

Aus dem Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV)  
(Nationales veterinärmedizinisches Referenzlabor für Salmonellen [NRL-Salm])  
eingereicht über  
den Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

**Genetische und molekularbiologische Untersuchungen zur Antibiotikaresistenz  
bei *Salmonella* Enteritidis Isolaten der Jahre 1986-1995**

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Grace Flindell**  
Tierärztin aus Plattsburgh/N.Y.

Berlin 1998  
Journal-Nr. 2171

Gedruckt mit Genehmigung  
des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. K. Hartung
Erster Gutachter:	Prof. Dr. R. Kroker
Zweiter Gutachter:	Univ.- Prof. Dr. H. M. Hafez

Tag der Promotion:	03. 07. 1998
--------------------	--------------

## INHALTSVERZEICHNIS

	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>I</b>
<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>3</b>
2. 1	Übersicht und Nomenklatur der Gattung <i>Salmonella</i>	3
2. 2	Morphologische und serologische Eigenschaften der Gattung <i>Salmonella</i>	4
2. 3	Reservoir von Salmonellen	4
2. 4	<i>Salmonella</i> Enteritidis - Geschichtliches -	5
2. 5	Verbreitung und Vorkommen von <i>Salmonella</i> Enteritidis in Deutschland und Europa	6
2. 6	Allgemeine Typisiermethoden bei Salmonellen	7
2. 7	Klassische Typisiermethoden	7
2. 7.1	Serologie	7
2. 7.2	Phagentypisierung	8
2. 7.3	Test auf Antibiotikaresistenzen	9
2. 8	Molekularbiologische Typisiermethoden	9
2. 8.1	Plasmidprofilanalyse	9
2. 8.2	Gensondenhybridisierungstechnik	10
2. 8.3	Makrorestriktionszymanalyse	11
2. 8.4	PCR - gestützte Analyseverfahren	12
2. 9	Geeignete Typisiermethoden bei <i>Salmonella</i> Enteritidis	12
2. 10	Lebensmittelrechtliche Aspekte	14
2. 11	Allgemeine Bedeutung von Antibiotika	16
2. 12	Antibiotika als Leistungsförderer	17
2. 13	Resistenz (Allgemeines)	21
2. 13.1	Resistenz (Definition)	21
2. 13.2	Natürliche Resistenz	21
2. 13.3	Erworbene Resistenz	21
2. 14	Mutation	22
2. 15	Übertragbare Resistenz	22
2. 15.1	Molekulare Grundlagen des Resistenztransfers	23
2. 15.1. a	Konjugation	23

2. 15.1. b	Transduktion	24
2. 15.1. c	Transformation	24
2. 15.1. d	Transposition	24
2. 16	Resistenzmechanismen	25
2. 17	Einzelne Antibiotika Stoffklassen sowie individuelle Resistenzmechanismen	25
2. 17.1	$\beta$ -Lactam Antibiotika	25
2. 17.2	Aminoglykosidantibiotika	26
2. 17.3	Chloramphenicol	28
2. 17.4	Tetracycline	28
2. 17.5	Nitrofurane-Derivate	30
2. 18	Vorkommen und Verbreitung resistenter <i>Salmonella</i> Enteritidis in Deutschland und Europa	31
<b>3.</b>	<b>EIGENE UNTERSUCHUNGEN</b>	<b>34</b>
3. 1	Material und Methoden	34
3. 1.1	Material für die bakteriologische Untersuchung	34
3. 1.2	Bakterienstämme	34
3. 1.3	Medien	35
3. 1.4	Allgemeine Kultur- und Lagerungsbedingungen	36
3. 1.5	Serologische Untersuchungen	36
3. 1.5.1	Material für die serologischen Untersuchungen	36
3. 1.5.2	Agglutinationstest	36
3. 1.6	Überprüfung der Antibiotikaresistenz	37
3. 1.6.1	Material und Durchführung	37
3. 1.7	Test auf Übertragbarkeit der Resistenz (Kreuzungsexperimente)	37
3. 1.7.1	Flüssigkeitskreuzungen	38
3. 1.7.2	Filterkreuzungen	39
3. 2	Molekularbiologische Untersuchungen	40
3. 2.1	Material für die molekularbiologische Charakterisierung	40
3. 2.2	Präparation von Plasmid-DNA	40
3. 2.3	Agarose-Gelelektrophorese	41
3. 2.4	Größenbestimmung von Plasmiden	41
3. 2.5	Geräte und Materialien	42

<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>44</b>
4. 1	Antibiotikaresistenz bei Salmonellen der Jahre 1985-1995	44
4. 2	Antibiotikaresistenz bei <i>S. Enteritidis</i> Isolaten der Jahre 1986-1995	45
4. 2.1	Vorkommen von Mehrfachresistenzen	46
4. 2.2	Anteil und Verlauf häufig vorkommender <i>Salmonella</i> Serovare sowie von Antibiotikaresistenzen bei <i>S. Enteritidis</i>	47
4. 3	Genetische und molekularbiologische Grundlagen der Resistenz (Jahre 1986-1995)	51
4. 3.1	Resistenzeigenschaften der untersuchten <i>S. Enteritidis</i> Stämme	51
4. 3.2	Übertragbarkeit der Resistenzen auf <i>E. coli</i> K-12	52
4. 4	Resistenzfaktoren (Plasmide)	55
4. 5	Klonale Strukturen ausgewählter Stämme	57
4. 6	Plasmid-Rekombinationen einzelner Stämme	58
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>63</b>
5. 1	Die Resistenzproblematik bei Salmonellen	63
5. 2	Nitrofurantoinresistenz bei <i>S. Enteritidis</i> : ein ernstzunehmendes Problem ?	65
5. 3	Plasmidstabilität	69
5. 4	Mögliche klonale Natur untersuchter <i>S. Enteritidis</i> Stämme	70
<b>6.</b>	<b>SCHLUSSFOLGERUNGEN</b>	<b>72</b>
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>73</b>
<b>8.</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>75</b>
<b>9</b>	<b>APPENDIX</b>	<b>77</b>
9. 1	Anhang 1	77
9. 2	Anhang 2	79
9. 3	Anhang 3	81
<b>10.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>84</b>

**ABKÜRZUNGEN**

AAC	Acetyltransferasen
AAH	Adenyltransferasen
AB	Antibiotika
Abb.	Abbildung
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
ap	Ampicillin
APH	Phosphotransferasen
A. bidest	Aqua bidestillata
Art. Nr.	Artikel Nummer
ASM	American Society for Microbiology
ATCC	American Type Culture Collection
BgVV	Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cm	Chloramphenicol
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
ct	Colistin
d	day
DDR	Deutsche Demokratische Republik
d.h.	das heißt
DT	Definitive Phage Type
DNA	Desoxyribonucleinsäure
E.	Enteritidis
Eiprod.	Eiprodukte
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Essigsäure
EF-G	Elongationsfaktor-G
EG	Europäische Gemeinschaft
etc.	et cetera
evtl.	eventuell
EWG	Europäische Wirtschaftsgemeinschaft
F	Nitrofurantoin
FR	Furazolidon
fr. Hähn.	frisches Hähnchen
gefr.	gefroren
gn	Gentamicin
his	Histidin
H.	Hühner
Hrsg.	Herausgeber

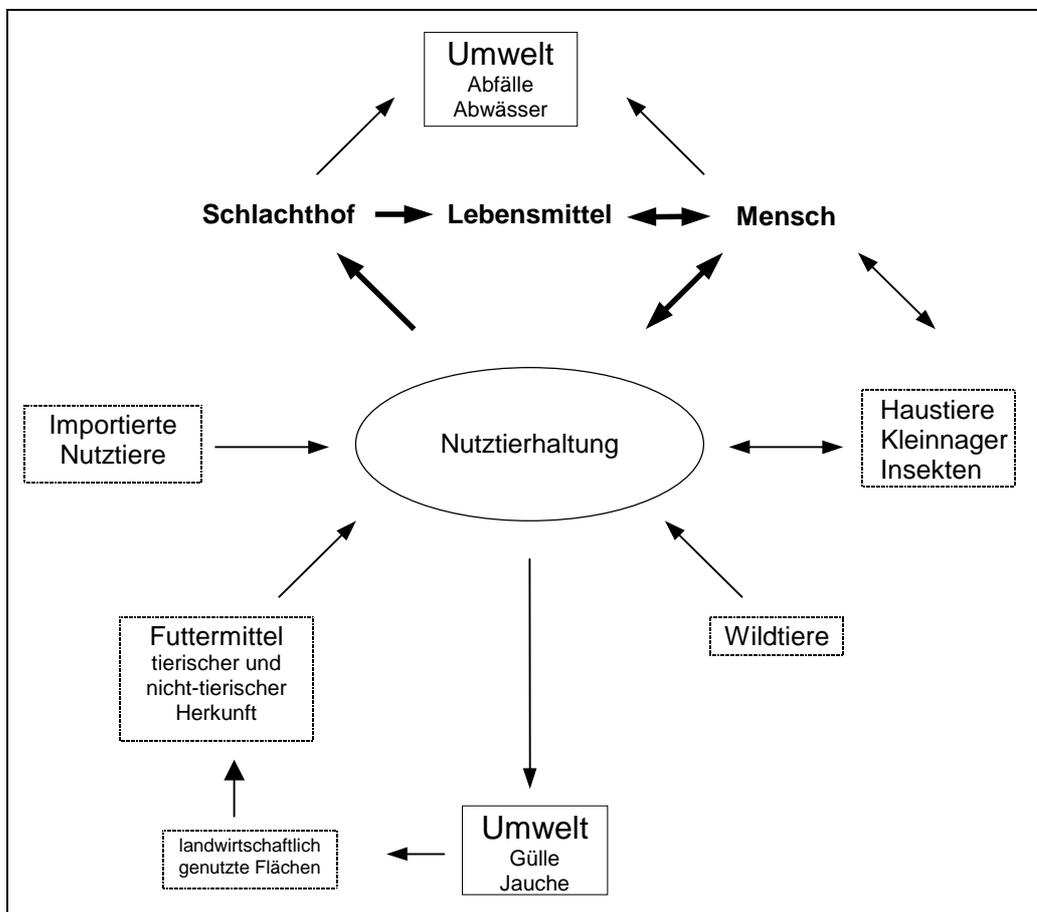
IS200	Insertionsequenz 200
Isol.	Isolate
kb	Kilobasen
kg	Kilogramm
kn	Kanamycin
KbE	Kolonie-bildende Einheiten
Kontr.	Kontrolle
Lab.	Laboratories
lac	Lactose
LM	Lebensmittel
LMBG	Lebensmittel und Bedarfsgegenstände Gesetz
LPS	Lipopolysaccharide
lys	Lysin
M	Molar
MD	Megadalton
mg	Milligramm
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MLS	Makrolid-Lincosamin-Streptogramin
MMR	Methyl-directed mismatch repair
MRSA	Methicillin resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
n	Anzahl
N	Normal
Nal	Nalidixinsäure
NRL-Salm.	Nationales Referenz Labor für Salmonellen
n.c. / n.t.	not typable
ne	Neomycin
n.ü.	nicht übertragen
p.	page
past.	pasteurisiert
pb	Polymyxin B
PBP	Penicillinbindendes Protein
PCR	Polymerase chain reaction
pH	negativer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pRQ29	Serovarspezifische Plasmid von <i>Salmonella</i> Enteritidis
PT	Phagentyp
Prod.	Produkte
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
RAPD	Random Amplifiable of Polymorphic DNA
RatsVo	Ratsverordnung
res.	resistent
Res.	Resistenz
R-Plasmid	Resistenz-Plamid
RNA	Ribonucleinsäure

RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
Rif	Rifampicin
RKI	Robert-Koch-Institut
S.	Seite
S. E.	<i>Salmonella</i> Enteritidis
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
S. Typh. O5 neg.	<i>Salmonella</i> Typhimurium O5 negativ
SDS	Natriumdodecylsulfat
SECL I-III	<i>Salmonella</i> Enteritidis Clonal Lineages I-III
spp	Spezies
<i>spv</i>	Salmonella plasmid virulence
SPF	Spezifisch pathogenfrei
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
Subsp.	Subspezies
<i>T.</i>	<i>Trichomonas</i>
Tab.	Tabelle
te	Tetracyclin
trp	Tryptophan
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
Typhm.	Typhimurium
ü.N.K.	über Nacht Kulturen
us. Stm.	untersuchte Stämme
UV	Ultraviolett
Verd.	Verdünnung
WHO	World Health Organisation
z. B.	zum Beispiel
zus.	zusätzlich
z.T.	zum Teil
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter-10 <sup>-6</sup> l
µg	Mikrogramm-10 <sup>-6</sup> g

## 1. Einleitung

Salmonellosen stellen im Sinne der sogenannten "Enteritis infectiosa" weltweit eine der häufigsten bakteriellen Infektionen dar (Ramos et al., 1996). Hierbei handelt es sich in den meisten Fällen um nicht wirtsadaptierte Erreger der *Salmonella* Spezies *enterica*, die in Abhängigkeit der jeweiligen Virulenz sowohl beim Tier als auch beim Menschen unterschiedlich schwer verlaufende Gastroenteritiden verursachen können. Zu den wichtigsten Serovaren zählen *Salmonella* Typhimurium und *Salmonella* Enteritidis (Selbitz et al., 1995), die aufgrund ihres Zoonosencharakters (Abb.1.1) für den Menschen als Verursacher lebensmittelbedingter Infektionen eine besondere Bedeutung erlangt haben.

Abb. 1.1 Infektionswege bei Salmonellen nach Baird-Parker (1990)



Im Verlauf der letzten 20 Jahre wurde bei den genannten Serovaren eine zunehmende Resistenzentwicklung insbesondere mehrfachresistenter *S. Typhimurium* Isolate international beobachtet (Levy, 1992; Lee et al., 1994; Threlfall et al., 1997). Obwohl die Behandlung salmonellenbedingter Enteritiden in der Regel keine Antibiotika erfordert (Hof, 1992), liegt die Bedrohung der Öffentlichkeit durch resistente Isolate vor allem in der Übertragung von Resistenzgenen auf andere bakterielle Erreger, die dann therapeutisch schwierig zu beeinflussen sind (Helmuth et al., 1997; Sack et al., 1997). Als Hauptursache für die Entwicklung resistenter Mikroorganismen seit Einführung der Antibiotika vor 50 Jahren, gilt der nichtsorgsame Gebrauch von Antibiotika in der Veterinär - und Humanmedizin sowie in der Landwirtschaft. Zu hohe Erwartungen an das "Wunder" Antibiotikum sowie ein Unterschätzen der genetischen Flexibilität mikrobiologischer Populationen haben schließlich zu dem gegenwärtig besorgniserregenden Stand antibiotika-resistenter Erreger geführt (Davies, 1997).

Der erfolgreiche Versuch einiger Wissenschaftler, antibiotika-resistente Bakterien anhand molekularbiologischer Methoden zu sensiblen Bakterien zu konvertieren, zeigt im Unterschied zur kostenintensiveren Entwicklung neuer Antibiotika eindrücklich die Notwendigkeit, mit der nach Alternativen gesucht wird, um dem globalen Resistenzproblem zu begegnen (Guerrier-Takeda, et al., 1997).

Angesichts der seit Mitte der 80-iger Jahre zunehmenden Isolationsrate sensibler *S. Enteritidis* Phagentyp 4 Stämme, für die ein klonaler Zusammenhang nachgewiesen wurde (Helmuth et al., 1985 & 1990, Tschäpe et al., 1997), sollten im Rahmen dieser Arbeit sowohl phänotypische als auch genotypische Eigenschaften an 65 resistenten *S. Enteritidis* Stämme anhand molekularbiologischer Methoden untersucht werden.

Dabei sollte die Frage geklärt werden, inwieweit *Salmonella* Enteritidis die Fähigkeit zur Multiresistenz besitzt und ob diese, wenn vorhanden, übertragen wird.

Darüber hinaus wurden die hier untersuchten epidemiologischen Marker auf das Vorhandensein eines Klons überprüft wie er für den multiresistenten *S. Typhimurium* DT104 nachgewiesen werden konnte (Threlfall et al., 1997; Liesegang et al., 1997).

## 2. Literaturübersicht

### 2.1 Nomenklatur der Gattung *Salmonella*

Die Gattung *Salmonella* zählt zur Familie der *Enterobacteriaceae*.

Nach Le Minor & Popoff (1987) besteht das Genus *Salmonella* aus zwei Spezies: Species *enterica* und Species *bongori* (s. Abb. 2.1).

Aufgrund biochemischer Merkmale wird die Spezies *enterica* in sechs weitere Subspezies eingeteilt: Subsp. *enterica* (I), Subsp. *salamae* (II), Subsp. *arizonae* (IIIa), Subsp. *diarizonae* (IIIb), Subsp. *houtenae* (IV), Subsp. *indica* (V). Die in Klammern gesetzten Zahlen reflektieren die frühere Bezeichnung der Subspezies. Gegenwärtig werden insgesamt 2.422 *Salmonella*-Serovare unterschieden (Popoff et al., 1996), wobei die meisten Serovare der Subsp. *enterica* angehören (Popoff & Le Minor, 1992). Der Serovar Enteritidis sowie Typhimurium gehören zur Subsp. *enterica*. Die exakte Nomenklatur ist der Abb. 2.1 zu entnehmen.

Abb. 2.1 Taxonomie der Gattung *Salmonella* (modifiziert nach Tschäpe & Kühn, 1995)

### Genus *Salmonella*



#### - Species *enterica*



- - Subspecies <i>enterica</i>	(1427)	→	Serovar	Typhimurium Enteritidis Bovismorbificans Marina etc.
- - Subspecies <i>salamae</i>	(482)			
- - Subspecies <i>arizonae</i>	(94)			
- - Subspecies <i>diarizonae</i>	(319)			
- - Subspecies <i>houtenae</i>	(69)			
- - Subspecies <i>indica</i>	(11)			

#### - Species *bongori* (20)

Σ **2422** (Popoff et. al., 1996)

Im Verlauf dieser Arbeit wird *Salmonella enterica* subspezies *enterica* serovar Enteritidis kurz als *Salmonella* Enteritidis oder *S. Enteritidis* bezeichnet.

## 2.2 Morphologische und serologische Eigenschaften der Gattung *Salmonella*

Bei dieser Gattung handelt es sich um gramnegative Stäbchenbakterien, von 0,7-1,5 x 2,0-5,0 µm Größe. Sie sind fakultative Anaerobier und sind in der Regel, mit Ausnahme von *Salmonella Gallinarum*, aufgrund des Besitzes von Geißeln beweglich (Selbitz et al., 1995).

Die im Kauffmann-White-Schema (Popoff et al., 1996) zunächst aufgeführten O-Antigene oder Körperantigene repräsentieren die Antigene der Bakterienzellwand. Diese setzen sich aus dem für gramnegative Bakterienzellwände üblichen Lipopolysaccharid-(LPS)-Komplex zusammen. H- oder Geißelantigene sind die Antigene der Bakteriengeißeln, die aus einem für Geißeln typischen Proteinkomplex bestehen, der als Flagellin bezeichnet wird (Jawetz et al., 1977). Die H-Antigene können in zwei Phasen (H1 und H2-Antigene) vorliegen, je nachdem welches der Gene (*fliC* oder *fliB*) exprimiert wird. Die meisten Serovare sind diphasisch und nur einige liegen in monophasischer Form vor. Von *S. Enteritidis* sind sowohl di- als auch monophasische Stämme bekannt. Die einzelnen O- Antigene werden mit arabischen Zahlen und die H- Antigene mit Buchstaben bezeichnet (Popoff & Le Minor, 1992). Für *S. Enteritidis* lautet die Antigenformel: 1,9,12:gm:-, deren Schreibweise sich international nach dem Pariser WHO-Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella* orientiert (Popoff & Le Minor, 1992). Der oben erwähnte Serovar *S. Gallinarum* Biovar *Gallinarum* und Biovar *Pullorum* besitzt kein Flagellin (Selander et al., 1996), so daß sich folgende Antigenformel ergibt: 1,9,12 :-:-.

## 2.3 Reservoir von Salmonellen

Als Erregerreservoir für Salmonellen gelten Säuger, wobei dem Menschen wie auch allen landwirtschaftlichen Nutztieren als potentieller Dauerausscheider eine besondere epidemiologische Bedeutung zukommt.

Das Wirtschaftsgeflügel und deren Eiprodukte sind als Hauptreservoir für *Salmonella* Enteritidis anzusehen (Humphrey et al., 1988; Anonymus, 1988; Rodrigue et al., 1990; Poppe et al., 1991; Van De Giessen et al., 1992; Threlfall & Chart, 1993; Suzuki, 1994; Tschäpe & Kühn, 1995), hingegen taucht beim Wassergeflügel besonders *S. Typhimurium* auf (Vielitz, 1993). Die Salmonellose der Taube wird zu 95% durch *Salmonella* Typhimurium O:5 neg verursacht (Becker et al., 1988). Pohl et al. (1997) beobachteten *Salmonella* Enteritidis bei Hunden, Katzen und Kaninchen häufiger als bei Wiederkäuern und Schweinen.

Weiterhin sind besonders Mäuse, Käfer und Insekten als wichtiges Reservoir für *S. Enteritidis* bei allen Nutztieren anzusehen, da sie in und in der Nähe von Stallungen überleben und somit jeder neuen Aufzucht eine mögliche Infektionsquelle bieten (Henzler & Opitz, 1992).

2. 4 *Salmonella* Enteritidis - Geschichtliches -

Der Name *Salmonella* Enteritidis ist auf die Entdeckung eines Erregers durch A. Gärtner in Jena zurückzuführen, welchen er im Jahre 1888 aus dem Fleisch eines wegen schleimiger Durchfälle geschlachteten Rindes isolierte und als "Bacillus enteritidis" bezeichnete. Zuvor waren 58 Personen, die Fleisch von diesem Schlachtrind verzehrten, an einer Gastroenteritis erkrankt, und eine Person verstarb nach dem Genuß von 800 Gramm rohen Fleisches desselben Rindes (Kelterborn, 1967).

Bald darauf wurde festgestellt, daß Erreger, die zunächst der Gärtnergruppe zugeordnet wurden, sich in ihren pathogenen Eigenschaften unterschiedlich gegenüber Menschen und Tieren verhielten.

Dies führte zu der Forderung nach einer genaueren Bestimmung und damit Charakterisierung der bislang allgemein als Nahrungsmittelvergifter geltenden Erreger, um epidemiologisch bessere Aussagen bezüglich der Infektionsquellen machen zu können. Die daraus resultierende Einteilung in vier Gruppen zeigt, daß hinsichtlich pathogener Eigenschaften Wirtsspezifitäten identifizierbar waren (Bahr, 1930) (s. Tab. 2.4).

Diese Wirtsspezifitäten führten dazu, bestimmte Ratinkulturen (*S. Enteritidis* var. danysz, Gruppe IV) als biologische Schädlingsbekämpfungsmittel gegen Ratten und Mäuse anzuwenden. Das in Dänemark, nach Verabschiedung des damals neusten dänischen Rattengesetzes (1920) eingesetzte und vorher entwickelte Ratinsystem wurde später ab 1926 in Deutschland in großem Umfang zur Rattenvertilgung benutzt (Bahr, 1930). In seiner Anwendung wurde das aus Ratin und Ratinin ("Meerzwiebelpräparat") bestehende System von anderen Autoren hinsichtlich der Unbedenklichkeit gegenüber dem Menschen in der damaligen Zeit bestätigt (Neumark, 1925 & 1926).

Tab. 2.4 Vorkommen und Einteilung der "Gärtnerbakterien", nach Bahr (1930)

	Gruppe I	Gruppe II	Gruppe III	Gruppe IV
<b>Einteilung</b>	"wirkliche Gärtnerbakterien"	"Gärtner-Poppe"	"Gärtner-Jensen"	"Gärtner-Danysz"
<b>Vorkommen</b>	Menschen, Fleisch: sog. Lebensmittelvergifter	ausschließlich Haustiere: Rind, Schwein	hauptsächlich Haustiere, weniger Menschen	hauptsächlich Ratten und Mäuse

Im Jahre 1935 wurde *S. Enteritidis* var. blegdam ("*Gärtner Blegdam*") als weiterer Erreger durch Kauffmann (1935) in die Gärtner-Gruppe aufgenommen.

Dieser sowie die früher zur Gruppe "*Gärtner-Danysz*" zählenden Erreger werden mittlerweile im Kauffmann-White-Schema (Kelterborn, 1967) als *S. Blegdam* bzw. als Variante *S. Enteritidis* var. biochem. Danysz bezeichnet. Weitere Varianten sind *S. Enteritidis* var. biochem. Essen und *S. Enteritidis* var. biochem. Chaco.

## 2. 5 Verbreitung und Vorkommen von *Salmonella* Enteritidis in Deutschland und Europa

Im Unterschied zu *Salmonella* Typhimurium tauchte *Salmonella* Enteritidis bis 1984 in Deutschland eher selten und nur sporadisch beim Menschen auf. Der Anteil der *Salmonella* Typhimurium Isolierungen lag mit bis zu 60% sehr hoch, während der von *Salmonella* Enteritidis mit einer Ausnahme im Jahre 1972 (knapp 40%) zwischen 5% und 10% als sehr gering zu vermerken war (Kühn, 1995).

Ab 1984 änderte sich die epidemiologische Situation drastisch:

Innerhalb von zwei Jahren (1984-1986) wurde eine vierfache Zunahme an *Salmonella* Enteritidis Phagentyp 4 Isolierungen verzeichnet. So gehörten 1984 5% aller untersuchten *S. Enteritidis* dem PT4 an, der 1986 bereits zu 20% isoliert werden konnte und somit zum führenden Epidemietyp wurde (Liesegang et al., 1997). 1992 wurde für *S. Enteritidis* insgesamt eine Isolationsrate bis über 70% ermittelt, die somit weit über der lag, die jemals für *Salmonella* Typhimurium festgestellt wurde. Dies führte zu einem erheblichen Gesamtanstieg der Salmonellose beim Menschen ab Mitte der 80-ziger Jahre (Kühn, 1995). Seit 1992 ist wieder eine Abnahme dieses Serovars zu beobachten, und für 1996 wurden aus dem Nationalen Referenzlabor für Salmonellen des RKI und des Nationalen Referenzlabors für Salmonellen des BgVV Werte um 60% angegeben (Tschäpe et al., 1997).

Bei einer Untersuchung von 1138 *Salmonella* Enteritidis Isolat aus 180 Orten Deutschlands für die Jahre 1990-91 stellten Schroeter et al. (1994) fest, daß 70,8% der untersuchten Stämme dem PT4 angehörten.

Mehrheitlich wurden seit Mitte der 80ziger Jahre sowohl im NRL des RKI (Kühn, 1995; Liesegang et al., 1997) als auch im NRL des BgVV Stämme des PT4 isoliert, die nach weiteren molekularbiologischen Untersuchungen als klonal einheitlich bezeichnet wurden (Helmuth et al., 1990; Helmuth & Schroeter, 1994). Diese für Deutschland aufgezeigte Entwicklung und zunehmende epidemiologische Bedeutung des Serovars als einer der wichtigsten Verursacher lebensmittelbedingter Salmonellosen, ist auch in anderen europäischen Ländern zu beobachten (Rodrigue et al., 1990; Fantasia & Filetici, 1994). Insbesondere die englischen Autoren Threlfall et al. (1989b & 1993) und andere Untersucher (Anonymus, 1988; Paul & Batchelor, 1988; Rampling et al., 1989; Erdem et al., 1994; Humphrey, 1994;) konnten in ihren Studien eine fortwährende Dominanz dieses Phagentyps feststellen.

Hingegen sind in den USA, Canada und der slowakischen Republik in der Mehrheit Stämme des PT8 (Rodrigue et al., 1992; Khakhria et al., 1991; Majtánova, 1997) epidemiologisch bedeutsam. So wurde bei einer Untersuchung von 404 *S. Enteritidis*-Stämmen, die aus tschechischen Kindern unter fünf Jahren zwischen 1995-97 isoliert wurden, in 341(84,4%) Fällen der Phagentyp 8 bestimmt (Rychlik et al., 1997).

Prognosen zufolge wird ein Erregerwechsel des vorherrschenden Epidemiekлона *Salmonella* Enteritidis PT4 zu *Salmonella* Typhimurium DT104 in den kommenden Jahren erwartet (Liesegang et al., 1997).

---

## 2. 6 Allgemeine Typisiermethoden bei Salmonellen

Die Verhütung der durch *Salmonella* Serovare verursachten lebensmittelbedingten Infektionen und Epidemien stellt eine der wichtigsten Aufgaben des öffentlichen Gesundheitswesens innerhalb der Industrieländer dar. Da es sich bei den enteropathogenen Salmonellen um Zoonoseerreger handelt, die überwiegend nicht-wirtsadaptierte Serovare sind (Selbitz et al., 1995), ist deren Identifizierung und Charakterisierung von besonderer epidemiologischer Bedeutung. Nur durch umfassende Informationen ist es möglich, Infektionswege zurück zu verfolgen, Infektionsquellen aufzudecken sowie gegebenenfalls rechtliche Maßnahmen zu ergreifen, die volksgesundheitlich relevant sind (Helmuth et al., 1990). Als Beispiel sei die Hühnerfleisch-Verordnung (1994) sowie die Eiprodukte-Verordnung in der Fassung von 1993 erwähnt.

Nach Maslow et al. (1993) sollte ein Typisierungssystem zwischen epidemiologisch verwandten Isolaten klonalen Ursprungs und Isolaten, die epidemiologisch nicht verwandt sind, unterscheiden können.

Zur Typisierung eignen sich Methoden, die die Differenzierung einzelner Serovare zulassen (Olsen et al., 1993). Wichtige Unterscheidungsmerkmale sind phänotypische Eigenschaften von Bakterienisolaten, die zu den traditionellen Untersuchungsmethoden wie Biotypie, Serologie, Phagolysotypie und Bestimmung der Antibiotikaresistenz geführt haben (Threlfall & Frost, 1990). Genetische Eigenschaften werden mit molekularbiologischen Techniken erfasst, die der epidemiologischen Feincharakterisierung von Isolaten dienen (Helmuth & Schroeter, 1994).

Hunter (1990) beschreibt drei Kriterien für Typisierungsmethoden, die nach Olsen et al. (1993) von einer einzelnen Methode jedoch nicht erfüllt werden können. Erst die Kombination geeigneter Techniken führt zu einem auswertbaren Ergebnis, welches bei wiederholten Untersuchungen eines Isolates reproduzierbar sein sollte. Eine hohe Differenzierung bezüglich nicht miteinander verwandter Stämme sowie die Typisierbarkeit aller Isolate sollte gewährleistet sein (Hunter, 1990). Der Wert einer Typisierungsmethode kann nach Hunter & Gaston (1988) mit Hilfe des Differenzierungsindex ausgedrückt werden.

Im folgenden werden die in der Literatur beschriebenen und für *S. Enteritidis* geeigneten Typisierungsmethoden vorgestellt.

## 2. 7. Klassische Typisierungsmethoden

### 2. 7.1 Serologie

Die im Kauffman-White Schema klassifizierten Salmonellen spp. werden aufgrund ihrer unterschiedlichen O- und H- Antigene in Serovare eingeteilt (Kauffmann, 1975). Serovare, die sowohl für Mensch und Tier bedeutend sind, gehören der Subspezies *enterica* der Spezies *enterica* an (Popoff et al., 1996). Für die Subspeziesbestimmung wird die Serologie als sehr

differenzierungsfähig betrachtet und bildet die Grundlage für weitere Typisierungsmethoden (Olsen et al., 1993). In seltenen Fällen kommt es durch Aufnahme eines Phagen oder Plasmids zu einer Serotypkonversion. Popoff & Le Minor (1985) berichten von einem plasmidcodierten O:54 Antigen, welches nach Aufnahme eines 7,5 kb großen Plasmids exprimiert und von vielen *Salmonella* Serovaren beherbergt wird.

Für epidemiologische Zwecke ist diese Methode jedoch nicht ausreichend, da in vielen Ländern wenige Serovaren mehr als 80% aller Isolate repräsentieren. Außerdem sind nicht-wirtsadaptierte pathogene Serovaren (*S. Enteritidis* und *S. Typhimurium*) gleichzeitig bei verschiedenen Tierarten zu finden, so daß sich die Infektionsquelle nicht eindeutig bestimmen läßt. Daher werden weitere Typisierungsmethoden eingesetzt, die innerhalb eines Serovars unterscheiden können. (Helmuth et al., 1990; Threlfall & Frost, 1990).

### 2. 7.2 Phagentypisierung

Die Phagentypie beruht auf der Wirtsspezifität bestimmter Bakteriophagen gegenüber *Salmonella* Serovaren. Die zu untersuchenden Isolate werden mit Phagen infiziert und produzieren ein definiertes Lysemuster, anhand dessen die Isolate einem bestimmten Phagentyp zugeordnet werden (Anderson et al., 1977; Helmuth et al., 1985; Ward et al., 1987; Olsen et al., 1993). Die Anwendung der Phagentypie für epidemiologische Zwecke beruht auf der Annahme, daß Stämme, die epidemiologisch verwandt sind, den gleichen Phagentyp aufweisen, während nicht miteinander verwandte Stämme unterschiedliche Phagentypen besitzen (Baggesen et al., 1997a). Für Serovaren, die als Zoonoseerreger bedeutend sind, wurden im Laufe der Zeit verschiedene Typisierungssysteme entwickelt. Bei *S. Enteritidis* hat sich die Bestimmung des Phagentyps nach Ward (Ward et al., 1987) im Unterschied zu anderen (Lilleengen, 1951; Gerschman, 1976; Lalko, 1977; Vieu et al., 1990) etabliert. In Abhängigkeit der geographischen Region existieren für *S. Typhimurium* mehrere Typisierungssysteme. Während in Mitteleuropa die Methode nach Callow (1959) oder nach Anderson et al. (1977) angewendet wird, wurde in Indien ein neues Schema erarbeitet, welches die dort häufig vorkommenden Stämme typisiert, die mit den in Europa üblichen Methoden nicht typisierbar sind (Threlfall & Frost, 1990). Die Umwandlung eines Phagentypen in einen anderen wird, ähnlich der Serotypkonversion, von einigen Autoren beobachtet. So berichten Ridley et al. (1996), daß der *S. Enteritidis* PT6a aus dem PT4 durch die Aufnahme eines *incX* Ampicillin Resistenzplasmids hervorgegangen ist. Aufgrund einer Genmutation beim PT4 kommt es zu einem Verlust des LPS und damit zur Verringerung der Virulenz, die in der Konversion zum PT7 phänotypisch entdeckt wurde (Chart et al., 1989). Frost et al. (1989) begründen die Alteration von PT4 nach PT24 durch Aquisition verschiedener R-Plasmide der *incN* Inkompatibilitätsgruppe, die auch für die Konversion anderer wichtiger Phagentypen von *S. Enteritidis* verantwortlich gemacht werden (Threlfall & Chart, 1993).

Obwohl die Phagentypisierung bei *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium* zu den wichtigsten Typisierungsmethoden zählt, bieten die Ergebnisse der Typisierung hinsichtlich des Ursprungs einer

---

Infektion, z. B. bei Vorherrschen des *Salmonella* Serovars PT4, nur wenig Informationen (Helmuth et al., 1990; Olsen et al., 1993).

### 2. 7.3 Test auf Antibiotikaresistenzen

Da die bei Salmonellen spp. auftretende Antibiotikaresistenz überwiegend durch konjugative Resistenzplasmide vermittelt wird, die durch den massiven Einsatz und Gebrauch sowohl in der Veterinär- als auch Humanmedizin einen Selektionsvorteil genießen, herrscht naturgemäß eine Fluktuation einzelner R-Plasmide, die die Bestimmung der Antibiotikaresistenz als alleinige Typisierungsmethode ausschließt (Threlfall & Frost, 1990; Olsen et al., 1993). In Kombination mit der Phagentypie und der Plasmidprofilanalyse ergeben sich aber oft wertvolle epidemiologische Hinweise, die das Aufdecken von Infektketten ermöglichen. Der multiresistente *S. Typhimurium*-Stamm 204c wurde Mitte der 80-iger Jahre überwiegend beim Rind und beim Kalb isoliert (Threlfall et al., 1986). Später wurde dieser Phagentyp auch im Geflügel identifiziert, dessen bovine Herkunft anhand von Antibiotogrammen und Plasmidanalysen nachgewiesen werden konnte (Threlfall et al., 1990).

## 2. 8 Molekularbiologische Methoden

### 2. 8.1 Plasmidprofilanalyse

Die Analyse der Plasmide war die erste Methode, für die die Elektrophorese zur Darstellung unterschiedlich großer Moleküle eingesetzt wurde, um genetische Eigenschaften von Mikroorganismen zu charakterisieren (Shaberg et al., 1981). Diese Typisierungsmethode beschreibt die Anzahl und Größe der in einem Bakterienstamm vorhandenen Plasmide. Obwohl die Bestimmung der Plasmide für epidemiologische Zwecke gerade bei Salmonellen sehr erfolgreich angewendet wurde (Helmuth et al., 1985; Threlfall et al., 1989a; Rodrigue et al., 1992; Brown et al., 1993; Threlfall et al., 1994a; Rankin et al., 1995), bedeutet das Vorhandensein von Plasmiden gleicher Größe nicht immer, daß die gleiche DNA-Sequenz zugrunde liegt (Olsen et al., 1993; Liebisch & Schwarz, 1996). Um mögliche strukturelle Unterschiede bei Plasmiden gleicher Größe zu erkennen, setzten bereits 1974 Thompson et al. Endonucleasen zur Spaltung extrachromosomaler DNA-Moleküle ein. In ihren Arbeiten aus den Jahren 1986 und 1987 berichten Platt et al. (1986 & 1987) über den erfolgreichen Einsatz von Restriktionsenzymen zur Analyse und zum "Fingerprinting" enterobakterieller Plasmide, vor allem bei *S. Typhimurium* (Platt et al., 1987). Bei Vorliegen unterschiedlicher Plasmide entstehen während des Schneidens unterschiedlich große lineare Fragmente, die nach gelelektrophoretischer Auftrennung zu charakteristischen Bandenmustern führen (Olsen et al., 1993).

In den letzten 15 Jahren sind von vielen Autoren (Taylor et al., 1982; Helmuth et al., 1985; Wray et al., 1990; Brown et al., 1992; Rankin et al., 1995) umfangreiche Plasmid-“Fingerprinting“-Untersuchungen durchgeführt worden, deren Ergebnisse entscheidende Informationen zur Epidemiologie salmonellenbedingter Infektionen bei Tier und Mensch lieferten. So wurde mit dieser Methode in Norwegen durch Olsvik et al. (1985) ein Tier-zu-Mensch-Transfer für *S. Typhimurium* nachgewiesen. Ebenso konnten mittels dieser Technik Olsen et al. (1992) sowie Threlfall et al. (1992), *S. Berta* infizierte Broiler als Infektionsquelle von Salmonellosen beim Menschen sowohl in Dänemark als auch in England belegen. Obwohl sich dieses Verfahren bei vielen Untersuchungen bewährt hat und Plasmidprofile nachweislich stabil sind (Casalino et al., 1984; Montenegro et al., 1991), ist sein alleiniger Einsatz zur epidemiologischen Typisierung von *Salmonella*-Stämmen aufgrund des bestehenden Mobilitätspotential von Plasmiden nicht geeignet (Schwarz et al., 1997). Von geringem Wert sind Plasmidanalysen bei den Serovaren *S. Infantis*, *S. Panama* und *S. Ealing*, da die Mehrzahl der Stämme plasmidfrei sind (Helmuth et al., 1985; Threlfall & Frost, 1990). Die Verwendung von Restriktionsenzymen zur Analyse der Gesamtzell-DNA gestatten hingegen umfassende und stabile Aussagen zur Genotypisierung von Salmonellen (Olsen et al., 1993). Hierbei wird entsprechend der Plasmidanalyse die gesamte bakterielle DNA einer Restriktionsanalyse unterzogen. Die dabei entstehenden Fragmentmuster werden nach gelelektrophoretischer Auftrennung miteinander verglichen, welches sich aufgrund der großen Anzahl gebildeter Fragmente, häufig als schwierig erweist (Liebisch & Schwarz, 1996) und bei Salmonellen oft nicht möglich ist (Helmuth & Schroeter, 1994; Olsen et al., 1993).

Der Einsatz der Gensondenhybridisierung sowie der Makrorestriktionsanalysen ermöglichen hingegen eine fundierte Auswertung der Fragmente.

### 2. 8.2 Gensondenhybridisierungstechnik

Das Prinzip der Hybridisierung beruht auf dem komplementären Verhalten doppelsträngiger DNA-Moleküle. Dabei werden Einzelstränge eines Genabschnittes isoliert, radioaktiv oder enzymatisch markiert und als Sonde zur Erkennung bakterieller Isolate, die eine homologe DNA-Sequenz aufweisen, verwendet (Montenegro & Helmuth, 1989).

Durch den Einsatz von *Salmonella* plasmid virulence (*spv*) Genen, die als markierte Sonden in Hybridisierungsreaktionen verwendet werden (Montenegro et al., 1991; Lax et al., 1993), lassen sich die dabei entstehende Hybridmoleküle der zuvor durch Restriktionsenzyme in Fragmente geschnittenen Plasmid DNA in Form von Banden nachweisen.

Die Größe der Hybridisierungsbanden variiert in Abhängigkeit der Positionen der Restriktionsenzymststellen in der nachzuweisenden Virulenz-Plasmid DNA. Die dabei entstehenden unterschiedlich großen Bandenmuster werden in der Literatur als sogenannte Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP's) bezeichnet. Erstmals wurde diese Technik durch Tompkins et al. (1986) bei Isolaten von *S. Typhimurium*, *Enteritidis* und *Dublin* anhand chromosomaler Fragmente von *S. Enteritidis* angewendet. Jones & Osborne (1991)

untersuchten *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium*-Stämme der prä-antibiotischen Ära (Murray-Sammlung) mit je einem *S. Enteritidis* Stamm (P49120, Phagentyp 4) und *S. Typhimurium* Stamm (C5) von 1989 unter der Fragestellung, ob die alten Stämme (bereits) Virulenzplasmide besaßen und, falls ja, ob molekulare Neukombinationen innerhalb der Virulenzregion stattgefunden haben. Hierzu setzten sie 2 Fragmente (3,5 kb und 2,5 kb), die sie zuvor durch Verdauung des Virulenzplasmids von *S. Typhimurium* C5 mit *Hind*III gewonnen hatten, als *virA* und *virB* Gensonden für Hybridisierungen der zu überprüfenden alten Stämme ein. Das Ergebnis zeigte sich in einer vollständigen Hybridisierung beider Fragmente mit den Virulenz-Plasmiden der Murray-Stämme, so daß die Gensondentechnik hinsichtlich Plasmidanalysen epidemiologisch wertvolle Aussagen zuläßt.

Zur Untersuchung der Gesamtzell-DNA stehen weitere etablierte Gensondenverfahren zur Verfügung. Für die epidemiologische Typisierung von Salmonellen bedeutend sind das von Grimont & Grimont (1986) entwickelte Ribotyping sowie die von Lam & Roth (1983a) erstmalig beschriebene Insertionssequenz (IS) IS200 sowie die wenig später von den gleichen Autoren entdeckte Salmonellenspezifität dieser Sequenz, die sie als epidemiologischen Marker geeignet erscheinen ließ (Lam & Roth, 1983b). IS200 gehört mit einer Länge von 700 bp zu den kleinsten Insertionselementen, die bislang beschrieben wurden (Stanley & Saunders, 1996). Jedoch wurde diese Genuspezifität später durch Gibert et al. (1990) eingeschränkt, da diese Autoren IS200 auch bei *Shigella sonnei* und *Shigella flexneri* feststellten. In der Folgezeit durchgeführte intensive Studien an *S. Enteritidis*-Stämmen insbesondere durch die Autoren Stanley et al. (1991; 1992a) und Stanley & Baquar (1994) resultierten in einem geringen diskriminatorischen Index ( $D=0,30$ ), so daß IS200 bei diesem Serovar als alleinige Typisierungsmethode nicht geeignet ist (Weide-Botjes et al., 1997).

Die beim Ribotyping eingesetzten Gensonden werden zur Erkennung der für ribosomale RNS kodierenden Gene verwendet. Diese Sonden können homologen oder auch heterologen Ursprungs sein (Grimont & Grimont, 1986; Esteban et al., 1993). So entwickelten Brosius et al. (1981) eine Genprobe, die aus dem *rrnB* Operon von *E. coli* bestand und später von Martinetti & Altwegg (1990) zur Analyse von *S. Enteritidis*-Stämmen benutzt wurde, wobei das Differenzierungsvermögen dieser Technik wesentlich von dem zur Restriktion der Gesamtzell-DNA verwendeten Enzym abhängt (Altwegg et al., 1989). Liebisch & Schwarz (1996) verweisen in ihrem Übersichtsreferat auf unterschiedlich bestehende Auffassungen hinsichtlich der Auswahl eines geeigneten Restriktionsenzym zum Nachweis verschiedener *Salmonella enterica* Serovare.

### 2.8.3 Makrorestriktionsenzymanalyse

Im Unterschied zur Restriktionsenzymanalyse entstehen bei der Makrorestriktion nach Einwirken von selten schneidenden Restriktionsendonukleasen nur 15 bis 60 Fragmente, die nach Auftrennung in der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) ein spezifisches Muster ergeben (Schwartz et al., 1983). Dieses Muster ist nach Grothues & Tümmler (1991) charakteristisch für

jedes Bakterienisolat und kann zur Erklärung genomischer Verwandtschaftsgrade zwischen Bakterien der gleichen Art herangezogen werden. So konnten Ridley et al. (1996) mit Hilfe dieser Technik zeigen, daß Ampicillin resistente *S. Enteritidis*-Stämme vom Phagentyp 6a aus dem Phagentyp 4 hervorgegangen sind. Bautsch (1993) verweist in seiner Arbeit auf eine klonale Verwandtschaft von Stämmen von *S. Enteritidis*, Phagentyp 4, hin. Für 25 der 30 untersuchten Isolate, die aus dem humanen Bereich stammten, konnte der PT4 festgestellt werden. Insgesamt zeigten diese Stämme ein identisches *NotI* - Restriktionsfragmentmuster auf. Im Gegensatz dazu wiesen die übrigen 5 verschiedenen Phagentypen unterschiedliche Fragmentmuster auf. Mit dieser Studie wurde gleichzeitig die Phagentypie in ihrem hohen Potential verschiedene Isolate zu unterscheiden bestätigt.

