

Aus dem  
Landeslabor Berlin-Brandenburg  
Institut für Lebensmittel, Arzneimittel, Tierseuchen und Umwelt

und dem  
Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen  
des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Untersuchungen zum Vorkommen von *Helicococcus ovis* bei der  
Endokarditis des Rindes sowie zur phänotypischen Charakterisierung  
und Empfindlichkeitsprüfung der Isolate

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

vorgelegt von  
**Peter Kutzer**  
Tierarzt aus Frankfurt (Oder)

Berlin 2009

Journal-Nr.: 3288

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Lothar H. Wieler  
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Achim Gruber  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Rudolf Staufenberg

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*  
endocarditis, cattle, Helcococcus ovis, isolation, identification, drug resistance

Tag der Promotion: 25. Mai 2009

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

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

ISBN: 978-3-86664-607-0

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2009**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© mensch und buch verlag 2009

choriner str. 85 - 10119 berlin

verlag@menschundbuch.de – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

*für Baigal  
in Liebe und Dankbarkeit*



## Abkürzungen

$\bar{x}$	arithmetisches Mittel
% (vol/vol)	Volumen-Prozent
% (wt/vol)	Masse-pro-Volumen-Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
Abb.	Abbildung
aq. bidest.	zweifach destilliertes Wasser
aq. dest.	destilliertes Wasser
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CCUG	Culture Collection, University of Göteborg
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Nukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alii
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
griech.	griechisch
h	Stunde
HCl	Hydrochlorid
i. d. R.	in der Regel
i. S.	im Sinne
E	Einheit
IE	Internationale Einheit
kbE	koloniebildende Einheit
l	Liter
LLBB	Landeslabor Berlin-Brandenburg
Lsg.	Lösung
max.	maximal
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid

<b>MHK</b>	Minimale Hemm-Konzentration
<b>MIC</b>	Minimal Inhibitory Concentration
<b>min</b>	Minute
<b>ml</b>	Milliliter
<b>mM</b>	millimolar
<b>mm</b>	Millimeter
<b>mod.</b>	modifiziert
<b>n</b>	Anzahl
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid (Kochsalz)
<b>NCCLS</b>	National Committee for Clinical Laboratory Standards
<b>o. g.</b>	oben genannt
<b>PCR</b>	Polymerasekettenreaktion
<b>pmol</b>	Pikomol
<b>rRNA</b>	ribosomale Ribonukleinsäure
<b>s</b>	Sekunde
<b>sog.</b>	sogenannt
<b>sp.</b>	Spezies (Einzahl)
<b>spp.</b>	Spezies (Mehrzahl)
<b>ssp.</b>	Subspezies
<b>T</b>	absolute Temperatur
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>u. U.</b>	unter Umständen
<b>z. T.</b>	zum Teil
<b>z. B.</b>	zum Beispiel

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	5
2	Schrifttum.....	6
2.1	Gattung <i>Helcococcus</i> .....	6
2.1.1	Taxonomie .....	6
2.1.2	Morphologie und Wachstumseigenschaften .....	6
2.1.3	Biochemische Leistungen .....	7
2.1.4	Klinische Bedeutung und Virulenzfaktoren .....	8
2.1.5	Empfindlichkeitsprüfung und bekannte Resistenzen .....	9
2.2	Infektiöse Endokarditis des Rindes.....	9
2.2.1	Ätiologie und Pathogenese .....	9
2.2.2	Klinische Symptomatik und Diagnose .....	11
2.2.3	Therapie und Prognose.....	11
3	Material .....	13
3.1	Art, Anzahl und Herkunft der Proben.....	13
3.2	Kontrollstämmе .....	13
3.3	Geräte.....	14
3.4	Nährmedien, Chemikalien und Lösungen für die Mikrobiologie .....	15
3.4.1	Nährmedien .....	15
3.4.2	Chemikalien und Lösungen.....	16
3.5	Diagnostika und Testkits für die Mikrobiologie.....	16
3.6	Aufarbeitungskits und Lösungen für die Molekularbiologie .....	17
3.7	Oligonukleotid-Primer für die Molekularbiologie.....	17
3.8	MHK-Mikrotiterplatten.....	18
4	Methoden .....	21
4.1	Pathologisch-anatomische Untersuchung .....	21
4.2	Primärkultur.....	21
4.3	Präsumtive Erregeridentifizierung.....	22

4.4	Lagerung und Rekultivierung von <i>Helcococcus ovis</i> -Isolaten .....	23
4.5	Ermittlung von Tierdaten und Herkunftsbeständen .....	25
4.6	16S rRNA-Gen Sequenzanalyse von <i>Helcococcus ovis</i> -verdächtigen Isolaten .....	25
4.6.1	DNA-Extraktion .....	25
4.6.2	PCR-Amplifikation des 16S rRNA-Gens und Sequenzanalyse .....	25
4.7	Phänotypische Charakterisierung von <i>Helcococcus ovis</i> -Isolaten .....	26
4.7.1	Kolonie- und Zellmorphologie.....	26
4.7.2	Prüfung der Ammen- und Pyridoxal-Abhängigkeit .....	27
4.7.3	Biochemische Leistungen .....	27
4.7.4	Prüfung weiterer Eigenschaften .....	28
4.8	Empfindlichkeitsprüfung von <i>Helcococcus ovis</i> -Isolaten.....	28
4.8.1	Wahl der Methodik .....	28
4.8.2	Standardisierung des Inokulums .....	28
4.8.3	Bestimmung der MHK .....	29
4.8.4	Prüfung auf induzierbare Clindamycin-Resistenz („D-Zonen“-Test).....	30
4.9	Entwicklung eines <i>Helcococcus</i> -Elektivagars.....	30
4.9.1	Rezeptur des Mediums .....	30
4.9.2	Evaluierung des Mediums .....	30
5	Ergebnisse.....	32
5.1	Pathologisch-anatomische Untersuchung .....	32
5.2	Primärkultur und präsumtive Erregeridentifizierung .....	33
5.3	Ermittlung von Tierdaten und Herkunftsbeständen.....	33
5.4	16S rRNA-Gen Sequenzanalyse von <i>Helcococcus ovis</i> -verdächtigen Isolaten .....	34
5.5	Phänotypische Charakterisierung von <i>Helcococcus ovis</i> -Isolaten .....	36
5.5.1	Kolonie- und Zellmorphologie.....	36
5.5.2	Prüfung der Ammen- und Pyridoxal-Abhängigkeit .....	37
5.5.3	Biochemische Leistungen .....	38
5.5.3.1	Ergebnisse mit API-Systemen.....	38
5.5.3.2	Ergebnisse mit Rosco Diatabs .....	39

5.5.4	Prüfung weiterer Eigenschaften .....	40
5.6	Empfindlichkeitsprüfung von <i>Helcococcus ovis</i> -Isolaten .....	44
5.6.1	Standardisierung des Inokulums .....	44
5.6.2	Bestimmung der MHK .....	44
5.6.3	Prüfung auf induzierbare Clindamycin-Resistenz („D-Zonen“-Test).....	47
5.7	Entwicklung eines <i>Helcococcus</i> -Elektivagars .....	47
5.7.1	Ermittlung des absoluten und relativen Wachstumsindex.....	47
5.7.2	Ermittlung von Sensitivität und Spezifität.....	49
5.7.3	Beurteilung koloniemorphologischer Eigenschaften .....	49
6	Diskussion.....	51
6.1	Prävalenz von <i>Helcococcus ovis</i> bei der infektiösen Endokarditis des Rindes.....	51
6.2	Phänotypische Charakterisierung von <i>Helcococcus ovis</i> -Isolaten .....	52
6.3	Empfindlichkeitsprüfung von <i>Helcococcus ovis</i> -Isolaten .....	55
6.4	Entwicklung eines selektiven Mediums für den <i>Helcococcus ovis</i> -Nachweis .....	58
6.5	Schlussfolgerungen und Ausblick.....	59
7	Zusammenfassung.....	61
8	Summary.....	63
9	Referenzen.....	65



## 1 Einleitung

In der Humanmedizin gewinnen nicht zu den Streptokokken oder Enterokokken zählende aerobe, Katalase-negative, Gram-positive Kokken als opportunistische Erreger von Infektionskrankungen insbesondere bei immunsupprimierten, chronisch kranken und/oder drogenabhängigen Patienten zunehmend an Bedeutung. So wurden Vertreter von wenigstens 15 Gattungen dieser taxonomisch heterogenen Erregergruppe aus menschlichen Probenmaterialien isoliert [80]. Hierzu zählen Spezies der Vancomycin-resistenten Genera *Leuconostoc*, *Pediococcus* und *Weissella*, der Pyridoxal-abhängigen Genera *Abiotrophia* und *Granulicatella* sowie der Genera *Aerococcus*, *Dolosicoccus*, *Dolosigranulum*, *Facklamia*, *Gemella*, *Globicatella*, *Helcococcus*, *Ignavigranum*, *Lactococcus* und *Vagococcus* [29; 30; 80; 81]. Relativ häufig wird in diesem Zusammenhang über Herzklappenentzündungen berichtet, wobei *Abiotrophia defectiva* und *Granulicatella* spp. mit zusammen 4 – 6 % sowie *Gemella* spp. mit ca. 3 % aller Endokarditis-Isolate besondere Beachtung verdienen [6; 81]. Weitere Fallstudien betreffen Septikämien, Augen-, Wund- und Harnwegsinfektionen sowie Osteomyelitiden.

Für die Veterinärmedizin sind Infektionen mit Vertretern o. g. Gattungen nur in Einzelfällen beschrieben und betreffen im Wesentlichen: *Globicatella sulfidifaciens*, isoliert aus eitrigen Lungen- und Gelenkinfektionen bei Rind, Schaf und Schwein; *Globicatella sanguinis* als Erreger von Meningoenzephalitiden bei Lämmern; *Helcococcus ovis*, nachgewiesen aus verschiedenen Infektionsgeschehen bei Schaf, Rind und Pferd; *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* als Verursacher septikämischer Erkrankungen bei Wassergeflügel; *Lactococcus garvieae* und *Vagococcus salmoninarum* als anerkannte Fischpathogene sowie *Weissella confusa* als Sepsiserreger bei einer Monameerkatze (*Cercopithecus mona*) [34; 79; 90; 91; 92]. Weitere Fallberichte beziehen sich auf *Gemella* spp. bei Hund und Kaninchen, *Vagococcus* spp. bei Fischotter, Robbe und Schweinswal sowie *Eremococcus coleocola* beim Pferd. Allerdings wurden diese Isolate entweder von klinisch unauffälligen Tieren oder als Bestandteil einer polymikrobiellen Flora gewonnen und waren somit von zweifelhafter pathogener Bedeutung [22; 23; 41; 42; 50].

Anlass für diese Arbeit war der zufällige Nachweis von *Helcococcus ovis* aus einer bovinen Endokarditis. Ziele der folgenden Untersuchungen waren: 1.) die Ermittlung der Prävalenz von *H. ovis* bei der infektiösen Endokarditis des Rindes anhand einer größeren Stichprobe, 2.) die phänotypische Charakterisierung von *H. ovis*-Isolaten und der Vorschlag eines praktikablen Identifizierungsschemas für die mikrobiologische Diagnostik, 3.) die Empfindlichkeitsprüfung von *H. ovis*-Isolaten und die Darstellung potentieller Antibiotika-Resistenzen sowie 4.) die Entwicklung eines selektiven Mediums für den Nachweis von *H. ovis* aus Probenmaterialien mit umfangreicher Begleitflora.

## 2 Schrifttum

### 2.1 Gattung *Helcococcus*

#### 2.1.1 Taxonomie

Die Gattung *Helcococcus* (griech.: *helkos*, Wunde; *coccus*, Kugel, Beere; *Helcococcus*, in Wunden vorkommende Kugel) wurde 1993 durch COLLINS et al. [18] eingeführt. Taxonomisch ist sie dem Stamm *Firmicutes*, Klasse *Clostridia*, Ordnung *Clostridiales*, Familie *Peptostreptococcaceae* zugeordnet [33] und beinhaltet die Spezies *Helcococcus kunzii* [18], *Helcococcus ovis* [20] sowie *Helcococcus sueciensis* [19]. Die auf Grundlage eines Isolates aus einer infizierten Knieprothese postulierte Art „*Helcococcus pyogenes*“ [64] erlangte bis dato keinen offiziellen Speziesrang.

#### 2.1.2 Morphologie und Wachstumseigenschaften

*Helcococcus* spp. sind Gram-positive, fakultativ anaerobe, unbewegliche Kokken [18; 19; 20]. COLLINS et al. [18; 19; 20] beschreiben die Zelllagerung als einzeln, in Paaren oder kurzen Ketten, die Mehrheit der Autoren beobachtete dagegen Paare und Haufen [10; 11; 53; 67; 68; 71; 78].

*H. kunzii* wächst auf bluthaltigen Agarmedien nach 24 h Inkubation bei 35 – 36 °C in Form stecknadelkopfgroßer, unpigmentierter Kolonien. Die Atmosphäre (aerob, CO<sub>2</sub>-angereichert, anaerob) hat keinen Einfluss auf die Wachstumsintensität [18; 67]. Hinsichtlich der Hämolyseeigenschaften gibt es unterschiedliche Angaben. COLLINS et al. [18] beschreiben *H. kunzii* als nicht-hämolisierend während andere Autoren von  $\alpha$ -Hämolyse nach 24 h [53] bzw. 48 h Inkubation [67; 71; 96] berichten. *H. kunzii* gilt als lipophil, das Wachstum wurde durch den Zusatz von 1 % Pferdeserum oder 0,1 % Tween 80 deutlich gefördert [11; 18]. Diese Eigenschaft konnte allerdings nicht für jedes Isolat bestätigt werden [71].

*H. ovis* bildet ebenfalls stecknadelkopfgroße, unpigmentierte Kolonien auf Blutagar. Ähnlich *H. kunzii* wurde *H. ovis* ursprünglich als nicht-hämolisierend charakterisiert [20], später aber von  $\alpha$ -Hämolyse nach 72 h Inkubation berichtet [68; 78]. Zwei Isolate, darunter der Referenzstamm *H. ovis* CCUG 39041, zeigten initiales Wachstum nur in der Peripherie eines *Staphylococcus*-Stammes, verloren diese Eigenschaft aber nach wiederholter Subkultur [20; 78]. Ein Isolat wurde als lipophil beschrieben mit verstärktem Wachstum unter Einfluss von 0,1 % Tween 80 [78].

*H. sueciensis* wurde durch anaerobe Inkubation deutlich im Wachstum gefördert und bildete nach 48 h stecknadelkopfgroße, graue, nicht-hämolisierende Kolonien [19].

### 2.1.3 Biochemische Leistungen

*Helcococcus* spp. sind Katalase-negativ, reduzieren kein Nitrat, produzieren keine Urease und weisen keine proteolytische Aktivität (Gelatineverflüssigung) auf [18; 19; 20]. Die Prüfung weiterer biochemischer Leistungen erfolgte mittels konventioneller Tests [11; 18; 19; 67] sowie verschiedener kommerzieller Identifizierungssysteme wie API 20 Strep [11; 18; 36; 67; 78; 96], API rapid ID 32 Strep [19; 20; 71], API ZYM [20], VITEK 2 GP [53] (alle bioMérieux, Marcy-l'Étoile) bzw. vereinzelt Rosco Diatabs (Rosco, Taastrup) [11; 71]. In einem Fallbericht wurde das Testsystem nicht spezifiziert [68].

Bei Verwendung des API 20 Strep wurde für *H. kunzii* übereinstimmend das Profil 4100413 erzielt [11; 18; 36; 67; 96]. Da *Helcococcus* spp. in der Datenbank der Identifizierungssoftware (apiweb, bioMérieux) nicht hinterlegt sind, lautet das entsprechende Ergebnis „Sehr gute Identifizierung auf Genusebene, *Aerococcus viridans*“. Das mit diesem System getestete *H. ovis*-Isolat zeigte das Profil 0440000 mit dem Identifizierungsergebnis „Sehr gute Identifizierung, *Granulicatella adiacens*“ [78]. Die diesen Profilen zugrunde liegenden biochemischen Leistungen sind in Tab. 1 dargestellt.

**Tab. 1: Biochemische Leistungen von *Helcococcus* spp. im API 20 Strep**

Biochemische Leistung <sup>1</sup>	<i>H. kunzii</i> Profil 4100413	<i>H. ovis</i> Profil 0440000
Acetoin (Voges-Proskauer)	–	–
Hippurat-Hydrolyse	–	–
Esculin	+	–
Pyroglutaminsäure-Arylamidase	+	–
α-Galactosidase	–	–
β-Glucuronidase	–	+
β-Galactosidase	–	–
Alkalische Phosphatase	–	–
Leucin Aminopeptidase	–	+
Arginin Dihydrolase	–	–
Ribose	–	–
Arabinose	–	–
Mannitol	–	–
Sorbitol	–	–
Lactose	+	–
Trehalose	+	–
Inulin	–	–
Raffinose	–	–
Stärke	+	–
Glycogen	+	–

+ positive, – negative Reaktion; <sup>1</sup> Reihenfolge der Anordnung im Testkit

Ein auf dem API rapid ID 32 Strep beruhendes Schema zur Differenzierung aller Vertreter der Gattung *Helcococcus* wurde von COLLINS et al. [19] entwickelt (Tab. 2).

**Tab. 2: API rapid ID 32 Strep-Tests zur Differenzierung innerhalb der Gattung *Helcococcus* (nach COLLINS et al., 2004)**

Biochemische Leistung	<i>H. sueciensis</i>	<i>H. ovis</i>	<i>H. kunzii</i>
Lactose	+	–	+
Pullulan	–	–	V
Trehalose	+	–	+
Alkalische Phosphatase	+	+	–
β-Glucosidase	–	–	+
β-Glucuronidase	–	+	–
Pyroglutaminsäure-Arylamidase	–	–	+
N-Acetyl-β-Glucosaminidase	+	–	+

+, > 90 % der Isolate positiv; –, < 10 % der Isolate positiv; V, variabel

#### 2.1.4 Klinische Bedeutung und Virulenzfaktoren

*H. kunzii* gilt als Vertreter der Hautflora insbesondere der unteren Extremitäten [10; 36]. Patienten mit Diabetes mellitus und/oder vaskulären Störungen der Beine bzw. Füße scheinen häufiger besiedelt zu sein als Gesunde [36]. Folgerichtig wurden Infektionen unter Beteiligung von *H. kunzii* vornehmlich im Zusammenhang mit Geschwüren, Phlegmonen oder postoperativen Abszessen im Bereich dieser Körperregionen beschrieben [10; 18; 36; 53; 71]. Da *H. kunzii* aus den genannten Entzündungsprozessen nur selten in Reinkultur [71] sondern überwiegend als Bestandteil einer polymikrobiellen Flora isoliert wurde, erschien die pathogene Bedeutung oft zweifelhaft [10; 18; 36; 53].

Weitere Berichte über *H. kunzii*-assoziierte Infektionen betrafen Brustabszesse [10; 11; 18] und entzündete Atherome (Talgzysten) [10; 67], auch hier z. T. in Vergesellschaftung mit anderen Bakterienspezies wie obligaten Anaerobiern oder *Staphylococcus aureus* [10]. Septikämische *H. kunzii*-Infektionen mit lebensbedrohlichem Verlauf wurden bislang für zwei intravenös-drogenabhängige Patienten beschrieben [96].

Von *H. sueciensis* ist lediglich bekannt, dass dieses Bakterium aus Wundmaterial einer 83-jährigen Frau isoliert wurde [19]. Detailliertere klinische Angaben liegen hierzu nicht vor.

*H. ovis* wurde erstmalig bei Schafen nachgewiesen, zum einen aus Lunge, Leber und Milz eines adulten männlichen Tieres in Mischkultur mit *Arcanobacterium pyogenes*, zum anderen aus Milch eines Tieres mit milder Mastitissymptomatik, hier vergesellschaftet mit *S. aureus*. Die klinische Signifikanz der *H. ovis*-Isolate blieb in beiden Fällen unklar [20]. Später

folgten Berichte über die Beteiligung an pulmonalen Abszessen bei Rindern und einem Pferd [48; 78] sowie an bovinen Endokarditiden [56; 68].

Bezüglich Virulenzfaktoren von *Helcococcus* spp. gibt es nur sehr wenige Informationen. Für *H. kunzii* berichten STAVRI et al. [86] über ein Hämagglutinin-Lectin mit Spezifität für Lactose und N-Acetylglucosamin als potentielles Adhäsion.

### **2.1.5 Empfindlichkeitsprüfung und bekannte Resistenzen**

Empfindlichkeitsprüfungen von *H. kunzii*-Isolaten wurden aufgrund des unbefriedigenden Wachstums in Mueller-Hinton-Bouillon mit und ohne 3 – 5 % lysiertem Pferdeblut [10; 11] überwiegend im Agardiffusionsverfahren bzw. mittels Etest (AB Biodisk, Solna) durchgeführt [67; 71]. Einzelne Isolate wurden im Agardilutions- oder Bouillon-Makrodilutions-Verfahren getestet [11; 96]. Die Interpretation der Ergebnisse in den Kategorien „sensibel“, „intermediär“ oder „resistent“ erfolgte i. d. R. auf Grundlage der in den NCCLS (jetzt CLSI)-Dokumenten M7-A (Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard) bzw. M6-A (Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard) für Streptokokken festgelegten Kriterien [10; 11; 67; 71; 96].

Die geprüften *H. kunzii*-Isolate waren sensibel (MHK-Werte sofern angegeben) für Penicillin (0,032 – 0,94 µg/ml), Ampicillin bzw. Amoxicillin (0,25 µg/ml), Cefotaxim (0,032 – 0,5 µg/ml) sowie Vancomycin (0,5 – 0,75 µg/ml) [10; 11; 18; 53; 67; 71; 96] und überwiegend resistent gegen Erythromycin (> 2 – > 256 µg/ml), selten mit gleichzeitiger Clindamycin-Resistenz [11; 71; 96]. WOO et al. [96] konnten die Erythromycin-Resistenz eines Isolates auf ein *ermA*-Gen zurückführen, dessen Nukleotid-Sequenz 100 % Übereinstimmung mit dem *ermA*-Gen von *Streptococcus pyogenes* aufwies. Zehn auf ihre Ciprofloxacin-Empfindlichkeit getestete Isolate erwiesen sich als intermediär bzw. resistent (2 – 4 µg/ml) [10].

*H. ovis* ist ebenfalls Vancomycin-sensibel [20; 68; 78]. Ein Isolat wurde mittels Etest geprüft und war sensibel für Penicillin (< 0,016 µg/ml) und Clindamycin (0,125 µg/ml) sowie resistent gegen Metronidazol (> 256 µg/ml) [78].

## **2.2 Infektiöse Endokarditis des Rindes**

### **2.2.1 Ätiologie und Pathogenese**

Die infektiöse Endokarditis ist eine wirtschaftlich bedeutende Erkrankung adulter Rinder, insbesondere Kühen [26; 38; 60]. Die Angaben zur Prävalenz variieren zwischen 0,12 % in 60.000 Schlachtrindern [87] und 9 % in 340 Sektionsfällen [60].

Verursacht wird die bovine Endokarditis durch bakterielle Erreger, wobei in allen neueren Studien *A. pyogenes* (Basonym: *Corynebacterium pyogenes*) mit Nachweisraten um die 60 % deutlich dominierte [60; 62; 69; 83; 87]. Streptokokken wurden von SCHIELE et al. [83] aus sieben von 28 (25 %) entzündlich veränderten Herzklappen isoliert, waren in anderen Berichten aber von eher untergeordneter Bedeutung [60; 62]. Sporadische Nachweise erfolgten neben *H. ovis* (siehe 2.1.4) auch für Pasteurellen, *Mannheimia haemolytica*, *Escherichia coli*, *S. aureus* [60; 83] sowie *Corynebacterium pseudodiphthereticum* [9]. MAILLARD et al. [54] konnten in Untersuchungen an 22 veränderten Herzklappen mittels PCR und 16S rRNA-Gen Sequenzanalyse in zwei Fällen Infektionen durch *Bartonella bovis* feststellen.

Aufbauend auf Erkenntnissen aus der Humanmedizin wird in der Kleintiermedizin davon ausgegangen, dass die Entstehung einer vorwiegend aus Thrombozyten und Fibrin bestehenden „nicht-bakteriellen thrombotischen Vegetation“ (Non Bacterial Thrombotic Vegetation, NBTV) von zentraler Bedeutung für die Pathogenese der infektiösen Endokarditis ist [66; 95]. Die NBTV resultiert aus einer Schädigung des Klappenendothels in Turbulenzbereichen infolge kongenitaler oder erworbener Herzfehler. Bei bestehender Bakteriämie wird die NBTV von Mikroorganismen kolonisiert und wandelt sich zur „infizierten Vegetation“. In diesem Zusammenhang scheint Fibronectin, das von Endothelzellen aber auch Thrombozyten und Fibroblasten als Reaktion auf die Endothelirritation gebildet wird, für die Adhäsion der Mikroorganismen von besonderer Bedeutung zu sein. So besitzen zahlreiche Endokarditiserreger Oberflächenrezeptoren (Adhäsine) für dieses Glykoprotein [66]. Im weiteren Infektionsverlauf bewirkt die nahezu ungehinderte Bakterienvermehrung ständig neue Auflagerungen von Fibrin und Thrombozyten sowie letztlich ein kontinuierliches Wachstum der Vegetation.

Beim Menschen und den meisten Tieren sind die Bikuspidal- und Aortenklappe öfter von Entzündungen betroffen als die Klappen des rechten Herzens. Dies wird auf den höheren hämodynamischen Druck und die hieraus resultierende stärkere mechanische Beanspruchung zurückgeführt [66]. Im Gegensatz dazu ist beim Rind die Trikuspidalklappe am häufigsten involviert, oftmals in Kombination mit weiteren Klappen, selten dagegen unter Einbeziehung des Wandendokards [60; 62; 69; 83; 87]. Die pathophysiologischen Ursachen dieser Rechtsherzdominanz sind nicht bekannt.

