

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Sciences
Studiengang Ökotrophologie

Bachelorarbeit

***Untersuchung des Resistenzverhaltens von Bakterien
der Verderbsflora verschiedener Aquakultur-Fische
gegenüber ausgewählten Antibiotika mittels der
Hemmstofftest-Methode***

Tag der Abgabe: 03.02.2014

Vorgelegt von: Irene Heidt
2035848

Betreuende Prüferin: Prof. Dr. med. vet. Katharina Riehn

Zweiter Prüfer: Dr. Carsten Meyer

Die Mittel zur Förderung dieser Arbeit
wurden durch das Max Rubner- Institut in Hamburg bereit gestellt.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	4
1 Einleitung.....	5
2.1 Rechtliche Rahmenbedingungen zum Antibiotikaeinsatz in der Aquakultur.....	6
2.2 Relevante fischtypische Verderbserreger und Charakterisierung..... Identifizierter Spezies.....	8
2.2.1 <i>Aeromonas</i>	8
2.2.2 <i>Moraxella</i>	9
2.2.3 <i>Pseudomonas</i>	10
2.2.4 <i>Shewanella</i>	11
2.3 Antibakterieller Wirkmechanismus ausgewählter Antibiotika mit..... Relevanz in der Aquakultur.....	12
2.3.1 Ampicillin	12
2.3.2 Trimethoprim.....	13
2.3.3 Erythromycin.....	13
2.3.4 Tetracyclin.....	14
2.3.5 Gentamicin.....	14
2.4 Resistenzentwicklung	15
2.4.1 Resistenzentstehung und –übertragung.....	15
2.4.2 Resistenzmechanismen gegenüber ausgewählten Antibiotika.....	16
3 Hemmstofftests - Material und Methode.....	18
3.1 Material.....	18
3.1.1 Fischproben.....	18
3.1.3 Bakterienanzucht und –isolierung.....	18
3.1.4 Identifizierung der bakteriellen Isolate.....	19
3.2 Methode.....	22
3.2.1 Vorbereitung.....	22
3.2.2 Testdurchführung.....	23
3.2.3 Messung von Hemmhöfen.....	24
4 Resultate.....	26

4.1	Resistenzverhalten untersuchter Isolate gegenüber ausgewählten	
	Antibiotika	27
4.1.1	Aeromonaden	27
4.1.2	Moraxellen	27
4.1.3	Pseudomonaden	28
4.1.4	Shewanellen	29
4.2	Zusammenfassung der Hemmstofftestergebnisse	29
5	Diskussion	30
5.1	Statistische Bewertung der Hemmstofftestergebnisse	30
5.2	Kritische Reflektion der Untersuchung und Methode	33
5.3	Schlussfolgerung und Bedeutung für den Menschen	35
	Anhang I: Nährmedien und Chemikalien	38
	Anhang II: Herkunft der Isolate und Testanzahl	39
	Anhang III: Komplettauswertung	40
	Anhang IV: Statistische Auswertung	46
	Literaturverzeichnis	48
	Abbildungsverzeichnis	55
	Tabellenverzeichnis	56
	ZUSAMMENFASSUNG	57
	ABSTRACT	58
	Eidesstaatliche Erklärung	59