#### 2.8.4 PCR - gestützte Analyseverfahren

Hierbei werden spezifische DNA-Abschnitte der Bakterien mit Hilfe der Polymerase chain reaction Technik (PCR) um den Faktor  $10^6$ - $10^{12}$  amplifiziert. Die Spezifität hängt von den Oligonucleotiden ab, die als Primer verwendet werden und von der für die Anlagerung der Primer benötigten Temperatur (Olsen et al., 1993).

Erfahrungen mit diesem Verfahren als epidemiologische Typisierungsmethode sind in der Literatur noch wenig beschrieben worden, zumal es sich um jüngere Entwicklungen handelt, die noch nicht etabliert sind. Darüber hinaus bestehen unterschiedliche Auffassungen hinsichtlich des diskriminatorischen Werts im Vergleich zu anderen Typisierungsmethoden (PFGE) für einzelne *Salmonella* Serovare (Duim et al., 1997; López-Molina et al., 1997). Andere Autoren sehen in den PCR-gestützten Verfahren und AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) eine realistische Möglichkeit, traditionelle Typisierungsmethoden wie die Serologie und Phagentypie abzulösen (Olsen et al, 1993).

#### 2. 9 Geeignete Typisierungsmethoden bei *S. Enteritidis*

Für die Typisierung der verschiedenen *Salmonella* Serovare sind vielfältige Methoden entwickelt worden. Neben den traditionellen, klassischen Techniken wie Biotypie, Phagentypie und Überprüfung der Antibiotikaresistenz wurde mit steigendem Verständnis für den Feinbau bakterieller Zellen zunehmend molekularbiologische Methoden entwickelt und installiert (Threlfall et al., 1989a; Helmuth et al., 1990). In Abhängigkeit des zu untersuchenden Serovars wurde jedoch festgestellt, daß nicht jede Typisierungsmethode das gleich große Diskriminierungspotential besitzt, so daß in den letzten 10 Jahren umfangreiche Studien zur Evaluierung geeigneter Methoden für die am häufigsten vorkommenden Serovare durchgeführt wurden. So konnten Olsen et al. (1997) in ihrer Arbeit zeigen, daß *IS200* sehr wohl für die Aufdeckung epidemiologisch verwandtschaftlicher Beziehungen innerhalb des *Salmonella* Serovar Typhimurium PT49, 110, 120 und 135 geeignet ist. Hingegen trifft dies für *S. Enteritidis*, wie

auch durch andere Autoren belegt (Stanley et al., 1991; Olsen et al., 1993), nicht zu. Nachdem für *Salmonella* Enteritidis die Phagentypie als zuverlässiger epidemiologischer Marker alleine angewendet (Threlfall et al., 1989a) und später bestätigt wurde (Bautsch, 1993), stellten Baggesen et al. (1997a) in ihrer Studie jedoch fest, daß Stämme, die dem PT7 angehören, nicht genetisch und damit epidemiologisch verwandt sind und dieser sehr wahrscheinlich aus den Phagentypen 1, 4 und 6 durch Verlust von Lipopolysacchariden hervorgegangen ist. Die durch diesen Verlust bedingte Konversion von PT4 zu PT7 wurde bereits in der Arbeit von Chart et al. (1989) beschrieben, hier jedoch mehr unter dem Aspekt des gleichzeitigen Virulenzverlusts für Menschen bei einer Infektion mit *S. Enteritidis* PT7 und weniger unter dem Gesichtspunkt der Unspezifität des PT7 als epidemiologischer Marker.

Einige Autoren (Brunner et al., 1983; Threlfall et al., 1989a; Brown et al., 1993) untersuchten die Möglichkeit, die seit 1981 von Shaberg et al. (1981) eingeführte Plasmidprofilanalyse als Alternative zur Phagentypie zu nutzen. Während für *S. Typhimurium* (Holmberg et al., 1984a; Threlfall et al., 1986; Wray et al., 1987) diese Methode erfolgreich angewendet wurde, konnte die Plasmidprofilanalyse bei *S. Enteritidis* nur bei bestimmten Phagentypen (PT4 und PT8) als epidemiologisch sinnvoller Marker eingesetzt werden (Threlfall et al., 1989a; Erdem et al., 1994; Threlfall et al., 1994a).

Erdem et al. (1994) untersuchten 38 türkische, aus dem humanen Bereich stammende *S. Enteritidis*-Stämme, die über einen Zeitraum von 2 Jahren (1992-1994) in vier verschiedenen Städten isoliert wurden. Insgesamt konnte für 25 Stämme der PT4 festgestellt werden. 17 Stämme dieses PT besaßen ein Plasmid mit einem Molekulargewicht von 38 MD, vier weitere Stämme wiesen 2 Plasmide mit einem Molekulargewicht von jeweils 38 MD und 20 MD auf, wiederum 2 weitere Stämme besaßen zusätzlich noch ein drittes Plasmid von 60 MD und eine Ampicillinresistenz, die durch dieses 60 MD Plasmid vermittelt wurde. Für einen Stamm konnte eine 70 MD plasmidcodierte Ampicillinresistenz zusätzlich zum vorhandenen 38 MD Plasmid nachgewiesen werden, und ein Stamm zeigte eine Trimethoprimresistenz, die nicht plasmidcodiert war, sowie das serovarspezifische 38 MD Plasmid. Mit dieser Studie wurde deutlich, daß die Plasmidprofilanalyse nicht nur geeignet ist, den Phagentyp 4 weiter zu differenzieren, sondern auch in Kombination mit der Antibiotikaresistenztestung epidemiologische Zusammenhänge hinsichtlich Eruierung von Infektionsketten und -quellen ermöglichte. Diese drei Techniken als epidemiologische Marker zur Charakterisierung von *S. Enteritidis*-Stämmen unterschiedlicher Herkunft zu verwenden, wurden von anderen Autoren (Rodrigue et al., 1992; Brown et al., 1994) ebenso favorisiert.

Milleman et al. (1995) verglichen in ihrer Studie den diskriminatorischen Wert der Plasmidprofilanalyse, Ribotyping sowie IS200 für Stämme der Serovare *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium*. Während *S. Typhimurium* durch das Ribotyping und IS200 differenziert wurde, konnten für *S. Enteritidis*, außer der Plasmidanalyse, keine weiteren Informationen auf der Basis restriktionsbedingter Analysen erzielt werden. Dies läßt bei diesem Serovar auf einen hohen Grad an genetischer Homogenität schließen, der bereits durch die Studien von Stanley et al. (1991; 1992a; 1992b) beobachtet werden konnte. Olsen et al. (1997) konnten jedoch die von

Stanley et al. (1991) durch IS200 definierten klonalen Linien SECLI und SECLII von *S. Enteritidis*-Stämmen unterschiedlicher Phagentypen durch die Kombination von vier genotypischen Typisierungsmethoden (IS200-, Ribo-, Pulsfeldgelelektrophorese und RFLP Typisierungen) bestätigen und darüber hinaus SECLI in weitere 4 Gruppen differenzieren. Daß die Kombination geeigneter molekularbiologischer Methoden zusammen mit der Phagentypie zur detaillierten Charakterisierung epidemiologischer Verwandtschaftsbeziehungen bei *S. Enteritidis* herangezogen werden kann, wird auch gegenwärtig durch die Autoren Weide-Botjes et al., (1997) und Laconcha et al., (1997) dokumentiert.

Tab. 2.9 zeigt eine Übersicht zur praktischen Anwendung molekularbiologischer Typisierverfahren bei *Salmonella Enteritidis*.

## 2. 10 Lebensmittelrechtliche Aspekte

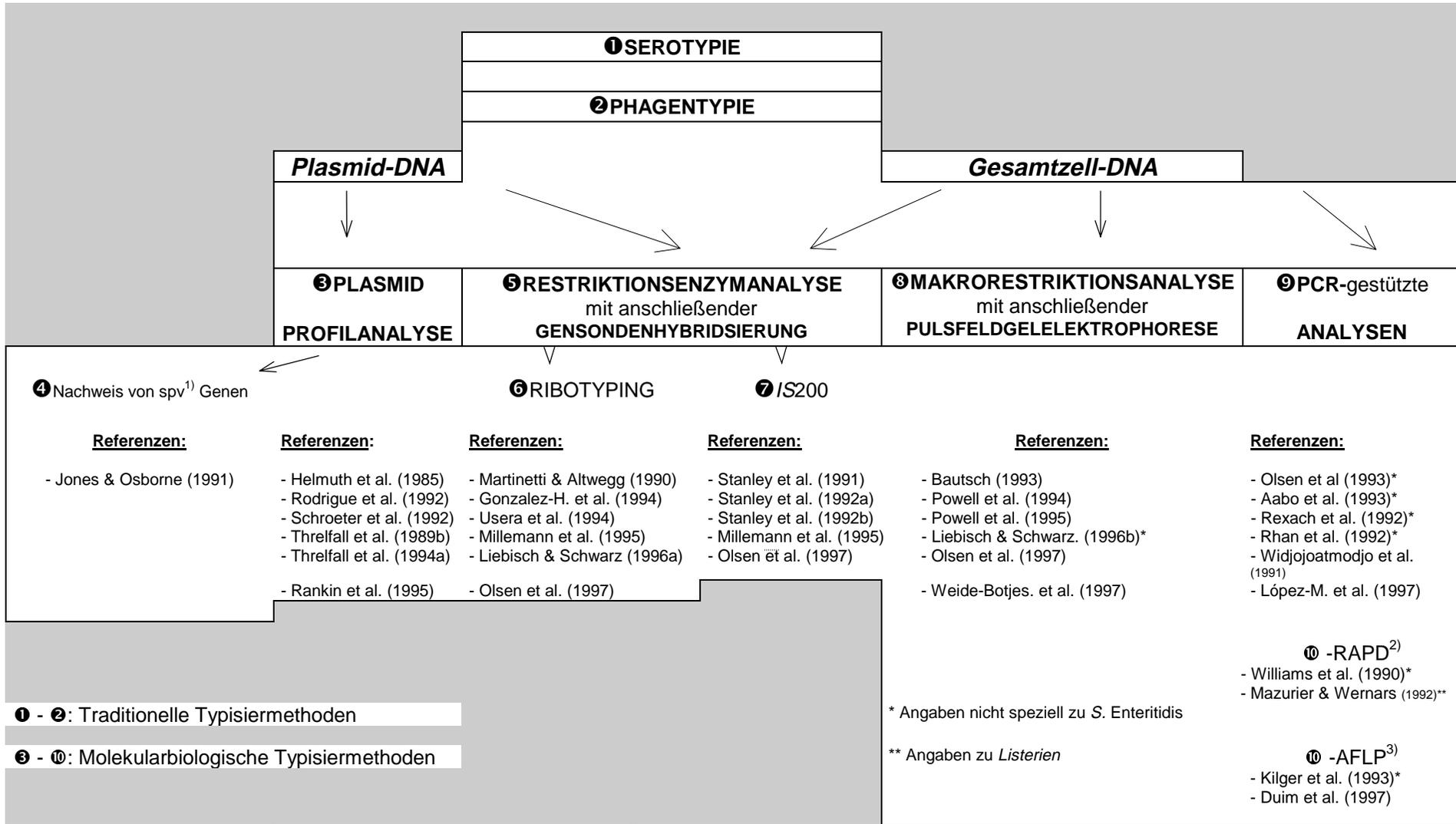
Aufgrund der ubiquitären Verbreitung von Salmonellen, deren Resistenzvermögen gegenüber Umwelteinflüssen sowie aufgrund der Tatsache, daß es sich bei diesen Mikroorganismen um Zoonoseerreger handelt, ist eine vollständige Beseitigung dieser Bakterien aus der Umwelt nicht möglich. In Hinblick auf die Vermeidung bzw. Reduzierung von Salmonellen bei Eiern und Eiprodukten sind daher in der Bundesrepublik Deutschland eine Reihe von Verordnungen erlassen worden.

Nach § 8 Nr.1 LMBG (1994) sind „Lebensmittel für andere derart herzustellen oder zu behandeln“, daß ihr Verzehr nicht geeignet ist, „die Gesundheit zu schädigen“. Dabei sollte bereits in der Urproduktion die Eliminierung von Infektionserregern, durch ständige Kontrollen sowie Impfung der Tiere, mit dem Ziel der Schaffung SPF-freier Tierbestände (Großklaus, 1991; Großklaus et al., 1991), erfolgen.

Die nationale Umsetzung der Richtlinie 92/117/EWG Zoonosen und Salmonellose-Kontrolle zur Bekämpfung von Salmonellen beim Geflügel erfolgte durch die 1994 erlassene Hühner-Salmonellen-Verordnung. In ihr sind Maßnahmen zur Minderung des Salmonellen-Eintrages in Geflügelzuchtbeständen verbindlich festgelegt. Weiterhin schreibt sie die Impfung von Junghennen in Aufzuchtbetrieben vor, die zum Zweck der Konsumeierproduktion aufgezogen werden.

In einer WHO-Langzeitstudie zur Senkung der Salmonellenbelastung in einer Geflügelfleischproduktionskette konnten die Autoren Käsbohrer et al. (1996) zeigen, daß auf vielen Produktionsebenen ein erheblicher Salmonellen-Eintrag zu ermitteln war. Insbesondere fand ein vertikaler Eintrag durch die Einstellung von Eintagsküken im Mastbetrieb statt. Durch geeignete und für die jeweilige Produktionsstufe adäquate Maßnahmen war es jedoch möglich, eine signifikante Abnahme der Salmonellen-Nachweisrate im Bereich der Mastbestände zu

Tab. 2. 9 Übersicht zur praktischen Anwendung molekularbiologischer Typisierverfahren bei *Salmonella* Enteritidis.



① - ②: Traditionelle Typisiermethoden

③ - ⑩: Molekularbiologische Typisiermethoden

<sup>1)</sup> *Salmonella* plasmid virulenz; <sup>2)</sup> Random Amplification of Polymorphic DNA; <sup>3)</sup> Amplified Fragment Length Polymorphism

erzielen. Insgesamt verdeutlicht die Studie, daß Sanierungskonzepte zur Senkung der Salmonellenbelastung in einem Tierbestand nur dann erfolgreich umgesetzt werden können, wenn eine bei allen Produktionsbeteiligten vorausgesetzte Kooperationsbereitschaft auch vorhanden ist.

Der Bekämpfung der Salmonellenbelastung und -kontamination von Lebensmitteln wird auch durch die Einführung der Hühnerei-Verordnung in der Fassung vom Dezember 1994 sowie durch die in der Fassung von 1993 geltende Eiprodukte-Verordnung Rechnung getragen. § 1 Absätze 2 bis 4 und § 2 (1) Nr 2 sowie § 3 der Hühnerei-Verordnung regeln den Umgang mit Eiern vom Beginn der Lagerung im Erzeugerbetrieb an bis zur Abgabe an den Verbraucher. Wesentliche Punkte sind:

- Kühlung ab dem 18. Tag nach dem Legen,
- Abgabefrist an den Verbraucher von maximal 21 Tagen nach dem Legen,
- Kennzeichnungspflicht:  
Verbraucherhinweis: *"bei Kühlschranktemperatur aufzubewahren, nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums durchzuerhitzen"*,
- maximale Mindesthaltbarkeit von 28 Tagen nach dem Legen,
- Kühlung (< 7 °C) von unerhitzten roheihaltigen Lebensmitteln nach maximal 2 h sowie deren Abgabe bis spätestens 24 h nach der Herstellung in Gewerbebetrieben.

Mit § 3 (5) Nr. 3a) und b) sowie Nr 4 der Eiprodukte-Verordnung (1993) wird die Herstellung Salmonellen-freier Eiprodukte geregelt. Vorgeschrieben sind, neben einer regelmäßigen Untersuchung der Produkte auf Salmonellenfreiheit, die Lagerungstemperaturen von gekühlten und gefrorenen Eiprodukten.

Im Hinblick auf die Produktion Salmonellen-freier Eier und Eiprodukte kommen ferner das Bundes-Seuchengesetz (1995) zur Anwendung, welches nach § 17 (1) Nr.1 und Nr. 3 ein Beschäftigungsverbot für Salmonellen-ausscheidende Personen, die in gefährdeten Bereichen arbeiten, regelt, sowie die Trinkwasserverordnung (1993), in deren Ausführungen (Anlage 1 Nr. 2) die Überprüfung des Vorhandenseins von Fäkalkeimen im Trinkwasser auf mögliche Verunreinigungen mit Salmonellen hinweist.

## 2. 11 Allgemeine Bedeutung von Antibiotika

Antibiotika gehören zu den Mitteln, die zur Behandlung bakterieller Infektionen eingesetzt werden. Im Unterschied zu Chemotherapeutika sind Antibiotika natürliche Stoffe, die von Mikroorganismen produziert werden und die das Wachstum anderer Mikroorganismen hemmen oder abtöten (Kroker, 1997). Mit der Entdeckung des Penicillins durch Fleming im Jahre 1929 (Fleming, 1929) begann eine neue Ära der therapeutischen Möglichkeiten bei Krankheiten, die durch pathogene Mikroorganismen hervorgerufen werden (Levy,1992). Diese Entdeckung sowie die darauf einsetzende intensive Suche nach weiteren antibiotisch wirksamen Substanzen galt nicht nur in der Medizin als einer der wichtigsten Fortschritte, sondern bedeutete auch eine

Umwälzung in gesellschaftlicher Hinsicht. So nahm die Lebenserwartung erheblich zu und als weitere Errungenschaft die Säuglingssterblichkeit ab (Helmuth, 1989).

Die daraus resultierende Erwartung und Euphorie, eines Tages Infektionskrankheiten besiegen zu können, wurde jedoch nicht erfüllt (Bitter-Suermann, 1996). Durch den kontinuierlichen und zunehmenden Einsatz von Antibiotika auch in der Veterinärmedizin, haben sich, aufgrund selektiver Bedingungen, Resistenzen entwickelt, die gleichermaßen bei Mensch und Tier vorkommen (O'Brien et al., 1982) und insbesondere bei lebensmittelbedingten Infektionen des Menschen zu unerwünschten, da therapeutisch schwieriger zu beeinflussenden (Linton, 1984) Situationen geführt haben (Helmuth & Protz, 1997). Antibiotika werden überwiegend in drei Bereichen eingesetzt. Zur Behandlung bakterieller Erkrankungen bei Mensch und Tier, zur Prophylaxe sowie als Leistungsförderer in der Tierernährung (Linton, 1984; Gast & Stephens, 1988; Moriñigo et al., 1990; Threlfall, 1992; Wray et al., 1993).

## 2. 12 Antibiotika als Leistungsförderer

Der Einsatz von AB als Leistungsförderer bei Tieren, die der Lebensmittelgewinnung dienen, wird von vielen Autoren als Ursache des gehäufteten Auftretens resistenter pathogener Mikroorganismen gesehen (Beutin, 1981; Hirsh et al., 1983; Dawson et al., 1984; Holmberg et al., 1984b; Linton, 1984; Gast & Stephens, 1986; Levy, 1987; Bitter-Suermann, 1996; Helmuth & Protz, 1997; WHO, 1997), zu denen neben *Enterokokken*, *Campylobacter*, *E. coli* und *Yersinien* vor allem die nicht-typhösen *Salmonellen* spp. zählen, die ihrerseits zu den Hauptverursachern lebensmittelbedingter Infektionskrankheiten gehören (Kvenberg & Archer, 1987; Endtz et al., 1991; Threlfall, 1992; Bates et al., 1994).

Die Entdeckung der antibiotischen Wirkung des Chlortetracyclins im Jahre 1947 durch Duggar (Levy, 1992) führte über die Verabreichung von *Actinomyces*-Rückständen an Schweinen zu der Erkenntnis, daß diese Substanz, in subtherapeutischen Dosen gegeben, eine darüber hinaus wachstumsfördernde Wirkung beinhaltet (Jukes et al., 1950). Da die Zeit bis zum Erreichen des Schlachtgewichts durch solche Stoffe erheblich verkürzt wurde, erfolgte deren Anwendung allein aus wirtschaftlichen Gründen, wurde doch schon immer nach Maßnahmen zur Verbesserung der Mastleistung beim Nutztier gesucht (Beutin, 1981). Zu Beginn der 50-iger Jahre wurden ähnliche Ergebnisse von verschiedenen Autoren (s. dazu Übersicht Visek, 1978) über andere Antibiotika erzielt, so daß, neben deren therapeutischen auch deren leistungsfördernde Wirkungen in Form von Futtermittelzusatzstoffen kommerzialisiert und europaweit sowie in den USA zum Teil unreflektiert eingesetzt wurden (Visek, 1978, Levy, 1992). Dieser nahezu unbekümmerte Umgang mit Antibiotika konnte sich bis Ende der 60-iger Jahre halten.

In einer bemerkenswerten Arbeit aus dem Jahr 1968 berichteten Anderson & Path von einer zunehmenden Infektion multiresistenter *S. Typhimurium* PT29 Stämmen bei Kälbern für die Jahre 1964-66. Weiterhin konnten Anderson & Path (1968) die bei den Kälbern festgestellte Infektion mit *S. Typhimurium* PT29 Stämmen im gleichen Zeitraum auch bei Menschen

nachweisen. Von den insgesamt eingesandten bovinen *Salmonella* Typhimurium-Stämmen gehörten 73,2% dem PT29 an, wovon 99,7% multiresistent waren. Analog dazu wurden von 576 eingesandten Humanisolaten des gleichen PT 96,5% für mehrfach-resistent befunden. Vor dem Hintergrund der transferierbaren Resistenz (Watanabe, 1963) postulierten Anderson & Path (1968) für dieses Ereignis eine Übertragung resistenter *S. Typhimurium*-Stämme der infizierten Tiere auf den Menschen über den direkten Kontakt oder über die Milch.

Die Ergebnisse ihrer Arbeit mündeten in der Forderung nach einer Neubewertung und Überprüfung des bisher unbegrenzten Einsatzes von AB als Futtermittelzusatzstoffe (Anderson & Path, 1968). In dem ein Jahr später erstellten "Swann-Report" (Anonymus, 1969) wurden erstmals Auswirkungen des unkontrollierten Antibiotika-Einsatzes diskutiert. Ferner wurden neben der Unterteilung in Therapie- und Wachstumsantibiotika verbindliche Richtlinien für die bis dato nicht bestehende Verschreibungspflicht von Therapieantibiotika, insbesondere im veterinärmedizinischen Einsatz, festgelegt (Linton, 1981). Diese Richtlinien führten in England zum Verbot von Antibiotika als Leistungsförderer, die gleichzeitig als Therapeutika beim Menschen angewendet wurden, und dem sich andere Länder, jedoch nicht die USA, anschlossen (Levy, 1992). Aufgrund der im Swann-Report gemachten Feststellung, daß Antibiotika, über einen längeren Zeitraum in subtherapeutischen Dosen gegeben, einen hohen Selektionsvorteil für resistent gewordene Mikroorganismen erzeugen und über die Nahrungskette auf den Menschen übergehen können, ist das seither für den Menschen und das Nutztier gleichermaßen bedeutungsvolle und zunehmende Resistenzproblem immer wieder Bestandteil zahlreicher Untersuchungen (O'Brien et al., 1982; Chaslus-Dancla, et al. 1991; Wall et al., 1995; Balis et al., 1996) aus unterschiedlichen Bereichen geworden. Für die Gesetzgebung der USA ist der Nachweis eines Zusammenhanges zwischen resistenten, beim Menschen zu Krankheiten führenden Erregern und der Verwendung von Penicillinen und Tetracyclinen als Leistungsförderer noch zu erbringen (Levy, 1992). Zahlreiche Arbeiten belegen jedoch den Transfer resistenter Mikroorganismen auf den Menschen. Levy et al. (1976) erzeugten eine in *E. coli* temperatursensitive Plasmidmutante (pSL222-6), die für Resistenzen gegen Chloramphenicol, Tetracyclin, Sulfonamiden und Streptomycin codierte. Diese resistenten *E. coli* wurden in das Intestinum von je 4 Küken eingebracht, die einzeln aufgestellt und mit tetracyclinhaltigem Futter gefüttert wurden. Nach vier Tagen wurde die Inokulation wiederholt und die Küken in je vier Käfige (A,B,C,D) mit weiteren 50 Küken plaziert. Von den vier Käfigen wurden zwei Käfige (B und D), jeweils mit und ohne Tetracyclin-Fütterung, in 50 m Entfernung des Betriebs aufgestellt. Die übrigen zwei (A und C) wurden unter gleichen Fütterungsbedingungen auf dem Gelände aufgestellt. Nach zwei Monaten konnte aus den Kotproben der Käfige A und B je 14 und 24% *E. coli* mit dem Resistenzplasmid pSL222-6 isoliert werden. Von insgesamt 14 Betriebsangehörigen, die mit der Betreuung und Probensammeln dieser Käfige beschäftigt waren, konnte in zwei Fällen pSL222-6 nachgewiesen werden. Mit dieser Studie wurde deutlich gezeigt, daß antibiotikahaltige Futtermittel das Wachstum resistenter *E. coli* selektieren und diese auf den Menschen übertragbar sind (Levy et al., 1976).

In der Folge der wissenschaftlichen Untersuchungen konnte der Zoonosencharakter auch für andere *Enterobacteriaceae*, insbesondere für *Salmonella* spp nachgewiesen werden (O'Brien et al. 1985; Holmberg et al., 1984b; Olsvik et al., 1985; Tacket et al., 1985; Gast et al., 1988; Levy, 1987; Threlfall et al., 1989b; Threlfall, 1992; Heisig et al., 1995; Wall et al., 1995). Dabei wurden Kälber, Rinder und Geflügel als Hauptreservoir für *Salmonella* Typhimurium und *Salmonella* Enteritidis beschrieben (Palmer & Rowe, 1986; Humphrey et al., 1988; Brown et al., 1994). Noch heute ist der Wirkungsmechanismus von Leistungsförderern nicht vollständig geklärt (Corpet, 1996). Möglicherweise hemmen AB, die zur Leistungsförderung eingesetzt werden, den bakteriellen Abbau von Aminosäuren im Gastrointestinaltrakt, wodurch es zu einer denkbar besseren Bereitstellung und Resorption der Nahrungsbestandteile kommt. Außerdem wird die Konzentration toxischer Substanzen wie Ammoniak und Amine reduziert (Visek, 1978).

Der Einsatz von Avoparcin als Leistungsförderer in Mastbetrieben hat besonders bei den Enterokokken zur Selektion resistenter Stämme geführt, die, wie *E. coli*, als Plasmid- oder Transposonreservoir gelten können (Corpet, 1996). Weiterhin wurde eine Kreuzresistenz gegen Vancomycin festgestellt, das in der Humanmedizin bislang als Reservemittel bei Enterokokkenbedingten Septikämien eingesetzt wurde. Mehrere innerhalb der letzten drei Jahre durchgeführte Studien (Bates et al., 1994; Witte, 1997; Danish Veterinary Laboratory, 1995) berichteten über Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) Stämme, isoliert bei Schweinen und Geflügel, die Avoparcin als Futtermittelzusatzstoff erhielten. Nach Woodford et al. (1995) wurde bei 9 von 10 Vancomycin-resistenten *E. faecium*-Stämmen Multiresistenzen gegen Penicilline, Gentamicin, Chinolone sowie Chloramphenicol gefunden. Im Frühjahr 1997 wurde Avoparcin als Leistungsförderer in der Mast bei Tieren, die der Lebensmittelgewinnung dienen, europaweit verboten (Richtlinie 97/6/EG der Kommission zur Änderung der Richtlinie 70/524/EWG).

Umstände, wie der illegale aber auch therapeutische Einsatz von Antibiotika, die Änderung der Darmflora beim Tier mit zunehmenden Alter, Diäten, sowie mikrobiologische Kontamination durch andere Tiere und Menschen (Linton, 1985) haben zu erheblichen Schwierigkeiten bei der Beurteilung der Selektionseigenschaften von nutritiv genutzten Antibiotika geführt. Um diese besser bewerten zu können, wurden 1984 im Rahmen eines Symposiums Kriterien und Methoden zur mikrobiologischen Evaluierung von Leistungsförderern in Futtermitteln festgelegt (Helmuth & Bulling, 1985). 1987 wurden auf europäischer Ebene verbindliche Richtlinien für die Bewertung von Zusatzstoffen in Futtermitteln für Tiere festgeschrieben (Richtlinie 70/524/EWG). Danach müssen mikrobiologische Tests sowie gesonderte Untersuchungen aller Antibiotika bezüglich deren Resistenzrisiko durchgeführt werden (Helmuth & Protz, 1997).

Tabelle 2.12 gibt Auskunft über die derzeit in Europa zugelassenen Antibiotika als Futtermittelzusatzstoffe (Anhang 1, Richtlinie 70/524/EWG der Kommission).

Tab. 2. 12 In Europa zugelassene Futtermittelzusatzstoffe: Antibiotika

Zusatzstoff	chemische Bezeichnung	Spektrum	Tierarten	Risiken für den Mensch
Avilamycin	Orthosomycin	grampositiv, antikoziostatisch	Ferkel, Schweine, Masthühner	-
<b>Avoparcin seit Frühjahr 1997 verboten</b>	Glykopeptid	grampositiv	Masthühner, Masttruthühner, Ferkel, Schweine, Kälber, Mastrinder	Vancomycin Resistenz
Flavomycin	Glykophosolipid	grampositiv	Legehennen, Truthühner, Tauben, Ferkel, Schweine, Pelztiere außer Kaninchen, Kälber,	-
Zink-Bacitracin	Polypeptid	grampositiv	Legehennen, Truthühner, Gänse, Tauben, Kälber, Schaf- und Ziegenlämmer, Ferkel, Schweine, Pelztiere außer Kaninchen	-
Carbadox	Quinoxalin	gramnegativ	Ferkel, bis 4 Monate	carcinogen
Olaquinox	Quinoxalin	gramnegativ	Ferkel, bis 4 Monate	carcinogen
Spiramycin	Makrolid	grampositiv	Truthühner; Sonstiges Geflügel außer Enten, Gänsen, Legehennen. Tauben, Kälber, Schaf- und Ziegenlämmer, Ferkel, Schweine, Pelztiere außer Kaninchen	Kreuzresistenz gegen Vertreter der MLS-Gruppe
Tylosin	Makrolid	grampositiv	Ferkel, Schweine	Kreuzresistenz gegen Vertreter der MLS-Gruppe
Virginiamycin	Streptogramin	grampositiv	Legehennen, Truthühner, Sonstiges Geflügel außer Enten, Gänsen. Tauben, Ferkel, Schweine, Kälber, Mastrinder	Kreuzresistenz gegen Vertreter der MLS-Gruppe
Monensin	Polyether	grampositiv, antikoziostatisch	Mastrinder	-
Salinomycin	Polyether	grampositiv, antikoziostatisch	Ferkel, Schweine	-

modifiziert nach Corpet, 1996 und Richtlinie 70/524/EWG der Kommission

Nach Cassell (1995) ist die Antibiotika-Resistenz in den 90-ziger Jahren zu einem Problem der Öffentlichkeit geworden, welches eine noch größere Sorgfaltspflicht der zulassenden und überwachenden Institutionen sowie der Human- und Veterinärmediziner bezüglich der Kontrolle der im Gebrauch befindlichen Antibiotika erfordert (Helmuth & Protz, 1997). Die als Leistungsförderer eingesetzten Antibiotika haben nach Ungemach (1996) hinsichtlich der bakteriellen Resistenzentwicklung und der Übertragung von Resistenzen auf den Menschen die größte Bedeutung erlangt.

## 2. 13 Resistenz (Allgemeines)

Zum Verständnis der sehr raschen Verbreitung von Resistenzen innerhalb von Mikroorganismen soll nachfolgend einiges zur Resistenz und deren Entwicklung bei Bakterien zusammengefaßt werden. Für die erfolgreiche Verbreitung von Mikroorganismen spielt nach Courvalin (1996) eine unter Selektionsdruck bestehende Antibiotikaresistenz eine größere Rolle als das Vorhandensein von Virulenzfaktoren. Dies hängt von der Art und Weise ab wie Bakterien Resistenzen erwerben oder übertragen.

Nachfolgend zwei mögliche Bestimmungen der Resistenz:

### 2. 13.1 Resistenz (Definition)

Die Entstehung einer verminderten Empfindlichkeit pathogener Mikroorganismen gegen Pharmaka (Bruns, 1983),

oder bezogen auf antimikrobiell wirksame Substanzen:

Ein pathogener Mikroorganismus muß dann als resistent bezeichnet werden, wenn die in vitro ermittelte minimale Hemmkonzentration (MHK) (DIN, 1996) eines Antibiotikums oder Chemotherapeutikums höher ist als die in vivo am Infektionsort erreichbare Serum- bzw. Gewebekonzentration (modifiziert nach Adam & Christ, 1987).

Hierbei stellt man die natürliche der erworbenen Resistenz gegenüber.

### 2. 13.2 Natürliche Resistenz

Bei der natürlichen Resistenz handelt es sich um eine species spezifische, stets vorhandene Unempfindlichkeit eines Mikroorganismus für einen bestimmten Wirkstoff (Smith & Lewin, 1993). Als Beispiel sei hier die natürliche Resistenz von *E. coli* gegenüber den Makroliden sowie die der Species *Pseudomonas* gegenüber Benzylpenicillin erwähnt (Smith & Lewin, 1993, Courvalin, 1996).

### 2. 13.3 Erworbene Resistenz

Hinsichtlich der erworbenen Resistenz verfügen Mikroorganismen (Bakterien) grundsätzlich über zwei genetische Mechanismen: Entweder erfolgt der Erwerb durch Mutation oder durch den Transfer von Resistenzgenen (Davies, 1980; Datta 1984; Courvalin, 1996).

## 2. 14 Mutation

Bei einer Mutation kommt es durch Modifikation der zellulären DNA zu einer Veränderung des Erbguts. Diese kann einem Bakterium bei entsprechend antibakterieller Exposition einen dem Wildtyp gegenüber entscheidenden Selektionsvorteil gewähren. Diese Mutanten überleben unter dem Selektionsdruck einer antibakteriell wirksamen Substanz, während der Wildtyp zu Grunde geht (Davies, 1980).

Die Mutation beinhaltet eine Änderung der DNA-Basen-Sequenz, deren einfachste Form sogenannte Punktmutationen darstellen. Dabei wird nur eine Base modifiziert. Ihnen stehen größere Veränderungen des Erbguts gegenüber. Diese werden ermöglicht durch Deletionen (Verlust von Basenpaaren), Insertionen (Hinzufügen von Basenpaaren) oder auch durch Inversion (Herausschneiden und Einsetzen eines DNA-Moleküls in umgekehrter Reihenfolge) einer DNA-Sequenz (Hutchinson, 1996).

Für das Vorkommen und die Verteilung von Resistenzgenen spielt nach heutigem Erkenntnisstand auch die Mutation eine epidemiologische Rolle, da sie an die Tochterzellen weitergegeben werden kann (Pidcock, 1996). Zwar bleibt eine Verbreitung dieser Resistenz innerhalb einer Spezies begrenzt (Smith & Lewin, 1993), kann aber in einem lokal begrenzten Raum zu Entwicklung von Resistenzen führen. Auch beschrieben LeClerc et al. (1996) in ihren Untersuchungen hohe Mutationsraten (>1%) bei pathogenen *E. coli* und *S. enterica*-Stämmen. Die resultierenden defekten MMR-Mutanten zeigten eine bis zu 1000-fach höhere Rifampicin Resistenz als ihre Wildtypen (Kontrollen) und gestatteten DNA-Rekombinationen zwischen verschiedenen Bakteriengenera, womit rasche Verteilung gegeben war (LeClerc et al., 1996).

Die von Acar & Goldstein (1997) beschriebene zunehmende Fluorochinolon-Resistenz bei den *Enterobacteriaceae* ist auf eine Mutation der für die Fluorochinolone wichtigen Angriffspunkte - DNA-Gyrase A und B oder Topoisimerase IV- zurückzuführen (Neu, 1992; Pidcock, 1995; Heisig, 1997) und wird chromosomal gebunden weitergegeben. Da die Fluorochinolone aber bislang erfolgreich als Mittel der Wahl bei schweren, auch nicht-typhösen Salmonellosen eingesetzt werden (Dutta et al., 1993), hat diese Resistenzentwicklung bei immunsupprimierten, alten Menschen und Kindern fatale Folgen, zumal andere Antibiotika (Ampicillin, Chloramphenicol sowie Trimethoprim und Sulfmethoxazol), die früher eingesetzt wurden, ebenso resistent sind (Muñoz et al., 1993) und neue antimikrobiell wirksame Substanzen in absehbarer Zeit nicht verfügbar sind (Bax, 1997).

## 2. 15 Übertragbare Resistenz

Hingegen erfolgt eine sehr viel raschere Verbreitung durch den Transfer von Resistenzgenen, die auf extrachromosomalen DNA-Strukturen (Plasmiden oder Transposonen) vorhanden sind. Sie dienen den Genen als Vektor. Aufgrund der Übertragungseigenschaften bestimmter sogenannter konjugativer Plasmide können Gene, die auf solchen Strukturen lokalisiert sind,

---

nicht nur innerhalb sondern auch zwischen den einzelnen Bakterienspezies und Genera weitergegeben und verbreitet werden (Saunders, 1984). Plasmidcodierte Resistenzen und deren Transfer sind besonders für die Familie der *Enterobacteriaceae* typisch (Rowe & Threlfall, 1984; Neu, 1992).

### 2. 15.1 Molekulare Grundlagen des Resistenztransfers

Für die Ausbreitung von Resistenzen stehen drei Übertragungswege zur Verfügung, deren genetische Aspekte in den letzten drei Jahrzehnten hinlänglich untersucht wurden. Nur die Kombination geeigneter Transferemechanismen, die unter selektiven Bedingungen wirksam werden, gewähren eine erfolgreiche Verteilung und schnelle Resistenzentwicklung im Sinne eines evolutionären Vorganges (Courvalin, 1996).

#### 2.15.1a Konjugation

Plasmide sind extrachromosomale DNA-haltige ringförmige Elemente, die sich unabhängig von der bakteriellen Wirtszell-DNA duplizieren und für das Überleben der Wirtszelle nicht erforderlich sind (Davies, 1980; Broda, 1979). Bakterien erhalten aber dadurch zusätzliche Informationen, die sich unter selektiven Bedingungen, als vorteilhaft erweisen können; codieren sie doch nicht nur für verschiedene Resistenzen sondern auch für andere Funktionen wie z.B. Virulenz. Somit können Bakterien sich rasch veränderten Bedingungen anpassen, wodurch auch die Dynamik der Resistenzentwicklung gegenüber neuen Antibiotika verdeutlicht wird (Saunders, 1984; Helmuth, 1989).

Plasmide, die Resistenzgene besitzen, werden als R-Faktoren bezeichnet und bestehen - sofern sie transferierbar sind - aus zwei genetisch unterschiedlichen Abschnitten. Der eine Teil enthält Gene, die für den Transfer des gesamten Plasmids codieren, während der andere die Gene besitzt, die verantwortlich sind für die Resistenz, die exprimiert wird (Helmuth, 1990). Der Vorgang des Plasmid-Transfers wird als Konjugation bezeichnet, bei dem der Kontakt zwischen einer plasmidhaltigen Zelle (Donor) und einer anderen Zelle (Recipient) durch einen Sex-Pilus entsteht, über den Kopien von Plasmiden an den Recipienten weitergegeben werden können (Firth et al., 1996).

Damit wird der Recipient zum (potentiellen) Donor mit neuen genetischen Informationen (Levy, 1992).

Daß ein genetischer Informationsaustausch auf extrachromosomaler Ebene stattfindet, wurde bereits 1946 durch Lederberg und Tatum beschrieben. Sie führten den Austausch von Genen bei *E. coli*-Stämmen auf das Vorhandensein einer extrachromosomalen Struktur zurück und bezeichneten ihn als F-Faktor (fertility). Die Entdeckung übertragbarer Resistenzplasmide durch

Watanabe (1963) erfolgte, nachdem Akiba et al. (1960) und Ochiai (1959) die Übertragbarkeit von Resistenzen zwischen Shigellen und *E. coli*-Stämmen nachweisen konnten.

#### 2. 15.1b Transduktion

Hierbei werden Plasmide mit Hilfe von Bakteriophagen, die als Vektoren dienen, zwischen Mikroorganismen übertragen (Falkow, 1975). Dieser Transfer erfolgt nur innerhalb einer Bakterienspezies, da die Anheftung des Virus von geeigneten Rezeptoren auf der Zelloberfläche der Wirtszelle (Bakterien) abhängt (Saunders, 1984), so daß ein genetischer Austausch nur zwischen gram-verwandten Spezies stattfinden kann (Reanny, 1976; Davies, 1980). Obwohl die Transduktion als natürliches Ereignis vor allem bei grampositiven Erregern nachgewiesen wurde und somit eine gewisse epidemiologische Bedeutung erhält (Lacey, 1975), spielt sie eine größere Rolle bei molekularbiologischen Untersuchungen, wo sie z.B. zur Erstellung von Genkarten eingesetzt wird (Masters, 1996).

#### 2. 15.1c Transformation

Eine weitere Möglichkeit des Gentransfers bietet die Transformation, bei der die Übertragung durch Aufnahme freier DNA in die Wirtszelle mit möglicher Integration in das Genom erfolgt (Levy, 1992). Im Unterschied zur Transduktion ist ein Austausch von Genen auch zwischen verschiedenen Genera möglich (Saunders, 1984), jedoch ist die Bedeutung der Transformation für die Verbreitung von Resistenzen bei gramnegativen Erregern epidemiologisch noch ungeklärt. Sie wird analog der Transduktion für molekularbiologische Zwecke eingesetzt (Hanahan & Bloom, 1996).

#### 2. 15.1d Transposition

Neben der Konjugation ermöglicht die Transposition eine weitere sehr rasche Verbreitung und Verteilung von Resistenzen sowohl innerhalb als auch zwischen einzelnen Bakterienspezies. Hierbei können mobile DNA- Sequenzen (Transposons) von einem Donor zu einem Recipienten springen, unabhängig ob dieser eine Wirtszell-DNA, einen Phagen oder ein Plasmid darstellt (Saunders, 1984; Helmuth, 1990). Daher benötigen die Transposons zur Integration ihrer genetischen Information in andere DNA-Strukturen keine DNA-Homologie (Levy, 1992).

Da Transposons im Gegensatz zu Plasmiden nicht replizieren können, sind sie auf ihre jeweilige Wirts-DNA angewiesen. Außer dem Erwerb neuer genetischer Informationen (Antibiotikaresistenz, Resistenz gegen Schwermetalle) kann die Transposition strukturelle DNA-Veränderungen (Deletionen, Fusionen, Inversionen) innerhalb des Genoms bewirken, die

zusätzlich exprimiert werden (Muster et al., 1981; Craig, 1996).

Tabelle 2. 15 enthält ausgewählte Literaturangaben zu den einzelnen Transfermechanismen.

Tab. 2. 15 Literaturangaben zu den Transfermechanismen

Transfer	Referenz:
-Konjugation	(Achtman et al., 1979); (Davies, 1980); (Levy,1992); (Neu, 1992); (Courvalin, 1996); (Firth et al., 1996)
-Transduktion	(Saunders, 1984); (Levy,1992); (Neu, 1992); (Masters, 1996)
-Transformation	(Saunders, 1984); (Levy,1992); (Neu, 1992); (Hanahan & Bloom, 1996)
-Transposition	(Levy,1992); (Neu, 1992); (Courvalin, 1996); (Craig, 1996)

## 2. 16 Resistenzmechanismen

Unabhängig davon wie Resistenzgene verteilt werden, haben Mikroorganismen die im folgenden wesentlichen Resistenzmechanismen entwickelt: Es sind dies die Umwandlung eines Antibiotikums in eine unwirksame Substanz, weiterhin die Konzentration eines Antibiotikums innerhalb einer Zelle gering zu halten, die Angriffspunkte des Antibiotikums zu verändern sowie im Sinne einer Substitution, alternative Angriffsziele für das Antibiotikum zu produzieren (Helmuth, 1990; Levy 1992; Neu, 1992; Salyers & Whitt, 1994).

In Abhängigkeit der Wirkungsweise von Antibiotika haben sich die genannten Resistenzmechanismen entwickeln können, wobei keine unmittelbare Wechselwirkung zwischen der Stoffklasse eines Antibiotikums und der durch das Bakterium ausgebildeten Resistenzmechanismen besteht. In einigen Fällen bedeutet erst die Kombination verschiedener Mechanismen den erfolgreichen Schutz der Zelle vor der antibiotischen Wirkung (Krügel, 1997). Für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antibiotika sowie die entsprechend entstandenen Resistenzmechanismen existiert eine umfangreiche Literatur, auf die nur übersichtsweise eingegangen wird.