Wesentlich für die Entstehung der bovinen Endokarditis ist ein peripherer Sepsisherd. Als Quellen der hämatogenen Erregerstreuung sind insbesondere Dekubitalphlegmonen, komplizierte Klauenerkrankungen, chronische Mastitiden, traumatische Retikulooperitonitiden und chronische Metritiden anzusehen [38; 60; 69].

### 2.2.2 Klinische Symptomatik und Diagnose

Das Anfangsstadium der Erkrankung ist gekennzeichnet durch unspezifische Symptome wie Fieber, Tachykardie, geringgradige Inappetenz und bei Kühen leicht rückläufige Milchleistung. Als einziger konkreter Hinweis dient u. U. ein bereits in der frühen Phase auskultierbares systolisches Herzgeräusch [69]. Im weiteren Krankheitsverlauf verstärkt sich die Symptomatik. POWER & REBHUHN [69] sowie HEALY [38] berichten über Tachykardie mit mehr als 80 i. d. R. laut pochenden Schlägen pro Minute bei 77 % bzw. 90 %, wiederkehrendes oder persistierendes Fieber bei 58 % bzw. 41 % und positiven Jugularvenenpuls bei 59 % bzw. 70 % der von ihnen untersuchten Tiere. Ein systolisches Herzgeräusch wurde übereinstimmend in ca. 50 % der Fälle festgestellt. Merkmale der Herzdekompensation als finalem Krankheitsstadium sind chronische Fressunlust mit Kachexie, drastischer Milchrückgang, Lungenödem und Dyspnoe, ventrale Ödeme, Venenstauung sowie wechselnde Lahmheiten bis hin zum Festliegen.

Labordiagnostisch sind eine moderate Anämie (Hämatokrit < 24 %) sowie Neutrophilie, Hyperglobulinämie, Hyperfibrinogenämie und Proteinurie zu beobachten [38; 69]. In 25 – 96 % der Fälle, in denen *post mortem* der Erregernachweis aus entzündlich veränderten Klappen gelang, konnte der identische Keim bereits *ante mortem* mittels Blutkulturen nachgewiesen werden [38; 83]. In klinischen Verdachtsfällen sehen HOUE et al. [40] positive Blutkulturen bei einer Sensitivität von 70 %, einer Spezifität von 93,8 % und einem positiven Vorhersagewert von 89 % als beweisend für das Vorliegen einer Endokarditis an.

Von den bildgebenden Verfahren wurde zur Diagnostik der bovinen Endokarditis insbesondere die Ultraschalltechnik erfolgreich angewendet [38; 97; 98]. So konnte HEALY [38] bei 20 von 21 Tieren die Erkrankung mittels Sonographie eindeutig nachweisen.

Nach POWER & REBHUHN [69] kann die klinische Diagnose *Endocarditis valvularis* bei Erfüllung von mindestens zwei der nachfolgenden Kriterien gestellt werden: 1.) Herzgeräusche und/oder Zeichen der Herzdekompensation, 2.) positive Blutkultur und 3.) Fieberepisoden. DOWLING & TYLER [26] erachten auch den sonographischen Nachweis einer Klappenläsion in Verbindung mit einer positiven Blutkultur oder wiederkehrendem Fieber als diagnostisch beweisend.

### 2.2.3 Therapie und Prognose

Therapieerfolg und Prognose hängen wesentlich vom Zeitpunkt der exakten Diagnosestellung ab. Bei Erkennung der Erkrankung im Anfangsstadium ist die Prognose mittelmäßig bis gut, bei fortgeschrittenem Verlauf eher zurückhaltend bis infaust [69].

Die Antibiotikatherapie sollte auf der Basis einer positiven Blutkultur mit Empfindlichkeitsprüfung des isolierten Erregers erfolgen [26; 38]. Mittel der Wahl sind aufgrund der zu erwartenden Gram-positiven Erreger Penicillin oder Ampicillin in hoher Dosierung über einen Zeitraum von mindestens vier bis sechs Wochen, in den ersten fünf bis sieben Tagen auch in Kombination mit einem Aminoglycosid (Gentamicin). Begleitend können bei Tieren mit beginnender Herzdekompensation Diuretika (Furosemid) eingesetzt werden [26; 38; 69].

Die Überlebensraten wurden von HEALY [38] wie folgt berichtet: 50 % der Tiere starben unter Therapie oder mussten getötet werden, ca. 30 % überlebten die ersten drei bis sechs Monate nach Therapie (Kurzzeitüberleben) und nur ca. 20 % konnten in ihre Herden zurückkehren, erschienen klinisch unauffällig und überlebten die folgenden sechs bis 20 Monate (Langzeitüberleben). Die i. d. R. unbefriedigenden Therapieraten werden zum einen auf die schlechte Bioverfügbarkeit des Antibiotikums innerhalb der Vegetation [26], zum anderen auf die Stoffwechsellinaktivität von mehr als 90 % der darin eingeschlossenen Bakterien [95] zurückgeführt. Daneben besteht ein hohes Risiko für Reinfektionen der geschädigten Klappen [26].

Therapieversuche der Endokarditis sind bei oft zweifelhafter Prognose mit hohen Kosten verbunden und bleiben im Regelfall genetisch besonders wertvollen Tieren vorbehalten. Eine weitaus größere Bedeutung haben prophylaktische Maßnahmen wie die Optimierung der Haltungs-, Melk- und Geburtshygiene um der Entstehung potentieller Sepsisherde vorzubeugen, ggf. auch therapeutische Schritte, um solche schnellstmöglich zu beseitigen [26; 38].

### 3 Material

#### 3.1 Art, Anzahl und Herkunft der Proben

Im Zeitraum September 2006 bis Februar 2008 gelangten 55 Rinderherzen mit pathologisch-anatomischen Veränderungen i. S. einer *Endocarditis valvularis thromboticans* zur Untersuchung, dies waren 54 Proben von zwei Schlachthöfen im Land Brandenburg und eine Probe aus dem Sektionsgut des LLBB. An den Schlachthöfen wurde der entsprechende Befund im Zuge der amtlichen Schlachtier- und Fleischuntersuchung erhoben. Für die sich anschließende bakteriologische Untersuchung gemäß AVV Fleischhygiene bzw. AVV Lebensmittelhygiene [7; 8] wurde Probenmaterial am Tag der Schlachtung gekühlt (4 °C) zum LLBB transportiert und hier unverzüglich bearbeitet. Die bakteriologische Untersuchung der Sektionsprobe erfolgte im Rahmen der Diagnostik von Tierseuchen bzw. -krankheiten.

#### 3.2 Kontrollstämme

Für diese Arbeit verwendete Kontrollstämme (Tab. 3) wurden entweder als lyophilisierte Referenzstämme von anerkannten Kulturensammlungen bezogen oder es handelte sich um Wildstämme, deren Spezieszugehörigkeit auf Grund umfangreicher phänotypischer und/oder genotypischer Prüfungen zweifelsfrei erschien. Die Bearbeitung erfolgte entsprechend den Hinweisen der abgebenden Sammlung und unter Einhaltung der Qualitätsrichtlinien der AKS Hannover [37]. Die Stammkulturen wurden bei –80 °C gelagert.

Tab. 3: Kontrollstämme

Spezies	Bezeichnung
<i>Abiotrophia defectiva</i>	DSM 9849 <sup>T</sup>
<i>Aeromonas hydrophila</i>	DSM 30187 <sup>T</sup>
<i>Alcaligenes faecalis</i>	DSM 6174
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	LLB 03UD25 <sup>W</sup>
<i>Bacillus cereus</i>	DSM 345
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	LLB 02YSZ7 <sup>W</sup>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	DSM 30053 <sup>T</sup>
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
<i>Enterococcus faecium</i>	DSM 6177
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Granulicatella adiacens</i>	DSM 9848 <sup>T</sup>
<i>Granulicatella elegans</i>	DSM 11693 <sup>T</sup>
<i>Helcococcus kunzii</i>	DSM 10548 <sup>T</sup>
<i>Helcococcus ovis</i>	CCUG 37441 <sup>T</sup>
<i>Helcococcus ovis</i>	CCUG 39041
<i>Helcococcus sueciensis</i>	CCUG 47334 <sup>T</sup>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	DSM 20391

**Tab. 3: Kontrollstämme (Fortsetzung)**

Spezies	Bezeichnung
<i>Listeria innocua</i>	DSM 20649 <sup>T</sup>
<i>Listeria monocytogenes</i>	DSM 12464
<i>Mannheimia haemolytica</i>	DSM 10531 <sup>T</sup>
<i>Micrococcus luteus</i>	DSM 1790
<i>Pasteurella multocida</i>	LLB 04URF108 <sup>W</sup>
<i>Proteus mirabilis</i>	DSM 6674
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
<i>Staphylococcus aureus</i>	LLB 03YSW3 <sup>W</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Staphylococcus capitis</i>	DSM 6180
<i>Staphylococcus cohnii</i>	DSM 6669
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	DSM 1798
<i>Staphylococcus xylosum</i>	DSM 6179
<i>Streptococcus agalactiae</i>	DSM 2134 <sup>T</sup>
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> ssp. <i>dysgalactiae</i>	DSM 20662 <sup>T</sup>
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> ssp. <i>equisimilis</i>	DSM 6176
<i>Streptococcus equi</i> ssp. <i>zooepidemicus</i>	DSM 20727 <sup>T</sup>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 49619
<i>Streptococcus uberis</i>	LLB 08URF15 <sup>W</sup>
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	DSM 8992 <sup>T</sup>

<sup>T</sup> Typstamm, <sup>W</sup> Wildstamm

### 3.3 Geräte

Für diese Arbeit wesentliche Geräte sind in Tab. 4 angegeben.

**Tab. 4: Geräte**

Bezeichnung	Hersteller/Bezugsquelle
Anaerobensystem	Oxoid, Wesel
Digitalkamera EOS 400D	Canon Deutschland, Krefeld
Gelelektrophorese-Kammer	Angewandte Gentechnologische Systeme, Heidelberg
Inkubator (CO <sub>2</sub> ) CB 210	Binder, Tuttlingen
Inkubatoren Heraeus B6420, B6200	Kendro Laboratory Products, Hanau
Lichtmikroskop DM LB mit Kamera DC 480	Leica Microsystems, Wetzlar
Pipetten „Research“ variabel, 1-, 12-Kanal	Eppendorf AG, Hamburg
Reagenzglasschüttler VF 2	IKA Labortechnik, Staufen i. Br.
Sicherheitswerkbank KR-170	Kojair Tech Oy, Vilppula
Ablesespiegel für Mikrotiterplatten	Titertek, Huntsville, AL
Stereomikroskop SZ 60	Olympus Deutschland, Hamburg
Thermocycler Trio Thermoblock	Biometra, Göttingen
Tiefgefriertruhe Heraeus HFC 286 Top	Kendro Laboratory Products, Hanau
Turbidometer	Oxoid, Wesel

### 3.4 Nährmedien, Chemikalien und Lösungen für die Mikrobiologie

#### 3.4.1 Nährmedien

Für diese Arbeit verwendete Nährmedien sind in Tab. 5 aufgeführt.

**Tab. 5: Nährmedien**

Bezeichnung	Hersteller	Zusammensetzung
Cation-Adjusted Mueller-Hinton-Bouillon mit lysiertem Pferdeblut und Pyridoxal (CAMHB+PP) [16]  Mueller-Hinton-II-Bouillon lysiertes Pferdeblut Pyridoxal-HCl	BD Diagnostics, Heidelberg  Oxoid, Wesel  Sigma-Aldrich, Taufkirchen	Fertigmedium in Röhrchen  3 % (vol/vol)  0,001 % (wt/vol)
Columbia-Blutagar (CBA)	Oxoid, Wesel	Fertigmedium in Platten
Columbia-Blutagar mit Pyridoxal (CBPA) [39]  Columbia-Agar defibriniertes Schafblut Pyridoxal-HCl	Merck, Darmstadt  Fiebig, Idstein-Niederauoff  Sigma-Aldrich, Taufkirchen	Trockenmedium (42 g/l aq. dest.)  10 % (vol/vol)  0,002 % (wt/vol)
<i>Helcococcus</i> -Elektivagar (HEA)  Edwards-Nährboden, mod. defibriniertes Schafblut Colistin-Sulfat Aztreonam Oxolinsäure Pyridoxal-HCl	Oxoid, Wesel  Fiebig, Idstein-Niederauoff  Sigma-Aldrich, Taufkirchen  MP Biomedicals, Illkirch  Sigma-Aldrich, Taufkirchen  Sigma-Aldrich, Taufkirchen	Trockenmedium (41 g/l aq. dest.)  7 % (vol/vol)  0,01 g/l  0,002 g/l  0,0025 g/l  0,002 % (wt/vol)
Hirn-Herz-Bouillon	Merck, Darmstadt	Trockenmedium (37 g/l aq. dest.)
Kligler-Eisen-Agar	Merck, Darmstadt	Trockenmedium (55 g/l aq. dest.)
Mueller-Hinton-Agar	Oxoid, Wesel	Fertigmedium in Platten
Serum-Agar nach Löffler  Standard-I-Nährbouillon D-Glucose  Rinder-Serum	Merck, Darmstadt  Merck, Darmstadt  Fiebig, Idstein-Niederauoff	Trockenmedium (8 g/l aq. dest.)  1 g/l davon 100 ml  300 ml

### 3.4.2 Chemikalien und Lösungen

Chemikalien und Lösungen für die Mikrobiologie sind in Tab. 6 gelistet.

**Tab. 6: Chemikalien und Lösungen**

Bezeichnung	Hersteller	Zubereitung
Glycerol	Carl Roth, Karlsruhe	gebrauchsfertig nach autoklavieren
Gram's Kristallviolett-Lsg.	Merck, Darmstadt	gebrauchsfertig
Gram's Safranin-Lsg.	Merck, Darmstadt	gebrauchsfertig
isotonische Kochsalzlsg.	Eigenherstellung	0,9 % (wt/vol) wässrige NaCl-Lsg.
Lugol's Lsg., stabilisiert	Merck, Darmstadt	gebrauchsfertig
McFarland Standard 0,5	Remel, Lenexa, KS	gebrauchsfertig
McFarland Standards Kit (Standards 0,5; 2; 3; 4; 5)	bioMérieux Deutschland, Nürtingen	gebrauchsfertig
Pyridoxal-HCl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	wässrige Stammlsg. 0,01 % bzw. 0,2 % (wt/vol) Lagerung bei -20 °C
Brennspiritus	AVG Chemie, Berlin	gebrauchsfertig
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt	3 % (vol/vol) wässrige Lsg.

### 3.5 Diagnostika und Testkits für die Mikrobiologie

Diagnostika und Testkits für die Mikrobiologie sind in Tab. 7 angegeben.

**Tab. 7: Diagnostika und Testkits**

Bezeichnung	Hersteller
API 20 Strep	bioMérieux Deutschland, Nürtingen
API rapid ID 32 Strep	bioMérieux Deutschland, Nürtingen
API ZYM	bioMérieux Deutschland, Nürtingen
Bactident Coagulase (EDTA-Kaninchenplasma)	Merck, Darmstadt
Bactident Oxidase	Merck, Darmstadt
Diatabs Alkalische Phosphatase Arginin Dihydrolase $\alpha$ -Galactosidase $\beta$ -Galactosidase (ONPG) $\beta$ -Glucosidase $\beta$ -Glucuronidase Hippurat-Hydrolyse Leucin Aminopeptidase Pyrrolidonyl Aminopeptidase Maltose Saccharose	Rosco Diagnostica, Taastrup
Polymyxin-Testblättchen (300 IE)	Oxoid, Wesel
Streptokokken-Identifizierungs-Test	Oxoid, Wesel
Testblättchen unbeschickt	Oxoid, Wesel
Vancomycin-Testblättchen (30 $\mu$ g)	Oxoid, Wesel

### 3.6 Aufarbeitungskits und Lösungen für die Molekularbiologie

Für molekularbiologische Untersuchungen verwendete Aufarbeitungskits und Lösungen sind in Tab. 8 aufgeführt.

**Tab. 8: Aufarbeitungskits und Lösungen**

Bezeichnung	Hersteller	Zubereitung
100 bp DNA-Marker	Invitrogen, Karlsruhe	1 µg/µl
Agarose	Biodeal, Markkleeberg	1,2 % (wt/vol) Agarosegel
dNTP Mix	Promega, Mannheim	10 mM (je dNTP)
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe	1,3 % (vol/vol) Endkonzentration
MgCl <sub>2</sub> -Lsg.	Invitrogen, Karlsruhe	50 mM
PCR-Puffer (10x)	Invitrogen, Karlsruhe	1:10 Verdünnung (vol/vol) in aq. bidest.
Phosphatgepuffete Salzlösung (10x PBS); pH 7,2	Carl Roth, Karlsruhe	1:10 Verdünnung (vol/vol) in aq. bidest.
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden	gebrauchsfertig
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden	gebrauchsfertig
Taq DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe	5 E/µl
TBE-Puffer	Carl Roth, Karlsruhe	1:10 Verdünnung (vol/vol) in aq. bidest.
Stopp-Puffer	Eigenherstellung	Formamid 9,5 ml EDTA-Lsg. pH 8,0 0,4 ml Bromphenolblau 5,0 mg Xylencyanol FF 5,0 mg aq. bidest. 0,1 ml

### 3.7 Oligonukleotid-Primer für die Molekularbiologie

Die in Tab. 9 angegebenen Oligonukleotid-Primer wurden von der Firma MWG Biotech, Ebersberg, synthetisiert.

**Tab. 9: Oligonukleotid-Primer**

Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')	Amplifikat	Position in <i>E. coli</i> 16S rRNA-Gen
Hov-Seq-fw	TGGCTCAGGACGAACGCT	1490 bp (F)	20 – 37
Hov-Seq-rev	CTTCGGGTATTGCCAACTC	1490 bp (R)	1416 – 1435

### 3.8 MHK-Mikrotiterplatten

Die MHK-Mikrotiterplatten (Trek Diagnostic Systems, West Sussex) wurden vom Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL), Referat 503, zur Verfügung gestellt.

Die folgenden Abb. 1 – 5 zeigen die Layouts der verwendeten Platten NLV 41, NLV 58, NLV 66, NLV 67 A und NLV 67 B. Die Werte in den Feldern A1 bis H10 geben die Konzentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) des Wirkstoffes in der jeweiligen Kavität an. In den wirkstofffreien Kavitäten H11 und H12 befinden sich die Wachstumskontrollen (CON).

Die Platte NLV 41 wurde im Untersuchungszeitraum durch die Platte NLV 58 mit modifizierten Wertebereichen für Quinupristin/Dalfopristin, Vancomycin, Tilmicosin und Tylosin-tartat abgelöst. Bei der Platte NLV 67 wurde im Studienverlauf der Wirkstoff Cefotaxim (NLV 67 A) durch Cefazolin (NLV 67 B) ersetzt.

NLV 41		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Erythromycin	A	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32
Clindamycin	B	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64
Quinupristin/ Dalfopristin	C	0.008	0.016	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16
Vancomycin	D	0.008	0.016	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16
Pirlimycin	E	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64
Tilmicosin	F	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64
Tylosin-tartat	G	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64
Oxacillin + 2 % NaCl	H	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	CON	CON

Abb. 1: MHK-Platte NLV 41 mit Spektrum Gram-positive Erreger

NLV 58		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Erythromycin	A	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32
Clindamycin	B	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64
Quinupristin/ Dalfopristin	C	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32
Vancomycin	D	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32
Pirlimycin	E	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64
Tilmicosin	F	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128
Tylosin-tartat	G	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128
Oxacillin + 2 % NaCl	H	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	CON	CON

Abb. 2: MHK-Platte NLV 58 mit Spektrum Gram-positive Erreger

NLV 66		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Tulathromycin	A	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64
Gentamicin	B	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
Enrofloxacin	C	0.008	0.016	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16
Trimethoprim/ Sulfameth- oxazol	D	0.015 /0.3	0.03/ 0.6	0.06/ 1.19	0.12/ 2.38	0.25/ 4.75	0.5/ 9.5	1/19	2/38	4/76	8/152	16/ 304	32/ 608
Spiramycin	E	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128
Tetracyclin	F	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
Neomycin	G	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128
Chloramphenicol	H	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	CON	CON

Abb. 3: MHK-Platte NLV 66 mit Spektrum Gram-positive und Gram-negative Erreger

NLV 67 A		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Ampicillin	A	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64
Amoxicillin/ Clavulansäure	B	0.03/ 0.015	0.06/ 0.03	0.12/ 0.06	0.25/ 0.12	0.5/ 0.25	1/0.5	2/1	4/2	8/4	16/8	32/16	64/32
Penicillin G	C	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32
Ceftiofur	D	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64
Cefquinom	E	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32
Cephalothin	F	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128
Cefotaxim	G	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32
Cefoperazon	H	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	CON	CON

Abb. 4: MHK-Platte NLV 67 A mit Spektrum Gram-positive und Gram-negative Erreger

NLV 67 B		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Ampicillin	A	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64
Amoxicillin/ Clavulansäure	B	0.03/ 0.015	0.06/ 0.03	0.12/ 0.06	0.25/ 0.12	0.5/ 0.25	1/0.5	2/1	4/2	8/4	16/8	32/16	64/32
Penicillin G	C	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32
Ceftiofur	D	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64
Cefquinom	E	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32
Cephalothin	F	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128
Cefazolin	G	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
Cefoperazon	H	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	CON	CON

Abb. 5: MHK-Platte NLV 67 B mit Spektrum Gram-positive und Gram-negative Erreger

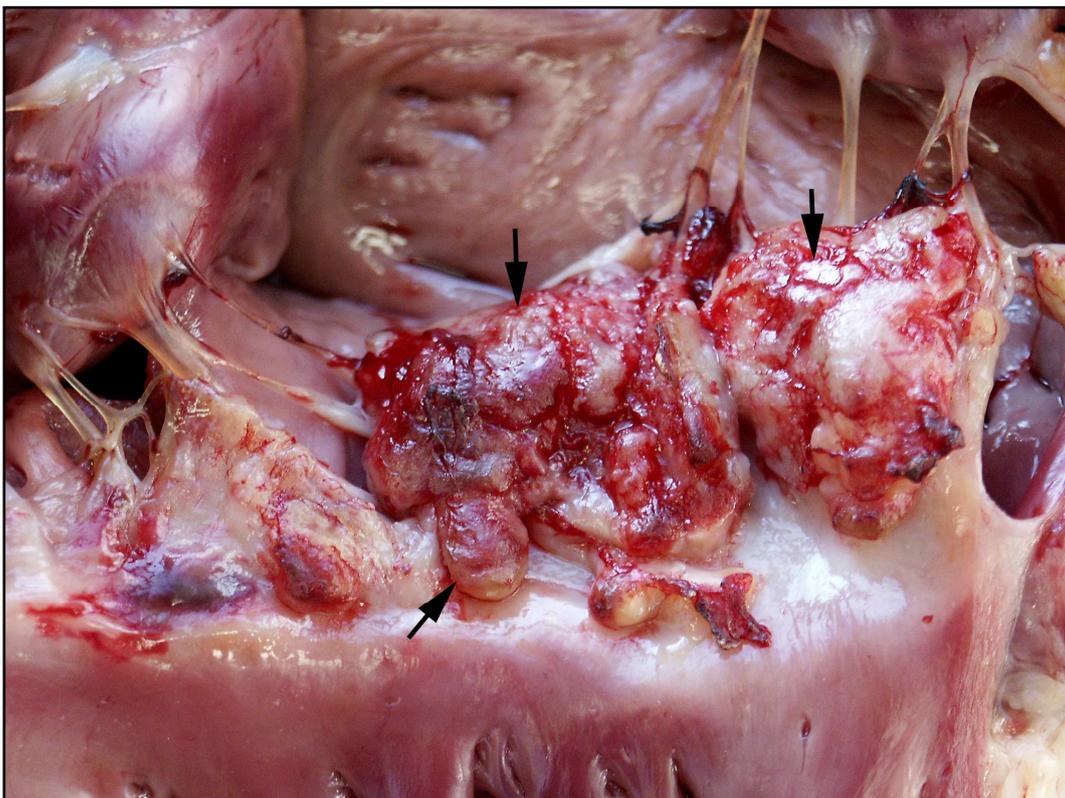
## 4 Methoden

### 4.1 Pathologisch-anatomische Untersuchung

Alle Herzen wurden pathologisch-anatomisch untersucht und die krankhaft veränderten Klappen anhand der vorliegenden anatomischen Gegebenheiten als Trikuspidal-, Mitral-, Pulmonal- oder Aortenklappe bestimmt [63].

### 4.2 Primärkultur

Mittels steriler Schere und Pinzette wurde von den Klappenvegetationen (Abb. 6) ein ca. haselnussgroßes Stück entnommen, in Brennspiritus getaucht und kurz abgeflammt. Nach Anlegen einer frischen Schnittfläche wurde diese auf die Oberfläche einer CBA-Platte gedrückt. Die weitere Ausimpfung des Materials erfolgte mittels Öse im dreifachen Verdünnungsausstrich. Abschließend wurden die drei Fraktionen des Ausstriches mit *S. aureus* LLB 03YSW3 in Form einer Ammenkultur beimpft. Die Inkubation der Medien erfolgte aerob bei  $36 \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C}$  für 48 h.



