Substitution des Chinolon-

ringsystems steigerte die antimikrobielle Aktivität und führte zu der Bezeichnung Fluochinolone für die neuen Gyrasehemmer (SIMON und STILLE, 1989; NAUMANN und DOPP, 1989).

Fluochinolone weisen ein sehr breites Wirkungsspektrum im gramnegativen und grampositiven Bereich auf (KOJDA, 2002).

### ❖ **Wirkungsmechanismus**

Fluochinolone wirken degenerativ bakterizid durch Hemmung der bakteriellen DNA-Gyrase, ein bakterielles Enzym, das die DNA in ihre Superhelix-Quartärstruktur umwandelt (KOJDA, 2002).

### ❖ **Pharmakokinetik**

#### ***Verteilung***

Fluochinolone sind gut gewebe- (Lunge, Knochen, Knorpel) und liquorgängig (KOJDA, 2002).

#### ***Elimination***

Die Elimination der Fluochinolone erfolgt über die Niere (KOJDA, 2002). Deshalb ist es wichtig, die Dosisanpassung bei Niereninsuffizienz zu kontrollieren.

### ❖ **Nebenwirkungen**

Als Nebenwirkungen werden die folgende Reaktionen von Säugetieren beschrieben: gastrointestinale Beschwerden, Neurotoxizität, Überempfindlichkeitsreaktionen und Knorpelschäden in der Wachstumsphase (KOJDA, 2002).



❖ **Resistenzen**

Zwischen den Vertretern der Gruppe besteht partielle Parallelresistenz (ESTLER, 2000).

**2.2.3.1 Enrofloxacin**

❖ **Chemie**

Enrofloxacin ist ein Antibiotikum aus der Wirkstoffgruppe der Fluorchinolone. Es hat ein Molekulargewicht von 359,4. Bis heute wird Enrofloxacin als Antiinfektivum zur Therapie von Infektionskrankheiten bei Hühnern und Puten eingesetzt (MALIK, 1989; KROKER, 1999; LÖSCHER et al., 2002).

Enrofloxacin, welches die chemische Bezeichnung 1-Cyclopropyl-7-(4-ethyl-1-piperazinyl)-6-fluor-1,4-dihydro-4-oxo-3-chinolincarbonsäure hat, unterscheidet sich von den meisten anderen Fluorchinolonen durch den Cyclopropylring an der Position 1, den sonst nur noch Ciprofloxacin und Sparfloxacin aufweisen. Die Cyclopropylsubstitution bedingt eine generelle Steigerung der antibakteriellen Aktivität (MALIK, 1989).

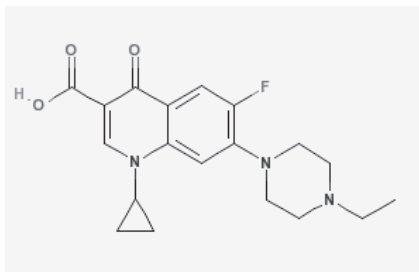


Abbildung 5: Grundstruktur von Enrofloxacin (aus <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Enrofloxacin wirkt bakterizid. Die Bioverfügbarkeit ist nach oraler Applikation mit der nach parenteraler Verabreichung vergleichbar. Die Halbwertszeiten liegen bei den o.g. Säugetierspezies zwischen 2 und 7 h. Hauptmetabolit ist das Ciprofloxacin, das in seiner chemotherapeutischen Wirkungspotenz dem Enrofloxacin vergleichbar ist (KROKER, 1999).

Es hat eine gute Wirkung gegen eine Vielzahl von gramnegativen und grampositiven Bakterien, u.a. *E. coli*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Haemophilus* spp., *Salmonella* spp., Mykoplasmen (*M. bovis* und *M. hyopneumoniae*), *Pasteurella* spp. und Staphylokokken (KROKER, 1999).

Enrofloxacin liegt in Reinsubstanz als gelbes, kristallines Pulver vor. Der Wirkstoff ist thermostabil und schwach lichtempfindlich. In Wasser ist es bei pH 7 schwer löslich, geht jedoch durch seine „Betain“-Struktur bei sauren und alkalischen pH-Werten leicht in Lösung. Oral und parenteral anwendbare Flüssigformulierungen enthalten daher die Enrofloxacinsalze in wässriger Lösung. Festformulierungen enthalten den Wirkstoff in seiner ursprünglichen Betain-Form (ALTREUTHER, 1987; BAYER, 2006).

### ❖ **Wirkungsmechanismus**

Fluorochinolone sammeln sich aufgrund ihrer Lipophilie intrazellulär in Makrophagen, polymorphkernigen Leukozyten oder neutrophilen Granulozyten an. Die intrazelluläre Konzentration ist 3-11 mal höher als der Serumspiegel (STUDDERT und HUGHES, 1992; DEMANUELLE et al., 1998).

❖ **Pharmakokinetik**

***Absorption***

Enrofloxacin wird sowohl nach oraler als auch nach parenteraler Applikation gut und schnell resorbiert. In Abhängigkeit von Tierart und Applikationsmodus werden bei gleicher Dosierung unterschiedlich hohe Konzentrationsmaxima erreicht (FREY und LÖSCHER, 1996).

***Verteilung***

Die Enrofloxacin-Konzentration in Organen und Geweben korreliert gut mit der Dosishöhe und liegt über den zu den korrespondierenden Zeiten gemessenen Serumkonzentrationen (SCHEER, 1987; DORRESTEIN und VERBURG, 1988; JUNG, 1994). Es ist für Fluorchinolone typisch, dass die meisten Gewebekonzentrationen etwa gleich hoch oder höher liegen als die Plasmaspitzenkonzentrationen. Besonders hohe Konzentrationen werden hierbei in Harnorganen und ableitenden Harnwegen, Leber und Galle, Lungengewebe, Genitaltrakt, Muskulatur, Haut, Tonsillen, Lymphknoten und Milz, Phagozyten, Knochen und Knorpel erreicht (CAESAR und STILLE, 1984; EASMON und CRANE, 1985; ADAM und CRIST, 1987; PATON und REEVES, 1988; SIMON und STILLE, 1989).

***Elimination***

Die Elimination erfolgt vorwiegend über die Niere. Die Halbwertszeiten liegen je nach Tierart zwischen 2 bis 7 Stunden. Sein Hauptmetabolit ist das Ciprofloxacin (LÖSCHER et al., 2002).

### ❖ **Nebenwirkungen**

Enrofloxacin ist wie die meisten Fluochinolone gut verträglich (FREY und LÖSCHER, 1996).

Als häufigste Nebenwirkung unter Enrofloxacin-Therapie treten gastrointestinale Beschwerden, meist Vomitus, auf (AUCOIN, 1989; SPOO und RIVIERE, 1995; KROKER, 1999). Von verschiedenen Kleinpapageien und Sittichen wurden 250 - 1000 ppm Enrofloxacin über 14 Tage im Futter gut vertragen. Histologisch trat bei Mohrenkopfpapageien unter der Behandlung eine ausgeprägte hydropische Schwellung der Lebermitochondrien auf. Diese Veränderungen waren nach Absetzen des Präparates voll reversibel (JUNG, 1994).

Allgemein sollte eine i.v.-Injektion von Enrofloxacin bei Geflügel vorsichtig durchgeführt werden, da es sehr alkalisch ist (NAKAMURA, 1995).

Für Embryotoxizität, Teratogenität und Mutagenität gibt es keine Hinweise (ALTREUTHER, 1987). Es hat auch keine immunsuppressive Wirkung (BEHR, 1986; RULLOF, 1990).

### ❖ **Dosierung**

Eine Langzeittherapie mit Enrofloxacin in einer Dosierung von 10 mg/kg KM ist auch erfolgreich. Die Überwindung einer Chlamydieninfektion ist wesentlich von der Konstitution der Papageien abhängig, weshalb bei jeder Therapie eine zusätzliche Gabe eines Multivitaminpräparates indiziert ist (HATT und WENKER, 2005).

### ❖ **Resistenzen**

Die Resistenzbildung erfolgt langsam und ist nicht durch Plasmide übertragbar. Es sind Resistenzen durch Mutationen bei *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Actinetobacter* und Enterokokken bekannt (PLUMB, 1999).

### 2.2.3.2 Difloxacin

In der Zwischenzeit wurden weitere Fluorochinolone, z.B. Difloxacin, zugelassen (KROKER, 1999).

Difloxacin besitzt eine breite bakterizide Wirkung gegen gramnegative, eine Reihe grampositiver Bakterien und gegen Mykoplasmen (KROKER, 1999). In Geflügel wird es gegen *Pasteurella multocida*, *E. coli* und *Mycoplasma gallisepticum* benutzt (KROKER, 1999; OLCHOWY et al., 2000).

#### ❖ Chemie

Difloxacin ist ein Arylfluorochinolonderivat (PLUMB, 1999). Es besitzt jedoch eine p-fluorophenyl-Gruppe an der Position 1 und eine Methylgruppe im Piperazinring.

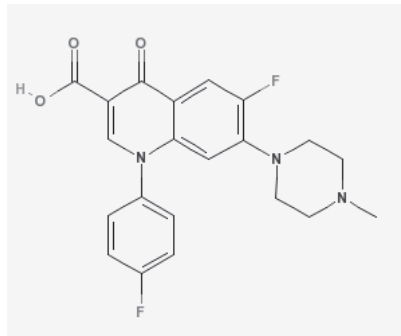


Abbildung 6: Grundstruktur von Difloxacin (aus <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

#### ❖ Wirkungsmechanismus

Difloxacin sammelt sich aufgrund der Lipophilie intrazellulär in Phagozyten (Makrophagen, polymorphkernige Leukozyten oder neutrophile Granulozyten) an, welche Bestandteil einer chronischen Entzündungsantwort sind (STUDDERT und HUGHES, 1992; DEMANUELLE, 1998).

Difloxacin verfügt über einen ähnlichen Wirkungsmechanismus wie Enrofloxacin.

#### ❖ **Pharmakokinetik**

##### ***Absorption***

Difloxacin hat eine gute orale Verfügbarkeit (PLUMB, 1999).

##### ***Verteilung***

Nach oraler Gabe beim Hund (PLUMB, 1999) und i.v.-Applikation bei der Ziege (ATEF et al., 2002) wird Difloxacin gut verteilt.

Der Metabolit Sarafloxacin ist vor allem in Leber, Niere und Urin nachweisbar, während der Metabolit N-Oxid von Difloxacin in Urin, Fett und Haut zu finden ist (EMEA, 2000).

##### ***Elimination***

Difloxacin wird über die Nieren ausgeschieden und erreicht im Urin hohe Konzentrationen (PLUMB, 1999).

#### ❖ **Nebenwirkungen**

Für Difloxacin gelten vergleichbare Kontraindikationen und Nebenwirkungen wie für Enrofloxacin (KROKER, 1999).

#### ❖ **Dosierung**

Die intravenöse Dosierung von Difloxacinhydrochlorid bei Huhn, Pute, Fasan und Wachtel besteht in 5 mg/kg (INUI et al., 1998). Per oral besteht die Dosis in 10 mg/kg über 5 Tage (KROKER, 1999; EMEA 2000). INUI et al. (1998) benennt auch eine Dosis von 5 mg/kg bei Huhn per oral.

Für Difloxacin werden MHK-Werte für *Chlamydia trachomatis* von 0,06-2 µg/ml angegeben (RETTIG et al., 1986; TJAM et al., 1986).

#### ❖ **Resistenzen**

Einige Stämme von *Pseudomonas aeruginosa* und *Pseudomonas* spp, sowie die meisten Enterokokken sind unempfindlich gegenüber Difloxacin (PLUMB, 1999).

#### **2.2.4 Makrolide**

Generell werden gramnegative Bakterien (*Neisseria* sp., *Bordetella pertussis*, *Legionella* sp., *Haemophilus* sp.), grampositive Bakterien (*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus faecalis*, *Listeria* sp., *Actinomyces* sp., *Clostridium* sp.), *Chlamydia* sp., *Chlamydophila* sp., *Ureaplasma* sp. und Mykoplasmen erfasst (KROKER, 1999; ALTHAUS et al., 2005).

Clarithromycin ist wegen besserer Resorption und erhöhter antibakterieller Wirkung dem Erythromycin vorzuziehen. Erythromycin und Clarithromycin können durch Inhibition von Cytochrom P450 zahlreiche Interaktionen hervorrufen (FREY und LÖSCHER, 1996).

#### ❖ **Chemie**

Makrolide besitzen einen Makrolactonring, der mit einem oder mehreren Aminozuckern bzw. neutralen Zuckern verknüpft ist, die für die antibiotische Wirkung essentiell sind. Eine Klassifizierung erfolgt in Abhängigkeit von der Anzahl der Kohlenstoffatome im Lactonring. Zur 14-C-Gruppe zählt Erythromycin (KROKER, 1999; ALTHAUS et al., 2005).

Die einzelnen Vertreter der Makrolide sind strukturell inhomogen. So liegen beispielsweise im Falle des Erythromycins A-, B-, C-, D- und E-Formen vor. Makrolide reagieren basisch und sind instabil gegenüber Säuren und Laugen (KROKER, 1999). Es hat ein Molekulargewicht von 790,809 (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

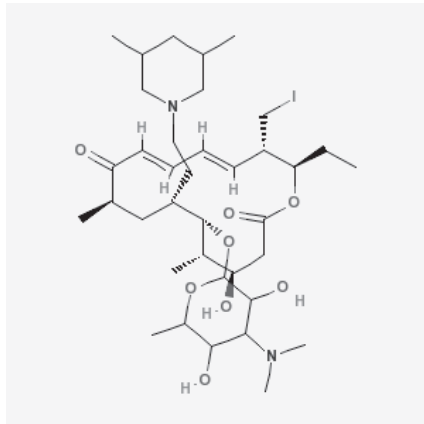


Abbildung 9: Grundstruktur der Makrolide (aus <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

### ❖ **Wirkungsmechanismus**

Der Wirkungsmechanismus beruht auf einer Hemmung der Proteinsynthese durch Bindung an die 50-S-Untereinheit der Ribosomen und ist daher vom Wirktyp bakteriostatisch mit ausgeprägtem postantibiotischem Effekt. Die Aufnahme in die Mikroorganismen erfolgt über passive Diffusion (KROKER, 1999; ALTHAUS et al., 2005).

### ❖ **Pharmakokinetik**

#### **Absorption**

Erythromycin besitzt eine gute enterale Resorption, wenn es in Form verschiedener Ester oder in säurefesten Kapseln appliziert wird. Es hat eine gute Gewebeverteilung und eine Plasmaeiweißbindung von 20 % (ALTHAUS et al., 2005).



### **Verteilung**

Makrolide besitzen eine intrazelluläre Wirkung und verfügen über eine intensive hepatische Metabolisation und biliäre Ausscheidung. Diese Substanzen sind gut gewebegängig, jedoch schlecht liquorgängig (FREY und LÖSCHER, 1996; KOJDA, 2002).

### **Elimination**

Die Elimination erfolgt über hepatische Biotransformation und auch biliär. Diese Substanzen haben eine geringe renale Elimination. Deshalb ist keine Dosisreduktion bei Niereninsuffizienz notwendig (ALTHAUS et al., 2005).

### ❖ **Dosierung**

Als pharmakodynamische Wechselwirkung ist bei Makroliden generell zu beachten, dass ihre Wirkung durch die gleichzeitige Gabe von Chloramphenicol und Lincosamiden antagonisiert wird, da diese Substanzen die gleiche Bindungsstelle an den Ribosomen verwenden (KROKER, 1999).

### ❖ **Nebenwirkungen**

Makrolide sollten nicht mit Ampicillin, Cephalosporinen, Chloramphenicol, Tetracyclinen, Aminoglykosiden, Polymyxinen, Barbituraten, Vitaminen der B-Gruppe oder Vitamin C vermischt werden. Makrolide sind ferner nicht kompatibel mit NaCl-Lösungen (ALTHAUS et al., 2005).

### ❖ **Resistenzen**

Die Resistenzentwicklung variiert bei den einzelnen Substanzen dieser Gruppe. Untereinander finden sich Kreuzresistenzen (KROKER, 1999; ALTHAUS et al., 2005).

### 2.2.4.1 Clarithromycin

Leider wurde es verfügbare Informationen über Clarithromycin nur für Hunde und Meerschweichen nicht aber für Vögel gefunden.

Clarithromycin ist ein bakteriostatisch wirkendes Makrolid gegen grampositive und gramnegative Bakterien, das in höheren Dosen auch bakterizid wirken kann (KAPUSNIK-UNER, 1995; SPOO, 1995; VILMANYI, 1996). Es besitzt eine Wirkung auf alle Keime, die gegenüber Penicillin G empfindlich sind, zusätzlich ist es auch wirksam gegen *Chlamydia spp*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Borellia burgdorferi*, *Legionella spp*, *Ureaplasma*, *Bordetella pertussis*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Mycobacterium avium*, *M. catharralis*, *Haemophilus influenzae*, viele Enterokokken-Stämme, *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidia* und *Plasmodia spp*. Clarithromycin wirkt besser gegen Streptokokken und Staphylokokken als Erythromycin (FITZGEORGE et al., 1993; KAPUSNIK-UNER et al., 1995).

#### ❖ Chemie

Clarithromycin ist ein lipophiles 6-O-Methylerythromycin A. Es wird halbsynthetisch aus Erythromycin A durch eine O-Methylsubstitution der Hydroxygruppe an 6. Stelle des 14-C Laktorings hergestellt (VILMANYI et al., 1996) und hat ein Molekulargewicht von 747,953 (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Im Gegensatz zu Erythromycin ist Clarithromycin bei niedrigem pH stabil (VILMANYI, et al. 1996).

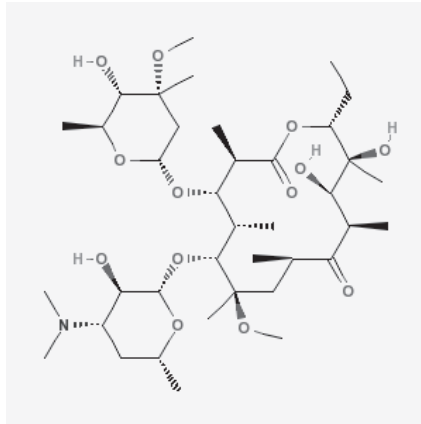


Abbildung 10: Grundstruktur von Clarithromycin

(aus <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

#### ❖ **Wirkungsmechanismus**

Clarithromycin bindet wie Erythromycin an die 50-S-Untereinheit der bakteriellen Ribosomen (an Proteine des Peptidyltransferasezentrums). Durch die Bindung wird der Transfer der neu entstehenden Peptidyl-tRNA von der Akzeptorstelle zur Donorstelle am Ribosom verhindert. Die Peptidyl-tRNA wird so an der Akzeptorstelle fixiert und die Proteinsynthese unterbrochen; dabei bleiben Polypeptid-Zwischenstufen zurück (MC EVOY, 1992; KAPUSNIK-UNER et al., 1995; SPOO und RIVIERE, 1995; EMEA, 1997; ROSIN und HENSCHLER, 1998).

Die antimikrobielle Aktivität ist vom pH-Wert abhängig (SPOO, 1995; PLUMB, 1999). Die nichtionisierte Form des Wirkstoffes ist für Zellen mehr durchlässig, womit die steigende antimikrobielle Aktivität bei alkalischen pH erklärt werden könnte (MC EVOY, 1992; KAPUSNIK-UNER et al., 1995).

❖ **Pharmakokinetik**

**Absorption**

Nach oraler Applikation wird Clarithromycin schnell vom Gastrointestinaltrakt absorbiert (KAPUSNIK-UNER et al., 1995).

**Verteilung**

Clarithromycin verfügt über ein hohes Verteilungsvolumen (VILMANYI et al., 1996).

Clarithromycin wird in der Leber durch eine oxidative N-Demethylierung und stereospezifische Hydroxylierung an der 14. C-Stelle abgebaut (KAPUSNIK-UNER et al., 1995; MANDELL und PETRI, 1995).

**Elimination**

Dosisabhängig werden von 20 bis 40 % unverändert über den Urin ausgeschieden, davon 10 bis 15 % als 14-Hydroxycarithromycin (KAPUSNIK-UNER et al., 1995).

❖ **Nebenwirkungen**

Clarithromycin verfügt über vergleichbare Nebenwirkungen wie Erythromycin. In Verbindung mit Kalzium oder Eisenmolekülen kann es zur Chelatbildung kommen, bei der Clarithromycin an Makromoleküle im Gastrointestinaltrakt bindet (VILMANYI et al., 1996).

❖ **Dosierung**

Die orale Verabreichung von kleinen Dosen ist möglich, da Clarithromycin bei niedrigem pH stabil ist und kaum im Magen zerstört wird (KAPUSNIK-UNER et al., 1995; VILMANYI et al., 1996).

Bei Niereninsuffizienz ist keine Dosisveränderung notwendig (KAPUSNIK-UNER et al., 1995).

## ❖ Resistenzen

Eine Resistenz gegen *Streptococcus pneumoniae* (EWIG et al., 2001), *Helicobacter pylori* (OSATO et al., 1999) und *Mycobacterium* spp. (WALLACE et al., 1999) wird beschrieben.

### 2.2.4.2 Erythromycin

Mit Erythromycin können die folgenden Erkrankungen behandelt werden: Mykoplasmosen, Infektionen des Respirations- und Urogenitaltraktes, Knochenmarksinfektionen, Metritis, Pyodermie, Mastitis (KROKER, 1999).

## ❖ Chemie

Erythromycin ist eine schwache Base, die mäßig wasserlöslich ist (KROKER, 1999).

Es hat ein Molekulargewicht von 733,927 (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

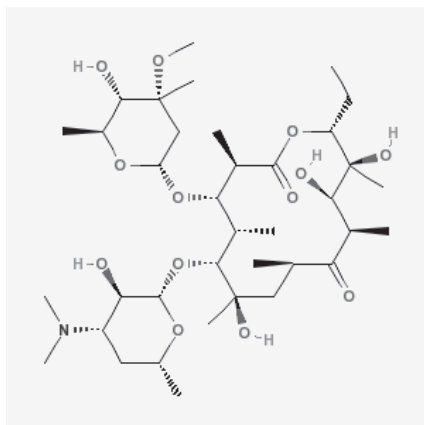


Abbildung 11: Grundstruktur der Erythromycin (aus <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

❖ **Wirkungsmechanismus**

Erythromycin verfügt über einen ähnlichen Wirkmechanismus wie Clarithromycin (s. 2.2.4.1).

❖ **Pharmakokinetik**

***Absorption***

Beim Rind verläuft die Absorption nach subkutaner und intramuskulärer Applikation in Abhängigkeit von der Dosis langsam (BURROWS, 1989).