## 2. 17 Ausgewählte Antibiotika-Stoffklassen sowie deren Resistenzmechanismen

### 2. 17.1 $\beta$ -Lactam-Antibiotika

Zu dieser Stoffklasse zählen vier Gruppen von Substanzen, deren Hauptmerkmal der gemeinsame Besitz eines  $\beta$ -Lactam-Ringes ist, der für die antibiotische Wirkung verantwortlich gemacht wird. Dabei handelt es sich um die Penicilline sowie die Aminopenicilline mit erweitertem Wirkungsspektrum, die Cephalosporine, Carbapeneme sowie

Monobactamantibiotika (Salyers und Whitt, 1994; Kroker, 1997). Über erste Resistenzen gegenüber Penicillinen wurde 1954 bei *Staphylococcus aureus* berichtet, nachdem diese Gruppe erst 1942 in den USA und England für den klinischen Gebrauch zugelassen wurde (Levy, 1992; Prescott, 1993a). Bereits 10 Jahre nach der Einführung des halbsynthetisch hergestellten Ampicillins im Jahre 1964 mehrten sich Berichte über Ampicillin-resistente Infektionen. Hauptverantwortlich für die Inaktivierung der Antibiotika sind die Bildung und Sekretion von  $\beta$ -Lactamasen, Enzyme, die den  $\beta$ -Lactam-Ring hydrolysieren und somit unwirksam werden lassen. Nach Medeiros (1997) existieren heute 178  $\beta$ -Lactamasen, die aufgrund ihrer Substratspezifität und inhibitorischen Funktionen in vier Gruppen eingeteilt werden können. Die hohe Anzahl solcher Lactamasen reflektiert den Wunsch nach immer neuen  $\beta$ -Lactam Antibiotika, in der Hoffnung, daß diese aufgrund der Spezifität bereits vorhandener Enzyme nicht zerstört werden können (Salyers und Whitt, 1994).

Ein besonders bei den grampositiven Bakterien vorkommender Resistenztyp stellt die Alteration der Penicillinbindenden Proteine (PBPs) dar, die innerhalb der cytoplasmatischen Membran gelegen sind und dort als Transpeptidasen die für den Zellwandaufbau verantwortliche Peptidoglycansynthese katalysieren. Hierbei codieren Resistenzgene für einen Austausch von Aminosäuren an der Bindungsstelle des Proteins, so daß im Falle des *mec* Gens, Methicillin nicht mehr an das PBP2a binden kann (Reynolds, 1984; Neu, 1992). Die Methicillinresistenz entwickelte sich in zweierlei Hinsicht zu einem ernststen Problem. Galt doch die Einführung dieser halbsynthetischen Substanz bei *S. aureus* als Antwort auf die durch die  $\beta$ -Lactamasen induzierte allgemeine Penicillin und Cephalosporinresistenz, so führten die bei dieser Spezies mit Methicillin durchgeführten Langzeitbehandlungen zu Kreuzresistenzen gegenüber allen Vertretern dieser Stoffklasse (MRSA). Das daraufhin verstärkt eingesetzte Glykopeptid Vancomycin ist die alleinige noch wirksame Substanz und birgt die Gefahr in absehbarer Zeit ebenso wirkungslos zu werden, da resistente Enterokokken als Reservoir und potentielle Donatoren dienen (Levy, 1997). Die Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) Stämme sind exemplarisch für die außerordentlich schnelle Entwicklung von Resistenzen, da sie mit Ausnahme des Vancomycins gegenüber allen verfügbaren Antibiotika, auch gegen Fluorochinolone, unempfindlich geworden sind (Neu, 1992).

## 2. 17.2 Aminoglykosidantibiotika

Analog den  $\beta$ -Lactamantibiotika werden Aminoglykoside ebenso durch modifizierende Enzyme inaktiviert. Jedoch geschieht dies nicht durch Hydrolyse sondern durch Hinzufügen von Phosphoryl-, Adenyl-, oder Acetylgruppen an bestehende Amino- bzw. OH-Gruppen. Entsprechend existieren Phosphotransferasen (APH), Adenyltransferasen (AAH) und Acetyltransferasen (AAC), die wegen ihrer unterschiedlichen Bindungen am Substrat zusätzlich mit arabischen Ziffern und beim Vorliegen unterschiedlicher Resistenzprofile mit römischen Ziffern bezeichnet werden.

Solche Bindungs- sowie Substratunterschiede spiegeln sich in der Vielfalt und Anzahl von modifizierenden Enzymen wider, die überdies auch noch geographisch variieren. Miller et al. (1997) berichten von 53 verschiedenen Aminoglykosid-Resistenzmechanismen bei 2.080 Isolaten verschiedener Genera (*Escherichia*, *Morganella*, *Proteus*, *Salmonella* und *Shigella*).

Die Modifizierung durch die im Cytoplasma lokalisierten Enzyme (Shaw et al., 1993) verhindert die Bindung des Antibiotikums an die 30S Untereinheit der Ribosomen, wodurch eine reguläre Proteinsynthese weiterhin gewährt bleibt (Saylers & Whitt, 1994).

Außer der Inaktivierung des Antibiotikums durch modifizierende Enzyme existieren weitere Resistenzmechanismen.

Eine Änderung der Membranpermeabilität für Aminoglykoside führt zu einer geringeren Aufnahme in die Wirtszelle, die somit resistent wird, ohne über substratmodifizierende Enzyme zu verfügen (Phillips & Shannon, 1984). Als dritte Möglichkeit wird die ribosomale Resistenz im Sinne einer Alteration des Zielmoleküls diskutiert, die aber bei den therapeutisch eingesetzten 2-deoxystreptaminhaltigen aminoglykosidischen Aminocyclitolen (Kanamycin und Gentamicin) unbedeutend ist (Phillips & Shannon, 1984). Ein Beispiel ist die Mutation auf dem *strA* Gen, die 1964 von Davies als erste bei *E. coli* beschrieben und untersucht wurde. Diese Mutation codiert für das ribosomale Protein S 12, welches seinerseits Strukturveränderungen bei 70S Untereinheiten von Ribosomen vornimmt und somit ursprünglich streptomycinsensibel in resistente Stämme umwandelt. Jedoch sind Berichte über solche Mutationen gegenwärtig selten (Reynolds, 1984). Eine andere, noch endgültig nachzuweisende Möglichkeit der Resistenzausbildung ist der verstärkte Efflux von Aminoglykosiden mit Hilfe eines "ABC-Exporters". Hierbei handelt es sich um einen energieabhängigen Sekretionsweg, der von membranständigen ATPasen gebildet wird. Diese ATPasen besitzen eine hydrophobe, innerhalb der Membran lokalisierte, und eine im Cytoplasma gelegene Domäne, die eine Nucleotidbindungsstelle besitzt. ABC-Exporter verfügen über eine hohe Substratspezifität entweder für die Aufnahme oder den Export von Stoffen. Alpha-Hämolyisin und Metalloproteasen als spezifische Substrate für *E. coli* und *P. aeruginosa* sind untersucht worden (Wandersman, 1996). In *Streptomyces griseus* wurden 2 Gene (*StrV* und *StrW*) beschrieben, die für ein Exportsystem codieren welches, phosphorylierte Zwischenstufen des Genprodukts *StrA* transportiert. Inwieweit eine "Umwidmung" solcher allgemeinen Transportsysteme zur Resistenzentwicklung im Sinne eines Exports toxischer Substanzen bei Zellen stattfindet, bleibt gegenwärtig unklar (Krügel, 1997).

Nachdem Streptomycin im Jahre 1944 als erstes aus *Streptomyces griseus*, einem Mitglied der Familie der *Aktinomyceten*, isoliert und wiederum als erstes Antibiotikum erfolgreich gegen *Mycobakterium tuberculosis* eingesetzt wurde, machten die stark toxischen Nebenwirkungen seinen Einsatz bald fraglich (Levy, 1992). 1957 wurde Kanamycin und 1963 Gentamicin als Therapeutikum zugelassen. Gentamicin-resistente *Pseudomonas*-Stämme tauchten bereits 1968 auf. Trotz weiterer Entwicklungen konnte das Problem der Toxizität, insbesondere die ototoxischen und nephrotischen Wirkungen, nicht gelöst werden, so daß seit Mitte der 70-iger Jahre keine neuen Aminoglykoside mehr auf den Markt gekommen sind (Prescott; 1993b).

### 2. 17.3 Chloramphenicol

Chloramphenicol wurde im Jahre 1948 als erstes Breitspektrumantibiotikum für den klinischen Gebrauch zugelassen, nachdem es 1947 aus *Streptomyces venezuela* in Caracas isoliert wurde (Levy, 1992). Außer gramnegativen und grampositiven Bakterien hemmt Chloramphenicol Rickettsien, Chlamydien und Mycoplasmen, was zu der Bezeichnung Breitspektrumantibiotikum führte. Erste Berichte über klinisch resistente Chloramphenicol-Stämme erfolgten durch Watanabe (1963), der in seinen umfassenden Studien an multiresistenten (Streptomycin, Tetracyclin und Chloramphenicol) *Shigella*-Isolaten aus dem Jahre 1959 zum Begründer der plasmidvermittelten Resistenz bei Mikroorganismen wurde. Dabei stellte er fest, daß die Übertragung der Resistenzfaktoren von *E. coli* auf Shigellen unabhängig vom F-Faktor geschieht und somit ein anderer Transfer-Faktor (Episom) vorliegen mußte (Watanabe, 1963). Auch bei dieser Stoffgruppe wird die Resistenz durch enzymatische Inaktivierung der antibiotisch wirksamen Substanz erzielt. Eine Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) katalysiert die acetyl-CoA abhängige Acetylierung der C-3 Hydroxylgruppe des Antibiotikums, welches nicht mehr an die 50 S-Untereinheit der 70S-Ribosomen binden kann (Shaw, 1984; Kroker, 1997). Darüber hinaus existieren plasmidcodierte CAT Varianten, die unterschiedlich produziert werden. Die bei gramnegativen Erregern vorkommenden CAT Varianten werden im Unterschied zu grampositiven Bakterien, bei denen diese erst durch Anwesenheit von Chloramphenicol induziert werden, kontinuierlich synthetisiert. Dies hat ein viel höheres Resistenzniveau bei erstgenannten Mikroorganismen zur Folge (Shaw, 1984). Das in *S. venezuela* produzierte Chloramphenicol wird durch eine Phosphorylierung an der C-3 Hydroxylgruppe inaktiviert (Krügel, 1997; Mosher et al., 1995).

Chloramphenicol unterliegt aufgrund seiner teilweise tödlich verlaufenden Nebenwirkungen spezifischen rechtlichen Bestimmungen. So wurde diese Substanz durch die Verordnung (EG) Nr. 1430 / 94 in den Anhang IV der RatsVo 2377 / 90 aufgenommen und darf deswegen bei lebensmittelliefernden Tieren nicht mehr verwendet werden (Kroker, 1997).

### 2. 17.4 Tetracycline

Die Tetracycline sind ebenso wie das Chloramphenicol antibiotisch wirksame Substanzen mit einem breiten Wirkungsspektrum (gramnegative und grampositive Bakterien, Mykoplasmen, Rickettsien sowie Chlamydien), deren erster Vertreter, Chlortetracyclin, im Jahre 1947 entdeckt wurde (Levy, 1992). Im Gegensatz zu Chloramphenicol, welches wegen seiner starken Nebenwirkungen eher als Reservemittel eingesetzt wurde, erwiesen sich die Tetracycline als die am geringsten toxischen Antibiotika, die je entwickelt wurden (Salyers & Whitt, 1994). Diese Eigenschaften führten zu einer rasch zunehmenden Produktion und einem hohen Verbrauch dieser Antibiotika, vor allem in den Entwicklungsländern (Levy, 1992). Die aus dem weltweiten Gebrauch resultierenden Resistenzen, insbesondere durch die bei lebensmittelliefernden Tieren als Leistungsförderer eingesetzten Tetracycline, haben mittlerweile den therapeutischen Nutzen

---

auf wenige Erreger eingeschränkt. So können nach Speer et al. (1992) Tetracycline noch bei Infektionen durch Chlamydien, Rickettsien, bei Brucellose und bei der Lyme-Disease verwendet werden, hingegen nicht mehr bei der durch Neisserien hervorgerufenen Gonorrhoe, deren Behandlung bis Ende der 80-ziger Jahre durch Tetracycline als Mittel der Wahl erfolgte. Anhand dieser Stoffgruppe ist besonders gut das breite Vorkommen und die Verteilung von Resistenzgenen zu beobachten, da die plasmidcodierten Tetracyclinresistenzen nicht nur bei den durch die Gramfärbung charakterisierten Bakterien vorkommen, sondern nun auch bei Mykobakterien, für die bislang chromosomale Mutationen und Deletionen als einzige Resistenzmechanismen nachgewiesen wurden (Pang et al., 1994, Roberts, 1997). Ein wesentlicher Resistenzmechanismus ist zum einen die Reduktion der Tetracyclinkonzentration in der Zelle durch verminderte Aufnahme in die Zelle oder gesteigerten Efflux (Speer et al., 1992). Dies führt zu einer Konzentration, die nicht mehr ausreicht, um an die 30S-Untereinheit der Ribosomen zu binden (Levy, 1992). Bei gramnegativen Bakterien wird eine Alteration der in der äußeren Zellmembran gelegenen Porin-Proteine (unter anderem OmpF) für einen geringeren Input diskutiert.

Ein vermehrter Efflux des Antibiotikums wird durch ein in der Cytoplasmamembran gelegenes Protein gesteuert, indem es durch einen energieabhängigen Transportvorgang Tetracyclin, das intrazellulär als Magnesium-gebundener Komplex vorliegen kann (Yamaguchi et al., 1991), hinaustransportiert. Gegenwärtig existieren 8 Tetracyclin-Efflux-Genklassen, wobei bis auf die Klassen M und Q alle übrigen Resistenzgenklassen plasmidcodiert sind (Speer et al., 1992). Das "Abschirmen" der Ribosomen vor einer möglichen Bindung des Tetracyclins durch ein im Cytoplasma gelegenes Protein wird in der Literatur als weniger häufig verbreitet angesehen. Hierbei kommt es zu einer noch nicht ausreichend verstandenen Interaktion des Proteins an den Elongationsfaktor EF-G (O'Neill et al., 1995). Drei Resistenzgene (*tetM*, *tetO*, und *tetQ*) sind für die ribosomalen Protektion beschrieben worden (Salyers & Whitt, 1994). Ein dritter Resistenztyp, der bislang nur bei aeroben Bakterien nachgewiesen wurde, beschäftigt sich mit der enzymatischen Inaktivierung von Tetracyclinen, deren klinische Bedeutung noch nicht geklärt ist (Sperr et al., 1992). Tetracyclin ist selbst an der Regulation verschiedener Resistenzgene beteiligt. In Untersuchungen an *Bacteroides*-Stämmen konnte nachgewiesen werden, daß die Transferfrequenz konjugativer Transposons, auf denen *tetQ* lokalisiert ist, bis zu 100-fach höher war im Falle eines vorherigen Wachstums der Stämme in tetracyclinhaltigem Medium (Valentine et al., 1988). Die Tatsache, daß ein Antibiotikum den Transfer der eigenen Resistenz steuern kann (Stevens et al., 1993) verdeutlicht, inwieweit Antibiotika zusätzlich zu ihren selektiven Funktionen im Sinne der evolutionären Resistenzverteilung eingebunden werden können (Davies, 1997).

---

### 2.17.5 Nitrofuran-Derivate

Im Unterschied zu den biosynthetisch gewonnenen Antibiotika handelt es sich bei den Nitrofuran-Derivaten um synthetisch hergestellte nitroheterocyclische Chemotherapeutika, deren antimikrobielle Wirkung erstmalig von Dodd & Stillman (1944) beschrieben wurde. Diese konnten die Autoren auf das Vorhandensein einer 5-Nitrogruppe sowie unterschiedlicher Substituenten in der Position 2 des Furanrings zurückführen. Neben ihrem breiten Wirkungsspektrum gegen gramnegative und grampositive Bakterien sowie gegen Giardien, Trichomonaden und Amöben, besitzen die Nitrofurane zusätzlich antioxiidantische Eigenschaften (Merck Veterinary Manual, 1986), die insbesondere Furazolidon als geeignetes Antioxiidantikum auszeichnen. So konnten Berg et al. (1956) in ihrer Studie zeigen, daß Furazolidon bei Mastkücken, die in kokzidienhaltiger Einstreu gehalten wurden, höhere Wachstumsraten ermöglichte, als Nitrofurazone, Nitrophenide und Sulphaquinoxaline.

Da die Nitro-Chemotherapeutika selbst antimikrobiell unwirksam sind und erst durch bakterielle enzymatische Reduktion aktiviert werden (Cramer, 1947), berichteten Asnis & Gots (1951) über zwei reduzierende Enzymsysteme, die jeweils unter aeroben (Nitroreductase 1) oder auch anaeroben (Nitroreductase 2) Bedingungen aktiv sein können. Die enzymatische Reduktion führt über mehrere reaktive Zwischenstufen (Nitroradikale, Nitroso-Gruppen und Hydroxylamin) schließlich zu offenkettigen Nitrilen.

Furazolidon entwickelte sich ab Mitte der 50-iger Jahre zum Mittel der Wahl bei der Behandlung der durch *S. Gallinarum* hervorgerufenen Geflügelsalmonellose (Chadfield, 1995), nachdem viele Studien über die Verwendung dieses Wirkstoffes als Therapeutikum durchgeführt worden waren (Lucas, 1954; Williams-Smith, 1954; Grumbles et al., 1954). Ebenso konnten experimentell hervorgerufene *S. Typhimurium* und *S. Thompson* Infektionen beim Geflügel durch Furazolidon erfolgreich behandelt werden (Wilson, 1955).

In den 60-iger Jahren jedoch häuften sich Berichte über ein zunehmendes Vorkommen Furazolidon-resistenter Salmonellen Serovare. Hall & Cartrite (1961) untersuchten vier *S. Gallinarum* Isolate, die aus einer an Salmonellose erkrankten Küken- und Putenherde in Texas stammten und erfolglos mit Furazolidon behandelt wurden. Die in-vitro auf Furazolidon getesteten Stämme waren vollständig sensibel, jedoch entwickelte ein Stamm eine Resistenz bei fortwährend durchgeführten Passagen in Furazolidon haltigem Medium. In einem weiteren Versuch wurde dieser Stamm zu Infektionsversuchen an Truthähnen herangezogen und erwies sich wiederum als resistent gegenüber Furazolidon (Hall & Cartrite, 1961), was zu der Annahme führte, daß der kontinuierliche Gebrauch dieser Substanz Furazolidon-resistente Stämme selektieren könnte.

In ihren Untersuchungen an 8 Furazolidon-resistenten *E. coli*-Stämmen, die vom Menschen und Haustieren isoliert wurden, konnten Williams-Smith & Halls (1966) den bereits früher (Stuart et al., 1963) vermuteten mutationsbedingten Charakter der Nitrofuranresistenz bestätigen.

Obwohl zahlreiche Studien (Aoki et al., 1974; Arai et al., 1975; Oliver, 1981; Breeze & Obaseiki-Ebor 1983) zur Übertragbarkeit von Nitrofuranresistenzen durchgeführt wurden, konnte sich eine

plasmidbedingte Resistenzübertragung in Verbindung mit dieser Substanz als allgemeingültige Lehrauffassung nicht durchsetzen. Vielmehr wurden chromosomal bedingte Mutationen für die Resistenzentwicklung verantwortlich gemacht (McCalla et al., 1978), die durch die bei der bakteriellen Reduktion entstehenden reaktiven Zwischenprodukte der Nitrofurane ausgelöst werden können. Dabei kommt es zunächst zu einer schwachen Bindung der reaktiven Nitrofuranmetabolite an die Chromosomen-DNA, die dann zur kovalenten Brückenbildung von 2 benachbarten Basenpaaren eines DNA-Stranges führen können (Mukherjee & Chatterjee, 1992). Eine Folge solcher Mutationen resultiert in einem Mangel an mikrobieller Nitrofuranreduktaseaktivität, der als Hauptursache für die Resistenzentwicklung gegenüber Nitrofuranen angenommen wird (McCalla et al., 1978).

Da die bei Mikroorganismen entstehenden DNA-Schäden auch in Säugerzellen ausgelöst werden können (durch Bildung reaktiver Zwischenprodukte), und wegen der damit verbundenen ungeklärten Toxizität, wurden sämtliche Nitrofurane in den Anhang IV der RatsVo 2377/90/EWG aufgenommen. Dies führte zu einem Verbot der Anwendung bei lebensmittelliefernden Tieren. Mittlerweile wurden alle Zulassungen widerrufen, so daß keine Präparate - auch für nicht lebensmittelliefernde Tiere - auf dem Markt existieren (Kroker, 1997).

Tabelle 2. 17 zeigt die hier besprochenen Antibiotika bezüglich Entdeckung, Resistenz sowie deren Wirkungsmechanismen in der Übersicht.

## 2. 18 Vorkommen und Verbreitung resistenter *Salmonella* Enteritidis in Deutschland und Europa

Im allgemeinen sind die Resistenzraten bei *S. Enteritidis* weltweit recht niedrig. Allerdings wird seit Beginn der 70-iger Jahre kontinuierlich über Vorkommen und Verbreitung vor allem auch mehrfachresistenter Stämme berichtet.

Im Rahmen einer umfangreichen polnischen Studie wurde im Jahre 1971 bei 87% von 361 untersuchten *Salmonella* Enteritidis-Stämmen aus dem Jahre 1964 eine Multiresistenz gegen 7 Antibiotika festgestellt (Lachowicz, 1971). Die Ergebnisse dieser Studie bestätigten Resultate anderer Autoren, die in den 60-iger Jahren bereits von multiresistenten Stämmen innerhalb der Familie *Enterobacteriaceae* berichteten (Guinée, 1965).

Terakado et al. (1980) untersuchten 217 verschiedene *Salmonella*-Stämme unterschiedlicher tierischer Herkunft. 70% der 49 *Salmonella* Enteritidis-Stämme zeigten eine Multiresistenz gegen mehr als drei Antibiotika.

Eine Infektion mit multiresistenten *Salmonella* Enteritidis-Stämmen in West-Afrika der Jahre 1980-82 führte in 30% der 100 untersuchten Patienten zum Tod. Multiresistente Stämme waren bis zu diesem Zeitpunkt nicht in Liberia bekannt (Hadfield et al., 1985).

In einer weiteren Studie wurden 67% der 35 untersuchten malaysischen *Salmonella* Enteritidis-Stämme für multiresistent und 37% für monoresistent befunden (Son et al., 1995).

Die in den vier Arbeiten beschriebene Multiresistenz ist für *Salmonella* Enteritidis im Unterschied zum Vorkommen multiresistenter *S. Typhimurium* DT204c (Threlfall et al., 1978;

Tab. 2. 17 Übersicht Antibiotika: Entdeckung, Resistenzentwicklung, Resistenzmechanismen sowie Wirkung und genetische Determination

Antibiotikum	Entdeckt 1,2,3,3a)	klinischer Gebrauch 1,2,3,8)	Resistenzen 1,2,3)	Resistenzmechanismen	Effekt / Wirkung	Genetische Determination		Referenz
						Mutation	Gene	
β - Lactam - Penicillin - Ampicillin - Methicillin	1940	1943	1940	β - Lactamasen Penicillin-bindende Proteine (PBPs)	Inaktivierung des AB Alteration der PBPs	X <sup>1)</sup> X <sup>5)</sup>	X <sup>1)</sup>	Reynolds (1984) Levy (1992) Neu (1992) Salyers & Whitt (1994) Kroker (1997) Medeiros (1997) Levy (1997) Phillips & Shannon (1984) Reynolds (1984) Levy (1992) Prescott (1993)
	1961	1964	1974					
	1960	1961	1965					
Aminoglykoside - Streptomycin - Gentamicin - Kanamycin	1944	1947	1956	Acetyltransferasen Phosphotransferasen Adenyltransferasen Änderung des Membranpotentials ribosomale Resistenz ABC-Exporter	Inaktivierung des AB  reduzierte Membranpermeabilität  Modifikation der 70 S Ribosomen Efflux des AB	X <sup>7)</sup>  X <sup>5)</sup>	X <sup>7)</sup>  X <sup>4)</sup>	Shaw et al. (1993) Salyers&Whitt(1994) Wandersman (1996) Krügel (1997) Kroker (1997) Miller et al. (1997)
	1963	1967	1970					
	1957	1957	1961					
Chloramphenicol	1947	1948	1955	Acetyltransferasen (CATs) Phosphotransferasen	Inaktivierung des AB		X <sup>1)</sup>	Watanabe (1963) Shaw (1984) Levy (1992) Mosher et al. (1995) Kroker (1996) Krügel (1997) Valentine et al. (1988)
Tetracycline - Chlortetracyclin	1948	1952	1956	Efflux-Proteine Alteration membranständiger Porin-Proteine ribosomal gebundenes Protein Oxidoreductase	Efflux verminderter Input  ribosomale Protektion  Inaktivierung des AB	X <sup>1)</sup> X <sup>6)</sup>	X <sup>6)</sup> X <sup>6)</sup>	Levy (1992) Speer et al. (1992) Stevens et al. (1993) Salyers&Whitt(1994) Pang et al. (1994) O'Neill et al. (1995) Davies (1997) Roberts (1997) Levy (1997)
Nitrofurane	1944	1953	1960	Mangel an Nitrofuranreductase I und II	Bildung reaktiver Metabolite, die die Wirtszell-DNA schädigen (mutagen z.T. cancerogen)	X <sup>9)</sup>		Cramer (1947) Asnis (1951) Hall & Carrite (1961) McCalla (1978) Mukherjee & Chatterjee (1992)

<sup>1)</sup> Davies (1997) <sup>2)</sup> Levy (1992) <sup>3)</sup> Prescott (1993) <sup>3a)</sup> Dodd & Stillman (1944) <sup>4)</sup> Krügel (1997) <sup>5)</sup> Reynolds (1984) <sup>6)</sup> Speer et al. (1992) <sup>7)</sup> Phillips & Shannon (1984) <sup>8)</sup> Chadfield (1995) <sup>9)</sup> McCalla (1978)

---

1985 & 1986; Wray et al., 1993; Graeber et al., 1995) und DT104 (Wall et al., 1995; Low et al., 1996) Isolate nicht typisch. Vielmehr wird *Salmonella* Enteritidis im europäischen Raum zwar als einer der am häufigsten isolierten Erreger angesehen (Liesegang et al., 1997), gilt aber im allgemeinen als sensibel gegenüber den häufig verwendeten Therapieantibiotika (Helmuth, 1997). Insbesondere die Entwicklung und das Vorkommen multiresistenter Stämme bei diesem Serovar sind selten (Frost et al., 1989; Threlfall et al., 1993; Ramos et al., 1996; Threlfall et al., 1997). Dennoch wird immer wieder von unterschiedlichen Autoren über das Vorkommen von monoresistenten Stämmen in Europa vor allem gegenüber  $\beta$ -Lactam Antibiotika berichtet (Lee et al., 1993a; Vatopoulos et al., 1994; Barguelli et al., 1995; Leegaard et al., 1996; Ramos et al., 1996).

Hinsichtlich der Entwicklung von Chinolonresistenzen gelten Salmonellen im allgemeinen noch als hoch sensibel (Hof et al., 1991). Über das Risiko des Transfers Chinolon-resistenter Isolate vom Tier auf den Menschen bei *Campylobacter* spp. wurde berichtet (Endtz et al., 1991). Jedoch existieren auch Studien zu Chinolonresistenzen bei Salmonellen tierischer Herkunft (Griggs et al., 1994; Helmuth & Protz, 1997) sowie deren Fähigkeit zur Ausbildung von Kreuzresistenzen gegen Fluorochinolone und chemisch nicht verwandten Antibiotika (Pers et al., 1996). Frost et al. (1996) berichten von einer zunehmenden Ciprofloxacinresistenz sowohl aus dem humanen als auch veterinärmedizinischen Bereich und hier insbesondere bei Tieren, die der Lebensmittelgewinnung dienen. Dies deutet auch auf den zunehmenden Gebrauch der Chinolone in der Veterinärmedizin hin (Griggs et al., 1994). Bereits 1989 wurden Nalidixin-resistente *Salmonella*-Stämme vom Geflügel in England isoliert (Wray et al., 1990a). In Deutschland sind Chinolone seit 1989 für den therapeutischen Gebrauch auch bei lebensmittelliefernden Tieren zugelassen. Helmuth & Protz (1997) berichten jedoch von Chinolon-resistenten *Salmonella* Typhimurium-Stämmen bereits in den Jahren 1986 und 1987.

### 3. Eigene Untersuchungen

#### 3.1 Material und Methoden

##### 3.1.1 Material für die bakteriologische Untersuchung

##### 3.1.2 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten resistenten und sensiblen *S. Enteritidis*-Stämme wurden der Stammsammlung des Fachgebietes "Molekularbiologie und Veterinärmedizinische Salmonellazentrale des Fachbereiches "Diagnostik und Epidemiologie" des BgVV entnommen. Diese Stämme, die im Rahmen von bakteriologischen und diagnostischen Untersuchungen isoliert wurden, lagern in der Stammsammlung als Stichkulturen vor. Zunächst erfolgte die Auswertung der vorhandenen Isolate der Jahre 1974-1975, um die Antibiotikaresistenz bei Salmonellen festzustellen.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden zwei Arbeitsansätze realisiert:

a)

Insgesamt wurden 94 Stämmen der Jahre 1986-1995 hinsichtlich ihrer Antibiotikaresistenzen gegen Tetracyclin; Ampicillin; Chloramphenicol; Kanamycin und Gentamicin überprüft. Von den 94 Stämmen wurden 65 repräsentative Stämme ausgewählt anhand derer die Übertragung von Antibiotikaresistenzen mit Hilfe von Kreuzungsversuchen überprüft wurde. Neben der Bestimmung der Phagentypen<sup>1</sup> wurden zur Untersuchung eines weiteren epidemiologischen Markers, Plasmidprofilanalysen durchgeführt. Hierbei werden die Zahl und die Größe der innerhalb eines Stammes vorliegenden Plasmide analysiert.

b)

Zusätzlich wurden 113 Stämme aus dem Jahre 1995 bezüglich ihrer Nitrofurantoin- und Furazolidonresistenz überprüft.

Außer diesen Wildtypen, deren Eigenschaften im Appendix, Anhang 1 aufgeführt sind, wurden für die molekularbiologischen Untersuchungen *E. coli* Referenzstämme (Standards) benutzt, die in der Tabelle 3.1 dargestellt sind.

Tabelle 3.1 Verwendete Referenz- und Laborstämme

Plasmide der Referenzstämme	Spezies	Molekulargewicht in Md	relevante Eigenschaften	Referenz / Herkunft
R 27	<i>E. coli</i>	112.0		Bukhari et al., (1977)
R 1	<i>E. coli</i>	62.0		Bukhari et al., (1977)
RP4	<i>E. coli</i>	36.0		Bukhari et al., (1977)
Col E 1	<i>E. coli</i>	4.2		Bukhari et al., (1977)
<b>Bezeichnung</b>				
BB1	<i>E. coli</i>		Nal, Rif, his, trp, lys, lac (Recipient)	Helmuth et al., (1981)
ATCC 25922	<i>E. coli</i>		Kontrollstamm	American Type Culture Collection*
2176 / 95	<i>S. Typhm. O5 neg.</i>		Kontrollstamm	Stammsammlung des BgVV
1432 / 95	<i>S. Enteritidis</i>		Kontrollstamm	Stammsammlung des BgVV
2373 / 95	<i>S. Enteritidis</i>		Kontrollstamm	Stammsammlung des BgVV
2375 / 95	<i>S. Enteritidis</i>		Kontrollstamm	Stammsammlung des BgVV

\* **American Type Culture Collection**, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852 USA

<sup>1</sup> gemäß dem Typisierschema von Ward et al. (1987), durchgeführt von W. Rabsch (BgVV, Wernigerode) und A. Schroeter (BgVV, Berlin)

## 3. 1.3 Medien

Die bei der Herstellung der nachfolgend aufgeführten Medien benötigten Puffer, Lösungen, Aminosäuren, Zuckertlösungen und Antibiotika wurden durch Filtration oder Autoklavieren sterilisiert. Für feste Medien wurden 25ml pro Petrischale eingefüllt. Tabelle 3.2 enthält die verwendeten Medien.

Tabelle 3.2 Verwendete Medien

Bezeichnung	Bedeutung	Rezeptur	Bemerkungen
Flüssige Medien			
a) L - Broth	Vollmedium, zum unselektiven Wachstum von Bakterien	1l Aqua bidest: 10g Bacto-Tryptone; 5g Yeast-Extrakt; 10g NaCl;	BgVV-Eigenherstellung gemäß Luria-Bouillon Difco Lab., Detroit, USA : Art. Nr. 0123-17-3 Difco Lab., Detroit, USA : Art. Nr. 0123-17-9 Merck Art. Nr. 1.01540.5000
b) Medium 56	Ausgangspuffer für alle Minimalplatten	1l Aqua bidest: 550,8ml 0,1M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 350,1ml 0,1M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 18ml 10% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 1,8ml 10% MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O 0,9ml 1,44% Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O 0,9ml 0,05% FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	BgVV-Eigenherstellung Merck Art. Nr. 6585 Merck Art. Nr. 5101 Merck Art. Nr. 1217 Merck Art. Nr. 5886 Merck Art. Nr. 2123 Merck Art. Nr. 3965
c) Medium 56 / 2	Mangelmedium	Medium 56 Aqua bidest im Verhältnis 1 : 1	BgVV-Eigenherstellung
d) D - Medium		L - Broth 56 / 2 Medium im Verhältnis 1 : 1	Alle Verdünnungen wurden in D - Medium ausaegeführt
Feste Medien			
a) L - Platten	Medium zum routinemäßigen Wachstum von Bakterien	L - Broth 2% Difco-Agar	Difco Lab., Detroit, USA : Art. Nr. 0123-17-3
b) Gassner - Platten	Selektives Medium zum Wachstum von Enterobacteriaceae	1l Gassner-Agar (Wasserblau-Metachromgelb-Lactose-Agar) zu 1l Aqua bidest: 14,0 g Spezialpepton 43 g Lactose 5,0 g NaCl 1,25 g Metachromgelb 0,625 g Wasserblau 13 g Agar pH = 7,1 ± 0,2	BgVV-Eigenherstellung nach Oxoid (CM 431)  Lactose negativ: Salmonellen, erscheinen gelb Lactose positiv: E. coli, erscheinen blau
c) Mueller-Hinton Platten	Platten zur Resistenzprüfung von Mikroorganismen	1 l Mueller-Hinton Agar zu 1l Aqua bidest: 2,0 g Rindfleisch, getrocknete Infusion aus 300 g 17,5 g Caseinhydrolysat 1,5 g Stärke 17,0 g Agar pH = 7,4 ± 0,2	BgVV-Eigenherstellung nach OXOID (CM 337)
d) Feuchtagar	Halbfester Agar zum Nachweis der H-Antigene (Geißeln)	1l Aqua bidest: LL Bouillon mit Fleischextrakt <sup>2)</sup> 0,45 g Agar 0,1 g Traubenzucker	BgVV-Eigenherstellung:  OXOID CM 325 Merck Art. Nr. 8342
e) Minimalagarplatten	Medium zur Kontrolle des Wachstums der Transkonjuganten, die im Laufe der Kreuzungsversuche entstanden sind.	Medium 56 gewünschte Aminosäuren gewünschte Antibiotika Lösung 1:1 mit geschmolzenem 4% Agar vermischen	BgVV-Eigenherstellung Donator und Recipient werden jeweils in ihrem Wachstum durch entsprechende Zusätze gehemmt.

<sup>2)</sup> zu 1000ml Aqua bidest: 7,0 g Fleischextrakt (Liebig-Pastete) ; Importhaus H. Wilms GmbH, Belgien  
10 g Bacto - Pepton, Difco Laboratories , Detroit, USA; Art. Nr. 0118 -17- 0  
3 g NaCl, Merck Art. Nr. 101540.5000; 2 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 12 H<sub>2</sub>O; Merck Art. Nr. 1.06579

### 3. 1.4 Allgemeine Kultur- und Lagerungsbedingungen

Soweit nicht anders angegeben wurden die Bakterienstämme wie folgt kultiviert:

Von einer Reinkultur (Gassner-Platte) wurde eine Einzelkolonie in 2ml L-Broth überimpft und über Nacht bei 37°C bebrütet.

Im Falle einer Aufbewahrung wurde von jedem Stamm 2ml einer ü. N. Kultur mit 2ml 50% Glycerin in L-Broth versetzt, kurz auf dem Vortex geschüttelt und davon 1,8ml in Nunc™<sup>® 3)</sup> Tubes eingefüllt und bei -30°C gelagert.

### 3. 1.5 Serologischen Untersuchungen

#### 3. 1.5.1 Material für die serologische Untersuchung

Die serologische Differenzierung erfolgte mit *Salmonella*-Testseren, die im BgVV hergestellt wurden:

- Polyspezifisches Testserum Anti-*Salmonella* I
- Gruppenspezifisches Testserum Anti-*Salmonella* D
- monospezifisches Testserum Anti-*Salmonella* H gm

#### 3. 1.5.2 Agglutinationstest

Die Gattung *Salmonella* gehört der Familie der *Enterobacteriaceae* an. Da sich die Salmonellen morphologisch kaum von anderen Gattungen der Familie unterscheiden, werden biochemische Methoden zur Bestimmung der Spezies eingesetzt.

Innerhalb der Gattung *Salmonella* werden aufgrund verschiedener O- und H-Antigene serologische Methoden benutzt, um den Serovar zu bestimmen (Kaufmann, 1975).

Die jüngste Auflage des Kauffmann-White-Schemas beschreibt 2422 Serovare in der für die Veterinärmedizin bedeutende Spezies *Salmonella enterica*. Der *Salmonella*-Serovar Enteritidis wird durch die Antigenformel 1, 9, 12: gm: 1.7 definiert (Popoff et al. 1996).

Für den Nachweis der O-Antigene der Salmonellen wurden die zu überprüfenden Stämme auf Gassner-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37° bebrütet. Da im Rahmen dieser Arbeit nur *S. Enteritidis* untersucht wurde, wurde ein Kaninchenserum, welches Antikörper gegen die für *S. Enteritidis* bestimmenden Körperantigene 1, 9, 12 enthält, mit einer kleinen Menge der zu untersuchenden Kultur auf einem Objektträger verrieben. Das Gemisch wurde bei schwacher Vergrößerung (6-fach) mit einer Lupe beobachtet.

Eine positive Agglutination äußert sich in einer Verklumpung der Bakterien, bei der ein Immunpräzipitat langsam sichtbar wird (Jawetz et al., 1977).

Um Geißelantigene nachzuweisen, wurde die Kultur mit einer Öse punktförmig auf einer Feuchtplatte aufgetragen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Durch Ausbildung der Geißelantigene sind die H-Phasen sehr gut nachweisbar. Zu diesem Zweck wird wiederum mittels eines antikörperhaltigen Kaninchensersums gegen die H-Antigene g und m agglutiniert. Das Ergebnis ist eine Flockenbildung, die rasch einsetzt und durch Schütteln wieder verschwindet (Jawetz et al., 1977).<sup>3</sup>

---

<sup>3</sup> Fa Intermed Cryo Tubes Art. Nr. 343958

### 3. 1.6 Test auf Antibiotikaresistenz

#### 3. 1.6.1 Material und Durchführung

Die Resistenzprüfung erfolgt auf der Grundlage einer Arbeitsempfehlung: "Resistenzbestimmung schnell wachsender Bakterien", veröffentlicht durch den AVID<sup>4</sup> (1996). Mittels fester Kulturmedien (Mueller-Hinton-Agar) wird die Prüfung als Agardiffusionstest mit standardisiert beladenen Testplättchen nach DIN 58 940 durchgeführt (Firma OXOID Deutschland GmbH, Wesel).

Einige Kolonien des zu untersuchenden Stammes wurden in 2ml L-Broth suspendiert und 24 h bei 37°C bebrütet. Mit einer kalibrierten Platinöse wurden anschließend ca 10<sup>6</sup> Bakterien in 1ml physiologischer Kochsalzlösung verbracht. Diese Suspension wurde auf Mueller-Hinton-Agar ausgespatelt. Die überschüssige Flüssigkeit wurde abgesaugt. Bei diesem Verdünnungsgrad wurde ein Wachstum von nicht konfluierenden Bakterienkolonien erreicht. Anschließend wurde die Agarplatte mit den entsprechend antibiotikabeladenen Testplättchen mit Hilfe eines Dispensers beschickt (Firma OXOID Deutschland GmbH, Wesel, Art. Nr. R 27 624-002). Die Ablesung erfolgte nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C. Tabelle 3.3 gibt Auskunft über die verwendeten Antibiotikamengen sowie die Bewertungsstufen.

Tabelle 3.3 verwendete Antibiotikamengen µg / Disc

Antibiotikum	µg / Disc	<u>Bewertungsstufen: Hemmhof in mm</u>		Fa OXOID
		Resistent	Sensibel	
Tetracyclin	30	≤ 16	≥ 22*	Art. Nr. 45 099
Ampicillin	10	≤ 14	≥ 22*	Art. Nr. 44 878
Chloramphenicol	30	≤ 20	≥ 21*	Art. Nr. 45 159
Kanamycin	30	≤ 13	≥ 18**	Art. Nr. 44 848
Gentamicin	10	≤ 14	≥ 21*	Art. Nr. 45 161
Nitrofurantoin	100	≤ 10	≥ 22***	Art. Nr. 38 715
Furazolidon	100	≤ 16	≥ 22***	Art. Nr. 446 89

\* DIN-Norm 58 940, 10 / 96; \*\* Comité de l'antibiogramme de la Société Française de microbiologie, 1995

\*\*\* DIN-Norm 58 940 12 / 94

### 3. 1.7 Test auf Übertragbarkeit der Resistenz (Kreuzungsversuche)

Für die Untersuchungen wie wirkungsvoll resistente *S. Enteritidis* Stämme ihre Resistenzdeterminanten übertragen, wurden Kreuzungsexperimente durchgeführt und die Transferierungsfrequenzen bestimmt. Eine Übersicht zu den Stämmen mit ihren Transferierungsfrequenzen befindet sich im Appendix, Anhang 2. Die Kreuzungsversuche wurden bei 37 °C bzw. bei 22° durchgeführt.

Im wesentlichen handelt es sich hierbei um das Kreuzen eines Donators (entsprechender *S. Enteritidis*-Stamm) mit einem Recipenten (*E. coli* K-12 (BB1)), aus dem Transkonjuganten (*E. coli* mit entsprechend erworbenen Eigenschaften) resultieren. Für diese Experimente müssen einige Vorarbeiten geleistet werden:

Um Transkonjuganten selektieren zu können, wurde 600ml L-Agar mit entsprechenden Zusätzen versehen und anschließend in Petrischalen gegossen.

<sup>4</sup> Arbeitskreis für veterinärmedizinische Infektionsdiagnostik, Arbeitsgebiet "Mikrobiologie, Parasitologie und Hygiene" der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft; Loseblattsammlung Methoden der Infektionsdiagnostik III / 1996

Die Zusammensetzung des L-Agars wurde so gewählt, daß ein selektives Wachstum der Transkonjuganten möglich wurde, bei gleichzeitiger Hemmung des Wachstums von Donator und Recipient. Tabelle 3.4 sind die entsprechenden Zusätze zu entnehmen:

Tabelle 3.4 Verwendete Zusätze für selektive Platten

600ml L-Agar	Bemerkungen	Antibiotikazusatz:	Herkunft
bei Verwendung für selektives Wachstum, dann obligatorisch: 0,3ml Nalidixinsäure (100 mg/ml) * 0,6ml Rifampicin (50 mg/ml)** 6ml 20% Glucose <sup>a)</sup> 0,1ml 0,12% Vitamin B <sub>1</sub> <sup>b)</sup> 1ml 4% Histidin <sup>c)</sup> 2ml 1% Tryptophan <sup>d)</sup> 1ml 3% Lysin <sup>e)</sup>	Donator wird gehemmt Donator wird gehemmt Recipient ist resistent gegen Nal und Rif. Sein Wachstum wird gehemmt durch die Verwendung des Antibiotikums auf dessen Resistenzgenübertragung getestet werden soll.	In Abhängigkeit der zu selektionierenden Resistenz, folgende Mengen: 1,5ml Tetracyclin 1,2ml Ampicillin 0,5ml Chloramphenicol 1,5ml Kanamycin 0,5ml Gentamicin	(12,5 µg/ml) Serva <sup>1</sup> (400 µg/ml) Sigma <sup>2</sup> (27,5 µg/ml) Serva <sup>3</sup> (30 µg/ml) Serva <sup>4</sup> (10 µg/ml) Serva <sup>5</sup>

\* Fa Serva D - 6900 Heidelberg 1; (Art Nr.: 29971)

<sup>a)</sup> Art. Nr.: 22799; <sup>b)</sup> Art. Nr.: 36022; <sup>c)</sup> Art. Nr.: 24770; <sup>d)</sup> Art. Nr.: 37370; <sup>e)</sup> Art. Nr.: 28195;

\*\* Fa Sigma Po Box 14508 St. Louis, MO, USA; (Art. Nr. R 3501)

1, 3, 5 (Art.Nr.: 35866; 16785; 22185)

2, 4 (Art.Nr.: A 9518; K 1876)

Bei Stämmen, die eine Multiresistenz besaßen wurde für jede Resistenz einzeln selektioniert. Die Ablesung der Platten erfolgte nach 2-tägiger Inkubation bei 37°C. Von einer Reinkultur wurde eine Kolonie des jeweiligen Donators in 10ml L-Broth geimpft. Zuvor wurde in einem Photoelectric-Colorimeter, Typ Klett-Summerson 800-3 zur Trübungsmessung, der Nullwert der L-Broth (Ausgangstrübung) bestimmt. In einem beheizbaren Umluftschüttelgerät wurde die Bakterienkultur sodann bei 37°C über mehrere Stunden bis zu einem Wert der Klett-Skala (Klett 130) inkubiert, welcher nach vorher für jeden Stamm einzeln erstellten Eichkurven ca  $2 \times 10^8$  koloniebildenden Einheiten (KbE)/ml (nach Abzug des Nullwertes) entsprach. Ebenso wurde mit dem Recipienten verfahren, der jedoch bei 37°C bis zu einem Wert der Klett-Skala (140) inkubiert wurde, welcher ca  $3-4 \times 10^8$  KbE/ml entsprach.