**Abb. 6: Herzklappe mit charakteristischen Vegetationen (Pfeil)**

Die Primärkulturen wurden jeweils nach Übernachtbebrütung sowie zum Ende der Inkubationszeit beurteilt und die einzelnen Koloniemorphologien sowie deren relative Quantität (ge-

ring, mittel, hoch) erfasst. Von potentiellen Erregern wurden zum Zweck der Identifizierung Subkulturen auf CBA angelegt und diese 24 – 48 h aerob bei  $36 \pm 1$  °C inkubiert. Bei Keimen mit Satellitismus-Phänomen (Abb. 7) erfolgte die Subkultur mit *S. aureus*-Amme sowie parallel auf CBPA. Offensichtliche Kontaminanten in geringem Keimgehalt wurden von der weiteren Betrachtung ausgeschlossen.



Abb. 7: Isolat 08LB103, Primärkultur 18 h, Satellitismus um *S. aureus*-Amme (Pfeil)

#### 4.3 Präsumtive Erregeridentifizierung

Die präsumtive Identifizierung erfolgte anhand phänotypischer Merkmale. Einbezogen wurden die Koloniemorphologie, die Zellmorphologie (Färbung nach Gram), biochemische Schlüsselreaktionen, wachstumsphysiologische Charakteristika sowie der Nachweis spezifischer Antigene [28; 85]. Eine Übersicht zu angewandten Identifizierungsschemata gibt Tab. 10. Im Einzelnen wurden die serologischen und biochemischen Prüfungen wie folgt durchgeführt:

Lancefield-Gruppen:	Streptokokken-Identifizierungs-Test
anaerobe Glucoseverwertung:	Kligler-Eisen-Agar
proteolytische Aktivität:	Serum-Agar nach Löffler
Katalase:	Wasserstoffperoxid-Lsg. (3 %)
Oxidase:	Bactident Oxidase

Koagulase (Röhrchentest):	Bactident Coagulase
Clumping-Faktor:	Bactident Coagulase
diffusibles Pigment:	Mueller-Hinton-Agar
Polymyxin B-Resistenz:	Polymyxin B-Testblättchen (300 IE)

Die abschließende Identifizierung von Streptokokken bzw. Enterokokken erfolgte z. T. unter Verwendung des API 20 Strep Systems.

#### 4.4 Lagerung und Rekultivierung von *Helcococcus ovis*-Isolaten

Präsumtiv als *H. ovis* identifizierte Isolate wurden auf CBPA subkultiviert und 24 – 48 h bei  $36 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  und 6 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Nach Prüfung der Reinheit wurde das Koloniematerial mit einem sterilen Tupfer aufgenommen und bis zum Entstehen einer deutlichen Trübung in 8 ml Hirn-Herz-Bouillon suspendiert. Von der Bakteriensuspension wurden jeweils 1,8 ml in vier 2 ml-Kryoröhrchen pipettiert und diese anschließend mit 0,2 ml sterilem Glycerol aufgefüllt. Die Röhrchen wurden verschlossen, gut durchmischt und gekennzeichnet. Nach 15 – 20 min Lagerung bei Raumtemperatur erfolgte die Kryokonservierung der Stammkultur bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ . Vom Rest der Suspension wurden zum Zwecke der Reinheitskontrolle 100  $\mu\text{l}$  auf CBA ausplattiert und 48 h aerob bei  $36 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert.

Grundsätzlich wurde darauf geachtet, die Anzahl der Passagen zwischen Primär- und Stammkultur so gering wie möglich zu halten. Im Regelfall wurden nicht mehr als zwei Subkulturen benötigt. Zum Schutz vor Kontaminationen wurden alle Arbeiten mit Stammkulturen in der Sicherheitswerkbank durchgeführt.

Für die Herstellung von Gebrauchskulturen wurde die Stammkultur geöffnet, mit einem sterilen Tupfer etwas Material von der Oberfläche entnommen und auf CBPA ausgeimpft. Die weitere Inokulation des Mediums erfolgte mittels Öse im Verdünnungsausstrich. Anschließend wurde 48 h bei  $36 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  und 6 %  $\text{CO}_2$  inkubiert und die Kultur auf Reinheit geprüft.

Ausgangskulturen für phänotypische oder genotypische Charakterisierungen sowie Empfindlichkeitsprüfungen wurden von der frischen Gebrauchskultur durch einmalige Subkultur (CBPA, 20 – 24 h,  $36 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ , 6 %  $\text{CO}_2$ ) gewonnen.

**Tab. 10: Schemata der präsumtiven Erregeridentifizierung**

Koloniemorphologie <sup>1</sup>	Zellmorphologie <sup>2</sup>	Serologie	Biochemie/Physiologie	Identifizierungsergebnis
0,5 – 1 mm, grauweiß, rundlich, β-Hämolyse	positive, coryneforme Stäbchen	Lancefield G +	Katalase – Proteolyse +	<i>A. pyogenes</i>
1 mm, farblos, rundlich, α-Hämolyse	positive Kokken	Lancefield C +	Katalase – API 20 Strep	<i>S. dysgalactiae</i> ssp. <i>dysgalactiae</i>
1 mm, farblos, rundlich, α-Hämolyse	positive Kokken	Lancefield (A-D, F-G) –	Katalase –	<i>Streptococcus</i> sp.
1 mm, hellgrau, rundlich	positive Kokken	Lancefield D +	Katalase – API 20 Strep	<i>Enterococcus</i> sp.
0,5 mm, farblos, rundlich, Satellitismus um <i>S. aureus</i>	positive Kokken		Katalase –	<i>H. ovis</i>
1 – 3 mm, grauweiß-gelblich, flach, Hämolyse	positive Kokken		Katalase + Koagulase (Röhrchen) + Clumping-Faktor + Polymyxin B-Resistenz +	<i>S. aureus</i>
3 – 5 mm, metallisch glänzend, flach, Hämolyse	negative, gerade Stäbchen		Oxidase + Glucose anaerob – Wachstum 42 °C + diffusibles Pigment +	<i>P. aeruginosa</i>
1 – 2 mm, grau, flach, saumartiger Rand	negative Diplokokken		Oxidase + Glucose anaerob –	Spezies der Familie <i>Neisseriaceae</i>

+ positive, – negative Reaktion; <sup>1</sup> CBA, 48 h, aerob, 36 ± 1 °C; <sup>2</sup> Färbung nach Gram

#### 4.5 Ermittlung von Tierdaten und Herkunftsbeständen

Von Tieren mit positivem *H. ovis*-Nachweis wurden anhand der bekannten Ohrmarken-Nummern im „Herkunftssicherungs- und Informationssystem für Tiere“ des Bayerischen Staatsministeriums für Landwirtschaft und Forsten [5] retrospektiv wesentliche Daten zum Lebenslauf ermittelt. Hierzu zählten das Geburts- und Todesdatum, die Rasse, das Geschlecht sowie Name und Anschrift des Herkunftsbestandes.

#### 4.6 16S rRNA-Gen Sequenzanalyse von *Helcococcus ovis*-verdächtigen Isolaten

##### 4.6.1 DNA-Extraktion

Koloniematerial von der Ausgangskultur wurde mittels sterilem Tupfer in 500 µl PBS (pH 7,2) suspendiert. Von dieser Bakteriensuspension wurden 100 µl in 180 µl ATL-Puffer des „QIAamp DNA Mini Kit“ überführt und gemäß dem Ergänzungsprotokoll „Protocols for bacteria, Protocol C“ aufgearbeitet. Die extrahierte DNA wurde in 100 µl aq. dest. eluiert und bei -20 °C gelagert.

##### 4.6.2 PCR-Amplifikation des 16S rRNA-Gens und Sequenzanalyse

Ziel der Untersuchungen war die Sequenzanalyse des nahezu vollständigen 16S rRNA-Gens aller *H. ovis*-verdächtigen Isolate sowie des Referenzstammes *H. ovis* CCUG 39041. Anhand der in GenBank für den Typstamm *H. ovis* CCUG 37441<sup>T</sup> hinterlegten 16S rRNA-Gen Sequenz (Accession# Y16279) wurde ein Primerpaar ausgewählt (Tab. 9), das die Amplifikation eines 1490 bp großen DNA-Fragments gewährleisten sollte. Der Reaktionsmix für die PCR-Amplifikation bestand aus folgenden Komponenten:

aq. bidest.	39,75 µl
PCR-Puffer 10x	5,00 µl
MgCl <sub>2</sub> -Lsg. 50 mM	2,00 µl
dNTP Mix 10 mM	1,00 µl
Hov-Seq-fw 25 pmol	0,50 µl
Hov-Seq-rev 25 pmol	0,50 µl
Taq DNA-Polymerase	0,25 µl
<i>H. ovis</i> -DNA	1,00 µl

Die PCR-Reaktion wurde in einem Thermocycler unter nachstehenden Bedingungen durchgeführt:

Initiale Denaturierung		94 °C, 5 min
30 Zyklen mit	T <sub>1</sub>	94 °C, 30 s
	T <sub>2</sub>	56 °C, 30 s
	T <sub>3</sub>	72 °C, 60 s
Finale Elongation		72 °C, 10 min

Um das Amplifikationsergebnis zu überprüfen, wurden 10 µl des PCR-Produktes mit 3 µl Stopp-Puffer vermischt und auf ein 1,2 % (wt/vol) Agarosegel aufgetragen welches 1,3 % (vol/vol) Ethidiumbromid enthielt. Die Abschätzung der Produktgröße erfolgte anhand eines parallel aufgetragenen 100 bp DNA-Markers (sog. DNA-Leiter). Die gelelektrophoretische Auftrennung wurde bei einer Spannung von 120 Volt für 30 min durchgeführt.

Bei erfolgreicher Amplifikation wurde das Restvolumen der PCR-Reaktion mittels „QIAquick PCR Purification Kit“ aufgereinigt und stand anschließend für die eigentliche Sequenzierung zur Verfügung, die von einem kommerziellen Dienstleister (AGOWA, Berlin) ausgeführt wurde. Die initiale Sequenzierreaktion erfolgte unter Verwendung des Primers Hov-seq-fw, weitere Sequenzierprimer wurden vom Dienstleister generiert.

Die für *H. ovis*-verdächtige Isolate sowie den Referenzstamm *H. ovis* CCUG 39041 ermittelten 16S rRNA-Gen Sequenzen wurden mit Hilfe der Software „Basic Local Alignment Search Tool: Nucleotide Databases“ (BLASTN 2.2.18+) [2] gegen alle in den Datenbanken GenBank (U.S.National Institutes of Health), EMBL (European Molecular Biology Laboratory) und DDBJ (DNA Databank of Japan) hinterlegten 16S rRNA-Gen Sequenzen abgeglichen. Weiterführende Analysen erfolgten mit dem Tool „MegAlign“ des Softwarepaketes „Lasergene“, Version 7 (DNASTAR Inc., Madison, WI).

## 4.7 Phänotypische Charakterisierung von *Helcococcus ovis*-Isolaten

### 4.7.1 Kolonie- und Zellmorphologie

Die Beurteilung der Koloniemorphologie erfolgte auf CBA mit *S. aureus*-Amme sowie CBPA jeweils nach Bebrütung ( $36 \pm 1$  °C, 6 % CO<sub>2</sub>) über Nacht sowie abschließend nach 48 h.

Für die Beschreibung der Zellmorphologie wurden die Isolate 48 h auf CBA mit *S. aureus*-Amme ( $36 \pm 1$  °C, 6 % CO<sub>2</sub>) sowie in CAMHB+PP ( $36 \pm 1$  °C, aerob) kultiviert. Im Anschluss wurden nach Gram gefärbte Präparate hergestellt und diese mikroskopisch im Hellfeld bei ca. 1000-facher Gesamtvergrößerung untersucht.

#### 4.7.2 Prüfung der Ammen- und Pyridoxal-Abhängigkeit

Für die Prüfung von Ammen- und Pyridoxal-Abhängigkeit wurde Koloniematerial von einer frischen Ausgangskultur in 0,9 %-iger Kochsalzlösung suspendiert und mittels Turbidometer auf einen Trübungswert entsprechend 0,5 McFarland eingestellt. Danach wurde ein steriler Tupfer in die Suspension getaucht, zum Entfernen überschüssiger Flüssigkeit am Rand des Röhrchens ausgedrückt und dreimal, stets versetzt um ca. 60°, vollständig über eine CBA-Platte ausgestrichen. Nach Abtrocknen der Agaroberfläche wurde auf einer Hälfte des Mediums ein mit 0,01 %-iger Pyridoxal-HCl-Lsg. getränktes Testblättchen aufgelegt [39] und die andere Hälfte mit einer *S. aureus*-Ammen (LLB 03YSW3) beimpft.

Die Beurteilung von Ammen- und Pyridoxal-Abhängigkeit erfolgte anhand der Ausprägung des Satellitismus-Phänomens (Wachstum in der Diffusionszone des Pyridoxal-Blättchens bzw. der Hämolysezone der *S. aureus*-Ammen) nach Bebrütung ( $36 \pm 1$  °C, 6 % CO<sub>2</sub>) für 24 h sowie abschließend nach 48 h. Als positive Kontrollstämme wurden *A. defectiva* DSM 9849<sup>T</sup>, *G. adiacens* DSM 9848<sup>T</sup> und *G. elegans* DSM 11693<sup>T</sup> verwendet, als Negativkontrolle diente *H. kunzii* DSM 10548<sup>T</sup>.

#### 4.7.3 Biochemische Leistungen

Für die Prüfung biochemischer Leistungen wurden Systeme zum Nachweis präformierter Enzyme verwendet. Diese zeichnen sich dadurch aus, dass Wachstum und Vermehrung des betreffenden Bakteriums im substrathaltigen Medium nicht erforderlich sind. Somit können auch anspruchsvolle Erreger (Faktorenabhängigkeit, obligat anaerobes Wachstum, etc.) relativ einfach getestet werden. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass Ergebnisse oftmals schon nach 4 – 5 h vorliegen.

Die Testdurchführung ist für alle auf dem genannten Prinzip beruhenden Systeme ähnlich. Nach Kultur auf einem agarhaltigen Medium wird eine dichte Suspension des Bakteriums hergestellt (Trübungswert 4 – 6 McFarland). Diese Suspension wird dem Testsubstrat zugesetzt und der Ansatz aerob, i. d. R. bei  $36 \pm 1$  °C, inkubiert. Sind die suspendierten Bakterien mit dem erforderlichen Enzym ausgestattet, wird das Substrat umgesetzt und dies durch einen Indikator angezeigt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit kamen die Systeme API rapid ID 32 Strep und API ZYM sowie verschiedene Substrate aus der Rosco Diatabs-Serie zum Einsatz. Testdurchführung und Interpretation der Ergebnisse erfolgten unter strikter Einhaltung der entsprechenden Arbeitsanweisung des Herstellers.

#### 4.7.4 Prüfung weiterer Eigenschaften

Für die Prüfung der Katalase-Reaktion wurde Material von der Ausgangskultur entnommen, mittels Platin-Impföse auf einem sauberen Objektträger verrieben und mit Wasserstoffperoxid-Lsg. (3 %) überschichtet. Positive Reaktionen (Kontrollstamm: *S. aureus* LLB 03YSW3) sind durch die spontane Bildung von Gasbläschen bis hin zu leichtem Aufschäumen gekennzeichnet, bei negativem Reaktionsausfall (Kontrollstamm: *S. pneumoniae* ATCC 49619) ist keine Bläschenbildung zu beobachten.

Für die Prüfung der Vancomycin-Resistenz wurde Material von der Ausgangskultur entnommen und mittels Öse auf der Hälfte einer CBPA-Platte dicht ausgeimpft. Anschließend wurde im Zentrum des Ausstriches ein Vancomycin-Blättchen (30 µg) platziert. Die Beurteilung erfolgte nach Bebrütung ( $36 \pm 1$  °C, 6 % CO<sub>2</sub>) über Nacht, wobei jede Ausprägung eines Hemmhofes um das Vancomycin-Blättchen als sensibel bewertet wurde.

Für die Prüfung des anaeroben Wachstums wurde Material von der Ausgangskultur auf einer CBPA-Platte subkultiviert. Die Beurteilung erfolgte nach 48 h Inkubation bei  $36 \pm 1$  °C im Anaerobensystem.

### 4.8 Empfindlichkeitsprüfung von *Helcococcus ovis*-Isolaten

#### 4.8.1 Wahl der Methodik

Die Empfindlichkeitsprüfung der *H. ovis*-Isolate erfolgte im Bouillon-Mikrodilutionsverfahren entsprechend den CLSI Dokumenten M31-A2 „Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals“ und M45-A „Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Table 1. *Abiotrophia* species and *Granulicatella* species (Formerly Known as Nutritionally Deficient or Nutritionally Variant Streptococci) - Information and Interpretive Criteria for Broth Microdilution Susceptibility Testing“ [15; 16].

#### 4.8.2 Standardisierung des Inokulums

Das CLSI Dokument M31-A2 gibt für die Inokulumdichte im Bouillon-Mikrodilutionsverfahren einen Richtwert von  $5,0 \times 10^5$  kbE/ml an. Abweichungen von  $\pm 3,0 \times 10^5$  kbE/ml gelten nach Auffassung der DVG-Arbeitsgruppe „Antibiotikaresistenz“ als tolerabel [24].

Vorversuche zur Standardisierung des Inokulums erfolgten unter Einbeziehung von sieben *H. ovis*-Isolaten, von denen im Vorfeld drei negativ und vier positiv auf Pyridoxal-Abhängigkeit getestet wurden. Angelehnt an die im CLSI Dokument M31-A2 beschriebene Methodik wurde Koloniematerial von der Ausgangskultur in einer 0,9 %-igen Kochsalzlösung suspen-

diert und mittels Turbidometer auf einen Trübungswert entsprechend 0,5 McFarland eingestellt. Im Anschluss wurden 5,23 ml CAMHB+PP mit 52 µl (Verdünnung 1:100) bzw. 131 µl (Verdünnung 1:40) dieser Suspension beimpft. Nach gründlicher Durchmischung mit dem Reagenzglasschüttler (3 × 10 s) wurden 10 µl der inokulierten CAMHB+PP in 10 ml einer 0,9 %-igen Kochsalzlösung überführt und abermals durchmischt. Von dem so erhaltenen Ansatz wurden jeweils 100 µl auf zwei Platten CBPA ausgespatelt. Nach Inkubation (36 ± 1 °C, 6 % CO<sub>2</sub>, 48 h) wurden die Kolonien für jede Platte gezählt, das arithmetische Mittel ( $\bar{x}_{CBPA}$ ) berechnet und hiervon der Wert für die mittlere Inokulumdichte ( $\bar{x}_{CBPA} \times 10^4$  kbE/ml) abgeleitet.

### 4.8.3 Bestimmung der MHK

Koloniematerial von der Ausgangskultur wurde in einer 0,9 %-igen Kochsalzlösung suspendiert und mittels Turbidometer auf einen Trübungswert entsprechend 0,5 McFarland eingestellt. Im Anschluss wurden 15 ml CAMHB+PP in einem nach Vorversuch (4.8.2) ermittelten Verdünnungsverhältnis mit dieser Suspension beimpft. Nach gründlicher Durchmischung mit dem Reagenzglasschüttler (3 × 10 s) wurde die inokulierte CAMHB+PP in eine sterile Kunststoffwanne gegeben und hieraus mittels 12-Kanal-Pipette jede Kavität der MHK-Mikrotiterplatten NLV 41 (später NLV 58), NLV 66 und NLV 67 A (später NLV 67 B) mit 50 µl befüllt. Danach wurden die Kavitäten mit Folie gasdicht verschlossen, die Platten gekennzeichnet und für 24 h inkubiert (36 ± 1 °C, aerob). Die Überprüfung des Inokulums hinsichtlich Dichte und Freiheit von Kontaminationen erfolgte ausgehend von der überschüssigen CAMHB+PP wie unter 4.8.2 beschrieben.

Nach der Inkubation wurde die Folie von der MHK-Platte entfernt und, beginnend mit den Kontrollen, das Wachstum in den Kavitäten unter Zuhilfenahme eines optisch nicht vergrößernden Ablesespiegels beurteilt. Der MHK-Wert eines Wirkstoffes wurde bestimmt als die geringste Konzentration, bei der kein Bakterienwachstum erkennbar war. Jede Isolat-Wirkstoff-Kombination wurde in zwei unabhängigen Messreihen geprüft.

Im Sinne der Qualitätskontrolle wurde jede Charge MHK-Mikrotiterplatten mit *S. pneumoniae* ATCC 49619 geprüft. Die hierbei ermittelten MHK-Werte für Erythromycin, Clindamycin, Quinupristin/Dalfopristin und Vancomycin (MHK-Platten NLV 41 bzw. 58), Trimethoprim/Sulfamethoxazol, Tetracyclin und Chloramphenicol (MHK-Platte NLV 66) sowie Ampicillin, Amoxicillin/Clavulansäure und Penicillin (MHK-Platten NLV 67 A bzw. 67 B) wurden mit den im CLSI Dokument M45-A, Table 16A, angegebenen Kontroll-Wertebereichen verglichen und bei Übereinstimmung die Plattencharge für die Empfindlichkeitsprüfung der *H. ovis*-Isolate verwendet.

#### **4.8.4 Prüfung auf induzierbare Clindamycin-Resistenz („D-Zonen“-Test)**

Die Prüfung auf induzierbare Clindamycin-Resistenz erfolgte für *H. ovis*-Isolate, die bei mindestens einer MHK-Bestimmung Werte für Erythromycin von  $\geq 1 \mu\text{g/ml}$  und gleichzeitig für Clindamycin von  $\leq 0,5 \mu\text{g/ml}$  aufwiesen. Die Methodik entsprach dem für  $\beta$ -hämolyisierende Streptokokken empfohlenen Verfahren [70]. Koloniematerial von der Ausgangskultur wurde in einer 0,9 %-igen Kochsalzlösung suspendiert, mittels Turbidometer auf einen Trübungswert entsprechend 0,5 McFarland eingestellt und mit einem sterilen Tupfer auf eine CBPA-Platte ausgeimpft. Um konfluentes Wachstum zu erzielen, wurde der Tupfer dreimal über die gesamte Plattenoberfläche ausgestrichen und die Platte dabei um jeweils ca.  $60^\circ$  gedreht. Anschließend wurden im Zentrum der Platte ein Erythromycin- (15  $\mu\text{g}$ ) sowie ein Clindamycin-Testblättchen (2  $\mu\text{g}$ ) im Abstand von 12 mm (Rand-zu-Rand) aufgelegt. Die Beurteilung erfolgte nach 24 h Inkubation ( $36 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ , 6 %  $\text{CO}_2$ ). Ein in Richtung Erythromycin-Blättchen deutlich abgeflachter Clindamycin-Hemmhof („D-Zone“) wurde als positiv für induzierbare Clindamycin-Resistenz gewertet.

#### **4.9 Entwicklung eines *Helcococcus*-Elektivagars**

##### **4.9.1 Rezeptur des Mediums**

Die Grundlage des Elektivagars bildete der in der Mastitisiagnostik gebräuchliche modifizierte Edwards-Nährboden zum Nachweis von *S. agalactiae* aus Rohmilch [25]. SAWANT et al. [82] konnten durch den Zusatz von Colistin und Oxolinsäure die Selektivität dieses Mediums steigern und insbesondere das Wachstum von *Staphylococcus* spp. sowie Vertretern der Familie *Enterobacteriaceae* unterdrücken. Um die Hemmwirkung auf Gram-negative Keime weiter zu verbessern, wurden im Rahmen dieser Arbeit der Colistin-Gehalt verdoppelt und Aztreonam hinzugefügt. Für das Wachstum von *H. ovis* wurde desweiteren Pyridoxal zugesetzt. Die Rezeptur des *Helcococcus*-Elektivagars (HEA) ist in Tab. 5 angegeben.

##### **4.9.2 Evaluierung des Mediums**

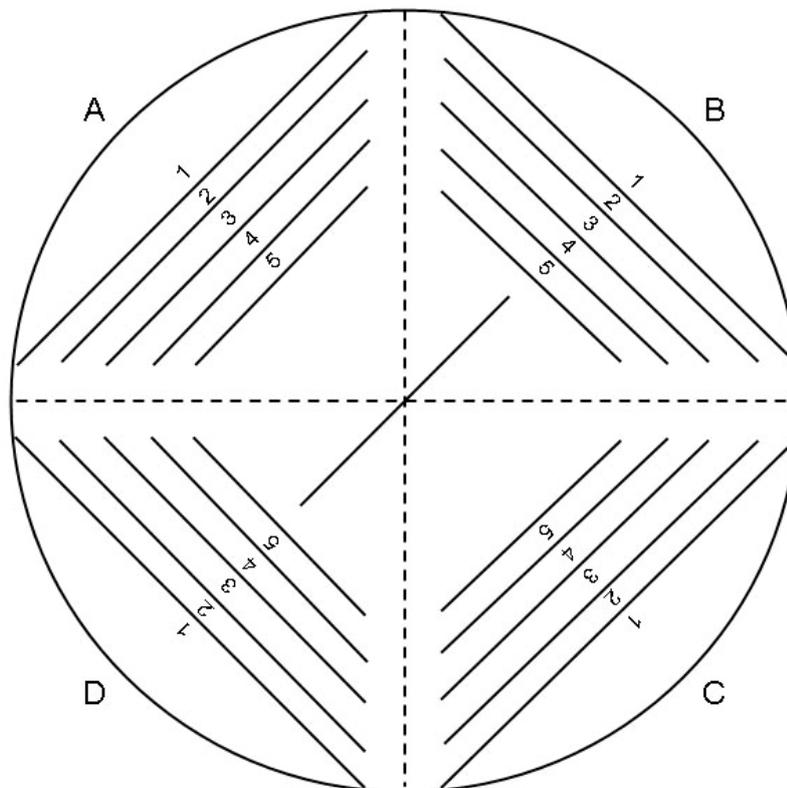
Die Prüfung von Produktivität und Selektivität des Elektivagars basierte auf der von MOSSEL et al. [58; 59] entwickelten „ecometric technique“. Hierbei handelt es sich um ein semiquantitatives, sequenzielles Verdünnungsverfahren, das es ermöglicht, anhand eines „absoluten Wachstumsindex“ (AWI) die Leistungsfähigkeit von Agarmedien in Platten zu beurteilen und zu vergleichen.