Nach oraler Gabe an Monogastrier wird Erythromycin gut im oberen Gastrointestinaltrakt resorbiert (PLUMB, 1999). Viel Futter im Gastrointestinaltrakt führt zu einer Steigerung der Magensäureproduktion und durch den damit verbundenen pH-Abfall zu einer verminderten Absorption (MCEVOY, 1992; SPOO und RIVIERE, 1995; EMEA, 1997).

Anhydroerythromycin, ein Teil der Erythromycinbase, wird durch den Dünndarm aufgenommen und größtenteils an Plasmaproteine gebunden (KAPUSNIK-UNER et al., 1995; SPOO und RIVIERE, 1995; STRATTON-PHELPS et al., 2000). Erythromycinestolat und Erythromycinethylsuccinat werden als inaktive Ester von Duodenum absorbiert und müssen erst zur aktiven Form hydrolysiert werden (MCEVOY, 1992).

***Verteilung***

Von therapeutischer Bedeutung ist, dass Erythromycin sehr gut gewebegängig ist und in verschiedenen Organen und Kompartimenten wie Lunge, Niere, Leber, Milz und Milch bzw. Euterlymphe gegenüber dem Serum angereichert wird. Dabei erfolgt die Elimination aus dem Gewebe langsamer als aus dem Serum (KROKER, 1999).

Erythromycin ist fettlöslich und verteilt sich gut im Gewebe, sowie in Makrophagen, Neutrophilen und Leukozyten (BURROWS, 1989; KAPUSNIK-UNER et al., 1995; KROKER, 1999).

Erythromycin kann die Blut-Hirnschranke passieren, aber erreicht dort keine therapeutisch wirksamen Konzentrationen. Weiterhin kann Erythromycin auch in Eiern nachgewiesen werden (SPOO und RIVIERE, 1995; EMEA, 1997; PLUMB, 1999).

### ***Elimination***

Erythromycin durchläuft einen enterohepatischen Kreislauf und wird bevorzugt über die Galle ausgeschieden (KROKER, 1999).

### ❖ **Dosierung**

HAIGHT und FINLAND (1952) beschrieben eine bakterizide Wirkung von Erythromycin in hohen Dosen. Die Wirkung ist allerdings auf proliferierende Keime beschränkt (FREY und LÖSCHER, 1996). Eine Dosierung in Geflügel von 25-80 mg/kg über das Trinkwasser (als Ester), nicht über das Futter, wird beschrieben (KROKER, 1999).

### ❖ **Nebenwirkungen**

Intramuskuläre Injektionen sind schmerzhaft und können zu lokalen Entzündungsreaktionen führen. Das Estolat, aber evtl. auch andere Ester, können intrahepatische Cholestasen auslösen. Da Erythromycin die Aktivität mikrosomaler Enzyme hemmt, kann eine pharmakokinetische Beeinflussung anderer Pharmaka auftreten. Aufgrund ihrer Inkompatibilität mit zahlreichen anderen Stoffen sollen keine Mischspritzen hergestellt werden (KROKER, 1999).

Erythromycin als schwache Base ist allerdings nicht säurestabil. Um es für die Magensäure unempfindlich zu machen und damit die Bioverfügbarkeit zu erhöhen, werden wasserlösliche Salze oder Ester verwendet (FREY und LÖSCHER, 1996).

### ❖ **Resistenzen**

Nachteilig wirkt sich die z. T. schon unter der Therapie - insbesondere bei Staphylokokken - einsetzende Resistenzentwicklung aus, die auf einer verminderten Affinität der Ribosomen gegenüber Erythromycin beruht (MC EVOY, 1992; KAPUSNIK-UNER et al., 1995; KROKER, 1999). Weiterhin ist Erythromycin unwirksam gegen *Clostridium difficile* (STRATTON-PHELPS et al., 2000), die meisten Stämme der Enterobacteriaceen wie *Pseudomonas*, *E. coli* oder *Klebsiella* (PLUMB, 1999) und gramnegative Bacillen, *Bacteroides fragilis* und *Mycobacterium fortuitum* (KAPUSNIK-UNER et al., 1995).

Die Resistenzen werden zum Teil durch Plasmide übertragen. Bei *Staphylococcus epidermidis* kommt es zu einer Abnahme der Membrandurchlässigkeit. Weiterhin können Methylasen die ribosomale RNA verändern und so zu einer Abnahme der Wirkstoffbindung führen. Enterobacteriaceen produzieren Esterasen, die eine Hydrolyse der Makrolide bewirken und so deren Wirkung verhindern. Auch sind chromosomale Mutationen bekannt, die eine Veränderung des 50-S-ribosomalen Proteins verursachen und so zu einer Unempfindlichkeit der Keime führen (KAPUSNIK-UNER et al., 1995; SPOO und RIVIERE, 1995; EMEA, 1997; ROSIN und HENSCHLER, 1998).



## 2.3 Fragestellung der einigen Untersuchungen

Eine gezielte Chemotherapie ist nur möglich, wenn die Empfindlichkeit des Erregers gegenüber dem Therapeutikum bekannt ist. Insbesondere bei Therapieversagern kann eine Überprüfung der Keime auf Resistenz von größter Bedeutung sein. In der Literatur erwähnte Fälle von Resistenzen gegen Tetracyclin und Tetracyclinderivate (z.B. CTC und Doxycyclin) bei *C. trachomatis*-, *C. suis*- und *C. psittaci*-Isolaten und gegen Erythromycin bei *C. trachomatis*-Isolaten werden beschrieben und ihre Entstehung, Resistenzmechanismen und biologischen Besonderheiten besprochen (MOURAD et al., 1980; JONES et al., 1990; ANDERSEN et al., 1998; LEFEVRE et al., 1998; SOMANI et al., 2000; LENART et al., 2001; FAILING et al., 2006).

Gemäß Psittakose-VO von 31. Dezember 2005 gelten als „wirksame Mittel“ zur Therapie der Psittakose CTC, Doxycyclin und Enrofloxacin. Zugleich sind Erythromycin und Clarithromycin gegen *C. trachomatis*-Infektionen beim Menschen effektiv.

Da das Spektrum der zur Verfügung stehenden Chemotherapeutika sich kontinuierlich erweitert, sollte der Einsatz neuerer Chemotherapeutika (z. B. Difloxacin und Clarithromycin) zur Bekämpfung der Chlamydiose und deren Berücksichtigung in der Psittakose-Verordnung dem Rechnung tragen. Deshalb ist es das Ziel der eigenen Untersuchungen, die minimale Hemmstoffkonzentration von Difloxacin, Clarithromycin und Erythromycin in Vergleichen von Chlortetracyclin, Doxycyclin und Enrofloxacin gegenüber 27 *Chlamydomphila psittaci*-Isolaten zu bestimmen. Hierbei ist von besonderer Bedeutung, ob die *Chlamydomphila psittaci*-Isolate eine Resistenz gegen diese Wirkstoffe entwickelt haben.

Als Untersuchungsmethoden wurden die Erregeranzüchtung in der Buffalo-Green-Monkey-Kidney-Zellkultur (BGM-Zellen), ihre Färbung mittels Giménez 2 Tage nach der Infektion und die Zählung der Chlamydien-Einschlüsse angewendet.

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Material**

#### **3.1.1 Ort und Zeitraum der Untersuchungen**

Die Versuche fanden in den Laborräumen der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische der Justus-Liebig-Universität Gießen in der Zeit von September 2005 bis Dezember 2006 statt.

#### **3.1.2 Herkunft der Chlamydienisolate**

Für die Untersuchungen standen 15 Isolate aus der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische der Justus-Liebig-Universität Gießen und 12 Isolate, die mir freundlicherweise vom Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der Justus-Liebig-Universität Gießen (Frau Dr. Judith Tyczka) überlassen wurden, zur Verfügung.

Sämtliche Proben sind vor Beginn der Antibiotikaempfindlichkeitsprüfung sowohl mit der Giménez-Färbung als auch mittels einer nested multiplex Polymerasekettenreaktion (PCR) (KALTENBÖCK et al., 1991, 1992, 1997) auf das Vorkommen von Chlamydien untersucht bzw. als *Chlamydophila psittaci* identifiziert worden.

Die verwendeten *Chlamydophila psittaci*-Isolate sind in den Tabellen 6 und 7 aufgeführt.

**Tabelle 6:** Angaben zu den verwendeten Isolaten der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische

<b>Chlamydienstamm</b>	<b>Wirtsspezies</b>	<b>Sonstiges</b>
244/03	Hornsittich	Tgb.-Nr. Geflügelklinik: 244 (2003) Isolierung mittels Zellkultur
1107/04	Blaustirnamazone	Tgb.-Nr. Geflügelklinik: 1107(2004) Isolierung mittels Zellkultur
2699/04	Rosellasittich	Tgb.-Nr. Geflügelklinik: 2699 (2004) Isolierung mittels Zellkultur
2156/03	Feinsittich	Tgb.-Nr. Geflügelklinik: 2156 (2003) Isolierung mittels Zellkultur
138/05	Wellensittich	Tgb.-Nr. Geflügelklinik: 138 (2005) Isolierung mittels Zellkultur
1999/03	Blaustirnamazone	Tgb.-Nr. Geflügelklinik: 1999 (2003) Isolierung mittels Zellkultur
236/05	Mäusebussard	Tgb.-Nr. Geflügelklinik: 236 (2005) Isolierung mittels Zellkultur
3/20901	Pekingente	Isolierung mittels Zellkultur
44/03	Sittich	Isolate aus Vet. U. Amt. Frankfurt (25.02.03)
238/98 LUA KO	Bergsittich	Isolierung mittels Zellkultur
1163	Gänseküken	Isolierung mittels Zellkultur
PS/10/93/LUA KO	Mohrenkopfpapagei	Isolierung mittels Zellkultur
Di/4504/93/LUA KO	Sittich	Isolierung mittels Zellkultur
Pa/186/97/LUA KO	Wellensittich	Isolierung mittels Zellkultur
364/365/98/LUA	Ente	Isolierung mittels Zellkultur

**Tabelle 7:** Angaben zu den verwendeten Isolatn des Instituts für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere

<b>Chlamydienstamm</b>	<b>Wirtsspezies</b>	<b>Sonstiges</b>
1904	Wellensittich	Tgb.-Nr. Geflügelklinik: 1904 (1980) Isolierung über Mäuse
6183	Ringsittich	Tgb.-Nr. Geflügelklinik: 6183 (1983)
5727	Sittich	Tgb.-Nr. Geflügelklinik: 5727 (1983) Isolierung über Mäuse
4043	Pekingente	Tgb.-Nr. Geflügelklinik: 4043-44 (1982) Isolierung über Mäuse
3437	Amazone	Tgb.-Nr. Geflügelklinik: 3436-37 (1982) Isolierung über Mäuse
831/80	Sittich	Tgb.-Nr. Geflügelklinik: 831 (1980)
4482/82	Pekingente	Tgb.-Nr. Geflügelklinik: 4482-86 (1982) Isolierung über Mäuse
383	Huhn	Tgb.-Nr. Geflügelklinik: 383 (1978)
3893	Ente	Tgb.-Nr. Geflügelklinik: 3892 bis 3894 (1982) Isolierung über Mäuse
2165	Nymphensittich	Tgb.-Nr. Geflügelklinik: 2165 (1978) Isolierung über Mäuse
1316/78	Amazone	Tgb.-Nr. Geflügelklinik: 1316 (1978) Isolierung über Mäuse
2163/78	Nymphensittich	Tgb.-Nr. Geflügelklinik: 2163 (1978) Isolierung über Mäuse

Bei den Proben aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten ist nicht bekannt, ob es sich um Isolate aus Organen oder Tupfer- bzw. Kotproben handelt.

Größtenteils stammt das Untersuchungsgut von toten Vögeln, die von Tierärzten oder Besitzern direkt an die Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische der Justus-Liebig-Universität Gießen eingesandt wurden.

Die Organe (Leber und/oder Milz) und Tupferproben (Rachen und/oder Kloake) wurden den Vögeln im Rahmen der Sektion in der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische der Justus-Liebig-Universität Gießen steril entnommen, unverzüglich in 3 ml BME steril verbracht und bei 4 °C oder -20 °C gelagert, bis sie unmittelbar darauf auf BGM-Zellkulturen für die anschließende Untersuchung mittels Giménez-Färbung verbracht wurden. Eine PCR wurde für die Isolate, die mittels Giménez-Färbung identifiziert wurden, durchgeführt, damit eine sichere Diagnose als *C. psittaci* erzielt werden konnte.

Die Tupferproben von Rachen und Kloake stammten von stationär aufgenommenen Patienten in der Poliklinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische der Justus-Liebig-Universität Gießen. Tupferproben von Konjunktiven wurden nur von den Patienten, die eine Konjunktivitis präsentierten, entnommen. Bei Verdacht auf Chlamydiose wurden die Tupfer mit Zellmaterial unter sterilen Bedingungen gewonnen, sofort in 3 ml BME verbracht und unverzüglich bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

### 3.1.3 Direkter Erregernachweis

#### 3.1.3.1 Zellen

Die Vermehrung der Isolate und die Antibiotikaempfindlichkeitsprüfungen wurden ausschließlich unter Verwendung von Buffalo-Green-Monkey- (BGM) Zellen durchgeführt. Diese Zelllinie wird an der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische der Justus-Liebig-Universität Gießen für die Isolierung und Vermehrung von Chlamydien verwendet.

#### 3.1.3.2 Zellkulturmedien

❖ ***Minimum Essential Medium Eagle (MEM) mit 20 mM HEPES***

MEM wird mit 5 %igem FKS, 0,2 ml Nystatin und 5 ml L-Glutamin versetzt und als Erhaltungs- und Subkultivierungsmedium verwendet. Es wird bei 6 °C gelagert.

❖ ***Basal-Medium-Eagle's (BME) mit Earle'schen Salzen***

BME EARLE Instamed 9,34 g/l mit L-Glutamin	100,0 ml/l
Tryptose-Phosphat-Brühe (TPB)	100,0 ml/l
Gentamicin-Lösung	1,9 ml/l
Moronol-Suspension	0,5 ml/l
Hepes-Puffer	15,0 ml/l

gelöst in Aqua dest., mit 1 N NaOH auf pH 7,5 eingestellt und bei 6 °C gelagert.

BME mit 2 % Fetalem Kälberserum (FKS) als Medium nach Verimpfen der Proben.

BME mit 5 %igem FKS als Erhaltungs- und Subkultivierungsmedium.

❖ ***Tryptose-Phosphat-Brühe (TPB)***

TPB-Pulver 147,5 g

In 5 l Aqua dest. gelöst, bei 121 °C autoklaviert und bei 6 °C gelagert.

❖ ***L-Glutamin-Lösung***

L-Glutamin reinst 29,25 g

In 1 l Aqua dest. gelöst, steril filtriert, 50 ml Portionen in sterile Glasflaschen abgefüllt, und bei -20 °C gelagert.

❖ ***Gentamicin-Lösung***

Gentamicinsulfat (663 U/mg) 1,0 g

In 20 ml Aqua dest. gelöst und bei 6 °C gelagert.

❖ ***Hepes-Puffer (Hydroxyethyl-piperazinyli-ethansulfonsäure)***

Hepes 238,3 g

In 1 l Aqua dest. gelöst, filtriert, 75 ml Portionen in sterile Glasflaschen abgefüllt, und bei 6 °C gelagert.

❖ ***Trypsin-Versen-Lösung (TV)***

NaCl 16,0 g

KCl 0,8 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,3 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,4 g

Hepes 7,15 g

Trypsin 7,0 g

Versen	0,4 g
Dextrose	2,0 g
Phenolrot	1,0 ml

gelöst in 2 l Aqua dest. Die Lösung wurde auf pH 7,2 eingestellt, steril filtriert, portioniert und bei -20 °C gelagert.

### 3.1.3.3 Verbrauchsmaterialien

Multiwell Gewebekulturplatten Falcon <sup>®</sup> mit 24 Vertiefungen	Falcon, Becton Dickinson, NJ, USA
Gewebekulturflaschen Falcon <sup>®</sup> 25 cm <sup>2</sup>	Falcon, Becton Dickinson, NJ, USA
Gewebekulturflaschen Falcon <sup>®</sup> 75 cm <sup>2</sup>	Falcon, Becton Dickinson, NJ, USA
Gewebekulturflaschen Cellstar <sup>®</sup> 75 cm <sup>2</sup>	Greiner, Frickenhausen
Deckgläser 12 mm	Assistent, Sondheim
Objektträger	Kittel-Gläser, Braunschweig
Immersionsöl	Merck, Darmstadt
Kryoröhrchen 2 ml	Greiner, Frickenhausen

### 3.1.3.4 Geräte

Autoklav 3850 EL	Tuttnauer, New York, USA
Waage Mettler P160 N	Wiesbaden
Inkubator (Modell B 5060 EK-CO <sub>2</sub> )	Heraeus, Hanau
Kühlzentrifuge Model J2-21	Beckman, München
Mikroskop (Modell 62057)	Carl Zeiss, Oberkochen



Netzmikrometer 10×10/5; 10, d=21 mm	Carl Zeiss, Oberkochen
Okular 10×/18 Br. mit Augenmuschel	Carl Zeiss, Oberkochen
Okular 10×/18 Br. foc. mit Augenmuschel	Carl Zeiss, Oberkochen
pH-Meter	Mettler-Toledo, Gießen
Ultraschallgerät Sonifier Cell Disruptor B15	Branson, Dietzenbach
Werkbank	Nunc GmbH & Co, Wiesbaden
Zentrifuge Hettich Rotanta/T	Hettich, Tuttlingen

### 3.1.3.5 Chemikalien

<i>Aqua destillata</i>	eigene Herstellung
BME-Earle´s Instamed	Seromed, Biochrom KG, Berlin
Cycloheximid	Serva, Heidelberg
Ethanol 95 %	Roth, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FKS)	Seromed, Biochrom KG, Berlin
Gentamicinsulfat (663 U/mg)	Seromed, Biochrom KG, Berlin
HCl	Merck, Darmstadt
KCl	Merck, Darmstadt
L-Glutamin reinst	Serva, Heidelberg
Malachitgrün	Merck, Darmstadt
MEM-Earle (1x)	Biochrom AG, Berlin
Methanol	Schmidt Chemikalien GmbH & Co., Dillenburg
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich, München
Neufuchsin	Merck, Darmstadt

Nystatin	Hermal, Reinbek
Phenollösung (1g/l)	Merck, Darmstadt
TBP-Pulver	Difco, Michigan, USA
Trypsin (1:250)	Difco, Michigan, USA

### 3.1.3.6 Reagenzien, Lösungen und Puffer für Giménez-Färbung

#### ❖ Karbolfuchsin-Stammlösung

10 % Neufuchsin in 95 % Ethanol	100 ml
4 % wässriges Phenol	250 ml
Aqua dest.	650 ml

Mindestens 48h bei Raumtemperatur stehen lassen.

#### ❖ 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,45

0,2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4$	3,5 ml
0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	15,5 ml
Aqua dest.	19,0 ml

#### ❖ Karbolfuchsin-Gebrauchslösung

Karbolfuchsin-Stammlösung	6,0 ml
Na-Phosphatpuffer	10,0 ml

Farblösung vor Gebrauch frisch filtrieren, maximal 40 Std. aufheben.

#### ❖ Malachitgrünlösung

0,8 %ige Lösung des Farbstoffes in Aqua dest.

❖ ***Methanol und Aqua destillata***

zum Waschen und Fixieren der Monolayer.

**3.1.3.7 Verwendete Chemotherapeutika für die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)**

In der Empfindlichkeitsprüfung der Chlamydien-Isolate kamen folgende Wirkstoffe zur Anwendung:

Doxycyclin	Doxycycline Hyclate <sup>®</sup> , Sigma-Aldrich
Chlortetracyclin	Chlortetracycline Hydrochloride <sup>®</sup> , Sigma-Aldrich
Enrofloxacin	Baytril <sup>®</sup> 10 % Injektionslösung, Bayer Vital
Difloxacin	Dicural <sup>®</sup> , Fort Dodge
Erythromycin	Erythromycin <sup>®</sup> , Sigma-Aldrich
Clarithromycin	Clarithromycin-ratiopharm <sup>®</sup> , Ratiopharm

**3.1.4 Nachweis der Chlamydien mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)**

**3.1.4.1 Verbrauchsmaterialien**

DNeasy <sup>®</sup> Tissue Kit	Quiagen, Hilden
Eppendorf	Eppendorf AG, Hamburg

### 3.1.4.2 Geräte

Autoklav 3850 EL	Tuttnauer, New York, USA
Geldokumentationssystem BioDocAnalyse	Biometra, Göttingen
Wasserbad	Köttermann, Hänigsen
Elektrophoresekammern	Keutz, Reiskirchen
Stromquelle	Pharmacia, Schweden
Thermo-Cycler T-Personal	Biometra, Göttingen
Vortexer	Heidolph, Schwabach
Werkbank	Nunc GmbH & Co, Wiesbaden
Zentrifuge Universal 32 R	Hettich, Tuttlingen

### 3.1.4.3 Chemikalien

Agarose NEEO®	Roth, Karlsruhe
dNTPs	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Ethanol 99,8 %	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromidlösung 1 % (10 g/l)	Roth, Karlsruhe
Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder, 0,5 mg DNA/ml	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Loading Dye Solution 6x	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Proteinase K solution (6 ml)	Quiagen GmbH, Hilden
Taq-DNA Polymerase (5000 units/ml, Lösung in 59 mM Tris-HCl, pH 7,5, 5mM Dithiothreitol, 0,1 mM EDTA, Stabilisatoren, 50 % Glycerol)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

#### 3.1.4.4 Primer (Roth, Karlsruhe)

<b>Primername</b>	<b>Nukleotidsequenz*</b>
191CHOMP ( <i>Chlamydia</i> spp.)	5' GCI YTI TGG GAR TGY GGI TGY GCI AC 3'
CHOMP 371 ( <i>Chlamydia</i> spp.)	5' TTA GAA ICK GAA TTG IGC RTT IAY GTG IGC IGC 3'
CHOMP 336s ( <i>Chlamydia</i> spp.)	5' CCR CAA GMT TTT CTR GAY TTC AWY TTG TTR AT 3'
CHOMP 371 ( <i>Chlamydia psittaci</i> )	5' GTA ATT TCI AGC CCA GCA CAA TTY GTG 3'

\*Degenerierte Nukleotide: K=G, T; M=A, C; R=A, G; W=A, T; Y=C, T; I=Inosin

#### 3.1.4.5 Puffer

##### TBE-Puffer (5x)

Tris-Base	540 g
Borsäure	275 g
EDTA	37,2 g (in 200 ml H <sub>2</sub> O gelöst, pH=8,0)

Die Substanzen wurden in Aqua dest. gelöst und auf 10 l aufgefüllt. Die Lösung wurde auf pH 8,5 eingestellt.