### 3. 1.7.1 Flüssigkeitskreuzungen

Zu 1ml Donator (Zelldichte ca  $2 \times 10^8$  Zellen/ml, = Klett 130) wurde 1ml Recipient (Zelldichte  $3-4 \times 10^8$  Zellen/ml, = Klett 140) gegeben. Nach einer Inkubation über Nacht bei jeweils 37°C und 22°C wurden Donator und Recipient durch Schütteln auf dem Vortex getrennt (Brooks, 1965). Anschließend wurden je 0,1ml der Verdünnungsstufen  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  des Konjugationsansatzes sowie 0,1ml des unverdünnten Ansatzes auf entsprechend selektiven Platten plattiert (Tab. 3.4) und über Nacht bei 37°C inkubiert. Für die Bestimmung der Transferierfrequenz der Resistenzdeterminanten wurde 0,1ml des ungekreuzten Donators in einer dekadischen Verdünnung von  $10^{-5}$  auf L-Platten plattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die Berechnung der Transferierungsfrequenz ergibt sich aus folgender Formel:

$$\frac{N \times 10 \times 10^A}{B} = \text{Transferierungshäufigkeit der Resistenzdeterminanten / Donator}$$

wobei

N = Anzahl der Kolonien der ausplattierten Kreuzung auf den selektiven Platten in KbE

A = Verdünnungsstufe der ausplattierten Kreuzung

B = Titer des Donators in KbE/ml

### 3. 1.7.2 Filterkreuzungen

Je 50 µl der oben beschriebenen Donatoren- und Recipientenkulturen wurden zusammen auf einen Filter (Porengröße 0,45 µm, Whatmann), der sich auf einer H-Platte befand, aufgetragen und über Nacht bei 37°C und 22°C inkubiert. Anschließend wurde der Filter in 2ml D-Medium gegeben und durch heftiges Schütteln (Brooks, 1965) auf dem Vortex wurden die Bakterien vom Filter abgelöst. Gleichzeitig wurde damit die Trennung von Donator und Recipient erreicht. Diese Bakteriensuspension wurde in einer Verdünnung von 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup> sowie 0,1ml des unverdünnten Ansatzes auf entsprechend selektive Platten (Tab. 3.4) plattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Für die Berechnung der Transferierungsfrequenz bei Filterkreuzungen gilt:

$$\frac{N \times 200 \times 10^A}{B} = \text{Transferierungshäufigkeit der Resistenzdeterminanten / Donator}$$

wobei

N = Anzahl der Kolonien der ausplattierten Kreuzung auf den selektiven Platten in KbE

A = Verdünnungsstufe der ausplattierten Kreuzung

B = Titer des Donators in KbE/ml

Zur Kontrolle der Donatoren wurde 0,1ml des ungekreuzten Donators mit seinen Resistenzdeterminanten auf entsprechend selektive Platten ausgespatelt und über Nacht bei 37°C bebrütet (Negativkontrolle).

Um festzustellen, ob es sich bei den gewachsenen Kolonien um Transkonjuganten, also um Recipienten mit neuerworbenen Resistenzen handelt, wurden je 20 ausgewählte Kolonien aus den Kreuzungen mit Hilfe eines Zahnstochers auf neue Selektivböden übertragen und über Nacht bei 37°C bebrütet. Um evtl. vorhandene Linkage-Gruppen zu bestimmen wurden anschließend die Platten replica-plattiert (Lederberg & Lederberg, 1952), d.h. es wurde mit Hilfe des Replica-Blocks<sup>5</sup>, der als "Kopiereinheit" dient, ein Abdruck von der gepickten Platte auf eine neue selektive Platte gemacht. Unter Linkage-Gruppen versteht man genetische Kopplungsgruppen bestimmter Resistenzdeterminanten. So kann z.B. eine Resistenz gegenüber Chloramphenicol gemeinsam mit Kanamycin übertragen werden.<sup>5</sup>

<sup>5</sup> BgVV-Eigenherstellung, nach Miller, J.: Experiments in molecular genetics  
Cold Spring harbour laboratories, USA (1972)

Aus der Betrachtung der über Nacht bei 37°C inkubierten Replica-Platten ergab sich welche der gewachsenen und gereinigten Kolonien für eine Plasmidisolierung geeignet waren, die dann entsprechend markiert wurden.

Sollten von den Transkonjuganten Glycerolkulturen angelegt werden, wurde von den Einzelkolonien der Replica-Platten durch zweimaliges Ausstreichen mit einer kalibrierten Platinöse auf L-Platten und jeweiligem Antibiotikum diese gereinigt, und weiter wie unter 3. 1.4 beschrieben behandelt.

### 3. 2 Molekularbiologische Untersuchungen

Tab. 3. 2.1 Material für die molekularbiologische Charakterisierung

Bezeichnung	Material	Bemerkungen
Te-Puffer	50mM Tris / 1mM EDTA, pH 8,0 Tris-Base: EDTA = TritiplexIII	Merck, Art.Nr. 8382.0500 Merck, Art.Nr. 12029.0100
Lysepuffer	steriles Aqua bidest 15% SDS 250mM Tris / 5 N Natronlauge-Lösung	Merck, Art.Nr. 9057.1000 Merck, Art.Nr.6495
Chloroform	119,38 g/mol	Merck, Art. Nr. 2445
Phenol	94,11 g/mol, Kristallin	Merck, Art. Nr. 200
Bromphenol-Blau-Lösung	25 mg Bromphenolblau 1,5 g Ficoll	Serva, Art. Nr. B 393/127 Pharmacia, Art. Nr. 17.0400.01
Agarose	0,8% , NEEO	Roth, Art. Nr. 2267.3
TBE	0,09 M Tris-Base 0,09 M Borsäure 0,025 M EDTA (pH 8,2)	Merck, Art.Nr. 8382.0500 Merck, Art. Nr. 165.1000 Merck, Art.Nr. 12029.0100
Ethidiumbromid-Stammlösung	10,0 mg/ml, Lagerung lichtgeschützt bei +4°C	Serva, Art. Nr. 21251

#### 3. 2.2 Zur Präparation der Plasmide wurde die Methode von Kado und Liu (1981) in modifizierter Form verwendet

Bei dieser Methode handelt es sich um ein alkalisches Denaturierungsverfahren zur Aufbereitung und Trennung von Plasmid-DNA.

Von geeigneten Kolonien (Auswahl anhand von Replica-Platten, s.o.) wurden ü.N.K. hergestellt. 2ml dieser ü.N.K wurden 5 min in der Eppendorffzentrifuge (Modell 5412) zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgegossen und die restliche Flüssigkeit mit Hilfe einer Pipette so abgezogen, daß das Pellet gut getrocknet wurde. Anschließend wurden die Zellen in 20 µl Tris-Puffer auf dem Schüttler resuspendiert.

Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 100µl Lyse-Mix (9,85ml enthalten: 5,7ml steriles Aqua bidest, 2,0ml 15% SDS, 2,0ml 250 mMTris, 150µl 5N NaOH, pH = 12,5). Die Lyse der Zellen erfolgte 30 min im Wasserbad bei 58°C. Sodann wurde dem Lysat 0,1ml einer ungepufferten Phenol-Chloroform Lösung, die im Verhältnis 1:1 angesetzt worden war, zugegeben. Durch das Hinzufügen des Phenols, finden die einzelnen Basenpaare der circulären Plasmid-DNA, aufgrund der jetzt eintretenden Neutralisation, wieder zueinander. Außerdem wurden die Proteine extrahiert. Nach 30 minütiger Zentrifugation wurden 90µl der wäßrigen Phase in der sich die Plasmid-DNA befindet, ohne die Interphase zu berühren, mit 10µl Bromphenol-Blau-Lösung (15% Ficoll, 5% Bromphenolblau) versetzt und sofort für 10 min. auf Eis gestellt. Zum Schluß wurden jeweils 25µl in die Probenaschen eines 0,8% Agarose Gels überführt und bei 100 Volt für 2 ½ Stunden eine Gelelektrophorese durchgeführt.

### 3. 2.3 Agarose - Gelelektrophorese

Die Technik der Agarose - Gelelektrophorese wurde zur Darstellung der Plasmide eingesetzt. Die Elektrophorese wurde in vertikalen Gelapparaten durchgeführt, da diese eine bessere Auflösung haben.

Es wurde ein 0,8% Agarosegel hergestellt. Dazu wurde die Agarose in dem Elektrophoresepuffer TBE (0,09 M Borsäure, 0,09 M Tris, 0,025 M EDTA, pH = 8,2) durch Kochen in Lösung gebracht und auf 58°C abgekühlt. Gele wurden dann zwischen zwei saubere Glasplatten im Abstand von 0,25 cm gegossen. Mit Hilfe eines Plexiglaskammes wurden am oberen Ende der Gelkammer Probenaschen zum Auftragen der Proben ausgespart. Nach 30 minütiger Polymerisation wurde der Elektrophoresepuffer TBE in die Gelkammern gefüllt und die DNA-Proben auf das Gel aufgetragen.

Anschließend wurde ein elektrisches Feld mit dem positiven Pol in Wanderungsrichtung angelegt. Nach vollendetem Elektrophoreselauf (2 ½ h bei 100 Volt) wurde das Gel in ein EtBr-Färbebad überführt und 15 min. gefärbt. Nachfolgend wurde das Gel in die Transilluminatorkammer des "Eagle Eye<sup>R</sup> II still video system" gelegt (Abb. 3.1). Durch Bestrahlung des Gels mit mittelwelligem UV-Licht (312 nm) konnten die DNA-Banden sichtbar gemacht werden. Mit Hilfe einer oberhalb der Transilluminatorkammer angebrachten Videokamera wurden die Gele digital erfaßt und anschließend vom Computer ausgewertet. Die ausgewerteten Gele wurden schließlich auf einem Thermo-Drucker ausgedruckt.

### 3. 2.4 Größenbestimmung von Plasmiden

Um die relative Molmasse (Molekulargewichte) der im Gel gewanderten Plasmid-DNA zu bestimmen, wurden auf dasselbe Gel DNA-Proben mit bekanntem Molekulargewicht (Standards, s. Tabelle 3.1) aufgetragen. Mit Hilfe des "Eagle Eye<sup>R</sup> II still video system" konnte eine Eichkurve erstellt werden, indem das Molekulargewicht der Standards halblogarithmisch berechnet wurde. Anhand dieser Kurve ließ sich das Molekulargewicht der unbekanntenen Plasmide ermitteln. Abschließend wurden die Plasmid-DNA Banden am Bildschirm beschriftet und pro Gel ein Ausdruck angefertigt.

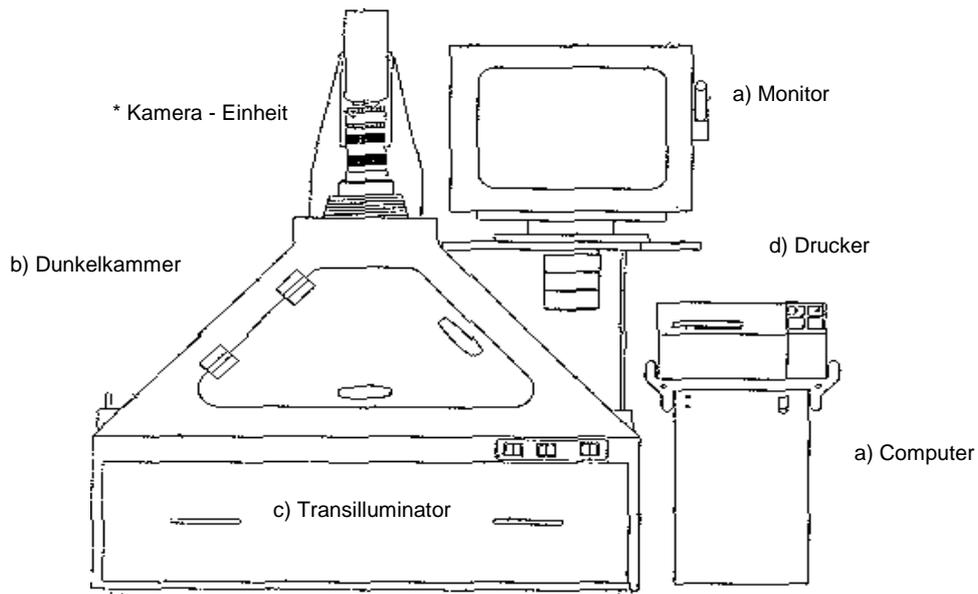
## 3. 2.5 Geräte und Materialien

Tab. 3. 5 Verwendete Geräte und Materialien

Kühlzentrifuge	Eppendorf Zentrifuge 5402
Photoelectric-Colorimeter	Klett Summerson Typ 803 (Photoelectric Colorimeter) Arthur Thomas Company Philadelphia, PA USA
Resuspendierer	Vortex Bender und Hobein AG Model 4550GE Zürich, Schweiz
Schüttler	Eppendorf Mixer 5432
Inkubator-Schüttler	Inkubator Shaker Model G25 New Brunswick Scientific Co. INC New Jersey, USA
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik mbH Burgwedel Typ 1002
Brutschrank	Heraeus DIN 58945 Typ: B 5028
Filter	Metricel <sup>R</sup> Membrane Filter Gelman Sciences D / 25 mm, Porengröße 0,45 µm P / N 63068 Ann Arbor, Michigan USA

Zur Analyse und Dokumentation der Gele verwendetes Gerät:

Eagle Eye<sup>R</sup> II Still Video System; Stratagen, 1995 (Abb. 3.1)



**Abb. 3.1** The Eagle Eye® II still video system \*

\* The Eagle Eye® II Still Video system:  
- (inklusive monochrome CCD Kamera)

Katalog # 400219 \*\*)

beinhaltet die folgenden Komponenten:

a) The Eagle Eye II Computer  
- (586, Pentium, inklusive Monitor)

Katalog # 400265

b) The Eagle Eye II Darkroom

Katalog # 400276

c) Transilluminator 2040 EV

Katalog # 401150

d) Thermodrucker

Katalog # 400281

\*\*) Firma: Stratagene, ©1995  
Cloning Systems  
La Jolla, California USA

Vertrieb: Stratagene GmbH  
D-69044 Heidelberg

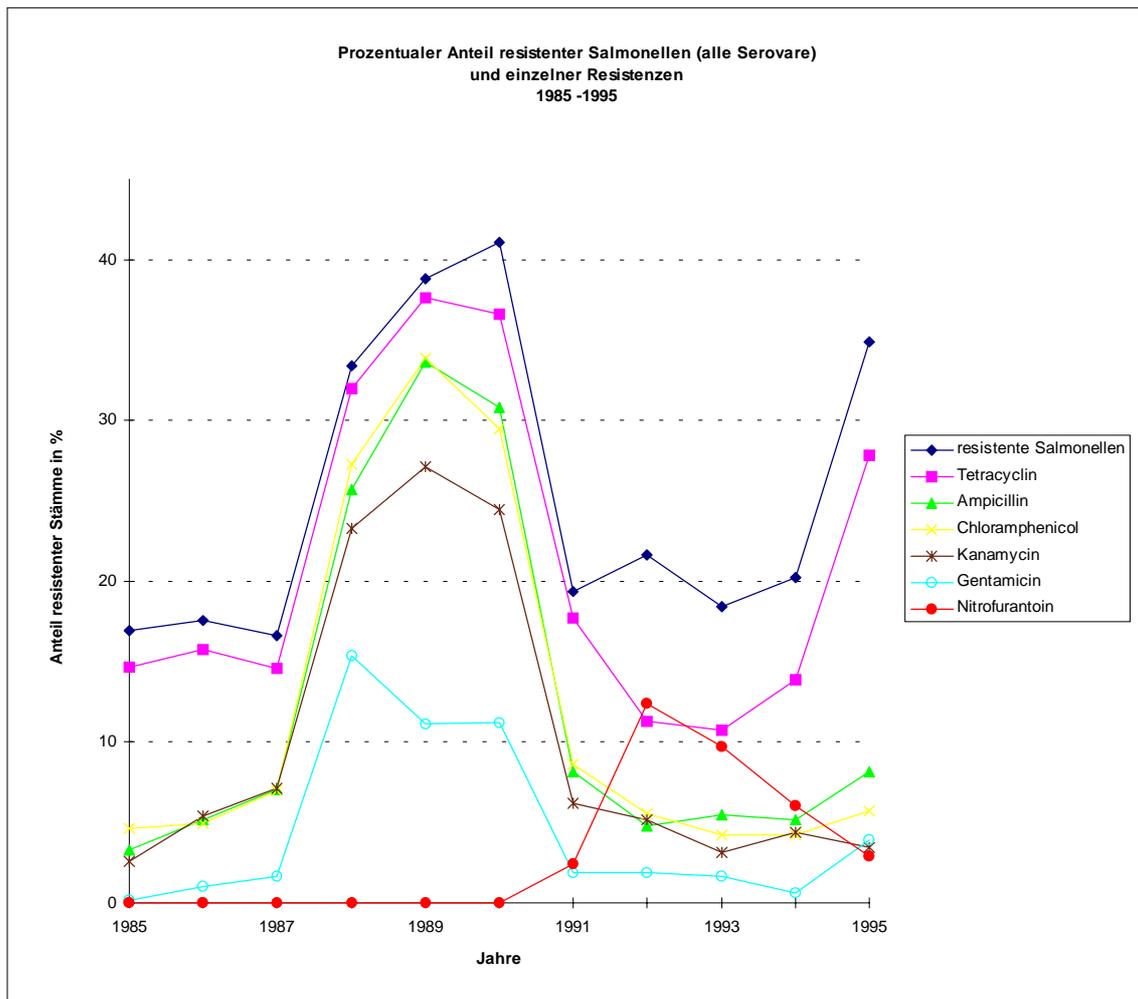
## 4. Ergebnisse

## 4.1 Antibiotikaresistenz bei Salmonellen der Jahre 1985-1995

Um das epidemiologische Geschehen bezüglich der Antibiotikaresistenz bei *S. Enteritidis* beurteilen zu können, wurden auch die epidemiologischen Aspekte bei anderen wichtigen *Salmonella* Serovaren betrachtet. Dazu wurde die im Fachgebiet 501 vorliegende Datenbank ausgewertet. Diese finden zunächst vor den Ergebnissen der eigentlichen Untersuchungen an *S. Enteritidis* Berücksichtigung.

Abbildung 4.1 zeigt den Verlauf der Resistenzentwicklung bei Salmonellen sowie den häufig vorkommender Resistenzdeterminanten. Grundlage dieser Kurve bilden Stämme, die unabhängig voneinander in verschiedenen Untersuchungsämtern im Rahmen unterschiedlichster Untersuchungen isoliert worden sind und zu weiterführenden Analysen an die Salmonellazentrale des BgVV eingesandt wurden.

Abb. 4.1



Auffällig ist, daß es im Untersuchungszeitraum bis 1991 zu einem Gipfel des Anteils resistenter Isolate kommt. Dieser wird durch einen hohen Anteil Tetracyclin-resistenter Isolate hervorgerufen. Diese Gemeinsamkeit im Kurvenverlauf wird von den Anteilen der Resistenzdeterminanten Ampicillin und Chloramphenicol begleitet. Sowohl Kanamycin als auch Gentamicin verhalten sich analog dazu, jedoch mit geringeren prozentualen Werten. Die Resistenzdeterminante Nitrofurantoin fällt als einzige mit ihrem Verlauf heraus. Die Zunahme ab 1991 hat 1992 ihren Höhepunkt und fällt dann konstant bis 1995 ab. Darüber hinaus sind drei Abschnitte ersichtlich:

1. Jahre 1985-1987

Zwischen 1985-1987 liegt der Anteil des Tetracyclins und des gesamtresistenten Salmonellenanteils unter 20%. Alle übrigen Resistenzdeterminanten bewegen sich zwischen 0 und 5%.

2. Jahre 1987-1991

Ab 1987 bis 1989 ist bis auf Gentamicin und Nitrofurantoin ein nahezu paralleler Anstieg der Resistenzdeterminanten zu verzeichnen (Anteil te: 37,6%, Anteil gesamt-resistenter Enteritidis Salmonellen 38,8%). In 1990 steigt die Kurve der resistenten Salmonellen bis 41,1% und damit zum Höhepunkt. In den Jahren danach fällt auch sie parallel zu den Kurven der einzelnen Resistenzdeterminanten. Der prozentuale Anteil Tetracyclin-, Ampicillin-, Chloramphenicol-, sowie Kanamycin-resistenter Isolate hat bereits 1989 mit Werten zwischen 25 und 40% ihren Höhepunkt. Gentamicin-resistente Stämme hingegen bleiben mit 11% zwischen 1989 und 1990 konstant beteiligt.

Zwischen 1990 und 1991 ist eine Abnahme aller dargestellten Resistenzdeterminanten über die Hälfte auf Werte zwischen 19,4% (Anteil resistenter Salmonellen), 17,7% (Tetracyclin), 8,1% (Ampicillin), 8,7% (Chloramphenicol), 6,2% (Kanamycin) und 1,9% (Gentamicin) zu verzeichnen. Im gleichen Zeitraum steigt die Nitrofurantoinrate auf 2,5% an.

3. Jahre 1991-1995

Zwei Ereignisse sind bemerkenswert:

a) Zwischen 1991-1992 ist der Verlauf des Tetracyclinanteils und der resistenter Salmonellen nicht mehr parallel. Für den Tetracyclinanteil ist eine Abnahme von 17% auf 11,31% festzustellen,

b) Nitrofurantoin ist 1992 mit 12,4% stärker beteiligt als die bislang vorherrschenden Tetracyclin-resistenten Stämme (11,3%).

Der Kurvenverlauf der übrigen antibiotikaresistenten Isolate bewegt sich ähnlich wie in den Jahren 1985-87, zwischen 5 und 10%.

Erst ab 1994 verläuft der Anteil tetracyclinresistenter Stämme sowie der resistenter Salmonellen wieder annähernd parallel, um 1995 auf Werte von 34,9% (resistenter Salmonellen) und 27,9% zu gelangen. Das Nitrofurantoin erreicht mit 2,9% fast seinen Ausgangswert wie im Jahre 1991.

Insgesamt ist der Grafik eine starke Zu- und Abnahme der häufig vorkommenden Resistenzdeterminanten über einen Zeitraum von 5 Jahren (1987-1991) zu entnehmen.

Dieser wellenförmige Verlauf spiegelt hauptsächlich die Beteiligung der Serovare *S. Typhimurium* und *S. Typhimurium* O:5 neg. und weniger die des Serovars *S. Enteritidis*, wie aus der Abb. 4.2.2 deutlich zu erkennen ist.

Bemerkenswert ist die Tatsache, daß ab 1990 der Anteil aller resistenten Isolate bis auf die nitrofurantoinresistenten Isolate steil abfällt, bei gleichzeitiger Zunahme resistenter *S. Enteritidis* Stämme (Abb. 4.1 und 4.2.2).

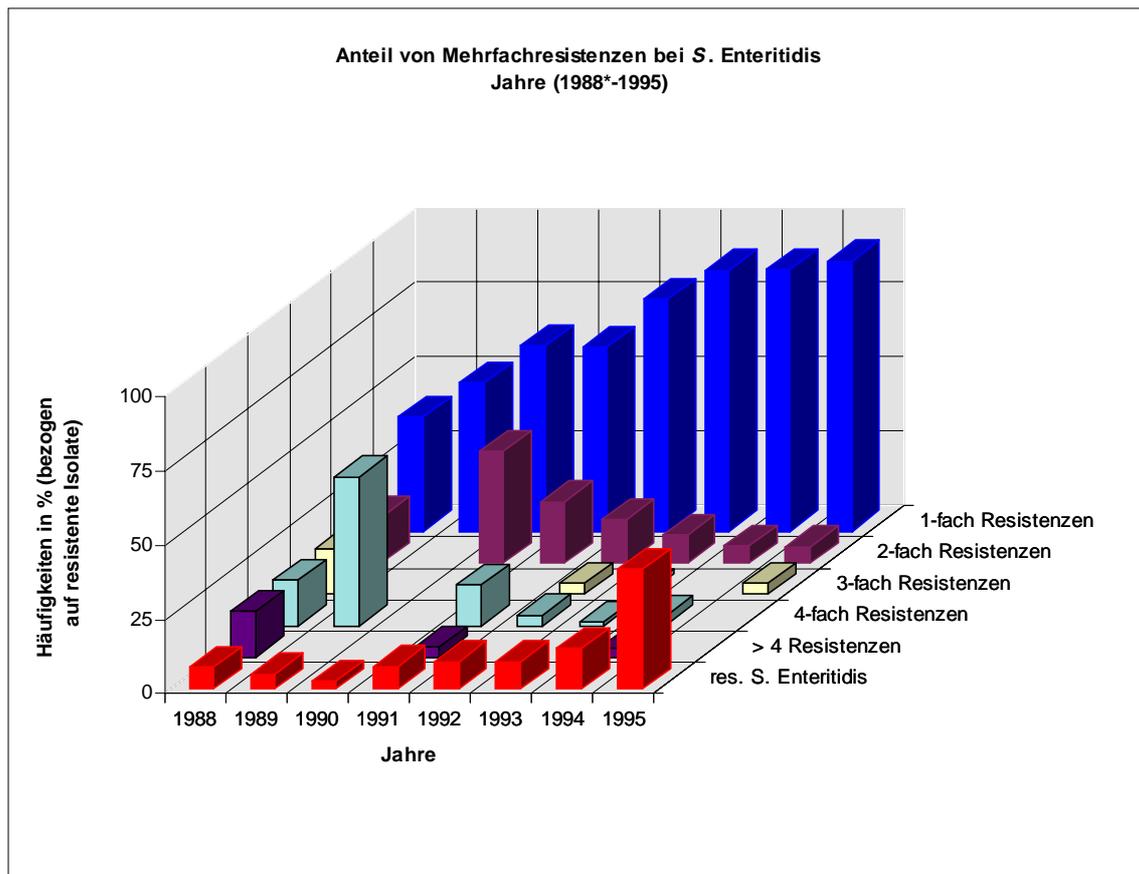
#### 4.2 Antibiotikaresistenz bei *S. Enteritidis* Isolatn der Jahre 1988\*-1995 (ohne Nitrofurane)

##### 4.2.1 Vorkommen von Mehrfachresistenzen

Um festzustellen, ob es bei *S. Enteritidis* wie bei anderen Serovaren auch multiresistente Isolate gibt, wurde dieser Aspekt zuerst untersucht.

Das nachstehende Säulendiagramm zeigt sowohl Vorkommen als auch die Verteilung von Mehrfachresistenzen des hier untersuchten Serovars für einen Zeitraum von 10 Jahren:

Abb. 4.2.1



\* Die Werte für 1986 und 1987 wurden nicht dargestellt, da nur Jahre mit mehr als 8 Einsendungen ausgewertet wurden.

Als mehrfachresistent wurden solche Isolate definiert, die mehr als 1 Resistenzdeterminante phänotypisch zum Ausdruck brachten.

Über den gesamten Zeitraum und kontinuierlich zunehmend vorhanden, sind die Isolate mit einer 1-fach Resistenz, die, abgesehen von den Jahren 1986 und 1987 (jeweils 100%, aber aufgrund der geringen Anzahl von resistenten Isolaten, ist dieser Prozentsatz zu vernachlässigen) in 1994 und 1995 mit je 91% ihren Höhepunkt hat.

Isolate, die über eine 2-fach Resistenz verfügen, sind ab 1990 beständig nachzuweisen, jedoch im weiteren Verlauf in abnehmender Häufigkeit und mit einem Anteil von 5% im Jahr 1995 am geringsten vorhanden.

Im Verlauf von 10 Jahren tritt die 4-fach Resistenz insgesamt 6x auf mit einem Anteil zwischen 1 und 50%. Die übrigen Werte sind der Tabelle 4.2.1 zu entnehmen, die die Grundlage für das Säulendiagramm bildet.

Tabelle 4.2.1 Zahl der *S. Enteritidis* mit

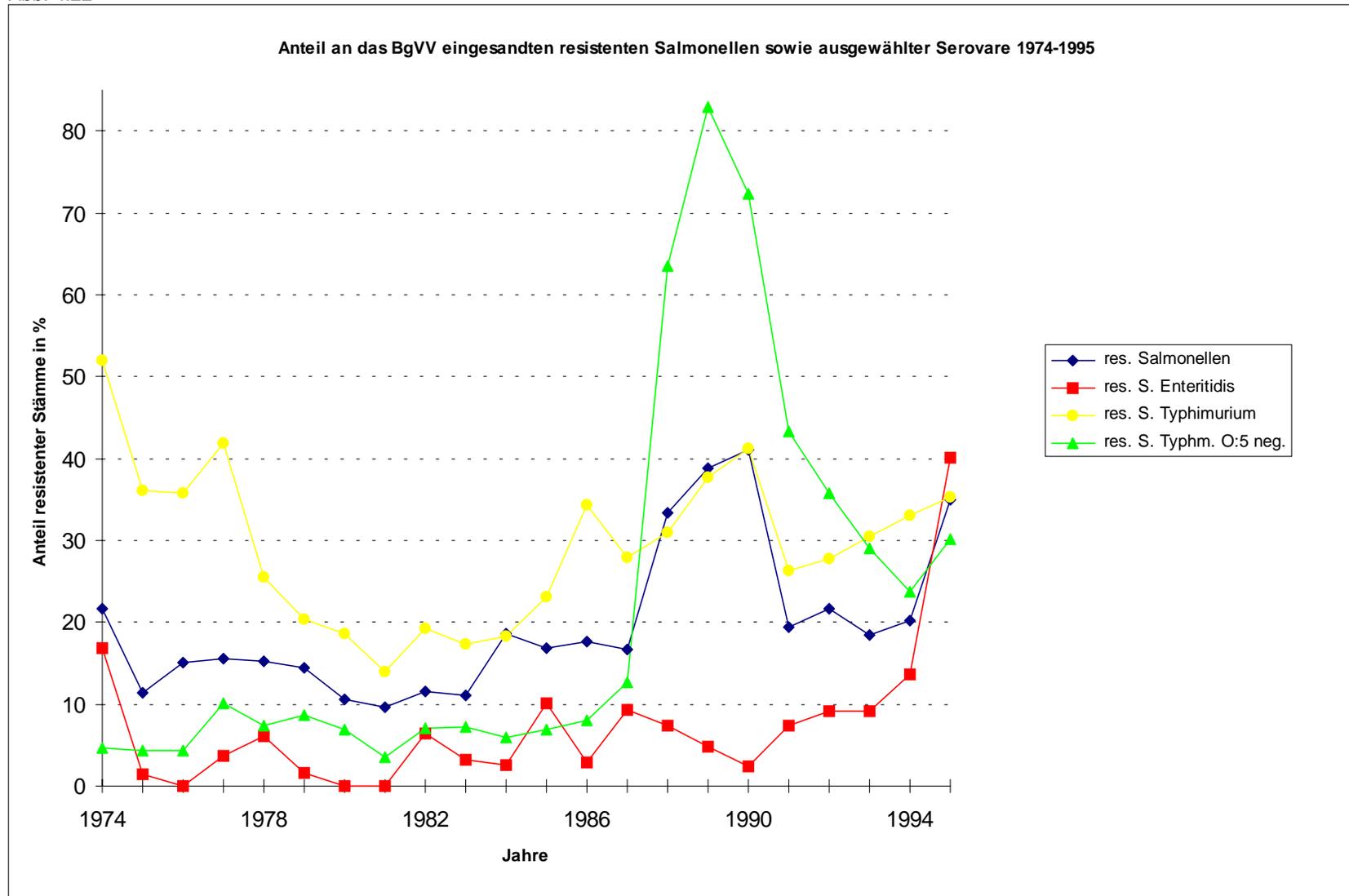
Jahre	Σ resistente Isolate	1-fach Resistenz	2-fach Resistenz	3-fach Resistenz	4-fach Resistenz	> 4-fach Resistenz
1988	13	5	2	2	2	2
1989	10	5	-	-	5	-
1990	8	5	3	-	-	-
1991	29	18	6	-	4	1
1992	55	43	8	2	2	-
1993	74	65	7	1	1	-
1994	72	64	4	-	2	2
1995	111	101	6	4	-	-

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß im Verlauf der letzten 10 Jahre bei diesen Serovaren die fortdauernde und ansteigende Tendenz von 1-fach Resistenzen, neben einer abnehmenden Tendenz von 2-fach Resistenzen, registriert werden muß. Das Auftreten von mehr als 2 Resistenzen im gleichen Zeitraum ist eher als sporadisch zu betrachten.

#### 4. 2.2 Anteil und Verlauf häufig vorkommender *Salmonella* Serovare sowie Antibiotikaresistenzen bei *S. Enteritidis* Isolaten

Wie in Abb. 4.1 zu erkennen, wurde der Verlauf der Resistenzentwicklung aller Salmonellen Isolate, aufgeschlüsselt in Bezug auf die überprüften Therapieantibiotika, dargestellt. Abb. 4.2.2 zeigt nun den Verlauf resistenter Salmonellen Isolate sowie den der am häufigsten vorkommenden resistenten Serovare *S. Typhimurium*, *S. Typhimurium* O:5 neg. sowie *S. Enteritidis* über einen Zeitraum von 20 Jahren. Von 1974 bis 1987 sind nicht nur die Resistenzraten für jeden Serovar konstant (*S. Typhimurium*: ca. 20%, *S. Typhimurium* O:5 neg. <10% und *S. Enteritidis* <10-<5%) sondern auch die damit verbundene Rangreihenfolge hinsichtlich der Isolationsrate beständig. Die Dynamik der einzelnen Kurvenverläufe setzt vor allem 1987 an. Innerhalb von 2 Jahren (1987-89) steigt die Kurve resistenter *S. Typhimurium* O:5 neg. Isolate um das 6-fache von 13% auf 83% an, um dann kontinuierlich abwärts auf 30% im Jahre 1995 zu gelangen. Der Anteil resistenter *S. Typhimurium* Stämme nimmt im gleichen Zeitraum um 10% von 28 auf 38% zu und liegt im Jahre 1989 zu 40% unter dem für *S. Typhimurium* O:5 neg. ermittelten Wert. Im Jahre 1993 liegt der Anteil resistenter *S. Typhimurium* Isolate mit

Abb. 4.22

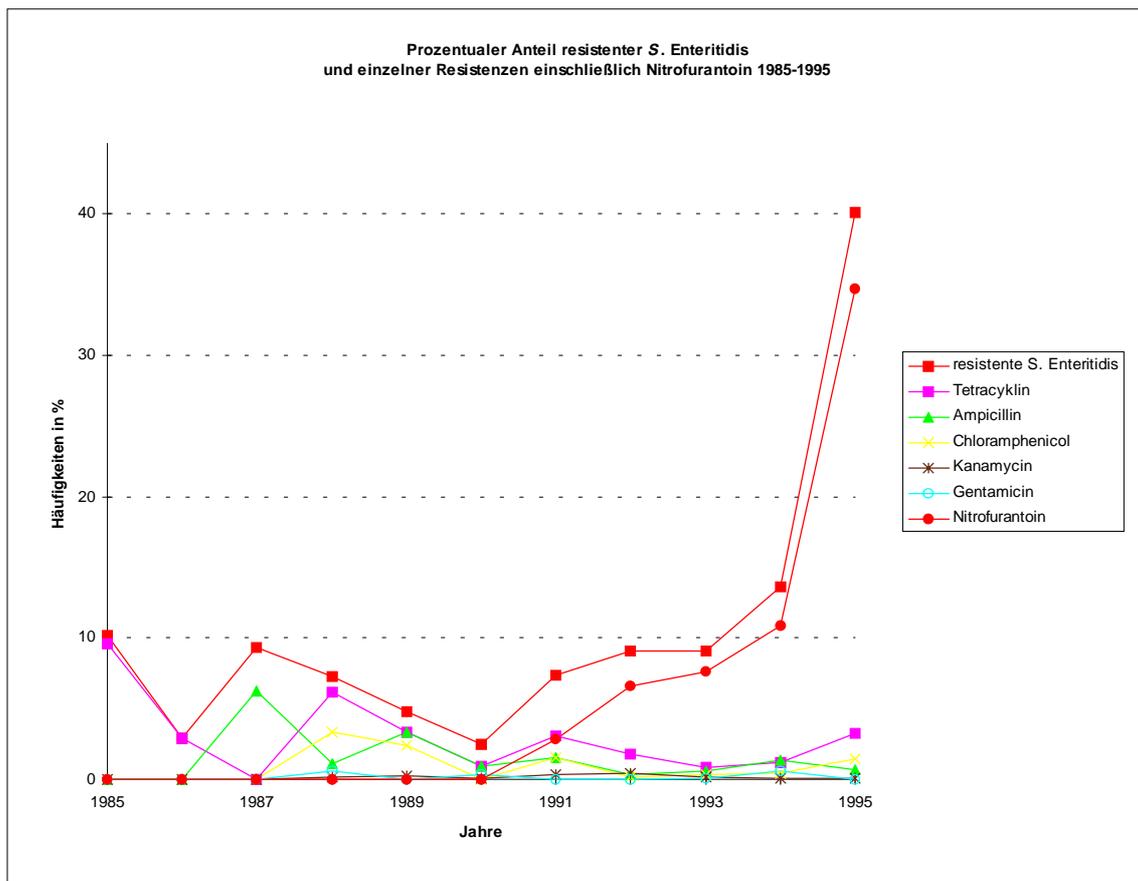


30,4% geringfügig wieder über dem resistenten *S. Typhimurium* O:5 neg. Bis zum Jahr 1993 ist der Anteil resistenter *S. Enteritidis* Isolate mit Werten um 10% gering, im Unterschied zu *S. Typhimurium* und *S. Typhimurium* O:5 neg. Bis zum Ende des Untersuchungszeitraums im Jahre 1995 jedoch steigt die Isolationsrate resistenter *S. Enteritidis* Stämme bis auf 40% und liegt mit diesem Wert einzig innerhalb des gesamten Untersuchungszeitraums höher als die beiden anderen Serovare (s. Abb. 4.2.2).

Die weiterführende Untersuchung konzentrierte sich auf die isolierte Betrachtung der resistenten *S. Enteritidis* Stämme sowie zunächst auf die bei diesem Serovar häufig vorkommenden Resistenzdeterminanten Tetracyclin, Ampicillin, Chloramphenicol, Kanamycin und Gentamicin (Abb. 4.2.3).

Der Anteil einzelner Resistenzdeterminanten liegt im Untersuchungszeitraum immer unter 10%. Vor allem cm; kn und gn sind mit ihren Werten in der Regel unter 1% und somit als unbedeutend zu betrachten. Auffällig jedoch ist eine deutliche Zweigliederung. Bis 1990 verläuft die Kurve der resistenten *S. Enteritidis*, mit einer Ausnahme im Jahr 87 (Anstieg auf 9,4%), gleichmäßig abwärts bis auf 2,5%. Dieser Verlauf wird überwiegend durch die Resistenzdeterminanten te und ap bestimmt.

Abb. 4.2.3



Ab 1990 bis 1995 ist dann eine Gegenläufigkeit zwischen dem Anteil der resistenten *S. Enteritidis* und dem der te und ap Resistenzen zu beobachten.

Demnach können diese Resistenzdeterminanten nicht an der Ausprägung dieses Verlaufs beteiligt sein. Auch die anderen für gewöhnlich häufig vorkommenden Resistenzdeterminanten cm; kn und gn erklären nicht die Diskrepanz zu der ansteigenden Kurve der resistenten *S. Enteritidis* Stämme, mit einem Höhepunkt im Jahr 1995 mit einem Anteil von 40%.

Da in dieser Arbeit nur Antibiotikaresistenzen berücksichtigt wurden, die in der Veterinärmedizin von therapeutischer Bedeutung sind, wurden die Werte anderer ebenso in der Routinediagnostik untersuchten Antibiotika überprüft.

Auffällig ist eine seit 1990 zunehmende Nitrofurantoinresistenzrate, so daß die entsprechenden Werte in die Kurve mit aufgenommen wurden (Abb. 4.2.3). Danach ergibt sich folgendes Bild: Die seit 1990 kontinuierliche und seit 1993 starke Zunahme resistenter *S. Enteritidis* Stämme wird offensichtlich durch die ab 1990 beginnende und bis 1995 stark zunehmende Resistenzrate gegenüber Nitrofurantoin bewirkt. Im Jahre 1990 besitzen 2,8% der im NRL-Salm. isolierten *S. Enteritidis* Stämme eine Resistenz gegen Nitrofurantoin, 1994 sind es 10,9% und 1995 zeigen 34,7% der Isolate eine Nitrofurantoinresistenz. Der aus diesen Werten resultierende Kurvenverlauf verhält sich annähernd parallel zu dem resistenter *S. Enteritidis* Isolate.

Warum es bei *S. Enteritidis* in diesem Zeitraum zu dem beobachteten starken Anstieg der Resistenz gegenüber Nitrofurantoin kommt, wird im Rahmen dieser Arbeit ungeklärt bleiben. Hinsichtlich der Herkunft gibt Tabelle 4.2.3 Auskunft über die prozentuale Verteilung nitrofurantoinresistenter *S. Enteritidis* Stämme der Jahre 1991-1995.

Tabelle 4.2.3

Häufigkeit resistenter *S. Enteritidis* Isolate in Bezug auf ihre Herkunft sowie prozentualer Anteil der nitrofurantoinresistenten *S. Enteritidis*-Stämme vom Geflügel (1991-1995)

Jahre	alle Quellen res <i>S. Enteritidis</i> (%)	Isolationsmaterial		Nitrofurantoinresistenz Geflügel/Eier/Eiprodukte (%)
		Geflügel/ Eier/Eiprodukte (%)	res. Geflügel/ Eier/Eiprodukte (%)	
1991	7,4	14,8	15,5	8,7
1992	9,1	43,1	11,2	6,3
1993	9,1	71,3	9,7	8,3
1994	13,6	52,4	15,9	13,7
1995	40,1	47,7	79,5	71,6

Die Tabelle zeigt, daß 1995 die Hälfte aller *S. Enteritidis* Stämme vom Geflügel stammen. In diesem Jahr sind auch 80% dieser Isolate resistent. Die Resistenzrate gegen Nitrofurantoin liegt im gleichen Jahr bei 72%. Die hohen Werte für das Jahr 1995 aus dem Geflügelbereich wurden in einer gesonderten Untersuchung nochmals überprüft, wobei auch auf eine mögliche Kreuzresistenz mit dem Furazolidon getestet wurde.

Im Einzelnen wurden folgende Ergebnisse für 1995 erzielt:

Von den 277 Stämmen stammten 132 (47,7%) aus dem Geflügelbereich einschließlich Eier und deren Produkte. Für die Resistenztestung wurden 113 Stämme ausgewählt. Im Falle des

Nitrofurantoin zeigte 96 (85%) Stämme Hemmhofgrößen von 9 mm und waren somit resistent. Im Gegensatz dazu waren alle Stämme gegenüber Furazolidon sensibel (Hemmhofgrößen > 30 mm). Detailliertere Angaben zu den untersuchten Stämmen finden sich im Appendix (Anhang 3).

#### 4.3 Genetische und molekularbiologische Grundlagen der Resistenz (Jahre 1986-1995)

##### 4.3.1 Resistenzeigenschaften der untersuchten *S. Enteritidis* Stämme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden nur die Stämme ausgewählt, für die eine Tetracyclin-, Ampicillin-, Chloramphenicol-, Kanamycin- oder Gentamicin-Resistenz nachgewiesen werden konnte. Die Stämme wurden im Agardiffusionstest hinsichtlich dieser Resistenzen überprüft, um einen Resistenzverlust speziell der älteren Stämme bei einer Lagerung in Stichtkulturen auszuschließen. Insgesamt wurden 94 Stämme, die zwischen 1986 und 1995 isoliert worden waren, überprüft. Durch den Vergleich der AntibioGramme, die zum Zeitpunkt der Isolierung festgestellt worden waren, mit den Resultaten der neuen Resistenztestungen, konnte nur für insgesamt 2 Stämme ein Verlust nachgewiesen werden.

Ein Stamm aus dem Jahre 1991 hatte die Chloramphenicolresistenz und ein weiterer des gleichen Jahres die Kanamycin und die Chloramphenicolresistenz verloren.

Tabelle 4.3.1 gibt Auskunft über die pro Jahr isolierten Stämme mit mindestens einer der 5 oben genannten Resistenzdeterminanten sowie deren Verluste.

Tabelle 4.3.1 Stabilität der Resistenzen

Jahre	resistente Stämme	davon veränderte Resistenzen*
1986	2	-
1987	4	-
1988	10	-
1989	9	-
1990	7	-
1991	13	2
1992	13	-
1993	14	-
1994	11	-
1995	11	-
$\Sigma$	<b>94</b>	<b>2</b>

\* d.h. verloren

Aufgrund der geringen Verluste liegt bei diesem Serovar für diesen Zeitraum eine sehr stabile Resistenzlage vor.

Tabelle 4.3.1.1 zeigt die Resistenzprofile der zur Verfügung stehenden Stämme sowie die ausgewählten Isolate für die weiteren genetischen und molekularbiologischen Untersuchungen.

Die Spalte „resistente *S. Enteritidis* n“ repräsentiert die tatsächliche Anzahl resistenter Stämme, also auch solche, für die andere Resistenzen als die hier untersuchten nachgewiesen werden konnten. Die „Resistenzmuster“ enthalten die im Rahmen der Arbeit untersuchten Stämme mit Resistenzen gegen te; ap; cm; kn; gn. Die dritte Spalte stellt die Anzahl der Stämme dar, die für die weiteren genetischen und molekularbiologischen Untersuchungen ausgewählt wurden. Die letzte Spalte zeigt entsprechend der zweiten, die jeweiligen Resistenzmuster der für die weiterführenden Analysen ausgewählten Stämme.

