

# BERICHT DES 24. KONGRESSES

der Deutschen

Veterinärmedizinischen

Gesellschaft e. V.

LEITTHEMA: „AKTUELLE FORSCHUNG“

Schwerpunktthemen:

„Perspektiven in der Veterinärmedizinischen Forschung“

„Salmonellen und Lebensmittel“

„Minimal invasive Chirurgie – pro und contra“

**Bad Nauheim**

**vom 4. bis 7. April 2001**

---

Verlag der  
Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V.  
Frankfurter Str. 89, D-35392 Gießen  
Vorsitzender : Prof. Dr. H. Martens (Berlin)

Die vergleichende Analyse von Hemmhofdurchmessern und MHK-Werten zeigte in beiden Testkollektiven, daß Isolate, die den gleichen Hemmhofdurchmesser aufweisen, sich in den entsprechenden MHK-Werten um maximal zwei Verdünnungsstufen unterscheiden. Im umgekehrten Fall ergeben sich bei Isolaten, die den gleichen MHK-Wert aufweisen, deutliche Unterschiede in ihren Hemmhofdurchmessern. So variierten beispielsweise *P. multocida*-Isolate mit dem MHK-Wert von 0,25 µg/ml in ihren Hemmhofdurchmessern zwischen 32 und 44 mm. *M. haemolytica*-Isolate mit MHK-Werten von 0,5 µg/ml variierten in den Hemmhofdurchmessern zwischen 29 und 38 mm.

#### 4. ZUSAMMENFASSUNG

Die Resultate dieser Studie zeigten, daß auch 5 Jahre nach Einführung des Florfenicols in die klinische Nutzung eine vollständige Empfindlichkeit der hauptsächlich zu bekämpfenden Erregern von Atemwegserkrankungen des Rindes vorliegt. Weiterhin bekräftigt der Vergleich von Hemmhofdurchmessern und MHK-Werten, daß eine direkte Umrechnung von Hemmhofdurchmessern in MHK-Werte (und umgekehrt) mit erheblichen Fehlern behaftet ist und daher selbst unter Verwendung laborspezifischer Eichkurven nicht empfohlen werden kann.

#### 5. LITERATURVERZEICHNIS

1. ANGEN, Ø., R. MUTTERS, D. A. CAUGANT, J. E. OLSEN und M. BISGAARD (1999): Taxonomic relationships of the [*Pasteurella*] *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen. nov., comb. nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov., *Mannheimia ruminalis* sp. nov. and *Mannheimia varigena* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. **49**: 67-86.
2. HÖRMANSDORFER, S. und J. BAUER (1996): Zur Resistenzsituation boviner Pasteurellen. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **109**: 168-171.
3. HÖRMANSDORFER, S. und J. BAUER (1998): Zur Resistenz boviner und porciner Pasteurellen gegenüber Florfenicol und anderen Antibiotika. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **111**: 422-426.
4. KEHRENBURG C. (2000): Molekulare Grundlagen der Tetracyclinresistenz von Isolaten der Genera *Pasteurella* and *Mannheimia*: Identifizierung neuartiger Plasmide und Transposons. Tierärztl. Hochschule Hannover, Ph.D.-These.
5. KONEMAN, E. W., S. D. ALLEN, W. M. JANDA, P. C. SCHRECKENBERGER, and W. C. WINN, Jr. (1997): Color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 5th ed. Lippincott, Philadelphia - New York, pp. 416-423.
7. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (1999): Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard. M31-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.

**Anschrift des Autors:** Prof. Dr. Stefan Schwarz, Institut für Tierzucht und Tierverhalten der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL), Dörnbergstr. 25-27, 29223 Celle. Tel. 05141-384673; Fax: 05141-381849; Email: stefan.schwarz@fal.de

Aus der <sup>1</sup>Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Institut für epidemiologische Diagnostik, Seestr. 55, D-16868 Wusterhausen, dem <sup>2</sup>Staatliches Veterinäruntersuchungsamt, Zur Taubeneiche 10-12, D-59821 Arnsberg, und dem <sup>3</sup>Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz, Blücherstr. 34, D-56073 Koblenz