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Passagieren der BGM-Zellen**

Die BGM-Zellen wurden kontinuierlich alle 4-10 Tage in 75 cm<sup>2</sup> Gewebekulturflaschen vermehrt. Das verbrauchte MEM-Medium wurde steril abgegossen. Durch Zugabe von 3 ml 37 °C warmer Trypsin-Versen-Lösung wurde der Zellrasen bei 37 °C für 6-7 Minuten inkubiert. Die erhaltene Zellsuspension wurde mit 10 ml MEM mit Zusatz von 5 %igem FKS versetzt und vorsichtig vermischt. Danach wurden die Zellen mit 30-40 ml MEM, das mit 5 %igem FKS versetzt wurde, resuspendiert, auf 3 Gewebekulturflaschen verteilt und bei 37 °C im Brutschrank erhalten.

### **3.2.2 Nachweiskulturen**

Zur Herstellung der Nachweiskulturen wurde ein zuvor sterilisiertes Deckgläschen von 12 mm Durchmesser in die Vertiefungen der Gewebekulturplatten eingelegt. Anschließend wurden 1 ml der verdünnten Zellsuspension darauf ausgesät. Bei 37 °C im Brutschrank wuchs nach 24-48 h ein durchgehender Zellrasen auf dem Deckgläschen, worauf die Erreger bzw. die Erregerstammuspension aufgebracht werden konnten.

### **3.2.3 Aufbereitung der Chlamydien zum Aufbringen auf Nachweiskulturen**

Die Organ- und Tupferproben wurden nach Einsendung bzw. Entnahme wie unter **3.1.2** beschrieben unter sterilen Bedingungen in jeweils 3 ml BME eingelegt und bis

zur Aufbereitung bei -20 °C eingefroren. Die Proben wurden in lauwarmem Wasser aufgetaut.

Alle Probenarten wurden mittels Ultraschall homogenisiert und bei 1000 × g für 10 Minuten zentrifugiert. Dies bewirkte das Herauslösen der Chlamydien aus den Zellen und das Anreichern im Überstand.

### **3.2.4 Nachweis der Chlamydien**

#### **3.2.4.1 Nachweis der Chlamydien in BGM-Zellkulturen**

War der zuvor auf Deckgläschen ausgesäte Rasen aus BGM-Zellen dicht gewachsen, wurde das Medium aus den Gewebekulturplatten steril abgegossen. 0,1 ml des aufbereiteten Probenmaterials wurde auf die Zellen aufpipettiert. Das übrige Probenmaterial wurde für eventuell notwendige weitere Untersuchungen bei -20 °C gelagert.

Die Platten wurden für 1 Stunde bei 2000 U/min (ca. 620 g) zentrifugiert und anschließend 2 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert um eine Absorption zu gewährleisten. Danach wurden die beimpften Vertiefungen mit je 1 ml MEM mit 2 %igem FKS und zusätzlich 2 µg/ml Cycloheximid aufgefüllt.

Eine Vertiefung, in die kein Probenmaterial verbracht wurde, wurde mit 1 ml MEM mit 2 %igem FKS und zusätzlich 2 µg/ml Cycloheximid aufgefüllt. Diese Nachweiskultur diente als Negativkontrolle. Als Positivkontrollen wurden entweder die Isolate 1904 (Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der Justus-Liebig-Universität Gießen) oder 44/03 (Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische, Justus-Liebig-Universität Gießen) benutzt.

Anschließend wurden die so bearbeiteten Nachweiskulturen bei 37 °C 3 Tage inkubiert.

#### 3.2.4.1.1 Giménez-Färbung

Die Deckgläschen wurden nach GIMÉNEZ (1964) mit dem folgenden Protokoll gefärbt.

❖ Färbung nach Giménez:

- a) Zunächst wurde das Medium der Negativkontrolle, der infizierten Nachweiskulturen und der Positivkontrolle steril abgegossen.
- b) Der beimpfte Zellrasen auf den verbliebenen Deckgläschen in den Vertiefungen wurde mit Methanol für mindestens 15 Minuten fixiert.
- c) Anschließend wurde das Methanol vollständig abpipettiert.
- d) Die Kulturen wurden zweimal mit Aqua dest. gewaschen.
- e) Die Kulturen wurden mit frisch filtrierter Karbolfuchsingebrauchslösung 6 Minuten gefärbt.
- f) Es folgte zweimal Waschen mit Aqua dest.
- g) Die Gegenfärbung erfolgte mit 0,8 %iger Malachitgrünlösung für 45 Sekunden.
- h) Es folgte zweimal waschen mit Aqua dest.
- i) Schritt g) wurde wiederholt.
- j) Danach wurden die Vertiefungen drei mal mit Aqua dest. gewaschen.
- k) Am Ende wurden die Deckgläschen aus den Vertiefungen mit Hilfe einer Pinzette herausgenommen, bei Raumtemperatur luftgetrocknet, auf be-



schriftete Objektträger mit der gefärbten Nachweiskultur nach unten in einen Tropfen des Einbettungsmediums (Eukitt) mit sanftem Druck eingebettet.

- I) Die Objektträger wurden unter dem Zeiss Lichtmikroskop bei 1000-facher Vergrößerung unter Verwendung von Immersionsöl mäanderförmig durchgemustert.

Nach der Giménez-Färbung waren in seltenen Fällen einzelne, sehr kleine, rot gefärbte Körperchen auf grünem Hintergrund sichtbar, die bei der Auswertung nicht berücksichtigt wurden. Als positiv galten Proben, bei denen 5 oder mehr Einschlusskörperchen zu sehen waren. Bei fraglichen Ergebnissen wurde eine Passage des entsprechenden Materials durchgeführt und erneut getestet.

### **3.2.4.2 Nachweis der Chlamydien mittels PCR**

#### **3.2.4.2.1 Aufreinigung von DNA**

Die Isolierung der DNA aus Zellpellets erfolgte mit dem QIAmp Tissue Kit der Firma Qiagen. Dabei wurden 500 µl Zellextrakte durch Lyse und Protease-Behandlung von Zellpellets gewonnen und die DNA durch Adsorption an Silika-Membranen in Säulen aufgereinigt. Nach Waschschrinen erfolgt die Elution der DNA von den Säulen mit einem speziellen Puffer. Die genaue Durchführung der Präparation kann dem Benutzerhandbuch entnommen werden. Das Extraktionsprodukt wurde bei 4 °C aufbewahren.

### 3.2.4.2.2 DNA-Amplifikation mittels PCR

Durch Verwendung einer thermostabilen Polymerase und spezifischer Primer können ausgewählte Abschnitte der vorliegenden DNA mittels PCR amplifiziert werden. Amplifiziert wird ein 576-597 bp großes Fragment, das spezifisch für Chlamydien ist, und ein 389-404 bp Fragment entsprechend zu *Chlamydomphila psittaci* (KALTENBOECK et al., 1991, 1992, 1997).

❖ **Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für den  
Genus-spezifischen Nachweis von Chlamydien**

PCR-Puffer	5,0 µl
(500 mM KCl, 15 mM MgCl <sub>2</sub> , 100 mM Tris-HCl pH 9,0)	
MgCl <sub>2</sub>	3,0 µl
dNTPs	1,0 µl
Taq DNA Polymerase	0,2 µl
Primer 191CHOMP	1,0 µl
Primer CHOMP371	1,0 µl
Bidest.	37,8 µl
DANN	1,0 µl

❖ **Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für den  
Spezies-spezifischen Nachweis von *Chlamydomophila psittaci***

PCR-Puffer	5,0 µl
(500 mM KCl, 15 mM MgCl <sub>2</sub> , 100 mM Tris-HCl pH 9,0)	
MgCl <sub>2</sub>	3,0 µl
dNTPs	1,0 µl
Taq DNA Polymerase	0,2 µl
Primer 218 Psitt	1,0 µl
Primer CHOMP336s	1,0 µl
Bidest.	37,8 µl
DANN	1,0 µl

❖ ***Amplifikationsbedingungen***

Bei jeder PCR wurden mindestens eine Negativkontrolle sowie eine Positivkontrolle mitgeführt. Als Negativkontrolle diente dabei ein Reaktionsansatz, der statt DNA die gleiche Menge Aqua bidest enthielt. Als Positivkontrolle wurde ein Lysat einer Chlamydien-infizierten Zellkultur (Isolate 1904 oder 44/03) verwendet.

Die Amplifikation wurde im Thermo-Cycler durchgeführt.

- Protokoll der genusspezifischen PCR

1 Zyklus	Denaturierung	95 °C	30 s
35 Zyklen	Denaturierung	95 °C	30 s
	Primer-Hybridisierung	50 °C	30 s
	Extensionsreaktion	72 °C	30 s
1 Zyklus	Abkühlen	4 °C	Pause

- Protokoll der speziesspezifischen PCR

1 Zyklus	Denaturierung	95 °C	30 s
20 Zyklen	Denaturierung	95 °C	30 s
	Primer-Hybridisierung	60 °C	30 s
	Extensionsreaktion	72 °C	30 s
1 Zyklus	Abkühlen	4 °C	Pause

❖ **Agarosegelelektrophorese**

Zur Analyse der PCR diente die elektrophoretische Auftrennung in 2 %igen Agarosegelen. Als Laufpuffer diente 0,5 %iger TBE-Puffer. Von den PCR-Ansätzen wurden jeweils 10 µl aufgetrennt und dazu mit 1 µl Loading Dye Solution 6x versetzt. Die Elektrophorese fand bei einer Spannung von 100 V für ca. 90 min statt. Danach wurde das Gel in einem Bad mit 1 %igem Ethidiumbromid für etwa 40 min gefärbt und im Wasserbad für 5 min gewaschen. Anschließend wurden sichtbare DNA-Banden auf einem UV-Transilluminator bei einer Wellenlänge von 254 nm identifiziert und fotografiert.

### **3.2.5 Vermehrung der Chlamydien**

Eine Methode, die Chlamydien auf eine für den Einsatz zur Antibiotikumempfindlichkeitsprüfung erforderliche Anzahl pro Milliliter Suspension zu vermehren, musste erst entwickelt werden. Denn erst eine mindestens 80 %ige Infektion von BGM-Monolayern erwies sich als ausreichend hohe Infektionsrate *in vitro*.

#### **3.2.5.1 Herstellen eines Erregerpellets und der Erregerstammsuspension**

Die Erreger wurden drei mal in BGM passagiert, um eine erforderliche Menge an Chlamydien pro Milliliter Suspension zu erhalten (siehe **3.2.4**). Die infizierten Zellen wurden vom Plattenboden mittels einer Pipette abgekratzt. Die Zellsuspension wurde in ein steriles Glasröhrchen überführt, die Zellen mit Ultraschall zerstört und die Suspension schließlich bei  $1000 \times g$  für 10 Minuten zentrifugiert. Danach wurden die BGM-Zellkulturplatten mit 0,1 ml der Überstand infiziert.

Daran anschließend erfolgte die Verimpfung auf in zwei Gewebekulturflaschen von  $25 \text{ cm}^2$  gezüchtetem BGM-Monolayer. Vom Überstand wurden 0,5 ml Suspension jeder Flasche hinzugefügt. Nach 4 Stunden im Brutschrank wurden die Flaschen mit 5 ml MEM inkl. 2 % FKS und  $2 \mu\text{g/ml}$  Cycloheximid aufgefüllt. Nach 3 Tagen wurden die BGM-Monolayer mit einem sterilen Gummischaber abgelöst. Diese Erregerstammsuspension wurde wie bereits beschrieben geschallt und klarzentrifugiert. Der somit erhaltene geklärte Überstand wurde wiederum in ein steriles Glasröhrchen überführt und bei  $41.800 \times g$  für 1 Stunde zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 3 ml MEM mit 5 % FKS resuspendiert und erneut auf BGM-Monolayer für die Antibiotikumempfindlichkeitsprüfung verimpft (siehe **3.2.8**).

### **3.2.6 Herstellen der Verdünnungsreihen der zu testenden Chemotherapeutika**

Die Wirkstoffe Chlortetracycline, Doxycycline, Enrofloxacin, Difloxacin, Erythromycin und Clarithromycin wurden für die Prüfung der Sensitivität mit allen Chlamydien-Isolaten eingesetzt (siehe **3.1.3.7**).

Die Verdünnungen wurden in Zellkulturmedium (MEM inkl. 2 % FKS und 2 µg/ml Cycloheximid) über eine Verdünnungsreihe in den Stufen 0,1 (nur für Enrofloxacin und Difloxacin) 0,25, 0,5, 1,0, 5,0, 10,0 µg/ml (nur für Chlortetracycline, Doxycycline, Enrofloxacin, Difloxacin, Erythromycin und Clarithromycin) angesetzt, da möglichst auch die Wirkung in subtherapeutischen Dosen ermittelt werden sollte. Alle Verdünnungen der Wirkstoffe wurden am Versuchstag frisch angesetzt.

### **3.2.7 Positiv- und Negativkontrollen**

Um die Brauchbarkeit der durchgeführten Untersuchungen und deren Ergebnisse beurteilen zu können, sind Positiv- und Negativkontrollen, die zum Versuchsansatz parallel mitgeführt wurden, notwendig. Je Versuchsansatz mit einem Antibiotikum wurde eine Positivkontrolle (Erregerstammssuspension ohne jegliche Zugabe von Antibiotikum) und eine Negativkontrolle (Zugabe von Antibiotikum ohne Erregerstammssuspension) mitgeführt, gefärbt und beurteilt.

### **3.2.8 Versuchsanordnung**

Zu Beginn der Antibiotikaempfindlichkeitsprüfung wurde die Erregerstammssuspension von jeder Gewebekulturflasche, wie bereits beschrieben, geschallt, klarzentrifu-

giert, ultrazentrifugiert und das entstandene Pellet in 3 ml MEM mit 5 %igem FKS resuspendiert (siehe **3.2.5.1**). Die nach **3.2.2** hergestellten Nachweiskulturen wurden mit 0,1 ml der Erregerstammssuspension infiziert, 1 Stunde bei 2000 r.p.m. (ca. 620 × g) zentrifugiert, 2 Stunden im Brutschrank bei 37 °C inkubiert, und mit 0,9 ml Antibiotikumverdünnung in den unter **3.2.6** genannten Verdünnungsstufen aufgefüllt, sodass sich ein Gesamtvolumen von 1 ml pro Vertiefung ergab. Es wurden je Antibiotikatestreihe eine Positiv- und eine Negativkontrolle angefertigt.

Jedes Isolat sollte mit 6 Wirkstoffen in 6 verschiedenen Konzentrationen getestet werden.

Anschließend wurden die Platten für 2 Tage im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Am dritten Tag sind die Nachweiskulturen nach Giménez gefärbt worden.

### **3.2.9 Mikroskopische Zählung der Chlamydien-Einschlusskörperchen**

Die Zählung der Einschlusskörperchen von Chlamydien in der Giménez-gefärbten Nachweiskultur erfolgte mit Hilfe eines Okularzählgitters (Netzmikrometer), das in ein Zeissmikroskop eingesetzt wurde. Die Zählung erfolgte bei 1000-facher Vergrößerung. Das Gitter besteht aus 100 einzelnen gleichgroßen Quadraten. Pro Deckgläschen wurden 10 Quadrate ausgezählt. Aus den Ergebnissen der 10 Zählungen wurde der arithmetische Mittelwert gebildet.

### **3.2.10 Bestimmung der minimalen Hemmstoffkonzentration (MHK)**

Die minimale Hemmkonzentration (MHK) wurde nach 48-stündiger Inkubation der Gewebekulturplatten bestimmt.

Zwischen 15 und 20 Zellen waren pro Quadrat im Blickfeld sichtbar. Zellen, die zu mindestens 50 % im Quadrat zu sehen waren, wurden mitgezählt. Es wurden 10 Quadrate, also zwischen 150 und 200 Zellen ausgezählt.

Die Zellen wurden anhand der sichtbaren Einschlusskörperchen differenziert und in „infiziert“ und „nicht infiziert“ eingeteilt. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe eines Excel-Sheet dokumentiert.

Als MHK wurde bei der Auswertung der einzelnen Verdünnungsstufen die niedrigste Konzentration der Testsubstanz ermittelt, bei der mikroskopisch keine Einschlusskörperchen mehr nachweisbar waren.

### **3.2.11 Bewertung der Ergebnisse**

Die Infektionsresistenz ist ein angeborener, artspezifischer Zustand der Unempfindlichkeit eines Organismus für einen bestimmten Krankheitserreger (WIESNER und RIBBECK, 1991). Ein pathogener Mikroorganismus muss dann als resistent bezeichnet werden, wenn die *in vitro* ermittelte minimale Hemmkonzentration (MHK) höher ist als die *in vivo* am Infektionsort erreichbare Serum- bzw. Gewebekonzentration (FORTH et al., 1990). Für die Sicherheit der klinischen Anwendung ist es entscheidend, ab welchem Verhältnis zwischen Überdosierung und Dosierung mit schwerwiegenden Nebenwirkungen zu rechnen ist. Je größer dieser Quotient ist, um so größer ist die therapeutische Breite und damit der Abstand zwischen therapeutischer Dosis und der Dosis, ab der mit solchen Nebenwirkungen zu rechnen ist (LÖSCHER et al., 2003).

Eine CTC-Blutkonzentration wurde in Aras zwischen 1 µg/ml und 2 µg/ml beschrieben (FLAMMER et al., 1989), während eine Konzentration von  $4,47 \pm 0,16$  µg/ml bis  $5,7 \pm 1,0$  µg/ml von Doxycyclin in verschiedenen Nutzgeflügelarten erreicht wurde



(SANTOS et al., 1997; LACZAY et al., 2001). In Ziervögeln wurde eine Enrofloxacin-Blutkonzentration von 0,40 µg/ml bis 4,10 µg/ml festgestellt (JUNG, 1992; LINDENSTRUTH, 1992).

Leider gibt es nicht viele verfügbare Informationen über die Plasmakonzentration von Difloxacin. Bei Hühnern wurde eine Serumkonzentration von 0,96 µg/ml bis 3,61 µg/ml beschrieben (INUI et al., 1998).

Eine Erythromycin-Plasmakonzentration von 5,0-6,9 µg/ml wurde in Broilern erzielt (GOUDAH et al., 2004). Andere Autoren fanden, dass Erythromycin bei Tauben eine Konzentration in Lungen und Trachea von 1,6 µg/ml erreicht, aber dass die Konzentration in Blutplasma niedriger war (VANHAECKE et al., 1990).

Informationen über die Pharmakokinetik von Clarithromycin bei Vögeln liegen bisher nicht vor.

Für die Bewertung der *in vitro*-Wirksamkeit der in der vorliegenden Arbeit festgestellten minimalen Hemmstoffkonzentration der sechs Wirkstoffe erfolgte eine Einleitung in sensibel, intermediär und resistent.

<b>Wirkstoff</b>	<b>Bewertung</b>		
	<b>Sensibel</b>	<b>Intermediär</b>	<b>Resistent</b>
Chlortetracyclin	≤ 0,5 µg/ml	1,0 µg/ml	≥ 5,0 µg/ml
Doxycyclin	≤ 1,0 µg/ml	5,0 µg/ml	≥ 10,0 µg/ml
Enrofloxacin	≤ 0,25 µg/ml	0,5-1,0 µg/ml	≥ 5,0 µg/ml
Difloxacin	≤ 0,5 µg/ml	1,0 µg/ml	≥ 5,0µg/ml
Clarithromycin	≤ 0,5 µg/ml	1,0 µg/ml	≥ 5,0 µg/ml
Erythromycin	≤ 1,0 µg/ml	5,0 µg/ml	≥ 10,0 µg/ml

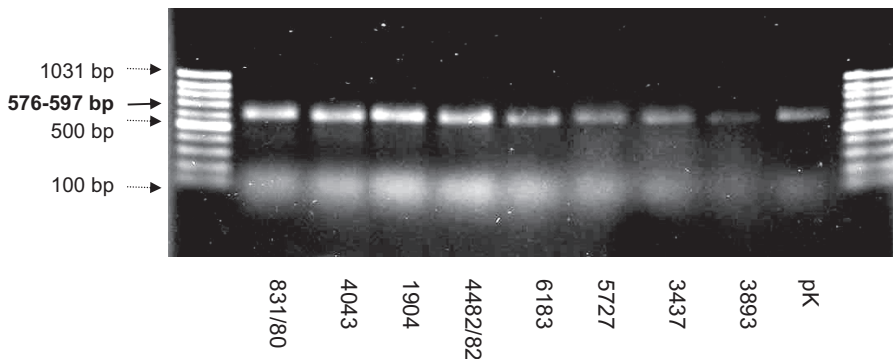
## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Nachweis von Chlamydien mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach KALTENBÖCK et al. (1991, 1992, 1997)

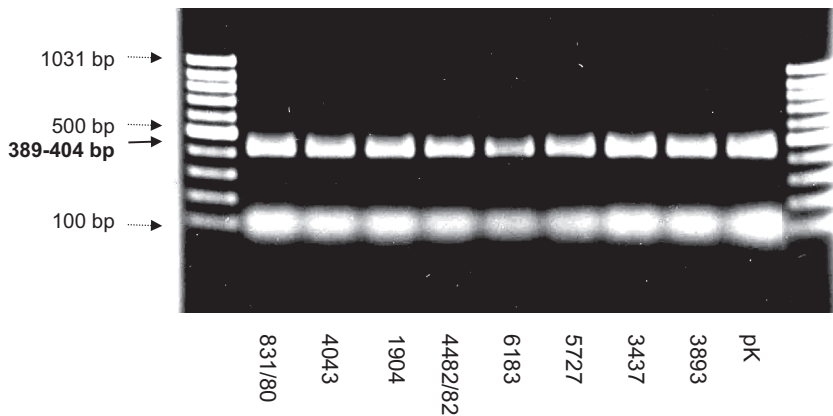
Zur Sicherung der taxonomischen Identität der verwendeten Stämme wurden sie mittels PCR nach KALTENBÖCK et al. (1991, 1992, 1997) überprüft. Die Isolate, die mittels Giménez-Färbung als positiv beurteilt wurden, reagierten auch positiv in der speziesspezifischen PCR für *Chlamydomphila psittaci*.

Abbildung 12 zeigt 576-597 bp Amplifikate, die spezifisch für das Genus *Chlamydomphila* sind. Abbildung 13 zeigt ein 384-404 bp Fragment, das *Chlamydomphila psittaci* entspricht.

**Abbildung 12:** Agarosegel (2 %ig) einer genusspezifischen Chlamydien-PCR nach KALTENBÖCK et al. (1991, 1992, 1997). Spur 1 und 11 zeigen den Molekulargewichtsmarker, Spur 2 bis 9 zeigen Isolate und Spur 10 zeigt die positive Kontrolle.



