

## E. Zusammenfassung

Insgesamt wurden 138 Untersuchungsmaterialien zahlreicher Tierarten auf gramnegative Anaerobier kulturell unter Verwendung nicht selektiver Medien und Selektivnährböden untersucht. Den Hauptanteil hiervon machten Lungen verschiedener Tierarten und Gewebeproben von an Dermatitis digitalis erkrankten Rindern aus. Die Differenzierung der Isolate erfolgte vergleichend mit Hilfe von kommerziellen Identifizierungssystemen (ID 32 A - Bio Merieux, BBL CRYSTAL - Becton-Dickinson) bzw. von konventionellen biochemischen Reaktionsreihen, Gaschromatographie sowie z. T. auch mit computergesteuerter gaschromatographischer Bakterienzellwandlipidanalyse. Anschließend wurde das Resistenzverhalten von 100 ausgewählten Isolaten mit dem ATB ANA (Bio Merieux) und für 6 verschiedene Antibiotika unter Einsatz des F-Tests überprüft.

Aus den 138 Proben konnten 242 Stämme gramnegativer Anaerobier isoliert werden. Von diesen wurden 77 (31,8%) zur Gattung *Fusobacterium*, 72 (29,8%) der Gattung *Bacteroides*, 54 (22,3%) der Gattung *Prevotella* und 36 (14,9%) der Gattung *Porphyromonas* zugeordnet. Insgesamt wurden von diesen Gattungen 25 verschiedene Arten differenziert. Daneben konnte ein Isolat als Mitglied der Gattung *Veillonella* und zwei nicht näher identifizierbare Stämme nachgewiesen werden.

Im Lungengewebe war die am häufigsten isolierte Spezies *Fusobacterium necrophorum*. Sie machte 50% der Isolate bei Wiederkäuern und 27,5% bei anderen Tierarten aus. Ebenfalls konnten häufig *Bacteroides* spp. (28,3%) und *Prevotella* spp. (18,3%) nachgewiesen werden, während *Porphyromonas* spp. nur in (5%) der Isolierungen nachzuweisen waren.

In 36 Gewebs- und Tupferproben von an Dermatitis digitalis erkrankten Rindern, die aus acht verschiedenen Milchviehbeständen stammten, waren 64 Stämme nachweisbar. Hierbei konnte *Porphyromonas levii* in allen acht Beständen isoliert werden, diese Spezies war mit insgesamt 22 (35,5%) Nachweisen am häufigsten vertreten. Als weitere Art trat daneben auch *Fusobacterium necrophorum* (15,6%) wiederholt in Erscheinung, bei den 18 isolierten Stämmen der Gattung *Prevotella* konnten nur 33,4% einer Spezies zugeordnet werden.

In den untersuchten Punktaten, Eiterproben und Wundtupfern waren anaerobe gramnegative sporenlose Stäbchen ebenfalls regelmäßig nachweisbar. Es ließen sich aus 24 Proben 50 Stämme isolieren. Von diesen konnten 19 (38%) der Gattung *Fusobacterium* und 16 (32%) der

Gattung *Bacteroides* zugeordnet werden konnten. Keime der Gattung *Prevotella* waren in 11 (22%) und von *Porphyromonas* in 4 (8%) Fällen nachzuweisen.

Bei den aus der Bauchhöhle isolierten gramnegativen Anaerobiern handelte es sich zu 76,9% um Keime der Gattung *Bacteroides*. Dabei dominierten eindeutig Keime der B-fragilis-Gruppe.

Ein Anteil von 92,1% richtiger Gattungsdiagnosen konnte mit Hilfe der bei der vorläufigen Identifizierung verwendeten Untersuchungsmethoden erzielt werden. Hierbei ist neben der Beurteilung des Wachstums auf verschiedenen Selektivnährmedien besonders das Verhalten gegenüber den Substanzen Colistin, Vancomycin, Kanamycin und Galle von Bedeutung.

Durch den zusätzlichen Einsatz von biochemischen Reaktionsreihen, und hier besonders durch den Einsatz der Indol- und Katalasereaktion, gelang es, bei 154 (64,2%) der insgesamt 239 Stämme eine Speziesdiagnose zu stellen. In 78 (32,9%) Fällen war jedoch eine Gattungsdiagnose möglich, so daß insgesamt >95% der Stämme in ihrer Gattungszugehörigkeit sicher bestimmt werden konnten.

Die eingesetzten kommerziellen Identifizierungssysteme ließen bei 79 (33,2%) von 239 der untersuchten Bakterienspezies keine Diagnose zu. Bei 80 (33,4%) Isolaten war eine Gattungsdiagnose möglich und für dieselbe Zahl gelang es, auch eine Speziesdiagnose zu stellen.

Die Gaschromatographie hat sich als eine geeignete zusätzliche Untersuchungsmethode für die Gattungen *Fusobacterium* und *Porphyromonas* bewährt. Die computergesteuerte gaschromatographische Bakterienzellwandlipidanalyse konnte in Einzelfällen die Diagnostik sinnvoll ergänzen.

Das Resistenzverhalten gegenüber 25 Antibiotika, hiervon sind 10 veterinärmedizinisch zugelassen, wurde mit 100 Isolaten auf der Basis der kommerziellen Mikrodilutionsmethode ATB ANA (Bio Merieux) getestet. Vergleichend hierzu wurde eine MHK-Wert-Bestimmung dieser Stämme anhand des E-Tests (AB-Biodisk) für sechs Antibiotika (Penicillin, Amoxicillin/Clavulansäure, Tetracyclin, Chloramphenicol, Clindamycin und Metronidazol) durchgeführt.