Koloniematerial von der Ausgangskultur wurde in einer 0,9 %-igen Kochsalzlösung suspendiert und mittels Turbidometer auf einen Trübungswert entsprechend 0,5 McFarland eingestellt. Anschließend wurde mittels kalibrierter Öse (1  $\mu\text{l}$ ) einmalig Material von der Bakterien-

suspension entnommen und in einem definierten Muster zuerst über vier Sektoren (A – D) und abschließend durch das Zentrum des Mediums ausimpft (Abb. 8). Nach Inkubation ( $36 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ , 6 %  $\text{CO}_2$ , 72 h) folgten die Ablesung des Endpunktes, d. h. des in Reihenfolge der Inokulation letzten Impfstiches mit Wachstum von mindestens einer Kolonie, sowie die Bestimmung des AWI entsprechend dem modifizierten Verfahren nach GURTNER & BEUCHAT [35]. Der AWI ergab sich hierbei aus der Anzahl bewachsener Impfstiche (max. 21) multipliziert mit dem Faktor 0,20 (max. AWI: 4,20).

In die Evaluierung wurden alle *H. ovis*-Isolate sowie 35 Kontrollstämme Gram-positiver und Gram-negativer Bakterienspezies einbezogen und jeweils die AWI für HEA ( $\text{AWI}_{\text{HEA}}$ ) und das Referenzmedium CBPA ( $\text{AWI}_{\text{CBPA}}$ ) ermittelt. Im Anschluss wurde der resultierende „relative Wachstumsindex“ (RWI) in der Form  $\text{RWI} = \text{AWI}_{\text{HEA}} / \text{AWI}_{\text{CBPA}}$  berechnet.

Für Isolate und Kontrollstämme mit einem RWI > 0,70 erfolgte zusätzlich die Beurteilung der kolonimorphologischen Eigenschaften Durchmesser (> oder < 1 mm), Hämolyseform und Schwärzung. Hierzu wurden nach Subkultur auf HEA (dreifacher Verdünnungsausstrich) und Inkubation ( $36 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ , 6 %  $\text{CO}_2$ , 72 h) die letzten fünf Einzelkolonien bewertet. Die Messung der Koloniedurchmesser wurde mittels Stereomikroskop mit integrierter Okularmessplatte bei vierfacher Gesamtvergrößerung durchgeführt, wobei 40 Teilstriche einer Strecke von 1 mm entsprachen.

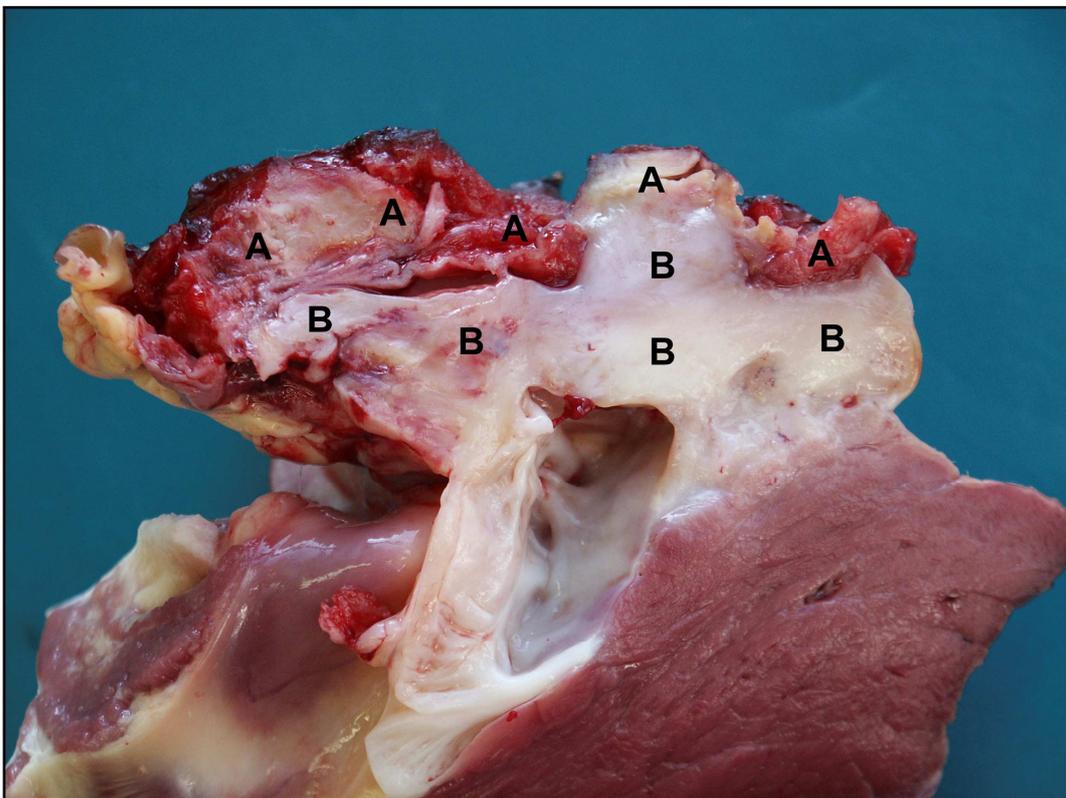


**Abb. 8:** „ecometric technique“ nach MOSSEL, Inokulationsmuster

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Pathologisch-anatomische Untersuchung

Alle untersuchten Herzen zeigten das Bild einer *Endocarditis valvularis thromboticans* mit ausgeprägten Klappenvegetationen, wobei die einzelnen Thrombi Haselnuss- bis Kinderfaustgröße erreichten. Der lumenseitige Anteil bestand im Wesentlichen aus unorganisiertem fibrinösem Exsudat. Tiefere Anteile wiesen organisiertes Granulationsgewebe auf das schließlich in avaskuläres Narbengewebe überging (Abb. 9). Die anatomischen Zuordnungen der Endokarditiden sind in Tab. 11 dargestellt.



**Abb. 9:** *Endocarditis valvularis thromboticans*, Thrombus mit lumenseitigem Fibrin (A) sowie Granulations- bzw. Narbengewebe (B)

**Tab. 11:** Anatomische Zuordnung untersuchter Endokarditiden

Herzklappe	Fälle	
	n	%
<i>Valva tricuspidalis</i>	39	70,9
<i>Valvae tricuspidalis et bicuspidalis</i> (auch Myokardabszess)	1	1,8
<i>Valvae tricuspidalis et trunci pulmonalis</i>	1	1,8
<i>Valva trunci pulmonalis</i>	6	10,9
<i>Valva bicuspidalis</i>	6	10,9
<i>Valva aortae</i>	1	1,8
Atrioventrikularklappe (nicht näher identifizierbar)	1	1,8

## 5.2 Primärkultur und präsumtive Erregeridentifizierung

Aus allen 55 Proben veränderter Herzklappen wurden Bakterien in hohem Keimgehalt angezüchtet. Die Isolate lagen meist in Reinkultur vor oder waren von nur vereinzelt Kolonien unspezifischer Flora wie coliformen Bakterien, Enterokokken und/oder Koagulase-negativen Staphylokokken begleitet. Mischinfektionen wurden in lediglich drei Fällen festgestellt. Die Ergebnisse der präsumtiven Erregeridentifizierung sind in Tab. 12 zusammengefasst.

**Tab. 12: Ergebnisse der präsumtiven Erregeridentifizierung**

Primäres Isolat	Weitere Isolate	Fälle	
		n	%
<i>A. pyogenes</i>	keine	33	60,0
	<i>S. aureus</i>	1	1,8
<i>H. ovis</i>	keine	16	29,1
	<i>P. aeruginosa, E. faecalis</i>	1	1,8
	<i>S. dysgalactiae</i> ssp. <i>dysgalactiae</i>	1	1,8
<i>S. dysgalactiae</i> ssp. <i>dysgalactiae</i>	keine	1	1,8
<i>Streptococcus</i> sp.	keine	1	1,8
Spezies der Familie <i>Neisseriaceae</i>	keine	1	1,8

*H. ovis*-Isolate zeigten in der Primärkultur deutlichen Satellitismus um die *S. aureus*-Amme (Abb. 7). Nur in einem Fall (07LB237) konnte feines Wachstum auch außerhalb der Hämolysezone des Ammenkeims beobachtet werden.

## 5.3 Ermittlung von Tierdaten und Herkunftsbeständen

Von 18 Rindern mit positivem *H. ovis*-Nachweis waren 17 weiblichen und eines männlichen Geschlechts. Das Durchschnittsalter betrug 47 Monate. Die Tiere stammten aus 17 Beständen, welche über die Bundesländer Brandenburg, Mecklenburg-Vorpommern, Niedersachsen und Sachsen-Anhalt verteilt waren (Tab. 13).

**Tab. 13: Tierdaten und Herkunftsbestände von Rindern mit positivem *H. ovis*-Nachweis**

Isolat	Geschlecht	Rasse	Alter (Monate)	Herkunftsbestand	
				PLZ	Bundesland
06LB560	W	SBT	56	D-26725	Niedersachsen
06URF77	M	FLF	20	D-14550	Brandenburg
06LB733	W	SBT	27	D-14913	Brandenburg
06LB769	W	SBT	55	D-15936	Brandenburg
06LB779	W	SBT	50	D-15910	Brandenburg
06LB813	W	SBT	48	D-01945	Brandenburg
06LB838	W	SBT	75	D-15926	Brandenburg
06LB842	W	XMM	53	D-14778	Brandenburg
07LB9	W	SBT	29	D-39291	Sachsen-Anhalt

**Tab. 13: Tierdaten und Herkunftsbestände von Rindern mit positivem *H. ovis*-Nachweis (Fortsetzung)**

Isolat	Geschlecht	Rasse	Alter (Monate)	Herkunftsbestand	
07LB26	W	SBT	33	D-39539	Sachsen-Anhalt
07LB227	W	SBT	61	D-01945	Brandenburg
07LB237	W	SBT	59	D-15936*	Brandenburg
07LB239	W	SBT	35	D-15936*	Brandenburg
07/40066	W	SBT	43	D-04932	Brandenburg
07LB242	W	SBT	48	D-14913	Brandenburg
07LB432	W	SBT	36	D-19357	Brandenburg
07LB637	W	SBT	61	D-39291	Sachsen-Anhalt
08LB103	W	XMM	59	D-23936	Mecklenburg-Vorpommern

W weiblich, M männlich, SBT Schwarzbunt, FLF Fleckvieh Fleischnutzung, XMM Kreuzung Milchrind X Milchrind,

\* identischer Bestand

#### 5.4 16S rRNA-Gen Sequenzanalyse von *Helcococcus ovis*-verdächtigen Isolaten

Von den *H. ovis*-verdächtigen Isolaten und dem Referenzstamm *H. ovis* CCUG 39041 wurde ein jeweils ca. 1300 bp (1291 – 1355 bp) langer Abschnitt des 16S rRNA-Gens sequenziert (max. 0,23 % fragliche Basenpositionen) und analysiert. Der mittels BLASTN durchgeführte Vergleich der ermittelten Sequenz mit allen in GenBank/EMBL/DDBJ hinterlegten Daten ergab in jedem Fall die größte Übereinstimmung mit dem Typstamm *H. ovis* CCUG 37441<sup>T</sup> (GenBank Accession# Y16279) (99 %) gefolgt von *H. kunzii* clone 1 (GenBank Accession# DQ082898) (96 %).

In weiteren Analysen mit Hilfe des Softwaretools „MegAlign“ wurde eine Übereinstimmung der Isolate untereinander von mindestens 99,6 % sowie mit dem Typstamm *H. ovis* CCUG 37441<sup>T</sup> von mindestens 99,7 % festgestellt. Die max. Übereinstimmung mit den Typstämmen *H. kunzii* NCFB 2900 (entspricht DSM 10548<sup>T</sup>; GenBank Accession# X69837) und *H. suecicensis* CCUG 47334<sup>T</sup> (GenBank Accession# AJ579914) betrug 95,5 % bzw. 94,2 % (Abb. 10).

		Identität %																						
Divergenz %	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22		
	1	99.8	100.0	99.9	99.9	99.8	99.9	99.9	99.8	99.8	99.8	99.8	99.9	99.9	99.8	99.8	99.8	99.9	99.9	99.9	95.4	94.0	1	
	2	0.1	99.8	99.8	99.9	99.7	99.8	99.8	99.8	99.6	99.8	99.8	99.9	99.8	99.6	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	95.3	94.0	2
	3	0.0	0.1	99.9	99.9	99.8	99.9	99.9	99.8	99.8	99.8	99.8	99.9	99.9	99.8	99.8	99.8	99.9	99.9	99.9	99.9	95.4	94.0	3
	4	0.0	0.1	0.0	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.9	99.8	99.7	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	95.4	94.0	4
	5	0.0	0.1	0.0	0.0	99.8	99.8	99.8	99.9	99.7	99.9	99.9	100.0	99.8	99.7	99.9	99.9	99.8	99.8	99.8	99.8	95.4	94.0	5
	6	0.2	0.2	0.1	0.2	99.8	99.8	99.9	99.7	99.8	99.7	99.7	99.8	99.9	99.8	99.7	99.7	99.8	99.8	99.8	99.8	95.5	94.0	6
	7	0.1	0.2	0.1	0.1	0.2	99.8	99.8	99.9	99.7	99.9	99.8	99.8	99.8	99.7	99.8	99.9	99.8	100.0	100.0	95.3	94.0	7	
	8	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.2	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	95.4	94.0	8	
	9	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	99.6	100.0	99.8	99.9	99.9	99.8	99.6	99.9	100.0	99.8	99.9	99.9	95.3	94.0	9	
	10	0.1	0.2	0.1	0.1	0.0	0.2	0.0	0.2	99.6	99.6	99.7	99.8	99.8	99.7	99.6	99.6	99.7	99.7	99.7	95.3	93.9	10	
	11	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.2	0.0	0.2	0.0	0.2	99.8	99.9	99.8	99.6	99.9	100.0	99.8	99.9	99.9	95.3	94.0	11	
	12	0.0	0.1	0.0	0.0	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	99.9	99.8	99.8	99.6	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	95.3	94.0	12	
	13	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.2	0.1	0.1	0.1	0.0	99.8	99.8	99.8	99.7	99.8	99.9	99.8	99.8	99.8	95.4	94.0	13	
	14	0.1	0.2	0.1	0.0	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	0.1	99.8	99.8	99.8	99.7	99.8	99.8	99.8	99.8	95.5	94.1	14	
	15	0.2	0.3	0.2	0.2	0.2	0.3	0.2	0.3	0.2	0.3	0.2	0.2	0.2	99.7	99.6	99.7	99.7	99.7	99.7	95.5	94.0	15	
	16	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	0.1	0.2	0.1	0.2	0.2	0.2	99.9	99.7	99.7	99.8	99.8	99.8	95.4	93.9	16	
	17	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.2	0.0	0.2	0.0	0.1	0.1	0.1	0.2	0.3	0.1	99.8	99.9	99.9	99.9	95.5	94.2	17	
	18	0.0	0.1	0.0	0.0	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0	0.0	0.1	0.2	0.2	0.1	99.9	99.9	99.9	95.4	94.2	18	
	19	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.2	0.0	0.2	0.0	0.0	0.1	0.1	0.2	0.3	0.1	0.0	0.1	99.9	100.0	95.5	94.2	19	
	20	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.2	0.0	0.2	0.0	0.0	0.1	0.1	0.2	0.3	0.1	0.0	0.1	0.0	95.4	94.1	20		
	21	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.6	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.4	4.4	4.5	4.5	93.7	21		
	22	6.1	6.1	6.1	6.1	6.1	6.2	6.2	6.1	6.1	6.1	6.1	6.1	6.1	6.2	6.2	5.8	5.9	5.9	6.1	6.4	22		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22		

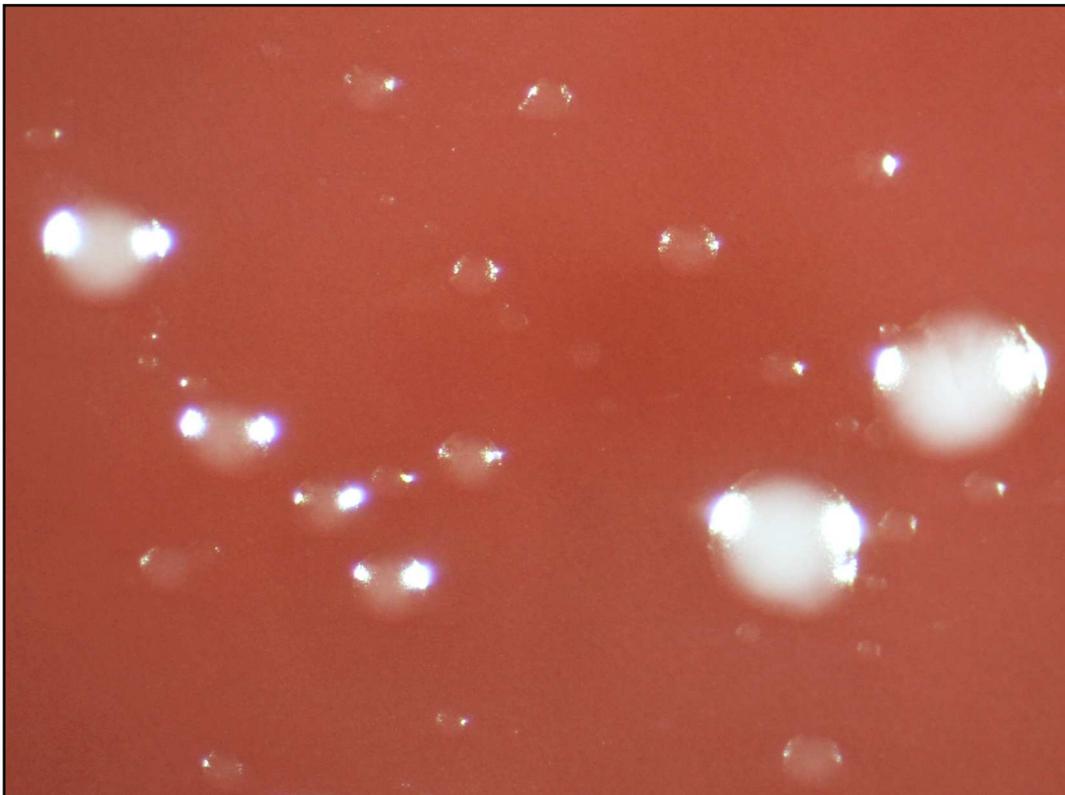
06LB560.seq  
 06URF77.seq  
 06LB733.seq  
 06LB769.seq  
 06LB779.seq  
 06LB813.seq  
 06LB838.seq  
 06LB842.seq  
 07LB9.seq  
 07LB26.seq  
 07LB227.seq  
 07LB237.seq  
 07LB239.seq  
 07-40066.seq  
 07LB242.seq  
 07LB432.seq  
 07LB637.seq  
 08LB103.seq  
 H. ovis CCUG 39041.seq  
 H. ovis Y16279.seq  
 H. kunzii X69837.seq  
 H. sueciensis AJ579914.seq

Abb. 10: Prozentuale Identität und Divergenz der 16S rRNA-Gen Sequenzen von 18 *H. ovis*-Isolaten, des Stammes *H. ovis* CCUG 39041 sowie der Typstämme *H. ovis*, *H. kunzii* und *H. sueciensis*

## 5.5 Phänotypische Charakterisierung von *Helcococcus ovis*-Isolaten

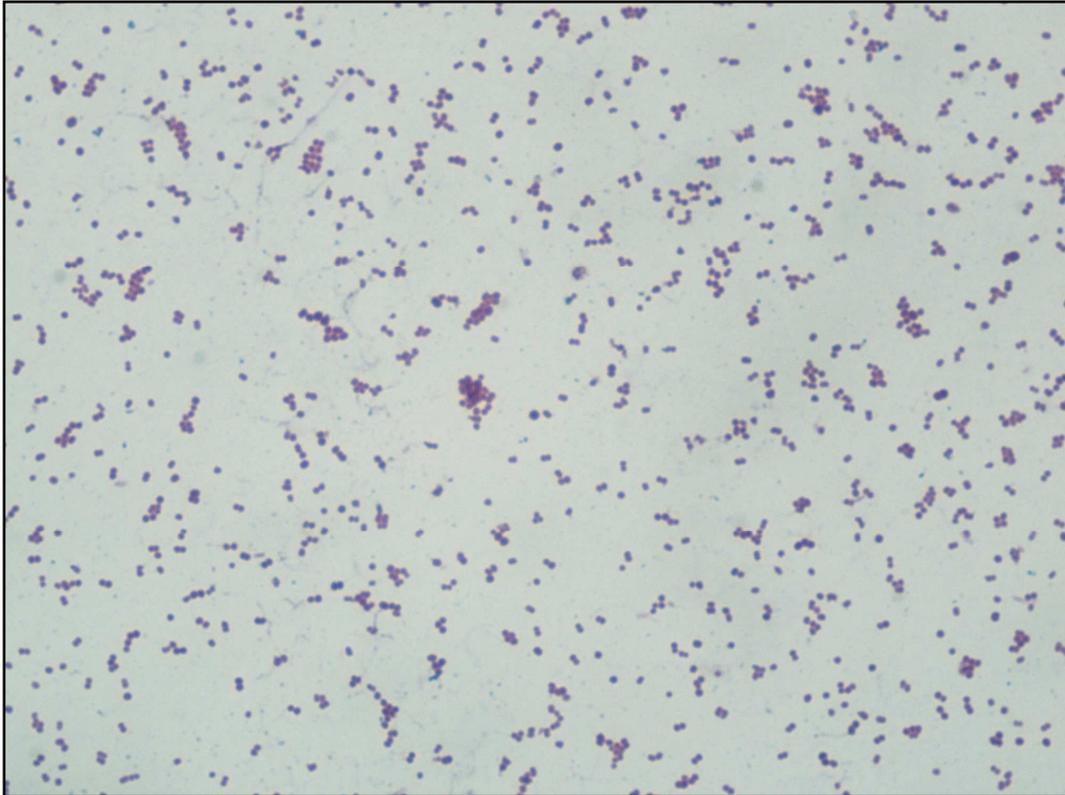
### 5.5.1 Kolonie- und Zellmorphologie

Die *H. ovis*-Kulturen wiesen einen ausgeprägten Polymorphismus auf der auch nach Subkultur auf CBPA stabil blieb. Nach 48 h Inkubation ( $36 \pm 1$  °C, 6 % CO<sub>2</sub>) erreichten die größten Kolonien einen Durchmesser von ca. 0,5 mm, waren rundlich und von hellgrauer Farbe. Dazwischen fanden sich feine, mit bloßem Auge eben noch sichtbare, rundliche, transparente Kolonien sowie feinste Kolonien, die nur mittels Stereomikroskop erkennbar waren (Abb. 11). Nach 48 h Inkubation waren alle *H. ovis*-Isolate anhämolysch auf CBA und CBPA.



**Abb. 11: *H. ovis*-Isolat 08LB108, Kolonienpolymorphismus auf CBPA nach 48 h, Vergrößerung x20**

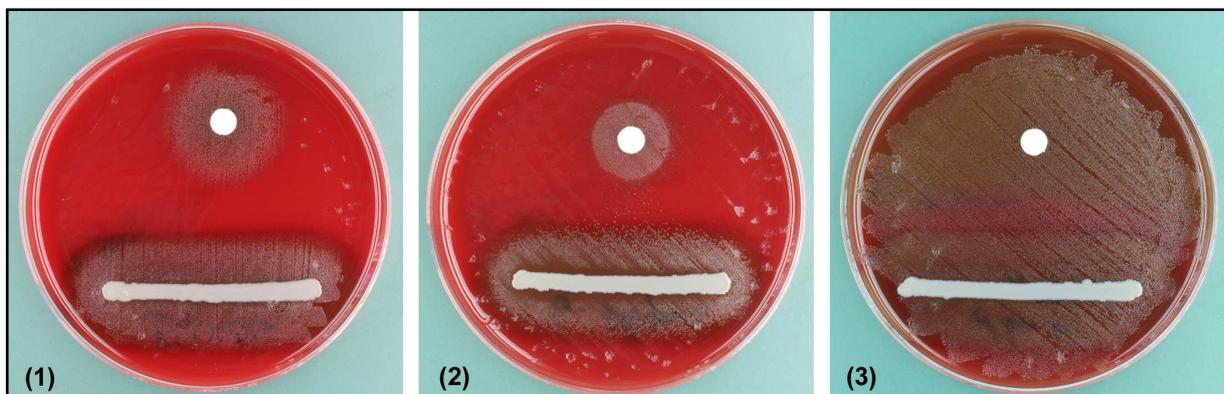
In der Gramfärbung stellten sich alle *H. ovis*-Isolate als positive bis labile Kokken dar und waren überwiegend in Paaren und Haufen gelagert (Abb. 12).



**Abb. 12: *H. ovis*-Isolat 06LB838, Gram-positive Kokken in Paaren und Haufen, Vergrößerung x1000**

### 5.5.2 Prüfung der Ammen- und Pyridoxal-Abhängigkeit

Die Beurteilung des Ammen- und Pyridoxal-Abhängigkeit erfolgte in den Kategorien „positiv“ (Wachstum auf die Diffusions- bzw. Hämolysezone beschränkt), „indifferent“ (Wachstum von vereinzelt Kolonien auch außerhalb der Diffusions- bzw. Hämolysezone) und „negativ“ (Wachstum auf der gesamten Oberfläche des Agarmediums). In Abb. 13 sind vergleichend ein positiver Test sowie eine positive und die negative Kontrolle dargestellt.



