

5 Zusammenfassung

Mit der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Übertragbarkeit von R-Plasmiden durch Konjugation zwischen verschiedenen Gattungen von Fischbakterien bei einer großen Anzahl verschiedener Stämme untersucht. Zu diesem Zweck wurden zuvor 285 Bakterienstämme der Gattungen *Aeromonas*, *Yersinia*, *Pseudomonas*, *Cytophaga/Flexibacter* und weitere Gattungen im Agar-Diffusionstest gegen zwölf Antibiotika/Chemotherapeutika getestet. Mit Ausnahme weniger Referenzstämme und Isolate anderer Institute waren die Bakterienstämme im Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der Tierärztlichen Hochschule Hannover aus Fischorganen in den Jahren von 1981 bis 1987 sowie 1992 isoliert worden. Bei den getesteten Antibiotika handelte es sich um Chloramphenicol (C), Sulfamethoxazol/Trimethoprim (SXT), Furazolidon (FUR), Oxytetracyclin (OT), Chlortetracyclin (CT), Streptomycin (SM), Ampicillin (AMP), Lincospectin (LIN), Erythromycin (ERY), Enrofloxacin (ENO), Fluméquine (FLU) und Oxolinsäure (OX). Auf Grund des Resistenzspektrums und der Bedeutung der einzelnen Arten für die Aquakultur wurden *Aeromonas salmonicida ssp. salmonicida* (A. s. s.), *Aeromonas hydrophila* (A. hyd.) und *Aeromonas sobria* (A. sob.) als Donoren mit *Yersinia ruckeri* (Y. r.) als Rezipient gepaart. Als Selektionsmarker für eine stattgefundene R-Plasmid-Übertragung wurden C, OT und CT ausgewählt. Insgesamt wurden 45 Donoren mit 22 Rezipienten gepaart, so daß 990 Konjugationen durchgeführt wurden. Hierbei wurden 37 Transkonjuganten (= 3,7 %, in der Gruppe mit A. s. s. als Donor 5 %, in der Gruppe mit A. sob. als Donor 4,5 %) gefunden. Alle Versuche wurden im Doppelansatz durchgeführt. Die Replikaplattierung der Transkonjuganten ergab in keinem Fall eine Trennung der eingesetzten Selektionsmarker. Eine phänotypisch sichtbare Übertragung von R-Plasmiden zwischen A. hyd. und Y. r. fand nicht statt. Die Transkonjuganten wurden im Agar-Diffusionstest auf die Existenz weiterer Resistenzmarker untersucht. Transformation und Transduktion wurden experimentell ausgeschlossen. Folgende R-Plasmide wurden nachgewiesen:

R-Plasmid	Häufigkeit des Auftretens	Donorstamm	Transferfrequenz
C	4	A. s. s.	10^{-3} bis 10^{-6}
OT, CT	14	A. sob.	10^{-2} bis 10^{-6}
OT, CT, SM, LIN	1	A. s. s.	10^{-5} bis 10^{-6}
C, OT, CT, SM, LIN	7	A. s. s.	10^{-4} bis 10^{-6}
C, OT, CT, SM, AMP, LIN	3	A. sob.	10^{-4} bis 10^{-6}
C, SXT, OT, CT, SM, AMP	2	A. sob.	10^{-3} bis 10^{-5}
C, SXT, OT, CT, SM, AMP, LIN	6	A. sob.	10^{-3} bis 10^{-5}

Eine Übertragung der Quinolone ENO, FLU und OX wurde ebensowenig nachgewiesen wie die Übertragung des Resistenzmarkers FUR. Diese Ergebnisse standen im Einklang mit anderen Autoren. Dagegen war die meines Wissens erstmalig nachgewiesene Codierung von LIN auf R-Plasmiden bei gramnegativen Bakterien genauso überraschend, wie die von SM und AMP, da diese Antibiotika nie offiziell in der Aquakultur in der BRD eingesetzt wurden.

Es waren bewußt Feldisolate als Donoren und Rezipienten eingesetzt worden, obwohl die Möglichkeit, Konjugationserfolg zu haben, dadurch stark eingeschränkt wurde. Meine Ergebnisse sind daher mit denen anderer Autoren, die R-Plasmide bei Fischbakterien übertrugen, nicht vergleichbar, da dort als Rezipienten i.d.R. genetisch definierte Laborstämme eingesetzt wurden. Ziel dieser Arbeit war jedoch unter anderem eine Abschätzung der Häufigkeit des Konjugationsereignisses bei Feldstämmen vorzunehmen, da bisher nur wenige Untersuchungen mit genetisch unveränderten Keimen direkt aus der Umgebung der Fische vorgenommen wurden. Hierdurch sollte eine bessere Vorstellung über die Verhältnisse *in-situ* gewonnen werden. Meines Wissens wurde ein solcher Umfang von Feldstämmen aus der Umgebung von Fischen nie zuvor auf R-Plasmid-Transfer untersucht, wobei erstmalig auch A. sob.-Stämme in dieser Quantität als Donoren und Y. r. als Rezipienten eingesetzt wurden. Die Tragweite der hier vorliegenden Ergebnisse ergibt sich aus der möglichen Übertragung von Resistenzgenen von einem Keim, der ubiquitär im Wasser verbreitet ist und auch im Darm der Fische vorkommt, auf eine für Fische hochpathogene Art aus der Gattung der *Enterobacteriaceae*. Neben der Bedeutung für die Aquakultur ist auch die Gefahr für andere Tiere und den Menschen durch Entstehung mehrfach-resistenter pathogener Bakterien nicht von der Hand zu weisen. Die von mir im Vergleich mit ähnlichen Arbeiten aus der Humanmedizin als niedrig eingestufte Häufigkeit des Auftretens von Transkonjuganten ist dabei weniger bedeutsam als die Möglichkeit ihrer anschließenden Selektion. Die Zunahme mehrfachresistenter Krankheitskeime könnte zu einem weltweiten Problem werden. Ein verantwortungsvoller Umgang mit den Antibiotika sowie eine Überwachung der Epidemiologie von R-Plasmiden ist daher unbedingt zu fordern.