#### Ursachen *Neospora caninum*-assoziierter Aborte bei Rindern

G. Schares<sup>1</sup>, P. Söndgen<sup>2</sup>, M. Peters<sup>2</sup>, R. Wurm<sup>2</sup>, M. Rauser<sup>3</sup>, R. Labohm<sup>3</sup>, K. Dräger<sup>3</sup>, G. Hess<sup>3</sup>, F.J. Conraths<sup>1</sup>

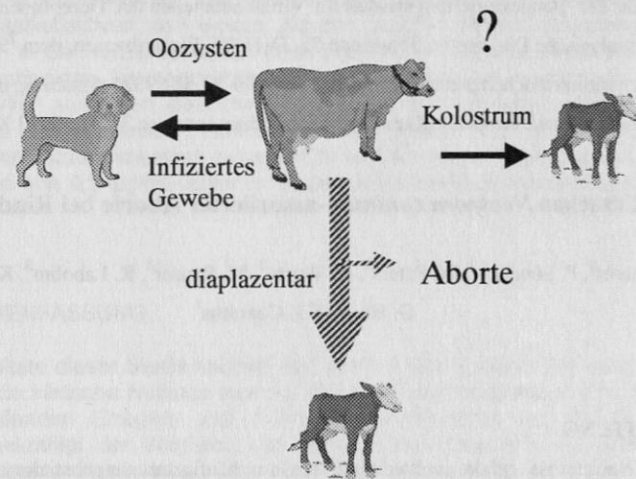
#### 1. EINLEITUNG

Die Neosporose gehört weltweit zu den am häufigsten diagnostizierten infektiösen Abortursachen beim Rind. Beispielsweise wurden in den Niederlanden bei 17% der eingesandten Föten Hinweise auf Infektionen mit *Neospora caninum* gefunden (Wouda et al. 1997). In Nordrhein-Westfalen und Rheinland-Pfalz konnten bei 22 % bzw. 29 % der untersuchten Föten *N. caninum*-Infektionen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion nachgewiesen werden (Rauser et al., unveröffentlicht; Söndgen et al., unveröffentlicht).

*N. caninum* ist ein protozoärer Parasit, der 1984 erstmals bei Hunden als Ursache für Enzephalomyelitiden und Myositiden beschrieben wurde. Der Hund ist Endwirt für *N. caninum*; Wildkarnivoren werden als weitere Endwirte diskutiert, sie sind aber als solche nicht bestätigt. 1989 wurde erstmals über Aborte beim Rind berichtet, die mit *N. caninum* in Verbindung gebracht werden konnten.

Rinder können sich pränatal über ihre Mütter infizieren. Dabei kommt es zum diaplazentaren Übertritt von *N. caninum* (vertikale Übertragung, siehe Abb. 1). Desweiteren werden als Infektionsquellen Oozysten diskutiert, die von Endwirten (Hunden, eventuell auch anderen Wildkarnivoren) im Kot ausgeschieden werden und das Futter oder Trinkwasser der Rinder kontaminieren können (horizontale Übertragung, siehe Abb. 1).

Im Feld werden in den betroffenen Herden endemische und epidemische *N. caninum*-assozierte Abortgeschehen beobachtet. Bei endemischen Abortgeschehen treten die Aborte über längere Zeiträume verteilt auf. Bei epidemischen Abortgeschehen ist eine starke zeitliche Häufung der Aborte innerhalb der Herde zu beobachten.



**Abb. 1:** Horizontale (postnatale) und vertikale (präinatale) Infektionswege bei der bovinen *Neospora*-Infektion. Die vertikale (////) Infektion ist wahrscheinlich der wichtigste Übertragungsweg; mehr als 80% der Kälber infizierter Mütter sind selbst infiziert. Darüber hinaus können sich Rinder horizontal (→) durch die Aufnahmen von *Neospora*-Dauerstadien (Oozysten) infizieren, die von Endwirten (Hunden) ausgeschieden werden. Die Übertragung durch Kolostrum infizierter Mütter wird in der Literatur diskutiert.

