

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine Charakterisierung von 120 equinen *Dermatophilus congolensis*-Feldisolaten durchgeführt. Dazu wurden das biochemische Leistungsvermögen, das Resistenzverhalten, die Membranproteinmuster in der SDS-PAGE und ihre antigenen Strukturen im Western-Blot untersucht. Drei dieser Isolate wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen als Referenzstämme aufgenommen: DSM 44172, 44173 und 44174. Je ein Isolat vom Rind und vom Esel, ein weiterer Referenzstamm und die Typstämme von *Dermatophilus congolensis* und *Dermatophilus chelonae* wurden zum Vergleich mituntersucht.

Bei den getesteten biochemischen Reaktionen erbrachte der Zusatz von 1 % Pferdeserum in kürzerer Zeit mehr positive Ergebnisse als eine konventionelle „Bunte Reihe“. Das biochemische Reaktionsvermögen konnte bei allen Feldisolaten als identisch angesehen werden. Daher kann die „Bunte Reihe“ der Identifizierung von in Deutschland vorkommenden *Dermatophilus congolensis*-Feldisolaten dienen. Alle *Dermatophilus congolensis*-Isolate waren nach viertägiger Bebrütung in der Lage Glucose, Fructose und Maltose zu vergären, Arginindihydrolase, Urease und Gelatinase zu bilden sowie ihre Beweglichkeit anzuzeigen. Ebenso waren alle Isolate in der Lage, in dextroshaltigem, flüssigen Nährmedium Säure zu bilden. Galactose, Lactose, Saccharose und Citrat konnten sie nicht verwerten. Schwefelwasserstoff und Indol wurden nicht gebildet. Nitrat wurde nicht reduziert und auch die Voges-Proskauer-Reaktion fiel negativ aus.

Mit Hilfe des API ZYM-Tests der Firma bioMérieux konnte das Bildungsvermögen präformierter Enzyme der *Dermatophilus congolensis*-Isolate qualitativ und semi-quantitativ untersucht werden. Die Inkubationszeit und der Auswertungsmodus dieses Tests wurden erstmals für diesen Erreger optimiert. Es konnte gezeigt werden, daß das Enzymbildungsvermögen bei allen Isolaten sehr ähnlich war. Acht Enzyme wurden von allen Isolaten und sechs Enzyme von keinem Isolat gebildet. Fünf weitere Substrate wurden von mindestens einem Stamm umgesetzt. Dabei variierten die gebildeten Enzymmengen nur in engen Schwankungsbereichen.

Aufgrund dieser sehr ähnlichen Reaktionsmuster kann der API ZYM-Test für eine Identifizierung eingesetzt werden. Diese wäre innerhalb von 6 Stunden möglich und somit deutlich schneller als eine Identifizierung mit Hilfe einer „Bunten Reihe“.

In den Untersuchungen zur Resistenzlage erwiesen sich alle Feldisolate als sensibel gegenüber Penicillin G, Ampicillin, Lincomycin, Erythromycin, Gentamicin, Streptomycin, Tetracyclin, Oxytetracyclin, Bacitracin und Ceftiofur. Gegenüber mindestens einem Chemotherapeutikum reagierten 43,3 % der equinen Feldisolate resistent oder intermediär. Ein intermediäres Verhalten trat bei 35,8 % der Isolate gegenüber Polymyxin B und bei 17,5 % der Isolate gegenüber Enrofloxacin auf. Als Oxacillin resistent erwiesen sich 13,3 % der Isolate, 1,7 % als resistent gegenüber Polymyxin B und je ein Stamm (0,83 %) war resistent gegenüber der Trimethoprim-Sulfamethoxazol-Kombination bzw. intermediär gegenüber Neomycin. Insgesamt kann die Resistenzlage als gut bezeichnet werden. Dabei ist für den praktizierenden Tierarzt zu beachten, daß eine Empfindlichkeit des Erregers *in vitro* nicht unbedingt mit den Therapieerfolgen einhergeht.

Konzentrierten sich die bisherigen Versuche, die Proteinbandenmuster mit Hilfe der SDS-PAGE darzustellen, auf Ganzzell-Lysate und Kulturüberstände, so wurden in dieser Arbeit erstmals die Membran- und Zellwandproteine isoliert untersucht. Die Silberfärbung der SDS-Gele ließ sehr ähnliche und bei einigen Isolaten auch identische Proteinbandenmuster erkennen. Banden bei 97, 86, 78, 68,5, 65, 63, 52 und 37 kDa konnten bei allen getesteten Isolaten dargestellt werden. Identische Bandenmuster konnten u. a. bei einem Stamm aus Nord-, Mittel- und Süddeutschland nachgewiesen werden.