Babette Klein

Investigations on transferable antibiotic resistance through R-plasmids between obligate and facultative fish pathogenic bacteria

The studies described in this thesis demonstrate the transferability of R-plasmids between different genera of fish bacteria through conjugation. For the first time a great number of different strains of fish bacteria has been studied. For this purpose, 285 bacterial strains, mainly of the genera *Aeromonas*, *Yersinia*, *Pseudomonas* and *Cytophaga/Flexibacter*, were tested with 12 antibiotics/ chemotherapeutics with the agardiffusion-method. With the exception of some reference strains and isolates of other institutes, the bacterial strains were isolated from fish organs in the Institute of Microbiology and Epidemics of the School of Veterinary Medicine between the years 1981 and 1987 and the year 1992 respectively. The antibiotics used were chloramphenicol (C), sulphamethoxazole/trimethoprim (SXT), furazolidone (FUR) oxytetracycline (OT), chlortetracycline (CT), streptomycin (SM), ampicillin (AMP), lincospectin (LIN), erythromycin (ERY), enrofloxacin (ENO), fluméquine (FLU) and oxolinic acid (OX). Based on the resistance spectrum and on the significance of the single species for aquaculture, *Aeromonas salmonicida ssp. salmonicida* (A. s. s.), *Aeromonas hydrophila* (A. hyd.) and *Aeromonas sobria* (A. sob.) were mated as donors with *Yersinia ruckeri* (Y. r.) as the recipient. C, OT and CT were chosen as selectionmarkers to demonstrate successful R-plasmid transfer. A total of 45 donor strains were mated with 22 recipients. In these 990 mating experiments 37 transconjugants were found (= 3,7%, in the group with A. s. s. as the donor 5%, in the group with A. sob. as the donor 4,5%). All experiments were carried out twice. Replicaplating of the transconjugants never showed separation of the selectionmarkers used. Phenotypically visible R-plasmid transfer between A. hyd. and Y. r. was not found. The transconjugants were tested with the agardiffusion-method for the existence of further resistance markers. Transfer of resistance markers by means of transformation or transduction was excluded experimentally. The following R-plasmids were observed:

R-plasmid	Number of occurrences	Donor strain	Frequency of transfer
C	4	A. s. s.	10^{-3} to 10^{-6}
OT, CT	14	A. sob.	10^{-2} to 10^{-6}
OT, CT, SM, LIN	1	A. s. s.	10^{-5} to 10^{-6}
C, OT, CT, SM, LIN	7	A. s. s.	10^{-4} to 10^{-6}
C, OT, CT, SM, AMP, LIN	3	A. sob.	10^{-4} to 10^{-6}
C, SXT, OT, CT, SM, AMP	2	A. sob.	10^{-3} to 10^{-5}
C, SXT, OT, CT, SM, AMP, LIN	6	A. sob.	10^{-3} to 10^{-5}

Transfer of the 4-quinolones ENO, FLU and OX as well as transfer of FUR was not seen. These results were in accordance with those of other authors. In contrast, the demonstration of plasmid-encoded LIN resistance in gram-negative bacteria is novel and just as surprising as that of SM and AMP as these drugs have never been used officially in aquaculture in Germany.

Field isolates were deliberately used as donors and recipients although this fact worsened the likelihood of successful R-plasmid transfer. As such my results are not directly comparable to those of other authors because, as a rule, they used genetically defined laboratory strains as the recipients. However this study set out to estimate the frequency of successful conjugal transfer between field isolates because only a few studies with genetically unchanged strains directly from the environment of fish exist. The results should lead to a better understanding of the *in-situ* conditions. To my knowledge R-plasmid transfer has been studied for the first time with such a great number of field isolates which were isolated from fishes. This was the first use of *A. sob.* as a donor and *Y. r.* as a recipient in such quantity. The importance of the presented results follows from the possible transferability of resistance genes from a bacteria which is ubiquitous present in freshwater and even the intestines of fish to a species highly pathogenic for fish from the family of *Enterobacteriaceae*. Besides the implications for aquaculture, the danger for other animals and even man through the development of multiple resistant pathogenic bacteria should not be ignored. In comparison with similar studies in human medicine, I consider the rate of conjugal transfer which has been observed here as low. However the rate is less important than the possibility of following selection of the resistance genes. The increase of multiple resistant pathogenic bacteria could become a world-wide problem. Therefore, responsibility in handling of antibiotics and the epidemiological surveillance of R-plasmids are an absolute necessity.