**Abb. 13: Ammen- und Pyridoxalabhängigkeit; (1) positives *H. ovis*-Isolat (06LB769), (2) positive Kontrolle (*G. elegans* DSM 11693<sup>T</sup>), (3) negative Kontrolle (*H. kunzii* DSM 10548<sup>T</sup>); CBPA, 48 h**

*H. ovis*-Isolate und -Referenzstämme sowie positive und negative Kontrollstämme zeigten für Ammen- und Pyridoxalabhängigkeit stets übereinstimmende Ergebnisse. Von den *H. ovis*-Isolaten wurden 13 (72,2 %) positiv und 5 (27,8 %) negativ getestet. Der Referenzstamm *H. ovis* CCUG 37441<sup>T</sup> zeigte ebenfalls ein negatives Resultat. *H. ovis* CCUG 39041 war positiv nach 24 h und indifferent nach 48 h Inkubation (Tab. 14).

**Tab. 14: Ammen- und Pyridoxalabhängigkeit nach Inkubation für 24 h und 48 h**

Isolat bzw. Stamm	Amme		Pyridoxal	
	24 h	48 h	24 h	48 h
06LB560	+/-	-	+/-	-
06URF77	+/-	-	+/-	-
06LB733	+	+	+	+
06LB769	+	+	+	+
06LB779	+	+	+	+
06LB813	+	+	+	+
06LB838	+	+	+	+
06LB842	-	-	-	-
07LB9	+	+	+	+
07LB26	+	+	+	+
07LB227	+	+	+	+
07LB237	+/-	-	+/-	-
07LB239	+	+	+	+
07/40066	+	+	+	+
07LB242	+	+	+	+
07LB432	+	+	+	+
07LB637	+	+	+	+
08LB103	+/-	-	+/-	-
<i>H. ovis</i> CCUG 39041	+	+/-	+	+/-
<i>H. ovis</i> CCUG 37441 <sup>T</sup>	-	-	-	-
<i>A. defectiva</i> DSM 9849 <sup>T</sup> (K+)	+	+	+	+
<i>G. adiacens</i> DSM 9848 <sup>T</sup> (K+)	+	+	+	+
<i>G. elegans</i> DSM 11693 <sup>T</sup> (K+)	+	+	+	+
<i>H. kunzii</i> DSM 10548 <sup>T</sup> (K-)	-	-	-	-

(K+) positiver Kontrollstamm, (K-) negativer Kontrollstamm; + positiv, +/- indifferent, - negativ

### 5.5.3 Biochemische Leistungen

#### 5.5.3.1 Ergebnisse mit API-Systemen

Alle *H. ovis*-Isolate und -Referenzstämme wurden zweifach getestet. Die Interpretation der Einzelreaktionen erfolgte für jeden Test in den Kategorien „positiv“, „indifferent“ und „negativ“. Unabhängig von der Reihenfolge der Reaktionsergebnisse wurde die abschließende Beurteilung der biochemischen Leistung für das jeweilige Isolat/den jeweiligen Referenzstamm entsprechend dem unten stehendem Schema durchgeführt (Tab. 15). Die Kombina-

tion „positiv/negativ“ ergab sich für kein Reaktionspaar, Testwiederholungen waren somit nicht erforderlich.

**Tab. 15: Beurteilungsschema für mit API Systemen ermittelte biochemische Leistungen**

Testergebnis 1	Testergebnis 2	Beurteilung
positiv	positiv	positiv
positiv	indifferent	positiv
positiv	negativ	Testwiederholung
indifferent	indifferent	negativ
indifferent	negativ	negativ
negativ	negativ	negativ

Für einige Enzymaktivitäten wurden in Abhängigkeit vom Substrat unterschiedliche Ergebnisse erzielt. So war die Alkalische Phosphatase stets positiv im API ZYM (Substrat: 2-Naphtylphosphat) aber negativ (Farbumschlag zu sehr blassem Gelb) im API rapid ID 32 Strep (Substrat: 4-Nitrophenyl- $\beta$ D-Galactopyranosid-2-CHA). Die  $\beta$ -Galactosidase-Reaktion war immer positiv mit dem Substrat Resorufin- $\beta$ D-Galactopyranosid (API rapid ID 32 Strep), bis auf ein Isolat aber negativ mit 2-Naphtyl- $\beta$ D-Galactopyranosid (API rapid ID 32 Strep und API ZYM). *H. ovis*-Isolate bzw. -Referenzstämme mit positiven Resultaten für  $\beta$ -Glucuronidase im API rapid ID 32 Strep (Substrat: Resorufin- $\beta$ D-Glucuronid) waren negativ im API ZYM (Substrat: Naphtol-AS-BI- $\beta$ D-Glucuronid). Detaillierte Darstellungen der mit den Systemen API rapid ID 32 Strep und API ZYM ermittelten biochemischen Leistungen erfolgen in Tab. 16 und Tab. 17.

### 5.5.3.2 Ergebnisse mit Rosco Diatabs

Mit Rosco Diatabs wurden die Aktivitäten von Alkalischer Phosphatase, Arginin Dihydrolase,  $\alpha$ -Galactosidase,  $\beta$ -Galactosidase,  $\beta$ -Glucosidase,  $\beta$ -Glucuronidase, Leucin Aminopeptidase und Pyrrolidonyl Arylamidase, die Hippurat-Hydrolyse sowie die Säurebildung aus Maltose und Saccharose für alle *H. ovis*-Isolate und -Referenzstämme einmalig geprüft (Tab. 18). Die Bewertung von Alkalischer Phosphatase und Hippurat-Hydrolyse erfolgte nach 4 h, die der anderen Tests nach Bebrütung über Nacht.

Für Alkalische Phosphatase (Substrat: p-Nitrophenyl-Phosphat) wurden stets negative Ergebnisse erzielt. Bis auf zwei Isolate deckten sich die Resultate für  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität (Substrat: o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid) mit denen des API rapid ID 32 Strep (Substrat: Resorufin- $\beta$ D-Galactopyranosid), allerdings waren die Farbumschläge überwiegend schwach. Mit Ausnahme eines Isolates waren die Ergebnisse für  $\beta$ -Glucuronidase (Substrat: p-Nitrophenyl- $\beta$ D-Glucuronsäure) ebenfalls übereinstimmend mit denen des API rapid ID 32

Strep. Für Leucin Aminopeptidase zeigten vier *H. ovis*-Isolate und der Referenzstamm *H. ovis* CCUG 39041 im Unterschied zum API ZYM negative Ergebnisse (Farbumschlag nach Gelb bzw. Gelb-Orange).

#### **5.5.4 Prüfung weiterer Eigenschaften**

Alle *H. ovis*-Isolate und -Referenzstämme waren Katalase-negativ, Vancomycin-sensibel und zeigten Wachstum unter anaeroben Kulturbedingungen.

Tab. 16: API rapid ID 32 Strep, Biochemische Leistungen von *H. ovis*-Isolaten und -Referenzstämmen

Reaktion <sup>1</sup>	<i>H. ovis</i> CCUG 37441 <sup>T</sup>	<i>H. ovis</i> CCUG 39041	06LB560	06URF77	06LB733	06LB769	06LB779	06LB813	06LB838	06LB842	07LB9	07LB26	07LB227	07LB237	07LB239	07/40066	07LB242	07LB432	07LB637	08LB103	Isolate positiv n (%)
Arginin Dihydrolase	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0 (0)
β-Glucosidase	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0 (0)
β-Galactosidase <sup>2</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	18 (100)
β-Glucuronidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	11 (61)
α-Galactosidase	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0 (0)
Alkalische Phosphatase	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0 (0)
Ribose	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0 (0)
Mannitol	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0 (0)
Sorbitol	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0 (0)
Lactose	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	4 (22)
Trehalose	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	5 (27)
Raffinose	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0 (0)
Acetoin (Voges-Proskauer)	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0 (0)
Alanyl-Phenylalanyl-Prolin-Arylamidase	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0 (0)
β-Galactosidase <sup>3</sup>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1 (6)
Pyroglutaminsäure-Arylamidase	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0 (0)
N-Acetyl-β-Glucosaminidase	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0 (0)
Glycyl-Tryptophan-Arylamidase	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0 (0)
Hippurat-Hydrolyse	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0 (0)
Glycogen	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0 (0)
Pullulan	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0 (0)
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	11 (61)
Melibiose	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	18 (100)
Melezitose	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0 (0)
Saccharose	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0 (0)
L-Arabinose	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0 (0)
D-Arabitol	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0 (0)
Methyl-βD-Glucopyranosid	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0 (0)
Tagatose	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1 (6)
β-Mannosidase	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0 (0)
Cyclodextrin	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	16 (89)
Urease	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0 (0)

+ positive, - negative Reaktion; <sup>1</sup> Reihenfolge der Anordnung im Testkit; <sup>2</sup> Substrat: Resorufin-βD-Galactopyranosid; <sup>3</sup> Substrat: 2-Naphthyl-βD-Galactopyranosid

Tab. 17: API ZYM, Biochemische Leistungen von *H. ovvis*-Isolaten und -Referenzstämmen

Reaktion <sup>1</sup>	<i>H. ovvis</i> CCUG 37441 <sup>T</sup>	<i>H. ovvis</i> CCUG 39041	06LB560	06URF77	06LB733	06LB769	06LB779	06LB813	06LB838	06LB842	07LB9	07LB26	07LB227	07LB237	07LB239	07/40066	07LB242	07LB432	07LB637	08LB103	Isolate positiv n (%)
Alkalische Phosphatase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	18 (100)
Esterase (C4)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	18 (100)
Esterase Lipase (C8)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	18 (100)
Lipase (C14)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 (0)
Leucin Arylamidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	18 (100)
Valin Arylamidase	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	16 (85)
Cystin Arylamidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	18 (100)
Trypsin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 (0)
$\alpha$ -Chymotrypsin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 (0)
Saure Phosphatase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	18 (100)
Naphtol-AS-BI-Phosphohydrolase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	18 (100)
$\alpha$ -Galactosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 (0)
$\beta$ -Galactosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 (0)
$\beta$ -Glucuronidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 (0)
$\alpha$ -Glucosidase <sup>2</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14 (80)
$\beta$ -Glucosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 (0)
N-Acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 (0)
$\alpha$ -Mannosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 (0)
$\alpha$ -Fucosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 (0)

+ positive, - negative Reaktion; <sup>1</sup> Reihenfolge der Anordnung im Testkit; <sup>2</sup> häufig schwach-positiv

Tab. 18: Rosco Diatabs, Biochemische Leistungen von *H. ovis*-Isolaten und -Referenzstämmen

Reaktion	<i>H. ovis</i> CCUG 37441 <sup>T</sup>	<i>H. ovis</i> CCUG 39041	06LB560	06URF77	06LB733	06LB769	06LB779	06LB813	06LB838	06LB842	07LB9	07LB26	07LB227	07LB237	07LB239	07/40066	07LB242	07LB432	07LB637	08LB103	Isolate positiv n (%)
Alkalische Phosphatase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 (0)
Arginin Dihydrolase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 (0)
α-Galactosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 (0)
β-Galactosidase <sup>1</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	16 (89)
β-Glucosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 (0)
β-Glucuronidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10 (56)
Leucin Aminopeptidase	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14 (78)
Pyrrolidonyl Arylamidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 (0)
Hippurat-Hydrolyse	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 (0)
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	18 (100)
Saccharose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 (0)

+ positive, - negative Reaktion; <sup>1</sup> überwiegend schwach-positiv

## 5.6 Empfindlichkeitsprüfung von *Helcococcus ovis*-Isolaten

### 5.6.1 Standardisierung des Inokulums

Nach Verdünnung 1:100 der 0,5 McFarland-Suspension in CAMHB+PP lagen die mittleren Inokulumdichten ( $\bar{x}_{\text{CBPA}} \times 10^4$  kbE/ml) mehrheitlich unterhalb und nach Verdünnung 1:40 überwiegend oberhalb des DVG-Toleranzbereiches ( $5,0 \pm 3,0 \times 10^5$  kbE/ml) (Tab. 19). Für die sich anschließenden MHK-Bestimmungen der *H. ovis*-Isolate wurde daraufhin eine Verdünnung 1:60, d. h. 250 µl 0,5 McFarland-Suspension in 15 ml CAMHB+PP, gewählt.

**Tab. 19: Koloniebildende Einheiten auf CBPA nach Verdünnung 0,5 McFarland-Suspension in CAMHB+PP 1:100 bzw. 1:40 und resultierende mittlere Inokulumdichten**

Isolat	Verdünnung 1:100			Verdünnung 1:40		
	CBPA 1 (kbE)	CBPA 2 (kbE)	$\bar{x}_{\text{CBPA}} \times 10^4$ (kbE/ml)	CBPA 1 (kbE)	CBPA 2 (kbE)	$\bar{x}_{\text{CBPA}} \times 10^4$ (kbE/ml)
06URF77	11	6	8,5	86	110	98,0
06LB560	10	15	12,5	89	107	98,0
06LB733	16	18	17,0	129	88	108,5
06LB779	13	7	10,0	58	54	56,0
06LB813	37	17	27,0	61	85	73,0
07LB26	13	8	10,5	99	89	94,0
07LB237	30	22	26,0	69	70	69,5

### 5.6.2 Bestimmung der MHK

Für jedes *H. ovis*-Isolat wurden in zwei unabhängigen Messreihen die MHK von jeweils 22 Wirkstoffen ermittelt. Auf die MHK-Bestimmung von Oxacillin (Platten NLV 41 bzw. 58) wurde verzichtet, weil dieser Wirkstoff als Surrogat für Methicillin ausschließlich der Detektion Methicillin-resistenter *Staphylococcus* spp. dient. Cefotaxim (Platte NLV 67 A) und Cefazolin (Platte NLV 67 B) wurden nicht in die Auswertungen einbezogen da die entsprechenden Werte aufgrund des genannten Chargenwechsels nicht für jedes Isolat ermittelt werden konnten.

Die Tests waren bei Verwendung des Spiegels unter optimalen Lichtverhältnissen i. d. R. gut auswertbar. Die Kontrollen zeigten übereinstimmend einen teppichartigen, fein granulierten Bodensatz mit einem Durchmesser  $\geq 2$  mm (Abb. 14). In früheren Arbeiten beschriebene, Medium-bedingte „Pseudoplaques“ [1] konnten auch in dieser Studie beobachtet werden, waren aufgrund fehlender Granulierung aber leicht von echtem Wachstum zu unterscheiden.

Die Überprüfung der mittleren Inokulumdichten ergab für fünf Isolate in einer der Messreihen geringe Abweichungen vom DVG-Toleranzbereich. Für vier Isolate wurden Werte unterhalb ( $0,8 - 1,7 \times 10^5$  kbE/ml) und für ein Isolat ein Wert oberhalb ( $11,5 \times 10^5$  kbE/ml) der

Toleranzgrenzen ermittelt. In Übereinstimmung mit allen anderen Isolaten unterschieden sich die MHK-Werte der ersten und zweiten Messreihe auch in diesen Fällen um höchstens eine log<sub>2</sub>-Verdünnungsstufe.



**Abb. 14: MHK-Wachstumskontrollen**

In Tab. 20 sind die Ergebnisse der MHK-Bestimmungen dargestellt. Unter Berücksichtigung aller Daten der ersten und zweiten Messreihe erfolgte für jeden Wirkstoff die Ermittlung der MHK-Werte, bei denen 50 % (MHK<sub>50</sub>) bzw. 90 % (MHK<sub>90</sub>) der geprüften Isolate im Wachstum gehemmt wurden.

Tab. 20: Ergebnisse der MHK-Bestimmungen für 18 *H. ovis*-Isolate

Wirkstoff	Isolate (n Messreihe 1/n Messreihe 2) mit MHK-Wert (µg/ml) <sup>1</sup>																MHK <sub>50</sub> (µg/ml) <sup>2</sup>	MHK <sub>90</sub> (µg/ml) <sup>2</sup>
	0,008	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256		
Penicillin G		1/1	3/3	0/2	5/3	9/9	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0			0,12	0,25
Ampicillin			0/0	1/1	3/3	6/4	8/10	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0			0,25	0,5
Amoxicillin/ Clavulansäure (2:1) <sup>3</sup>			0/0	0/0	4/4	9/11	5/3	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0			0,25	0,5
Cephalothin				2/2	4/5	8/9	4/2	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0,25	0,5
Cefoperazon				7/7	11/10	0/1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0				0,12	0,12
Ceftiofur			0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/1	4/6	12/10	2/1	0/0	0/0	0/0			4	4
Cefquinom		0/0	0/0	0/0	0/0	0/1	3/3	7/5	8/9	0/0	0/0	0/0	0/0				1	2
Enrofloxacin	0/0	0/0	0/0	0/0	0/1	6/2	8/11	0/0	0/0	0/0	1/0	3/4					0,5	≥ 16
Tetracyclin					1/1	1/1	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	2/3	11/10	2/2	0/0	0/0	32	64
Erythromycin		0/0	0/0	0/0	0/0	0/6	14/10	2/0	0/0	0/0	0/0	0/0	2/2				0,5	≥ 32
Spiramycin				0/0	0/1	6/14	10/1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/1	1/0	0/1	1/0		0,25	16
Tilmicosin				0/0	0/0	0/0	0/0	5/7	9/9	2/0	0/0	0/0	0/0	2/2			2	≥ 64
Tulathromycin			0/0	0/0	0/0	0/0	1/0	10/14	4/2	1/0	0/0	1/1	1/1	0/0			1	16
Tylosin				4/4	7/12	5/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	1/1	0/0	0/0			0,12	8
Clindamycin			0/0	2/12	15/5	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1			0,12	0,12
Pirlimycin			0/1	5/11	12/5	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1			0,12	0,12
Quinupristin/ Dalfopristin		0/0	0/0	6/5	12/13	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0				0,12	0,12
Gentamicin					0/0	0/0	0/0	1/5	7/10	10/3	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	2	4
Neomycin				0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	4/7	8/9	5/1	0/0	1/1		16	32
Chloramphenicol							0/0	0/0	10/15	8/3	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	2	4
Vancomycin		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	16/17	2/1	0/0	0/0	0/0	0/0				1	1
Trimethoprim/Sulfa- methoxazol (1:19) <sup>4</sup>		1/3	3/1	0/1	1/0	1/0	0/1	0/0	0/0	0/0	1/1	1/2	10/9				≥ 32	≥ 32

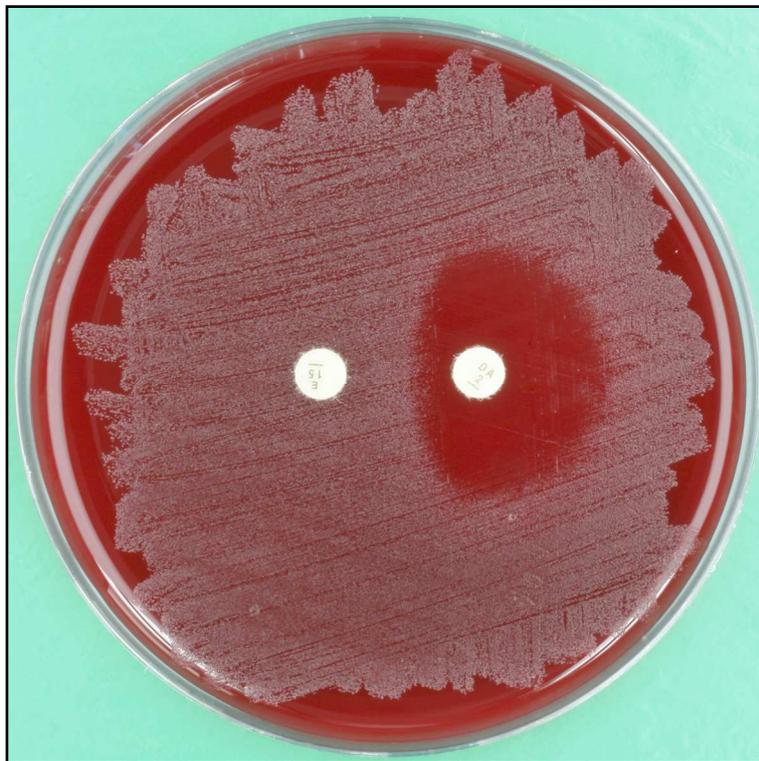
<sup>1</sup> für alle Wirkstoffe gilt: geringste getestete Konzentration lies ≤, höchste getestete Konzentration lies ≥; <sup>2</sup> ermittelt aus allen Werten der 1. und 2. Messreihe; <sup>3</sup> angegeben ist die Konzentration der Amoxicillin-Komponente, <sup>4</sup> angegeben ist die Konzentration der Trimethoprim-Komponente

### 5.6.3 Prüfung auf induzierbare Clindamycin-Resistenz („D-Zonen“-Test)

Entsprechend den unter 4.8.4 festgelegten Kriterien wurden drei Isolate auf induzierbare Clindamycin-Resistenz geprüft, davon eines mit positivem Ergebnis (Tab. 21, Abb. 15).

**Tab. 21: MHK-Werte für Erythromycin und Clindamycin sowie Ergebnisse des „D-Zonen“-Tests**

Isolat	Erythromycin		Clindamycin		„D-Zonen“-Test
	MHK 1 (µg/ml)	MHK 2 (µg/ml)	MHK 1 (µg/ml)	MHK 2 (µg/ml)	
06LB779	> 32	> 32	0,12	0,12	positiv
06LB838	1	0,5	0,12	0,12	negativ
06LB842	1	0,5	0,12	0,12	negativ



**Abb. 15: „D-Zonen“-Test, positives *H. ovis*-Isolat 06LB779, links Erythromycin (15 µg), rechts Clindamycin (2 µg)**

## 5.7 Entwicklung eines *Helicococcus*-Elektivagars

### 5.7.1 Ermittlung des absoluten und relativen Wachstumsindex

Von den geprüften Bakterienspezies zeigten alle Katalase-negativen, Gram-positiven Kokken (KNGPK) gutes Wachstum auf HEA (RWI  $\geq 0,79$ ). Für drei *H. ovis*-Isolate war der AWI für HEA sogar geringfügig höher als der für das Referenzmedium CBPA (RWI  $> 1,00$ ). Die getesteten Nicht-KNGPK wurden vollständig im Wachstum gehemmt (RWI = 0,00) (Tab. 22).

**Tab. 22: AWI<sub>CBPA</sub>, AWI<sub>HEA</sub> sowie resultierende RWI für 18 *H. ovis*-Isolate und 35 Kontrollstämme**

Spezies	Bezeichnung	AWI <sub>CBPA</sub>	AWI <sub>HEA</sub>	RWI
<i>A. defectiva</i>	DSM 9849 <sup>T</sup>	4,20	4,20	1,00
<i>A. hydrophila</i>	DSM 30187 <sup>T</sup>	3,80	0,00	0,00
<i>A. faecalis</i>	DSM 6174	4,20	0,00	0,00
<i>A. pyogenes</i>	LLB 03UD25 <sup>W</sup>	4,20	0,00	0,00
<i>B. cereus</i>	DSM 345	2,80	0,00	0,00
<i>C. pseudotuberculosis</i>	LLB 02YSZ7 <sup>W</sup>	4,20	0,00	0,00
<i>E. aerogenes</i>	DSM 30053 <sup>T</sup>	4,20	0,00	0,00
<i>E. faecalis</i>	ATCC 29212	4,20	4,20	1,00
<i>E. faecium</i>	DSM 6177	2,80	2,20	0,79
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	2,20	0,00	0,00
<i>G. adiacens</i>	DSM 9848 <sup>T</sup>	4,20	4,20	1,00
<i>G. elegans</i>	DSM 11693 <sup>T</sup>	4,20	4,20	1,00
<i>H. kunzii</i>	DSM 10548 <sup>T</sup>	4,20	4,20	1,00
<i>H. ovis</i>	CCUG 37441 <sup>T</sup>	4,20	4,00	0,95
<i>H. ovis</i>	CCUG 39041	4,20	4,00	0,95
<i>H. ovis</i>	06LB560	4,20	4,20	1,00
<i>H. ovis</i>	06URF77	4,00	4,20	1,05
<i>H. ovis</i>	06LB733	4,20	4,2	1,00
<i>H. ovis</i>	06LB769	4,20	4,20	1,00
<i>H. ovis</i>	06LB779	4,20	4,20	1,00
<i>H. ovis</i>	06LB813	4,00	4,00	1,00
<i>H. ovis</i>	06LB838	4,20	4,00	0,95
<i>H. ovis</i>	06LB842	4,20	4,20	1,00
<i>H. ovis</i>	07LB9	4,20	4,20	1,00
<i>H. ovis</i>	07LB26	4,20	4,20	1,00
<i>H. ovis</i>	07LB227	4,20	4,20	1,00
<i>H. ovis</i>	07LB237	4,20	4,20	1,00
<i>H. ovis</i>	07LB239	3,80	4,00	1,05
<i>H. ovis</i>	07/40066	3,80	4,20	1,11
<i>H. ovis</i>	07LB242	4,20	4,20	1,00
<i>H. ovis</i>	07LB432	4,00	4,00	1,00
<i>H. ovis</i>	07LB637	4,20	4,20	1,00
<i>H. ovis</i>	08LB103	4,20	4,20	1,00
<i>H. sueciensis</i>	CCUG 47334 <sup>T</sup>	4,20	4,20	1,00
<i>L. fermentum</i>	DSM 20391	4,20	0,00	0,00
<i>L. innocua</i>	DSM 20649 <sup>T</sup>	4,20	0,00	0,00
<i>L. monocytogenes</i>	DSM 12464	4,20	0,00	0,00
<i>M. haemolytica</i>	DSM 10531 <sup>T</sup>	4,20	0,00	0,00

**Tab. 22: AWI<sub>CBPA</sub>, AWI<sub>HEA</sub> sowie resultierende RWI für 18 *H. ovis*-Isolate und 35 Kontrollstämme (Fortsetzung)**

Spezies	Bezeichnung	AWI <sub>CBPA</sub>	AWI <sub>HEA</sub>	RWI
<i>M. luteus</i>	DSM 1790	4,00	0,00	0,00
<i>P. multocida</i>	LLB 04URF108 <sup>W</sup>	3,80	0,00	0,00
<i>P. mirabilis</i>	DSM 6674	4,20	0,00	0,00
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 27853	4,20	0,00	0,00
<i>S. aureus</i>	ATCC 25923	4,20	0,00	0,00
<i>S. capitis</i>	DSM 6180	4,20	0,00	0,00
<i>S. cohnii</i>	DSM 6669	4,20	0,00	0,00
<i>S. epidermidis</i>	DSM 1798	4,20	0,00	0,00
<i>S. xyloso</i>	DSM 6179	4,20	0,00	0,00
<i>S. agalactiae</i>	DSM 2134 <sup>T</sup>	4,20	4,20	1,00
<i>S. dysgalactiae</i> ssp. <i>dysgalactiae</i>	DSM 20662 <sup>T</sup>	4,20	4,20	1,00
<i>S. dysgalactiae</i> ssp. <i>equisimilis</i>	DSM 6176	4,20	4,00	0,95
<i>S. equi</i> ssp. <i>zooepidemicus</i>	DSM 20727 <sup>T</sup>	4,20	4,20	1,00
<i>S. uberis</i>	LLB 08URF15 <sup>W</sup>	4,20	4,20	1,00
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	DSM 8992 <sup>T</sup>	4,00	0,00	0,00

### 5.7.2 Ermittlung von Sensitivität und Spezifität

Definiert man KNGPK als auf HEA gesuchte und Nicht-KNGPK als auf HEA unerwünschte Mikroorganismen, lassen sich Sensitivität und Spezifität des Mediums wie in Tab. 23 dargestellt ermitteln [82].