**Abbildung 13:** Agarosegel (2 %ig) einer speziesspezifischen Chlamydien-PCR nach KALTENBÖCK et al. (1991, 1992, 1997). Spur 1 und 11 zeigen den Molekulargewichtsmarker, Spur 2 bis 9 zeigen Isolate und Spur 10 zeigt die positive Kontrolle.



#### 4.2 Qualitätssicherung zur Methodendurchführung bei der Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration

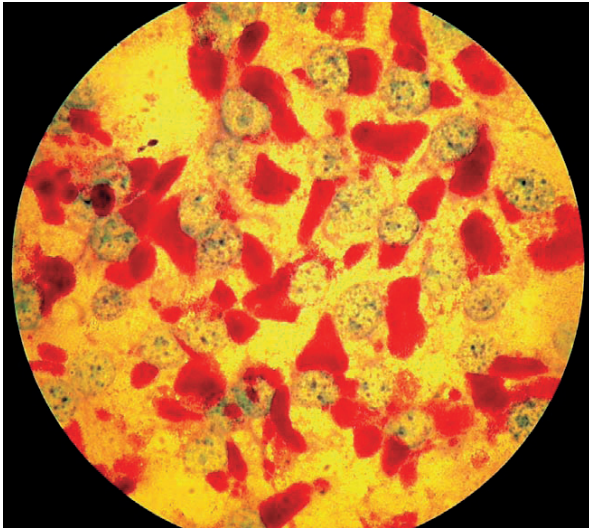
##### 4.2.1 Negativ- und Positivkontrolle

In der Negativkontrolle wurden keine morphologischen Veränderungen an den nicht infizierten nach Giménez gefärbten BGM-Zellkulturen erkannt. Somit erwiesen sich alle verwendeten Konzentrationen der Wirkstoffe als nicht zytotoxisch und konnten für die weiteren Untersuchungen verwendet werden.

In der Chlamydien-infizierten Positivkontrolle ohne Wirkstoff waren 2 Tage p.i. immer kompakte, rote Einschlüsse zu finden, wenn nach Giménez gefärbt wurde (s. Abbildung 14).

Die Zahl der Einschlüsse der mitgeführten Positivkontrollen steht in jeder Tabelle zur Bestimmung der minimalen Hemmstoffkonzentration als Referenz für jedes Isolat

und ist mit 0,0 gekennzeichnet.



**Abbildung 14:** *Chlamydia psittaci*-Einschlüsse (rot) nach Giménez-Färbung. Zytoplasma und Zellkerne kaum gefärbt (ggf. grünlich). Isolat 364/365/98/LUA

#### 4.2.2 Quantitative Bestimmung der Chlamydien-Einschlüsse

Beim Zusatz der verwendeten Chemotherapeutika wurden die Einschlüsse weniger dicht und nur noch schwach rot gefärbt. Bei etwas höheren Konzentrationen traten entweder nur noch einzelne rote Partikel innerhalb grüner Einschlüsse auf, oder es wurden keine Einschlüsse mehr gefunden. Die Konzentration, bei der keine roten Einschlusskörperchen mehr nachweisbar waren, wurde als die „minimale Hemmkonzentration“ angesehen. Die minimale Hemmkonzentration (MHK) des jeweiligen Wirkstoffs ist in der Tabelle 8 dargestellt.

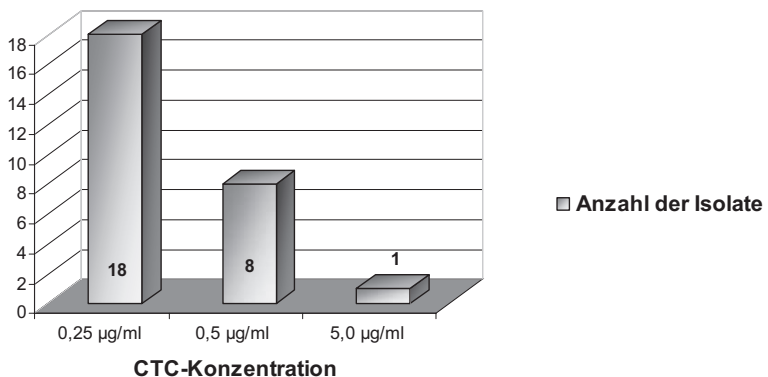
**Tabelle 8:** Minimale Hemmkonzentration in µg/ml bei 27 *Chlamydomphila psittaci*-Isolaten

Isolat	CTC	Doxy- cyclin	Diflo- xacin	Enroflo- xacin	Clarithro- mycin	Erythro- mycin
244/03	≤ 0,25	0,50	≤ 0,10	0,50	≤ 0,25	> 10,0
1107/04	0,50	≤ 0,25	≤ 0,10	0,25	≤ 0,25	> 10,0
2699/04	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,10	0,25	≤ 0,25	10,0
2156/03	0,50	0,50	0,50	0,25	0,50	> 10,0
138/05	0,50	≤ 0,25	0,50	0,50	≤ 0,25	10,0
1999/03	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,10	0,25	0,50	> 10,0
236/05	≤ 0,25	1,00	0,25	0,25	≤ 0,25	5,0
3/20901	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,10	0,50	≤ 0,25	10,0
44/03	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,10	0,25	0,50	> 10,0
238/98 LUA KO	0,50	≤ 0,25	≤ 0,10	0,50	1,00	10,0
1163	≤ 0,25	≤ 0,25	0,25	0,50	0,50	10,0
PS/10/93 LUA KO	≤ 0,25	1,00	≤ 0,10	0,25	≤ 0,25	> 10,0
Di/4504/93 LUA KO	≤ 0,25	0,50	≤ 0,10	1,00	0,50	5,0
Pa/186/97 LUA KO	0,50	0,50	0,25	0,25	≤ 0,25	10,0
364/365/98 LUA KO	≤ 0,25	0,50	≤ 0,10	0,25	≤ 0,25	5,0
1904	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,10	0,25	0,50	10,0
6183	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,10	0,25	≤ 0,25	10,0
5727	5,00	1,00	0,25	0,25	≤ 0,25	> 10,0
4043	≤ 0,25	1,00	≤ 0,10	0,50	0,50	10,0
3437	0,50	≤ 0,25	≤ 0,10	0,50	0,50	10,0
831/80	0,50	≤ 0,25	≤ 0,10	0,25	≤ 0,25	10,0
4482/82	≤ 0,25	≤ 0,25	0,25	0,50	0,50	10,0
383	≤ 0,25	≤ 0,25	0,25	0,25	≤ 0,25	> 10,0
3893	≤ 0,25	≤ 0,25	0,25	0,25	≤ 0,25	0,5
2165	≤ 0,25	≤ 0,25	0,25	0,25	0,50	10,0
1316/78	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,10	0,25	≤ 0,25	10,0
2106/03	0,50	≤ 0,25	≤ 0,10	5,00	0,50	> 10,0

### 4.3 Minimale Hemmkonzentration von Chlortetracyclin gegen Chlamydien

Die 27 *Chlamydomphila psittaci*-Isolate zeigen gegenüber Chlortetracyclin die in der Grafik 1 und in der Tabelle 9 dargestellten MHK-Profile.

**Grafik 1:** Häufigkeitsauszählung der MHK von 27 *Chlamydomphila psittaci*-Isolaten gegen Chlortetracyclin (CTC)



Eine deutlich hervortretende Abhängigkeit der Zahl der Einschlüsse der meisten Isolate ist ab einer CTC-Konzentration 0,25 µg/ml zu sehen. Bei einer CTC-Konzentration von 0,25 µg/ml konnten 18 der 27 Isolate keine Einschlüsskörperchen mehr hervorrufen. Bei einer CTC-Konzentration von 0,5 µg/ml ist die Zahl der Einschlüsse um fast 100 % im Vergleich zur Positivkontrolle vermindert. Nur das Isolat 5727, das 1983 aus einem Sittich isoliert wurde, führt zur Bildung von Inklusionen bis zu 1,0 µg/ml, und zeigt deshalb eine Resistenz gegenüber CTC an. Erst ab 5 µg/ml wurden keine Chlamydia-Einschlüsse mehr erkannt (Tabelle 9).

**Tabelle 9:** Zahl der Chlamydien-Einschlüsse je ausgezähltem Quadrat (arithmetische Mittelwerte von je 10 Quadraten des Okularzählgitters) bei steigendem Chlortetracyclin (CTC)-Gehalt im Medium

Chlamydienisolat	Chlortetracyclin-Gehalt ( $\mu\text{g/ml}$ )						Bewertung*
	0,0	0,25	0,5	1,0	5,0	10,0	
244/03	15,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
1107/04	16,5	3,1	0,0	0,0	0,0	0,0	S
2699/04	12,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
2156/03	10,3	8,3	0,0	0,0	0,0	0,0	S
138/05	8,5	6,9	0,0	0,0	0,0	0,0	S
1999/03	18,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
236/05	9,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
3/20901	8,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
44/03	17,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
238/98 LUA KO	12,5	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	S
1163	16,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
PS/10/93/LUA KO	13,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
Di/4504/93/LUA KO	12,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
Pa/186/97/LUA KO	12,6	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	S
364/365/98/LUA KO	13,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
1904	8,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
6183	15,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
5727	8,9	9,8	10,0	7,9	0,0	0,0	R
4043	16,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
3437	15,2	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	S
831/80	10,2	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	S
4482/82	14,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
383	15,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
3893	15,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
2165	14,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
1316/78	16,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
2106/03	18,9	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	S
<b>arithmet. Mittelwerte</b>	<b>13,6</b>	<b>1,1</b>	<b>0,4</b>	<b>0,3</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	

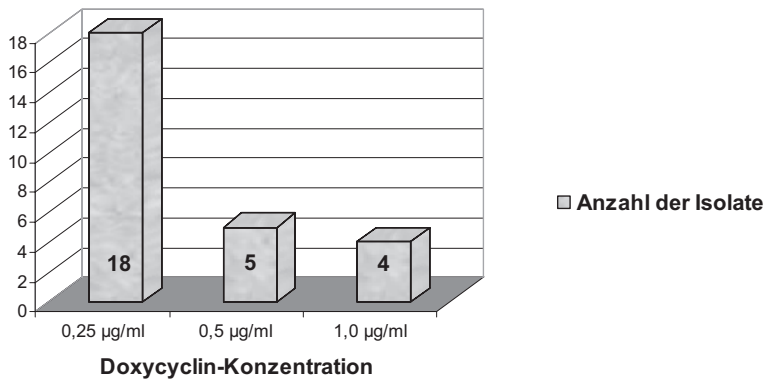
\* S= sensibel, I= intermediär, R= resistent

Eine Chlortetracyclinresistenz wurde bei 26 der 27 Isolate nicht nachgewiesen.

#### 4.4 Minimale Hemmkonzentration von Doxycyclin gegen Chlamydien

Grafik 2 und Tabelle 10 zeigen die Zahl der Chlamydien-Einschlüsse enthaltenden BGM-Zellen nach der Beimpfung durch 27 *Chlamydomphila psittaci*-Isolate mit verschiedenen Doxycyclin-Konzentrationen.

**Grafik 2:** Häufigkeitsauszählung der MHK von 27 *Chlamydomphila psittaci*-Isolaten gegen Doxycyclin



9 der 27 getesteten Isolate weisen Chlamydien-Einschlüsse bei Konzentrationen zwischen 0,25 und 0,5 µg/ml auf. Bereits bei 0,25 µg/ml und 0,5 µg/ml Doxycyclin traten deutlich weniger positive Zellen auf als bei der pK. Bei Konzentrationen ab 1,0 µg/ml waren keine positiven Zellen mehr nachweisbar.

Bei den 27 Isolaten wurde keine Resistenz festgestellt.



**Tabelle 10:** Zahl der Chlamydien-Einschlüsse je ausgezähltem Quadrat (arithmetische Mittelwerte von je 10 Quadraten des Okularzählgitters) bei steigendem Doxycyclin-Gehalt im Medium

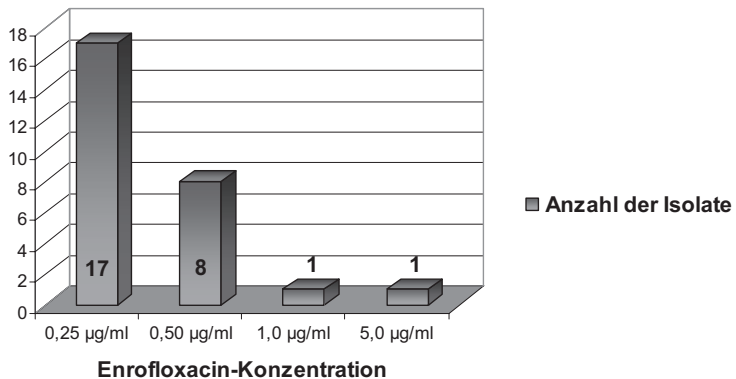
Chlamydienisolat	Doxycyclin-Gehalt (µg/ml)						Bewertung*
	0,0	0,25	0,5	1,0	5,0	10,0	
244/03	15,9	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	S
1107/04	14,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
2699/04	14,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
2156/03	12,3	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	S
138/05	11,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
1999/03	15,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
236/05	17,1	0,2	0,1	0,0	0,0	0,0	S
3/20901	13,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
44/03	13,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
238/98 LUA KO	12,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
1163	15,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
PS/10/93/LUA KO	8,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	S
Di/4504/93/LUA KO	14,4	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	S
Pa/186/97/LUA KO	15,4	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	S
364/365/98/LUA KO	13,9	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	S
1904	10,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
6183	15,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
5727	9,4	0,6	0,3	0,0	0,0	0,0	S
4043	8,3	0,9	0,1	0,0	0,0	0,0	S
3437	14,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
831/80	9,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
4482/82	14,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
383	11,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
3893	11,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
2165	14,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
1316/78	14,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
2106/03 Dx	12,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
<b>arithmet. Mittelwerte</b>	<b>13,0</b>	<b>0,13</b>	<b>0,02</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	

\* S= sensibel, I= intermediär, R= resistent

#### 4.5 Minimale Hemmkonzentration von Enrofloxacin gegen Chlamydien

In chlamydieninfizierten Zellkulturen ohne Enrofloxacinzusatz waren nach 2 Tagen kompakte, rote Einschlüsse nachweisbar. Die Enrofloxacin-Konzentration von 0,1 µg/ml führte nur zu einer geringfügigen Verminderung der Zahl der Einschlusskörperchen (Tabelle 11). Unter Zusatz von höheren Konzentrationen von Enrofloxacin nahm die Zahl der Einschlüsse ab. Mit 0,25 µg/ml waren Einschlüsse bei 10 Isolaten (37,0 %), bei 0,50 µg/ml nur noch bei 2 Isolaten (7,4 %), erkennbar. Bei 1,0 µg/ml war nur das Isolat 2106 noch positiv, und ab 5 µg/ml waren keine positiven Zellen mehr nachweisbar.

**Grafik 3:** Häufigkeitsauszählung der MHK von 27 *Chlamydophila psittaci*-Isolaten gegen Enrofloxacin



**Tabelle 11:** Zahl der Chlamydien-Einschlüsse je ausgezähltem Quadrat (arithmetische Mittelwerte von je 10 Quadraten des Okularzählgitters) bei steigendem Enrofloxacin-Gehalt im Medium

Chlamydienisolat	Enrofloxacin-Gehalt (µg/ml)						Bewertung*
	0,0	0,10	0,25	0,50	1,0	5,0	
244/03	17,5	17,5	0,1	0,0	0,0	0,0	I
1107/04	10,7	7,6	0,0	0,0	0,0	0,0	S
2699/04	8,4	6,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
2156/03	8,4	7,9	0,0	0,0	0,0	0,0	S
138/05	10,9	3,9	0,1	0,0	0,0	0,0	I
1999/03	19,7	19,7	0,0	0,0	0,0	0,0	S
236/05	14,5	16,1	0,0	0,0	0,0	0,0	S
3/20901	11,8	11,4	11,3	0,0	0,0	0,0	I
44/03	11,1	8,8	0,0	0,0	0,0	0,0	S
238/98 LUA KO	10,0	8,2	0,4	0,0	0,0	0,0	I
1163	8,6	5,9	0,1	0,0	0,0	0,0	I
PS/10/93/LUA KO	11,2	11,2	0,0	0,0	0,0	0,0	S
Di/4504/93/LUA KO	11,5	7,4	0,4	0,1	0,0	0,0	I
Pa/186/97/LUA KO	10,0	4,8	0,0	0,0	0,0	0,0	S
364/365/98/LUA KO	13,1	5,2	0,0	0,0	0,0	0,0	S
1904	16,6	7,4	0,0	0,0	0,0	0,0	S
6183	15,9	12,4	0,0	0,0	0,0	0,0	S
5727	14,9	9,2	0,0	0,0	0,0	0,0	S
4043	14,3	10,7	8,0	0,0	0,0	0,0	I
3437	15,3	6,4	0,1	0,0	0,0	0,0	I
831/80	8,0	6,7	0,0	0,0	0,0	0,0	S
4482/82	12,9	7,8	0,1	0,0	0,0	0,0	I
383	11,3	12,9	0,0	0,0	0,0	0,0	S
3893	9,9	10,6	0,0	0,0	0,0	0,0	S
2165	18,9	13,4	0,0	0,0	0,0	0,0	S
1316/78	11,9	11,5	0,0	0,0	0,0	0,0	S
2106	12,7	9,7	0,8	0,4	0,1	0,0	R
<b>arithmet. Mittelwerte</b>	<b>12,6</b>	<b>9,6</b>	<b>0,8</b>	<b>0,02</b>	<b>0,004</b>	<b>0,0</b>	

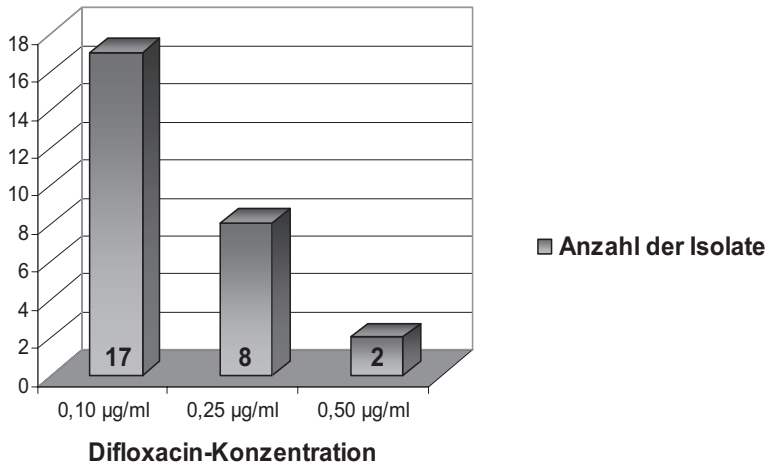
\* S= sensibel, I= intermediär, R= resistent

#### 4.6 Minimale Hemmkonzentration von Difloxacin gegen Chlamydien

Bei der Anwendung von 0,1 µg/ml Difloxacin wurden im Gegensatz zu 0,1 µg/ml Enrofloxacin (s. 4.5) in 17 von 27 Isolaten (63,0 %) keine Einschlusskörperchen mehr nachgewiesen (Tabelle 12 und Grafik 4). Nur 2 Isolate (7,4 %) zeigen bei 0,25 µg/ml noch infizierte Zellen. Bei einer Difloxacin-Konzentration ab 0,5 µg/ml treten keine Einschlüsse mehr auf.

Somit konnte bei den 27 geprüften *Chlamydophila psittaci*-Isolaten keine Resistenz nachgewiesen werden.

**Grafik 4:** Häufigkeitsauszählung der MHK von 27 *Chlamydophila psittaci*-Isolaten gegen Difloxacin



**Tabelle 12:** Zahl der Chlamydien-Einschlüsse je ausgezähltem Quadrat (arithmetische Mittelwerte von je 10 Quadraten des Okularzählgitters) bei steigendem Difloxacin-Gehalt im Medium

Chlamydienisolat	Difloxacin-Gehalt (µg/ml)						Bewertung*
	0,0	0,1	0,25	0,5	1,0	5,0	
244/03	9,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
1107/04	15,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
2699/04	9,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
2156/03	9,6	0,3	0,2	0,0	0,0	0,0	S
138/05	11,6	0,2	0,1	0,0	0,0	0,0	S
1999/03	23,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
236/05	9,3	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	S
44/03	12,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
238/98 LUA KO	15,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
1163	9,6	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	S
PS/10/93/LUA KO	8,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
Di/4504/93/LUA KO	10,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
Pa/186/97/LUA KO	11,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	S
364/365/98/LUA KO	14,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
1904	9,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
6183	11,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
5727	8,4	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	S
4043	9,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
3437	9,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
831/80	13,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
4482/82	12,0	11,4	0,0	0,0	0,0	0,0	S
383	10,6	10,6	0,0	0,0	0,0	0,0	S
3893	9,5	9,5	0,0	0,0	0,0	0,0	S
2165	13,8	13	0,0	0,0	0,0	0,0	S
1316/78	8,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
2106	12,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
<b>arithmet. Mittelwerte</b>	<b>11,5</b>	<b>1,7</b>	<b>0,01</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	

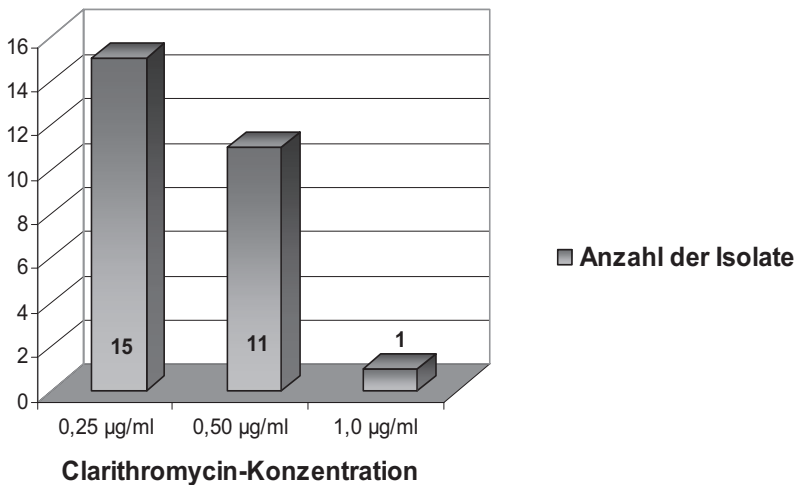
\* S= sensibel, I= intermediär, R= resistent

#### 4.7 Minimale Hemmkonzentration von Clarithromycin gegen Chlamydien

Bei einer Clarithromycin-Konzentration von 0,25 µg/ml konnten bei 15 Isolaten (55,6 %) keine Einschlusskörperchen nachgewiesen werden (Tabelle 13 und Grafik 5). Nur Isolat 238/98 LUA KO bildete noch Einschlüsse bei 0,5 µg/ml, bei 1,0 µg/ml wurden keine Einschlüsse mehr beobachtet.