Abkürzungsverzeichnis

A.	<i>Aeromonas</i>
Ach.	<i>Achromobacter</i>
AMG	Arzneimittelgesetz
AMP	Ampicillin
API	Analytical Profile Index
BLE	Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BMELV	Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz
BMG	Bundesministerium für Gesundheit
BSAC	British Society for Antimicrobial Chemotherapy (Britische Gesellschaft für antimikrobielle Chemotherapie)
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute (Institut für Klinik- und Labor-Standards)
DART	Deutsche Antibiotika-Resistenzstrategie
Delf.	<i>Delftia</i>
DIMDI	Deutsches Institut für Medizinische Dokumentation und Information
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E.	<i>Enterobacter</i>
EKZ	Einkaufszentrum
ERY	Erythromycin
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (Europäisches Komitee zur antimikrobiellen Empfindlichkeitstestung)
GENT	Gentamicin
LFGB	Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch
M.	<i>Moraxella</i>
MHK	Minimale Hemmkonzentration
n.a.	nicht auswertbar
NaCl	Natriumchlorid
P.	<i>Pseudomonas</i>
Past.	<i>Pasteurella</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
Ser.	<i>Serratia</i>
Sh.	<i>Shewanella</i>
spp.	species pluralis
Standardabw.	Standardabweichung
TÄHAV	Verordnung über tierärztliche Hausapotheken
TET	Tetracyclin
TM	Trimethoprim
ÜN	Über-Nacht
V-Lsg	Verdünnungslösung
VO	Verordnung
WIdO	Wissenschaftliches Institut der AOK

1 Einleitung

Sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin - einschließlich der Aquakultur - ist der Einsatz antibiotisch wirkender Mittel nicht wegzudenken. Allein in der Humanmedizin sind in Deutschland laut dem WIdO etwa 80 verschiedene antibiotisch wirkende Substanzen zur Behandlung von Infektionskrankheiten im Einsatz (GÜNTHER et al. 2003). Aquakulturen werden unter Rahmenbedingungen betrieben, die einer Massentierhaltung entsprechen. Stressoren wie hohe Besatzdichten wirken permanent auf die Zuchtfische ein und können zur Schwächung ihres Immunsystems führen. Damit Verluste durch Infektionskrankheiten möglichst vermieden werden, wird daher in zunehmendem Maße auf die präventive Verwendung von Antibiotika gesetzt (BARTON & IWAMA 1991, NAYLOR & BURKE 2005, CABELLO 2006).

Zu Beginn des 21. Jahrhunderts hatte sich die Anzahl an Aquakulturbetrieben weltweit innerhalb von 20 Jahren nahezu vervierfacht (NAYLOR et al. 2000, NAYLOR et al. 2003, NAYLOR & BURKE 2005, CABELLO 2006).

Aufgrund des Rückgangs der herkömmlichen Fischereien bedingt durch die Überfischung der Meere einerseits und der anhaltend hohen Nachfrage auf dem globalen Markt andererseits ist ein rapideres Wachstum der Aquakultur auf der gesamten Welt zu verzeichnen (GOLDBURG et al. 2001, GOLDBURG & NAYLOR 2005, CABELLO 2006).

Zahlreiche Untersuchungen führen auf, dass antibiotikaresistente Bakterien vor allem dort auftreten, wo ein massiver Antibiotikaeinsatz und damit eine verstärkte Selektion entsprechend resistenter Bakterien zu verzeichnen ist (FEUERPFIL et al. 1999, CABELLO et al. 2013). Dementsprechend gehören auch Fischfarmgebiete dazu.

Antibiotikaresistente Bakterien sind nicht erst im Laufe der Zeit zum Vorschein gekommen sondern bereits seit Anfang der Antibiotikatherapie präsent (KRONTHALER 2009).

Die Resistenzentwicklung ist ein unkalkulierbarer Prozess und wird Bakterien durch ihr exzellentes Anpassungsvermögen über vielseitige Resistenzmechanismen ermöglicht.

Dies führt bei fast jedem Antibiotikum zum früheren oder späteren Wirkungsverlust.

Durch Sekundärkontamination besteht die Gefahr der Übertragung resistenter Keime auf den Menschen, wodurch ein medizinisches Therapieproblem im Falle einer Infektion entstehen kann (FEUERPFIL et al. 1999, KRONTHALER 2009).

Ziel der Arbeit war es, anhand von Hemmstofftests Daten zur Antibiotikaempfindlichkeit fischtypischer Verderbserreger zu sammeln, um auf dieser Grundlage die aktuelle Resistenzlage von Bakterien in der Aquakultur-Verarbeitung zu bewerten.