Tabelle 4.3.1.1 Vorkommen und Eigenschaften untersuchter *S. Enteritidis*-Stämme 1986-1995

Jahre	resistente <i>S. Enteritidis</i> n	Resistenzmuster	Zahl untersuchter Stämme	Resistenzmuster untersuchter Stämme
1986	2	te;(2)	2	te;(2)
1987	6	ap;(4)	3	ap;(3)
1988	12	te; (5) te; cm; (1) te; cm; kn; (2) te; ap; cm; kn; (1) te; ap; cm; kn; gn (1)	10	te; (5) te; cm; (1) te; cm; kn; (2) te; ap; cm; kn; (1) te; ap; cm; kn; gn; (1)
1989	10	te; (2) ap; (2) te; ap; cm; kn; (5)	7	te; (1) ap; (1) te; ap; cm; kn; (5)
1990	8	te; (1) ap; (1) kn; (1) gn; (1) te; ap; (1) te; kn; (1) ap; gn; (1)	6	te; (1) ap; (1) kn; (1) te; ap; (1) te; kn; (1) ap; gn; (1)
1991	29	te; (5) ap; (3) te; kn; (2) te; cm; (1)	5	te; (1) ap; (1) te; kn; (2) te; cm (1)
1992	55	te; (2) ap; (1) kn; (1) te; kn; (8) te; ap; cm; (1)	13	te; (2) ap; (1) kn; (1) te; kn; (8) te; ap; cm; (1)
1993	74	te; (4) ap; (5) gn; (1) te; kn; (2) te; cm; (1) cm; kn; (1) te; cm; kn; (1)	9	te; (4) ap; (1) te; kn; (2) cm; kn; (1) te; cm;kn; (1)
1994	70	te; (3) ap; (5) te; gn; (1) te; ap; cm; kn; gn; (2)	6	te; (1) ap; (2) te; gn; (1) te; ap; cm; kn; gn; (2)
1995	111	te; (4) ap; (2) te; kn; (1) te; cm; (4)	4	te; (1) ap; (2) te; kn; (1)
		Σ	65	

#### 4. 3.2 Übertragbarkeit der Resistenzen auf *E. coli* K - 12.

Ziel der vorgelegten Arbeit war es, das Vorkommen resistenter *S. Enteritidis* Isolate der Jahre 1986-1995 sowie deren molekularbiologische Eigenschaften zu beschreiben. Da die vorhandenen Resistenzdeterminanten, auch plasmidcodiert sein können, bieten sich Kreuzungsversuche als einfache Methode zur Überprüfung der Übertragbarkeit von Resistenzen an.

Von den insgesamt 94 zur Verfügung stehenden Stämmen wurden 65 repräsentative Isolate für die genetischen und molekularbiologischen Untersuchungen ausgewählt. Nachfolgend zusammengefaßt die Häufigkeit der einzelnen Resistenzen für die zu kreuzenden Isolate (Tab 4.3.2 und Tab. 4.3.1.1).

Tabelle 4.3.2 Häufigkeit untersuchter *S. Enteritidis*-Stämme

Anzahl der Resistenzen	Resistenzmuster	Häufigkeiten Anzahl	Häufigkeit %
1-fach	te	18	27,7
	ap	12	18,5
	kn	2	3
2-fach	ap; gn	1	1,5
	te; ap	1	1,5
	te; cm	2	3
	te; kn	14	21,5
	te; gn	1	1,5
	cm; kn	1	1,5
3-fach	te; ap; cm	1	1,5
	te; cm; kn	3	5
4-fach	te; ap; cm; kn	6	9
5-fach	te; ap; cm; kn; gn	3	5
Σ		<b>65</b>	<b>100</b>

Knapp ein Drittel der Stämme wiesen eine 1-fach Resistenz für Tetracycline auf. Am zweithäufigsten kam die Kombination Tetracyclin/Kanamycin sowie die Monoresistenz Ampicillin vor, mit jeweils 20%. Ca 9% (6) der Stämme verfügten über ein 4-fach Resistenz mit den Resistenzdeterminanten gegen Tetracyclin, Ampicillin, Chloramphenicol und Kanamycin.

Demnach weisen von den 65 untersuchten Stämmen 32 (49,2%) eine Monoresistenz und weitere 50% eine Mehrfachresistenz auf, wobei die 2-fach Resistenz am häufigsten vorkommt.

Somit ergibt sich eher ein moderates Bild bezüglich der Prävalenz von Multiresistenzen bei diesem Serovar.

Mit Hilfe der Kreuzungsexperimente sollte nicht nur die Übertragbarkeit von plasmidcodierten Resistenzdeterminanten nachgewiesen werden. Vielmehr sollte auch untersucht werden, in wie weit sich die einzelnen Stämme hinsichtlich des Transfers unter verschiedenen Konditionen (Flüssig- oder Filterkreuzungen bei 37° bzw. 22°C) unterscheiden. Die unterschiedlichen Temperaturen reflektieren die in-vitro Bedingungen: 37°C als optimale Wachstumstemperatur für Salmonellen, die sie in Organismen häufig antreffen, sowie die in vivo Konditionen mit 22°C als Umgebungstemperatur, um zu demonstrieren, daß Resistenzübertragungen auch außerhalb des Organismus stattfinden können.

Tabelle 4.3.2.1 zeigt eine Übersicht des besten Transfer bei den entsprechenden Bedingungen. Hierbei wurde noch nicht der teilweise Transfer von mehrfachresistenten Stämmen berücksichtigt (s. dafür Tabelle 4.3.2.2).

Tabelle 4.3.2.1 Transfereigenschaften der untersuchten Stämme

Jahre	us. Stämme	Filter		flüssig		ohne Transfer
		22 ° C	37 ° C	22 ° C	37 ° C	
1986	2	te (1)				te (1)
1987	3	ap (2)	ap (1)			
1988	10				te (6); kn (1)	te (3)
1989	7		kn (1)	ap(1)	te (1); cm (1); kn (3)	
1990	6	kn (1)	ap (2)		te (1); gn (1)	te (1)
1991	5	ap (1)	kn (1)		te (3)	
1992	13		ap (1); kn (1)		te (2); kn(6); te, kn (1)	te, ap, cm (1); te (1)
1993	9	te (1)	ap (1); kn (4)		te (1)	te (2)
1994	6	te (1)	ap (2); gn (1)		ap (1)	te (1)
1995	4		te (1); ap (1); kn (1)			ap (1)
Σ	65	7	18	1	28	11

Die untersuchten Stämme zeigten folgende Verteilung bezüglich der Übertragbarkeit unter verschiedenen Bedingungen :

Von den 65 Stämmen haben 54 (83%) eine oder mehrere Resistenzen übertragen.

Am häufigsten (71%) findet ein Transfer von Resistenzdeterminanten bei 37°C statt. Davon übertragen 28 (43%) Stämme im flüssigen Milieu und 18 (27%) Serovare unter festen Bedingungen. 7 (11%) Isolate haben eine Übertragung der Resistenzen bei 22°C unter festen Bedingungen durchgeführt. 1 (2%) Stamm hat im flüssigen Medium bei 22°C übertragen. 11 (17%) Stämme haben nicht übertragen.

Dem Appendix (Anhang 2) können die detaillierteren Transfereigenschaften der hier untersuchten Stämme entnommen werden.

Darüber hinaus interessierte auch wieviel Prozent der multiresistenten Stämme ihre Resistenzen vollständig oder teilweise übertragen haben. Tabelle 4.3.2.2 zeigt die Transfereigenschaften dieser multiresistenten Stämme.

Tabelle 4.3.2.2 Anzahl multiresistenter Stämme sowie deren Transfereigenschaften

Jahre	us. Stm.	Mehrfach resistente Stämme	ohne Transfer	Transfer multiresistente Stämme	teilweiser Transfer
1986	2	-	-	-	-
1987	3	-	-	-	-
1988	10	5	-	5	-
1989	7	5	-	4	1
1990	6	3	-	2	1
1991	5	3	-	2	1
1992	13	9	1	5	3
1993	9	4	-	1	3
1994	6	3	-	1	2
1995	4	1	-	1	-
$\Sigma$	<b>65</b>	<b>33 (50%)</b>	<b>1</b>	<b>21(64%)</b>	<b>11(33%)</b>

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß, mit Ausnahme der Stämme aus den Jahren 1993 und 1994 zu über 50% ein vollständiger Transfer der Resistenzdeterminanten stattgefunden hat. Nur in einem Jahr (1992) wurde die Mehrfachresistenz eines Stammes nicht übertragen.

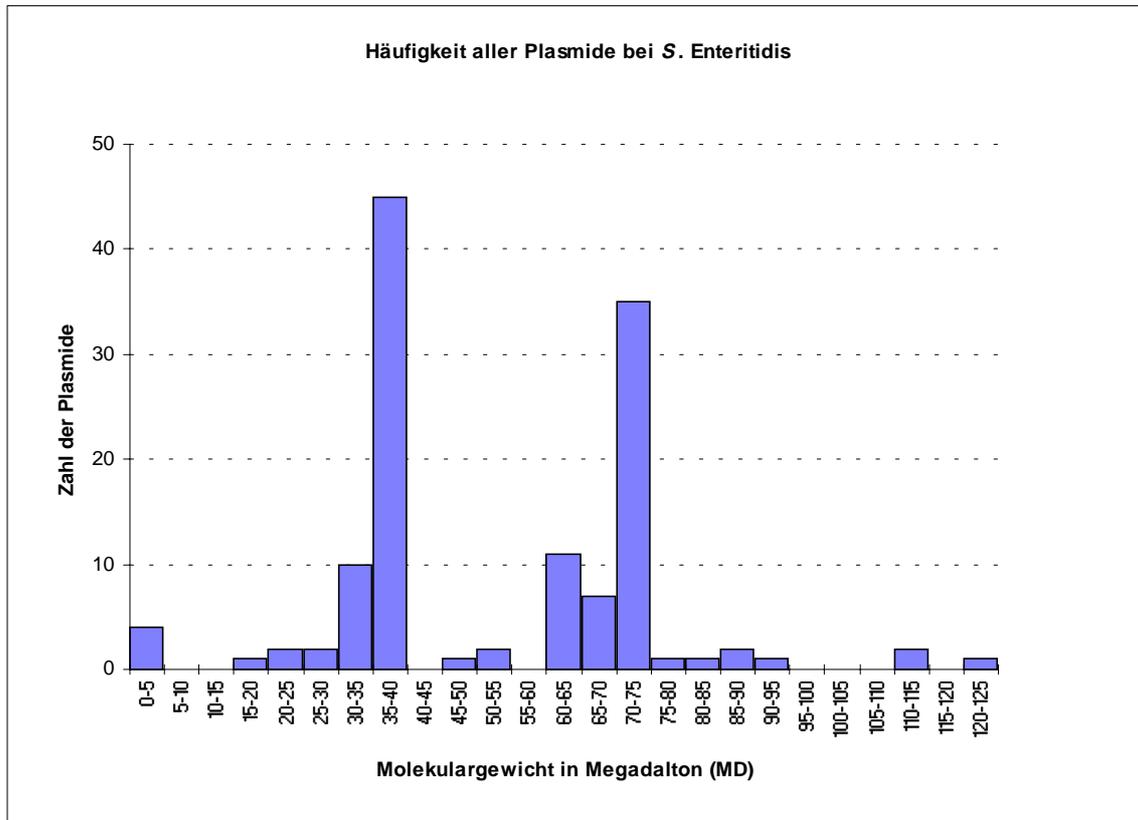
1988 wiesen 5 der 10 untersuchten Stämmen eine Multiresistenz auf, die vollständig übertragen wurde. 1989 haben 4 multiresistente Stämme ihre Resistenz vollständig übertragen. In den Jahren 1990-1991 wurde jeweils nur eine Resistenzdeterminante von einem multiresistenten Stamm nicht übertragen. In 1992 haben 5 der 9 mehrfachresistenten Stämme vollständig übertragen, 3 haben nur eine Resistenzdeterminante übertragen. 1993 besaßen von den 9 untersuchten Stämmen 4 eine Multiresistenz. Bei 3 fand nur ein teilweiser Transfer statt. 1 Stamm hat die Multiresistenz übertragen. Sowohl 1994 als auch 1995 wurde die Resistenz je eines multiresistenten Stammes vollständig übertragen.

#### 4. 4 Resistenzfaktoren

Die in dieser Arbeit untersuchten 65 Stämme wurden nach ihrer genetischen Untersuchung auf die Übertragbarkeit des phänotypischen Merkmals der Resistenz gegen gebräuchliche Therapieantibiotika auf den Besitz von Resistenzfaktoren (Plasmide) überprüft, mit dem Ziel, nach elektrophoretischer Auftrennung und Molekulargewichtsbestimmung der hier isolierten Plasmid-DNA, möglicherweise einheitliche Plasmidmuster der einzelnen Stämme vorzufinden.

Die Ergebnisse die hierbei erzielt wurden, ergaben jedoch ein recht heterogenes Bild, welches nachstehendem Säulendiagramm (Abb. 4.4) entnommen werden kann.

Abb. 4.4



Alle untersuchten 65 Stämme verfügten über mindestens ein Plasmid.

Plasmide mit einem Molekulargewicht von 37 MD [=pRQ 29] wurden bei 45 (69,2%) Stämmen festgestellt und waren somit am häufigsten vertreten.

An zweiter Stelle folgen Plasmide mit einem Molekulargewicht zwischen 70 und 75 MD (35 (53,8%) Stämme). An dritter Position stehen Plasmide, die ein Molekulargewicht zwischen 70 und 40 MD aufweisen (21 (32,3%) Stämme). Plasmide mit Molekulargewichten zwischen 35 und <5 MD sowie zwischen 125 und 75 MD kommen bei je 19 (29%) und je 8 (12,3%) der Stämme vor.

Insgesamt wurden 128 Plasmide bestimmt, die sich auf 36 Plasmidprofile verteilen. Bei 8 Stämmen (674, 794 / 89; 1307, 2258 / 91; 1506 / 88; 66, 505, 2636 / 92) und damit am häufigsten, konnte die Plasmidkombination [73 MD / pRQ29] festgestellt werden, gefolgt vom Muster [71 MD / pRQ29], daß bei 6 Stämmen (1659 / 91; 121 / 94; 1218, 1493 / 95; 2614 / 92; 2487 / 93) vorgefunden werden konnte. 5 Stämme (5, 1040 / 86, 1357, 1358, 1359 / 87) besaßen ein Plasmid mit einem Molekulargewicht von 32 MD. 4 Stämme (1147, 1286, 1439 / 88; 967 / 90) zeigten das Profil [68 / pRQ29] und 2 Isolate wiesen das Profil [72 MD / pRQ29] auf.

Für folgende Profile konnten jeweils 2 Stämme ermittelt werden: [112 MD / pRQ29]; [74 MD / pRQ29 / <4 MD]; [74 MD / pRQ29]; [73 MD, 70 MD / pRQ29]; [72 MD]; [62 MD / pRQ29]; [62 / 34]; [60 MD]. Die nähere Charakterisierung dieser Stämme sowie die übrigen Profile sind jeweils dem Appendix (Anhang 1) zu entnehmen.

#### 4.5 Klonale Struktur ausgewählter Stämme

Um bei den untersuchten Stämmen möglicherweise vorhandene klonale Strukturen festzustellen, wurde neben der Bestimmung der Antibiotika-Resistenz, der Resistenzfaktoren (Plasmide) zusätzlich die Phagentypie anhand der in Mitteleuropa für *S. Enteritidis* etablierten Methode nach Ward et al. (1987) durchgeführt.

Die hier untersuchten Stämme zeigten insgesamt 11 verschiedene Phagentypen. (Tabelle 4.5 )

Tabelle 4.5 Häufigkeit und Verteilung von Phagentypen (PT) untersuchter *S. Enteritidis*-Stämme

Zahl untersuchter Stämme: 65	Häufigkeiten n	%
PT4	21	32,3
PT6a*	18	27,7
PT38	6	9,2
PT7*	5	7,7
PT13a	3	4,6
PT8	2	3,1
PT32; PT6; PT5a; PT14b; PT11	je 1	je 1,5
n.c.	5	7,7
Σ	<b>65</b>	<b>100</b>

n.c.= not typable; \* Phagentypen, die sich vom PT4 ableiten

Phagentyp 4 wurde mit 32,3% am häufigsten bestimmt. 95 % der zum PT4 gehörenden Stämme wurden aus dem humanen, Lebensmittel- und Umweltbereich isoliert. Weiterhin ist Phagentyp 6a mit einem Anteil von 27,7% als zweithäufigster nachweisbar. Zu 88,9% ist dieser Typ beim Geflügel bzw. bei deren Produkten nachweisbar gewesen. Von der Häufigkeit her sind weiterhin die Phagentypen 38 mit 9,2% und PT7 mit 7,7% von Belang, wobei PT7 bezüglich PT4 epidemiologisch relevant ist. Von den 5 zum PT7 gehörenden Isolaten, stammen 4 aus dem Geflügelbereich. PT13a und PT8 sind mit jeweils 4,6 bzw. 3,1% noch erwähnenswert. PT32; PT6; PT5a; PT14b; PT11 sind mit je 1,5% Anteil vertreten. 5 (7,7%) Stämme waren nicht typisierbar. Zusammenfassend zeigen diese Daten, daß ca. 70% aller untersuchten Isolate dem PT4 oder sich davon ableitenden Phagentypen (6a, 7) angehören. Die Ergebnisse der Plasmidprofilanalyse in Kombination mit denen der Phagentypie ergeben das in Tab. 4.5.1 dargestellte Bild:

Tabelle 4.5.1 Plasmidprofile untersuchter *S. Enteritidis*-Stämme

Phagentyp	Anzahl*	Plasmidprofile
4	21	16
6a	18	16
38	6	5
7	5	4
13	3	2
8	2	2
32; 6; 5a; 14b; 11	je	je 1

\* Anzahl der Stämme

Von den 21 zum Phagentyp 4 gehörenden Stämmen konnten insgesamt 16 verschiedene Plasmidprofile bestimmt werden.

Bei Phagentyp 6a konnten ebenso 16 Plasmidprofile bei 18 Stämmen, die diesem PT angehörten, charakterisiert werden.

Für die 6 PT38 Stämme konnten 5, für die 5 PT7 Stämme 4, für die 3 PT13a Stämme 2 und für beide PT8 Stämme je 1 Plasmidmuster bestimmt werden.

Die übrigen Phagentypen wurden durch je 1 Profil beschrieben. (Appendix, Anhang 1).

Für jeweils 2 Stämme aus dem gleichen Jahr konnten eindeutig klonale Strukturen erkannt werden. Die Stämme 1357 / 87 und 1358 / 87 mit der gleichen Antibiotikaresistenz Ampicillin, dem gleichen Phagentypen 13a und identischem Plasmidmuster (32 MD).

Für 4 einfachresistente Stämme aus 2 unterschiedlichen Jahren (1147, 1286, 1439 / 88 sowie 967 / 90) können klonale Strukturen zugeordnet werden. Diese weisen eine Tetracyclinresistenz auf, gehören bis auf ein Stamm (1286 / 88) dem Phagentyp 4 an und besitzen das Plasmidprofil 68 MD und pRQ29. Für den Stamm 1286 / 88 wurde der PT6a bestimmt, der möglicherweise aus dem PT4 hervorgegangen ist.

Für 4 multiresistente Stämme mit den Resistenzen te, ap, cm und kn aus dem Jahr 1989 (803; 804; 1225; 2488) können klonale Strukturen angenommen werden, obwohl für den Stamm 804 / 89 kein Phagentyp bestimmt werden konnte und der Stamm 1225 / 89 ein 72 MD statt 74 MD großes Plasmid aufweist und für den Stamm 2488 / 89 kein Plasmid <4 MD nachgewiesen werden konnte.

#### 4.6 Plasmid-Rekombinationen bei einzelnen Stämmen

Bakterien verfügen über Mechanismen (Mutation, Transposition, Crossover, Insertion) die ihre chromosomale und Plasmid-DNA befähigen, Neukombinationen zu bilden. Hierbei kommt es durch Neuordnung und Austausch von genetischem Material zum Austausch der genetischen Information und damit zu einem veränderten Genotyp.

Die Auswertung der im Rahmen der molekularbiologischen Untersuchungen erzielten Ergebnisse zeigt hinsichtlich dieser Phänomene folgende Verteilung:

Von den 65 untersuchten Stämmen haben 12 (18,5%) nicht übertragen. 37 (56,9%) Stämme übertrugen ihre Resistenzdeterminanten ohne Ausbildung von Neukombinationen, d.h. die Wildtyp-Plasmide erscheinen unverändert in Kopie im Transkonjuganten wieder. 4 (6,2%) Stämme transferieren ihre Resistenz mittels Transposition aus dem Wirtszell-Chromosomen.

8 (12,3%) der Stämme übertrugen die Resistenz auf kleineren Plasmiden als in der Donorzelle. Es muß folglich zur Deletion im Verlauf des DNA-Transfers gekommen sein. 3 (4,6%) Stämme wurden als Sonderfälle bezeichnet, da die bei ihnen festgestellten komplexen und teilweise vielfachen Neukombinationen der DNA jeweils nur einmal auftraten:

1. Der Stamm 1506 / 88 besitzt zwei Plasmide mit Molekulargewichten von 73 und 37 MD. In den Transkonjuganten konnte ein drittes Plasmid mit einem Molekulargewicht von 11 MD beobachtet werden, so daß der Eindruck entsteht, dieser Stamm transferiert seine Resisten-

---

zen te und cm zusätzlich über ein 11 MD großes Plasmid. Möglicherweise liegt hier eine sogenannte reversible Dissoziation des R-Faktors in zwei unabhängige Replicons in der Recipientenzelle vor, nachdem vorher ein gemeinsamer Transfer beider Resistenzen stattgefunden haben muß (Abb. 4.6.1).

2. Der multiresistente Stamm 1225 / 89 (te, ap, cm, kn) besitzt neben dem serovarspezifischen (pRQ29) noch zwei weitere Plasmide (74 MD und ein kryptisches, <4 MD). Die Resistenzen werden vollständig über ein 102 MD großes Plasmid übertragen, während die Resistenzdeterminanten ap, kn und cm jeweils im Transkonjuganten auf einem 74 MD großen Plasmid lokalisiert sind, und somit ein vollständiger Resistenztransfer mit Hilfe des Cointegrates erfolgt (Abb 4.6.2).
3. Der 5-fachresistente Stamm 378 / 94 (te; ap; cm; kn; gn) mit den zwei Linkagegruppen te; ap und gn sowie te; ap; gn; cm und kn besitzt als Wildtyp das serovarspezifische Plasmid pRQ29 und zeigt abhängig von selektiven Bedingungen, zusätzlich ein 112 MD großes Plasmid. Unter starkem Selektionsdruck (Wildtyp gewachsen in mit te und ap angereicherter L-Broth) sind beide Plasmide deutlich sichtbar (Abb. 4.6.3 A). Dagegen stellt sich das 112 MD große Plasmid bei einem unter nicht selektiven Bedingungen gewachsenen Wildtyp eher schwach bzw. nicht dar (Abb. 4.6.3 B). Die Resistenzen werden auf dem 112 MD großen Plasmid übertragen, unabhängig ob das 112 MD große Plasmid makroskopisch beim Wildtyp sichtbar ist und unabhängig welche Linkagegruppe gerade transferiert wird.

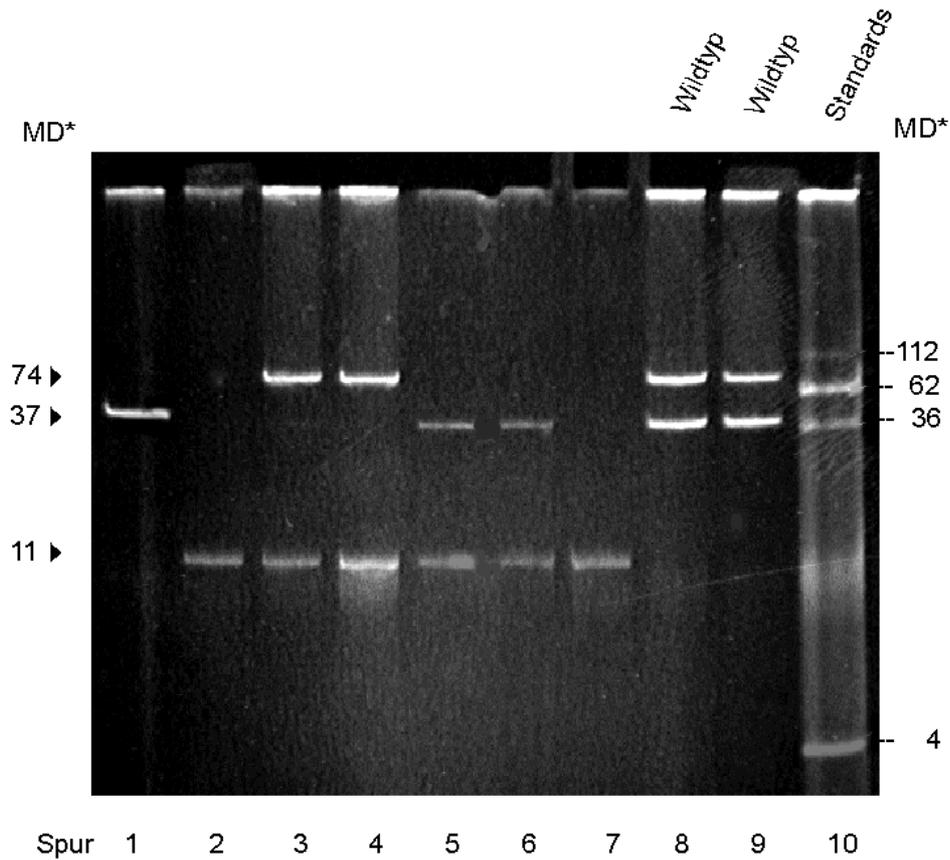


Abb. 4.6.1 Plasmidprofile des *S. Enteritidis* Wildtyps 1506 / 88 (te; cm; Spur 8 und 9). Die Standards wurden auf der Spur 10 positioniert. Die Transkonjuganten sind auf den Spuren 1-7 zu finden. Auf den Spuren 2-7 ist deutlich ein 11 MD großes Plasmid zu erkennen, auf dem zusätzlich die Resistenzen te; cm übertragen worden sind. Die Spuren 3 und 4 lassen eine eindeutige Zuordnung nicht erkennen. Die Resistenzen könne sowohl auf dem 73 MD großen Plasmid als auch auf dem 11 MD großen Plasmid übertragen worden sein.

\* Molekulargewicht in Megadalton

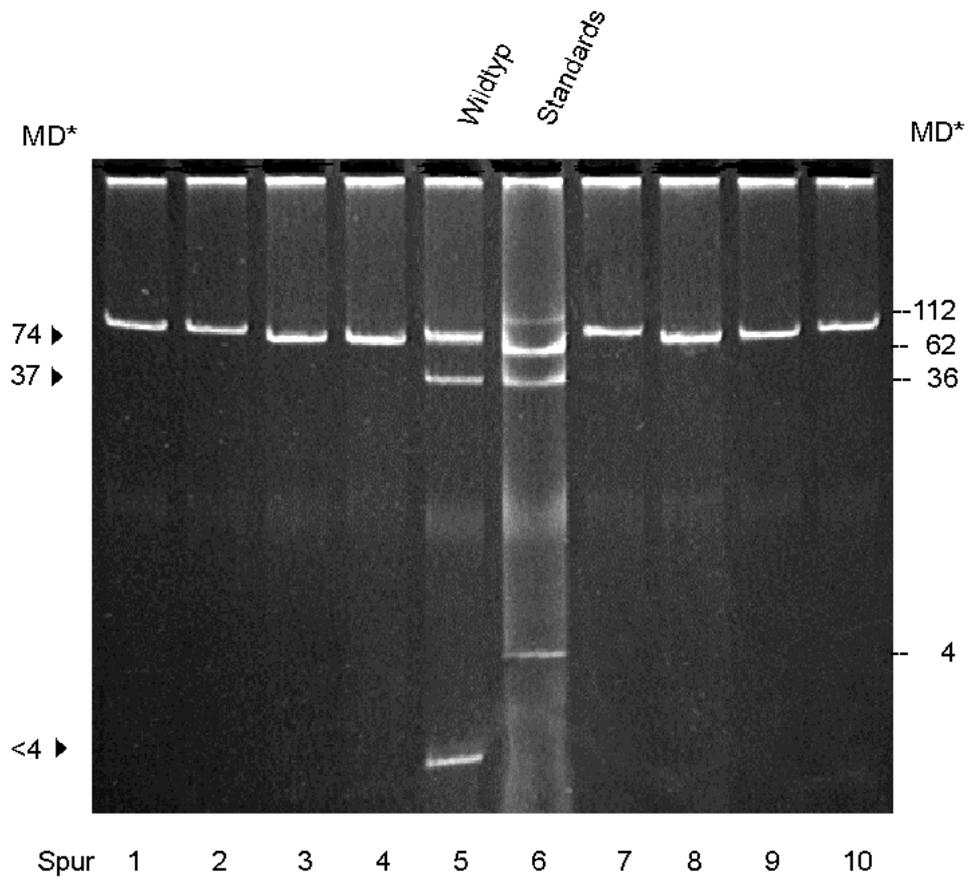


Abb. 4.6.2 Plasmidprofile des *S. Enteritidis* Wildtyps 1225 / 89 (te; ap; cm; kn; Spur 5), der Standards (Spur 6) sowie der dazugehörigen Transkonjuganten (Spur 1-4 und 7-10). Rechts sind die Molekulargewichte für die Standards (Spur 6) und links die für den Wildtyp (Spur 5) angegeben. Eine vollständige Übertragung der Resistenzdeterminanten (te; ap; cm; kn; gn) findet auf einem 102 MD großen Plasmid statt (Cointegrate: Spur 1 und 2, 7, sowie 9 und 10). Teilweiser Transfer der Resistenzdeterminanten ap; kn; cm auf einem 74 MD großen Plasmid : Spur 3, 4 und 8.

\* Molekulargewicht in Megadalton

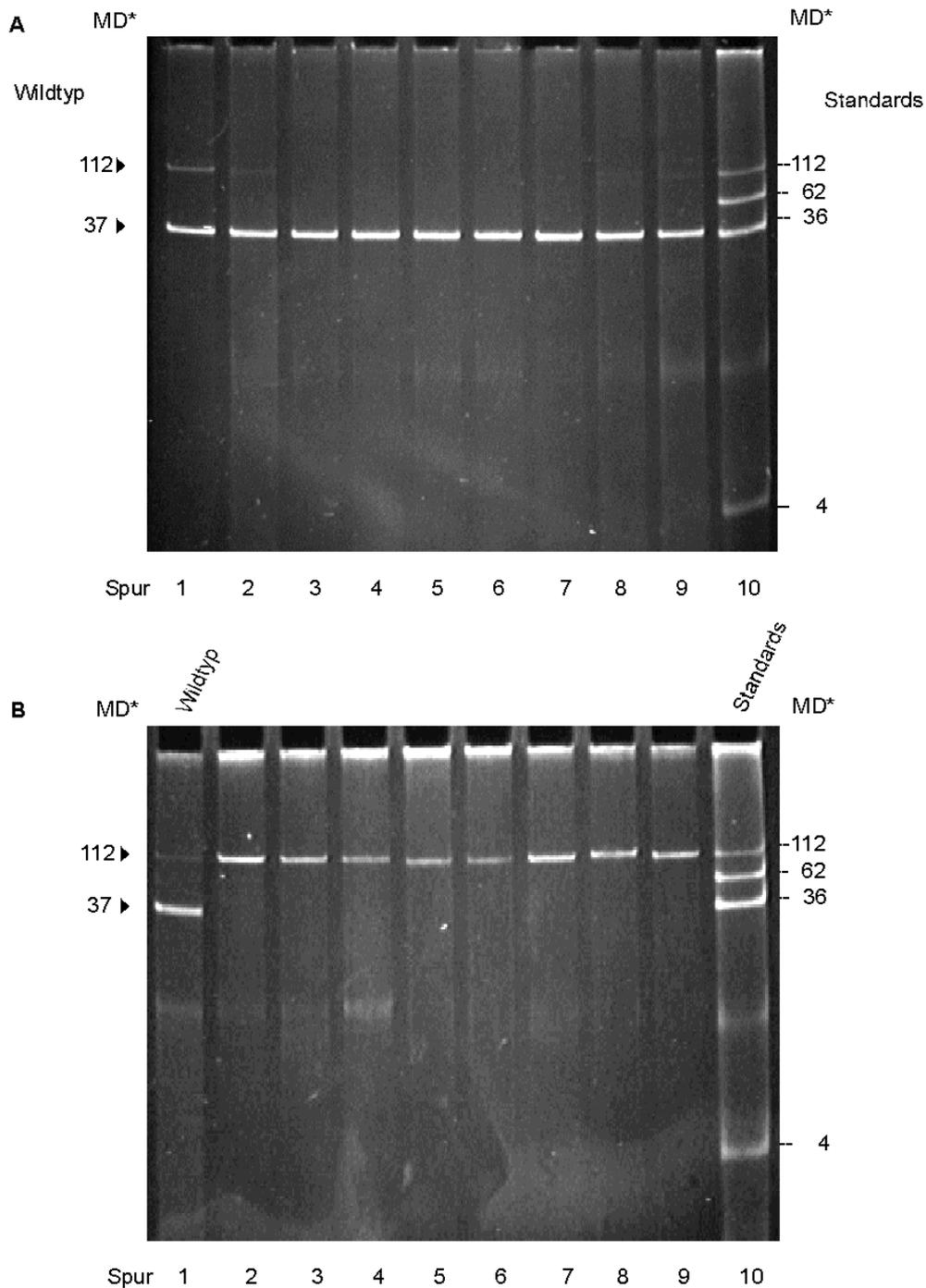


Abb. 4.6.3 Plasmidprofile des *S. Enteritidis* Wildtyps 378 / 94 (te; ap; cm; kn; gn; Spur 1). Die Standards sind auf beiden Gelen auf Spur 10 lokalisiert. Die Transkonjuganten befinden sich auf den Spuren 2-9.

A: Wildtyp gewachsen in H-Broth ohne selektive Zusätze. Außer dem serovarspezifischen Plasmid pRQ29 ist das 112 MD große Plasmid nur schwach zu erkennen.

B: Wildtyp gewachsen in H-Broth mit Tetracyclin und Ampicillin Zusätzen. Unter diesen selektiven Bedingungen ist das 112 MD große Plasmid deutlich sichtbar.

\* Molekulargewicht in Megadalton

---

## 5. Diskussion

### 5.1 Das Resistenzproblem bei Salmonellen

Die Entwicklung antibiotikaresistenter Mikroorganismen bietet die Gefahr, daß bereits überwunden geglaubte Infektionserreger in Zukunft wieder eine größere Bedeutung erlangen. Die damit verbundene Besorgnis hat zu einer zunehmenden Debatte um den Nutzen der mittlerweile weltweit eingesetzten Antibiotika geführt. (Cohen, 1992; Cassell, 1995; Davies, 1997; Wray, 1997). Nicht nur der eingeschränkte Nutzen dieser als "Wundermittel" (Levy 1992) bezeichneten Wirkstoffe, sondern auch die für den Menschen daraus resultierenden Gesundheitsrisiken wie zunehmende Morbidität und Mortalität, die in einigen Fällen gezeigt werden konnte (Cohen, 1992), sowie die ständige Vergrößerung des vorhandenen Pools resistenter Gene haben zu einer Diskussion großen öffentlichen Interesses geführt (Helmuth et al., 1997).

Zu Beginn der 80-iger Jahre ist diese Resistenzentwicklung besonders für die nicht-typhösen Salmonellen Serovare *S. Typhimurium* DT204c (Wray, et al., 1993) sowie DT104 (Threlfall et al. 1994a) und ab 1985 zunehmend auch bei *S. Enteritidis* beobachtet worden (Helmuth et al., 1997). Das Problem liegt vor allem in ihrem Charakter als Zoonoseerreger. Für die genannten resistenten Isolate wurde von vielen Autoren ein Zusammenhang zwischen dem Vorkommen humaner Infektionen und dem Kontakt landwirtschaftlich genutzter Tiere nachgewiesen. Dabei kommt es bereits im Nutztier durch Selektion zur Aquisition von Resistenzgenen bei gramnegativen Mikroorganismen, die im Falle der Salmonellen Serovare *Enteritidis* und *Typhimurium* über die Nahrungsmittelkette beim Menschen zur Salmonellose führen können (Abb. 1.1); (O'Brien et al., 1982; Holmberg et al., 1984a & b; Rowe & Threlfall, 1986; Corpet, 1988; Baird-Parker, 1990; Wray et al., 1990b; Chaslus-Dancla, et al. 1991; Wall et al, 1995; Balis et al., 1996; Low et al., 1996).

Die in dieser Arbeit untersuchte Resistenzentwicklung aller Salmonellen für den Zeitraum 1986 - 1995 ist hauptsächlich durch eine starke Zu- und Abnahme insbesondere der Tetracyclin-, Ampicillin- und Chloramphenicol-resistenten Isolate zwischen den Jahren 1987 und 1991 gekennzeichnet (Abb. 4.1). Bei den hierbei am häufigsten vorkommenden resistenten Isolaten handelt es sich um die wichtigen Serovare *S. Typhimurium*, *S. Typhimurium* O5 neg. sowie *S. Enteritidis*, deren Resistenzverlauf der Abb. 4.2.2 entnommen werden kann.

Bei dem im Jahre 1989 über 80 prozentigen Anteil resistenter *S. Typhimurium* O5 neg. Isolate handelt es sich um resistente Stämme des DT 204c der Kälbermastbetriebe aus dem Weser / Ems Gebiet (Graeber et al., 1995). Hingegen finden sich vor allem bei den englischen Autoren vergleichbare Angaben zum Vorkommen und Häufigkeit der übrigen beiden resistenten Serovare. So konnten Threlfall et al. (1990) im Jahre 1988 für 32% der untersuchten *S. Typhimurium* sowie für 13% der *S. Enteritidis* Isolate eine Resistenz nachweisen.

Neben den Sulfonamid-resistenten Isolaten waren die Tetracyclin-, Ampicillin- und Chloramphenicol-resistenten Isolate am häufigsten vertreten. Wray et al. (1993) stellten für das Jahr 1990 eine über 50 prozentige Resistenz bei *S. Typhimurium* Stämmen fest, hingegen waren für das gleiche Jahr nur 13% resistente *S. Enteritidis* Isolate nachzuweisen. In einer weiteren Studie zeigten Threlfall et al. (1997), daß im Jahre 1994 78% der *S. Typhimurium* Stämme resistent waren und eine nur 9 prozentige Resistenz bei *S. Enteritidis* Isolaten bestand. Am häufigsten wurden hier, ebenso wie in den vorherigen Jahren, die Antibiotika Tetracyclin, Ampicillin und Chloramphenicol bestimmt. Hinsichtlich resistenter *S. Enteritidis* Isolate wurde in der vorgelegten Arbeit für 1994 ein vergleichbarer Wert ermittelt (13%), während der Anteil resistenter *S. Typhimurium* Isolate im Vergleich zu dem von Threlfall et al. (1997) ermittelten Werten mit 33% weit darunter liegt (Abb. 4.2.2).

Weiterhin konnte im Unterschied zur Studie von Threlfall et al. (1997) in dieser Arbeit eine Änderung in der Häufigkeit der isolierten Resistenzen beobachtet werden. So wurden bis 1991 für alle resistenten Salmonellen Serovare (Abb. 4.1) am häufigsten Tetracyclin-resistente Isolate, gefolgt von den Ampicillin- und Chloramphenicol-resistenten Isolaten, bestimmt.

Jedoch liegt im Jahre 1992 die Resistenzrate Nitrofurantoin-resistenter Isolate (12,4%) über der der Tetracyclin-resistenten Isolate (11,4%), wobei ab 1993 der Anteil Tetracyclin-resistenter Isolate mit 10,7% wieder am höchsten ist. Der Anteil resistenter Nitrofurantoin Isolate steht ab 1993 bis 1994 vor den übrigen Resistenzen an zweiter Stelle und erst im Jahre 1995 sinkt dieser unter den Anteil der übrigen Resistenzen (Abb. 4.1).

Die in dieser Arbeit hinsichtlich der Häufigkeit mehrfachresistenter im Vergleich zu einfachresistenten *S. Enteritidis*-Stämmen ermittelten Ergebnisse konnten in der Literatur vielfach bestätigt werden, wobei hier mehrfachresistent als "resistent gegen vier oder mehr Antibiotika" definiert wird (Threlfall et al., 1997). Von den insgesamt 65 untersuchten *S. Enteritidis*-Stämmen waren knapp 14% mehrfachresistent im Unterschied zur Häufigkeit einfach (49%)-, zweifach (30%)- und dreifachresistenter (6%) Stämme (Tab. 4.3.2). In einer Studie verglichen Threlfall et al. (1993) das Vorkommen mehrfachresistenter *Salmonella*-Stämme aus den Jahren 1981 und 1990 bei Mensch und landwirtschaftlich genutzten Tieren miteinander. Von den im Jahre 1990 17794 untersuchten humanen Isolaten waren 11% einfachresistent und <1% mehrfachresistent. Die im gleichen Jahr untersuchten 3832 Geflügelisolate zeigten zu 14% eine Einfachresistenz und 1% der Stämme wies eine Mehrfachresistenz auf. Dieses mehrheitliche Vorkommen einfachresistenter Stämme bei *S. Enteritidis* wurde auch von anderen europäischen und außereuropäischen Autoren beschrieben (Frost et al., 1989; Lee et al., 1993a; Vatopoulos et al., 1994; Ramos et al., 1996; Tassios et al., 1997; Tschäpe et al., 1997).

Nicht nur die Häufigkeit verschiedener Resistenzprofile sondern auch die im allgemeinen relativ niedrige Resistenzrate sowie das Vorkommen von Mehrfachresistenzen unterscheidet diesen Serovar deutlich vom Serovar *S. Typhimurium*. So konnte bei *S. Typhimurium* ein bis zu 66%iger Anteil von 7-9fach resistenten Stämmen, die im Jahre 1990 vom Rind isoliert wurden, nachgewiesen werden (Threlfall et al., 1993). Bereits im Jahre 1981 wurde über 5-7fach resistente *S. Typhimurium* DT 204c Isolate von Rindern und Kälbern berichtet, deren klonale Natur auf die Eigenschaften dieses seit 1983 in England vorherrschenden Phagentyps

zurückzuführen war (Rowe, 1981; Threlfall et al., 1990 & 1993). Threlfall et al. (1997) berichten von einer Zunahme mehrfachresistenter Isolate von *S. Typhimurium* im Jahre 1996 (81%) im Vergleich zu 1994 (62%). Insbesondere der DT104 boviner Herkunft mit seinem seit 1990 bestehenden Resistenzmuster gegen Ampicillin, Chloramphenicol, Streptomycin, Sulfonamiden und Tetracyclinen wurde 1996 zu 95% isoliert im Unterschied zu 1994 wo er zu 89% bestimmt wurde (Low et al., 1996).

Ursächlich leistete der massive Antibiotikaeinsatz in der Kälberaufzucht einen wesentlichen Beitrag zur Entwicklung multiresistenter *S. Typhimurium*. Dieser scheint in der Geflügelproduktion geringer zu sein, so daß der mit dem Geflügel assoziierte Serovar Enteritidis PT4 (Annonymus, 1988; Coyle et al., 1988; Humphrey et al., 1989; Telzak et al., 1990; Hafez & Stadler, 1997) aufgrund eines geringeren Selektionsdrucks weniger häufig mehrfachresistent in Erscheinung getreten ist (Threlfall et al., 1993). Neben dieser Ursache kommen weiterhin niedrigere Transferraten von Resistenzplasmiden in Frage, die bei *S. Enteritidis* zu niedrigeren Resistenzraten führen können, wie sie von den Autoren Frost et al. (1989) sowie Anderson & Threlfall (1970) für diesen Serovar bereits beschrieben wurden.

Die oben für *S. Typhimurium* auch in der Literatur (Rivera et al., 1991; Lee et al., 1993) als typisch beschriebenen Eigenschaften schließen jedoch nicht aus, daß *S. Enteritidis* potentiell die Fähigkeit zur Multiresistenz besitzt und diese auch effektiv übertragen könnte, wie dies die Ergebnisse der Resistenzüberprüfung und Transferraten der untersuchten 65 Stämme zeigen (Tab. 4.3.2.2 und Appendix, Anhang 2). Die Autoren Nair et al. (1995) konnten in den USA ebenso multiresistente *S. Enteritidis* Stämme nachweisen. Von den insgesamt 588 Isolaten unterschiedlicher Herkunft waren 81% gegen ein oder mehrere Antibiotika, die in der Humanmedizin therapeutisch eingesetzt werden, resistent. 70% der 467 aus dem nichthumanen Bereich sowie 30% der 121 humanen Stämme waren resistent gegen 4 oder mehr der getesteten 12 Antibiotika.

In einer dänischen Arbeit aus dem Jahre 1996 berichteten Pers et al. (1996) von einem *S. Enteritidis* Stamm, der aus einem Patienten mit bestehendem Milzabszeß isoliert wurde und gegen  $\beta$ -Lactamantibiotika, Chloramphenicol sowie Ciprofloxacin resistent war. Der Patient wurde einen Monat zuvor wegen einer durch *S. Enteritidis* verursachten Pneumonie mit Ampicillin und Ciprofloxacin behandelt. Somit wird deutlich, daß auch *S. Enteritidis* unter entsprechend selektiven Bedingungen sich multiresistent verhalten und, in gleicher Weise wie bei einer Infektion mit einem chinolonresistenten *S. Typhimurium* (Hof et al., 1991), eine klinisch bedrohliche Dimension annehmen kann.