In der vorliegenden Studie wurde der Frage nachgegangen, welche Infektionsgeschehen den Hintergrund für die im Feld beobachteten endemischen und epidemischen *N. caninum*-assoziierten Abortgeschehen bilden.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. Untersuchungen in Herden mit *N. caninum*-assoziierten Aborten

In Herden mit nachgewiesenen *N. caninum*-assoziierten Aborten aus Niedersachsen, Nordrhein-Westfalen, Rheinland-Pfalz und Baden-Württemberg wurden seroepidemiologische Untersuchungen durchgeführt. Für die Untersuchungen wurden in den jeweiligen Herden von allen weiblichen Rindern im Alter von mindestens 2 Jahren und von möglichst vielen der zwischen 6 Monaten und 2 Jahren alten Rinder eine Serumprobe gewonnen.

Die serologischen Untersuchungen wurden mit einem indirekten ELISA durchgeführt, der auf einem *N. caninum*-Oberflächenantigen basiert (Schaes et al. 2000).

Die serologischen Ergebnisse wurden mittels Fisher exact- und  $\chi^2$ -Test statistisch ausgewertet. Dabei wurde geprüft, ob eine statistische Assoziation zwischen einer Antikörperantwort gegen *N. caninum* und den Aborten bestand (Tabelle 1). Des Weiteren wurde geprüft, ob eine Assoziation zwischen der Antikörperantwort der Mütter und der ihrer Töchter (Tabelle 2) vorhanden war.

**Tabelle 1:** Statistische Zusammenhänge zwischen dem serologischen Nachweis von *N. caninum*-Infektionen bei Müttern und dem Auftreten von Aborten.

Art des Abortgeschehens	Herde	Zahl der Aborte/ Zahl der tragenden Tiere	Verkalbezeitraum	Untersuchung der Verkalbungen			P-Wert
				Positive Tiere Abort	Kein Abort	Odds Ratio (95% Konfidenzgrenzen)	
Endemisch	1	4/64	1997	3/4	12/60	12,0 (0,96-329)	0,037
	2	10/80	1999	9/10	11/70	48,3 (5,21-1126)	< 0,001
	3	3/94	1998	3/5	15/89	7,4 (0,89-71)	0,047
	4	7/38	2000	6/7	6/31	25,0 (2,14-672)	0,002
	5	4/67	2000	4/4	27/63	5,3 (0,51-133) <sup>a</sup>	0,041
Epidemisch	6	8/66	9-10/ 2000	8/8	10/58	38,4 (3,98-917)	< 0,001
	7	5/22	9-10/ 2000	4/5	2/17	30,0 (1,54-1358)	0,046
	8	7/34	10/ 2000	4/7	3/27	10,7 (1,17-123)	0,020
	9	12/55	9-10/ 2000	11/12	11/31	20,0 (2,10-472) <sup>b</sup>	0,003

<sup>a</sup> Odds-Ratio wurde durch Ersetzen von 0 durch 1 unterschätzt

<sup>b</sup> Yates-korrigierter Chi-Quadrat-Test

### 2.2. Tankmilchuntersuchungen auf *N. caninum*-spezifische Antikörper

Bei flächendeckenden Tankmilchuntersuchungen, wurden alle Rinderherden beprobt, die von Januar bis August 2000 Milch an in Rheinland-Pfalz ansässige Molkereien lieferten. Die Tankmilchuntersuchungen wurden mit einem indirekten ELISA, basierend auf einem *N. caninum*-Oberflächenantigen durchgeführt (Schaes et al., Publikation in Vorbereitung).



Die Tankmilchergebnisse wurden den verschiedenen Regionen (Gemeinden und Städten) zugeordnet und mit Daten zur Bevölkerungsdichte verglichen.

### 3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

#### 3.1. Untersuchungen innerhalb betroffener Herden (Tabelle 2).

In Herden mit endemischen *N. caninum*-assoziierten Abortgeschehen (d.h. Abortgeschehen, bei denen die Verkaltungen nicht gehäuft, sondern über längere Zeiträume verteilt auftreten) waren statistisch signifikante Assoziationen zwischen der Antikörperantwort der Mütter und der ihrer Töchter nachweisbar. Dies deutet darauf, dass sich die meisten Tiere in der Herde wahrscheinlich pränatal (d.h. über ihre Mütter) infiziert haben.