2.1 Rechtliche Rahmenbedingungen zum Antibiotikaeinsatz in der Aquakultur

Antibiotische Mittel gehören zur Gruppe der Arzneimittel, die im Rahmen der Aquakultur am Körper eines lebensmittelliefernden Tieres zur Verhütung bzw. Bekämpfung von Fischkrankheiten verabreicht werden (§2 Abs.1 Satz 1 AMG). Deswegen findet national vor allem das Arzneimittelgesetz Anwendung, das der Regelung eines sicheren Verkehrs von wirkungsvollen sowie unbedenklichen Arzneimitteln dient (§1 AMG). Alle in Deutschland eingesetzten Antibiotika sind generell zulassungspflichtig gemäß §21 (1) AMG und verschreibungspflichtig gemäß §48 (1) AMG.

Derzeit gibt es in Deutschland lediglich zwei Antibiotika, die zur Behandlung von Fischen eingesetzt werden dürfen. Dazu gehören Trimethoprim und der zu den Sulfonamiden gehörende Wirkstoff Sulfadoxin (BMELV 2013).

Anders als in den Industrienationen unterliegt der Einsatz bedenklicher Antibiotika wie z.B. Quinolonen bei lebensmittelliefernden Tieren in Ländern wie China und Chile, in denen ein enormes Wachstum der industriellen Aquakultur zu beobachten ist, gar keinen gesetzlichen Einschränkungen (CABELLO 2004, JACOBY 2005, CABELLO 2006).

Zur Sicherung des gesundheitlichen Verbraucherschutzes sind in der Europäischen Union unbedenkliche Rückstandshöchstmengen für jedes Antibiotikum, das an lebensmittelliefernden Tieren angewendet wird, festzusetzen (BENDIX 2003). Die Verordnung (EG) Nr. 470/2009 „über die Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Rückstände pharmakologisch wirksamer Stoffe in Lebensmitteln tierischen Ursprungs [...]“ regelt in diesem Sinne gesetzliche Höchstmengen für antibiotische Wirkstoffe, die in der Fischzucht europäischer Mitgliedsstaaten zugelassen sind. Gleichzeitig soll hiermit die Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 ersetzt werden.

Sowohl für antibiotisch wirksame Substanzen, die im Anhang IV der VO (EWG) Nr. 2377/90 aufgeführt sind, als auch für Stoffe, die in keinem der Anhänge I bis III der genannten VO gelistet sind, besteht EU-weit ein gänzlich Anwendungsverbot bei lebensmittelliefernden Tieren.

Auch im Rahmen eines „Therapienotstandes“ nach §56a (2) AMG darf auf diese Wirkstoffe nicht zurückgegriffen werden (VON CZAPIEWSKI 2010).

Zur Überprüfung lebensmittelliefernder Tiere aus verschiedenen Produktionsstufen auf Rückstände unerwünschter Stoffe, wie z.B. Antibiotika, führt das BVL seit 1989 nach einheitlichen Vorgaben der EU das Programm des Nationalen Rückstandkontrollplans durch (BVL 2013). Mindestanforderungen zum ordnungsgemäßen Umgang mit Antibiotika in der Veterinärmedizin sind bereits seit vielen Jahren in den „Leitlinien für den sorgfältigen Umgang mit antimikrobiell wirksamen Tierarzneimitteln“ verankert (WILKE 2000).

Im Rahmen des Nationalen Resistenzmonitorings führt das BVL seit 2001 in ganz Deutschland Überwachungsstudien zur Beobachtung der bakteriellen Resistenzentwicklung bei lebensmittelliefernden Tieren durch (BVL 2012).

Seit 2008 verfolgt das BMG gemeinsam mit dem BMELV und dem BMBF ein Konzept zur Eindämmung der Resistenzproblematik bezüglich des Antibiotikaeinsatzes in der Human- sowie Veterinärmedizin. Hierfür haben die Bundesministerien die „Deutsche Antibiotika-Resistenzstrategie“ (DART) veröffentlicht, die nationale Ziele zur Minimierung von Antibiotikaresistenzen umfasst und laufend dem aktuellen wissenschaftlichen Stand angepasst wird (BMG, BMELV & BMBF 2011, HEGGER-GRAVENHORST 2012).