## 5. 2 Nitrofurantoinresistenz bei *S. Enteritidis* : ein ernstzunehmendes Problem ?

Die unter Punkt 5.1 beschriebene vergleichsweise starke Zunahme Nitrofurantoin-resistenter Isolate hat ihre Ursache in der ab 1990 starken Zunahme resistenter *S. Enteritidis* Isolate (Abb. 4.2.3). Für den Zeitraum 1991-1995 stammte durchschnittlich die Hälfte aller *S. Enteritidis* Isolate aus dem Geflügelbereich, wobei 1995 72% dieser Isolate gegen Nitrofurantoin resistent

(Tab. 4.2.3) waren. Diese hohen Isolations- und Resistenzraten wurden bereits 1989 in einer Arbeit von Rampling et al. (1989) beschrieben, die über eine zunehmende Nitrofurantoinresistenz bei *S. Enteritidis* PT4 vom Geflügel in England berichteten. In ihrer Arbeit untersuchten sie 81 Mastküken, die von der weiteren Verarbeitung während der Schlachtung aufgrund makroskopisch sichtbarer Pericarditiden ausgeschlossen wurden. 47 (58%) der untersuchten Tiere zeigten eine Infektion mit dem Serovar *S. Enteritidis* PT4. 95 % dieser Isolate waren resistent gegen Nitrofurantoin, wohingegen alle Isolate sensibel gegenüber einer breiten Palette von Antibiotika waren.

Nitrofurantoin wird neben dem Furazolidon in der Geflügelindustrie in England hauptsächlich zur Behandlung von Infektionen mit Protozoen *Eimeria spp.* (Rampling et al., 1989), *Trichomonas vaginalis* und *T. fetus* (Hennig, 1972a) eingesetzt, welche unter intensiven Haltungsbedingungen der Masttiere entstehen (Rampling et al., 1989). Nach Chadfield (1995) ist das Furazolidon, mit bestehender Kreuzresistenz zu Nitrofurantoin (Paul et al., 1952), in England das am häufigsten eingesetzte Nitrofurantoin, das in der Veterinärmedizin als Therapeutikum und als Futtermittelzusatz verwendet wird.

Hingegen besitzen in Deutschland die Nitrofurane aufgrund ihrer ungeklärten Toxizität, eine geringe therapeutische Anwendung (Kroker, 1996). Bis zum Jahre 1996 wurden Nitrofurantoin und Furazolidon als „Hohlraumtherapeutika“ verwendet, jedoch nur bei Tieren, die nicht der Lebensmittelgewinnung dienen. So wurde beim Hund Nitrofurantoin zur Behandlung von Harnwegsinfektionen eingesetzt.

Vor dem EU-weiten Verbot im Jahre 1995 wurde Furazolidon bei infektiösen Enteritiden, hervorgerufen durch *E. coli*, Salmonellen und *Balantidium coli* unter anderem beim Geflügel in einer Dosierung bis zu 400g/t Futter für 7-21 Tage und bis 200 mg/l Trinkwasser für 5-14 Tage angewendet (Kroker, 1996).

In einer weiteren Studie aus dem Jahre 1990 untersuchten Rampling et al. (1990) 38 *S. Enteritidis* PT4 Serovare von Mastküken sowie 89 Stuhlproben von Patienten mit Diarrhöen. Diese Ergebnisse wurden mit 81 Stämmen anderer Serovare sowie mit 16 *S. Enteritidis* Isolaten, die nicht den PT4 darstellten, verglichen. Alle 38 Geflügelisolate sowie > 95% (86) der Stuhlproben waren resistent gegen Nitrofurantoin. Ebenso verhielten sich 36% der übrigen Stämme und 81% (13) der 16 *S. Enteritidis* Isolate, die nicht dem PT4 angehörten, gegenüber Nitrofurantoin resistent (Rampling et al., 1990). Im Gegensatz dazu konnten die australischen Autoren Cox et al. (1996) andere Ergebnisse erzielen. In ihrer Studie wurden je 66 und je 62 *S. Enteritidis*-Stämme auf Nitrofurantoin bzw. Furazolidon getestet. Von den 66 Stämmen gehörten 18 dem PT4 an. 92% der insgesamt 66 Stämme sowie 84% der *S. Enteritidis* PT4 Stämme waren sensibel. Diese Ergebnisse stehen im starken Kontrast zu den von Rampling et al. (1990) erbrachten Resultaten.

Die Ergebnisse der englischen Untersuchungen sowie der in England übliche Gebrauch der beiden genannten Nitrofurane weisen auf eine lange Tradition im Umgang mit diesen Stoffen hin.

Denkbar wäre demnach, daß in England ein sensibler *S. Enteritidis* Klon durch einen höher resistenten ersetzt wurde, und dieser sich möglicherweise in den 90-iger Jahren dann in Deutschland ausbreiten konnte.

Demgegenüber, scheint ein derart vielfältiger Einsatz von Nitrofuranen, wie er in England in der Veterinärmedizin üblich ist, in Deutschland -zumindest in den alten Bundesländern- nicht bestanden zu haben, obschon die Autoren Hafez et al. (1992) von einer häufigen Verwendung furazolidonhaltiger Futtermittel in der Broilermast zur Prophylaxe gegen Salmonellen im Südwestdeutschen Raum berichten. Ob sich hieraus ein resistenter Klon innerhalb der alten Bundesländer hätte entwickeln können, muß unbeantwortet bleiben.

Eine andere Situation ist in den neuen Bundesländern zu beobachten. In seinem am BgVV erstellten Jahresbericht zur Resistenzbewertung veterinärmedizinischer bakterieller Erreger für das Jahr 1990 stellt Trollenier (1992) eine bemerkenswert hohe Nitrofurantoinresistenz (abhängig von der Tierart zwischen 22 und 59%) bei *S. Enteritidis* fest. So konnte für 22% der vom Huhn und für 59% der vom Rind isolierten *S. Enteritidis* Stämme eine Nitrofurantoinresistenz festgestellt werden. Da dieser Bericht ausschließlich die Resistenzsituation der neuen Bundesländer für das Jahr 1990 beschreibt, wird erkennbar, daß möglicherweise andere Futtermittelzusatzstoffe als in den alten Bundesländern Verwendung gefunden haben. So existierten nach Hennig (1972a) in der ehemaligen DDR Futtermittelrezepturen, nach denen Furazolidon und Nitrofurazon (Nitrofurazol) zur Prophylaxe der Kokzidiose in der Geflügelproduktion eingesetzt wurden. Bei der Herstellung von Broileralleinfutter und Kükenaufzuchtfutter erfolgte der Zusatz, unabhängig von der verwendeten Substanz, im Mischfutterwerk. Die Dosierung wurde mit ca. 125 mg Kokzidiostatikum je kg Futter (Hennig, 1972b) angegeben, jedoch mit der Empfehlung dieses im zweijährigen Rhythmus zu wechseln. Nach Jeroch (1972) wurde das in der ehemaligen DDR hergestellte Kükenaufzuchtfutter (Legerichtung) gemäß staatlicher Rezeptur mit 110 mg/kg eines wirksamen Kokzidiostatikums versehen. In der Junghennenperiode wurde das Alleinfutter für Tiere des Legetyps seit dem 01.01.1972 mit 86 mg/kg supplementiert, während das Broilermastmischfutter 120 mg des Kokzidiostatikums Zoalen (3,5 Dinitro-ortho-toluamid)/kg zu enthalten hatte (Jeroch & Flachowsky, 1972). Die Verwendung des Furazolidons in der Kälberfütterung erfolgte hingegen als Prophylaxe gegen Koli- und Salmonelleninfektionen. Die Dosierung betrug 2,5g je kg des Medizinalfutters "Kälmed", von dem 30g/Tier über drei Tage lang während der Umstellung in Einzelbuchtenhaltung verabreicht wurde (Hennig, 1972c).

Die vom Ministerium für Land-, Forst- und Nahrungsgüterwirtschaft jährlich herausgegebenen "Qualitätsanforderungen sowie Produktionsvorschriften an Mischfuttermittel, Wirk- und Mineralstoffmischungen" galten als Gütevorschriften und waren somit verbindlich für die Herstellerbetriebe industrieller Mischungen. In einer Ausgabe des Jahres 1982 sind die Inhaltsstoffe für die in der Tierproduktion verwendeten Mischfuttermittel in Form von Nährstoffrezepturen zusammengestellt. Von den neun für das Scharrgeflügel vorgesehenen Rezepturen enthalten fünf den Vermerk "Kokzidiostatikum-Zusatz", nunmehr ohne Dosierungsangabe, jedoch mit dem Hinweis, daß diese variabel ist, da die "Anteile in Abhängigkeit vom einzusetzenden Handelsprodukt unterschiedlich sind" (Röhnisch & Knappe,

1982). Erst ab 1984 findet sich eine verbindliche Dosierungsangabe für das seit diesem Jahr eingesetzte Monensin (100 mg/kg Broilermastfutter) zur Kokzidiose-Prophylaxe (Illing & Müller, 1986). Insgesamt könnten jedoch die sowohl zur Verwendung als auch zur Dosierung eines geeigneten Kokzidiostatikums eher allgemein gehaltenen Angaben zu einem nicht überschaubaren Gebrauch von Antikokzidiostatika geführt haben, wodurch eine Resistenzentwicklung innerhalb der Enterobacteriaceae gegenüber diesen zur Prophylaxe eingesetzten Antibiotika nicht ausgeschlossen werden kann. Dies trifft auch für das Nitrofurantoin zu, obwohl es nach Strey et al. (1986) nach „Bekanntwerden kritischer Einschätzungen in seiner Anwendungsweise neu geregelt wurde“.

Daß der Einsatz von Antibiotika zur Prävention einer Salmonellose sowie der Gebrauch von Antikokzidiostatika beim Geflügel sogar zu gehäuften Infektionen mit resistenten Salmonellen führen kann, wurde bereits von den Autoren Rantala & Nurmi (1974), Smith & Tucker (1975 & 1978) sowie Pavia et al. (1990) nachgewiesen. In einer Studie von Manning et al. (1994) konnte insbesondere für *S. Enteritidis* eine Zunahme der Kolonisationsrate des Caecums bei Leghorn Eintagsküken gezeigt werden. Diese wurden mit Bacitracin,- Novobiocin,- Nalidixin- sowie Nitrofurazon-resistenten *S. Enteritidis* Isolaten oral infiziert, nachdem sie ein mit entsprechenden Antibiotika versehenes Futter (Novobiocin: 0,385 g/kg oder Nitrofurazon: 0,3 g/kg) für 7 Tage erhalten hatten.

Demnach wäre auch zu diskutieren, ob sich im Laufe der Zeit in der DDR ein resistenter *S. Enteritidis* Klon herangebildet haben könnte und dieser ab 1990 durch regen Austausch unterschiedlicher Geflügelzüchter nun in der gesamten Bundesrepublik möglicherweise verbreitet wurde. In diesem Zusammenhang sei auf die Arbeit von Wray et al. (1990b) verwiesen, die Ställe und Betriebe von Tierhändlern als wichtige Standorte für die Übertragung und Verbreitung von Salmonelleninfektionen bei Kälbern benennen.

Epidemiologisch schlüssige Resultate wären jedoch nur nach weitergehenden molekularbiologischen Untersuchungen zur Feindifferenzierung der Isolate zu erwarten, die jedoch den Rahmen dieser Arbeit weit übersteigen.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt läßt sich auch nicht abschätzen, inwiefern das für beide Nitrofurane (Nitrofurantoin: Bundesanzeiger 1994; Furazolidon: Bundesanzeiger 1995) erlassene Verbot zur Behandlung bei Tieren, die der Lebensmittelgewinnung dienen, einen Einfluß auf die Entwicklung Nitrofurantoin-resistenter *S. Enteritidis* Isolate gehabt hat. Hinzu kommt, daß zwei (Ronidazol und Dimetridazol) der vier bislang zur Verfügung stehenden Zusatzstoffe zur Verhütung der Histomoniasis und der Kokzidiose in den Anhang IV der RatsVo 2377/90/ EWG aufgenommen wurden. Für Ipronidazol, ein weiterer Vertreter der Nitroimidazole, besteht keine Zulassung mehr, so daß einzig Nifursol als Nitrofurand-derivat zur Prophylaxe eingesetzt werden darf (Kroker, 1997). Berücksichtigt man die bereits in den 50-iger Jahren festgestellte Kreuzresistenz innerhalb der gesamten Nitrofurangruppe (Paul et al., 1952; Merck Veterinary Manual, 1986) und die oben genannten Beschränkungen, so ist es denkbar, daß eine vermehrte Anwendung von Nifursol (möglicherweise) zu einer insgesamt zunehmenden Nitrofurandresistenz beigetragen hat.

Insgesamt bleibt die hier dargestellte Nitrofurantoinresistenzentwicklung bei *S. Enteritidis* Isolaten der Jahre 1990-1995 als interessantes epidemiologisches Geschehen festzuhalten. Eine nochmalige Überprüfung der bei den hier untersuchten *S. Enteritidis* Stämme nicht nachzuweisenden Kreuzresistenz möge in einer weiterführende Studie, die die Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration beinhalten sollte, ihren Schwerpunkt finden.

Vor dem Hintergrund jedoch bereits existierender Chinolonresistenzen bei Salmonellen (Griggs et al., 1994; Pers et al., 1996) sowie bei *Campylobacter* (Endtz et al., 1991) ist die Nitrofurantoinresistenz bei diesem Serovar aus humantherapeutischer Sicht als gering zu werten zumal Nitrofurantoin im Unterschied zu den Chinolonen in der Humanmedizin kaum noch Anwendung findet.

### 5. 3. Plasmidstabilität

Hinsichtlich der Stabilität von Plasmiden in Bakterienzellen bestehen viele und oft kontroverse Auffassungen.

Die Stabilität eines Resistenzplasmids in einer Bakterienzelle hängt im wesentlichen vom umgebenden Milieu ab. In Anwesenheit eines Antibiotikums besitzen die plasmidhaltigen Bakterienzellen einen Wachstumsvorteil gegenüber den sensiblen Zellen, wie von vielen Autoren (Levy et al., 1976; Linton, 1985; Bennet & Linton, 1986;) gezeigt wurde.

In einer Studie von Hughes & Datta (1983) konnten die Autoren eindrücklich belegen, inwiefern sich die Abwesenheit eines selektiven Drucks auf das Resistenzverhalten von plasmidhaltigen Mikroorganismen auswirkt. Die von ihnen untersuchten *Enterobacteriaceae*-Stämme der Murray-Sammlung aus der Zeit vor Einführung der Antibiotika (1917-1954) wiesen keine Resistenzen auf, obwohl 24% der Stämme über konjugative Plasmide verfügten.

Einige Autoren besonders älterer Literatur vertreten die Ansicht, resistente Bakterien wären sensiblen Wirtszellen oft unterlegen, da die zu erhaltenden Plasmide einen zusätzlich energetischen Aufwand bedeuten würde (Godwin & Slater, 1979; Helling et al., 1981; DaSilva & Bailey, 1986).

Diese Meinung wurde mit der in dieser Arbeit durchgeführten Resistenzüberprüfung anhand ausgewählter *S. Enteritidis* Stämme aus 10 Jahren nicht bestätigt. 98% der Stämme konnten ihre Resistenzen behalten, obwohl sie in einem unselektiven Medium als Stichkultur gelagert wurden (Tab. 4.3.1). Dies zeigt, daß Plasmide offensichtlich über einen langen Zeitraum trotz Abwesenheit eines selektiven Mediums in Wirtszellen präsent sein können. In diesem Zusammenhang wurde immer wieder die Frage laut, welchen Beitrag Plasmide außerdem für das Überleben der Wirtszelle leisten, abgesehen von der definierten Situation eines selektiven Mediums, in dem Bakterienzellen ohne begleitende Resistenzfaktoren keinen Selektionsvorteil hätten (Bennett & Linton, 1986). Ursächlich kommen hierfür nach Lenski (1997) evolutive, mutationsbedingte Adaptionsvorgänge seitens der Wirtszelle in Betracht, die es ermöglichen, daß Plasmide in der Bakterienzelle erhalten bleiben. In diesem Zusammenhang konnten Timmis et al. (1985) bereits zeigen, daß Plasmide Mechanismen entwickelten, die dazu führten, daß bei

der Teilung der Wirtszelle jede Tochterzelle mindestens eine Kopie dieser Elemente erhielten. Darüber hinaus konnten einige Autoren zeigen, daß in gemischten Bakteriensuspensionen (plasmidhaltige und plasmidfreie Zellen) die plasmidhaltigen den plasmidfreien Kulturen hinsichtlich ihrer Wachstumsrate nicht unterlegen waren (Jones et al., 1980; Jones & Melling, 1984).

In ihrer Übersicht zur „Verbreitung und Persistenz von Antibiotika Resistenzgenen“ weisen Salyers & Amabile-Cuevas (1997) auf das Vorhandensein weiterer, auf dem Resistenzplasmid lokalisierte Gene hin, die Bakterien in Abwesenheit eines Antibiotikums zusätzliche Selektionsvorteile ermöglichen (Amabile-Cuevas et al., 1996). Dabei handelt es sich um ein für gewöhnlich im Transposon integriertes DNA Segment (Integron), daß neu aufgenommene Gene bündeln und als „Gencluster“ in das Transposon integrieren kann (Hall & Collis, 1995). Solche durch Integrons vermittelten Mechanismen konnten auch für Plasmide, die Resistenzgene gegenüber Schwermetallen besitzen und die im Sinne einer Co-Selektion gleichzeitig für den Erhalt von Resistenzdeterminanten codieren, nachgewiesen werden (Salyers & Amabile-Cuevas, 1997).

So konnten Summers et al. (1993) in ihren Studien zeigen, daß Blei neben Schwermetall-Resistenzen auch für die Ausbildung von Antibiotikaresistenzen selektiv wirkte. Im Vergleich zu den Primaten ohne Amalgamfüllungen, konnten die Autoren bei 6 Primaten mit Amalgamfüllungen einen signifikant höheren Anteil resistenter Bakterienstämme in den Faeces nachweisen.

Daß die Ursachen für die Beibehaltung von Resistenzplasmiden in Abwesenheit eines selektiven Mediums noch nicht umfassend geklärt sind, zeigt deutlich, wie komplex die Vorgänge sind, die die Aquisition, Verbreitung sowie Erhaltung von Resistenzgenen innerhalb von Mikroorganismen begleiten.

#### 5. 4 Mögliche klonale Natur der untersuchten *S. Enteritidis*-Stämme

Die Subklassifizierung von *Salmonella* Enteritidis Isolaten anhand bestimmter Methoden sowie die daraus resultierenden Ergebnisse gestatten eine Aussage über mögliche vorhandene klonale Strukturen (Morris et al., 1992; Brown et al., 1994). Klonal bedeutet nach Orskov & Orskov (1983), daß mikrobiologische Isolate, die an verschiedenen Orten zu unterschiedlichen Zeiten und aus verschiedenen Quellen isoliert wurden, jedoch, aufgrund identischer phänotypischer wie auch genetischer Merkmale, einen gemeinsamen Ursprung besitzen. Mit anderen Worten: Ein Klon stellt eine Population von Zellen dar, die sich von einer einzigen Elternzelle ableiten. (Selunder et al., 1986). Nach Eisenstein (1990) kann das Vorhandensein eines Klons nie vollständig bewiesen werden. Durch den Einsatz und die Kombination geeigneter Untersuchungsmethoden wird aber die Beschreibung und damit die Anwesenheit eines Klons wahrscheinlich.

Anhand Antibiotika-sensibler Salmonellen Isolate internationaler Herkunft konnten Helmuth et al. (1985) für *S. Typhimurium*, *S. Dublin*, *S. Enteritidis* und *S. Choleraesuis* klonale Strukturen

bestimmen. Diese beruhen auf dem Besitz von *Salmonella* Virulenz Plasmiden und auf dem Vorhandensein homogener Proteine der äußeren Membran, wodurch ein globaler epidemiologischer Zusammenhang für diese Serovare etabliert werden konnte.

Im Unterschied zu den Ergebnissen von Helmuth et al. (1985) zeigten die hier untersuchten 65 resistenten Stämme nur ansatzweise klonale Beziehungen auf, die sich jedoch überwiegend auf Stämme des gleichen Jahres beschränkten.

Jeweils 2 von 4 Stämmen (1357,1358 / 87 sowie 803, 804 / 89) zeigten konstante Merkmale, die eine klonale Zuordnung zuließen. Beide Isolate aus dem Jahre 1987 waren Ampicillin monoresistent, gehörten dem Phagentyp 13a an und besaßen ein 32 Md großes Plasmid. Der Stamm 1359 / 87 unterschied sich von den eben genannten Stämmen nur durch seine Konversion zum Phagentyp 8, ein Vorgang, welcher bei den Serovaren Enteritidis und Typhimurium üblich ist und von einigen Autoren beschrieben wurde (Frost et al., 1989; Threlfall & Chart, 1993; Ridley et al., 1996; Threlfall et al., 1997).

Nur 2 Stämme aus den Jahren 1990 (967 / 90) und 1994 (378 / 94) zeigten die gleichen phänotypischen und genotypischen Eigenschaften je eines Stammes aus dem Jahre 1988: (1147 / 88; Tetracyclinresistenz; Phagentyp 4; Plasmide: 68 und 37 Md) und (2099 / 88; Resistenzen: te, ap, cm, kn, gn; Phagentyp: 4; Plasmide: 112, 37). Aus dem Stamm 378 / 94 könnte der im gleichen Jahr isolierte Stamm 121 / 94 hervorgegangen sein, besitzt er doch bis auf das 112 Md große Plasmid die beim Stamm 2099 / 88 genannten epidemiologischen Marker. Möglicherweise führte hier eine Deletion zu dem Verlust des 112 Md großen Plasmids, welches phänotypisch in einem unvollständigen Resistenztransfer (ap) resultierte. (Appendix, Anhang 1).

Dieses heterogene Bild unterscheidet resistente *S. Enteritidis* Isolate nicht nur von ihren sensiblen homogenen Partnern (Helmuth et al., 1990; Tschäpe et al., 1997), sondern auch vom Serovar *Salmonella* Typhimurium, welcher Ende der 70-ziger bis Mitte der 80-ziger Jahre als DT 204c (Rowe et al., 1979; Threlfall et al., 1980 & 1986; Graeber et al., 1995; Wray et al., 1993) und nachfolgend seit Ende der 80-ziger Jahre als multiresistenter DT104 eine klonale Verbreitung in Europa und den USA erfuhr (Threlfall et al., 1994; Low et al., 1996; Vahaboglu et al., 1996; Baggesen et al., 1997b; Brisabois et al., 1997).

Gleichwohl künftig *S. Typhimurium* DT104 auch in Deutschland als vorherrschender Epidemietyp erwartet wird (Liesegang et al., 1997; Threlfall et al., 1997), sollte der möglichen Entwicklung eines mehrfachresistenten *S. Enteritidis* PT4 Klons vor allem durch einen sensiblen und vernünftigen Antibiotikaeinsatz vornehmlich in der Geflügelproduktion begegnet werden. Die Qualität und das Ausmaß der Verteilung eines epidemiologisch relevanten Klons wird im wesentlichen durch die von Levy (1994) aufgestellte "Antibiotika Resistenzgleichung" bestimmt. Demnach führen, neben einer Reihe anderer Faktoren, Antibiotika als selektives Agens in Kombination mit einem geeigneten Vehikel (Resistenzgene) zur Entstehung eines womöglich mehrfachresistenten Mikroorganismus, der unter Umständen eine gesellschaftspolitische und volksgesundheitliche Bedeutung annehmen kann (Fock, 1995; Levy, 1997; WHO, 1997).

## 6. SCHLUSSFOLGERUNGEN

- 1) Die Resistenzrate bei *Salmonella* Enteritidis ist im Vergleich zu anderen Serovaren sehr niedrig (< 10%) und zeigt bis auf die Nitrofurantoinresistenz bis 1995 keine steigende Tendenz.
- 2) Knapp 50% (32) der untersuchten resistenten 65 Stämme wiesen eine 1-fach Resistenz auf, wobei am häufigsten die Monoresistenz gegenüber Tetracyclin vertreten ist (18 Stämme (27,7%).
- 3) 50% (33) der Stämme besitzen eine Mehrfachresistenz, deren Hauptanteil (61%) die 2-fach Resistenzen sind, von denen am häufigsten die Tetracyclin / Kanamycin Kombination vorkommt.
- 4) Von allen Stämmen haben 54 (83%) eine oder mehrere Resistenzen übertragen.
- 5) Für nur 6 Stämme konnten ansatzweise klonale (gleiche epidemiologische Marker: Resistenzen, Phagentyp und Plasmid) Strukturen nachgewiesen werden.
- 6) Die seit 1991 zunehmende und im Jahre 1995 bemerkenswert hohe (35%) Nitrofurantoinresistenzrate bleibt als epidemiologisches Geschehen interessant, aber ungeklärt. Dabei stammte die Hälfte aller Isolate vom Geflügel. Denkbar wäre, daß sich ein Epidemieklon herangebildet und über einen langen Zeitraum dominierte. Weitere molekularbiologische Untersuchungen sollten zur Klärung der Infektionsquelle durchgeführt werden.
- 7) Aufgrund des nur gelegentlichen Einsatzes als Therapieantibiotikum, wird der Nitrofurantoinresistenz bei diesem Serovar nur geringe Bedeutung beigemessen.
- 8) Insgesamt besitzt *Salmonella* Enteritidis, in Abhängigkeit vom Selektionsdruck die Fähigkeit zur Multiresistenz, ähnlich wie bei dem Serovar *S. Typhimurium*.

## 7. ZUSAMMENFASSUNG

Neben der Beurteilung der allgemeinen Resistenzentwicklung bei Salmonellen über einen Zeitraum von 22 Jahren (1974-1995) wurden im Rahmen dieser Arbeit die phänotypischen und genetischen Eigenschaften an ausgewählten *S. Enteritidis* Stämmen mittels molekularbiologischer Methoden untersucht.

Die Untersuchung der Resistenzentwicklung erfolgte anhand der an das BgVV eingesandten Salmonellen Stämme, wobei die häufig vorkommenden Serovare *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* sowie *S. Typhimurium* O:5 neg. besondere Berücksichtigung fanden. Dabei zeigte sich, daß die Resistenzrate für Salmonellen im allgemeinen bei 20% liegt und daß der im Jahre 1990 hohe Wert von 40% auf das Vorherrschen von multiresistenten *S. Typhimurium* O:5 neg. zurückgeführt werden konnte. Im Vergleich dazu ist die Resistenzrate für *S. Enteritidis* mit 10% gering.

Die seit 1993 beobachtete starke Zunahme resistenter *S. Enteritidis* Isolate fand ihre Ursache in der zunehmende Resistenzrate gegenüber Nitrofurantoin. Diese Feststellung mündete in einer zusätzlichen Überprüfung der Nitrofurantoinresistenz anhand von 113 *S. Enteritidis* Stämmen aus dem Jahre 1995.

Um die Übertragbarkeit der Antibiotika-Resistenzen bei *Salmonella* *Enteritidis*, dessen Phagentyp 4 ab Ende der achtziger Jahre zum dominierenden Epidemietyp in Mitteleuropa gehört, zu überprüfen, wurden an 65 ausgewählten *S. Enteritidis* Stämmen genetische Untersuchungen durchgeführt.

Dazu wurden nur solche *S. Enteritidis* Stämme ausgewählt, deren Resistenzmuster Antibiotika aufwiesen, die üblicherweise als Therapieantibiotika (Tetracycline, Ampicillin, Chloramphenicol, Kanamycin und Gentamicin) Anwendung finden. Von den 65 untersuchten Isolaten waren 50% monoresistent und 27% wiesen eine Tetracyclinresistenz auf. Die übrigen 50% verhielten sich resistent gegen zwei oder mehrere Antibiotika.

Die Untersuchungen beinhalteten Kreuzungsexperimente des Donors (resistente *S. Enteritidis* Stämme) mit dem Recipienten *E. coli* K-12, aus denen Transkonjuganten (*E. coli*) mit entsprechend neu erworbenen Resistenzen resultierten. Die Versuche wurden bei 37°C bzw. bei 22°C durchgeführt. 71% (46) der Isolate und damit am häufigsten haben bei 37°C und nur 12% (8) haben bei 22°C ihre Resistenz übertragen.

Neben der Übertragbarkeit von Resistenzen sowie der Bestimmung der Transferraten bildete die Untersuchung hinsichtlich eines vollständigen oder teilweisen Transfers der Resistenzgene multiresistenter Stämme einen weiteren Schwerpunkt dieser Arbeit. Insgesamt haben 83% (54) eine oder mehrere Resistenzen übertragen.

Eine weitere Differenzierung der *S. Enteritidis* Stämme erfolgte durch die Plasmidprofilanalyse, also die Bestimmung von Zahl und Größe der innerhalb eines Stammes vorliegenden Plasmide.

Alle Stämme besaßen ein oder mehrere Plasmide. 69% der untersuchten Stämme verfügten über das Virulenz-Plasmid pRQ29 und 54% zeigten ein 70-75 MD großes Plasmid.

In Kombination mit der im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich durchgeführten Phagentypie und den Resistenzprofilen sowie den Plasmidmustern konnten Aussagen über mögliche klonale Zusammenhänge gemacht werden, die jedoch bei diesen Stämmen nur im Ansatz vorzufinden waren. Ein klonaler Zusammenhang konnte nur für 6 Stämme nachgewiesen werden. Diese Populationsstruktur steht im Gegensatz zu anderen multiresistenten Serovaren, wie z.B. *S. Typhimurium* DT 104.

Insgesamt zeigten die hier untersuchten *S. Enteritidis* Stämme bezüglich ihrer phänotypischen und genotypischen Eigenschaften ein sehr heterogenes Bild. Es besteht jedoch die Gefahr, daß beim unsachgemäßen Einsatz von antimikrobiell wirksamen Substanzen eine bis heute sensible Population, schnell durch multiresistente *S. Enteritidis* ersetzt werden kann. Deswegen mahnen die vorgelegten Daten zum sorgsamem Umgang mit Antibiotika beim Geflügel.

---

## Genetic and molecular characterization of resistant *S. enteritidis* isolated from 1986 to 1995 in Germany

### 8. SUMMARY

The development of antimicrobial drug resistance during 1974 to 1995 of the three most common *Salmonella* serovars *S. enteritidis*, *S. typhimurium* and *S. typhimurium* O:5 negative is described. In general the resistance rate for *Salmonella* is around 20%, peaking with 40% in 1990 when multiresistant *S. typhimurium* O:5 negative DT 204 prevailed. In *S. enteritidis* the resistance rate is comparably low (< 10%).

In order to gain more information on resistance in *S. enteritidis*, the detailed phenotypic and genetic properties of 65 selected isolates were investigated by genetic and molecular techniques.

It could be shown, that *S. enteritidis* isolates expressed resistance to antibiotics which are commonly used in veterinary medicine, namely tetracycline, ampicillin, chloramphenicol, kanamycin and gentamicin. The resistance phenotypes turned out to be very stable and from the 65 investigated strains 50% were monoresistant, and 27.7% of them exhibited resistance against tetracycline only. Another 50% of the strains were multiresistant to 2 or more antimicrobial agents. 61% of them were resistant against tetracycline and kanamycin.

Mating experiments were carried out, in order to detect the presence of R-factors possessing transfer systems at 37°C and 22°C, reflecting conditions in two habitats that *Salmonella* serovars encounter during their life-cycle. High temperatures in the host and low in the environment.

83% (54) of all investigated strains transferred one or more resistances under the mating conditions applied. The majority of 71% (46) transferred at 37°C and 12% (8) of all strains transferred their resistances at 22°C preferentially.

In order to determine a clonal structure among the strains, further strain-differentiation was achieved by plasmid-profile-analysis and phagetyping. All isolates carried one or more plasmids and the whole population showed a very heterogeneous plasmid distribution. 69% carried the virulence plasmid pRQ29 and a 70-75 MD plasmid was present in 54% of the strains.

In conclusion the plasmid-profiling combined with the results of the antibiotic resistance tests and phagetyping elucidated a very heterogeneous population structure. The presence of clones was limited to only 6 strains. This contrasts the results obtained with other multiresistant serotypes e.g. the dominating multiresistant clone *S. typhimurium* DT104.

However, multiresistant *S. enteritidis* strains exist in Germany and selective pressure could facilitate their spread. This imposes the danger, that a mainly antibiotic sensitive *S. enteritidis* population might be substituted with resistant strains.

Since 1991 there has been an increase in the rate of Nitrofurantoin-resistance in *S. enteritidis* from 0% in 1990 to 35% in 1995. 50% of the *S. enteritidis* strains originated from poultry, and they showed a resistance level of 72% against Nitrofurantoin. These strains appear to be epidemiologically related and might be derived from a clonal spread of a single ancestor. Nevertheless further molecular methods should be applied in order to determine the source of these nitrofurantoin resistant strains.

Anhang 1  
Phänotypische und molekularbiologische Eigenschaften der 65 untersuchten *S. Enteritidis*  
Stämme sowie deren Herkunft

Stmnr./Jahr	Resistenzen	Phagentyp (Ward et al., 1987)	Plasmide Molekulargewicht in MD	Bezeichnung pRQ	Linkage- Gruppe(n)	Genetische Eigenschaften der Resistenz	Herkunft
5/86	te;	n.c.	32	1800	-	nicht übertragen	BU** Rind
1040/86	te;	4	32	1801	-	nicht übertragen	Kot Rind
1357/87	ap;	13a	32	1802 1803	-	Transfer über 52 MD Plasmid; Transposition aus dem Chromosom	Mastküken, Herz, Leber, Milz
1358/87	ap;	13a	32	1804 1805	-	Transfer über 52 MD Plasmid; Transposition aus dem Chromosom	Pute, Darm
1359/87	ap;	8	32	1806 1807	-	Transfer über 52 MD Plasmid; Transposition aus dem Chromosom	Pute, Darm
382/88	te;cm;kn	38	76 37	1808 29	te;cm;kn	Transfer über 76 MD Plasmid; Deletionen Spur 1 und 3	DIU*** Ferkel
383/88	te;ap;cm;kn	38	73 70 37	1809 1810 29	te;ap;cm;kn	Transfer über 73 MD Plasmid; Deletionen Spur 3,4 und 8,9	DIU Ferkel
384/88	te;cm;kn	38	73 70 37	1811 1812 29	te;cm;kn	Transfer über 73 MD Plasmid; Deletionen Spur 3,4	DIU Ferkel
1147/88	te	4	68 37	1813 29	-	nicht übertragen	Katze, Galle
1285/88	te	32	62 37	1814 29	-	Transfer über 62 MD	Gans, Herz
1286/88	te	6a	68 37	1815 29	-	nicht übertragen	Gans, Herz
1439/88	te	n.c.	68 37	1816 29	-	nicht übertragen	Klärschlamm
1506/88	te;cm	6a	73 37	1817 29	te;cm	Übertragung über 11 MD Plasmid Sonderfall, da revers.* Dissoziation	Broiler, Organe
1692/88	te	38	62 34	1818 1819	te	Übertragung über 62 MD Plasmid	Hühnermist
2099/88	te;ap;cm;kn; gn	4	112 37	1820 29	te;ap;cm;kn; gn	Transfer über 112 MD Plasmid	DIU. Kalb
246/89	te;ap;cm;kn;	38	88 74 37	1821 1822 29	te;kn te;ap;cm;kn;	Überwiegend Transfer über 74 MD Plasmid; teilweise Deletionen,	Kot, Kalb
674/89	te	4	73 37	1823 29	-	Transfer über 73 MD Plasmid	Organe, Kalb
794/89	ap	6a	73 37	1824 29	-	Übertragung über 73 MD Plasmid	Klärschlamm
803/89	te;ap;cm;kn	6a	74 37	1825 29	te;ap;cm;kn	Übertragung über 74 MD Plasmid; Deletionen Spur 4 und 5	Zwerghuhn
804/89	te;ap;cm;kn	n.c.	<4 74 37	1826 1827 29	te;ap;cm;kn	Übertragung über 74 MD Plasmid; Deletionen Spur 4 und 5	Gans
1225/89	te;ap;cm;kn	6a	72 37	1828 1829 29	ap;cm;kn te;ap;cm;kn	Transfer über 72 und teilweiser Transfer über 101 MD Plasmide; Sonderfall, da Cointegrate	Gans, Herz
2488/89	te;ap;cm;kn	4	<4 74 37	1830 1831 29	te;ap;cm;kn	Transfer über 74 MD Plasmid;	Schweinefleisch
967/90	te	4	68 37	1832 29	-	nicht übertragen	Hähnchen- brustfilet, gefr.
981/90	kn	7	74 37	1833 29	-	Transfer über 74 MD Plasmid	Kot, Huhn
1331/90	te,ap	6	71 27	1834 1831	te,ap	Transfer über 27 MD Plasmid	DIU, Mensch
1585/90	ap	6a	62 34	1835 1833	-	Transfer über 62 MD Plasmid	Leber, Gans
1916/90	ap,gn	4	62 37	1836 29	ap,gn	Transfer über 62 MD Plasmid	DIU, Mensch
2272/90	te,kn	6a	67 33	1837 1838	te,kn	Transfer über 67 MD Plasmid	Organe, Broiler

\* reversibel

\*\* Bakteriologische Untersuchung

\*\*\* Diagnostische Untersuchung

Stmnr./Jahr	Resistenzen	Phagentyp (Ward et al., 1987)	Plasmide Molekulargewicht in MD	Bezeichnung pRQ	Linkage- Gruppe(n)	Genetische Eigenschaften der Resistenz	Herkunft
1307/91	te;kn	5a	73 37	1839 <b>29</b>	te;kn	Transfer über 73 MD Plasmid.	Broiler
1626/91	ap	7	88 70 46	1840 1841 1842	-	Transfer über 70 MD Plasmid	DIU, Huhn
1659/91	te;kn	6a	71 37	1843 <b>29</b>	te;kn	Transfer über 71 MD Plasmid	Küken, Herz, Leber
2258/91	te;c	4	73 37	1844 <b>29</b>	te;c	Transfer über 73 MD Plasmid	DIU, Mensch
2081/91	te	14b	95 72 37 2	1845 1846 <b>29</b> 1847	-	Transfer über 95 MD Plasmid	LM, Hähnchenmagen
66/92	te;kn	7	73 37	1848 <b>29</b>	te;kn	Transfer über 73 MD Plasmid	Kot, Kalb
505/92	te;kn	n.c.	73 37	1849 <b>29</b>	te;kn	Transfer über 73 MD Plasmid	Darm, Geflügel
516/92	kn	4	60 37	1850 <b>29</b>	-	Transfer über 60 MD Plasmid	Darm, Geflügel
533/92	te;kn	6a	84 37	1851 <b>29</b>	te;kn	Transfer über 84 MD Plasmid	Darm, Geflügel
1065/92	te;ap;kn	4	60	1852	-	nicht übertragen	DIU, Legehennen
1356/92	ap	4	37 22	<b>29</b> 1853	-	Transfer über 22 MD Plasmid	Gülle
1452/92	te	4	72 37	1854 <b>29</b>	-	Transfer über 72 MD Plasmid	DIU, Huhn
1456/92	te	4	68	1855	-	nicht übertragen	Geflügel, Hybride
2429/92	te;kn	7	72	1856	te;kn	Transfer über 72 Plasmid	Eier
2431/92	te;kn	6a	62	1857	te;kn	Transfer über 62 Plasmid	Eier
2614/92	te;kn	6a	71 37	1858 <b>29</b>	te;kn	Transfer über 71 Plasmid	Huhn
2645/92	te;kn	6a	122 72 37	1859 1860 <b>29</b>	te;kn	Transfer über 72 Plasmid	Huhn
2636/92	te;kn	7	73 37	1861 <b>29</b>	te;kn	Transfer über 73 Plasmid	Huhn
320/93	te;cm;kn	4	71	1862	te;cm;kn	Transfer über 71 MD Plasmid	LM, geschn. H. fleisch
562/93	te;	4	60	1863	-	nicht übertragen	LM, Huhn
632/93	te;	4	68	1864	-	nicht übertragen	BU, Hähnchen
1603/93	te;kn	6a	60 72 37	1865 1866 <b>29</b>	kn;te	Transfer über 72 MD Plasmid, Deletionen Spur 3	Roaster, Huhn
1679/93	te;	11	37 18	1867 <b>29</b>	te	Transfer über 18 MD Plasmid	Eier
2310/93	ap	(24) n.c.	37 25	1868 <b>29</b>	-	Transfer über 25 MD Plasmid	Gülle
2428/93	te;kn	38	60 34	1869 1870	kn;te	Transfer über 60 MD Plasmid	Eier
2487/93	te;	6a	71 37	1871 <b>29</b>	-	Transfer über 71 MD Plasmid	Eier
2789/93	cm; kn	13a	62 50	1872 1873	cm; kn	Transfer über 62 MD Plasmid,	Taube
121/94	te;ap;gn;cm; kn	4	71 37	1874 <b>29</b>	ap	unvollständiger Transfer nur ap	LM, Huhn
378/94	te;ap;gn;cm; kn	4	112 37	1875 <b>29</b>	te;ap;gn te;ap;gn;cm; kn	Transfer über 112 MD Sonderfall, da 112 MD Plasmid im Wildtyp abhängig vom selektiven Milieu	Kalb, Organe
1332/94	te;gn	4	74 53 37	1876 1877 <b>29</b>	te;gn	Transfer über 74 MD Plasmid	Hühnerklein, Oldenburg
1639/94	te	6a	72 37	1878 <b>29</b>	-	nicht übertragen	LM, Huhn
2159/94	ap	6a	37 24	29 1879	-	Transfer über 24 MD Plasmid	DIU, Mensch
2288/94	ap	6a	37 30	29 1880	-	Transfer über 30 MD Plasmid	Kot, Huhn
351/95	te;kn	6a	72	1881	te;kn	Transfer über 72 MD Plasmid	LM, Huhn
1218/95	te	4	71 37	1882 <b>29</b>	-	Transfer über 71 Plasmid	DIU, Mensch
1493/95	ap	4	71 37	1883 <b>29</b>	-	Transfer über 71 Plasmid	Nandu, Geflügel
1596/95	ap	8	37	1884	-	nicht übertragen	Sittich, DIU

Anhang 2: Transferraten der 65 untersuchten *S. Enteritidis*-Stämme

Stammnr./ Jahr	Resistenzen*	Filter		Flüssig		nicht übertragen
		22°	37°	22°	37°	
5/86	te;	3,88E-02	-	-	-	
1040/86	te;	-	-	-	-	x
1357/87	ap		4,10E-07			
1358/87	ap	8,21E-04				
1359/87	ap	1,80E-03				
382/88	<u>te</u> ,cm,kn				2,62E-01	
383/88	<u>te</u> ,ap,cm,kn				3,21E-01	
384/88	te,cm, <u>kn</u>				3,08E-01	
1147/88	te					x
1285/88	te				6,24E-06	
1286/88	te					x
1439/88	te					x
1506/88	<u>te</u> ,cm				3,09E-02	
1692/88	te					
2099/88	<u>te</u> ,ap,cm,kn,gn				1,01E-03	
246/89	te,ap,cm, <u>kn</u> ;				4,64E-02	
674/89	te				1,11E+00	
794/89	ap			1,47E-01		
803/89	te,ap,cm, <u>kn</u>				4,73E-02	
804/89	te,ap, <u>cm</u> ,kn				1,05E-03	
1225/89	te,ap,cm, <u>kn</u>				1,02E+00	
2488/89	te,ap,cm, <u>kn</u>				1,26E-03	
967/90	te					x
981/90	kn	2,34E+00				
1331/90	te, <u>ap</u>		6,19E-02			
1585/90	ap		1,95E-03			
1916/90	ap, <u>gn</u>				1,16E-01	
2272/90	<u>te</u> ,kn				7,07E-01	
1626/91	ap	7,17E-03				
1659/91	<u>te</u> ,kn				3,55E-01	
2258/91	<u>te</u> ,c				1,68E-01	
2081/91	te				2,16E-01	
66/92	te, <u>kn</u>				2,19E-01	
505 92	<u>te</u> ,kn				4,88E-02	

Stammnr./ Jahr	Resistenzen*	Filter		Flüssig		nicht übertragen
		22°	37°	22°	37°	
516/92	kn		2,19E-01			
533/92	te, <u>kn</u>				7,65E-01	
1065/92	te,ap,cm					x
1356/92	ap		3,66E-02			
1452/92	te				1,86E-01	
1456/92	te					x
2429/92	te, <u>kn</u>				2,04E-01	
2431/92	<u>te, kn</u>				1,22E-02	
2614/92	te, <u>kn</u>				2,15E-01	
2645/92	te, <u>kn</u>				2,67E-01	
2636/92	te, <u>kn</u>				1,09E-01	
320/93	te,cm, <u>kn</u>		4,17E-03			
562/93	te,					x
632/93	te,					x
1603/93	te, <u>kn</u>		7,43E-01			
1679/93	te,	1,39E+01				
2310/93	ap		2,72E+00			
2428/93	te, <u>kn</u>		1,23E+00			
2487/93	te,				6,35E-01	
2789/93	cm, <u>kn</u>		1,81E-03			
121/94	te, <u>ap</u> ,gn,cm,kn				4,89E-02	
378/94	<u>te</u> ,ap,gn,cm,kn	2,59E-01				
1332/94	te, <u>gn</u>		2,72E-02			
1639/94	te					x
2159/94	ap		2,56E-01			
2288/94	ap		2,21E-01			
351/95	te, <u>kn</u>		3,60E-01			
1218/95	te		1,09E+00			
1493/95	ap		1,81E+00			
1596/95	ap					x

\*Bei Isolaten, die mehrere Resistenzgene auf einem Plasmid tragen, wurde die Transferfrequenz für den unterstrichenen Marker angegeben.

te = Tetracyclin; ap = Ampicillin; cm = Chloramphenicol; kn = Kanamycin; gn = Gentamicin

## Anhang 3

Eigenschaften gesondert untersuchter *S. Enteritidis* Stämme auf Nitrofurantoin und Furazolidonresistenz aus 1995

Stammnr./1995	Herkunft	untersuchte Resistenz (10/96)		zusätzliche Resistenz	Phagentyp (Ward et al., 1987)
		Nitrofurantoin (F)	Furazolidon (FR)		
12	Huhn, Federn / Kloake	r*	s**	keine	7
15	Hühnerküken	r	s	keine	6a
28	Huhn, Kot	r	s	keine	4
29	Huhn, Kot	r	s	keine	4
30	Huhn, Kot	r	s	keine	4
31	Huhn, Kot	r	s	keine	4
41	LM Huhn, H.-klein	r	s	keine	4
74	LM Huhn, H.-brust	r	s	keine	4
92	LM Huhn, Hähnchen	s	s	keine	4
101	Huhn, Kot	r	s	keine	3
115	Huhn, Kot	r	s	keine	4
122	LM Huhn, Darm	s	s	keine	6
123	LM Huhn, Darm	r	s	keine	6
179	LM Huhn, Leber	r	s	keine	14b
181	Eiprod., Rohware	r	s	keine	4
219	LM Huhn, Keule	r	s	keine	4
241	LM Huhn	r	s	keine	34
250	Nudelsalat	r	s	keine	4
268	LM Huhn, fr. Hähn.	r	s	keine	6
308	Huhn, Sammelkot	r	s	keine	4
351	LM Huhn, Keule	r	s	kn, ne	6a
458	Eier, Schale	r	s	keine	6a
523	Eier, Schale	r	s	keine	4
539	Eier, Vollei	r	s	keine	7a
545	Eier, Vollei	r	s	keine	7a
546	Eier, Vollei	r	s	keine	4
547	Eier, Vollei	r	s	keine	4
548	Eier, Schale	r	s	keine	4
549	Eier, Vollei	r	s	keine	4
550	Eier, Vollei	nicht gewachsen	nicht gewachsen	keine	8
586	Huhn, Kot	r	s	keine	4
591	Huhn, Kot	r	s	keine	4
596	LM Huhn	r	s	keine	4
598	LM Huhn, H.-klein	r	s	keine	4
599	Huhn, Tierkörper	r	s	keine	4
600	Huhn, Tierkörper	r	s	keine	4
649	Huhn	r	s	keine	6
650	Huhn	s	s	keine	6
660	Eiprod., Kalte Platte	r	s	keine	4

Stammnr. / 1995	Herkunft	Nitrofurantoin (F)	Furazolidon (FR)	zus. Res.	Phagentyp
661	Eiprodukt, Eiersalat	r	s	keine	4
664	Eier, Vollei	r	s	keine	4
665	Eier, Vollei	r	s	keine	4
704	LM Huhn, Hähnchen	r	s	keine	4
797	Huhn	r	s	keine	4
895	Huhn, Organe	r	s	keine	4
904	Eier, Eigelb	r	s	keine	4
909	Eier, past. Vollei	s	s	keine	4
928	Huhn, Zekum	r	s	nal	4
930	Huhn, Kot	r	s	keine	4
931	Huhn, Kot	r	s	keine	4
1017	Huhn, Kot	r	s	keine	4
1018	Huhn	r	s	keine	4
1019	Huhn	r	s	keine	4
1020	Huhn	r	s	keine	4
1031	Huhn	r	s	keine	4
1048	Eiprodukt, Dressing	r	s	keine	4
1080	Huhn	r	s	keine	4
1101	Eier, Kakadu	r	s	keine	4
1102	Eier, Kakadu	r	s	keine	4
1131	Eiprodukt, Dressing	r	s	keine	4
1189	Eier, Vollei	r	s	keine	4
1203	Eier, vom Huhn	s	s	keine	n. t.
1206	Eiprodukt, Tiramisu	r	s	keine	4
1207	Eiprodukt, Tiramisu	r	s	keine	4
1208	Eiprodukt, Tiramisu	r	s	keine	4
1212	Huhn, Kot	s	s	keine	n. t.
1222	Eiprodukt, Tiramisu	r	s	keine	4
1228	Eier, Eiergelb	r	s	keine	4
1251	Eischale	r	s	keine	4
1252	Eidotter	r	s	keine	4
1282	Frikassee	r	s	keine	4
1283	Eiprodukt, Eierlikör	r	s	keine	4
1293	LM Huhn, H. crossies	r	s	keine	4
1307	LM Huhn, Mc Chicken	r	s	keine	4
1335	Eier, Dotter, 3 d alt	r	s	keine	4
1359	Hühnerküken	s	s	keine	4
1380	Eier, Vollei gefr.	r	s	keine	4
1396	LM Huhn, Mc Chicken	r	s	keine	1
1405	Eier	r	s	keine	1
1406	Eier, Schalen	s	s	keine	1

Stammnr. / 1995	Herkunft	Nitrofurantoin (F)	Furazolidon (FR)	zus. Res.	Phagentyp
1407	Eier	r	s	keine	1
1431	Eiprod., Kartoffelsal.	s	s	keine	1
1432	Eiprod., Nudelsal.	r	s	keine	1
1452	Eier, Dotter	r	s	keine	4
1462	Eier, Vollei	r	s	keine	4
1463	Eier, Vollei	s	s	keine	4
1465	Eier, Vollei	r	s	keine	4
1488	Eier, Vollei, gefr.	s	s	ct, pb	4
1500	Huhn	r	s	keine	4
1753	LM Huhn, H.brustfilet	r	s	keine	4
1819	Huhn	s	s	keine	4
1877	Eier, Vollei	s	s	keine	4
1886	Eier, Vollei	s	s	keine	n. t.
1944	Huhn	r	s	keine	4
1947	Huhn	r	s	keine	4
2006	Eier, Klasse II	r	s	keine	1
2008	LM Huhn, Keule	r	s	keine	1
2009	LM Huhn, H.brustfilet	r	s	keine	4
2011	LM Huhn, Suppenhuhn	r	s	keine	4
2091	Eier, Dotter	r	s	keine	7
2143	LM Huhn, H. crossies	r	s	keine	4
2166	LM Huhn	r	s	keine	4
2254	Eier, Schalen	r	s	keine	4
2285	Huhn, Kot	r	s	keine	4
2292	Eier	r	s	keine	4
2295	Huhn, Kot	s	s	keine	34
2321	LM Huhn, Keule	s	s	keine	8
2329	Eier, Schalen	r	s	keine	4
2359	Eier, Schalen	s	s	keine	4
2373	Eier	r	s	keine	4
2374	Eier	r	s	keine	4
2375	Eier	r	s	keine	4
2384	LM Huhn, Keule	r	s	keine	n. t.