Gegenüber Clarithromycin konnte keine Resistenz bei den 27 Isolaten festgestellt werden.

**Grafik 5:** Häufigkeitsauszählung der MHK von 27 *Chlamydophila psittaci*-Isolaten gegen Clarithromycin



**Tabelle 13:** Zahl der Chlamydien-Einschlüsse je ausgezähltem Quadrat (arithmetische Mittelwerte von je 10 Quadraten des Okularzählgitters) bei steigendem Clarithromycin (CTC)-Gehalt im Medium

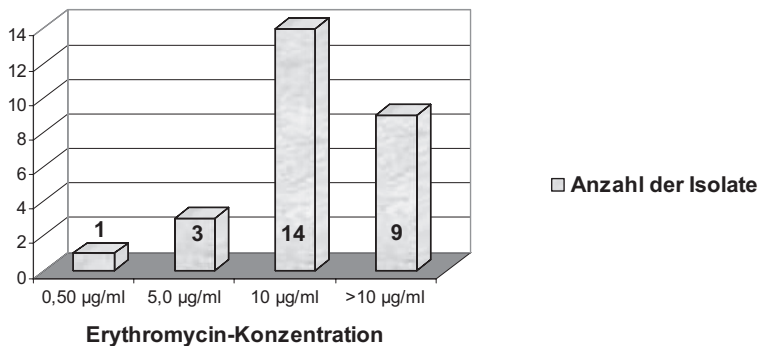
Chlamydienisolat	Clarithromycin-Gehalt (µg/ml)						Bewertung*
	0,0	0,25	0,5	1,0	5,0	10,0	
244/03	13,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
1107/04	11,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
2699/04	19,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
2156/03	8,6	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	S
138/05	15,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
1999/03	16,5	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	S
236/05	10,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
3/20901	17,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
44/03	13,3	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	S
238/98 LUA KO	12,9	0,2	0,1	0,0	0,0	0,0	I
1163	12,7	2,9	0,0	0,0	0,0	0,0	S
PS/10/93/LUA KO	10,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
Di/4504/93/LUA KO	14,6	2,3	0,0	0,0	0,0	0,0	S
Pa/186/97/LUA KO	9,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
364/365/98/LUA KO	10,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
1904	12,6	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	S
6183	13,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
5727	10,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
4043	15,4	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	S
3437	15,8	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	S
831/80	12,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
4482/82	9,5	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	S
383	12,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
3893	13,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
2165	15,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	S
1316/78	10,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	S
2106	18,2	1,5	0,0	0,0	0,0	0,0	S
<b>arithmet. Mittelwerte</b>	<b>13,2</b>	<b>0,3</b>	<b>0,004</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	

\* S= sensibel, I= intermediär, R= resistent

#### 4.8 Minimale Hemmkonzentration von Erythromycin gegen Chlamydien

Erythromycin war auffallend wenig wirksam hinsichtlich der Hemmung der Einschlusskörperbildung. Abgesehen von Stamm 3893 reichten Konzentrationen von 0,25 µg/ml bis 1,0 µg/ml nicht aus, um die Bildung von Einschlüssen zu unterbinden. Erst bei 5,0 µg/ml war eine Wirkung bei 3 Isolaten zu erkennen. Bei 10,0 µg/ml wiesen 14 Isolate keine Einschlüsse mehr auf (Tabelle 14 und Grafik 6). Resistenzen wurden bei 23 Isolaten (85,2 %) nachgewiesen. Nur ein Isolat (3,7 %) war sensibel und nur 3 (11,1 %) zeigten eine intermediäre Empfindlichkeit gegen Erythromycin.

**Grafik 6:** Häufigkeitsauszählung der MHK von 27 *Chlamydophila psittaci*-Isolaten gegen Erythromycin





**Tabelle 13:** Zahl der Chlamydien-Einschlüsse je ausgezähltem Quadrat (arithmetische Mittelwerte von je 10 Quadraten des Okularzählgitters) bei steigendem Erythromycin-Gehalt im Medium

Chlamydienisolat	Erythromycin-Gehalt ( $\mu\text{g/ml}$ )						Bewertung*
	0,0	0,25	0,5	1,0	5,0	10,0	
244/03	19,7	17,1	17,0	17,0	8,5	3,6	R
1107/04	15,7	13,2	12,0	11,9	2,1	0,1	R
2699/04	23,0	22,5	22,4	22,4	4,3	0,0	R
2156/03	11,0	8,0	8,0	7,1	1,3	0,2	R
138/05	16,1	14,7	14,7	14,4	1,7	0,0	R
1999/03	14,5	11,4	11,8	11,8	3,8	0,3	R
236/05	11,1	10,3	9,0	8,8	0,0	0,0	I
3/20901	18,4	18,4	17,8	16,3	0,2	0,0	R
44/03	18,7	13,6	13,6	13,1	2,6	0,3	R
KO'98 (P.T.)	9,9	9,7	8,9	8,9	2,6	0,0	R
1163 (P.T.)	15,9	14,8	14,4	14,1	1,7	0,0	R
PS/10/93/LUA KO	15,4	13,6	9,4	10,1	4,8	2,4	R
Di/4504/93/LUA KO	12,9	12,4	12,4	12,2	0,0	0,0	I
Pa/186/97/LUA KO	13,4	10,1	10,1	10,0	0,3	0,0	R
364/365/98/LUA KO	13,5	12,0	11,8	9,6	0,0	0,0	I
1904	12,2	11,6	10,6	10,5	0,2	0,0	R
6183	15,7	14,6	14,0	13,3	0,4	0,0	R
5727	15,9	13,6	13,6	13,6	6,4	0,8	R
4043	14,3	9,1	1,4	0,3	0,2	0,0	R
3437	16,5	13,7	13,6	13,5	0,8	0,0	R
831/80	12,7	12,1	12,0	12,0	0,4	0,0	R
4482/82	15,2	12,2	8,7	7,8	1,5	0,0	R
383	13,1	8,9	8,1	8,1	1,8	0,2	R
3893	12,8	2,9	0,0	0,0	0,0	0,0	S
2165	14,6	14,6	14,4	14,4	0,6	0,0	R
1316/78	10,5	10,5	10,5	8,8	2,0	0,0	R
2106/03	11,5	10,6	10,0	10,0	2,0	1,2	R
<b>arithmet. Mittelwerte</b>	<b>14,6</b>	<b>12,5</b>	<b>11,5</b>	<b>11,1</b>	<b>1,9</b>	<b>0,3</b>	

\* S= sensibel, I= intermediär, R= resistent

#### 4.9 Friedman-Test

Die Tabelle 15 zeigt die Datenbeschreibung der MHK der 27 *C. psittaci*-Isolate mit einfacher Häufigkeitsauszählung und Quartilen.

Zum Vergleich der Mediane der verschiedenen Wirkstoffe wurde der Friedman-Test durchgeführt. Untersucht wurden dabei 27 *C. psittaci*-Isolate (Probanden) und 6 verschiedene Wirkstoffe (Behandlungsstufen). Die Nullhypothese ( $H_0$ ) lautet, dass alle Wirkstoffe eine gleiche MHK gegen die 27 *C. psittaci*-Isolate haben. Die Alternativhypothese ist, dass nicht alle Wirkstoffe die gleiche MHK besitzen. Das Ergebnis dieser statistischen Methode zeigt, es gibt hoch signifikante Unterschiede ( $p < 0,0001$ ) zwischen der MHK der 6 Wirkstoffe in dieser Untersuchung.

**Tabelle 15:** Datenbeschreibung mit einfacher Häufigkeitsauszählung und Quartilen

Wirkstoff	Mediane ( $\mu\text{g/ml}$ )	Minimum ( $\mu\text{g/ml}$ )	Maximum ( $\mu\text{g/ml}$ )	$q_1^*$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	$q_3^*$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
Chlortetracyclin	0,25	0,25	5,00	0,25	0,50
Doxycyclin	0,25	0,25	1,00	0,25	0,50
Enrofloxacin	0,25	0,25	5,00	0,25	0,50
Difloxacin	0,10	0,10	0,50	0,10	0,25
Clarithromycin	0,25	0,25	1,00	0,25	0,50
Erythromycin	10,00	0,50	> 10,0	10,0	> 10,0

\*Quartil

## 5 Diskussion

In der Literatur wird die minimale Hemmkonzentration (MHK) als die niedrigste Konzentration einer Substanz definiert, bei der eben keine Einschlüsse mehr auftreten (LIEBOWITZ et al., 1986; SEGRETI et al., 1987; WALSH et al., 1987). Nach eigenen Untersuchungen stellen sich vermehrungsfähige Chlamydien (Elementarkörperchen) in der Giménez-Färbung als rote Partikel dar. Die Konzentration, bei der keine roten Partikel mehr nachweisbar waren, wurde in den eigenen Untersuchungen als die „minimale Hemmkonzentration“ angesehen.

Aus diesem Grund ist die Größe des Chlamydien-Inokulums bei diesen Untersuchungen unkritisch. Aus praktischen Gründen ist es aber sinnvoll, das Inokulum so zu wählen, dass mindestens 45-50 % der Zellen der positiven Kontrollen Einschlüsse zeigen.

Ein sehr großes Inokulum kann insbesondere, wenn Chlamydien-Aggregate vorliegen, die Interpretation der Ergebnisse erschweren, da hier die extrazellulär liegenden Chlamydien Einschlüsse vortäuschen können. Auch ist es möglich, dass ein zu großes Inokulum die Lysis der meisten Zellen verursacht.

Das Inokulum wurde deshalb, wenn nichts anderes angegeben ist, stets so gewählt, dass mindestens 45-50 % der Zellen je Gesichtsfeld infiziert waren und somit Einschlüsse enthalten.

Alle verwendeten sechs Wirkstoffe greifen auf unterschiedliche Weise in den Vermehrungszyklus der Chlamydien ein. In der Latenz befindliche Chlamydien vermehren sich nicht und können deshalb durch die verwendeten Wirkstoffe nicht beeinflusst werden.

## 5.1 Tetracycline: Chlortetracyclin und Doxycyclin

Tetracyclin und seine Ableitungen sind im Moment die günstigsten Wirkstoffe, um die Chlamydiose zu behandeln, weil sie effektiv, verhältnismäßig preiswert und wenig toxisch sind (SPEER et al., 1992). In zahlreichen Publikationen wird lediglich über Studien an „Tetracyclin“ berichtet, wobei keine Unterscheidung in Chlor- und Oxytetracyclin getroffen wurde (BOWIE et al., 1978 und 1987; LIEBOWITZ et al., 1986; WALSH et al., 1987; JONES et al., 1990; ANDERSEN et al., 1998; LEFEVRE et al., 1998; SOMANI et al., 2000; LENART et al., 2001). In manchen Publikationen befindet sich auch die Formulierung Tetracyclin und Tetracyclinderivate (JONES et al., 1990; LEFEVRE et al., 1998; SOMANI et al., 2000; LENART et al., 2001).

Die Mehrheit der Untersuchungen, die bisher zum Thema „antimikrobielle Empfänglichkeit“ ausgeführt worden sind, beziehen sich auf *C. trachomatis*.

FLAMMER et al. (1989) haben die Konzentrationen von CTC in Vögeln beschrieben. Sie fanden eine Chlortetracyclin-Blutkonzentration von 1-2 µg/ml in Aras, die mit Pellets mit 1-1,5 %iger CTC-Lösung für 30 oder 45 Tage gefüttert wurden. Andererseits wurden maximale Plasmakonzentrationen für Doxycyclin in Puten bei SANTOS et al. (1997) von 4,9 (+/-1,4) bis 5,7 (+/-1,0) µg/ml und in Broilern bei LACZAY et al. (2001) von 4,47 +/- 0,16 µg/ml festgestellt. Die MHK-Werte von CTC lagen in der hier vorliegenden Untersuchung zwischen 0,25 und 5,0 µg/ml, für Doxycyclin zwischen 0,25 und 1,0 µg/ml. Diese Ergebnisse zeigen, dass Doxycyclin *in vitro* gegen *C. psittaci* wirksam ist, da seine MHK-Werte *in vitro* fast ausnahmslos kleiner als die *in vivo* erreichbare Konzentration der Wirkstoffe ist. Nur das Isolat 5727 war resistent gegenüber CTC, obwohl die anderen Isolate sensibel gegen diesen Wirkstoff waren. Die Ergebnisse von Doxycyclin stimmen mit der Untersuchung zur *in vitro*-Wirksamkeit von Doxycyclin überein, die von BUTAYE et al. (1997) durchgeführt

wurde. Die Autoren haben die *in vitro*-Empfänglichkeit von 14 europäischen *Chlamydia (Chlamydophila) psittaci*-Isolaten von Puten geprüft und stellten für Doxycyclin eine MHK von 0,05-0,2 µg/ml fest.

HENNING (1985) fand heraus, dass eine Doxycyclin-Konzentration von 0,2 µg/ml bei 62 isolierten *C. psittaci*-Feldstämmen zu einer vollständigen Hemmung der Produktion infektiöser Elementarkörperchen führte. Diese Ergebnisse stimmen mit den eigenen Ergebnissen überein, denn hier betrug die maximale MHK für Doxycyclin 1,0 µg/ml. Unter diesen Bedingungen wurden Resistenzen bei den überprüften Stämmen nicht beobachtet. Zugleich haben SEGRETI et al. (1987) die MHK von Doxycyclin und Erythromycin gegenüber 11 *C. trachomatis*-Isolaten bestimmt. Die Autoren bemerken, dass beide Wirkstoffe, Doxycyclin und Erythromycin, sehr wirksam waren (MHK<sub>90</sub> 0,03 µg/ml für Doxycyclin und 0,06 µg/ml für Erythromycin). NOTOMI et al. (1999) untersuchten mehrere Wirkstoffe, um ihre Effektivität gegen *C. trachomatis* zu kontrollieren, und ermittelten für Doxycyclin eine MHK von 0,063 µg/ml.

Die Ergebnisse zu CTC in dieser Untersuchung fallen mit der Arbeit von LIEBOWITZ et al. (1986) nicht zusammen, in der Difloxacin und Tetracyclin gegen *C. trachomatis* getestet worden ist. Diese Autoren erhalten eine MHK von 0,125 µg/ml für Tetracyclin, während in meiner Untersuchung ein Isolat als resistent beschrieben wurde. Auch WALSH et al. (1987) haben die *in vitro*-antimikrobiellen Wirkungen von Erythromycin und Tetracyclin für *C. trachomatis* bestimmt. In ihrem Versuch war die MHK von Tetracyclin 0,06-0,51 µg/ml und für Erythromycin von 0,51 µg/ml bis > 1,02 µg/ml.

BOWIE et al. führten 1987 eine *in vitro*-Empfänglichkeitprüfung mit 10 klinischen Isolaten von *C. trachomatis* mit Tetracyclin, Doxycyclin und Erythromycin durch. Die Ergebnisse mit Tetracyclin (0,031-0,125 µg/ml) und Doxycyclin (0,016-0,031 µg/ml) waren ähnlich denen von BOWIE et al. (1978). Genauso wie bei der vorliegenden

Arbeit fanden die Autoren keine Resistenzbildung der Chlamydien gegen Doxycyclin und CTC.

Es wurde auch dokumentiert, dass mehrere *C. trachomatis*-Isolate widerstandsfähig gegen Tetracyclin und Tetracyclinderivate erscheinen (JONES et al., 1990; LEFEVRE et al., 1998; SOMANI et al., 2000; LENART et al., 2001). JONES et al. (1990) haben fünf Isolate, die resistent gegen mehrere Antibiotika waren, einschließlich Tetracyclin, Doxycyclin und Erythromycin, gesammelt. Ein zweites menschliches tetracyclinresistentes *C. trachomatis*-Isolat wurde in Frankreich 1997 isoliert (LEFEVRE et al., 1998). Dieses Isolat war resistent gegen Tetracyclin aber empfindlich gegen alle anderen geprüften Wirkstoffe, einschließlich Erythromycin. ROBLIN und HAMMERSCHLAG (2000) haben die *in vitro*-Wirksamkeit verschiedener Wirkstoffe gegen zehn *Chlamydia pneumoniae*-Isolate und fünf *C. trachomatis*-Stämme in HEp-2-Zellen gezeigt. Die MHK<sub>90</sub> von Doxycyclin für *C. pneumoniae* war 0,25 µg/ml und für *C. trachomatis* 0,06 µg/ml.

SOMANI et al. (2000) haben die Isolierung von drei urogenitalen Isolaten, die zu Doxycyclin und anderen Antibiotika resistent waren, durchgeführt. In einem vorherigen Bericht wurden acht tetracyclinresistente *C. suis*-Isolate von Schweinen, die auf Bauernhöfen in Nebraska oder Iowa gehalten wurden, isoliert (ANDERSEN et al., 1998). Auch LENART et al. (2001) berichten über eine Tetracyclinresistenz bei zwei *C. suis*-Isolaten. Zugleich benötigen FAILING et al. (2006) bis zur vollständigen Hemmung der Bildung von Einschlüssen bei 15 von 20 *Chlamydophila psittaci*-Isolaten mehr als 10,0 µg/ml Chlortetracyclin bzw. bei 9 von 20 Isolaten mehr als 10,0 µg/ml Doxycyclin, was als Hinweis auf eine Resistenz einiger Chlamydien-Isolate gegenüber den beiden Tetracyclinen bewertet wurde.

## 5.2 Chinolone: Enrofloxacin und Difloxacin

Leider gibt es nicht viele verfügbare Informationen über die minimale Hemmkonzentration der Gyrasehemmer gegen *Chlamydophila psittaci*.

JUNG (1992) erzielte während einer Enrofloxacin-Dauermedikation über das Futter den folgenden mittleren Blutspiegel: Wellensittiche 0,40 µg/ml bei 250 ppm und 0,83 µg/ml bei 500 ppm, Kanarienvogelsittiche 1,9 µg/ml bei 500 ppm, Alexandersittiche 0,72 µg/ml bei 500 ppm und bei 1000 ppm stark schwankende Werte von 0,08 µg/ml bis 2,1 µg/ml, Mohrenkopfpapageien 0,56 µg/ml bei 500 ppm und 0,66 µg/ml bei 1000 ppm Dosierung. LINDENSTRUTH (1992) fand, dass die ermittelten Enrofloxacin-Blutspiegel bei einer Futterdosis von 500 ppm im Gruppendurchschnitt (Kongogaupapageien, Timneh-Graupapageien, Aras, Blaustirn-Amazonen, Gelbwangen-Amazonen, Weißstirn-Amazonen, Gelbnacken-Amazonen und Mohrenkopfpapageien) zwischen 0,66 und 4,10 µg/ml lagen. Andererseits gibt es nur wenige Daten zur Plasmakonzentration von Difloxacin. Nach oraler Difloxacin-Behandlung von Hühnern mit 5 mg/kg wurde eine Serumkonzentration von 0,96-3,61 µg/ml festgestellt (INUI et al., 1998).

Nach eigenen Ergebnissen hat Enrofloxacin gegen *Chlamydophila psittaci* eine MHK von 0,25 µg/ml bis 5,0 µg/ml. Fast alle die Isolate zeigen keine Resistenz, nur das Isolat 2106 ist als resistent beurteilt worden. Alle Isolate besitzen eine MHK von 0,1 µg/ml bis 0,5 µg/ml gegenüber Difloxacin, was man als eine wirksame Konzentration dieses Wirkstoffs im Blut eines Vogels übersetzen könnte. Mit diesen Ergebnissen konnte bei den untersuchten Isolaten insgesamt nur einmal eine Resistenz gegen diese zwei Wirkstoffe nachgewiesen werden, was mit der Arbeit von anderen Autoren weitgehend übereinstimmt. BUTAYE et al. (1997) fanden in ihrer Untersuchung mit 14 europäischen *Chlamydia (Chlamydophila) psittaci*-Isolaten aus Puten eine MHK

für Enrofloxacin von 0,25 µg/ml. Da die MHK auch für die nach der Enrofloxacin-Behandlung isolierten Chlamydien 0,125 µg/ml betrug, lag offensichtlich keine Resistenz gegen Enrofloxacin vor (LINDENSTRUTH, 1993).

Bei FAILING et al. (2006) wurde eine vollständige Hemmung der Einschlusskörperbildung durch eine Enrofloxacin-Konzentration von 1,0 µg/ml bei 12 von 20 *C. psittaci*-Isolaten und durch Difloxacin bei 5 von 20 *C. psittaci*-Isolaten beobachtet. Aber alle Isolate, wenn auch in unterschiedlichem Maße, waren empfindlich gegen diese Wirkstoffe. Die  $MHK_{50}$  für Enrofloxacin betrug 0,18 µg/ml und für Difloxacin 0,168 µg/ml.

In einer anderen Untersuchung konnten LIEBOWITZ et al. (1986) bei *C. trachomatis in vitro* keine Resistenz gegen Difloxacin (MHK zwischen 0,125 µg/ml und 0,25 µg/ml) nachweisen.

FERNANDES et al. (1986) stellten fest, dass Difloxacin höhere Serumspiegel verursacht. Nach oraler oder subkutaner Verabreichung von 100 mg/kg Difloxacin an Mäuse wurde im Serum ein Wirkspiegel von 22,4 µg/ml und eine Halbwertszeit von 10,9 h bestimmt, was bedeuten könnte, dass der Wirkstoff die erforderlichen Werte erst im Plasma erreichen muss, um wirksam sein zu können. Auf der Basis dieser Ergebnisse wäre es wichtig zu wissen, ob es auch möglich wäre, dass Difloxacin einen genauso hohen Spiegel im Vogelserum erreichen kann. Dies bedarf jedoch noch der Untersuchung.



### 5.3 Makrolide: Erythromycin und Clarithromycin

In den vergangenen Jahren führte das wachsende Interesse in der Makrolideforschung zur Bereitstellung von Clarithromycin und anderen Chemikalien, die verbesserte pharmakokinetische Eigenschaften im Vergleich zu Erythromycin zeigen (NOTOMI et al., 1999). Der vor kurzem entwickelte Wirkstoff Clarithromycin ist beim Menschen effektiver und besser verträglich als Erythromycin und Tetracycline zur Behandlung von *C. pneumoniae*-Infektionen (KUO et al., 1996). Die vorliegende Arbeit ist nach unserem Wissensstand die erste Untersuchung, die versucht, den Wirkungsgrad von Clarithromycin gegen *C. psittaci* zu bestimmen.

Die MHK von Clarithromycin in diesem Versuch liegt zwischen 0,25 und 1,0 µg/ml. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass dieser Wirkstoff *in vitro* wirksam gegen *C. psittaci* sein dürfte. Jedoch ist es notwendig, mehr Studien durchführen, um zu bestimmen, wenn die Konzentrationen von Clarithromycin im Blut höher als die *in vitro* MHK sind.