2010 wurde zur Abschätzung der Resistenzsituation im Zusammenhang mit dem Antibiotikaverbrauch die DIMDI- Arzneimittelverordnung verabschiedet. Diese verpflichtet Tierarzneimittelhersteller und –vertreiber dazu, die Abgabemengen antibiotischer Stoffe jährlich an das ‚Deutsche Institut für Medizinische Dokumentation und Information‘ zu melden (GERMAP 2010).

Auf nationaler Ebene findet bei Themen rund um die Lebensmittel- und Futtermittelsicherheit das Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB) Anwendung. Das LFGB setzt die Vorschriften der VO (EG) Nr. 178/2002 „zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts [...] und zur Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit“ national um. Daneben hat auf nationaler Ebene die tierärztliche Hausapothekenverordnung zur Regelung der Anwendung und Verschreibung von Arzneimitteln durch Tierärzte eine wichtige Bedeutung. Gemäß §12 Abs. 1 bis 2 TÄHAV dürfen Tierärzte Antibiotika an Tierhalter nur im Rahmen einer ordnungsgemäßen Behandlung des Tieres abgeben, sofern die Tiere angemessen untersucht und die medikamentöse Behandlung inklusive ihres Erfolges vollständig kontrolliert wurde.

Entsprechend der Tierhalter-Arzneimittel-Nachweisverordnung (2006) haben Tierhalter, die lebensmittelliefernde Tiere halten, umfassende Dokumentation über an Tieren angewendete Arzneimittel zu führen.

2.2 Relevante fischtypische Verderbserreger und Charakterisierung identifizierter Spezies

2.2.1 *Aeromonas*

Zu den typischen Verderbniserregern bei Fischen und Fischerzeugnissen gehören Bakterien der Gattung *Aeromonas*. Im Rahmen dieser Arbeit wurden speziell Isolate der Spezies *Aeromonas hydrophila* und *Aeromonas salmonicida* als solche identifiziert und hinsichtlich ihres Resistenzverhaltens überprüft.

Eigenschaften

- Form: kokkoide Stäbchen/ kurze Stäbchen
- Gramfärbung: negativ
- Oxidase: zumeist positiv
- Aerob/ Anaerob: fakultativ anaerob
- Motilität: *A. hydrophila* motil
A. salmonicida bewegungsunfähig
- Wachstumsbedingungen: *A. hydrophila* mesophil
→ Wachstum bei 1-42 °C, optimal bei 28 °C
A. salmonicida psychrophil
→ optimales Wachstum bei 4-22 °C, max. bei 34 °C

Vorkommen

Die Umweltbakterien sind im Oberflächenwasser weit verbreitet. Daneben kommen *Aeromonaden* im Boden, Süß- und Brackwasser vor. Sie sind Teil der natürlichen marinen Mikroflora (ALTWEGG 1999, LABELLA et al. 2013).

Pathogenität

Aeromonas salmonicida wird im Zusammenhang mit Aquakultur-Fischen als Auslöser schwerwiegender bakterieller Infektionen charakterisiert (LABELLA et al. 2013).

Die Spezies ist vor allem für die Fischkrankheit Furunkulose verantwortlich (VON CZAPIEWSKI 2010).

In einigen Arbeiten wird *Aeromonas hydrophila* als die global bedeutendste fischpathogene Spezies beschrieben (AUSTIN & ADAMS 1996, NIELSEN et al. 2001).

Sie löst bei immungeschwächten Fischen Flossenfäule, Läsionen und insbesondere bei Forellenfischen Septikämien aus (AUSTIN & ADAMS 1996, ALTWEGG 1999).

Einige Stämme von *A. hydrophila* gelten auch als fakultativ humanpathogen und können bei Kontakt mit kontaminiertem Wasser bzw. über die Aufnahme von kontaminierten Lebensmitteln beispielsweise eine Wundinfektion, Gastroenteritis oder im Falle einer Immunsuppression eine Sepsis auslösen (ALTWEGG 1999).