**Tab. 23: Sensitivität und Spezifität von HEA auf der Basis von 53 Teststämmen (mod. nach SAWANT et al., 2002)**

KNGPK (n = 32)		Nicht-KNPGK (n = 21)		Sensitivität (%) (A / A + B) x 100	Spezifität (%) (D / C + D) x 100
Richtig positiv (AWI <sub>HEA</sub> > 0) A	Falsch negativ (AWI <sub>HEA</sub> = 0) B	Falsch positiv (AWI <sub>HEA</sub> > 0) C	Richtig negativ (AWI <sub>HEA</sub> = 0) D		
32	0	0	21	100	100

### 5.7.3 Beurteilung koloniemorphologischer Eigenschaften

Sowohl alle *H. ovis*-Isolate und -Referenzstämme als auch die Kontrollstämme *H. kunzii* DSM 10548<sup>T</sup> und *H. sueciensis* CCUG 47334<sup>T</sup> wiesen auf HEA nach 72 h Inkubation (36 ± 1 °C, 6 % CO<sub>2</sub>) einen Koloniedurchmesser < 1 mm auf und zeigten weder Hämolyse noch Schwärzung. *Helcococcus* spp. konnten anhand dieser Merkmale von Enterokokken, Streptokokken sowie *A. defectiva* und *Granulicatella* spp. abgegrenzt werden (Tab. 24). Der zuvor für *H. ovis*-Isolate beschriebene Kolonienpolymorphismus (5.5.1) war auch auf HEA zu beobachten.

**Tab. 24: Koloniemorphologische Eigenschaften von 18 *H. ovis*-Isolaten sowie 14 KNGPK-Kontrollstämmen auf HEA (72 h, 36 ± 1 °C, 6 % CO<sub>2</sub>)**

Spezies	Bezeichnung	$\bar{x}_{KD5}$ (mm)	Hämolyse	Schwärzung
<i>A. defectiva</i>	DSM 9849 <sup>T</sup>	0,8	α	–
<i>E. faecalis</i>	ATCC 29212	1,6	γ	–
<i>E. faecium</i>	DSM 6177	1,4	α	+
<i>G. adiacens</i>	DSM 9848 <sup>T</sup>	1,0	α	+
<i>G. elegans</i>	DSM 11693 <sup>T</sup>	0,9	α	–
<i>H. kunzii</i>	DSM 10548 <sup>T</sup>	0,4	γ	–
<i>H. ovis</i>	CCUG 37441 <sup>T</sup>	0,3	γ	–
<i>H. ovis</i>	CCUG 39041	0,5	γ	–
<i>H. ovis</i>	06LB560	0,6	γ	–
<i>H. ovis</i>	06URF77	0,6	γ	–
<i>H. ovis</i>	06LB733	0,4	γ	–
<i>H. ovis</i>	06LB769	0,5	γ	–
<i>H. ovis</i>	06LB779	0,7	γ	–
<i>H. ovis</i>	06LB813	0,5	γ	–
<i>H. ovis</i>	06LB838	0,4	γ	–
<i>H. ovis</i>	06LB842	0,5	γ	–
<i>H. ovis</i>	07LB9	0,5	γ	–
<i>H. ovis</i>	07LB26	0,6	γ	–
<i>H. ovis</i>	07LB227	0,8	γ	–
<i>H. ovis</i>	07LB237	0,5	γ	–
<i>H. ovis</i>	07LB239	0,7	γ	–
<i>H. ovis</i>	07/40066	0,4	γ	–
<i>H. ovis</i>	07LB242	0,5	γ	–
<i>H. ovis</i>	07LB432	0,3	γ	–
<i>H. ovis</i>	07LB637	0,7	γ	–
<i>H. ovis</i>	08LB103	0,4	γ	–
<i>H. sueciensis</i>	CCUG 47334 <sup>T</sup>	0,2	γ	–
<i>S. agalactiae</i> <sup>1</sup>	DSM 2134 <sup>T</sup>	1,9	γ	–
<i>S. dysgalactiae</i> ssp. <i>dysgalactiae</i> <sup>2</sup>	DSM 20662 <sup>T</sup>	0,8	α	–
<i>S. dysgalactiae</i> ssp. <i>equisimilis</i> <sup>2</sup>	DSM 6176	0,7	β	–
<i>S. equi</i> ssp. <i>zooepidemicus</i>	DSM 20727 <sup>T</sup>	1,2	β	–
<i>S. uberis</i>	LLB 08URF15 <sup>W</sup>	2,4	γ	–

$\bar{x}_{KD5}$  mittlerer Durchmesser fünf aufeinanderfolgender Einzelkolonien; + positive, – negative Reaktion; <sup>1</sup> bläuliche Kolonien; <sup>2</sup> trockene Kolonien

## 6 Diskussion

Die vorliegende Arbeit stellt nach bestem Wissen des Autors die erste zusammenhängende Studie zur Prävalenz von *H. ovis* in einem definierten Krankheitsbild, zu wesentlichen phänotypischen Eigenschaften dieses Erregers sowie zu dessen Empfindlichkeit gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen dar. Im Folgenden werden die erzielten Ergebnisse bewertet und im Kontext mit Resultaten anderer wissenschaftlicher Studien interpretiert. Die Reihenfolge der Besprechung orientiert sich an den in der Einleitung definierten Untersuchungszielen.

### 6.1 Prävalenz von *Helcococcus ovis* bei der infektiösen Endokarditis des Rindes

Im Verlauf dieser Arbeit wurden 55 bovine Endokarditiden bakteriologisch untersucht und in 18 Fällen *H. ovis* isoliert, davon 16mal in Reinkultur. Die Prävalenz von *H. ovis* betrug somit 32,7 %. Anhand der verfügbaren Herkunftsdaten, denen zufolge nur zwei Tiere dem gleichen Bestand entstammten und die Betriebe ansonsten über weite Gebiete Brandenburgs und benachbarter Bundesländer verteilt waren, ist eine zufällige Häufung nicht anzunehmen. Dieses Ergebnis ist insofern beachtlich, als der Erreger im Zusammenhang mit Endokarditiden bislang erst zweimal beschrieben wurde [56; 68]. Der Hauptgrund für den bis dato seltenen Nachweis von *H. ovis* dürfte darin zu suchen sein, dass die wachstumsphysiologische Besonderheit der Ammen- bzw. Pyridoxal-Abhängigkeit durch die üblichen Kulturansätze nicht berücksichtigt wird. Dies betrifft insbesondere die bakteriologische Untersuchung (BU) im Rahmen der amtlichen Fleischuntersuchung [27]. In den „Methoden zur Untersuchung von Fleisch“ [8] ist für die „semiquantitative Untersuchung des sonstigen Keimgehaltes“ lediglich ein Standardnährboden (z. B. Pepton-Fleischextrakt-Agar) vorgeschrieben, ergänzend kann ein Dextrose-Blutagar verwendet werden. Unter diesen Bedingungen gelingt die Detektion von *H. ovis* nur zufällig infolge Satellitismus des Erregers um Keime der Begleitflora [20; 78]. Eine weitere Ursache für die geringen *H. ovis*-Nachweisraten könnte darin bestehen, dass trotz initialer Isolierung die weitere Subkultur erfolglos bleibt und der Erreger aufgrund erster Prüfungen (Färbung nach Gram, Katalase-Test, etc.) fälschlich als „*Streptococcus* sp.“ identifiziert wird.

Wann immer ungewöhnliche Mikroorganismen im Zusammenhang mit einer Erkrankung beschrieben werden, sollte deren Identifizierung mittels 16S rRNA-Gen Sequenzanalyse erfolgen [14]. Nach einer aktuellen Empfehlung [44] sind hierbei folgende Grundsätze zu berücksichtigen: 1.) die phänotypischen Eigenschaften des Isolates lassen nicht darauf schließen, dass es einer Gruppe von Bakterien angehört, die bekanntermaßen Probleme bei der Identifizierung mittels 16S rRNA-Gen Sequenzanalyse bereiten (z. B. *Edwardsiella*: *E. hoshinae*, *E. ictaluri*, *E. tarda*), 2.) es werden mindestens 500 – 525 bp, ideal 1300 – 1500 bp sequenziert, wobei der Anteil fraglicher Basenpositionen < 1 % beträgt und 3.) die Übereinstimmung

mit dem jeweiligen Typ- oder Referenzstamm beträgt > 99 %, ideal > 99,5 %. Da alle im Verlauf der vorliegenden Studie durchgeführten Analysen die genannten Kriterien erfüllten (Fragmentgröße 1291 – 1355 bp, fragliche Basenpositionen max. 0,23 %, Übereinstimmung mit Typstamm *H. ovis* CCUG 37441<sup>T</sup> sowie Referenzstamm *H. ovis* CCUG 39041 ≥ 99,7 %) kann die Speziesidentität der 18 *H. ovis*-Isolate als gesichert gelten.

Die Prävalenz von *A. pyogenes* betrug 61,8 % und bestätigte insofern Ergebnisse früherer Untersuchungen [60; 62; 69; 83; 87]. Streptokokken mit 5,5 % sowie andere Erreger mit zusammen 7,3 % der Isolate waren dagegen von eher untergeordneter Bedeutung. Mischkulturen aus zwei bzw. drei Erregern fanden sich in nur drei Fällen (5,5 %). Dies entspricht Erkenntnissen aus der Humanmedizin, wonach Endokarditiden polymikrobieller Ätiologie mit 3 – 4 % aller Erkrankungsfälle selten sind und vorwiegend Risikopatienten (Drogenabusus, Klappenprothesen) betreffen [61].

Pathomorphologisch wurde an 74,5 % der Proben eine *Endocarditis valvularis thromboticans* der Trikuspidalklappe festgestellt. Dies spiegelt die für das Rind charakteristische Neigung zur Rechtsherzendokarditis wider [60; 62; 69; 83; 87]. Da von den Schlachthöfen häufig keine vollständigen Herzen eingesandt wurden, ist es nicht möglich, begründete Aussagen zur Beteiligung anderer Klappen zu treffen.

## 6.2 Phänotypische Charakterisierung von *Helcococcus ovis*-Isolaten

Nach anfänglichen Beobachtungen anderer Autoren [20; 78] wurde im Rahmen dieser Arbeit Satellitismus/Pyridoxal-Abhängigkeit als wesentliches Charakteristikum von *H. ovis* aufgezeigt. In der Primärkultur wuchsen 17 von 18 Isolaten (94,4 %) nur in unmittelbarer Nachbarschaft zur *S. aureus*-Amme. *H. ovis* stimmt in dieser Eigenschaft mit den sog. „nutritionally variant streptococci“ (NVS) überein, die erstmalig von FRENKEL & HIRSCH [32] beschrieben wurden und derzeit den Spezies *A. defectiva*, *G. adiacens* und *G. elegans* zugeordnet sind [21; 46; 77]. In Analogie zu *A. defectiva* und *Granulicatella* spp. scheinen sich einige Stämme von *H. ovis* an ein Wachstum ohne Ammenstamm oder Pyridoxal-Supplement zu adaptieren, was deren phänotypische Identifizierung u. U. beeinträchtigen kann [13; 20; 30; 78]. In der vorliegenden Studie verloren insgesamt vier Isolate dieses spezifische Merkmal, davon zwei schon nach einmaliger Subkultur auf CBPA.

Festzustellen bleibt, dass der Typstamm *H. ovis* CCUG 37441<sup>T</sup> Ammen- bzw. Pyridoxal-unabhängig ist und ihm somit ein Hauptcharakteristikum der Spezies fehlt. Dies steht exemplarisch für ein grundsätzliches Problem der klinischen Mikrobiologie in Human- und Veterinärmedizin. Im Zeitraum 1990 – 2000 hat sich die Anzahl der im *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* als neu publizierten Spezies vervierfacht und

die der Genera sogar versiebenfacht. Von diesen neuen Taxa, sowohl Spezies als auch Genera, wurden 40 % anhand eines einzigen Isolates beschrieben [12]. Der Typstamm wird somit bereits festgelegt bevor eine repräsentative Sammlung von Stämmen besteht und die ökologische Diversität der Spezies geklärt wurde [99]. Unter diesen Umständen ist es fraglich, ob die Merkmale des Typstammes die wahren Gegebenheiten der Spezies reflektieren bzw. u. U. ist es möglich, dass der Typstamm ein Extrem in der Variationsbreite der Spezies darstellt [43; 99]. Da trotz einer breiteren Verfügbarkeit der 16S rRNA-Gen Sequenzanalyse die routinemäßige Identifizierung von Bakterienstämmen in klinisch-mikrobiologischen Labors überwiegend auf phänotypischen Kriterien beruht, sind Berichte zu wachstumsphysiologischen, morphologischen und biochemischen Eigenschaften einer neuen Spezies auf der Basis eines einzigen Isolates für die diagnostische Praxis nahezu bedeutungslos [12; 14; 43].

Die biochemischen Leistungsprüfungen mit drei auf der Wirkung präformierter Enzyme beruhenden Testsystemen (API rapid 32 Strep, API ZYM, Rosco Diatabs) ergaben für einige nominell identische Aktivitäten unterschiedliche Resultate. Besonders auffällig war dies bei den Schlüsselreaktionen [20] Alkalische Phosphatase- (100 % positiv im API ZYM; 100 % negativ im API rapid 32 Strep und mit Rosco Diatabs) und  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität (Referenzstämme und ca. 60 % der Isolate positiv im API rapid 32 Strep und mit Rosco Diatabs, 100 % negativ im API ZYM). Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass die Erstbeschreibung von *H. ovis* als Alkalische Phosphatase- und  $\beta$ -Glucuronidase-positiv ebenfalls unter Verwendung der Systeme API rapid 32 Strep und API ZYM erfolgte, allerdings ohne das Hinweisen auf die oben dargestellten Unstimmigkeiten gegeben wurden [20]. Substratabhängige Ergebnisse konnten desweiteren für die  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität demonstriert werden (Referenzstämme und 89 % der Isolate positiv mit *o*-Nitrophenyl- $\beta$ D-Galactopyranosid im Rosco Diatab, 100 % positiv mit Resorufin- $\beta$ D-Galactopyranosid im API rapid ID 32 Strep, Referenzstämme und 94 % bzw. 100 % der Isolate negativ mit 2-Naphtyl- $\beta$ D-Galactopyranosid im API rapid ID 32 Strep bzw. API ZYM). Insgesamt scheinen Substrate auf der Basis von Resorufin- und Nitrophenol-Derivaten für die Detektion der  $\beta$ -Galactosidase- und  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivitäten eine höhere Empfindlichkeit aufzuweisen als die entsprechenden Naphtol-Derivate. Dies steht im Einklang mit Untersuchungsergebnissen, wie sie bei der Prüfung diverser Glycosidhydrolase-Aktivitäten sog. „Viridans-Streptokokken“ erzielt wurden [47]. Hinsichtlich der nachgewiesenen Leucin Arylamidase- bzw. Leucin Aminopeptidase-Aktivitäten bestanden zwischen dem API ZYM (100 % positiv) und Rosco Diatabs (50 % der Referenzstämme und 78 % der Isolate positiv) ebenfalls deutliche Unterschiede.

Die hier gezeigte Inkonsistenz von Ergebnissen biochemischer Leistungen spiegelt einen wesentlichen Aspekt der herrschenden Methodenvielfalt und der Veröffentlichung resultierender Daten wider. Biochemische Tests, sowohl in Form konventioneller Methoden als auch

miniaturisierter Systeme, können für die Prüfung einer nominell identischen Stoffwechselleistung in Abhängigkeit von der Art des Enzyms (konstitutiv oder induzierbar), dem verwendeten Substrat, der Empfindlichkeit des Detektionssystems, der Größe des Inokulums und/oder der Inkubationsdauer unterschiedliche Ergebnisse aufweisen [4; 11; 18; 31; 49]. Dies macht für die Publikation entsprechender Daten eine genaue Beschreibung der Methodik zwingend erforderlich. Beim Einsatz kommerzieller Systeme sollten die Arbeitsanweisungen der Hersteller strikt befolgt werden, jede Modifikation ist im Hinblick auf die Reproduzierbarkeit von Testergebnissen kritisch zu bewerten. Für Veröffentlichungszwecke gilt es ferner als inkorrekt, den Vergleich der phänotypischen Eigenschaften eines Isolates mit den Merkmalen des Typstammes ausschließlich auf der Basis publizierter Daten zu führen, da diese falsch sein können oder ggf. mit anderen Methoden erzielt wurden [14].

Anhand der mittels API rapid 32 Strep erzielten Ergebnisse für die  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität (61 % positive Isolate) ist festzustellen, dass es sich hierbei entgegen früheren Auffassungen [19; 20] um ein variables Speziesmerkmal handelt. Dies gilt auch für die Verwertung von Lactose, Trehalose und Pullulan mit 22 %, 27 % und 61 % positiven Isolaten. Dagegen war die Cyclodextrin-Verwertung bei ca. 90 % der Isolate positiv und somit von relativer Konstanz. Im Unterschied zu den Ergebnissen der Erstbeschreibung [20] zeigten alle *H. ovis*-Isolate und -Referenzstämme im API ZYM System Esterase (C4)- sowie Esterase Lipase (C8)-Aktivität und überwiegend schwache Valin Arylamidase-Aktivität. Für die  $\alpha$ -Glucosidase-Aktivität im API ZYM existieren keine Vergleichsdaten. In der vorliegenden Studie zeigten 80 % der *H. ovis*-Isolate, der Typstamm *H. ovis* CCUG 37441<sup>T</sup> und auch der Stamm *H. ovis* CCUG 39041 positive, wenngleich oft schwache Reaktionen.

Gestützt auf die Merkmale Satellitismus/Pyridoxal-Abhängigkeit und Hämolyse auf Blutagar sowie acht API rapid ID 32 Strep basierte biochemische Tests wurde ein Schema für die Identifizierung von *H. ovis* und dessen Differenzierung von anderen *Helcococcus* spp. sowie den Pyridoxal-abhängigen Spezies *A. defectiva*, *G. adiacens* und *G. elegans* entwickelt (Tab. 25). Die in der Literatur [13; 18; 19; 21; 46; 77] für *H. kunzii*, *H. sueciensis*, *A. defectiva*, *G. adiacens* und *G. elegans* angegebenen biochemischen Leistungen wurden anhand des Typstammes der jeweiligen Spezies (Tab. 3) für das API rapid ID 32 Strep System im Doppelansatz überprüft. Abweichend von CHRISTENSEN et al. [13] wurde für den Typstamm *G. adiacens* DSM 9848<sup>T</sup> eine negative  $\beta$ -Galactosidase Aktivität festgestellt.

**Tab. 25: API rapid ID 32 Strep basiertes Identifizierungsschema für *H. ovis***

Phänotypische Eigenschaft	Ergebnis für Spezies					
	<i>H. ovis</i>	<i>H. kunzii</i>	<i>H. sueciensis</i>	<i>A. defectiva</i>	<i>G. adiacens</i>	<i>G. elegans</i>
Satellitismus/ Pyridoxal-Abhängigkeit	+	–	–	+	+	+
Hämolyse auf Schafblutagar	γ	γ	γ	α	α	α
Arginin Dihydrolase	–	–	–	–	–	+
α-Galactosidase	–	–	–	+	–	–
β-Galactosidase <sup>1</sup>	+	+	+	+	–	–
β-Galactosidase <sup>2</sup>	–	–	+	+	–	–
β-Glucuronidase	V	–	–	–	+	–
Hippurat-Hydrolyse	–	–	–	–	–	+
Pyroglutaminsäure-Arylamidase	–	+	–	+	+	+
Saccharose	–	–	–	+	+	+
Herkunft	Tier	Mensch	Mensch	Mensch	Mensch	Mensch

+, ≥ 85 %; V, 16 – 84 %; –, ≤ 15 % der Stämme positiv; <sup>1</sup> Substrat: Resorufin-βD-Galactopyranosid; <sup>2</sup> Substrat: 2-Naphtyl-βD-Galactopyranosid

### 6.3 Empfindlichkeitsprüfung von *Helcococcus ovis*-Isolaten

Da für *H. ovis* kein standardisiertes Verfahren der Empfindlichkeitsprüfung zur Verfügung steht, wurde aufgrund von Ähnlichkeiten in der Wachstumsphysiologie (Pyridoxal-Abhängigkeit) auf eine anerkannte Richtlinie für *A. defectiva* und *Granulicatella* spp. zurückgegriffen [16]. Mit der gewählten Methodik gelang es, eine akzeptable Reproduzierbarkeit zu erzielen, d. h. für die jeweils getestete Isolat-Wirkstoff-Kombination MHK-Werte zu generieren, die in zwei unabhängigen Messreihen nicht mehr als eine log<sub>2</sub>-Verdünnungsstufe voneinander abweichen [17]. Die für fünf Inokulmdichten ermittelten Unter- bzw. Überschreitungen des DVG-Toleranzbereiches wirkten sich diesbezüglich nicht negativ aus. Dies entspricht Erkenntnissen, die im Zusammenhang mit Empfindlichkeitsprüfungen von *A. pyogenes* gewonnen wurden. Schwankungen der Inokulmdichten im Bereich 0,5 x 10<sup>5</sup> – 10,0 x 10<sup>5</sup> kbE/ml hatten hierbei keinen wesentlichen Einfluss auf die Ergebnisse der MHK-Bestimmungen, was insbesondere auf die im Vergleich zu z. B. *E. coli* relativ lange Generationszeit des Erregers zurückgeführt wurde [1].

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Empfindlichkeitsprüfungen für einzelne Substanzklassen besprochen. In Ermangelung *H. ovis*-spezifischer Grenzwerte ist eine Interpretation der MHK-Werte in den Kategorien „sensibel“, „intermediär“ oder „resistent“ nur für einige Wirkstoffe möglich. So können gemäß CLSI Dokument M 31-A3 Amoxicillin/Clavulansäure, Cephalothin, Chloramphenicol, Gentamicin und Tetracyclin entsprechend den Grenzwerten für nicht weiter spezifizierte „andere“ Erreger beurteilt werden [17]. Da diese Werte auf Daten

aus der Humanmedizin beruhen, sollten die Interpretationen für veterinärmedizinische Fragestellungen aber mit Vorsicht erfolgen [1].

β-Lactam-Antibiotika (Penicilline und Cephalosporine): Die MHK-Werte für Penicillin G und Ampicillin waren nicht normal verteilt sondern tendenziell ansteigend. Dies deutet darauf hin, dass die Empfindlichkeiten der getesteten Isolate keinen repräsentativen Querschnitt der *H. ovis*-Normalpopulation darstellen. Verglichen mit den Literaturangaben zur Penicillin-MHK des equinen *H. ovis*-Isolates ( $< 0,016 \mu\text{g/ml}$ ) [78] wurden für die Gesamtheit der bovinen *H. ovis*-Endokarditisisolates deutlich höhere Werte für Penicillin G ( $\text{MHK}_{50} = 0,12 \mu\text{g/ml}$ ;  $\text{MHK}_{90} = 0,25 \mu\text{g/ml}$ ) ermittelt. Für Amoxicillin/Clavulansäure waren die MHK-Werte normal verteilt und alle Isolate als sensibel (Grenzwert:  $\leq 8/4 \mu\text{g/ml}$ ) zu bewerten.