\*resistent    \*\* sensibel    n.t. nicht typisierbar

Kartoffelsal.: Kartoffelalat;

Nudelsal.: Nudelsalat

Eiprod.: Eiprodukt

- AABO, S., O.F. RASMUSSEN, L. ROSSEN, P.D. SORENSEN und J.E. OLSEN (1993)  
*Salmonella* identification by the polymerase chain reaction.  
Mol. Cell Prob. **7**, 171-178
- ACAR, J.F. und F.W. GOLDSTEIN (1997)  
Trends in bacterial resistance to Fluoroquinolones.  
Clin. Inf. Dis. **24** (Suppl.1) S67-73
- ACHTMAN, M., KENNEDY N., R. HELMUTH, G. MORELLI, L. BEUTIN und R. THOMPSON (1979)  
Cell-Cell interactions in conjugating *Escherichia coli*: Conjugation proteins and the mating cycle.  
In: Mitsuhashi, S. (Hrsg.)  
Microbial drug resistance Volume 2  
Japan Scientific Societies Press, Tokyo; University Park Press, Baltimore, S. 157-168
- ADAM, D. und W. CHRIST (1987)  
Antibiotika und Chemotherapeutika, Antiinfektiöse Therapie.  
In: Forth, W., D. Henschler, W. Rummel (Hrsg.)  
Allgemeine und spezielle Pharmakologie, 5. Auflage  
Bibliographisches Institut Mannheim / Wien / Zürich, S. 582, Wissenschaftsverlag, 1987
- AKIBA, T., K. KOYAMA, Y. ISHIKI, S. KIMURA und T. FUKUSHIMA (1960)  
On the mechanism of the development of multiple drug-resistant clones of *Shigella*.  
Japan. J. Microbiol. **4**, 219-227
- ALTWEGG, M., F. W. HICKMANN-BRENNER und J.J. FARMER III (1989)  
Ribosomal RNA gene restriction patterns provide increased sensitivity for typing *Salmonella* Typhi strains.  
J. Infect. Dis. **160**, 145-149
- AMABILE-CUEVAS, C.F. und M.E. CHICUREL (1996)  
A possible role for plasmids in mediating the cell-cell proximity required for gene flux.  
J. Theor. Biol. **181**, 237-243
- ANDERSON, E.S. und F.C. PATH (1968)  
Drug resistance in *Salmonella* Typhimurium and its implications.  
Brit. med. J. **3**, 333-339
- ANDERSON, E.S. und E.J. THRELFALL (1970)  
Change of host range in a resistance factor.  
Genet. Res. **16**, 207-214
- ANDERSON, E.S. und E.J. THRELFALL (1974)  
The characterization of plasmids in the enterobacteria.  
J. Hyg. Camb. **72**, 471-487
- ANDERSON, E.S. (1975)  
The problem and implication of chloramphenicol resistance in the *typhoid bacillus*.  
J. Hyg. Camb. **74**, 289-299
- ANDERSON, E.S., L.R. WARD, M.J. De SAXE und J.D.H. De SA (1977)  
Bacteriophage-typing designations of *Salmonella* Typhimurium.  
J. Hyg. **78**, 297-300
- ANNONYMUS (1969)  
Report of the Joint Committee on the use of Antibiotics in animal husbandry and veterinary medicine (Swan-Report).  
Cmd. 4190. London: Her Majesty's Stationary Office, 1969

- ANNONYMUS (1988)  
*Salmonella* Enteritidis Phage Type 4: chicken and Egg.  
Lancet ii, 720-722
- AOKI, T., S. EGUSA und T. ARAI, (1974)  
Detection of R-factors in naturally occurring *Vibrio anguillarum* strains.  
Antimicrob. Agents Chemother. **6**, 534-538
- ARAI, T., T. AOKI und S. EGUSA (1975)  
Mechanism of decrease of nitrofurans sensitivity conferred by R factors.  
In: Mitsuhashi, S., H. Hashimoyo (Hrsg.)  
Microbial drug resistance  
Japan Scientific Societies Press, Tokyo; University Park Press, Baltimore, S. 505-513
- ASNIS, R.E. und J.S. GOTS (1951)  
Studies on the action of nitrofurans on bacterial enzyme systems. I. The inhibition of bacterial respiration by Furacin.  
Arch. Biochem. **30**, 24-34
- BAGGESEN, D.L., H. C. WEGENER und M. MADSEN (1997a)  
Correlation of conversion of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Phage Type 1, 4, or 6 to Phage Type 7 with loss of lipopolysaccharide.  
J. Clin. Microbiol. **35**, 330-333
- BAGGESEN, D.L., D. SANDVAG und F.M. AARESTRUP (1997b)  
Characterization of Danish multiresistant *S. Typhimurium* DT 104 of animal origin.  
IMBEM IV: Fourth International Meeting on Bacterial Epidemiological Markers, Elsinore, Denmark, p. 135, 10-13. September 1997
- BAHR, L. (1930)  
Typen von Gärtnerbakterien und ihr Vorkommen bei Menschen und Tieren.  
Dtsch. tierärztl. Wschr. **10**, 145-148 und 165-169
- BAIRD-PARKER, A.C. (1990)  
Foodborne illness foodborne salmonellosis.  
Lancet Vol **336** 1231-1235
- BALIS, E., A.C. VATOPOULOS, M. KANELOPOULOU, E. MAINAS, G. HATZOUDIS, V. KONTOGIANNI, H. MALAMOU-LADA, S. KITSOU-KIRIAKOPOULOU und V. KALAPOTHAKI (1996)  
Indication of in vivo transfer of an epidemic R-plasmid from *Salmonella* Enteritidis to *Escherichia Coli* of the normal human gut flora.  
J. Clin. Microbiol. **34**, 977-979
- BARGUELLIL F., C. BUUCOA, A. AMOR, J.L. FAUCHÈRE und C. FENDRI (1995)  
In vivo acquisition of extended-spectrum Beta-Lactamase in *Salmonella* Enteritidis during antimicrobial therapy.  
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **14**, 703-706
- BATES, J., J.Z. JORDENS und D.T. GRIFFITHS (1994)  
Farm animals as a putative reservoir for vancomycin-resistant enterococcal infection in man.  
J. Antimicrob. Chemother. **34**, 507-516
- BAUTSCH, W. (1993)  
*NotI* Macrorestriction Analysis suggests a clonal relationship of *Salmonella enterica*, ser. Enteritidis Lysotype 4 strains.  
Infection **21**, No. 5, 54/328 - 56/330
- BAX, R.P. (1997)  
Antibiotic resistance: A view from the pharmaceutical industry.  
Clin. Inf. Dis. **24** (Suppl.1) S151-3

- BECKER, W., R. HELMUTH, O. PIETSCH, G. STEIDTEN und R. STEPHAN (1988)  
*Salmonella* Typhimurium var. copenhagen als Ursache einer verlustreichen Erkrankung in einer Milchviehherde.  
Tierärztl. Umschau, **43**, 557-563
- BENNETT, P.M. und A.H. LINTON (1986)  
Do plasmids influence the survival of bacteria.  
J. Antimicrob. Chemother. **18**, Suppl. C, 123-126
- BERG, L.R., C.M. HAMILTON und G.E. BEARSE (1956)  
The effect of furazolidone and other drugs on the growth of chicks raised on old litter containing coccidia.  
zitiert aus **CHADFIELD, M.** (1995)
- BEUTIN, L. (1981)  
Antibiotika und chemische Wirkstoffe in der Tierernährung.  
Biologie in unserer Zeit **5**, 129-134
- BITTER-SUERMAN, D. (1996)  
Resolution: Resistenzgefahr durch Antibiotika als Futtermittelzusatzstoffe.  
Hyg. Med. **21**, 443
- BREEZE, A.S. und E.E. OBASEIKI-EBOR (1983)  
Mutations to Nitrofurantoin and Nitrofurazone resistance in *Escherichia coli* K-12.  
J. Gen. Microbiol. **129**, 99-103
- BRISABOIS, A., I. CASIN, F. MOURY, J. BREUIL, S. FREMY und E. COLLATZ (1997)  
Distribution of antibiotic resistance types of selected *Salmonella* Typhimurium strains from animal and human origin.  
IMBEM IV: Fourth International Meeting on Bacterial Epidemiological Markers, Elsinore, Denmark, p. 137, 10-13. September 1997
- BRODA, P. (1979)  
Plasmids.  
San Francisco: Freeman , 1979
- BROOKS L.K. (1965):  
A quick and efficient method for interruption of bacterial conjugation.  
Genet. Res. Camb. **6**, 300-303
- BROSIUS, J., H. ULLRICH, M.A. RAKER, A. GRAY, T.J. DULL, R.R. GUTELL und H.F. NOLLER (1981)  
Construction and fine mapping of recombinant plasmids containing the *rrnB* ribosomal RNA operon of *E. coli*.  
Plasmid **6**, 112-118
- BROWN, D.J., J.E. OLSEN und M. BISGAARD (1992)  
*Salmonella enterica*: infection, cross infection and persistence within the environment of a broiler parent stock unit in Denmark.  
Zbl. Bakt. **277**, 129-138
- BROWN, D.J., E.J. THRELFALL, M.D. HAMPTON und B. ROWE (1993)  
Molecular characterization of plasmids in *Salmonella* Enteritidis phage types.  
Epidem. Infec. **110**, 209-216
- BROWN, D.J., D.L. BAGGESEN, H.B. HANSEN, H.C. HANSEN und M. BISGAARD (1994)  
The characterization of Danish isolates of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis by phage typing and plasmid profiling: 1980-1990  
APMIS **102**, 208-214

- BRUNNER, F., A. MARGADANT und R. PEDUZZI (1983)  
The plasmid pattern as an epidemiological tool for *Salmonella* Typhimurium epidemics: comparison with the lysotype.  
J. Infect. Dis. **148**, 7-11
- BRUNS, W. (1983)  
Antibiotika und Chemotherapeutika, Antiinfektiöse Therapie.  
In: Forth, W., D. Henschler, W. Rummel (Hrsg.)  
Allgemeine und spezielle Pharmakologie  
Bibliographisches Institut Mannheim / Wien / Zürich, 3. Aufl., Wissenschaftsverlag, 1983
- BUKHARI, A.I., J.A. SHAPIRO und S.L. ADHYA (Hrsg.) (1977)  
DNA Insertion elements, plasmids, and episomes.  
Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, N.Y.
- BUNDESANZEIGER, (1994)  
Bekanntmachung über die Zulassung und Registrierung von Tierarzneimitteln vom 12. Juli 1994.  
(Nitrofurantoin) nach RatsVo Nr. 2901 / 93 / EWG vom 18.10.1993  
Nr. 141, S. 7804 vom 29.07.1994
- BUNDESANZEIGER, (1995)  
Bekanntmachung über die Zulassung und Registrierung von Tierarzneimitteln vom 17. Juli 1995.  
(Furazolidon) nach RatsVo Nr. 1442 / 95 / EG vom 26.06.1995  
Nr. 149, S. 8783 vom 10.08.1995
- CALLOW, B.R. (1959)  
A new phage-typing scheme for *Salmonella* Typhimurium.  
J. Hyg. **57**, 346-359
- CASALINO, M., A. COMMANDUCCI, M. NICOLETTI und F. MAIMONE (1984)  
Stability of plasmid content in *Salmonella* Wien in late phases of the epidemic history.  
Antimicrob. Agents Chemother. **25**, 499-501
- CASSELL, G.H. (1995)  
ASM Task force urges broad program on antimicrobial resistance.  
ASM (American Society for Microbiology) News **61**, 116-120
- CHADFIELD, M.S. (1995)  
Nitrofurans in relation to salmonella infection in poultry.  
Thesis for the degree of Doctor of Philosophy at the University of Bristol, S. 18
- CHART, H., B. ROW, E.J., THRELFALL und L.R. WARD (1989)  
Conversion of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 to phage type 7 involves loss of lipopolysaccharide with concomitant loss of virulence.  
FEMS Microbiol. Lett. **60**, 37-40
- CHASLUS-DANCLA, E., P. POHL, M. MEURISSE, M. MARIN und J.P. LAFONT (1991)  
High genetic homology between plasmids of human and animal origins conferring resistance to the aminoglycosides gentamicin and apramycin.  
Antimicrob. Agents Chemother. **35**, 590-593
- COHEN, M.L. (1992)  
Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era.  
Science **257**, 1050-1055
- CORPET, D.E. (1988)  
Antibiotic resistance from food.  
N. Engl. J. Med. **318**, 1206-1207

- CORPET, D.E. (1996)  
Microbiological hazards for humans of antimicrobial growth promoter use in animal production.  
*Revue Méd. Vét.* **147**, 851-862
- COURVALIN, P. (1996)  
The Garrod Lecture: Evasion of antibiotic action by bacteria.  
*J. Antimicrob. Chemother.* **37**, 855-869
- COX, J.M., M.D. BROOK und J.B. WOOLCOCK (1996)  
Sensitivity of Australian isolates of *Salmonella* Enteritidis to nitrofurantoin and furazolidone.  
*Vet. Microbiol.* **49**, 305-308
- COYLE, E.F., C.D. RIBEIRO, A.J. HOWARD, S.R. PALMER, H.I. JONES, L. WARD und B. ROWE (1988)  
*Salmonella* Enteritidis Phage Type 4 Infection: Association with Hens' eggs.  
*Lancet* **ii**: 1295-1297
- CRAIG, N.L. (1996)  
Transposition.  
In: Neidhardt F.C, R. Curtis III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, H.E. Umbarger 2nd ed. (Hrsg.)  
*Escherichia coli* and *Salmonella* - Cellular and Molecular Biology  
American Society for Microbiology (ASM) Press, S. 2339-2362
- CRAMER, D.L. (1947)  
The mode of action of nitrofurantoin compounds, II. Application of physio-chemical methods on the study of action against *Staphylococcus aureus*.  
*J. Bacteriol.* **54**, 119-125
- DANISH VETERINARY LABORATORY, (1995)  
The effect of Avoparcin used as a feed additive on the occurrence of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* in pig and poultry production.  
Danish Veterinary Laboratory, Copenhagen, Denmark, 1995, July, 1-105
- DaSILVA, N.A. und J.E. BAILEY (1986)  
Theoretical growth yield estimates for recombinant cells.  
*Biotech. Bioeng.* **28**, 741-746
- DATTA, N. (1984)  
Introduction to antibiotic resistance in bacteria.  
*Brit. Med. Bull.* **40**, 1-2
- DAVIES, J.E., (1964)  
Studies on the ribosomes of streptomycin-sensitive and resistant strains of *Escherichia coli*.  
*Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **51** 659-664
- DAVIES, J.E. (1980)  
Mechanisms of Antibiotic Resistance.  
Current Concepts, Upjohn Company 1980
- DAVIES, J.E. (1997)  
Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants.  
In: Antibiotic Resistance: Origins, Evolution, Selection and Spread **15-27**  
aus der Serie: Ciba Foundation Symposia 207 1997
- DAWSON, K.A., B.E. LANGLOIS, T.S. STAHLY und G.L. CROMWELL (1984)  
Some characteristics and antibiotic resistance of anaerobic bacteria from the ceca and colons of pigs fed Chlortetracycline-containing and unmedicated diets.  
*Appl. Environ. Microbiol.* **47**, 210-212

- DIN DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMIERUNG E.V. (Hrsg.) (1994)  
Methoden der Empfindlichkeitsprüfung von bakteriellen Krankheitserregern (außer Mykobakterien) gegen Chemotherapeutika. DIN-Norm 58 940, Teil 3.  
Beuth Verlag GmbH, Berlin, Köln, (1994)
- DIN DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMIERUNG E.V. (Hrsg.) (1996)  
Methoden der Empfindlichkeitsprüfung von bakteriellen Krankheitserregern (außer Mykobakterien) gegen Chemotherapeutika. DIN-Norm 58 940, Teil 3.  
Beuth Verlag GmbH, Berlin, Köln, (1996)
- DODD, M.C. und W.B. STILLMAN (1944)  
The in vitro bacteriostatic action of some simple furan derivatives.  
J. Pharmacol. Exp. Ther. **82**, 11-18
- DUIM, B., E. KRUIJT, N. LEEUWEN, F. VAN ZIJDERVELD und J. WAGENAAR (1997)  
Molecular typing of *Salmonella* by AFLP based DNA fingerprinting.  
IMBEM IV: Fourth International Meeting on Bacterial Epidemiological Markers, Elsinore, Denmark, p. 14, 10-13. September 1997
- DUTTA, P., R. RASAILY, M.R. SAHA, S.K. MITRA, S.K. BHATTACHARYA, M.K. BHATTACHARYA und M. LAHIRI (1993)  
Ciprofloxacin for treatment of severe typhoid fever in children.  
Antimicrob. Agents Chemother. **37**, 1197-1199
- EISENSTEIN, B.I. (1990)  
New molecular techniques for microbial epidemiology and the diagnosis of infectious diseases.  
J. Inf. Dis. **161**, 595-602
- ENDTZ, P.H., G.J. RUIJS, B. VAN KLINGEREN, W.H. JANSEN, T. VAN DER REYDEN und R.P. MOUTON (1991)  
Quinolone resistance in *Campylobacter* isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine.  
J. Antimicrob. Chemother. **27**, 199-208
- ERDEM, B., E.J. THRELFALL, S.L. SCHOFIELD, L.R. WARD und B. ROWE (1994)  
Plasmid profile typing provides a method for the differentiation of strains of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 isolated in Turkey.  
Letters Appl. Microbiol. **19**, 265-267
- ESTEBAN, E., K. SNIPES, D. HIRD, R. KASTEN und H. KINDE (1993)  
Use of ribotyping for characterization of *Salmonella* serotypes.  
J. Clin. Microbiol. **31**, 233-237
- FALKOW, S. (1975)  
In: Lagnado, J.R. (Hrsg.)  
Infectious multiple drug resistance.  
Pion Limited, 207 Brondesbury Park London, S. 49-50
- FANTASIA, M. und E. FILETICI (1994)  
*Salmonella* Enteritidis in Italy.  
Int. J. Food Microbiol. **21**, 7-13
- FIRTH, N., K. IPPEN-IHLER und R.A. SKURRY (1996)  
Structure and function of the F-factor and mechanism of conjugation.  
In: Neidhardt F.C., R. Curtis III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, H.E. Umbarger 2nd ed. (Hrsg.)  
*Escherichia coli* and *Salmonella* - Cellular and Molecular Biology  
American Society for Microbiology (ASM) Press, S. 2377-2401

- FLEMING, A. (1929)  
On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*.  
Brit. J. Exp. Path. **10** 226-236
- FOCK, R. (1995)  
Vorwort.  
In: Kühn, H., H. Tschäpe (Hrsg.)  
Salmonellosen des Menschen: Epidemiologische und ätiologische Aspekte  
Medizin Verlag GmbH München, 1996 (RKI-Schriften **3/ 95**) S. 4
- FROST, J.A., L.R. WARD und B. ROWE (1989)  
Acquisition of a drug resistance plasmid converts *Salmonella* Enteritidis phage type 4 to phage type 24.  
Epidem. Inf. **103**, 43-248
- FROST, J.A., A. KELLEHER und B. ROWE (1996)  
Increasing ciprofloxacin resistance in salmonellas in England and Wales 1991-1994.  
J. Antimicrobiol. Chemo. **37**, 85-91
- GAST, R.K. und J.F. STEPHENS (1986)  
In vivo transfer of antibiotic resistance to a strain of *Salmonella* Arizonae.  
Poultry Science **65**, 270-279
- GAST, R.K. und J.F. STEPHENS (1988)  
Effects of Kanamycin administration to poultry on the proliferation of drug-resistant *Salmonella*.  
Poultry Science **67**, 689-698
- GAST, R.K., J.F. STEPHENS und D.N. FOSTER (1988)  
Effects of Kanamycin administration to poultry on the interspecies transmission of drug-resistant *Salmonella*.  
Poultry Science **67**, 699-706
- GERSHMAN, M. (1976)  
Phage typing system for *Salmonella* Enteritidis.  
Appl. Environm. Microbiol. **32**, 1 p190-191
- GIBERT, I., J. BARBE und J. CASADESUS (1990)  
Distribution of insertion sequence IS200 in *Salmonella* and *Shigella*.  
J. Gen. Microbiol. **136**, 2555-2560
- GODWIN, D. und J. SLATER (1979)  
The influence of the growth environment on the stability of a drug resistance plasmid in *Escherichia coli* K12.  
J. Gen. Microbiol., **111**, 201-210
- GONZALEZ-HEVIA, M. A., J.J. LLANEZA und U.C. MENDOZA (1994)  
Usefulness of molecular genetic markers in typing of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis causing a food-borne outbreak.  
Int. J. Food Microbiol. **22**, 97-103
- GRAEBER, I., M.A. MONTENEGRO, C. BUNGE, U. BOETTCHER, H. TOBIAS, E-A. HEINEMEYER und R. HELMUTH (1995)  
Molecular marker analysis of *Salmonella* Typhimurium from surface waters, humans, and animals.  
Eur. J. Epidem. **11**, 325-331
- GRIGGS, D.J., M.C. HALL, Y.F. JIN und L.J.V. PIDDOCK (1994)  
Quinolone resistance in veterinary isolates of salmonella.  
J. Antimicrob. Chemother. **33**, 1173-1189

- GRIMONT, F. und P.A.D. GRIMONT (1986)  
Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools.  
Ann. Institute Past. Microbiol. **137 B**, 165-167
- GROßKLAUS, D. (1991)  
Ernährung und gesundheitlicher Verbraucherschutz.  
Zentrbl. Hyg. Umweltmed. **191**, 102-116
- GROßKLAUS, D., K. GERIGK, H. KOLB und K.-D. ZASTROW (1991)  
Zur weltweiten Zunahme von Enteritis infectiosa Fällen - Kritische Anmerkungen -.  
Arv. Lebensmittelhyg. **42**, 136-140
- GROTHUES, F. und B. TÜMMLER (1991)  
New approaches in genome analysis by pulsed-field gel electrophoresis:  
application to the analysis of *Pseudomonas* Species  
Mol. Microbiol. **5**, 2763-2776
- GRUMBLES, L.C., F.L.K. WILLS und W.A. BONEY Jr. (1954)  
Furazolidone treatment of fowel typhoid in turkeys.  
J. Am. Vet. Med. Assoc. **124**, 217-219
- GUERRIER-TAKEDA, C., R. SALAVATI und S. ALTMAN (1997)  
Converting Bacteria from drug resistant to drug sensitive.  
Proc. Nat. Acad. Sci., **94**, 8273-8921
- GUINÉE, P.A.M. (1965)  
Transfer of multiple drug resistance from *Escherichia coli* to *Salmonella* Typhimurium in the  
mouse intestine.  
Antonie van Leeuwenhoek **31**, 314-322
- HADFIELD, T.L., M.H. MONSON und I.K. WACHSMUTH (1985)  
An outbreak of antibiotic-resistant *Salmonella* Enteritidis in Liberia, West Africa.  
J. Infect. Dis. **151**, 790-795
- HAFEZ, H.M., S. JODAS und J. EMELE (1992)  
Practice experience using feed and water medication to control *Salmonella* in broiler flocks.  
In: M. Hinton und R.W.A.W. Mulder (Hrsg.)  
"Flair No. 6 / COST No. 906" Prevention and control of potentially pathogenic microorganisms  
in poultry and poultry meat processing. 7. The role of antibiotics in the control of foodborne  
pathogens".  
Proceeding of meeting held at Bristol, UK, April. 1992 Het Spelderholt, Holland, 63-68
- HAFEZ, H.M. und A. STADLER (1997)  
*Salmonella* Enteritidis colonization in turkey poults.  
DTW **104**, 118-119
- HALL, C.F. und H.T. CARTRITE (1961)  
Observations on strains of *Salmonella* Gallinarum apparently resistant to furazolidone.  
Av. Dis. **5**, 382-392
- HALL, R.M. und C.M. COLLIS (1995)  
Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific  
recombination.  
Mol. Microbiol. **15**, 593-600
- HANAHAHAN, D. und F.R. BLOOM (1996)  
Mechanisms of DNA Transformation.  
In: Neidhardt F.C, R. Curtis III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik,  
W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, H.E. Umbarger 2nd ed. (Hrsg.)  
*Escherichia coli* and *Salmonella* - Cellular and Molecular Biology  
American Society for Microbiology (ASM) Press, S. 2449-2459

- HEISIG, P., B. KRATZ, E. HALLE, Y GRÄSER, M. ALTWEGG, W. RABSCH und J.-P. FABER (1995)  
Identification of DNA gyrase A mutations in ciprofloxacin-resistant isolates of *Salmonella* Typhimurium from men and cattle in Germany.  
Microbiol. Drug Res. **1**, 211-218
- HEISIG, P. (1997)  
Mechanisms and epidemiology of Fluorquinolone resistance in *Enterobacteriaceae*.  
In: Biospektrum, Sonderband "Antibiotic Resistance"  
Spektrum Akademischer Verlag, 42-46
- HELLING, R., T. KINNEY und J. ADAMS (1981)  
The maintenance of plasmid-containing organisms in populations of *Escherichia coli*.  
J. Gen. Microbiol. **123**, 129-141
- HELMUTH, R., R. STEPHAN, E. BULLING, W.J. VAN LEEUWEN, J.D.A. VAN EMBDEN, P.A.M. GUINÉE, D. PORTNOY und S. FALKOW (1981)  
R-factor cointegrate formation in *Salmonella* Typhimurium bacteriophage type 201 strains.  
J. Bacteriol. **146**, 444-452
- HELMUTH, R., R. STEPHAN, C. BUNGE, B. HOOG, A. STEINBECK und E. BULLING (1985)  
Epidemiology of virulence-associated plasmids and outer membrane protein patterns within seven common *Salmonella* serotypes.  
Inf. Imm. **48**, 175-182
- HELMUTH, R. und E. BULLING (1985)  
Proceeding of the Symposium on criteria and methods for the microbiological evaluation of growth promoters in animal feeds.  
Berlin, Federal Institut for Health Protection of Consumers and Veterinary Medicin, 1-190
- HELMUTH, R. (1989)  
Zum Problem der Antibiotika-Resistenz.  
Bundesgesundhbl. **32**, 160-162
- HELMUTH, R. (1990)  
Bacterial and genetic mechanisms of antimicrobial resistance.  
WHO / Zoonoses / **90.167** Annex III p2-7
- HELMUTH, R., M.A., MONTENEGRO, A. STEINBECK, A. SEILER und O. PIETSCH (1990)  
Molekularbiologische Methoden zur epidemiologischen Feincharakterisierung von Krankheitserregern am Beispiel von *Salmonella* Enteritidis aus Geflügel.  
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **103**, 416-421
- HELMUTH, R. und A. SCHROETER (1994)  
Molecular typing methods for *S. Enteritidis*.  
Int. J. Food Microbiol. **21**, 69-77
- HELMUTH, R. 1997  
Epidemiology of antibiotic resistance - The example of *Salmonella*.  
IMBEM IV: Fourth International Meeting on Bacterial Epidemiological Markers, Elsinore, Denmark, p. 22, 10-13. September 1997
- HELMUTH, R. und D. PROTZ (1997)  
How to modify conditions limiting resistance in bacteria in animals and other reservoirs.  
Clin. Infect. Dis. **24 (Suppl 1)**: S136-138
- HELMUTH, R., A. SCHROETER und D. PROTZ (1997)  
Resistenzen durch die Anwendung von Tierarzneimitteln und Futterzusatzstoffen.  
Bundesgesundheitsbl. **11**, 428-431

- HENNIG, A. (1972a)  
Kokzidiostatika.  
In: Hennig, A. [Hrsg.]  
Mineralstoffe, Vitamine, Ergotropika  
VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag Berlin, S. 498-520, 1972
- HENNIG, A. (1972b)  
Kokzidiostatika.  
in: Hennig, A. [Hrsg.]  
Grundlagen der Fütterung  
2. Aufl., VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag Berlin, S. 134-135, 1972
- HENNIG, A. (1972c)  
Fütterung der Kälber.  
in: Hennig, A. [Hrsg.]: Grundlagen der Fütterung  
2. Aufl., VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag Berlin, S.382-383,1972
- HENZLER, D.J. und H.M. OPITZ (1992)  
The role of mice in the epizootiology of *Salmonella* Enteritidis Infection on chicken layer farms.  
Avian Dis **36**, 625-631
- HIRSH, D.C., J.S. IKEDA, L.D. MARTIN, B.J. KELLEY und G.Y. GHAZIKHANIAN (1983)  
R Plasmid-mediated Gentamicin resistance in *Salmonellae* isolated from turkeys and their environment.  
Avian Dis **27**, 766-772
- HOF, H., I. EHRHARD und H. TSCHÄPE (1991)  
Presence of quinolone resistance in a strain of *Salmonella* Typhimurium.  
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **10**, 747-749
- HOF, H. (1992)  
Therapie der Salmonellen-Enteritis.  
Dsch. med. Wschr. 117, **Nr. 36**, 1378
- HOLMBERG, S.D., I.K. WACHSMUTH, F.W. HICKMAN-BRENNER und M.L. COHEN (1984a)  
Comparison of plasmid profile analysis, phage typing and antimicrobial susceptibility testing in characterizing *Salmonella* Typhimurium isolates from outbreak.  
J. Clin. Microbiol. **19**, 100-104
- HOLMBERG, S.D., M.T. OSTERHOLM, K.A. SENGER und M.L. COHEN (1984b)  
Drug-resistant *Salmonella* from animals fed antimicrobials.  
N. Engl. J. Med. **311**, 615-622
- HUGHES, V.M. und N. DATTA (1983)  
Conjugative plasmids of the 'pre-antibiotic' era.  
Nature **302**, 725-726
- HUMPHREY, T.J., B. ROWE und G.C. MEAD (1988)  
Poultry meat as a source of human salmonellosis in England and Wales.  
Epidem. Inf. **100**, 175-184
- HUMPHREY, T.J., A. BASKERVILLE, H. CHART und B. ROWE (1989)  
Infection of egg-laying hens with *Salmonella* Enteritidis PT4 by oral inoculation.  
Vet. Rec. **125**, 531-532
- HUMPHREY, T.J. (1994)  
Contamination of egg shell and contents with *Salmonella* Enteritidis: a review.  
Int. J Food Microbiol. **21**, 31-40

- HUNTER, P.R. und M.A. GASTON (1988)  
Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's Index of Diversity.  
J. Clin. Microbiol. **26**, 2465-2466
- HUNTER, P.R. (1990)  
Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods.  
J. Clin. Microbiol. **28**, 1903-1905
- HUTCHINSON, F. (1996)  
Mutagenesis.  
In: Neidhardt F.C, R. Curtis III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, H.E. Umbarger 2nd ed. (Hrsg.)  
*Escherichia coli* and *Salmonella* - Cellular and Molecular Biology  
American Society for Microbiology (ASM) Press, 2339-2362
- ILLING, M. und B. MÜLLER (1986)  
Zur Analytik von Monensin in Futtermitteln und Prämixen.  
Mh. Vet.-Med. **41**, 854-855
- JACOBY, G.A. und A.A. MEDEIROS (1991)  
More extended-Spectrum  $\beta$ -lactamases.  
Antimicrob. Agents Chemother. **35**, 1697-1704
- JAWETZ, E., J. L. MELNICK und E. A. ADELBERG (1977)  
Medizinische Mikrobiologie.  
Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York
- JEROCH, H. und G. FLACHOWSKY (1972)  
Fütterung des Hühnergefüügels in der Aufzuchtperiode.  
In: Jeroch, H. [Hrsg]  
Geflügelernährung  
VEB Gustav Fischer Verlag Jena, 1972, S. 90-94
- JONES, S., S. PRIMROSE, A. ROBINSON und D. ELLWOOD (1980)  
Maintenance of some ColE1-type plasmids in chemostat culture.  
Mol. Gener. Gen. **180**, 579-584
- JONES, S. und J. MELLING (1984)  
Persistence of pBR322-related plasmids in *Escherichia coli* grown in chemostat cultures.  
FEMS Microbiol. Lett. **22**, 239-243
- JONES, C.S. und D.J. OSBORNE (1991)  
Identification of contemporary plasmid virulence genes an ancestral isolates of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium.  
FEMS Microbiol. Lett. **80**, 7-12
- JUKES, T.E., E. STOCKSTAD, R. TAYLER, T. CUNHA, H. EDWARDS und G. MAEDOWS (1950)  
Growth promoting effect of aureomycin on pigs.  
Arch. Biochem, **26**, 324
- KADO, C.I. und S.-T. LIU (1981)  
Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids.  
J. Bacteriol. **145**, 1365-1373
- KÄSBOHRER, A., TH. BLAHA, M. PÖPPEL und D. MISCHOK (1996)  
WHO-Langzeitstudie zur schrittweisen Senkung der Salmonellenbelastung in einer Geflügelfleisch-produktionskette.  
51. Fachgespräch über Geflügelkrankheiten der DVG / WVPA Hannover 31.10.-01.11.1996

- KAUFFMANN, F. (1935)  
"Über die Typeneinteilung der Gärtner-Gruppe".  
Z. Hyg. **117**, 431-450
- KAUFFMANN, F. (1975)  
Classification of Bacteria.  
Munsksgaard, Kopenhagen (1975)
- KELTERBORN, E. (1967)  
*Salmonella*-Species, Erstfunde, Namen und Vorkommen.  
S. Hirzel Verlag, Leipzig 1967, S. 140-141
- KHAKHRIA, R., D. DUCK und H. LIOR (1991)  
Distribution of *Salmonella* Enteritidis phage types in Canada.  
Epidemiol. Infect. **106**, 25-32
- KILGER, G. und P.A.D. GRIMONT (1993)  
Differentiation of salmonella phase 1 flagellar antigen types by restriction of the amplified *fliC* gene.  
J. Clin. Microbiol. **31**, 1108-1110
- KRÜGEL, H. (1997)  
How microorganisms produce and survive antibiotics.  
in: Biospektrum, Sonderband "Antibiotic Resistance"  
Spektrum Akademischer Verlag, 42-46
- KROKER, R. (1996)  
Nitrofurane.  
In: Frey, H., W. Löscher (Hrsg.)  
Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin  
Enke Verlag 1996 S. 499-501(1996)
- KROKER, R. (1997)  
Pharmaka zur Behandlung und Verhütung bakterieller Infektionen.  
in: Löscher, W., (Hrsg.), F.R: Ungemach, R. Kroker 3. neubearbeitete Auflage  
Grundlagen der Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren  
Verlag Paul Parey S. 211-245 (1997)
- KÜHN, K. (1995)  
Vorkommen und epidemische Verbreitung.  
In: Kühn, H., H. Tschäpe (Hrsg.)  
Salmonellosen des Menschen: Epidemiologische und ätiologische Aspekte  
Medizin Verlag GmbH München, 1996 (RKI-Schriften **3/ 95**) S. 19-35
- KVENBERG, J.E. und D.L. ARCHER (1987)  
Economic impact of colonization control on foodborne disease.  
Food Technology, **7**, 77-81
- LACEY, R.W. (1975)  
Antibiotic resistance plasmids of *Staphylococcus aureus* and their clinical importance.  
Bacteriol. Rev. **39**, 1-32
- LACHONCHA, I., N. LÓPEZ-MOLINA, A. REMENTERIA, A. AUDICANA, I. PERALES und J. GARAIZAR (1997)  
Application of pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological typing of *Salmonella* Enteritidis and *S. Typhimurium*.  
IMBEM IV: Fourth International Meeting on Bacterial Epidemiological Markers, Elsinore, Denmark, p. 120, 10-13. September 1997)

- LACHOWICZ, Z. (1971)  
Drug resistance of *Salmonella* Enteritidis Bacilli.  
Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis **19**, 851-860
- LALKO, J. (1977)  
*Salmonella* Enteritidis bacteriophage typing.  
Bull. Inst. Marit. Trop. Med. Gdynia **28**, 187-193
- LAM, S. und J.R. ROTH (1983a)  
Genetic mapping of IS 200 copies in *Salmonella* Typhimurium strain LT2.  
Genetics **105**, 801-811
- LAM, S. und J.R. ROTH (1983b)  
A *Salmonella*-specific insertion sequence.  
Cell **34**, 951-960
- LAX, A.J., G.D. PULLINGER, J.M. SPINK, F. QURESHI, M.W. WOOD und P.W. JONES (1993)  
Plasmid genes involved in virulence in *Salmonella*.  
In: F. Cabello and C. Hormaeche (Hrsg.)  
The Biology of *Salmonella*  
Plenum Press, New York, pp. 171-190
- LEDERBERG, J. und E.L. TATUM (1946)  
Novel genotypes in mixed cultures of biochemical mutants of bacteria.  
Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. **11**, 113
- LEDERBERG, J. und E.M. LEDERBERG (1952)  
Replica-plating and indirect selection of bacterial mutants.  
J. Bacteriol. **63**, 399-406
- LE MINOR, L. und M.Y. POPOFF (1987)  
Designation of *Salmonella enterica* sp. nov. as the type and only species of the genus *Salmonella*.  
Int. J. Syst. Bact., **37**, 465-468
- LECLERC, J.E., L. BAOGUANG, W.L. PAYNE und T.A. CEBULA (1996)  
High mutation frequencies among *Escherichia coli* and *Salmonella* pathogens  
Science **274**, 1208-1211
- LEE, A.L., V.L. THREATT, N.D. PUHR, P. LEVINE, K. FERRIS und R.V. TAUXE (1993a)  
Antimicrobial-resistant *Salmonella* spp isolated from healthy broiler chickens after slaughter.  
JAVMA **202**, 752-755
- LEE, A.L., N.D. PUHR und E.K. MALONY (1994)  
Increase in antimicrobial-resistant *Salmonella* infections in the United States, 1989-1990.  
J. Inf. Disease **170**, 128-134
- LEE, C., B.E. LANGLOIS und K.A. DAWSON (1993b)  
Detection of Tetracyclin resistance determinants in pig isolates from three herds with different histories of antimicrobial agent exposure.  
Appl. Environ. Microbiol. **59**, 1467-1472
- LEEGARD, T.M., M.H. VAN GESTEL, P.L.C. PETIT und J.A.M. VAN DE KLUNDERT (1996)  
Antibiotic resistance mechanisms in *Salmonella* species causing bacteraemia in Malawi and Kenya.  
APMIS **104**, 302-306