**Tabelle 2:** Statistische Zusammenhänge zwischen dem serologischen Nachweis von *N. caninum*-Infektionen bei Müttern und ihren Töchtern. Nur in Herden mit endemischen *N. caninum*-assoziierten Abortgeschehen waren diese Zusammenhänge statistisch signifikant.

Art des Abortgeschehens	Herde	Serologisch positive Töchter		Odds Ratio (95% Konfidenzgrenzen)	P-Wert
		Mutter positiv	Mutter negativ		
Endemisch	1	7/14	1/36	35,0 (3,27-892)	< 0,001
	2	2/5	0/25	16,7 (0,78-687)	0,023
	3	3/6	1/27	26,0 (1,49-959)	0,014
	4	2/2	1/5	8,0 (0,17-1772)	0,143
	5	3/4	2/10	12,0 (0,51-605)	0,095
Gesamt-endemisch		17/31	5/103	23,8 (6,79-89,0)	< 0,001 <sup>b</sup>
Epidemisch	6	2/6	13/33	0,77 (0,08-6,11)	0,622
	7	2/4	7/31	3,4 (0,27-44,6)	0,268
	8	2/4	0/8	8,0 (0,28-450) <sup>a</sup>	0,091
	9	0/3	3/11	0,0 (0,00-11,9)	1
Gesamt-epidemisch		6/7	23/83	1,42 (0,41-4,83)	0,564 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Odds-Ratio wurde durch Ersetzen von 0 durch 1 unterschätzt.

<sup>b</sup> Yates-korrigierter Chi-Quadrat-Test

In Herden mit epidemischen *N. caninum*-assoziierten Abortgeschehen (d.h. seuchenhafte Abortgeschehen, bei denen die Verkaltungen zeitlich gehäuft auftreten) waren dagegen keine statistisch signifikanten Assoziationen zwischen der Antikörperantwort der Mütter und der ihrer Töchter nachweisbar (Tabelle 2). Dies deutet darauf, dass sich die Tiere wahrscheinlich postnatal infiziert haben. Die wahrscheinlichste Infektionsquelle stellen von Endwirten (z.B. Hunden) ausgeschiedene Dauerstadien (Oozysten) dar, die Futter oder Trinkwasser der Herde kontaminiert haben könnten.

#### 3.2. Tankmilchuntersuchungen auf *N. caninum*-spezifische Antikörper

In Rheinland-Pfalz treten die in der Tankmilchuntersuchung *N. caninum*-positiven Herden regional gehäuft auf. Tankmilch-positive Herden sind in oder um dichter besiedelte Regionen häufiger nachweisbar. Da angenommen werden kann, dass in dichter besiedelten Gebieten auch mehr Hunde gehalten werden, könnte dieses Ergebnis darauf hindeuten, dass die Infektionen von Rinderherden mit *N. caninum* in Deutschland im wesentlichen von Hunden ausgehen. Zur Bestätigung dieser Hypothese werden zur Zeit weitere Untersuchungen durchgeführt. Ergebnisse aus den USA, dass Wildkarnivoren als weitere Endwirte eine große Bedeutung bei der bovinen Neosporose spielen, scheinen sich für Deutschland nicht zu bestätigen, da Regionen, in denen eine höhere Dichte an Wildkarnivoren angenommen werden kann, geringere Prävalenzen Tankmilch-positiver Herden aufweisen.

### 4. ZUSAMMENFASSUNG

In Rinderherden mit endemischen *N. caninum*-assoziierten Abortgeschehen haben sich die Tiere überwiegend pränatal infiziert.

Epidemische (seuchenhafte) *N. caninum*-assoziierte Abortgeschehen stehen offenbar im Zusammenhang mit überwiegend postnatalen Infektionen. Diese werden wahrscheinlich durch Oozysten ausgelöst, die Futter oder Trinkwasser der Tiere kontaminiert haben könnten.

Die flächendeckenden Tankmilchuntersuchungen in Rheinland-Pfalz zeigen, dass Rinderherden in oder in der Nähe dicht besiedelter Gebiete ein höheres Risiko der Infektion mit *N. caninum* haben als Rinderherden in weniger dicht besiedelten Gegenden.