Innerhalb der Cephalosporine wurden unterschiedliche Empfindlichkeiten beobachtet. So lagen die MHK-Werte für Cephalothin (1. Generation) stets im unteren sensiblen Bereich ( $\text{MHK}_{50} = 0,25 \mu\text{g/ml}$ ;  $\text{MHK}_{90} = 0,5 \mu\text{g/ml}$ ; Grenzwert:  $\leq 8 \mu\text{g/ml}$ ) und auch für Cefoperazon (3. Generation) wurden übereinstimmend hohe Empfindlichkeiten ( $\text{MHK}_{50} = 0,12 \mu\text{g/ml}$ ,  $\text{MHK}_{90} = 0,12 \mu\text{g/ml}$ ) nachgewiesen. Demgegenüber waren die normal verteilten MHK-Werte für Ceftiofur (3. Generation) im höheren Wertebereich angesiedelt ( $\text{MHK}_{50} = 4 \mu\text{g/ml}$ ,  $\text{MHK}_{90} = 4 \mu\text{g/ml}$ ). Die MHK-Werte für Cefquinom (4. Generation) zeigten im ebenfalls höheren Bereich von  $0,25 - 2 \mu\text{g/ml}$  ein Verteilungsmuster analog zu Penicillin G und Ampicillin.

Fluorchinolone: Für Enrofloxacin ergab sich eine bimodale Verteilung der MHK-Werte mit einer 14 Isolate umfassenden empfindlichen Normalpopulation im MHK-Bereich von  $0,12 - 0,5 \mu\text{g/ml}$  und vier resistenten Isolaten (22,2 %) mit MHK-Werten zwischen 8 und  $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ . In Anbetracht dieses Ergebnisses und unter Berücksichtigung der bzgl. Ciprofloxacin bei *H. kunzii* erzielten Resultate [10] ergibt sich die Vermutung, dass *Helicococcus* spp. relativ häufig Resistenzen gegen Fluorchinolone aufweisen.

Tetracycline: Gegenüber Tetracyclin waren nur zwei Isolate als sensibel (Grenzwert:  $\leq 4 \mu\text{g/ml}$ ), eines als intermediär ( $8 \mu\text{g/ml}$ ) und 15 Isolate (83,3 %) als resistent (Grenzwert:  $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ ) zu bewerten. Die genetische Basis dieser auffallend häufigen Tetracyclin-Resistenz von *H. ovis* bedarf weiterer Untersuchungen. Derzeit sind 36 bakterielle Tetracyclin (*tet*)-Resistenzgene bekannt von denen 22 für sog. Efflux-Systeme, 10 für ribosomale Schutzproteine und drei für enzymatische Deaktivierungsmechanismen kodieren. Der auf dem *tetU*-Gen basierende Mechanismus ist noch ungeklärt [75]. Obwohl *tet*-Gene bereits bei zahlreichen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterienspezies einzeln oder in Kombination nachgewiesen wurden [72; 73], liegen für *Helicococcus* spp. bisher keine entsprechenden Informationen vor.

Makrolide, Lincosamine, Streptogramine: Alle geprüften Makrolidantibiotika zeigten unabhängig von deren Struktur (14-, 15- oder 16-gliedriger Lactonring) bimodale Verteilungen der MHK-Werte mit zwei resistenten Isolaten (06LB779, 07LB26). Das Isolat 07LB26 wies gleichzeitig hohe MHK-Werte ( $> 64 \mu\text{g/ml}$ ) für die Lincosamide Clindamycin und Pirlimycin auf. Für das Isolat 07LB26 waren erhöhte MHK-Werte für Lincosamide ( $= 0,12 \mu\text{g/ml}$ ) nicht feststellbar, mittels „D-Zonen“-Test konnte im Folgenden aber eine induzierbare Clindamycin-Resistenz nachgewiesen werden (Abb. 15). Die hier beobachteten Resistenzmuster sind charakteristisch für konstitutive (07LB26) bzw. induzierbare (06LB779) Makrolid-Lincosamin-Streptogramin B (MLS<sub>B</sub>)-Resistenzen, die auf einer durch *erm*-Gene kodierten Methylase des Adenin-Restes A2058 der bakteriellen 23S rRNA beruhen [51]. Obwohl sich Makrolide, Lincosamine und Streptogramin B hinsichtlich ihrer chemischen Struktur deutlich unterscheiden, überlappen die Bindungsstellen an der 23S rRNA, was bei Methylierung des A2058 zur entsprechenden Kreuzresistenz führt. Beim induzierbaren Resistenztyp wird inaktive Methylase-mRNA produziert, die zur Aktivierung eines Induktors (i. d. R. ein Makrolidantibiotikum) bedarf. Demgegenüber wird beim konstitutiven Typ bereits aktive Methylase-mRNA gebildet, der Induktor ist somit nicht erforderlich [51]. Bisher wurden 32, meist auf Plasmiden und Transposons gelagerte und daher übertragbare *erm*-Gene bei zahlreichen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterienarten nachgewiesen [51; 74; 76], darunter ein *ermA*-Gen bei *H. kunzii* mit Ausprägung einer konstitutiven MLS<sub>B</sub>-Resistenz [96]. Für die genannten *H. ovis*-Isolate wurden die genetischen Ursachen der MLS<sub>B</sub>-Resistenz bisher nicht ermittelt, dies ist Bestandteil weiterführender Untersuchungen.

Das Streptogramin Quinupristin/Dalfopristin (Synercid®) besteht aus einer Streptogramin B- (Quinupristin) und einer Streptogramin A-Komponente (Dalfopristin) im Verhältnis 30:70. Während beide Komponenten für sich genommen bakteriostatisch wirken, können durch deren Kombination bakterizide Effekte erzielt werden. Die MHK-Werte der geprüften *H. ovis*-Isolate einschließlich jener mit nachgewiesener MLS<sub>B</sub>-Resistenz lagen im niedrigen Wertebereich von  $0,06 - 0,12 \mu\text{g/ml}$ . Dies entspricht Literaturangaben, wonach MLS<sub>B</sub>-Resistenz zwar die Wirksamkeit von Streptogramin B allein, nicht aber die von Streptogramin A bzw. die der Kombination beider Komponenten beeinträchtigt [52; 94].

Aminoglycoside, Glycopeptide, Phenicole und potenzierte Sulfonamide: Gegenüber Gentamicin waren alle *H. ovis*-Isolate sensibel (Grenzwert:  $\leq 4 \mu\text{g/ml}$ ), allerdings lagen die MHK-Werte mehrheitlich im oberen Bereich von  $2 - 4 \mu\text{g/ml}$ . Für Neomycin ergaben sich Hinweise auf eine intrinsische Resistenz. Die MHK-Werte waren für 17 Isolate im hohen Wertebereich von  $8 - 32 \mu\text{g/ml}$  normal verteilt, ein Isolat wies einen MHK-Wert von  $\geq 128 \mu\text{g/ml}$  auf. Alle Isolate waren sensibel für Chloramphenicol (Grenzwert:  $\leq 8 \mu\text{g/ml}$ ), die MHK-Werte für Vancomycin lagen im Bereich von  $1 - 2 \mu\text{g/ml}$ . Für potenzierte Sulfonamide ergab sich wiederum

ein bimodales Verteilungsmuster der MHK-Werte, wobei zwei Drittel der Isolate mit MHK-Werten  $\geq 8/152$  als resistent einzuschätzen waren.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass sich trotz des relativ kleinen Testkollektivs von 18 *H. ovis*-Isolaten überraschend zahlreiche Hinweise auf Resistenzen ergaben und diese Wirkstoffe verschiedener Substanzklassen (Fluorchinolone, Tetracycline, Makrolide und Lincosamine, Aminoglycoside, potenzierte Sulfonamide) betrafen. Als mögliche Ursache ist anzunehmen, dass aufgrund der mit Endokarditiden einhergehenden klinischen Symptomatik (remittierendes Fieber, Dyspnoe, Leistungsdepression, etc.) an den Tieren bereits diverse Therapieversuche vorgenommen wurden. Erwartungsgemäß waren zum Zeitpunkt der Schlachtung antibiotisch wirksame Substanzen mittels Dreiplatten-Hemmstofftest [8] jedoch nicht mehr nachweisbar. Für die klinisch-mikrobiologische Praxis ergibt sich aus den hier dargestellten Resultaten die Notwendigkeit der regelmäßigen Empfindlichkeitsprüfung von Infektions-assoziierten *H. ovis*-Isolaten. Als therapeutische Mittel der Wahl erscheinen nach den bisher vorliegenden Daten hoch dosierte Penicilline.

#### **6.4 Entwicklung eines selektiven Mediums für den *Helcococcus ovis*-Nachweis**

Bei der zeitnahen postmortalen Diagnostik boviner Endokarditiden gelingt die Detektion von *H. ovis* i. d. R. schon mittels einfacher *S. aureus*-Ammenkultur auf CBA. Dies wird durch die vorherrschenden Monoinfektionen des natürlicherweise keimfreien Herzens, die oft hohen Erregerzahlen und die meist geringe Kontamination des Untersuchungsgutes begünstigt. Anders stellt sich die Situation bei bakteriologischen Untersuchungen primär unsteriler Probenmaterialien von Haut und Hautanhangorganen, oberem Respirationstrakt, Verdauungs- oder Urogenitaltrakt dar. Aufgrund der hier oft polymikrobiell bedingten Infektionen sowie einer umfangreichen Standort- und/oder Kontaminationsflora kann das relativ langsam wachsende *H. ovis* durch Begleitkeime schnell überwuchert werden. Ziel war es daher, ein Agarmedium von hoher Produktivität, Selektivität und Elektivität für *H. ovis* zu entwickeln, das sowohl in der Infektionsdiagnostik als auch in Studien zur Erregerökologie, u. a. der Ermittlung des natürlichen Standortes, einen regelmäßigen Nachweis erlaubt.

Für die Evaluierung des HEA wurde mit der „ecometric technique“ (ET) [58; 59] ein semiquantitatives Verfahren gewählt, das verglichen mit den üblichen, auf der Auszählung koloniebildender Einheiten beruhenden quantitativen Methoden (Spatelverfahren, Tropfplattenverfahren, Spiralplattenverfahren) mit einiger Übung einfach durchzuführen sowie zeit- und materialsparend ist. Für die Entwicklung von Kulturmedien ist die Genauigkeit der ET ausreichend, da hierbei relativ große Unterschiede in der Leistungsfähigkeit betrachtet werden [93]. Für die positive Evaluierung eines selektiven Mediums sollten die RWI der gesuchten Mikroorganismen (Produktivität)  $> 0,70$ ; besser  $\geq 0,80$  und die RWI der unerwünschten

Mikroorganismen (Selektivität)  $< 0,25$ ; besser  $\leq 0,20$  betragen [3; 93]. Für HEA wurden KNGPK als gesuchte und Nicht-KNGPK als unerwünschte Mikroorganismen definiert. Mit Ausnahme von *E. faecium* DSM 6177 (RWI = 0,79) erreichten KNGPK, darunter alle *H. ovis*-Isolate und -Referenzstämme, einen RWI  $\geq 0,95$  während alle Nicht-KNGPK einen RWI = 0,00 aufwiesen. Die Anforderungen an Produktivität und Selektivität des Mediums wurden somit erfüllt.

Eine alternative Form der Beurteilung selektiver Nährmedien nahmen SAWANT et al. [82] anhand des rein qualitativen Parameters „Wachstum ja/nein“ vor und ermittelten die resultierende Spezifität und Sensitivität. Auf HEA zeigten alle KNGPK Wachstum ( $AWI_{HEA} > 0,00$ ) während alle Nicht-KNGPK vollständig gehemmt wurden ( $AWI_{HEA} = 0,00$ ). Sensitivität und Spezifität des Mediums betragen jeweils 100 %.

Inwiefern HEA geeignet ist, *H. ovis* von anderen KNGPK abzugrenzen, wird durch die Elektivität des Mediums bestimmt. MOSSEL [57] definierte Elektivität als „einfaches Erkennen von Kolonien unterschiedlicher Organismen, basierend entweder auf intrinsischen Eigenschaften des Organismus oder spezifischen Reaktionen des zu prüfenden Mediums“. Hinzuzufügen bliebe der Passus „unter festgelegten Inkubationsbedingungen“, da diese wesentlichen Einfluss auf die genannten Eigenschaften bzw. Reaktionen nehmen können. Nach 72 h Bebrütung bei  $36 \pm 1$  °C und erhöhter CO<sub>2</sub>-Spannung (6 %) konnten *Helcococcus* spp. anhand der Charakteristika Koloniedurchmesser  $< 1$  mm, fehlende Hämolyse sowie fehlende Schwärzung relativ einfach von anderen KNGPK abgegrenzt werden. Eine Differenzierung innerhalb der Gattung *Helcococcus* gelang dagegen nicht. Für die diagnostische Praxis empfiehlt es sich, verdächtige Kolonien auf CBA mit *S. aureus*-Amme zu subkultivieren. Unter der Maßgabe, dass es sich bei dem jeweiligen Isolat um KNGPK handelt, kann bei positivem Satellitismus die weitere Identifizierung entsprechend Tab. 25 erfolgen. Isolate, die aufgrund abweichender phänotypischer Eigenschaften nicht eindeutig zuzuordnen sind, können abschließend nur mittels 16S rRNA-Gen Sequenzanalyse identifiziert werden.

Grundsätzlich stellt HEA ein vielversprechendes Medium für den Nachweis von *H. ovis* aus klinischen Materialien dar. Die Prüfung der Leistungsfähigkeit in der veterinärmikrobiologischen Praxis steht allerdings noch aus. Nach ersten Erkenntnissen sollte der Einsatz in der Routinediagnostik insbesondere bei Aborten und anderen Infektionen des Urogenitaltraktes in Erwägung gezogen werden.

## 6.5 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit rechtfertigen die Einstufung von *H. ovis* als „emerging pathogen“ des Rindes. Diese Bewertung wird weiterhin gestützt durch Nachweise aus

Endometritiden und Aborten, Pneumonien sowie einem Zungenulcus (KUTZER et al., unveröffentlicht). Die Assoziation mit Infektionen unterschiedlichster Organsysteme weist deutliche Parallelen zu *A. pyogenes* auf [45] und legt die Vermutung nahe, dass es sich bei *H. ovis* um einen Vertreter der endogenen Flora und opportunistischen Krankheitserreger handelt. Im Rahmen epidemiologischer Fragestellungen ist daher die Aufklärung des Habitats von wesentlichem Interesse. Im Fokus stehen hierbei die äußere Haut sowie die Schleimhäute der oralen Kavität, des vorderen Verdauungs- und des Urogenitaltraktes. Daneben sind weitere Untersuchungen zur Beteiligung von *H. ovis* an diversen Infektionsgeschehen sowohl beim Rind als auch bei Schaf, Ziege und Pferd unerlässlich, wobei nicht zuletzt aus wirtschaftlicher Sicht bovine Mastitiden besondere Berücksichtigung finden sollten. Um in Anbetracht der vorstehend genannten Aufgaben die Leistungsfähigkeit der *H. ovis*-Diagnostik nachhaltig zu verbessern, ist es erforderlich, das derzeitige Methodenspektrum (Isolierung, phänotypische Identifizierung) um eine speziesspezifische PCR zu ergänzen.

Der initiale Schritt in der Pathogenese der infektiösen Endokarditis ist die Kolonisierung der NBTV (2.2.1). Folglich sind die Endokarditiserreger mit der höchsten Prävalenz besonders befähigt, an geschädigten Klappenendothelien zu haften [55]. Vermittelt wird diese Fähigkeit durch sog. MSCRAMMs (microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules), eine Klasse bakterieller Adhäsine, die spezifisch an Liganden der extrazellulären Matrix (u. a. Fibrinogen, Fibronectin, Kollagen, Laminin) binden [55; 65]. MSCRAMMs sind wichtige Virulenzfaktoren insbesondere opportunistischer Gram-positiver Mikroorganismen [65] und konnten sowohl bei den häufigsten Endokarditiserregern des Menschen (*Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *A. defectiva*) [55; 65; 84] als auch bei *A. pyogenes* [45] nachgewiesen werden. Insofern ist es sehr wahrscheinlich, dass *H. ovis* ebenfalls über MSCRAMMs verfügt. Diese gilt es z. B. mittels Adhäsionsassays [84; 88; 89] aufzuklären und somit erste Einblicke in die Pathogenese *H. ovis*-assoziiertes Infektionen zu gewinnen. Dem könnten sich Untersuchungen zur Invasion in Epithelzellen sowie zum Überleben in Makrophagen anschließen.

## 7 Zusammenfassung

Anlass für diese Arbeit war der zufällige Nachweis von *Helcococcus ovis* aus einer bovinen Endokarditis. Ziele der sich anschließenden Untersuchungen waren die Ermittlung der Prävalenz von *H. ovis* bei der infektiösen Endokarditis des Rindes, die phänotypische Charakterisierung und die Empfindlichkeitsprüfung der *H. ovis*-Isolate sowie die Entwicklung eines selektiven Mediums für den kulturellen Erregernachweis.

Im Zeitraum September 2006 bis Februar 2008 wurden insgesamt 55 Rinderherzen mit pathomorphologischen Veränderungen i. S. einer *Endocarditis valvularis thromboticans* bakteriologisch untersucht. Die Anzucht erfolgte in Form einer Ammenkultur unter Verwendung von Columbia-Blutagar und einem *S. aureus*-Stamm. Es wurden 18 (32,7 %) verdächtige Isolate gewonnen, i. d. R. als hochgradiges Wachstum und in Reinkultur. Mittels Sequenzanalyse eines ca. 1300 bp langen Abschnittes des 16S rRNA-Gens konnten alle Isolate als *H. ovis* bestätigt werden, wobei die Übereinstimmung mit dem Typstamm *H. ovis* CCUG 37441<sup>T</sup> mindestens 99,7 % betrug.

Alle *H. ovis*-Isolate stellten sich als Katalase-negative, fakultativ anaerobe, Vancomycinsensible, in Paaren und Haufen gelagerte Gram-positive Kokken dar. Als phänotypisches Hauptcharakteristikum zeigte die überwiegende Mehrheit der Isolate (94,4 % in Primärkultur, 72,2 % nach Subkultur) Satellitismus in der *S. aureus*-Peripherie bzw. Pyridoxal-Abhängigkeit. *H. ovis* gleicht darin den sog. „nutritionally variant streptococci“ die aktuell den Genera *Abiotrophia* und *Granulicatella* zugeordnet sind. Biochemische Leistungen wurden mittels der Systeme API rapid ID 32 Strep, API ZYM und Rosco Diatabs geprüft und hierbei für die Aktivitäten von Alkalischer Phosphatase,  $\beta$ -Galactosidase,  $\beta$ -Glucuronidase und Leucin Aminopeptidase divergente Resultate erzielt. Gestützt auf die Merkmale Satellitismus/Pyridoxal-Abhängigkeit und Hämolyse auf Blutagar sowie acht API rapid ID 32 Strep basierte biochemische Tests wurde ein Schema für die Identifizierung von *H. ovis* und dessen Differenzierung von anderen *Helcococcus* spp. sowie den Pyridoxal-abhängigen Spezies *A. defectiva*, *G. adiacens* und *G. elegans* entwickelt.

Die Empfindlichkeitsprüfung der *H. ovis*-Isolate erfolgte für 22 Wirkstoffe aus 11 Substanzklassen im Bouillon-Mikrodilutionsverfahren entsprechend einer anerkannten CLSI-Richtlinie für *A. defectiva* und *Granulicatella* spp.. Mit dieser Methode gelang es, eine akzeptable Reproduzierbarkeit der MHK-Werte zu erzielen. Trotz des relativ kleinen Testkollektivs wurden zahlreiche Resistenzen festgestellt, die Wirkstoffe verschiedener Substanzklassen betrafen. So waren vier Isolate (22,2 %) resistent gegen Enrofloxacin, 15 Isolate (83,3 %) resistent gegen Tetracyclin und 12 Isolate (66,0 %) resistent gegen potenzierte Sulfonamide. Darüber hinaus konnten für zwei Isolate (11,1 %) Makrolid-Lincosamid-Streptogramin B (MLS<sub>B</sub>)-Resistenzen, sowohl konstitutiv als auch induzierbar, nachgewiesen werden.

Basis für die Entwicklung eines selektiven bzw. elektiven Mediums zum Nachweis von *H. ovis* aus polymikrobiell bedingten Infektionsprozessen und/oder kontaminierten Probenmaterialien war eine Modifikation des in der Mastitisdiagnostik gebräuchlichen Edwards-Nährbodens. Um für *H. ovis* geeignete Wachstumsbedingungen zu schaffen, wurde dieses Medium um Pyridoxal-HCl ergänzt und zum Zwecke der verbesserten Hemmwirkung auf Gram-negative Keime Aztreonam hinzugefügt. Die Evaluierung des *Helcococcus*-Elektivagars (HEA) erfolgte mittels „ecometric technique“ nach MOSSEL und unter Einbeziehung aller *H. ovis*-Isolate sowie von 35 Kontrollstämmen verschiedener Gram-positiver und Gram-negativer Bakterienspezies. Im Ergebnis konnte eine sehr gute Produktivität und Selektivität für Katalase-negative, Gram-positive Kokken, einschließlich *Helcococcus* spp., festgestellt werden. Die Differenzierung der *Helcococcus* spp. von anderen Katalase-negativen, Gram-positiven Kokken (Elektivität) gelang nach 72 h Bebrütung bei  $36 \pm 1$  °C und erhöhter CO<sub>2</sub>-Spannung (6 %) relativ einfach anhand der Charakteristika Koloniedurchmesser < 1 mm, fehlende Hämolyse sowie fehlende Schwärzung. Eine Diskriminierung innerhalb der Gattung *Helcococcus* war dagegen nicht möglich.

## 8 Summary

### **Investigations on the occurrence of *Helcococcus ovis* in bovine valvular endocarditis and phenotypic characterization and susceptibility testing of the isolates**

The study presented here was initiated by the accidental isolation of *Helcococcus ovis* from a bovine endocarditis case. Major goals of the following researches were the investigation of the *H. ovis* prevalence in bovine valvular endocarditis, the phenotypic characterization and the susceptibility testing of the *H. ovis* isolates, and the development of a selective culture medium.

Between September 2006 and February 2008, specimens from 55 bovine hearts with valvular endocarditis were examined by culture using Columbia blood agar and cross streaking the inoculated plate with a *Staphylococcus aureus* strain. *H. ovis* was isolated from 18 (32.7%) cases, mainly as heavy growth and pure culture. Species identification was confirmed by sequence analysis of an approximately 1300 bp fragment of the 16S rRNA gene, showing at least 99.7% sequence identity with the type strain *H. ovis* CCUG 37441<sup>T</sup>.

All *H. ovis* isolates were gram positive, with cocci arranged in pairs and clusters. They were catalase negative, vancomycin sensitive and grew facultatively anaerobically. As a main feature, the vast majority of the *H. ovis* strains (94.4% in primary culture, 72.2% after subculture) demonstrated distinct satellitism around the *S. aureus* streak and pyridoxal dependency, resembling the case for the so-called “nutritionally variant streptococci”, which are now assigned to the genera *Abiotrophia* and *Granulicatella*. Using the API rapid ID 32 Strep, API ZYM, and Rosco Diatabs systems, incongruent results were obtained for alkaline phosphatase,  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -glucuronidase, and leucine aminopeptidase activities. Based on the characteristics satellitism/pyridoxal dependency, hemolysis on blood agar, and eight biochemical reactions included in the API rapid ID 32 Strep, a scheme for the identification of *H. ovis* and its differentiation from other *Helcococcus* spp. and the pyridoxal-dependent species *Abiotrophia defectiva*, *Granulicatella adiacens*, and *Granulicatella elegans* was proposed.

Susceptibility testing of the *H. ovis* isolates was carried out for 22 agents from 11 antibiotic classes using broth microdilution method according to an approved CLSI guideline for *A. defectiva* and *Granulicatella* spp.. By this method, it was possible to obtain MIC results of acceptable reproducibility. Despite the small number of test subjects, numerous resistances to agents from different antibiotic classes were observed. Four isolates (22.2%) were resistant to enrofloxacin, 15 (83.3%) to tetracycline and 12 (66.0%) to trimethoprim/sulfamethox-

azole. Furthermore, two isolates (11.1%) displayed coresistence, both constitutively and inducibly, to macrolide, lincosamide and streptogramin B (MLS<sub>B</sub>) antibiotics.

The development of a selective or elective medium, respectively, for the isolation of *H. ovis* from polymicrobial infectious processes and/or contaminated specimens based on the modified Edwards medium commonly used in mastitis diagnostics. To ensure appropriate conditions for the growth of *H. ovis*, this medium was supplemented with pyridoxal HCl. Moreover, aztreonam was added to enhance the inhibition of gram-negative bacteria. Evaluation of the *Helcococcus* elective agar (HEA) was carried out by application of the “ecometric technique” proposed by MOSSEL. Using this method, all *H. ovis* isolates and 35 control strains of various gram-positive and gram-negative bacteria were tested for growth, resulting in a very good productivity and selectivity for the catalase-negative gram-positive cocci including *Helcococcus* spp.. After incubation for 72 h at  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  in an atmosphere of 6% CO<sub>2</sub>, the discrimination of *Helcococcus* spp. from other catalase-negative gram-positive cocci (selectivity) was relatively simple considering the characteristic colony diameter < 1 mm and absence of both hemolysis and blackening. In contrast, differentiation within the *Helcococcus* genus was not possible.