Die MHK von Clarithromycin in dieser Untersuchung stimmt mit den Befunden von anderen Autoren (NAKATA et al., 1994; KUO et al., 1996; ROBLIN und HAMMERSCHLAG, 2000; CRITCHLEY et al., 2002; MALAY et al., 2002) für *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* überein. Um die Wirksamkeit verschiedener Antibiotika (einschließlich Erythromycin, Clarithromycin und Doxycyclin) gegen atypische Erreger von Atemwegserkrankungen beim Menschen zu testen, wurden 9 *C. pneumoniae*-Isolate, die zwischen 1995 und 1999 von Patienten aus Nordamerika und Europa gesammelt wurden, geprüft. Die Ergebnisse zeigen, dass Clarithromycin der wirksamste Wirkstoff, mit einem MHK Bereich von  $\leq 0,008$ – $0,03$  µg/ml, war (CRITCHLEY et al., 2002).

Die *in vitro*-Empfänglichkeiten von *C. pneumoniae*-Isolaten gegen Makrolide und Tetracycline wurde auch bei KUO et al. (1996) bestimmt. Tetracyclin hatte eine MHK von 0,08 µg/ml (0,05–0,1 µg/ml), Clarithromycin 0,04 µg/ml (0,025–0,1 µg/ml) und Erythromycin 0,08 µg/ml (0,05–0,1 µg/ml). Durch MALAY et al. (2002) wurden verschiedene Wirkstoffe gegen 5 *C. trachomatis*- und 20 *C. pneumoniae*-Stämme *in vitro* geprüft. Die MHK von Clarithromycin lag für alle *C. pneumoniae*-Isolate bei 0,015–0,06 µg/ml und für *C. trachomatis*-Isolate bei 0,03 µg/ml. In einem anderen Experiment zeigten NAKATA et al. (1994) eine MHK von 0,025 µg/ml bis 0,05 µg/ml für 25 *C. trachomatis*-Isolate.

NOTOMI et al. (1999) untersuchten die Eigenschaften mehrerer Wirkstoffe, um ihre Effektivität gegen *C. trachomatis* zu kontrollieren. Sie fanden heraus, dass Erythromycin mit einer MHK von 0,125 µg/ml, Clarithromycin mit 0,016 µg/ml und Doxycyclin mit 0,063 µg/ml wirkten. Die Autoren konnten keine Resistenz gegen die geprüften Wirkstoffe belegen.

In ihrer Untersuchung haben MIYASHITA et al. (2003) die  $MHK_{90}$  verschiedener Wirkstoffe, unter ihnen Clarithromycin und Erythromycin, gegen *C. pneumoniae* verglichen. Sie haben die  $MHK_{90}$  als diejenige Wirkstoffkonzentration definiert, an der die Vermehrung der Isolate zu mindestens 90 % gehemmt wurde. Die folgenden Ergebnisse wurden ermittelt: 0,063 µg/ml für Clarithromycin und 0,25 µg/ml für Erythromycin. Zugleich haben ROBLIN und HAMMERSCHLAG (2000) die *in vitro*-Wirksamkeit verschiedener Antibiotika gegen 10 *C. pneumoniae*- und fünf *C. trachomatis*-Isolate in HEp-2-Zellkulturen gezeigt. Die  $MHK_{90}$ -Werte von Doxycyclin und Clarithromycin gegen *C. pneumoniae* betragen 0,25 µg/ml und gegen *C. trachomatis* 0,06 µg/ml.

Tetracyclin und Erythromycin sind die Wirkstoffe der Wahl, um *C. trachomatis*-Infektionen zu behandeln (SANDERS et al., 1986; BONOMO et al., 1997). Aber wie

die vorliegenden Untersuchungen zeigen, äußert sich die Wirkung von Erythromycin nur sehr geringfügig hinsichtlich der Reduktion der Einschlusskörperchen.

GOUDAH et al. (2004) fanden, dass man bei Broilern eine Erythromycin-Plasmakonzentration von 5,0-6,9 µg/ml erreichen kann. Im Gegenteil beschreiben VANHAECKE et al. (1990) eine Gewebskonzentration in der Lunge und der Trachea der Tauben von nur 1,6 µg/ml. Die *in vitro*-Daten der vorliegenden Untersuchung zeigen aber, dass größere Erythromycin-Konzentrationen erforderlich sind, um eine erfolgreiche Behandlung von Vögeln durchzuführen. Denn die Mehrheit der ermittelten MHK-Werte (85,2 %) überstieg 5,0 µg/ml. Aus diesem Grund ist Erythromycin kein Mittel der ersten Wahl zur Behandlung der aviären Chlamydiose.

Es gibt laborexperimentelle (MOURAD et al., 1980) und klinische Beweise, dass Erythromycin auch nicht immer effektiv gegen *C. trachomatis* ist (BOWIE et al., 1982 und 1987). BOWIE et al. (1987) führten eine *in vitro*-Empfänglichkeitsprüfung für Erythromycin an 10 klinischen Isolaten von *C. trachomatis* durch. Die Autoren fanden heraus, dass Erythromycin eine MHK von 0,5 µg/ml bis 2,0 µg/ml hatte und weniger aktiv als in einer vorhergehenden Untersuchung war (BOWIE et al., 1978), in der eine MHK für Erythromycin zwischen 0,25 µg/ml und 0,5 µg/ml ermittelt wurde. JONES et al. (1990) haben fünf Isolate, die resistent gegen mehrere Wirkstoffe, einschließlich Tetracyclin, Doxycyclin und Erythromycin waren, gesammelt. Ein zweiter menschlicher tetracyclinresistenter *C. trachomatis*-Stamm wurde in Frankreich 1997 isoliert (LEFEVRE et al., 1998). Dieses Isolat war resistent gegen Tetracyclin aber empfindlich gegen alle anderen geprüften Antibiotika, einschließlich Erythromycin.

Es gibt auch Daten, die über die MHK des Erythromycins gegen *C. pneumoniae* informieren. KUO et al. (1996) bestimmten die MHK des Erythromycins gegen *C. pneumoniae* als 0,08 µg/ml (0,05–0,1 µg/ml), und MIYASHITA et al. (2003) haben eine MHK<sub>90</sub> von 0,25 µg/ml gezeigt.

## 5.4 Friedman-Test

Der Friedman-Test stellt eine verteilungsfreie Variante des speziellen zweifaktoriellen Varianzanalyse-Modells für den Vergleich mehrerer abhängiger Stichproben dar (<http://www.urz.uni-heidelberg.de/statistik/sas-ah/02.02.01/Friedman.html>).

Diese statistische Methode zeigt, es gibt hoch signifikante Unterschiede ( $p < 0,0001$ ) zwischen den MHK der Wirkstoffe dieser Untersuchung, d.h., fast alle Wirkstoffe dieser Arbeit, außer Erythromycin, haben eine gute *in vitro*-Wirksamkeit gegen *C. psittaci*. Die MHK des Erythromycins ist sehr hoch im Vergleich zu anderen Wirkstoffen. Deshalb ist Erythromycin kein Wirkstoff der Wahl, um *Chlamydophila psittaci*-Infektionen zu behandeln. Im Vergleich dazu sind CTC, Doxycyclin und Enrofloxacin noch sehr wirksam *in vitro* gegen *C. psittaci*.

Eine sehr wichtige und interessante nachfolgende Arbeit wäre, die Verträglichkeit und Pharmakokinetik von Difloxacin und Claritromycin *in vivo* festzustellen, weil beide Wirkstoffe eine gute *in vitro*-MHK gegen Chlamydien besitzen.

## 6 Zusammenfassung

Nach der Literaturübersicht wird die Methode zur Bestimmung der Antibiotikumempfindlichkeit von 27 *Chlamydomphila psittaci*-Isolaten gegen Chlortetracyclin (CTC), Doxycyclin, Enrofloxacin, Difloxacin, Clarithromycin und Erythromycin - minimale Hemmkonzentration (MHK) - aufgeführt. Die MHK wird als die niedrigste Konzentration einer Substanz angesehen, die eben die Bildung reifer zytoplasmatischer *Chlamydomphila psittaci*-Einschlüsse (infektiöse Partikel) verhindert. Als resistent werden Chlamydien angesehen, wenn die *in vitro* erforderliche Konzentration eines Wirkstoffes zur vollständigen Verhütung der Chlamydien-Einschlüsse größer ist, als der *in vivo* zur Therapie erforderliche Blutspiegel.

Es wurden BGM-Monolayer und die Giménez-Färbung benutzt, welche mit den Isolaten aus Sittichen, Amazonen, Papageien, Enten, Gänschen, Hühnern und Greifvögeln infiziert und mit unterschiedlichen Wirkstoffkonzentrationen behandelt wurden. Die Inkubationszeit der inokulierten Zellkulturen betrug 2 Tage. Danach erfolgten Fixieren, Färben mittels Giménez, Auszählen der zytoplasmatischen Einschlüsse und Auswerten.

Die Untersuchungen wurden bei einer Chlortetracyclin-, Doxycyclin-, Clarithromycin- und Erythromycinkonzentration von 0,25 µg/ml, 0,50 µg/ml, 1,0 µg/ml, 5,0 µg/ml und 10,0 µg/ml, und bei einer Enrofloxacin- und Difloxacinkonzentration von 0,10 µg/ml, 0,25 µg/ml, 0,50 µg/ml, 1,0 µg/ml und 5,0 µg/ml durchgeführt. Zur Kontrolle wurden eine Negativ- und eine Positivkontrolle durchgeführt.

Die Mediane der MHK für CTC, Doxycyclin, Enrofloxacin und Clarithromycin betrug 0,25 µg/ml und für Difloxacin 0,10 µg/ml. Keines der 27 *C. psittaci*-Isolate ergab bei Doxycyclin, Difloxacin und Clarithromycin Hinweise auf eine Resistenz. Aller-

dings war ein Isolat resistent gegenüber CTC und ein anderes Isolat war resistent gegen Enrofloxacin.

Erythromycin war gegen die *Chlamydophila psittaci*-Isolate am wenigsten wirksam. Die Zahl der Einschlüsse nahm mit steigender Wirkstoffkonzentration nur sehr langsam ab die MHK betrug bei 23 Isolaten mindestens 10 µg/ml. Deshalb sollte Erythromycin nicht die erste Option für die Behandlung der Psittakose / Ornithose sein.

## 7 Summary

### **Susceptibility of *Chlamydophila psittaci* isolates to different antibiotics**

After a review of the literature, the present study specified the method for the determination of the antibiotic susceptibility of 27 *Chlamydophila psittaci*-isolates to chlorotetracyclin (CTC), doxycyclin, enrofloxacin, difloxacin, clarithromycin and erythromycin in terms of the minimal inhibiting concentration (MIC). The MIC was defined as the lowest drug concentration that prevented the formation of inclusions. For this purpose Buffalo Green Monkey cell (BGM cell cultures) were infected with 27 isolates derived from various psittacines, duck, gosling, chickens and birds of prey. The infected cultures were treated with different concentrations of the six drugs. The incubation time was 2 days, followed by fixation, staining by Giménez and counting of the cells with inclusions. For the MIC determinations CTC, doxycycline, clarithromycin, and erythromycin were diluted in steps of 0.25 µg/ml, 0.50 µg/ml, 1.0 µg/ml, 5.0 µg/ml and 10.0 µg/ml, and enrofloxacin and difloxacin in 0.10 µg/ml, 0.25 µg/ml, 0.50 µg/ml, 1.0 µg/ml and 5.0 µg/ml. A negative control and a positive control were also included. The median of the MIC for CTC, doxycyclin, enrofloxacin and clarithromycin was 0.25 µg/ml and for difloxacin 0.10 µg/ml. Based on these results, one isolate shows resistance to CTC and another one to enrofloxacin, while none of the 27 *C. psittaci* isolates were resistant to doxycyclin, difloxacin and clarithromycin. Erythromycin did not produce a significant reduction of the *Chlamydophila psittaci* inclusions (median of the MIC 10 µg/ml). Therefore it should not be the first option for the treatment of psittacosis.

## 8 Resumen

### **Susceptibilidad de 27 aislamientos de *Chlamydomphila psittaci* a diversos fármacos antimicrobiales**

En el presente estudio se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) de clortetraciclina (CTC), doxiciclina, enrofloxacina, difloxacina, claritromicina y eritromicina para 27 aislamientos de *Chlamydomphila psittaci*. La CIM fue definida como la concentración mínima de la droga a la cual no se hallan inclusiones de la bacteria.

Se infectó células Buffalo Green Monkey (BGM) con los aislamientos de *C. psittaci*, las cuales fueron posteriormente tratadas con diferentes concentraciones de los fármacos mencionados con anterioridad. El periodo de incubación fue de 2 días, luego del cual se llevó a cabo la fijación de las células, su tinción mediante el método de Giménez y su conteo manual.

Para la determinación del MIC se utilizó diluciones de 0,25 µg/ml, 0,50 µg/ml, 1,0 µg/ml, 5,0 µg/ml y 10,0 µg/ml de CTC, doxiciclina, claritromicina y eritromicina, mientras que para la de enrofloxacina y difloxacina, de 0,10 µg/ml, 0,25 µg/ml, 0,50 µg/ml, 1,0 µg/ml y 5,0 µg/ml. Asimismo se empleó controles positivos y negativos a lo largo del experimento.

El valor de la mediana de la CIM para CTC, doxiciclina, enrofloxacina y claritromicina fue de 0,25 µg/ml, mientras que para difloxacina, de 0,10 µg/ml. Uno de los aislamientos fue clasificado como resistente a CTC y otro, a Enrofloxacina. Por otra parte, no se encontró resistencia de la bacteria hacia la doxiciclina, difloxacina y claritromicina.



La eritromicina, por el contrario, no produjo una reducción significativa de las inclusiones del agente (mediana de la MIC: 10,0 µg/ml). Con base en estos datos, no se recomienda usar este producto como primera opción para el tratamiento de la infección con *Chlamydophila psittaci*.

## 9 Literaturverzeichnis

**ADAM, D. und CHRIST, W. (1987):**

Antibiotika und Chemotherapeutika, Antiinfektiose Therapie. In W. FORTH, D. Henschler und W. Rummel (Hrsg.), *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 5. Aufl. (S. 654-662). München: Elsevier GmbH.

**ALLAN, I. und PEARCE, J. H. (1979):**

Modulation by centrifugation of cell susceptibility to chlamydia infection. *Journal of General Microbiology*, **111**: 87-92.

**ALTHAUS, F.R., MEVISSEN, M., NÄGELI, H. (2005):**

*Antimikrobielle Wirkstoffe: ein Begleittext zur Vorlesung für die Studierenden der Veterinärmedizin, Vetsuisse-Fakultät der Universitäten Zürich und Bern.* (Internet). Verfügbar unter: [http://www.vetpharm.unizh.ch/SCRIPT/PDF\\_DATA/abcs.pdf](http://www.vetpharm.unizh.ch/SCRIPT/PDF_DATA/abcs.pdf)

**ALTREUTHER, P. (1987):**

Daten zur Chemie und Toxikologie von Baytril. *Veterinär-Medizinische Nachrichten*, **58**: 87-89.

**ANDERSEN, A. A. und TAPPE, J. P. (1989):**

Genetic, immunologic and pathologic characterisation of avian chlamydial strains. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **195**: 1512-1516.

**ANDERSEN, A. A. (1996):**

Comparison of pharyngeal, fecal, and cloacal samples for the isolation of *Chlamydia psittaci* from experimentally infected cockatiels and turkeys. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **8**: 448-450.

**ANDERSEN, A. A., GRIMES, J. E., WYRICK, P. B. (1997):**

In B.W. Calnek, H. J. Barnes, C. W. McDougald, Y. M. Saif (Eds.), *Diseases of poultry* (10<sup>th</sup> Edition., pp. 333-349). Ames, Iowa: Iowa State University Press.

**ANDERSEN, A. A. (1998):**

Chlamydiosis. In D. E. Swayne, J. R. Glisson, M. W. Jackwood, J. E. Pearson, W. M. Reed, *A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens*, (4<sup>th</sup> Edition, pp. 81-88). Tallahassee, Florida: American Association of Avian Pathologists, University of Pennsylvania, Rose Printing.

**ANDERSEN, A. A. und ROGERS, D. G. (1998):**

Resistance to tetracycline and sulfadiazine in swine *C. trachomatis* isolates. In R. S. Stephens et al. (Ed.), *Chlamydial infections. Proceedings of the Ninth International Symposium on Human Chlamydial Infection* (S. 313-316).

**ANDERSEN, A.A. (2000):**

Avian Chlamydiosis. In OIE Standards Commission (Ed.), *Manual of standards for diagnostic tests and vaccines*. 4<sup>th</sup> Edition (S. 679-690). Paris: Office International des Epizooties.

**ANDERSEN, A. A. und VANROMPAY, D. (2003):**

Avian chlamydiosis (psittacosis, ornithosis). In Y. M., Saif, (Ed.), *Diseases of poultry* (11<sup>th</sup> Edition, pp. 863-879). Ames Iowa: Iowa State University Press.

**ARIZMENDI, F. und GRIMES, J.E. (1995):**

Comparison of the Giménez staining method and antigen detection ELISA with culture for detecting *Chlamydiae* in birds. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **7**: 400-401.

**ARENS, M. und WEINGARTEN, M. (1981):**

Vergleichende Untersuchungen an Buffalo-Green-Monkey (BGM) – Zellen und Mäusen zur Isolierung von *Chlamydia psittaci* aus Kot und Organproben aus Vögeln. *Zentralblatt für Veterinärmedizin*, **B 28**: 301-309.

**ARZEY, G.G. und ARZEY, K.E. (1990):**

Chlamydiosis in layer chickens. *Australian Veterinary Journal*, **67**: 461.

**ATEF, M., EL-BANNA, H. A., ABD EL-ATY, A. M., GOUDAH, A. (2002):**

Pharmacokinetics of difloxacin in goats. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, **109**: 320-323.

**AUCOIN, D.P. (1989):**

Enrofloxacin the first veterinary quinolone antibacterial. *Veterinary Messenger*, **2**: 10-12.

**BARR, D. A., SCOTT, P. C., O'ROURKE, M. D., COULTER, R. J. (1986):**

Isolation of *Chlamydia psittaci* from commercial broiler chickens. *Australian Veterinary Journal*, **63**: 377-378.

**BAUMGARTNER, R., ISENBÜGEL, E. (1998):**

Wellensittiche. In K. Gabrisch & P. Zwart (Hrsg.), *Krankheiten der Heimtiere* (S. 429-486). Hannover: Schlütersche & Co.

**BAYER Health Care (2006):**

Produktinformation von Baytril. Verfügbar unter:  
<http://www.baytril.com/7/Chemistry.htm>

**BECKER, W. und MENK, W. (1992):**

Chlamydien-Infektion. In W. Becker & W. Menk. (Hrsg.), *Zoonosen-Fibel: Zwischen Tier und Mensch übertragbare Infektionskrankheiten*. 3. Auflage. (S. 69-74). Berlin: Hoffmann Verlag.

**BEDSON, S. P. und BLAND, J. O. W. (1932):**

A morphological study of the psittacosis virus, with a description of the developmental cycle. *British Journal of Experimental Pathology*, **13**: 461-466.

**BEHR, K. P. (1986)**

*Untersuchungen zur Verträglichkeit und Kompatibilität von Bay VP 2674 (Baytril®) bei gesunden jungen Puten und zur Wirksamkeit nach experimenteller Mycoplasma gallisepticum-Infektion*. Veterinärmedizinische Dissertation, Hannover.

**BINET, R. und MAURELLI, A. T. (2005)**

Frequency of spontaneous mutations that confer antibiotic resistance in *Chlamydia* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **49**: 2865-2873.

**BOGNER, K.H., DÜNNINGER, A., KALETA, E.F. (1997):**

Nachweis von Chlamydien bei Psittaziden aus Tupferproben mit verschiedenen Methoden. *AVID-Mitteilungen II, Anlage 10*: 1-7.

**BÖNNER, B. M. (2006):**

Isolation und Identifikation von *Chlamydia (Chlamydophila) psittaci* aus einem Peckingentenbestand. Veterinärmedizinische Dissertation, Gießen.

**BONOMO, R. A., AUCOTT J., SALATA, R. A. (1997):**

Oral antibiotics in the nineties: new drugs and new challenges in primary care. *Frontiers in Bioscience*, **2**: e63-71.

**BOVARNICK, M. R., MILLER, J. C., SNYDER, J. C. (1950):**

The influence of certain salts, amino acids, sugars, and proteins on the stability of rickettsiae. *Journal of Bacteriology*, **59**: 509-22.

**BOWIE, W. R., LEE, C. K., ALEXANDER, E. R. (1978):**

Prediction of efficacy of antimicrobial agents in treatment of infections due to *Chlamydia trachomatis*. *Journal of Infectious Diseases*, **138**: 655-659.

**BOWIE, W. R., MANZON, L. M., BORRIE-HUME, C. J., FAWCETT, A., JONES, H. D. (1982):**

Efficacy of treatment regimens for lower urogenital *Chlamydia trachomatis* infection in women. *American Journal of Obstetrics and Gynaecology*, **142**: 125-129.

**BOWIE, W. R., LEE, C. K., ALEXANDER, E. R. (1987):**

*In vitro* activity of Ro 15-8074, Ro 19-5247, A-56268, and roxithromycin (RU 28965) against *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **31**: 470-472.

**BRAND, C. J. (1989):**

Chlamydial infections in free-living birds. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **195**: 1531-1535.

**BROWN, S. A. (1996):**

Fluoroquinolones in animal health. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **19**: 1-14.

**BURROWS, G. E. (1980):**

Pharmacotherapeutics of macrolides, lincomycins and spectomycin. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **176**: 1072-1077.

**BUTAYE, P., DUCATELLE, R., DE BACKER, P., VERMEERSCH, H., REMON, J. P., HAESBROUCK, F. (1997):**

*In vitro* activities of doxycycline and enrofloxacin against *Chlamydia psittaci* strain from turkeys. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **41**: 2800-2801.

**CAESAR, M. und STILLE, W. (1984):**

*Die Chemotherapeutika der Nalidixinsäure-Gruppe. Eine Dokumentation.* München, Berlin und Wien: Zuckschwerdt.

**CALDWELL, H. D. und SCHACHTER, J. (1982):**

Antigenic analysis of the major outer membrane protein of *Chlamydia* spp. *Infection and Immunity*, **35**: 1024-31.

**CASTAÑEDA, M. R. C. (1930):**

A new stain for Rickettsia bodies. *Journal of Infectious Diseases*, **47**: 416-417.