In Western-Blots mit polyklonalen Antikörpern gegen den *Dermatophilus congolensis*-Typstamm oder den Referenzstamm DSM 43037 waren fast alle Banden der Proteinfärbung darstellbar. Es ließen sich gleich und unterschiedlich stark antigene Proteine bei allen Isolaten und mit beiden Seren darstellen. Ob und welche der nach der Immunisierung gebildeten Antikörper protektive Wirkungen gegenüber einer erneuten Infektion besitzen, bedarf jedoch noch der Klärung.

In keiner der durchgeführten Untersuchungen konnten die Ergebnisse in einen Zusammenhang mit der geographischen oder tierartlichen Herkunft gestellt werden.

Summary

Krüger, Birgit:

Phenotypic characterization of equine
Dermatophilus congolensis field isolates

This work is the first to characterize 120 equine *Dermatophilus congolensis* field isolates. To do this the biochemical capacities, resistance behaviour, membrane protein profiles in SDS-PAGE and their antigenic structures were investigated in western blot. Three of these isolates were accepted by the "Deutschen Sammlung für Mikroorganismen" as reference strains: DSM 44172, 44173 und 44174. One isolate each from a cow and a donkey, an additional reference strain and the type strains of *Dermatophilus congolensis* and *Dermatophilus chelonae* were investigated for comparative purposes.

The addition of 1% horse serum yielded in more positive results of the biochemical reactions in a shorter period of time than conventional biochemical reactions. The biochemical capacities of all field isolates proved to be identical. Therefore the biochemical reactions can serve to identify the *Dermatophilus congolensis* field isolates occurring in Germany. All *Dermatophilus congolensis* isolates were able to ferment glucose, fructose and maltose after an incubation period of four days. They were able to produce arginine dihydrolase, urease and gelatinase and proved to be mobile. In addition, all isolates were capable of producing acid in a liquid culture medium containing dextrose. They were not able to utilize galactose, lactose, sucrose and citrate. They did not form hydrogen sulphide and indole. They also did not reduce nitrate and the Voges-Proskauer reaction was negative in all cases.

With the help of the API ZYM test bioMérieux, the ability of *Dermatophilus congolensis* isolates to produce various preformed enzymes was investigated qualitatively and semi-quantitatively. The incubation period and evaluation mode of this test were optimised for *Dermatophilus congolensis* for the first time. It was shown that the ability of all isolates to produce these enzymes was similar. Eight enzymes were produced by all isolates and six enzymes were not produced by any isolate. Five further substrates were converted by at least one isolate. The amount of enzyme formed varied only a little. Due to these very similar reaction patterns, the API ZYM test can be used for the rapid identification of *Dermatophilus congolensis* within 6 hours. This

test is significantly faster than identification using conventional biochemical reactions.

Analysis of the resistance patterns showed that all field isolates were sensitive to penicillin G, ampicillin, lincomycin, erythromycin, gentamicin, streptomycin, tetracycline, oxytetracycline, bacitracin, and ceftiofur. A resistant or an intermediate behaviour to at least one antimicrobial agent showed 43.3 % of the equine field isolates. An intermediate reaction occurred in 35.8 % of the isolates towards polymyxin B and 17.5 % of the isolates showed an intermediate reaction to enrofloxacin. Resistance to oxacillin was observed in 13.3% of the isolates while 1.7 % of the isolates were resistant to polymyxin B. Only single isolates (0.83 %) exhibited either resistance to a trimethoprim-sulfamethoxazol combination or showed an intermediate reaction to neomycin.

Although antimicrobial resistance was rarely observed among the *Dermatophilus congolensis* isolates investigated in this study, the practising veterinary surgeon must note that the sensitivity of the bacteria *in vitro* does not automatically mean successful therapy.

The experiments performed so far have focussed on attempts to present the protein profiles of whole cell lysates and supernatants with the help of SDS-PAGE. In this work, the protein profiles of membrane and cell wall of *Dermatophilus congolensis* were investigated for the first time. The silver staining of the SDS gels showed very similar, and in the case of some isolates, even identical protein profiles. Protein bands at 97, 86, 78, 68.5, 65, 63, 52, and 37 kDa were shown for all tested isolates. Identical protein profiles were present in all strains from the North, the Middle and the South of Germany.

Virtually all protein bands reacted with the polyclonal antibodies raised against the *Dermatophilus congolensis* type strain or the reference strain DSM 43037 in Western blots. However, the intensities of these antigen/antibody reactions varied with regard to the protein bands, the *Dermatophilus congolensis* isolates and the antisera used. Nevertheless, some of the protein bands did not differ in their reactivity. Whether and, if so, which antibodies formed after immunization will show a protective effect against a renewed infection remains to be clarified.

It was not possible to relate the results of the phenotypic characterization of the *Dermatophilus congolensis* isolates to the geographical source or type of animal in any of the experiments performed.