- LENSKI, R.E. (1997)  
The cost of antibiotic resistance - from the perspective of a bacterium.  
In: Antibiotic Resistance: Origins, Evolution, Selection and Spread  
aus der Serie: Ciba Foundation Symposia **207** 131-151 Wiley, Chichester
- LEVY, S.B., G.B. FITZGERALD, A.B. MACONE (1976)  
Spread of antibiotic-resistant plasmids from chicken to chicken and from chicken to man.  
Nature **260**, 40-42
- LEVY, S.B. (1987)  
Antibiotic use for growth promotion in animals: Ecologic and public health consequences.  
J. Food Prot. **50**, 616-620
- LEVY, S.B. (1992) (Hrsg.)  
The antibiotic paradox: how miracle drugs are destroying the miracle.  
Plenum Press, 233 Spring Street, New York 1992, S. 1-279
- LEVY, S.B. (1994)  
Balancing the drug resistance equation.  
Trends Microb. **2**, 341-342
- LEVY, S.B. (1997)  
Antibiotic resistance: An ecological imbalance.  
In: Antibiotic Resistance: Origins, Evolution, Selection and Spread  
aus der Serie: Ciba Foundation Symposia **207** 1-14 Wiley, Chichester
- LIEBISCH, B. und S. SCHWARZ (1996)  
Molekularbiologische Methoden zur epidemiologischen Typisierung von Salmonellen -  
Übersichtsreferat.  
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **109**, 348-354
- LIEBISCH, B. und S. SCHWARZ (1996a)  
Molecular typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis isolates.  
J. Med. Microbiol. **44**, 52-59
- LIEBISCH, B. und S. SCHWARZ (1996b)  
Evaluation and comparison of molecular techniques for epidemiological typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Dublin.  
J. Clin. Microbiol., **34**, 641-646
- LIESEGANG, A., R. PRAGER, W. STRECKEL, W. RABSCH, B. GERICKE, G. SELTMANN, R. HELMUTH und H. TSCHÄPE (1997)  
Wird der *Salmonella enterica* Stamm DT 104 des Serovars Typhimurium der neue führende  
Epidemietyp in Deutschland ?  
InfFO **I/97**, 6-10
- LILLEENGEN, K. (1951)  
Typing of *Salmonella Gallinarum* and *Salmonella Pullorum* by means of bacteriophages.  
Acta Pathol. Microbiol. Scand. **30**, 194-202
- LINTON, A.H. (1981)  
Has Swann failed ?  
Vet. Rec. **108**, 328-331
- LINTON, A.H. (1984)  
Antibiotic-resistant bacteria in animal husbandry.  
Br. Med. Bull. **Vol. 40**, No.1 91-95
- LINTON, A.H., (1985)  
Microbiological risks of growth promoter use.  
Vet. Rec. **108**, 328-331

- LÓPEZ-MOLINA, N., I. LACONCHA, A. REMENTERIA., A. AUDICANA, I. PERALES und J. GARAIZAR (1997)  
Optimization of PCR for fingerprinting *Salmonella* Enteritidis and the reproducibility of the method.  
IMBEM IV: Fourth International Meeting on Bacterial Epidemiological Markers, Elsinore, Denmark, p. 139, 10-13. September 1997
- LOW, J.C., G. HOPKINS, T. KING und D. MUNRO (1996)  
Antibiotic resistant *Salmonella* Typhimurium DT 104 in cattle.  
Vet. Rec. **June 29**, (Letters) 650-651
- LUCAS, F.R. (1954)  
Furazolidine in the treatment of an outbreak of fowel typhoid in chickens.  
Poultry Sci. **34**, 440
- McCALLA, D.R., C. KAISER und M.H.L. GREEN (1978)  
Genetics of nitrofurazone resistance in *Escherichia coli*.  
J. Bacteriol. **133**, 10-16
- MAJTÁNOVA, L. (1997)  
Occurrence of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage types in the Slovak Republic.  
Eur. J. Epidemiol. **13**, 243-245
- MANNING, J.G., B.M. HARGFIS, A. HINTON, JR., D.E. CORRIER, J.R. DELOACH und C.R. CREGER (1994)  
Effect of selected Antibiotics and Anticoccidials on *Salmonella* Enteritidis cecal Colonization and organ invasion in Lehorn chicks.  
Avian Diseases **38**, 56-261
- MARTINETTI, G. und M. ALTWEGG (1990)  
rRNA gene restriction patterns and plasmid analysis as a tool for typing *Salmonella* Enteritidis.  
Res. Microbiol. **141**, 1151-1162
- MASLOW, J.N., M.E. MULLIGAN und D. ARBEIT (1993)  
Molecular epidemiology: application on contemporary techniques to the typing of microorganisms.  
Clin. Infect. Dis. **17**, 153-164
- MASTERS, M. (1996)  
Generalized Transduction.  
In: Neidhardt F.C, R. Curtis III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, H.E. Umbarger 2nd ed. (Hrsg.)  
*Escherichia coli* and *Salmonella* - Cellular and Molecular Biology  
American Society for Microbiology (ASM) Press, S. 2421-2441
- MAZURIER, S.I. und K. WERNARS (1992)  
Typing of *Listeria* strains by random amplification of polymorphic DNA.  
Res. Microbiol. **143**, 499-505
- MEDEIROS, A.A. (1997)  
Evolution and dissemination of  $\beta$ -lactamases accelerated by generations of  $\beta$ -lactam antibiotics.  
Clin. Inf. Dis. **24** (Suppl.1) S19-45
- MILLER, G.H., F.J. SABATELLI, R.S. HARE, Y. GLUPCZYNSKI, P. MACKEY, D. SHLAES, K. SHIMIZU, K.J. SHAW und THE AMINOGLYCOSIDE RESISTANCE STUDY GROUPS (1997)  
The most frequent Aminoglycoside Resistance mechanisms - Changes with time and geographic area: a reflection of Aminoglycoside usage patterns.  
Clin. Inf. Dis. **24** (Suppl.1) S 46-62

- MILLEMANN, Y., M-C. LESAGE, E. CHASLUS-DANCLA und J-P. LAFONT (1995)  
Value of plasmid profiling, ribotyping and detection of IS200 for tracing avian isolates of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis.  
J. Clin. Microbiol. **33**, 173-179
- MONTENEGRO, M.A. und R. HELMUTH (1989)  
Molekularbiologische Methoden als Alternative zum Tierexperiment- Einsatz von DNS-Sonden beim Nachweis bakterieller Krankheitserreger.  
Bundesgesundhbl. **8/89**, 347-351
- MONTENEGRO, M.A., G. MORELLI und R. HELMUTH (1991)  
Heteroduplex analysis of *Salmonella* virulence plasmids and their prevalence in isolates in defined sources.  
Microbiol. Pathogen. **11**, 391-397
- MORIÑIGO, M.A., R. CORNAX, D. CASTRO, M. JIMINEZ-NOTARO, P. ROMERO und J.J. BORREGO (1990)  
Antibiotic resistance of *Salmonella* strains isolated from natural polluted waters.  
J. Appl. Bacteriol. **68**, 297-302
- MORRIS JR. J.G., D.M. DWYER, C.W. HOGE, A.D. STUBBS, D. TILGHMAN, C. GROVES, E. ISRAEL und J. P. LIBONATI (1992)  
Changing clonal patterns of *Salmonella* Enteritidis in Maryland: Evaluation of strains isolated between 1985-1990.  
J. Clin. Microbiol. **30**, 1301-1303
- MOSHER, R.H., D.J., CAMP, K. YANG, M.P. BROWN, W.V. SHAW und L.C. VINING (1995)  
Inactivation of chloramphenicol by O-phosphorylation. A novel resistance mechanism in *Streptomyces venezuelae* ISP 5230, a chloramphenicol producer.  
J. Biol. Chemistry **270** (45), 27000-27006
- MUKHERJEE, U. und S.N. CHATTERJEE (1992)  
*In vitro* interaction between nitrofurantoin and *Vibrio cholera* DNA.  
Chem. Biol. Interactions **82**, 111-121
- MUÑOZ, P., M. DOLORES DÍAZ, M. RODRÍGUEZ-CREÍXEMS, E. CERCENADO, T. PELAEZ und E. BOUZA (1993)  
Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolates in a Spanish hospital.  
Antimicrob. Agents Chemother. **37**, 1200-1202
- MUSTER, C.J., L.A. MACHATTIE und J.A. SHAPIRO (1981)  
Transposition and rearrangements in plasmid evolution.  
in: Levy S.B., R.C. Clowes und E.L. Koenig (Hrsg.)  
Molecular Biology, Pathogenicity, and Ecology of Bacterial Plasmids  
Plenum Press, New York 349-358, (1981)
- NAIR, U.S., M. SAEED, P.M. MURIANA, R.A. KREISLE, B. BARRETT, C.L. SINCLAIR und M.L., FLEISSNER (1995)  
Plasmid profiles and resistance to antimicrobial agents among *Salmonella* Enteritidis isolates from human beings and poultry in the midwestern United States.  
JAVMA **206**, 1339-1344
- NEU, H.C. (1992)  
The crisis in antibiotic resistance.  
Science **257**, 1064-1073
- NEUMARK, E. (1925 und 1926)  
In: Zschr. für Fleisch und Milchhygiene.  
zitiert aus **BAHR, L.** (1930)

- O'BRIEN, T.F., J.D. HOPKINS, E.S. GILLEECE, A.A. MEDEIROS, R.L. KENT, B.O. BLACKBURN, M.B. HOLMES, J.P., REARDON, J.M. VERGERONT, W.L. SCHELL, E. CHRISTENSON, M. L. BISSETT und E.V. MORSE (1982)  
Molecular epidemiology of antibiotic resistance in *Salmonella* from animals and human beings in the United States.  
N. Engl. J. Med **307**, 1-6
- O'BRIEN, T.F., M. DEL PILAR PLA, K.H. MAYER, H. KISHI, E. GILLEECE, M. SYVANEN und J.D. HOPKINS (1985)  
Intercontinental Spread of a new antibiotic resistance gene on a epidemic plasmid.  
Science **230**, 87-88
- OCHIAI, K. (1959)  
Distribution and clinic of dysentery caused by antibiotic-resistant strains. Medicine of Japan in 1959.  
Proc. 15th Gen. Meeting Japan Med. Assoc. **5**, 306-316
- OLIVER, P. (1981)  
Resistance to Nitrofurantoin conferred by the drug-resistance factor R46.  
Mutation Research **91(4-5)**, 297-299
- OLSEN, J.E., M. SORENSEN, D.J. BROWN, K. GAARSLEV und M BISGAARD (1992)  
Plasmid profiles as an epidemiological marker in *Salmonella enterica* serovar Berta infections.  
APMIS **100**, 221-228
- OLSEN, J.E., D.J. BROWN, M.N. SKOV und J.P. CHRISTENSEN (1993)  
Bacterial typing methods suitable for epidemiological analysis. Application in investigations of Salmonellosis among livestock.  
Vet. Q. **15**, 125-135
- OLSEN, E.O., M.N. SKOV, O. ANGEN, E.J. THRELFALL und M. BISGAARD (1997)  
Genomic relationships between selected phage types of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype Typhimurium defined by ribotyping, IS200 typing and PFGE.  
Microbiol. **143**, 1471-1479
- OLSVIK, O., H. SORUM, K. WACHSMUTH, K FOSSUM und J.C. FEELEY (1985)  
Animal-to-human transmission of both sensitive and resistant *Salmonella* Typhimurium demonstrated by plasmid profiling.  
Lancet **i**, 172-173
- O'NEILL, M.M., E.A. EADY, A. RADFORD, S. BAUMBERG und J. H. COVE (1995)  
The use of PCR to isolate a putative ABC transporter from *Saccharopolyspora erythraea*.  
FEMS Microbiol. Lett. **131**, 189-195
- ORSKOV, F. und I. ORSKOV (1983)  
From the National Institutes of Health. Summary of a workshop on the clone concept in the epidemiology, taxonomy and evolution of the *enterobacteriaceae* and other bacteria.  
J. Inf. Dis. **148**, 346-357
- OXOID HANDBUCH (1993)  
5. aktualisierte deutsche Auflage  
Unipath GmbH, Wesel, 1993
- PALMER, S.R. und B. ROWE (1986)  
Trends in *Salmonella* infections.  
PHLS Microbiol. Digest **3**, 23-25
- PANG, Y., B.A. BROWN, V.A. STEINGRUBE, R.J. WALLACE JR. und M.C. ROBERTS (1994)  
Tetracyclin resistance determinants in *Mycobacterium* and *Streptomyces* Species.  
Antimicrob. Agents Chemother. **38**, 1408-1412

- PAUL, H.E., C.M. HARRINGTON, R.C. BENDER und W.P. BRIGGS (1952)  
Resistance and cross resistance of bacteria to Nitrofurans.  
P.S.E.B.M. **79**, 199-204
- PAUL, J. und B. BATCHELOR (1988)  
*Salmonella* Enteritidis phage type 4 and hens eggs.  
Lancet, **ii**, 1421
- PAVIA, A.T.; L.D. SHIPMANN, J.G. WELLS, N.D. PUHR, J.D. SMITH, T.W. MCKINLEY und R.V. TAUXE (1990)  
Epidemiologic evidence that prior antimicrobial exposure decreases resistance to infection by antimicrobial-sensitive *Salmonella*.  
J. Infect. Dis. **161**, 255-260
- PERS, C., P. SOGAARD und L. PALLESEN (1996)  
Selection of multiple resistance in *Salmonella* Enteritidis during treatment with ciprofloxacin.  
Scand. J. Infect. Dis. **28**, 529-531
- PHILLIPS, I. und K. SHANNON (1984)  
Aminoglycoside resistance.  
Brit. Med. Bull. **40**, 28-35
- PIDDOCK, L.J.V. (1995)  
Mechanisms of resistance to Fluoroquinolones: State-of-the-art 1992-1994.  
Drugs **49** (Suppl.2): 29-35
- PIDDOCK, L.J.V. (1996)  
Does the use of antimicrobial agents in veterinary medicine and animal husbandry select antibiotic-resistant bacteria that infect man and compromise antimicrobial chemotherapy ?  
J. Antimicrob. Chemother. **38**, 1-3
- PLATT, D.J., J.S. CHESHAM, D.J., C.A.KRAFT und J. TAGGART (1986)  
Restriction enzyme fingerprinting of enterobacterial plasmids: a simple strategy with wide application.  
J. Hygiene **97**, 205-210
- PLATT, J., D.J. BROWN, D.C. OLD, R.M. BARKER, D.S.MURNO und J. TAYLOR (1987)  
Old and new techniques resolve a problem of infection by *Salmonella* Typhimurium.  
Epidemiol. Inf. **99**, 137-142
- POHL, P., H. IMBERECHTS, M. DE. FILETTE und A. STOCKMANS (1997)  
*Salmonella* Enteritidis in mammals in Belgium (1992-1996).  
Newsletter Comm. Ref. Laborat. F. *Salmonella*, Vol.3, Nr. 2, 15
- POPOFF, M.Y. und LE MINOR, L. (1985)  
Expression of antigenetic factor O:54 is associated with the presence of a plasmid in *Salmonella*.  
Ann. Inst. Past./Microbiol. **136 B**, 169-179
- POPOFF, M.Y. und LE MINOR, L. (1992)  
Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars 6th revision.  
WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Institut Pasteur, Paris
- POPOFF, M.Y., J. BOCKEMÜHL und F.W. HICKMANN-BRENNER (1996)  
Supplement 1995 (no. 39) to the Kauffmann-White scheme.  
Res. Microbiol. **147**, 765-769
- POPPE, C., R.J. IRWIN, S. MESSIER, G.G. FINLEY und J. OGGEL (1991)  
The prevalence of *Salmonella* Enteritidis and other *Salmonella* spp. among Canadian registered commercial chicken broiler flocks.  
Epidemiol. Infect. **107**, 201-211

- PORTNOY, D.A., S.L. MOSELEY und S. FALKOW (1981)  
Characterization of plasmids and plasmid-associated determinants of *Yersinia enterocolitica* pathogenesis.  
Infect. Immun. **31**, 775-782
- POWELL, N.G., E.J. THRELFALL, H. CHART, S.L. SCHOFIELD und B. ROWE (1994)  
Subdivision of *Salmonella* Enteritidis PT4 by pulsed field gel electrophoresis: potential for epidemiological surveillance.  
FEMS Microbiol. Lett. **119**, 193-198
- POWELL, N.G., E.J. THRELFALL, H. CHART, S.L. SCHOFIELD und B. ROWE (1995)  
Correlation of change in phage type with pulsed field profile and 16 rrn profile in *Salmonella* Enteritidis phage types 4, 7, and 9a.  
Epidemiol. Infect. **114**, 25-40
- PRESCOTT, J.F. (1993a)  
Antimicrobial drug action and interaction: An introduction.  
In: Antimicrobial therapy in veterinary medicine  
John F. Prescott... -2. Aufl. (Hrsg.)  
Iowa State University Press, 1993 S. 5
- PRESCOTT, J.F. (1993b)  
Aminoglycosides and Aminocyclitols.  
Antimicrobial therapy in veterinary medicine  
John F. Prescott... -2. Aufl. (Hrsg.)  
Iowa State University Press, 1993 S. 144
- RAMOS, J.M., J.M. ALÉS, M. CUENCA-ESTRELLA, R.FERNÁNDEZ-ROBLAS und F. SORINO (1996)  
Changes in susceptibility of *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Virchow to six antimicrobial Agents in a Spanish hospital, 1980-1994.  
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **15**, 85-88
- RAMPLING, A., R. UPSON, L.R. WARD, J.R. ANDERSON, E. PETERS und B. ROWE (1989)  
*Salmonella* Enteritidis phage type 4 infection of broiler chickens: A hazard to public health  
Lancet, **ii**, 436-438
- RAMPLING, A., R. UPSON und DEREK F.J. BROWN (1990)  
Nitrofurantoin resistance in isolates of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 from poultry and humans.  
J. Antimicrob. Chemother. **25**, 285-290
- RANKIN, S.C., C.E. BENSON und D.J. PLATT (1995)  
The distribution of serotype specific plasmids among different subgroups of strains of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis: characterization of molecular variants by restriction enzyme fragmentation patterns.  
Epidemiol. Infect. **114**, 24-40
- RANTALA, M. und E. NURMI (1974)  
Hazards involved in the use of Furazolidone for the prevention of salmonellosis in broiler chickens.  
J. Hyg. **72**, 349-354
- REANNY, D. (1976)  
Extrachromosomal elements as possible agents of adaptation and development.  
Bacteriol. Rev. **40**, 552-590
- REYNOLDS, P.E. (1984)  
Resistance to the antibiotic target site.  
Brit. Med. Bull. **40**, 3-10

- REXACH, L., F. DILASSER, J.P., GUILLOU und P. FACH (1992)  
Use of *S. Typhimurium* virulence plasmid gene and genes coding for flagellins for PCR detection of *Salmonella* genus.  
*Salmonella* and Salmonellosis Ploufragan, France Book of Posters p 49
- RHAN, K., S.A. DE GANDIS und R.C. CLARKE (1992)  
Amplification of an inv. Agene sequence of *Salmonella* Typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of salmonella.  
Mol. Cell Prob **6**, 271-279
- RIDLEY, A.M., P. PUNIA, L.R. WARD, R. BOWE und E.J. THRELFALL (1996)  
Plasmid characterization and pulsed-field electrophoretic analysis demonstrate that ampicillin-resistant strains of *Salmonella* Enteritidis phage typ 6a are derived from *Salm.* Enteritidis phage typ 4.  
J. Appl. Bacteriol. **81**, 613-618
- RIVERA, M.J., N. RIVERA, J. CASTILLO, M. C. RUBIO und R. GÓMEZ-LUS (1991)  
Molecular and epidemiological study of *Salmonella* clinical isolates.  
J. Clin. Microbiol. **29**, 927-932
- RÖHNISCH, H.-G. und G. KNAPE (1982)  
Erläuterungen zu den Qualitätsanforderungen.  
In: Landwirtschaftsausstellung der DDR (Hrsg.)  
Qualitätsanforderungen für Mischfuttermittel Wirk- und Mineralstoffmischungen und wissenschaftliche Empfehlungen für den Einsatz in der Tierproduktion  
Ausgabe **1982**, S. 9
- ROBERTS, M.C. (1997)  
Genetic mobility and distribution of tetracyclin determinants.  
in: Antibiotic Resistance: Origins, Evolution, Selection and Spread  
aus der Serie: Ciba Foundation Symposia **207** 206-222, Wiley, Chichester
- RODRIGUE, D.C., R.V. TAUXE und B. ROWE (1990)  
International increase in *Salmonella* Enteritidis: A new pandemic ?  
Epidemiol. Infect. **105**, 21-27
- RODRIGUE, D.C., D.N. CAMERON, N.D. PUHR, F.W. BRENNER, M.E. ST. LOUIS, I.K. WACHSMUTH und R. V. TAUXE (1992)  
Comparison of plasmid profiles, phage types and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* Enteritidis isolates in the United States.  
J. Clin. Microbiol. **30**, 854-857
- ROTH, J.R., N. BENSON, T. GALITSKI, K. HAACK, J.G. LAWRENCE und L. MIESEL (1996)  
Rearrangments of the bacterial chromosome: Formation and applications.  
In: Neidhardt F.C, R. Curtis III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, H.E. Umbarger 2nd ed. (Hrsg.)  
*Escherichia coli* and *Salmonella* - Cellular and Molecular Biology  
American Society for Microbiology (ASM) Press, 2256-2274
- ROWE, B., E.J. THRELFALL, L.R. WARD und A.S. ASHLEY (1979)  
International spread of multiresistant strains of *Salmonella* Typhimurium phage types 204 and 193 from Britain to Europe.  
Vet. Rec. **105**, 468-469
- ROWE, B. (1981)  
Salmonellosis in animals and man.  
In: Special Report:  
Vet. Rec. **Nov.14**, 438-440

- ROWE, B. und E.J. THRELFALL (1984)  
Drug resistance in gram-negative aerobic bacilli.  
Brit. Med. Bull. **40**, 68-76
- ROWE, B. und E.J. THRELFALL (1986)  
Antibiotic resistance in salmonella.  
PHLS Microbiol. Digest **3**, 18-22
- RYCHLIK, I., R. KARPISKOVA, M. DEDICOVA, M. FALDYNOVA und F. SISAK (1997)  
Plasmid profil analysis and phagetyping in *Salmonella* Enteritidis strains isolated in children under the age of 5 years in the Czech Republic.  
IMBEM IV: Fourth International Meeting on Bacterial Epidemiological Markers, Elsinore, Denmark, p.140, 10-13. September 1997
- SACK, R.B., M. RAHMAN, M. YUNUS und E.H. KHAN (1997)  
Antimicrobial resistance in organisms causing diarrheal disease.  
Clin. Infect. Dis. **24** (Suppl 1): S102-105
- SAKAI, T., T. CHALERMCHAIKIT (1996)  
The major sources of *Salmonella* Enteritidis in Thailand.  
Inter. J. Food Microbiol. **31**, 173-180
- SALYERS, A.A. und C. F. AMABILE-CUEVAS (1997)  
Why are antibiotic resistance genes so resistant to elimination ?  
J. Antimicrob. Chemother. **41**, 2321-2325
- SALYERS, A.A. und D.D. WHITT (1994)  
Antibiotics: Mechanisms of action and mechanisms of bacterial resistance.  
in: Bacterial Pathogenesis A Molecular Approach; American Society for Microbiology Kapitel **8**, S. 97-109
- SAUNDERS, J.R. (1984)  
Genetics and evolution of antibiotic resistance.  
Brit. Med. Bull. **40**, 54-60
- SCHROETER, A., M. HARTUNG, O. PIETSCH, W. RABSCH und R. HELMUTH (1992)  
Zum *Salmonella* Enteritidis Geschehen in der Bundesrepublik Deutschland der Jahre 1990/1991.  
Bundesgesundhbl. **8**, 377-383
- SCHROETER, A., L.R. WARD, B. ROWE, M. HARTUNG und R. HELMUTH (1994)  
*Salmonella* Enteritidis phage types in Germany.  
Eur. J. Epidemiol. **10**, 645-648
- SCHWARTZ, D.C., W. SAFFRAN, J. WELSH, R. HAAS, M. GOLDENBERG und C.R. CANTOR (1983)  
New techniques for purifying large DNAs and studying their properties and packaging.  
Cold Spring Harbor. Symp. Quant. Biol. **47**, 19-195
- SCHWARZ, S., M. WEIDE-BOTJES, B. KOBE und G. FRECH (1997)  
Molecular methods for the epidemiological analysis of *Salmonella* serovars of zoonotic importance.  
*Salmonella* and Salmonellosis '97; Proceedings May 20/21/22, 1997 Ploufragan France, 41-44
- SELANDER, R.K., L. JIA und K. NELSON (1996)  
Evolutionary genetics of *Salmonella enterica*.  
In: Neidhardt F.C, R. Curtis III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, H.E. Umberger 2nd ed. (Hrsg.)  
*Escherichia coli* and *Salmonella* - Cellular and Molecular Biology  
American Society for Microbiology (ASM) Press, 2691-2707

- SELUNDER, R.K., D.A. CAUGANT, H. OCHMANN, J.M. MUSSER, M. GILMOUR und T.S. WHITHAM (1986)  
Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics.  
Appl. Environm. Microbiol. **51**, 5 p 873-884
- SELBITZ, H.J., SINELL. H.J. und A SZIEGOLEIT (1995)  
Das Salmonellen-Problem.  
in Vet - special  
Gustav-Fischer Verlag. Jena, Stuttgart
- SHABERG, D.R., L.S. TOMPKINS und S. FALKOW (1981)  
Use of agarose gel electrophoresis of plasmid deoxyribonucleic acid to fingerprint Gram-negative bacilli.  
J. Clin. Microbiol. **13**, 1105-1108
- SHAW, K.J., P.N. RATHER, R.S. HARE und G.H. MILLER (1993)  
Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes.  
Microbiol. Rev, **57**, 138-163
- SHAW, W.V. (1984)  
Bacterial resistance to chloramphenicol.  
Brit. Med. Bull. **40**, 36-41
- SMITH, J.T. und C.S. LEWIN (1993)  
Mechanisms of antimicrobial resistance and implications for epidemiology.  
Vet. Microbiol. **35**, 233-242
- SMITH, H.W. und J.F. TUCKER (1975)  
The effect of antibiotic therapy on the fecal excretion of *Salmonella* Typhimurium by experimental infected chickens.  
J. Hyg. **72**, 349-354
- SMITH, H.W. und J.F. TUCKER (1978)  
The effect of antimicrobial feed additives on the colonization of the alimentary tract of chickens by *Salmonella* Typhimurium.  
J. Hyg. **80**, 217-237
- SON R., A. ANSARY, I. SALMAH und A. MAZNAH (1995)  
Survey of plasmids and resistance factors among veterinary isolates of *Salmonella* Enteritidis in Malaysia.  
World Journal of Microbiology und Biotechnology **11**, 315-318
- SPEER, B.S., N.B. SHOEMAKER und A.A. SALYERS (1992)  
Bacterial resistance to Tetracyclin: Mechanisms, transfer, and clinical significance.  
Clin. Microbiol. Rev., **5** 387-399
- STANLEY, J., C.S. JONES und E.J. THRELFALL (1991)  
Evolutionary lines among *Salmonella* Enteritidis phage types are identified by insertion sequence IS200 distribution.  
FEMS Microbiol. Lett. **82**, 83-90
- STANLEY, J., A.P. BURNENS, E.J. THRELFALL, N. CHOWDRY und M. GOLDSWORTHY (1992a)  
Genetic relationships among strains of *Salmonella* Enteritidis in a national epidemic in Switzerland.  
Epidemiol. Infect. **108**, 213-220

- STANLEY, J., M. GOLDSWORTHY und E.J. THRELFALL (1992b)  
Molecular phylogenetic typing of pandemic isolates of *Salmonella* Enteritidis.  
FEMS Microbiol. Lett. **90**, 153-160
- STANLEY, J. und N. BAQUAR (1994)  
Phylogenetics of *Salmonella* Enteritidis.  
Int. J Food Microbiol. **21**, 79-87
- STANLEY, J. und N. SAUNDERS (1996)  
DNA insertion sequences and the molecular epidemiology of *Salmonella* and *Mycobacterium*.  
J. Med. Microbiol. **45**, 236-251
- STEVENS, A.M., N.B. SHOEMAKER, L.Y. LI und A.A. SALYERS (1993)  
Tetracycline regulation of genes on *Bacteroides* conjugative transposons.  
J. Bacteriol. **175**, 6134-6141
- STREY, A., S. BALDAUF, W. LAUE und H. TROLLDENIER (1986)  
Effektiver Einsatz von Tierarzneimitteln unter besonderer Berücksichtigung der Rückstandsfreiheit tierischer Lebensmittel.  
Mh. Vet.-Med. **41**, 840-844
- STUART, E.E., R.D. KEENUM und H.W. BRUINS (1963)  
Experimental studies on an isolate of *Salmonella* Gallinarum apparently resistant to furazolidone.  
Av. Dis. **7**, 294-303
- SUMMERS, A.O., J. WIREMAN, M.J. VIMY, F.L. LORSCJEIDER, B. MARSHALL, S.B. LEVY, S. BENNET und L. BILLARD (1993)  
Mercury released from dental "silver" fillings provokes an increase in mercury- and antibiotic resistant bacteria in oral and intestinal floras of primates.  
Antimicrob. Agents Chemother. **37**, 825-834
- SUZUKI, S. (1994)  
Pathogenicity of *Salmonella* Enteritidis in poultry.  
Int. J Food Microbiol. **21**, 89-105
- TACKET, C.O., L.B. DOMINGUEZ, J. FISHER und M. L. COHEN (1985)  
An outbreak of multiple-drug-resistant *Salmonella* Enteritidis from raw milk.  
Bundesgesundhbl. **32**, 160-162
- TASSIOS, P.T., A. MARKOGIANNAKIS, A.C. VATOPOULOS, E. KATSANIKOU, E.N. VELONAKIS, J. KOUREAKREMASTINOU und N.J. LEGAKIS (1997)  
Molecular epidemiology of antibiotic resistance of *Salmonella* Enteritidis during a 7 year period in Greece.  
J. Clin. Microbiol. **35**, 1316-1321
- TAYLOR, D.N., I.K. WACHSMUTH, Y. SHANKGUAM, E.V. SCHMIDT, T.J. BARRETT, J.S. SCHRADER, C.S. SCHERACH, H.B. MCGEE, R.A. FELDMAN und D.J. BRENNER (1982)  
Salmonellosis associated with marijuana: a multistate outbreak traced by plasmid fingerprinting.  
N. Engl. J. Med. **307**, 1249-1253
- TELZAK, E.E., L.D. BUDNICK, M.S. ZWEIG GREENBERG, S. BLUM, M. SHAYEGANI, C.E. BENSON und S. SCHULTZ (1990)  
A nosocomial outbreak of *Salmonella* Enteritidis infection due to the consumption of raw eggs.  
N. Engl. J. Med. **323**, 394-397

- TENOVER, F.C. (1985)  
Plasmid Fingerprinting: A tool for bacterial strain identification and surveillance of nosocomial and community-acquired infections.  
*Clin. Lab. Med.* **5**, 413-436
- TERAKADO, N., T. OHYA, H. UEDA und Y. ISAYAMA und K. OHMAE (1980)  
A survey on drug resistance and R plasmids in *Salmonella* isolated from domestic Animals in Japan.  
*Jpn. J. Vet. Sci.* **42**, 543-550
- THE MERCK VETERINARY MANUAL (1986)  
A handbook of diagnosis, therapy, and disease prevention and control for the veterinarian.  
6. Auflage, Merck und Co., Inc. Rahway, N.J., USA 1986 S. 1547
- THOMPSON, R., S.G. HUGHES und P. BRODA (1974)  
Plasmid identification using specific endonucleases.  
*Mol. Gen. Genet.* **133**, 141-149
- THRELFALL, E.J., L.R. WARD und R. BOWE (1978)  
Spread of multiresistant strains of *Salmonella* Typhimurium phage types 204 and 193 in Britain.  
*Br. Med. J* **ii** 997
- THRELFALL, E.J., L.R. WARD, A.S. ASHLEY und R. BOWE (1980)  
Plasmid-encoded trimethoprim resistance in multiresistant epidemic *Salmonella* Typhimurium phage types 204 and 193 in Britain.  
*Br. Med. J* **ii**, 1210-1211
- THRELFALL, E.J., L.R. WARD, J.L. FERGUSON und B. ROWE (1985)  
The increasing incidence of resistance to gentamicin and related aminoglycosides in *Salmonella* Typhimurium PT 204c in England Wales and Scotland.  
*Vet. Rec.* **117**, 355-357
- THRELFALL, E.J., B. ROWE, J.L. FERGUSON und L.R. WARD (1986)  
Characterization of plasmids conferring resistance to gentamicin and apramycin in strains of *Salmonella* Typhimurium phage type 204c isolated in Britain.  
*J. Hyg. Camb.* **97**, 419-426
- THRELFALL, E.J., D. BROWN, B. ROWE und L.R. WARD (1989a)  
Multiple drug-resistant strains of *Salmonella* Typhimurium in poultry.  
*Vet. Rec.* **124**, 538
- THRELFALL, E.J., B. ROWE und L.R. WARD (1989b)  
Subdivision of *Salmonella* Enteritidis phage types by plasmid profile typing.  
*Epidem. Inf.* **102**, 459-465
- THRELFALL, E.J., D. BROWN, B. ROWE und L.R. WARD (1990)  
Occurrence of *S. Typhimurium* DT204c in poultry in England and Wales.  
*Vet. Rec.* **127**, 234
- THRELFALL, E.J. und J.A. FROST (1990)  
The identification, typing and fingerprinting of *Salmonella*: laboratory aspects and epidemiological applications.  
*J. Appl. Bacteriol.* **68**, 5-16
- THRELFALL, E.J. (1992)  
Antibiotics and the selection of food-borne pathogens.  
*J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.* **73**, 96S-102S

- THRELFALL, E.J., M.L.M. HALL, L.R. WARD und B. ROWE (1992)  
Plasmidprofiles demonstrate that an upsurge in *Salmonella* Berta in humans in England and Wales is associated with imported poultry meat.  
Eur. J. Epidem. **8**, 27-33
- THRELFALL, E.J., B. ROWE und L.R. WARD (1993)  
A comparison of multiple drug resistance in salmonellas from humans and food animals in England and Wales, 1981 and 1990  
Epidem. Inf. **111**, 189-197
- THRELFALL, E.J. und H. CHART (1993)  
Interrelationships between strains of *Salmonella* Enteritidis.  
Epidemiol. Infect. **111**, 1-8
- THRELFALL, E.J., J.A. FROST, L.R. WARD und B. ROWE (1994)  
Epidemic in cattle and humans of *Salmonella* Typhimurium DT104 with chromosomally integrated multiple drug resistance.  
Vet. Rec. **134**, 577
- THRELFALL, E.J., M.D. HAMPTON, H. CHART und B. ROWE (1994a)  
Use of plasmid profile typing for surveillance of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 from humans, poultry and eggs.  
Epidem. Infec. **112**, 25-31
- THRELFALL, E.J., M.D. HAMPTON, H. CHART und B. ROWE (1994b)  
Identification of a conjugative plasmid carrying antibiotic resistance and *Salmonella* plasmid virulence (*spv*) genes in epidemic strains of *Salmonella* Typhimurium phage type 193.  
Letters Appl. Microbiol. **18**, 82-85
- THRELFALL, E.J., L.R. WARD, J.A. SKINNER und B. ROWE (1997)  
Increase in multiple antibiotic resistance in Nontyphoidal Salmonellas from humans in England and Wales : A comparison of data for 1994 and 1996.  
Microb. Drug Res. Vol. **3**, Nr.3, 263-266 (in press)
- TIMMIS, K.N., M.I. GONZALEZ-CARRERO, T. SEKIZAKI und F. ROJO (1986)  
Biological activities specified by antibiotic resistance plasmids.  
J. Antimicrob. Chemother., **18**, Suppl.C, 1-12
- TOMPKINS, L.S., N. TROUP, A. LABIGNE-ROUSSEL und M.L. COHEN (1986)  
Cloned random chromosomal sequences as probes to identify salmonella species.  
J. Inf. Dis. **154**, 156-162
- TROLLDENIER, H. (1992)  
Resistenzauswertung veterinärmedizinisch bedeutsamer Erreger.  
VetMed Hefte **3**, 8
- TSCHÄPE, H. und H. KÜHN (1995)  
Einleitung.  
In: Kühn, H., H. Tschäpe (Hrsg.)  
Salmonellosen des Menschen: Epidemiologische und ätiologische Aspekte  
Medizin Verlag GmbH München, 1996 (RKI-Schriften **3/95**) S. 6
- TSCHÄPE, H., A. LIESEGANG, B. GERICKE, R. PRAGER, W. RABSCH und R. HELMUTH (1997)  
The up and down of *S. Enteritidis* in Germany.  
IMBEM IV: Fourth International Meeting on Bacterial Epidemiological Markers, Elsinore, Denmark, p. 19, 10-13. September 1997

- UNGEMACH, F.R. (1996)  
Safety aspects of growth promoters used as feed additives.  
European Commission, Scientific conference on growth promotion in meat production -  
Proceedings, Luxembourg: Office for official publications of the European Communities, 1996  
Directorate-General VI, Agriculture; 602 pp; **XVIII**, 333-346
- USERA, M.A., T. POPOVIC, A. BOPP und N.A. STOCKBINE (1994)  
Molecular subtyping of *Salmonella* Enteritidis phage type 8 strains from the United States.  
J. Clin. Microbiol. **32**, 194-198
- VAHABOGLU, H., S. DODANLI, C. EROGLU, R. ÖZTÜRK, G. SOYLETIR, I. YILDIRIM und V.  
AVKAN (1996)  
Characterization of multiple-antibiotic-resistant *Salmonella* Typhimurium strains: Molecular  
epidemiology of PER-1-producing isolates and evidence for nosocomial plasmid exchange by  
a clone.  
J. Clin. Microbiol. **34**, 2942-2946
- VALENTINE, P., N.B. SHOEMAKER und A.A. SALYERS (1988)  
Mobilization of *Bacteroides* plasmids by *Bacteroides* conjugal elements.  
J. Bacteriol. **170**, 1319-1324
- VAN De GIESSEN, A.W., J.B. DURFENNE, W.S. RITMEESTER, P.A.T.A. BERKERS, W.J. VAN  
LEEUVEN und S.H.W. NOTERMANS (1992)  
The identification of *Salmonella* Enteritidis-infected poultry flocks associated with an outbreak  
of human salmonellosis  
Epidemiol. Infect. **109**, 405-411
- VATOPOULOS, A.C., E. MAINAS, E. BALIS, E.J. THRELFALL, M. KANELOPOULOU, V.  
KALAPOTHAKI, H. MALMOU-LADA und N.J. LEGAKIS (1994)  
Molecular epidemiology of ampicillin-resistant clinical isolates of *Salmonella* Enteritidis.  
J. Clin. Microbiol. **32**, 1322-1325
- VIELITZ, E. (1993)  
*Salmonella* Enteritidis: Auftreten, Bedeutung und Kontrollmaßnahmen.  
Arch. Geflügelk. **57**, 193-198
- VIEU, J.F., S. JEANJEAN, B. TOURNIER und B. KLEIN (1990)  
Application d'une série unique de bactériophage à la lysotypie de *Salmonella* sérovar Dublin  
et de *Salmonella* sérovar Enteritidis.  
Méd. Malad. Infec. **20**, 229-33
- VISEK, W.J. (1978)  
The mode of growth promotion by antibiotics.  
J. Anim. Sci. **46**, 1447-1468
- WALL, P.G., D. MORGAN, K. LAMDEN, M. GRIFFIN, E.J. THRELFALL, L.R. WARD und B. ROWE (1995)  
Transmission of multi-resistant strains of *Salmonella* Typhimurium from cattle to man.  
Vet. Rec. **136**, 591-592
- WANDERSMAN, C. (1996)  
Secretion across the bacterial outer membrane.  
In: Neidhardt F.C., R. Curtis III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik,  
W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, H.E. Umbarger 2nd ed. (Hrsg.)  
*Escherichia coli* and *Salmonella* - Cellular and Molecular Biology  
American Society for Microbiology (ASM) Press, S. 955-966
- WARD, L.R., J.D.H. DE SA und B. ROWE (1987)  
A phage-typing scheme for *Salmonella* Enteritidis.  
Epidem. Inf. **99**, 291-294

- WARD, L.R., E.J. THRELFALL und B. ROWE (1990)  
Multiple drug resistance in *Salmonellae* in England and Wales UK. A comparison between 1981 and 1988.  
J. Clin. Pathol. **43** (7), 563-566
- WATANABE, T. (1963)  
Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria.  
Bacteriol. Rev. **27**, 87-115
- WEIDE-BOTJES, M., B. KOBE, E. HÜLLER und S. SCHWARZ (1997)  
Molecular subtyping of isolates of predominant *Salmonella* Enteritidis Phage types.  
*Salmonella* and Salmonellosis '97; Proceedings May 20/21/22, 1997 Ploufragan France, 41-44
- WHO (1997)  
The medical impact of the use of antimicrobials in food animals  
Report of a WHO meeting Berlin, Germany 13-17- Oktober 1997
- WIDJOJOATMODJO, M.N., A.C. FLUIT, R. TORENSMA, B.H.I. KELLER und J. VERHOEF (1991)  
Evaluation of a magnetic immuno PCR assay for rapid detection of salmonella.  
Eur. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **10**, 935-938
- WILLIAMS, J.G.K., A.R. KUBELIK, K.J.LIVAK, J.A., RAFALSKI und S.V. TINGEY (1990)  
DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers useful as genetic markers.  
Nucl. Acids Res. **18**, 6531-6535
- WILLIAMS-SMITH, H. (1954)  
The use of furazolidone in the treatment of experimental fowel typhoid.  
Vet. Rec. **66**, 215
- WILLIAMS-SMITH, H. und S. HALLS (1966)  
Observations on infective drug resistance in Britain.  
Vet. Rec. **78**, 415-420
- WILSON, J.E. (1955)  
The use of furazolidone in the treatment of infections of day old chicks.  
Vet. Rec. **67**, 849
- WITTE, W. (1997)  
Impact of antimicrobial use in animal feeding on resistance of bacterial pathogens in humans.  
in: Antibiotic Resistance: Origins, Evolution, Selection and Spread **61-71**  
aus der Serie: Ciba Foundation Symposia 207 1997
- WOODFORD, N., A.P. JOHNSON, D. MORRISON und D.C.E SPELLER (1995)  
Current perspectives on glycopeptide resistance.  
Clin. Microbiol. Rev. **8**, 585-615
- WRAY, C., I. MCLAREN, N.M. PARKINSON und Y. BEEDELL (1987)  
Differentiation of *Salmonella* Typhimurium DT204c by plasmid profile and biotyping.  
Vet. Rec. **121**, 514-516
- WRAY, C., I. MCLAREN, R. WISE und L.J.V. PIDDOCK (1990a)  
Nalidixic-acid resistant *Salmonellae*.  
Vet Rec. **126**, 489
- WRAY, C., N. TODD, I. MCLAREN, Y. BEEDELL und B. ROWE (1990b)  
The epidemiology of *Salmonella* infection of calves: the role of the dealers ?  
Epidemiol. Infect. **105**, 295-305

WRAY, C., I.M. MCLAREN und Y.E. BEEDELL (1993)

Bacterial resistance monitoring of Salmonellas isolated from animals, national experience of surveillance in the United Kingdom.  
Vet. Microbiol. **35**, 313-319

WRAY, C. (1997)

Development of antibiotic resistance. A Vet's tale.  
J Med. Microbiol. **46**, 26-28

YAMAGUCHI, A., H. OHMORI, M. KANEKO-OKDERA, T. NOMURA und T. SAWAI (1991)

$\Delta$ pH-dependent accumulation of tetracyclin in *Escherchia coli*.  
Antimicrob. Agents Chemother. **35**, 53-56

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Kroker danke ich für die Übernahme der Dissertation, für die unverzügliche Bereitschaft zur kritischen Durchsicht des Manuskriptes sowie für die freundliche Unterstützung.

Herrn Dr. R. Helmuth danke ich für die Überlassung des Themas, für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und für die jederzeit gewährte intensive und fachgerechte wissenschaftliche Betreuung. Ferner für sein persönliches Engagement, mit dem er es stets vermochte interessante und lebendige Diskussionen zu führen.

Frau Bunge, Herrn Hoog, Frau Steinbeck, Frau Berendonk danke ich besonders für die unentbehrliche Hilfe im Labor, für den herzlichen Umgang und für die moralische Unterstützung.

Herrn Dr. A. Schroeter danke ich für die differenzierten und inhaltlichen Anregungen sowie für die engagiert durchgeführte Phagentypisierung.

An dieser Stelle sei auch herzlich Herrn Dr. W. Rabsch und seinen Mitarbeitern für die ebenso engagiert durchgeführte Phagentypisierung gedankt.

Herrn Dr. M. Hartung danke ich für die computer-fachliche Hilfe, insbesondere bei der Anfertigung der molekularbiologischen Grafiken.

Weiterhin gilt mein Dank Frau Dr. G. Arndt aus dem Institut für Biometrie für die statistische Beratung der Ergebnisse.

Frau Moser danke ich für die durchgeführten DIMDI-Recherchen.

Herrn Dr. H. Trolldenier, Herrn Dr. Ruffle und Frau Dr. Witthuhn danke ich für die Bereitstellung ausgewählter Literatur.

Mein persönlicher Dank gilt vor allem Frau Dr. Käsbohrer, die mit ihrer außergewöhnlichen Persönlichkeit und Geduld mir stets zur Seite stand, und deren Unterstützung einen großen Teil zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

Meinen Freunden und vor allem Herrn E. Kraas danke ich für die Anteilnahme und das mühevollen Korrekturlesen des Manuskriptes.

## LEBENS LAUF

geboren am 08. Februar 1966 in Plattsburgh / N.Y. / USA  
Eltern Dr. Edwin Fred Flindell, Ingrid Flindell, geb. Dieckmann  
Juni 1971 Übersiedlung nach Berlin

### **Schulbildung**

ab 1972 3. Grundschule auf dem Tempelhofer Feld  
ab 1978 Eckener-Gymnasium Berlin-Tempelhof  
Dez. 1984 Abitur

### **Studium**

Sept. 1985-1991 Studium der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin  
1993 Erlangung der deutschen Staatsangehörigkeit sowie Erwerb der  
Approbation

### **Weiterer Werdegang**

1993-1994 Hospitantin in einer Berliner Kleintierpraxis  
seit Mai 1995 Beginn der Dissertation im  
Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und  
Veterinärmedizin (BgVV), Fachbereich "Diagnostik und Epidemiologie",  
Fachgebiet "Molekularbiologie und Veterinärmedizinische Salmonella  
Zentrale"  
seit April 1997 Mitarbeit im Gemeinschaftlichen Referenzlabor für die Epidemiologie  
der Zoonosen