**CORSACO, D. und VENDITTI, D. (2004):**

Emerging chlamydial infections. *Critical Reviews in Microbiology*, **30**: 75-106.

**CRITCHLEY, I. A., JONES, M. E., HEINZE, P. D., HUBBARD, D., ENGLER, H. D., EVANGELISTA, A. T., THORNSBERRY, C., KARLOWSKY, J. A., SAHM, D. F. (2002):**

*In vitro* activity of levofloxacin against contemporary clinical isolates of *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* from North America and Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, **8**: 214.

**DEMANUELLE, T. C., IHRKE, P. J., BRANDT, C. M., KASS, P. H., VULLIET, P. R. (1998):**

Determination of skin concentrations of enrofloxacin in dogs with pyoderma. *American Journal of Veterinary Research*, **59**: 1599-1604.

**DONATI, M., POLLINI, G. M., SPARACINO, M., FORTUGNO, M. T., LAGHI, E., CEVENINI, R. (2002):**

Comparative *in vitro* activity of garenoxacin against *Chlamydia* spp. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **50**: 407-10.

**DORRESTEIN, G. M. und VERBURG, E. (1988):**

*Pharmakokinetik von Baytril® bei Brieftauben bei verschiedenen Applikationsformen.* DVG, VI. Tagung über Vogelkrankheiten, München 3. / 4.03.1988.

**DORRESTEIN, G. M. und KUMMERFELD, N. (1995):**

Singvögel. In K Gabrisch & P Zwart (Hrsg.), *Krankheiten der Heimtiere* (S. 327-396). Hannover: Schlütersche Verlagsanstalt und Druckerei.

**DYER, D. C. (1988):**

Pharmacokinetics of chlortetracycline in the turkey: Evaluation of biliary secretion. *American Journal of Veterinary Research*, **49**: 36-37

**EASMON, C.S.F. und CRANE, J.P. (1985):**

Uptake of ciprofloxacin by human neutrophils. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **16**: 67-73.

**EMEA, Committee for Veterinary Medicinal Products (1995):** *Oxytetracycline, Tetracycline, Chlortetracycline. Summary Report.* European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, London, from <http://www.emea.eu.int>

**EMA, Committee for Veterinary Medicinal Products (1997):**

*Erythromycin - Erythromycin thiocyanate - Erythromycin stearate. Summary Report.* European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, London, from <http://www.emea.eu.int>

**EMA, Committee for Veterinary Medicinal Products (2000):**

*Difloxacin (extension to swine and cattle). Summary Report.* The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, London (GB), from <http://www.emea.europa.eu/pdfs/vet/mrls/052598en.pdf>

**ESTLER, C. J. (Hg.) (2000):**

*Pharmakologie und Toxikologie.* 5. Auflage, Stuttgart: Schattauer.

**EVERETT, K. D. E. und ANDERSEN, A. A. (1997):**

The ribosomal intergenic spacer and domain I of the 23S rRNA gene are phylogenetic markers for *Chlamydia* spp. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **47**: 461-473.

**EVERETT, K. D. E., BUSH, R. M., ANDERSEN, A. A. (1999):**

Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **49**: 415-440.

**EVERETT, K. D. E., HORNING, L. J., ANDERSEN, A. A. (1999a):**

Rapid detection of the *Chlamydiaceae* and other Families in the order *Chlamydiales*: Three PCR Tests. *Journal of Clinical Microbiology*, **37**: 575-580.

**EWIG, S., REINERT, R. R., WIEDEMANN, B., MEHL, M., RODLOFF, A. C., TRAUTMANN, M., PLETZ, M. W., LODE, H., KARDOS, P., SHAH, P., KRESKEN, M. (2001):**

Antibiotika-Resistenz bei Erregern ambulant erworbener Atemwegsinfektionen. *Chemotherapie Journal*, **11**:12-26.

**FAILING, K., THEIS, P., KALETA, E. F. (2006):**

Determination of the inhibitory concentration 50 % (IC<sub>50</sub>) of four selected drugs (chlortetracycline, doxycycline, enrofloxacin and difloxacin) that reduce *in vitro* the multiplication of *Chlamydophila psittaci*. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, **113**: 412-417.

**FERNANDES, P. B., CHU, D. T. W., BOWER, R. R., JARVIS, K. P., RAMER, N. R., SHIPKOWITZ, N. (1986):**

*In vitro* evaluation of A-56619 (difloxacin) and A-56620: new aryl-fluoroquinolones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **29**: 201-208.

**FLAMMER, K., WHITT-SMITH, D., PAPICH, M. (2001):**

Plasma concentrations of doxycycline in selected psittacine birds when administered in water for potential treatment of *Chlamydophila psittaci* infection. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, **15**: 276-282.

**FINLAYSON, J., BUXTON, D., ANDERSON, I. E., DONALD, K. M. (1985):**

Direct immunoperoxidase method for demonstration of *Chlamydia psittaci* in tissue sections. *Journal of Clinical Pathology*, **38**: 712-714.

**FITZGEORGE, R. B., LEVER, S., BASKERVILLE, A. (1993):**

A comparison of the efficacy of azithromycin and clarithromycin in oral therapy of experimental airborne Legionnaires' disease. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **31**: 171-176.

**FLAMMER, K., CASSIDY, D. R., LANDGRAF, W. W., ROSS, P. F. (1989):**

Blood concentrations of chlortetracycline in macaws fed medicated pelleted feed. *Avian Diseases*, **33**:199-203.

**FORTH, W., HENSCHLER, D., RUMMEL, W. (1990):**

*Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie, Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker.* 5. Auflage. Deutschland: Wissenschaftsverlag.

**FREY, H. H. und LÖSCHER, W. (1996):**

Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin. Stuttgart: Verlag Enke.

**FRIMMER, M. (1986):**

Pharmakologie und Toxikologie. *Ein Lehrbuch für Veterinärmediziner und Naturwissenschaftler.* Stuttgart: Schattauer Verlag.

**FRITZSCHE, K. und GERRIETS, E. (1962):**

Ornithose und Psittakose. In K. Fritzsche, und E. Gerriets E. (Hrsg.), *Geflügelkrankheiten. Lehrbuch für Tierärzte und Studierende der Veterinärmedizin.* (S. 191-206). Berlin und Hamburg: Paul Parey Verlag.

**FUKUSHI, H. und HIRAI, K.(1992):**

Proposal of *Chlamydia pecorum* sp. Nov. for *Chlamydia* strains derived from ruminants. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **42**: 306-308.

**GEENS, T., DESPLANQUES, A., VAN LOOCK, M., BÖNNER, B. M., KALETA, E. F., MAGNINO, S., ANDERSEN, A. A., EVERETT, K. D. E., VANROMPAY, D. (2005):**

Sequencing of the *Chlamydophila psittaci* ompA gene reveals a new genotype, E/B, and the need for a rapid discriminatory genotyping method. *Journal of Clinical Microbiology*, **43**: 2456-2461.

**GERBERMANN, H. und ERBER, M. (1985):**

*Nachweis von Chlamydia psittaci in Zellkulturen – eine Alternative zum Mäuseinfektionsversuch für die Routinediagnostik.* DVG, IV. Tagung Krankheiten der Vögel; München, 7./8.03.1985, 92-100.

**GERBERMANN, H. (1998):**

*Psittakose – Probleme bei der Bekämpfung.* DVG, Tagung / Fachgruppe Tierseuchen; Hannover, 18./19.07.

**GERLACH, H. (1994):**

Chlamydia. In B. W. Ritchie, G. J. Harrison & L. R. Harrison (Eds.), *Avian Medicine: Principles and Application* (p.p. 984-966). Florida: Wingers.

**GIEMSA, G. (1902):**

Färbemethoden für Malariaparasiten. *Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten*, I. Abteilung, Originale, **32**: 307-313.

**GIMENEZ, D. F. (1964):**

Staining Rickettsiae in yolk sac cultures. *Stain Technology*, **39**: 135-140.

**GOUDAH, A., ABO EL-SOUD, K., ABD EL-ATY, A. M. (2004):**

Pharmacokinetics and tissue residue profiles of erythromycin in broiler chickens after different routes of administration. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, **111**: 162-165.

**GRATZL, E. und KÖHLER, H. (1968):**

*Spezielle Pathologie und Therapie der Geflügelkrankheiten*. Stuttgart: Enke-Verlag.

**GRAYSTON, J. T. (1989):**

*Chlamydia pneumoniae* sp. nov. for *Chlamydia* sp. Strain TWAR. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **39**: 88-90.

**GRIMES, J. E. und WYRICK, P. B. (1991):**

*Chlamydiosis (Ornithosis)*. In B. W. Calnek, H. J. Barnes, C. W. Beard, W. M. Reid, & H. W. Yoder Jr (Eds.), *Diseases of Poultry* (9th Edition, pp. 311-325). Ames: Iowa State University Press.

**GYLSTORFF, I. und GRIMM, I. (1998):**

*Vogelkrankheiten*. 2. Auflage. Stuttgart: Ulmer Verlag.

**HACKSTADT, T. (1986):**

Identification and properties of chlamydial polypeptides that bind eukaryotic cell surface components. *Journal of Bacteriology*, **165**: 13-20.

**HAFEZ, H. (2003):**

Psittakose / Ornithose. In E. F. Kaleta und M. Krautwald-Junghanns (Hrsg.), *Kompendium der Ziervogelkrankheiten* (2. Auflage, S. 249-256). Hannover: Schlütersche GmbH & Co.

**HAHN, H. (1986):**

Kurzmitteilung über den Einfluß von Chinolon-Abkömmlingen auf das Immunsystem. *Infection*, **14**: 219.

**HAIGHT, T. H. und FINLAND, U. M. (1952):**

Observations on mode of action of erythromycin. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **81**: 188-193.

**HARRISON, G. J., (1989):**

A practitioner's view of the problem of avian chlamydiosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **195**: 1929-1928.



**HATT, J. M. und WENKER, C. (2005):**

Papageien und Sittiche. In K. GABRISCH und P. ZWART (Hrsg.), *Krankheiten der Heimtiere*. 6. Aufl. (S. 519). Hannover: Schlütersche Verlaganstalt und Druckerei.

**HEIDENREICH, M. (1996):**

*Greifvögel: Krankheiten, Haltung, Zucht*. Berlin: Blackwell Wissenschafts-Verlag.

**HENNING, K. (1985):**

*Antibiotikumempfindlichkeit und Resistenzbildung bei Chlamydien unter besonderer Berücksichtigung der Empfindlichkeit von Chlamydia psittaci gegen Doxycyclin*. Veterinärmedizinische Dissertation, Gießen.

**HENNING, K. und KRAUSS, H. (1986):**

Zur Methodik der Bestimmung der Antibiotikumempfindlichkeit von Chlamydien *in vitro*. *Journal of Veterinary Medicine*, 447-461.

**HENNING, K. und KRAUSS, H. (1986a):**

Felduntersuchung zur Frage einer Resistenzbildung von *Chlamydia psittaci* gegen Tetracykline. *Berliner und Münchner Tierärztliche Wochenschrift*, **99**: 381-382.

**HEWINSON, R. G., RANKIN, S. E. S., BEVAN, B. J., FIELD, M. E., WOOKWARD, M. J. (1991):**

Detection of *Chlamydia psittaci* from avian field samples using the PCR. *The Veterinary Record*, **128**: 129-130.

**HILBRICH, P. (1978):**

Ornithose – Psittakose – Miyagawanellöse – Chlamydiosis. In P. Hilbrich (Hrsg.), *Krankheiten des Geflügels unter besonderer Berücksichtigung der Haltung und Fütterung*. (S. 215-217). Villingen-Schwenningen: Verlag Hermann Kuhn.

**HIRAI, K. und UNE, T. (1986):**

Antichlamydial activity of ofloxacin. *Microbiology Immunology*, 30: 445-450.

**HOLZINGER, H. A. M. (1996):**

*Nachweis von Chlamydia sp. bei klinisch gesunden, freilebenden Meisen (Paridae)*. Veterinärmedizinische Dissertation, Gießen.

**HUHN, A. (1991):**

Untersuchungen zur Optimierung der Anzüchtung und Antigenproduktion von *Chlamydia psittaci* in Zellkulturen. Veterinärmedizinische Dissertation, Gießen.

**ILLNER, F. (1962):**

Zur Frage der Übertragung des Ornithosevirus durch das Ei. *Monatshefte für Veterinärmedizin*, **17**: 116-117.

**INNIS, M. A. und GELFAND, D. H. (1990)**

PCR protocols: A guide to methods and applications, Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J. (Eds.). San Diego, Academic Press, Inc., pp. 3-12.

**INUI, T., TAIRA, T., MATSUSHITA, T., ENDO, T. (1998):**

Pharmacokinetic properties and oral bioavailabilities of difloxacin in pig and chicken. *Xenobiotica*, **28**: 887-893.

**IQBAL, Z. und RIKIHISA, Y. (1994):**

Reisolation of *Ehrlichia canis* from blood and tissues of dogs after doxycycline treatment. *Journal of Clinical Microbiology*, **32**: 1644-1649.

**JACOBSON, E. R. und TELFORD, S. R. (1990):**

Chlamydial and poxvirus infections of circulating monocytes of a flap-necked chameleon (*Chamaeleo dilepis*). *Journal of Wildlife Diseases*, **26**: 572-577.

**JONES, R.B., VAN DER POL., B., MARTIN, D. H., SHEPARD, M. K. (1990):**

Partial characterization of *Chlamydia trachomatis* isolates resistant to multiple antibiotics. *Journal of Infectious Diseases*, **162**: 1309-1315.

**JUNG, C. (1994):**

Untersuchungen zu Akzeptanz, Pharmakokinetik und Verträglichkeit von Enrofloxacin bei Psittaziden sowie zur Frage der therapeutischen Wirksamkeit bei einer experimentellen Infektion mit *Chlamydia psittaci*. Veterinärmedizinische Dissertation, Gießen.

**KALETA, E. F. (1997):**

Aktuelle Fragen der Diagnose und Bekämpfung der Psittakose. *Tierärztliche Praxis* **26**: 295-301.

**KALETA, E. F. und TADAY, E. M. A. (2003):**

Avian host range of *Chlamydophila* spp. based on isolation, antigen detection and serology. *Avian Pathology*, **32**: 435-462.

**KALTENBOECK, B., KOUSOULAS, K. G., STORZ, J. (1991):**

Detection and strain differentiation of *Chlamydia psittaci* mediated by a two-step polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, **29**: 1969-1975.

**KALTENBOECK, B., KOUSOULAS, K. G., STORZ, J. (1992):**

Two-step polymerase chain reactions and restriction endonuclease analyses detect and differentiate ompA DNA of *Chlamydia* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, **30**: 1098-1104.

**KALTENBOECK, B., SCHMEER, N., SCHNEIDER, R. (1997):**

Evidence for numerous omp 1 alleles of porcine *Chlamydia trachomatis* and novel Chlamydia species obtained by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, **35**: 1835-1841.

**KAPUSNIK-UNER, J. E., SANDE, M. A., CHAMBERS, H. F. (1995):**

Antimicrobial agents: tetracyclines, chloramphenicol, erythromycin, and miscellaneous antibacterial agents. In J. G. Hardman & L. E. Limbird (Eds.), *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (pp 1123-1153). New York: McGraw-Hill.

**KESHISHYAN, H., HANNA, L., JAWETZ, E. (1973):**

Emergence of rifampin-resistance in *Chlamydia trachomatis*. *Nature*, **244**: 173-174.

**KÖHLER, G. (1996):**

*Krankheiten der Reptilien und Amphibien*. Stuttgart: Eugen Ulmer Verlag.

**KOJDA, G. (2002):**

*Pharmakologie/Toxikologie systematisch*. 2. Auflage. Bremen: UNI-MED.

**KRAUSS, H. (1980):**

Rickettsien und Chlamydieninfektionen – Neue Verfahren in der Laboratoriumsdiagnostik. ATF – 2. Seminar Fachgr. Virologie und Viruskrankh. 11. und 12. Nov. 1980 Marburg / Lahn, 131-144.

**KRAUSS, H., und SCHMEER, N. (1992):**

Aviäre Chlamydiose. In G. Heider und G. Monreal (Hrsg.), *Krankheiten des Wirtschaftsgeflügels* (S. 277-308). Stuttgart: Gustav Fischer Verlag Jena.

**KREBSZ, P. (1995):**

*Die Erforschungsgeschichte der Ornithosen*. Marburger Schriften zur Medizingeschichte, Band 32, Verlag Peter Lang.

**KROKER, R. (1999):**

Pharmaka zur Behandlung und Verhütung bakterieller Infektionen. In W. Löscher, F. R. Ungemach & R. Kroker (Hrsg.), *Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren* (S. 211-246). Berlin: Parey.

**KROKER, R. (2003):**

Auswahlkriterien für ein geeignetes Antibiotikum. In W. Löscher, F. R. Ungemach & R. Kroker (Hrsg.), *Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren* (S. 211-214). Berlin: Blackwell Verlag GmbH.

**KUO, C. C., WANG, S. P., GRAYSTON, J. T. (1977):**

Antimicrobial activity of several antibiotics and a sulfonamide against *Chlamydia trachomatis* organisms in cell culture. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **12**: 80-83.

**KUO, C., JACKSON, L. A., LEE, A., GRAYSTON, J. T. (1996):**

*In vitro* activities of azithromycin, clarithromycin, and other antibiotics against *Chlamydia pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **40**: 2669–2670.

**LACZAY, P., SEMJEN, G., LEHEL, J., NAGY, G. (2001):**

Pharmacokinetics and bioavailability of doxycycline in fasted and nonfasted broiler chickens. *ACTA Veterinaria Hungarica*, **49** :31-37.

**LEE, C. K., BOWIE, W. R., ALEXANDER, E. R. (1978):**

*In vitro* assays of the efficacy of antimicrobial agents in controlling *Chlamydia trachomatis* propagation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **13**: 441-445.

**LEFEVRE, J. C. und LEPARGUEUR, J. P. (1998):**

Comparative *in vitro* susceptibility of a tetracycline-resistant *Chlamydia trachomatis* strain isolated in Toulouse (France). *Sexually Transmitted Diseases*, **25**: 350-352.

**LEHNERT, C. (1962):**

Zur Frage der Übertragung des Ornithosevirus über das Brutei bei Enten. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, **75**: 151-152.

**LEIBOWITZ, L. (1989):**

Chlamydiosis: an newly reported serious disease of larval and postmetamorphic bay scallops (*Argopecten irradians*). *Journal of Fish Diseases*, **12**: 125-136.

**LENART, J., ANDERSEN, A. A., ROCKEY, D. D. (2001):**

Growth and development of tetracycline-resistant *Chlamydia suis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **45**: 2198-2203.

**LIEBOWITZ, L. D., SAUNDER, J., FEHLER, G., BALLARD, R., KOORNHOF, H. J. (1986):**

*In vitro* activity of A-56619 (difloxacin), A-56620, and other new quinolone antimicrobial agents against genital pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **30**: 948-950.

**LINDENSTRUTH, H. (1992):**

Feldversuch zur Wirksamkeits- und Verträglichkeitsprüfung von Baytril<sup>®</sup> bei importierten Psittaciden im Rahmen der staatlichen Psittakoseprophylaxe und -therapie. Veterinärmedizinische Dissertation, Gießen.

**LINDENSTRUTH, H. und FROST, J.W. (1993):**

Enrofloxacin (Baytril<sup>®</sup>) – eine Alternative in der Psittakoseprophylaxe und -therapie bei importierten Psittaciden. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, **100**: 364-368.

**LÖSCHER, W., UNGEMACH, F.R., KROKER, R. (2002):**

*Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren*. Berlin: Parey.

**LÜTHGEN, W. (1972):**

Aktuelle Fragen zur Ornithose/Psittakosebekämpfung. *Ärztliche Praxis*, **24**: 2298-2302 und 2345-2353.

**MACHIAVELLO, A. M. (1937):**

Estudios sobre tifos exantimático. II. Un nuevo método para teñir Rickettsia. *Revista Chilena Higiene e Medicina Preventiva*, **1**: 101-106.

**MALAY, S., ROBLIN, P. M., REZNIK, T., KUTLIN, A., HAMMERSCHLAG, M. R. (2002):**

*In vitro* activities of BMS-284756 against *Chlamydia trachomatis* and recent clinical isolates of *Chlamydia pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **46**: 517-518.

**MALIK, H. (1989):**

Baytril<sup>®</sup> (Enrofloxacin): Ein neuartiges Antifektivum für die Veterinärmedizin. *Vet.* **9**: 17-20.

**MANDELL, G. L. und PETRI, W. A. (1995):**

Antimicrobial Agents: Sulfonamides, Trimethoprim-Sulfamethoxazole, Quinolones,

and Agents for Urinary Tract Infections. In J. G. Hardman & L. E. Limbird (Hrsg.), *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (pp. 1057-1072). New York: McGraw-Hill.

**MCCLLENAGHAN, M., HERRING, A. J., AITKEN, I. D., HONEYCOMBE, I. D. (1986):**

Some comparative biochemical studies on *Chlamydia psittaci* strains of ovine and avian origin. In I. D. Aitken (Ed.), *Chlamydial diseases of ruminants* (pp. 139-147). Commission of the European Communities.

**MCDONALD, S. E. (1989):**

Summary of medications for use in psittacine birds. *Journal of the Association of Avian Veterinarians*, **3**: 120-127

**MCELNEA, C. L. und CROSS, G. M. (1999):**

Methods of detection of *Chlamydia psittaci* in domesticated and wild birds. *Journal of Australian Veterinary*, **77**: 516-521.

**MCEVOY, G. K. (Ed.) (1992):**

American Hospital Formulary Service Drug Information (AHFS). Bethesda.

**MEISSLER, M.. (1980):**

Untersuchung zum Nachweis von Chlamydien in der Zellkultur. Veterinärmedizinische Dissertation, Gießen.

**MEISSLER, M. und KRAUSS, H. (1980):**

Zur Technik der Isolierung und Züchtung von Chlamydien in der Zellkultur. *Fort-schritte in der Veterinärmedizin*, **30**: 224-230.

**MESSMER, T. O., SKELTON, S. K., MORONEY, J. F., DAUGHARTY, H., FIELDS B. S. (1997):**

Application of a nested, multiplex PCR to psittacosis outbreaks. *Journal of Clinical Microbiology*, **35**: 2043-2046.

**MEYER, K. F. (1967):**

The host spectrum of psittacosis-lymphogranuloma venereum (PL) agents. *American Journal of Ophthalmology*, **63**: 1225-1246.

**MIYASHITA, N., FUKANO, H., YOSHIDA, K., NIKI, Y., MATSUSHIMA, T. (2003):**

*In vitro* activity of cethromycin, a novel antibacterial ketolide, against *Chlamydia pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **52**: 497-499.