## 9 Referenzen

1. **Alešík, E. (2006):** Wirksamkeit antimikrobieller Wirkstoffe bei *Arcanobacterium pyogenes*: Etablierung und Anwendung der Empfindlichkeitsbestimmung mittels Bouillonmikrodilution sowie genotypische Charakterisierung tetracyclinresistenter Stämme. München, Ludwig-Maximilians-Universität, Diss. 189 S.
2. **Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schaffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D. J. (1997):** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25(17), 3389-402.
3. **Australian Society for Microbiology, Culture Media Special Interest Group (2004):** Guidelines for assuring quality of food and water microbiological culture media. Abgerufen am: 20.08.2008, von: <http://www.theasm.com.au/documents/FWMQCGuidelinesAugust2004.pdf>.
4. **Bascomb, S.; Manafi, M. (1998):** Use of enzyme tests in characterization and identification of aerobic and facultatively anaerobic gram-positive cocci. *Clin Microbiol Rev.* 11(2), 318-40.
5. **Bayerisches Staatsministerium für Landwirtschaft und Forsten. (2008):** Herkunftssicherungs- und Informationssystem für Tiere. Abgerufen am: 23.05.2008, von: <http://www.hi-tier.de>.
6. **Brouqui, P.; Raoult, D. (2001):** Endocarditis due to rare and fastidious bacteria. *Clin Microbiol Rev.* 14(1), 177-207.
7. **Bundesrepublik Deutschland (2002):** Allgemeine Verwaltungsvorschrift über die Durchführung der amtlichen Überwachung nach dem Fleischhygienegesetz und dem Geflügelfleischhygienegesetz (AW Fleischhygiene - AVVFIH) (BAnz. Nr. 44a vom 05.03.2002).
8. **Bundesrepublik Deutschland (2007):** Allgemeine Verwaltungsvorschrift über die Durchführung der amtlichen Überwachung der Einhaltung von Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs und zum Verfahren zur Prüfung von Leitlinien für eine gute Verfahrenspraxis (AVV Lebensmittelhygiene - AVV LmH) (BAnz. Nr. 180a vom 25.09.2007).
9. **Cabana, E. M.; Kelly, W. R.; Daniel, R. C.; O'Boyle, D. (1990):** A case of bovine valvular endocarditis caused by *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*. *Vet Rec.* 126(2), 41-2.
10. **Caliendo, A. M.; Jordan, C. D.; Ruoff, K. L. (1995):** *Helcococcus*, a new genus of catalase-negative, gram-positive cocci isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 33(6), 1638.
11. **Chagla, A. H.; Borczyk, A. A.; Facklam, R. R.; Lovgren, M. (1998):** Breast abscess associated with *Helcococcus kunzii*. *J Clin Microbiol.* 36(8), 2377-9.
12. **Christensen, H.; Bisgaard, M.; Frederiksen, W.; Mutters, R.; Kuhnert, P.; Olsen, J. E. (2001):** Is characterization of a single isolate sufficient for valid publication of a new genus or species? Proposal to modify recommendation 30b of the Bacteriological Code (1990 Revision). *Int J Syst Evol Microbiol.* 51(Pt 6), 2221-5.
13. **Christensen, J. J.; Facklam, R. R. (2001):** *Granulicatella* and *Abiotrophia* species from human clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 39(10), 3520-3523.
14. **Clarridge, J. E., 3rd (2004):** Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev.* 17(4), 840-62, table of contents.
15. **Clinical and Laboratory Standards Institute (2002):** Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; Approved Standard - Second Edition. CLSI Document M31-A2. Wayne, PA.

- 16. Clinical and Laboratory Standards Institute (2006):** Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; Approved Guideline. CLSI Document M45-A. Wayne, PA.
- 17. Clinical and Laboratory Standards Institute (2008):** Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; Approved Standard - Third Edition. CLSI Document M31-A3. Wayne, PA.
- 18. Collins, M. D.; Facklam, R. R.; Rodrigues, U. M.; Ruoff, K. L. (1993):** Phylogenetic analysis of some *Aerococcus*-like organisms from clinical sources: description of *Helcococcus kunzii* gen. nov., sp. nov. Int J Syst Bacteriol. 43(3), 425-9.
- 19. Collins, M. D.; Falsen, E.; Brownlee, K.; Lawson, P. A. (2004):** *Helcococcus sueciensis* sp. nov., isolated from a human wound. Int J Syst Evol Microbiol. 54(Pt 5), 1557-60.
- 20. Collins, M. D.; Falsen, E.; Foster, G.; Monasterio, L. R.; Dominguez, L.; Fernandez-Garazabal, J. F. (1999):** *Helcococcus ovis* sp. nov., a gram-positive organism from sheep. Int J Syst Bacteriol. 49 Pt 4, 1429-32.
- 21. Collins, M. D.; Lawson, P. A. (2000):** The genus *Abiotrophia* (Kawamura et al.) is not monophyletic: proposal of *Granulicatella* gen. nov., *Granulicatella adiacens* comb. nov., *Granulicatella elegans* comb. nov. and *Granulicatella balaenopterae* comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 50 Pt 1, 365-9.
- 22. Collins, M. D.; Rodriguez Jovita, M.; Foster, G.; Sjoden, B.; Falsen, E. (1999):** Characterization of a *Gemella*-like organism from the oral cavity of a dog: description of *Gemella palaticanis* sp. nov. Int J Syst Bacteriol. 49 Pt 4, 1523-6.
- 23. Collins, M. D.; Rodriguez Jovita, M.; Lawson, P. A.; Falsen, E.; Foster, G. (1999):** Characterization of a novel gram-positive, catalase-negative coccus from horses: description of *Eremococcus coleocola* gen. nov., sp. nov. Int J Syst Bacteriol. 49(4), 1381-5.
- 24. Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e. V. (2004):** MHK-Bestimmung mit der Methode der Bouillon-Mikrodilution bei tierpathogenen Bakterien entsprechend NCCLS M31-A2 (2002). Prüfprotokoll zum Ringversuch 2004.
- 25. Deutsches Institut für Normung e. V. (1987):** Mikrobiologische Milchuntersuchung; Nachweis von *Streptococcus agalactiae* in Rohmilch DIN 10194:1987-09.
- 26. Dowling, P. M.; Tyler, J. W. (1994):** Diagnosis and treatment of bacterial endocarditis in cattle. J Am Vet Med Assoc. 204(7), 1013-6.
- 27. Europäische Union (2004):** Verordnung (EG) Nr. 854/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 mit besonderen Verfahrensvorschriften für die amtliche Überwachung von zum menschlichen Verzehr bestimmten Erzeugnissen tierischen Ursprungs (ABl. L 226 vom 25.6.2004, S. 83).
- 28. Euzéby, J. P. (1998-2008):** Dictionnaire de bactériologie vétérinaire. Abgerufen am: 23.05.2008, von: <http://www.bacdico.net>.
- 29. Facklam, R.; Elliott, J. A. (1995):** Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, gram-positive cocci, excluding the streptococci and enterococci. Clin Microbiol Rev. 8(4), 479-95.
- 30. Facklam, R. R. (2001):** Newly described, difficult-to-identify, catalase-negative, gram-positive cocci. Clinical Microbiology Newsletter. 23(1), 1-7.

31. **Fertally, S. S.; Facklam, R. (1987):** Comparison of physiologic tests used to identify non-beta-hemolytic aerococci, enterococci, and streptococci. *J Clin Microbiol.* 25(10), 1845-50.
32. **Frenkel, A.; Hirsch, W. (1961):** Spontaneous development of L forms of streptococci requiring secretions of other bacteria or sulphhydryl compounds for normal growth. *Nature.* 191, 728-30.
33. **Garrity, G. M.; Lilburn, T. G.; Cole, J. R.; Harrison, S. H.; Euzéby, J.; Tindall, B. J. (2007):** Taxonomic outline of the bacteria and archaea, Release 7.7 March 6, 2007. Part 7 – The Bacteria: Phylum “*Firmicutes*”: Class “*Clostridia*”. Abgerufen am: 10.07.2008, von: <http://www.taxonomicoutline.org/index.php/toba/article/view/184/216>.
34. **Goyache, J.; Vela, A. I.; Gibello, A.; Blanco, M. M.; Briones, V.; Gonzalez, S.; Tellez, S.; Ballesteros, C.; Dominguez, L.; Fernandez-Garayzabal, J. F. (2001):** *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* infection in waterfowl: first confirmation in animals. *Emerg Infect Dis.* 7(5), 884-6.
35. **Gurtler, J. B.; Beuchat, L. R. (2005):** Performance of media for recovering stressed cells of *Enterobacter sakazakii* as determined using spiral plating and ecometric techniques. *Appl Environ Microbiol.* 71(12), 7661-9.
36. **Haas, J.; Jernick, S. L.; Scardina, R. J.; Teruya, J.; Caliando, A. M.; Ruoff, K. L. (1997):** Colonization of skin by *Helcococcus kunzii*. *J Clin Microbiol.* 35(11), 2759-61.
37. **AKS Hannover (2005):** Hinweise zu QM-Schwerpunkten in der Mikrobiologie: Umgang mit Stammsammlungen in der Mikrobiologie. Abgerufen am: 23.03.2008, von: <http://www.aks-hannover.de/direkt/Mibi-Hinw-Vers%202.pdf>.
38. **Healy, A. M. (1996):** Endocarditis in cattle. A review of 22 cases. *Irish Vet J.* 49, 43-8.
39. **Higgins, R.; Biberstein, E. L.; Jang, S. S. (1984):** Nutritionally variant streptococci from corneal ulcers in horses. *J Clin Microbiol.* 20(6), 1130-4.
40. **Houe, H.; Eriksen, L.; Jungersen, G.; Pedersen, D.; Krogh, H. V. (1993):** Sensitivity, specificity and predictive value of blood cultures from cattle clinically suspected of bacterial endocarditis. *Vet Rec.* 133(11), 263-6.
41. **Hoyles, L.; Foster, G.; Falsen, E.; Collins, M. D. (2000):** Characterization of a *Gemella*-like organism isolated from an abscess of a rabbit: description of *Gemella cunicula* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 50 Pt 6, 2037-41.
42. **Hoyles, L.; Lawson, P. A.; Foster, G.; Falsen, E.; Ohlen, M.; Grainger, J. M.; Collins, M. D. (2000):** *Vagococcus fessus* sp. nov., isolated from a seal and a harbour porpoise. *Int J Syst Evol Microbiol.* 50 Pt 3, 1151-4.
43. **Janda, J. M.; Abbott, S. L. (2002):** Bacterial identification for publication: when is enough enough? *J Clin Microbiol.* 40(6), 1887-91.
44. **Janda, J. M.; Abbott, S. L. (2007):** 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J Clin Microbiol.* 45(9), 2761-4.
45. **Jost, B. H.; Billington, S. J. (2005):** *Arcanobacterium pyogenes*: molecular pathogenesis of an animal opportunist. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 88(2), 87-102.
46. **Kawamura, Y.; Hou, X. G.; Sultana, F.; Liu, S.; Yamamoto, H.; Ezaki, T. (1995):** Transfer of *Streptococcus adjacens* and *Streptococcus defectivus* to *Abiotrophia* gen. nov. as *Abiotrophia adiacens* comb. nov. and *Abiotrophia defectiva* comb. nov., respectively. *Int J Syst Bacteriol.* 45(4), 798-803.

47. **Kilian, M.; Mikkelsen, L.; Henrichsen, J. (1989):** Taxonomic study of viridans streptococci: description of *Streptococcus gordonii* sp. nov. and emended descriptions of *Streptococcus sanguis* (White and Niven 1946), *Streptococcus oralis* (Bridge and Sneath 1982), and *Streptococcus mitis* (Andrewes and Horder 1906). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39, 471-84.
48. **Kubota, Y.; Morimoto, K. (2006):** Association between cases of bovine abscess during the previous 20-year period in Hiroshima prefecture and *Helcococcus ovis*. *Hiroshima Journal of Veterinary Medicine.* 21, 24-7.
49. **LaClaire, L. L.; Facklam, R. R. (2000):** Comparison of three commercial rapid identification systems for the unusual gram-positive cocci *Dolosigranulum pigrum*, *Ignavigranum ruoffiae*, and *Facklamia* Species. *J Clin Microbiol.* 38(6), 2037.
50. **Lawson, P. A.; Foster, G.; Falsen, E.; Ohlen, M.; Collins, M. D. (1999):** *Vagococcus lutrae* sp. nov., isolated from the common otter (*Lutra lutra*). *Int J Syst Bacteriol.* 49 Pt 3, 1251-4.
51. **Leclercq, R. (2002):** Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin Infect Dis.* 34(4), 482-92.
52. **Leclercq, R.; Courvalin, P. (2002):** Resistance to macrolides and related antibiotics in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 46(9), 2727-34.
53. **Lemaitre, N.; Huvent, D.; Loiez, C.; Wallet, F.; Courcol, R. J. (2008):** Isolation of *Helcococcus kunzii* from plantar phlegmon in a vascular patient. *J Med Microbiol.* 57(Pt 7), 907-8.
54. **Maillard, R.; Petit, E.; Chomel, B.; Lacroux, C.; Schelcher, F.; Vayssier-Taussat, M.; Haddad, N.; Boulouis, H. J. (2007):** Endocarditis in cattle caused by *Bartonella bovis*. *Emerg Infect Dis.* 13(9), 1383-5.
55. **Moreillon, P.; Que, Y. A. (2004):** Infective endocarditis. *Lancet.* 363(9403), 139-49.
56. **Morimoto, K.; Kubota, Y.; Fujita, A.; Kawamoto, C.; Ibaraki, Y. (2006):** A case of bovine valvular endocarditis in which *Helcococcus ovis* is isolated. *Journal of the Japan Veterinary Medical Association.* 59(5), 325-328.
57. **Mossel, D. A. (1985):** Introduction and prospective. *Int J Food Microbiol.* 2, 1-7.
58. **Mossel, D. A.; Bonants-Van Laarhoven, T. M.; Ligtenberg-Merkus, A. M.; Werdler, M. E. (1983):** Quality assurance of selective culture media for bacteria, moulds and yeasts: an attempt at standardization at the international level. *J Appl Bacteriol.* 54(3), 313-27.
59. **Mossel, D. A.; van Rossem, F.; Koopmans, M.; Hendriks, M.; Verouden, M.; Eelderink, I. (1980):** Quality control of solid culture media: a comparison of the classic and the so-called ecometric technique. *J Appl Bacteriol.* 49(3), 439-54.
60. **Müller, M.; Platz, S.; Ehrlein, J.; Ewringmann, T.; Molle, G.; Weber, A. (2005):** Bakteriell bedingte Thromboembolie bei Milchkühen-eine retrospektive Auswertung von 31 Sektionsfällen unter besonderer Berücksichtigung des Ursachenkomplexes. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 118(3-4), 121-7.
61. **Naber, C. K. (2004):** S2-Leitlinie zu Diagnostik und Therapie der infektiösen Endokarditis. *Z Kardiol.* 93(12), 1005-21.
62. **Narucka, U.; van den Berg, J.; Nouws, J. F.; Okma, B. D.; Peelen, J. P.; Soethout, A. E. (1985):** [Disorders in slaughtering animals. V. Endocarditis in slaughtering pigs, sows and cattle]. *Tijdschr Diergeneeskd.* 110(19), 776-9.

63. **Nickel, R.; Schummer, A.; Seiferle, E. (2004):** Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. 4. Auflage. MVS Medizinverlage Stuttgart. ISBN:978-3-8304-4164-9. Band III, Kreislaufsystem, Haut- und Hautorgane.
64. **Panackal, A. A.; Houze, Y. B.; Prentice, J.; Leopold, S. S.; Cookson, B. T.; Liles, W. C.; Limaye, A. P. (2004):** Prosthetic joint infection due to "*Helcococcus pyogenes*". J Clin Microbiol. 42(6), 2872-4.
65. **Patti, J. M.; Allen, B. L.; McGavin, M. J.; Hook, M. (1994):** MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. Annu Rev Microbiol. 48, 585-617.
66. **Peddle, G.; Sleeper, M. M. (2007):** Canine bacterial endocarditis: a review. J Am Anim Hosp Assoc. 43(5), 258-63.
67. **Peel, M. M.; Davis, J. M.; Griffin, K. J.; Freedman, D. L. (1997):** *Helcococcus kunzii* as sole isolate from an infected sebaceous cyst. J Clin Microbiol. 35(1), 328-9.
68. **Post, K. W.; Rushton, S. D.; Billington, S. J. (2003):** Valvular endocarditis associated with *Helcococcus ovis* infection in a bovine. J Vet Diagn Invest. 15(5), 473-5.
69. **Power, H. T.; Rebhun, W. C. (1983):** Bacterial endocarditis in adult dairy cattle. J Am Vet Med Assoc. 182, 806-808.
70. **Raney, P. M.; Tenover, F. C.; Carey, R. B.; McGowan, J. E., Jr.; Patel, J. B. (2006):** Investigation of inducible clindamycin and telithromycin resistance in isolates of beta-hemolytic streptococci. Diagn Microbiol Infect Dis. 55(3), 213-8.
71. **Riegel, P.; Lepargneur, J. P. (2003):** Isolation of *Helcococcus kunzii* from a post-surgical foot abscess. Int J Med Microbiol. 293(6), 437-9.
72. **Roberts, M. C.:** Distribution of *tet* resistance genes among gram-negative bacteria. Abgerufen am: 13.09.2008, von: <http://faculty.washington.edu/marilynr/tetweb3.pdf>.
73. **Roberts, M. C.:** Distribution of tetracycline resistance genes among gram-positive bacteria, *Mycobacterium*, *Mycoplasma*, *Nocardia*, *Streptomyces* and *Ureaplasma*. Abgerufen am: 13.09.2008, von: <http://faculty.washington.edu/marilynr/tetweb3.pdf>.
74. **Roberts, M. C.:** Location of the various genes. Abgerufen am: 13.09.2008, von: <http://faculty.washington.edu/marilynr/ermweb4.pdf>.
75. **Roberts, M. C.:** Mechanism of resistance for characterized *tet* and *otr* genes. Abgerufen am: 13.09.2008, von: <http://faculty.washington.edu/marilynr/tetweb1.pdf>.
76. **Roberts, M. C.:** Mechanisms of MLS resistance. Abgerufen am: 13.09.2008, von: <http://faculty.washington.edu/marilynr/ermwebA.pdf>.
77. **Roggenkamp, A.; Abele-Horn, M.; Trebesius, K. H.; Tretter, U.; Autenrieth, I. B.; Heesemann, J. (1998):** *Abiotrophia elegans* sp. nov., a possible pathogen in patients with culture-negative endocarditis. J Clin Microbiol. 36(1), 100-4.
78. **Rothschild, C. M.; Oaks, J. L.; Schaupp, J. K.; Rurangirwa, F. R.; Sellon, D. C.; Hines, M. T. (2004):** *Helcococcus ovis* isolated from a pulmonary abscess in a horse. J Clin Microbiol. 42(5), 2224-6.
79. **Ruiz-Zarzuola, I.; de Bias, I.; Girones, O.; Ghittino, C.; Muazquiz, J. L. (2005):** Isolation of *Vagococcus salmoninarum* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), broodstocks: characterization of the pathogen. Vet Res Commun. 29(7), 553-62.

- 80. Ruoff, K. L. (2002):** Miscellaneous catalase-negative, gram-positive cocci: emerging opportunists. *J Clin Microbiol.* 40(4), 1129.
- 81. Ruoff, K. L. (2007):** *Aerococcus*, *Abiotrophia*, and other aerobic catalase-negative, gram-positive cocci. In: *Manual of Clinical Microbiology*. 9<sup>th</sup> ed. Washington, DC: ASM Press. ISBN 978-1-5558-1371-0. S. 443-54.
- 82. Sawant, A. A.; Pillai, S. R.; Jayarao, B. M. (2002):** Evaluation of five selective media for isolation of catalase-negative gram-positive cocci from bulk tank milk. *Journal of Dairy Science.* 85(5), 1127-32.
- 83. Schiele, R.; Amtsberg, G.; Meier, C. (1984):** Zur Diagnostik der bakteriellen Endokarditis des Rindes mit Hilfe intra vitam angelegter Blutkulturen. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 91(1), 15-8.
- 84. Senn, L.; Entenza, J. M.; Prod'hom, G. (2006):** Adherence of *Abiotrophia defectiva* and *Granulicatella* species to fibronectin: is there a link with endovascular infections? *FEMS Immunol Med Microbiol.* 48(2), 215-7.
- 85. Songer, J. G.; Post, K. W. (2005):** *Veterinary Microbiology: bacterial and fungal agents of animal disease.* St. Louis, MO: Elsevier Saunders. ISBN:0721687172.
- 86. Stavri, H.; Beveridge, T. J.; Moyles, D.; Athamna, A.; Doyle, R. J. (2002):** Hemagglutinin of unusual specificity from *Helcococcus kunzii*. *Arch Microbiol.* 177(2), 197-9.
- 87. Strehle, U.; Welbers, N. (1987):** Die Pyogenes-Endokarditis des Rindes. *Tierärztliche Umschau.* 42, 869-78.
- 88. Styriak, I.; Laukova, A.; Fallgren, C.; Wadstrom, T. (1999):** Binding of extracellular matrix proteins by animal strains of staphylococcal species. *Vet Microbiol.* 67(2), 99-112.
- 89. Styriak, I.; Laukova, A.; Fallgren, C.; Wadstrom, T. (1999):** Binding of selected extracellular matrix proteins to enterococci and *Streptococcus bovis* of animal origin. *Curr Microbiol.* 39(6), 327-35.
- 90. Vandamme, P.; Hommez, J.; Snauwaert, C.; Hoste, B.; Cleenwerck, I.; Lefebvre, K.; Vancanneyt, M.; Swings, J.; Devriese, L. A.; Haesebrouck, F. (2001):** *Globicatella sulfidifaciens* sp. nov., isolated from purulent infections in domestic animals. *Int J Syst Evol Microbiol.* 51(Pt 5), 1745-9.
- 91. Vela, A. I.; Fernandez, E.; las Heras, A.; Lawson, P. A.; Dominguez, L.; Collins, M. D.; Fernandez-Garayzabal, J. F. (2000):** Meningoencephalitis associated with *Globicatella sanguinis* infection in lambs. *J Clin Microbiol.* 38(11), 4254-4255.
- 92. Vela, A. I.; Porrero, C.; Goyache, J.; Nieto, A.; Sanchez, B.; Briones, V.; Moreno, M. A.; Dominguez, L.; Fernandez-Garayzabal, J. F. (2003):** *Weissella confusa* infection in primate (*Cercopithecus mona*). *Emerg Infect Dis.* 9(10), 1307-9.
- 93. Weenk, G. H. (1992)** Microbiological assessment of culture media: comparison and statistical evaluation of methods. *Int J Food Microbiol.* 17(2), 159-81.
- 94. Weisblum, B. (1995):** Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob Agents Chemother.* 39(3), 577-85.

95. **Wilson, W.; Taubert, K. A.; Gewitz, M.; Lockhart, P. B.; Baddour, L. M.; Levison, M.; Bolger, A.; Cabell, C. H.; Takahashi, M.; Baltimore, R. S.; Newburger, J. W.; Strom, B. L.; Tani, L. Y.; Gerber, M.; Bonow, R. O.; Pallasch, T.; Shulman, S. T.; Rowley, A. H.; Burns, J. C.; Ferrieri, P.; Gardner, T.; Goff, D.; Durack, D. T. (2007):** Prevention of infective endocarditis: Guidelines from the American Heart Association: a guideline from the American Heart Association Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease Committee, Council on Cardiovascular Disease in the Young, and the Council on Clinical Cardiology, Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia, and the Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group. *Circulation*. 116(15), 1736-54.
96. **Woo, P. C.; Tse, H.; Wong, S. S.; Tse, C. W.; Fung, A. M.; Tam, D. M.; Lau, S. K.; Yuen, K. Y. (2005):** Life-threatening invasive *Helicococcus kunzii* infections in intravenous-drug users and *ermA*-mediated erythromycin resistance. *J Clin Microbiol*. 43(12), 6205-8.
97. **Yamaga, Y.; Too, K. (1986):** Echocardiographic detection of bovine cardiac diseases. *Jpn J Vet Res*. 34(3-4), 251-67.
98. **Yamaga, Y.; Too, K. (1987):** Diagnostic ultrasound imaging of vegetative valvular endocarditis in cattle. *Jpn J Vet Res*. 35(1), 49-63.
99. **Young, J. M. (2000):** Suggestions for avoiding on-going confusion from the Bacteriological Code. *Int J Syst Evol Microbiol*. 50 Pt 4, 1687-9.

## Publikationsverzeichnis

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden vorab veröffentlicht in:

**Kutzer, P.; Schulze, C.; Engelhardt, A.; Wieler, L. H.; Nordhoff, M. (2008):** *Helcococcus ovis*, an emerging pathogen in bovine valvular endocarditis. J Clin Microbiol. 46(10), 3291-5.

## **Danksagung**

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Lothar H. Wieler für die Überlassung des Themas und die stets freundliche Unterstützung bei dessen Bearbeitung, insbesondere aber für sein unermüdliches Drängen, mich dieser Aufgabe zu stellen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Roland Körber für dessen Einverständnis, meine Untersuchungen im Landeslabor Berlin-Brandenburg durchzuführen und mich der hier verfügbaren technischen Mittel zu bedienen.

Mein herzlicher Dank gilt Dr. Andreas Engelhardt, Dr. Marcel Nordhoff und Dr. Christoph Schulze für deren fortwährende Hilfsbereitschaft im Allgemeinen sowie die vielen guten Ratschläge zur Beantwortung molekularbiologischer und pathomorphologischer Fragestellungen im Besonderen.

Den Kolleginnen und Kollegen des Bundesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL), Dr. Heike Kaspar, Dr. Ulrike Steinacker und Dr. Jürgen Wallmann danke ich für die fachliche Beratung in Fragen der Empfindlichkeitsprüfung und die unkomplizierte Bereitstellung der Testplatten.

Ich danke Herrn Dr. Ulf Klaaß aus dem Landesamt für Verbraucherschutz, Landwirtschaft und Flurneuordnung (LVLF) des Landes Brandenburg für dessen Unterstützung bei der Beschaffung der Tier- und Bestandsdaten.

Ein großes Dankeschön geht an Frau Angelika Pahlke für die tatkräftige Hilfe bei der Bearbeitung der Stämme sowie an Frau Ingrid Schwarz für die Verwirklichung auch ausgefallener Nährmedienwünsche.

## **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit bestätige ich, Peter Kutzer, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Frankfurt (Oder), den 15. Januar 2009

Peter Kutzer