## 5. LITERATURVERZEICHNIS

Schares, G., Rauser, M., Söndgen, P., Rehberg, P., Bärwald, A., Dubey, J.P., Edelhofer, R., Conraths, F.J. 2000. Use of purified tachyzoite surface antigen p38 in an ELISA to diagnose bovine neosporosis. *Int.J.Parasitol.* 30,1123-1130.

Wouda, W., Moen, A.R., Visser, I.J.R., Vanknapen, F. 1997. Bovine fetal neosporosis: a comparison of epizootic and sporadic abortion cases and different age classes with regard to lesion severity and immunohistochemical identification in brain, heart and liver. *J.Vet.Diagn.Invest.* 9,180-185.

**Anschrift des Verfassers:**

Dr. Gereon Schares

Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere

Institut für epidemiologische Diagnostik

Seestrasse 55

D-16868 Wusterhausen

### EXCLUSION OF SPECIFIC GLYCOPEPTIDE AND TETRACYCLINE RESISTANCE MECHANISMS IN PROBIOTIC LACTOBACILLI BY PROBING OF *van* AND *tet* GENES

G. Klein,<sup>1,3</sup> I. A. Casas,<sup>2</sup> and G. Reuter<sup>3</sup>, <sup>1</sup>BgVV, Berlin, <sup>2</sup>Biogaia Biologics Inc., Raleigh, NC, USA, <sup>3</sup>Inst. für Fleischhygiene u. -technologie, FU Berlin  
(\*current address: BgVV)

**Abstract**

**Objective** To assess the impact of an antibiotic resistance on the pathogenic potential of a microorganism, it is essential to know the molecular mechanism of the resistance. A first step is to exclude mechanisms of resistance, which are described for pathogenic species. The aim of this study was to determine if the glycopeptide and tetracycline resistance of strains of probiotic lactobacilli is based on similar genetic elements like in enterococci and Gram-negatives, resp.

**Methods** Five *L. reuteri* and one *L. rhamnosus* strain have been investigated in order to determine the presence of the *vanA* gene cluster and the *vanB* gene by PCR and southern hybridization as well as *vanC*, *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetM*, and *tetO* genes by PCR (for *tet* genes only three probiotic strains could be tested). Additionally *L. reuteri* field strains were included for *tet* gene analysis. All strains were tested for antibiotic susceptibility in a microbouillon dilution test against a variety of antibiotics.

**Results** All *Lactobacillus* strains were resistant to the glycopeptide vancomycin and tetracycline. PCR and southern hybridization showed that none of the probiotic *Lactobacillus* strains possessed the *vanA* or *vanB* gene or any other gene of the *vanA* gene cluster. PCR confirmed also that none of the probiotic strains possessed *vanC*, *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetM*, or *tetO* genes. Unspecific PCR products for *tet* genes could be observed for some *L. reuteri* field strains.

**Conclusions** The findings indicate that the glycopeptide resistance of the probiotic *Lactobacillus* strains analysed in this study is based on other genetic elements than the *vanA*, *vanB* or *vanC* glycopeptide resistance of enterococci. In addition, no relationship between *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetM*, or *tetO* genes and tetracycline resistance in these strains could be observed. *tetA*, *tetB*, *tetC* genes were expected to be absent as they are typical for Gram-negatives. Other *tet* genes like K and L must be monitored in the future.

**Introduction:**

Lactobacilli are often used as probiotics in man and animal and in fermentation processes of animal feed, in the dairy and meat industry. Some *Lactobacillus* species are known to be glycopeptide and/or tetracycline resistant. To assess the impact of an antibiotic resistance on the pathogenic potential of a microorganism, it is essential to know the molecular mechanism of the resistance. In addition the glycopeptide resistance in enterococci is transferable by conjugation. Also EC administrative regulations force to look for specific *tet* genes, even if they are only present in Gram-negatives. The aim of this study was to determine if the glycopeptide and tetracycline resistance of strains of probiotic lactobacilli is based on similar genetic elements like in enterococci and Gram-negatives, resp.

**Material and Methods:**

Susceptibility testing was done according to NCCLS (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, USA., 1997). For the interpretation of results the MIC-ranges of the NCCLS (1997) were used.