**MORONEY, J. F., GUEVARA, R., IVERSON, C., CHEN, F. M., SKELTON, S. K., MESSMER, T. O., PLIKAYTIS, B., WILLIAMS, P. O., BLAKE, P., BUTLER, J. C. (1998):**

Detection of chlamydiosis in a shipment of pet birds, leading to recognition of an outbreak of clinically mild psittacosis in humans. *Clinical Infectious Diseases*, **26**: 1425-1429.

**MOULDER, J. W. (1984):**

Chlamydiales. In N. R. Krieg & M. D. Baltimore (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore/London: Williams & Wilkins.

**MOURAD, A., SWEET, R.L., SUGG, N., SCHACHTER, J. (1980):**

Relative resistance to erythromycin in *Chlamydia trachomatis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **18**: 696-698.

**MÜHLHARDT, C. (2002):**

PCR. In C. Mühlhardt, *Der Experimentator: Molekularbiologie / Genomics*. 3. Auflage, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.

**MUTSCHMANN, F. (1998):**

Detection of *Chlamydia psittaci* infections in amphibians using an immunofluorescence test. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, **111**: 187-189.

**NAKAMURA, S. (1995):**

Veterinary use of new quinolones in Japan. *Drugs*, **49**: 152-158.

**NAKATA, K., MATSUI, T., MIYAZAKI, S., ARAKAWA, S., ISHIGAMI, J., KAMIDONO, S. (1994):**

*In vitro* and *in vivo* activities of sparflaxacin against *Chlamydia trachomatis*. 10th International AIDS Conference. **7-12**; 10:270, 1994, Kobe University, Japan.

**NAUMANN, P. und DOPP, C. (1989):**

Fluorochinolone - antibakterielle Aktivität, Pharmakokinetik und Indikationen einer neuen Gruppe von Chemotherapeutika. *Internist*, **30**: 20-31.

**NEWCOMER, C. E., ANVER, M. R., SIMMONS, J. L., WILCKE, B. W. JR., NACE, G. W. (1982):**

Spontaneous and experimental infections of *Xenopus laevis* with *Chlamydia psittaci*. *Laboratory Animal Science*, **32**: 680-686.

**NEWTON, C.R. und GRAHAM, A.(1994):**

PCR. Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.

**NORD, C. E. (1988):**

Effect of new quinolones on the human gastrointestinal microflora. *Reviews of Infectious Diseases*, **10**: 193-196.

**NOTOMI, T., IKEDA, Y., NAGAYAMA, A. (1999):**

Minimum inhibitory and minimal lethal concentration against *Chlamydia trachomatis* dependent on the time of addition and the duration of the presence of antibiotics. *Chemotherapy*, **45**: 242-248.

**NÜCHTER, H. (2004):**

Nachweis von *Chlamydophila psittaci* in unterschiedlichen Bereichen in zwei Hähnchen- und zwei Putenschlachtereien mittels direkter Immunfluoreszenz nach Erregeranzüchtung in Buffalo-Green-Monkey-Kidney-Zellkulturen sowie der Polymerase-Ketten-Reaktion mit anschließender Restriktionsenzymanalyse. Veterinärmedizinische Dissertation, Gießen.

**OLCHOWY, T. W., TERHUNE, T. N., HERRICK, R. L. (2000):**

Efficacy of difloxacin in calves experimentally infected with *Mannheimia haemolytica*. *American Journal of Veterinary Research*, **6**: 710-713.

**OLSEN, B., PERSSON, K., BROHOLM, K. A. (1998):**

PCR detection of *Chlamydia psittaci* in faecal samples from passerine birds in Sweden. *Epidemiology and Infection*, **121**: 481-484.

**OSATO, M. S., REDDY, R., GRAHAM, D. Y. (1999):**

Metronidazole and clarithromycin resistance amongst *Helicobacter pylori* isolates from a large metropolitan hospital in the United States. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **12**: 341-347.

**PAGE, L. A. (1966):**

Revision of the family Chlamydiaceae Rake (Rickettsiales): Unification of genus Chlamydia Jones, Rake and Stearns 1945. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **16**: 223-253.

**PAGE, L. A. (1971):**

Influence of temperature on the multiplication of Chlamydiae in chicken embryos. *Trachoma and Related Disorders*. Amsterdam and New York: Exerpta Medica.

**PAGE, L. A. und GRIMES, J. E. (1984):**

Avian Chlamydiosis (Ornithosis). In M. S. Hofstad, H. J. Barnes, B. W. Calnek, W. M. Yoder and Jr. H. W. Yoder (Eds.), *Diseases of Poultry*. 8<sup>th</sup> Edition. (S. 283-308). Ames: Iowa State University Press.

**PATON, J. H. und REEVES, D. S. (1988)**

The fluoroquinolone antibiotics, microbiology, pharmacokinetics and clinical use. *Drugs*, **36**: 193-228.

**PEES, M. (2004):**

Leitsymptome bei Papageien und Sittichen. Stuttgart: Enke Verlag.

**PLUMB, D. C. (1999):**

Veterinary Drug Handbook. White Bear Lake: PharmaVet Publishing.

**PSCHYREMBEL, W. (1994):**

Klinisches Wörterbuch, 257. Auflage. Berlin, New York: Gruyter.

**RETTIG, P. J., ROLLERSON, W. J., MARKS, M. I. (1986).**

*In vitro* activity of six fluoroquinolones against *Chlamydia trachomatis*. In D. ORIEL, G. L. RIDGWAY, J. SCHACHTER, D. TAYLOR-ROBINSON und M. Ward, *Chlamydial infections* (528-531). England: Cambridge University Press.

**RIDGWAY, G. L., OWEN, G. M., ORIEL, J. D. (1978).**

The antimicrobial susceptibility of *Chlamydia trachomatis* in cell culture. *British Journal of Venereal Diseases*, **54**: 103-106.

**RIOND, J. L. und RIVIERE, J. E. (1988).**

Pharmacology and Toxicology of Doxycycline. *Veterinary and Human Toxicology*, **30**: 43.

**RIVIERE, J. E. und SPOO, J. W. (1995):**

Tetracycline antibiotics. In H. R. Adams (Ed.), *Veterinary Pharmacology and Therapeutics* (pp. 784-796). Ames: Iowa State University Press.

**ROBLIN, P. M. und HAMMERSCHLAG, M. R. (2000):**

*In vitro* activity of GAR-936 against *Chlamydia pneumoniae* and *Chlamydia trachomatis*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **16**: 61–63.

**RODOLAKIS, A. (1987):**

Experimental models in chlamydiosis. *Annales de Recherches Veterinaires*, **18** : 345-354.

**ROLLE, M. und MAYR, A. (1993):**

Chlamydia. In A. Mayr, B. Gedek, O.-R. Kaaden & H. Mahnel (Hrsg.), *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre* (6. Auflage, S. 679-690). Stuttgart: Enke Verlag.

**ROSIN, H. und HENSCHLER, D. (1998):**

Antibiotika und Chemotherapeutika. In W. Forth, D. Henschler und W. Rummel (Hrsg.), *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie* (7. Auflage, S. 677-787). Mannheim: Wissenschaftsverlag Bibliograph.

**RÜBEL, A. und ISENBÜGEL, E. (1995):**

Papageien und Sittiche. In K. Gabrisch & P. Zwart (Hrsg.), *Krankheiten der Heimtiere* (S. 521-522). Hannover: Schlütersche Verlagsanstalt und Druckerei.

**RÜBEL, A. und ISENBÜGEL, E. (1998):**

Papageien und Sittiche. In K. Gabrisch & P. Zwart (Hrsg.), *Krankheiten der Heimtiere* (S. 487-568). Hannover: Schlütersche Verlagsanstalt und Druckerei.

**RÜBEL, A. und ISENBÜGEL, E. (2001):**

Papageien und Sittiche. In K. Gabrisch & P. Zwart (Hrsg.), *Krankheiten der Heimtiere* (5. Auflage, S. 521-522). Hannover: Schlütersche GmbH & Co.

**RULLOF, R. (1990):**

Einfluß von Baytril auf die Fruchtbarkeit von Zuchttauben und auf die Entwicklung von zwei Nachkommengenerationen. *DVG, VII. Tagung über Vogelkrankheiten*, München, 1./03.1990, 104-113.

**SACHSE, K. und GROßMANN, E. (2002):**

Chlamydienerkrankungen der Nutz- und Haustiere - Zoonotisches Potential der Erreger und diagnostische Fragen. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, **109**: 142-148.

**SACHSE, K. und HOTZEL, H. (2003):**

Detection and differentiation of Chlamydiae by nested PCR. *Methods in Molecular Biology*, **216**: 123-136.

**SANDERS, L. L., HARRISON, H. R., WASHINGTON, A. E. (1986):**

Treatment of sexually transmitted chlamydial infections. *Journal of American Medical Association*, **255**: 1750-1756.

**SANTOS, M. D., VERMEERSCH, H., REMON, J. P., SCHELKENS, M., DE BACKER, P., DUCATELLE, R., HAESBROUCK, F. (1997):**



Administration of doxycycline hydrochloride via drinking water to turkeys under laboratory and field conditions. *Poultry Science*, **76**:1342-8

**SATALOWICH, F. T., BARRETT, L., SINCLAIR, C., SMITH, K. A., WILLIAMS, L. P. (1994):**

Compendium of chlamydiosis (psittacosis) control. *Journal of American Veterinary Medical Association*, **203**: 1673-1680.

**SCHEER, M. (1987):**

Wirkstoffkonzentrationen von Baytril® im Serum und in Geweben nach oraler und parenteraler Applikation. *Veterinary Medical Review*, **2**,104 118.

**SCHIEFER, H. G. und KRAUSS, H. (1982):**

Pathogenicity of chlamydia. Findings in human medicine. *Münchener Medizinische Wochenschrift*, **124**: 123-126.

**SCHOLZ, S. R. (1978):**

Die Verbreitung, Bedeutung und diagnostische Nachweisbarkeit von Chlamydieninfektionen bei Tieren (mit Ausnahme der Vögel). Veterinärmedizinische Dissertation, Hannover.

**SEGRETI, J., KESSLER, H. A., KAPPELL, K. S., TRENHOLME, G. M. (1987):**

*In vitro* activity of A-56268 (TE-031) and four other antimicrobial agents against *Chlamydia trachomatis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **31**: 100-101.

**SELBITZ, H. J. (1992):**

Chlamydiales. In *Lehrbuch der veterinärmedizinischen Bakteriologie*. (S. 251-256). Jena: Fischer Verlag.

**SHAW, D. H. und RUBIN, S. I. (1986):**

Pharmacologic activity of doxycycline. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **189**: 808-810.

**SHEWEN, P. E. (1980):**

Chlamydial infection in animals: a review. *Canadian Veterinary Journal*, **21**: 2-11.

**SIMON, C. und STILLE, W (1989):**

*Antibiotika-Therapie in Klinik und Praxis*. 7. Aufl. Stuttgart, New York: Schattauer.

**SOEDARMANTO, I., SCHWARZ, S., LIEBISCH, B., LÄMMLER, C. (1995):**

Tetracycline resistance determinants among streptococci of serological group G and L. *Veterinary Microbiology*, **45**: 331-337.

**SOMANI, J., BHULLAR, V. B., WORKOWSKI, K. A., FARSHY, C. E., BLACK, C. M. (2000):**

Multiple drug-resistant *Chlamydia trachomatis* associated with clinical treatment failure. *Journal of Infectious Diseases*, **181**: 1421-1427.

**SPEARS, P. und STORZ, J. (1979):**

Biotyping of *Chlamydia psittaci* based on inclusion morphology and response to diethylaminoethyl-dextran and cycloheximide. *Infection and Immunity*, **24**: 224-32.

**SPEER, B. S., SHOEMAKER, N. B., SALYERS, A. A. (1992):**

Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. *Clinical Microbiology Reviews*, **5**: 387-399.

**SPOO, J. W. und RIVIERE, J. E. (1995):**

Chloramphenicol, Macrolides, Lincosamides, Fluoroquinolones and miscellaneous Antibiotics. In H. R. Adams (Ed.), *Veterinary Pharmacology and Therapeutics* (S 820-855). Ames: Iowa State University Press.

**STAMP, J.T., MCEWEN, A.D., WATT, J.A.A., NISBET, D.I. (1950):**

Enzootic abortion in ewes. I. Transmission of the disease. *The Veterinary Record*, **62**: 251-264.

**STORZ, J. und KRAUSS, H. (1985):**

Chlamydia. In H. Blobel und T. Schliesser (Hrsg.), *Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren* (S. 447-531). Jena: VEB Gustav Fischer Verlag.

**STRATTON-PHELPS, M., WILSON, W. D., GARDNER, I. A. (2000):**

Risk of adverse effects in pneumonic foals treated with erythromycin versus other antibiotics: 143 cases (1986-1996). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **217**: 68-73.

**STUDDERT, V. P. und HUGHES, K. L. (1992):**

Treatment of opportunistic mycobacterial infections with enrofloxacin in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **201**: 1388-1399.

**SUCHLAND, R. J., GEISLER, W. M., STAMM, W. E. (2003):**

Methodologies and cell lines used for antimicrobial susceptibility testing of *Chlamydia* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **47**: 636-42.

**SUWA, T., ANDO, S., HASHIMOTO, N., ITAKURA, C. (1990):**

Pathology of experimental chlamydiosis in chicks. *Nippon Juigaku Zasshi*, **52**: 275-83.

**TADAY, E. M. A. (1998):**

Organveränderungen und Erregernachweise nach Infektionen mit *Chlamydia* sp. beim Vogel unter besonderer Berücksichtigung des aviären Wirtsspektrums. – Eine veterinärhistorische Studie -. Veterinärmedizinische Dissertation, Gießen.

**TAPPE, J. P., ANDERSEN, A. A, CHEVILLE, N. F. (1989):**

Respiratory and pericardial lesions in turkeys infected with avian or mammalian strains of *Chlamydia psittaci*. *Veterinary Pathology*, **26**: 386-395.

**THEURETZBACHER, U. und SEEWALD, M. (1999):**

Chlamydien. In F. Vogel, U.Theuretzbacher, M.Seewald, H. W. Doerr, K. Fleischer, *Mikrobiologie im klinischen Alltag*. Stuttgart: Kohlhammer W.

**TJAM, K. H., WAGENWOORT, J. H. T., van KLINGEREN, B., PIOT, P., STOLZ, E., MICHEL, M. F. (1986):**

*In vitro* activity of the two new 4-quinolones A56619 and A56620 against *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* and *Gardnerella vaginalis*. *Journal of Clinical Microbiology*, **5**: 498-501.

**TRIBBY, I. I. E., FRIIS, R. R., MOULDER, J. W. (1973):**

Effect of chloramphenicol, rifampicin and nalidixic acid on *Chlamydia psittaci* growing in L-cells. *Journal of Infectious Diseases*, **127**: 155-163.

**UNKRIG, A. S. (1995):**

Vergleichende Untersuchung über den Nachweis von *Chlamydia psittaci* bei Psittaziden, Tauben, Puten und Hühnern mittels BGM-Zellkultur (mit GIMÉNEZ-Färbung), direkter Immunfluoreszenz an Probenmaterial sowie nach Anzüchtung in BGM-Zellkulturen mit anschließender Immunfluoreszenz. Veterinärmedizinische Dissertation, Gießen.

**VANHAECKE, E., DE BACKER, P., REMON, J. P., DEVRIESE, L. A. (1990):**

Pharmacokinetics and bioavailability of erythromycin in pigeons (*Columba livia*). *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **13**: 356-60.

**VANROMPAY, D., DUCATELLE, R., HAESBROUCK, F. (1992):**

Diagnosis of avian chlamydiosis: specificity of the modified Giménez staining on smears and comparison of the sensitivity of isolation in eggs and three different cell cultures. *Journal of Veterinary Medicine*, **39**: 105-112.

**VANROMPAY, D., DUCATELLE, R., HAESBROUCK, F., HENDRICKX, W. (1993):**

Primary pathogenicity of an european isolate of *Chlamydia psittaci* from turkey poults. *Veterinary Microbiology*, **38**: 103-13.

**VANROMPAY, D., DUCATELLE, R., HAESBROUCK, F. (1994):**

Pathogenicity for turkeys of *Chlamydia psittaci* strains belonging to the avian serovars A, B and D. *Avian Pathology*, **23**: 247-262.

**VANROMPAY, D., DUCATELLE, R., HAESBROUCK, F. (1995):**

*Chlamydia psittaci* infections: a review with emphasis on avian chlamydiosis. *Veterinary Microbiology*, **45**: 93-119.

**VANROMPAY, D., BUTAYE, P., SAYADA, C., DUCATELLE, R., HASEBROUCK, F. (1997):**

Characterization of avian *Chlamydia psittaci* strains using *omp1* restriction mapping and serovar-specific monoclonal antibodies. *Research in Microbiology*, **148**: 327-333.

**VANROMPAY, D. (2000):**

Round Table Discussion: Use of PCR testing in Diagnosis Chlamydiosis. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, **14**: 122-127.

**VERORDNUNG ZUM SCHUTZ GEGEN DIE PSITTAKOSE UND ORNITHOSE (PSITTAKOSE-VO) (1991):**

Vom 14. November 1991, zuletzt geändert am 14. Oktober 1999.

**VERORDNUNG ZUM SCHUTZ GEGEN DIE PSITTAKOSE UND ORNITHOSE (PSITTAKOSE-VO) (1991):**

Vom 31. Dezember 2005, Stand 1. August 2006.

**VILMANYI, E., KUNG, K., RIOND, J. L., TRUMPI, B., WANNER, M. (1996):**  
Clarithromycin pharmacokinetics after oral administration with or without fasting in crossbred beagles. *Journal of Small Animal Practice*, **37**: 535-539.

**WALLACE, R. J., MEIER, A., BROWN, B. A., ZHANG, Y., SANDER, P., ONYI, G. O., BÖTTGER, E. C. (1996):**

Genetic basis for clarithromycin resistance among isolates of *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **40**: 1676–1681.

**WALSH, M., KAPUS, E. W., QUINN, T. C. (1987):**

*In vitro* evaluation of CP-62993, erythromycin, clindamycin, and tetracycline against *Chlamydia trachomatis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **31**: 811–812.

**WARD, M. E. (1983):**

Chlamydial classification, development and structure. *British Medical Bulletin*, **39**: 109-115.

**WARD, M. E. und MURRAY, A. (1984)**

Control mechanism governing the infectivity of *Chlamydia trachomatis* for HeLa cells: Mechanism of endocytosis. *Journal of General Microbiology*, **130**: 1765-1780.

**WEDEL, A. (2004):**

*Ziervögel*. 2. Auflage. Stuttgart: Parey Verlag.

**WEHR, J. und BEER, J. (1987):**

Chlamydien-Infektionen. In J. Beer (Hrsg.), *Infektionskrankheiten der Haustiere* (Teil I., S. 371-389). Jena: Fischer.

**WIESNER, E. und RIBBECK, R. (1991):**

Wörterbuch der Veterinärmedizin. 3. Aufl. (S. 1253-1254). Stuttgart: Gustav Fischer Verlag Jena.

**WILT, P. C., KORDOVA, N., WILT, J. C. (1972):**

Preliminary characterization of a chlamydial agent isolated from embryonated snow goose eggs in northern Canada. *Canadian Journal of Microbiology*, **18**: 1327-1332.

**WILSON, R. C., KEMP, D. T., KITZMAN, J. V., GOETSCH, D. D. (1988):**

Pharmacokinetics of doxycycline in dogs. *Canadian Journal of Veterinary Research*, **52**: 12-14.

**WINSOR, D.K., J R. und GRIMES, J. E. (1988):**

Relationship between infectivity and cytopathology for L-929 cells, membrane proteins, and antigenicity of avian isolates of *Chlamydia psittaci*. *Avian Diseases*, **32**, 421-431.

**WITTENBRINK, M. M., MROZEK, M., BISPING, W. (1993):**

Isolation of *Chlamydia psittaci* from a chicken egg: evidence of egg transmission. *Zentralblatt für Veterinärmedizin, B* **40**: 451-452.

**WOLKE, R. E., WYAND, D. S., KHAIRALLAH, L. H. (1970):**

A light and electron microscopic study of epitheliocystis disease in the gills of Connecticut striped bass (*Morone saxatilis*) and white perch (*Morone americanus*). *Journal of Comparative Pathology*, **80**: 559-563.

**WYRICK, P. B. und RICHMOND, S. J. (1989):**

Biology of chlamydiae. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **195**: 1507-1512.

**YOSHIDA, H., KISHI, Y., SHIGA, S., HAGIWARA, T. (1998):**

Differentiation of *Chlamydia* species by combined use of polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Microbiology and Immunology*, **42**: 411-414.

**ZWART, P. (1995):**

Echsen. In K. Gabrisch & P. Zwart (Eds.), *Krankheiten der Heimtiere* (S. 809-858). Hannover: Schlütersche Verlagsanstalt und Druckerei.

## 10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Erhard F. Kaleta, der mir die Möglichkeit gab, diese Arbeit in der "Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische" durchzuführen. Ich danke ihm für die unzähligen und stets sehr hilfreichen Gespräche und die rasche Durchsicht dieser Arbeit und dafür, dass er an mich glaubte.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. Brigitte M. Bönner und Herrn Dr. Ayhan Yilmaz für ihre ständige Diskussionsbereitschaft und ihre unzähligen Hilfestellungen.

Ich bedanke mich bei Frau Dr. Judith Tyczka (Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere) für die Überlassung von 12 *Chlamydophila psittaci*-Isolaten. Weiterhin danke ich Herrn Dr. Klaus Failing (AG Biomathematik und Datenverarbeitung) für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Ein großer Dank geht an Frau Julia Schmalz für ihre Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Experimente.

Ein herzliches Dankeschön auch an Frau Dr. Ursula Heffels-Redmann und an meine Mitdoktoranden Nicole Friedrich, Wenke Häuser und Dagmar Sommer für alle ihre Hilfe in der Grammatikkorrektur dieser Arbeit. Ebenso danke ich den anderen Mitdoktoranden, technischen Assistenten und Arbeitern des Instituts für das fröhliche und nette Arbeitsklima.

Für meine finanzielle Unterstützung danke ich dem DAAD.

Nicht zuletzt danke ich herzlich meinen Eltern, meinem Freund, meiner Familie und meinen Freunden, ganz besonders meinen Eltern für ihre Geduld, meinem Freund für seine guten Nerven und Hilfen, und meinen Freunden dafür, dass sie mich nicht vergessen haben.

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.“





**ISBN 978-3-939902-25-6**



**Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH  
35392 Gießen · Frankfurter Str. 89 · Tel. 0641 / 24466 · Fax: 0641 / 25375  
e-mail: [Geschaeftsstelle@dvg.net](mailto:Geschaeftsstelle@dvg.net) · Homepage: <http://www.dvg.net>**