Als Ergebnis der Resistenzprüfung ist festzuhalten, daß gegenüber anaeroben gramnegativen sporensen Stäbchen insbesondere Penicilline in Kombination mit  $\beta$ -Lactamase-Inhibitoren, Chloramphenicol, Clindamycin sowie Metronidazol und Rifampicin wirksam sind. Keime der B-fragilis-Gruppe zeigten eine zum Teil ausgeprägte Resistenz gegenüber verschiedenen  $\beta$ -Lactamantibiotika und sollten deshalb auf ihr Resistenzverhalten hin überprüft werden. Der Einsatz von Tetracyclin bei der Behandlung von Anaerobierinfektionen kann nur mit Einschränkungen empfohlen werden.

**Hubertus Even:**

**Prevalence, differentiation and susceptibility of gram-negative anaerobes belonging to the genera *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, and *Fusobacterium* in clinical samples of sick animals**

## F. Summary

On the whole, 138 samples were culturally examined by applying unselective and selective media. Special emphasis was - on the one hand - put on the examination of lungs of different kinds of animals and on the other on samples of tissue from dairy cattle suffering from *Dermatitis digitalis*.

As far as the identification of the isolates is concerned four diagnostic methods were comparatively applied that is firstly commercially available identification systems (BBL CRYSTAL, Becton Dickinson, ID 32 A, Bio Merieux), secondly conventional biochemical reactions, thirdly gas chromatography and finally computerized lipid-analysis of the bacterial cell wall.

Of the 138 samples 242 gram-negative anaerobes could be isolated, of these, 77 (31.8%) belonged to the genus *Fusobacterium*, 72 (29.8%) to the genus *Bacteroides*, 54 (22.3%) to the genus *Prevotella*, and finally 36 (14.9%) to the genus *Porphyromonas*. 25 different species of the genera mentioned above could be differentiated in total. Apart from these, one member of the genus *Veillonella* was found as well as two other strains which could not be identified.

The species, then, which occurred most frequently in samples of lung tissue was *Fusobacterium necrophorum*. In the case of ruminants this species made up 50% of all isolates, in lungs of other animals *Fusobacterium necrophorum* was found in 27.5%. As far as frequency is concerned *Bacteroides spp* as well as *Prevotella spp* (28.3%) could also be traced quite regularly. Only 5% of all isolates belonged to the genus *Porphyromonas*.

36 specimens (tissue and swabbing material) of dairy cattle were analyzed, which suffered from *Dermatitis digitalis* and belonged to eight different herds. 64 isolates of anaerobes were found

in the samples examined. Here, *Porphyromonas levii* was of crucial importance, since it was both present in all eight herds and with 22 (33.5%) occurrences the most frequent of all species. Another outstanding bacterium in this respect was *Fusobacterium necrophorum* (15.6%). Of the 18 strains belonging to the genus of *Prevotella* only 33.4% could be ascribed to a certain species.

Moreover, anaerobic bacteria could regularly be found in the drainage fluids, pus, and swabs examined. In the 24 samples 50 strains were distinguishable, of which 19 (38%) could be subsumed under the genus of *Fusobacterium*, 16 (32%) were *Bacteroides* spp., species of the genus *Prevotella* were identified in 11 (22%) and of *Porphyromonas* in 4 (8%) cases.

In abdominal organs, 76.9% of all species were identified as members of the genus *Bacteroides*, with the species of the *B.-fragilis*-group predominating.

It was possible to diagnose the correct genus in 92.1% of all cases by means of those diagnostic tools which were applied for the presumptive identification. Next to the cultivation of microbiological media the tests with colistine, vancomycin, kanamycin, and bile have to be mentioned here.

By the additional use of biochemical reaction tests, and here especially the observation of the indole reaction and the catalase reaction, respectively 154 (64.2%) of the 239 strains could be identified on the level of species, the genus of the isolate, however, was revealed in 78 (32.9%) times, so that for more than 95% of all rods the genera could be sorted out.

The commercial systems for identifying anaerobic bacteria did not offer significant data in 79 (33.1%) of 239 cases. 80 (33.2%) isolates, then, could be related to the different genera and in 80 (33.2%) cases only the very species could be diagnosed.

As regards the examination and identification of *Fusobacterium* and *Porphyromonas* gas chromatography is another well established diagnostic tool. Moreover, computerized lipid-analysis of the cell wall may - in some cases - be a sensible supplementary method.

The susceptibility of the four genera to different antibiotics was tested by the help of a commercially relevant method, namely the microdilution-method (ATB ANA, Bio Merieux). 100 different gram-negative anaerobes were exposed to 25 antibiotics, 10 of which are licensed

to be used in veterinary medicine. The E test (AB Biodisk), however, was referred to in order to substantiate the efficiency of six antibiotics (e.g. penicillin, amoxicillin/clavulan-acid, tetracycline, chloramphenicol, clindamycin, and metronidazole) and to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of these antibiotics.

What can be said about the results of these examinations is that different types of penicillins, especially in combination with  $\beta$ -lactamase-inhibitors, chloramphenicol, clindamycin, rifampicine, and metronidazole proved to be highly effective against gram-negative anaerobic bacteria. Some members of the B-fragilis-group, however, proved to be quite resistant when exposed to  $\beta$ -lactam-antibiotics, so that susceptibility testing should be intensified on members of this group. The use of tetracycline against anaerobic infections can thus no longer be recommended without restriction.