2.2.2 Moraxella

Moraxella-Bakterien zählen ebenfalls zu den lebensmittelverderbenden Bakterien.

Der Gattung Moraxella werden mehrere Arten zugeordnet, darunter auch die potentiell humanpathogenen Spezies *Moraxella lacunata* und *Moraxella catarrhalis*.

Eigenschaften

- Form: kokkoide bzw. kurze Stäbchen
- Motilität: unbeweglich
- Gramfärbung: negativ
- Oxidase: positiv
- Aerob/ Anaerob: aerob

Vorkommen

Der Großteil aller Arten ist natürlicher Bestandteil der Schleimhautflora von Säugetieren (KAYSER et al. 2010).

Pathogenität

Einige Vertreter der Gattung Moraxella können humanpathogen sein. Beispielsweise kann die Spezies *M. catarrhalis* eine potentielle Gefährdung für den Menschen durch das Hervorrufen von Atemwegsinfektionen darstellen, wenn die Erreger massenhaft im unteren Respirationstrakt vorliegen (ENRIGHT & MCKENZIE 1997).

2.2.3 *Pseudomonas*

Zum typischen Keimspektrum von Fischen gehören auch *Pseudomonas*-Bakterien. Die meisten Spezies der Gattung werden als Verderbniserreger beschrieben, die während der Fischlagerung schnell zum überwiegenden Bestandteil der Mikroflora werden können (WEBER 2003).

Besondere humanmedizinische Relevanz kommt der Art *Pseudomonas aeruginosa* zu, da ihre Stämme Verursacher von Hospitalinfektionen sein können (SELBITZ 2007).

Identifiziert und untersucht wurden im Rahmen dieser Arbeit hauptsächlich die Arten *Pseudomonas putida* und *Pseudomonas fluorescens*.

Eigenschaften

- Form: Stäbchen
- Motilität: beweglich
- Gramfärbung: negativ
- Oxidase: positiv
- Aerob/ Anaerob: strikt aerob

Vorkommen

Pseudomonaden bevorzugen feuchte Milieus und kommen ubiquitär im Erdboden und Wasser vor. Sie können diverse Lebensmittel kontaminieren und aus dem Darm von Tier und Mensch isoliert werden (BAUMGART 2001).

Pathogenität

Pseudomonas putida verursacht bei Aquakultur-Fischen Weichteilinfektionen, begünstigt durch stressverursachende Rahmenbedingungen wie beispielsweise hohe Besatzdichten (SMOLOWITZ 1998, ALTINOK, KAYIS & CAPKIN 2006).

Für Menschen ist die Spezies in der Regel nur im Falle einer Immunsuppression von Bedeutung. Hierbei können Erkrankungen wie Bakteriämien, Harnwegsinfektionen oder Lungeninfektionen auftreten, meistens infolge von entsprechend invasiv angewendeten medizinischen Geräten (CARPENTER et al. 2008, YOSHINO et al. 2010).

Pseudomonas fluorescens zählt als hitzestabiles Bakterium zu den wichtigsten Verderbniserregern bei Lebensmitteln.

2.2.4 *Shewanella*

Die bedeutendste Rolle bei der Kühl- bzw. Eislagerung von Fischen und marinen Lebensmitteln spielen Bakterien der Gattung *Shewanella* (FONNESBECH VOGEL et al. 2005). Eine hohe Keimzahl von *Shewanella*-Bakterien im bzw. auf dem Lebensmittel gilt als Hauptindikator eines Verderbs.

Als relevante Vertreter gelten *Shewanella baltica* und *Shewanella putrefaciens*, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit im Hinblick auf ihre Antibiotikaempfindlichkeit untersucht wurden.

Eigenschaften

- Form: gerade Stäbchen/ leicht gekrümmte Stäbchen
- Motilität: beweglich
- Gram: negativ
- Aerob/ Anaerob: zumeist aerob, z.B. *Shewanella baltica* auch anaerob

Vorkommen

Shewanella putrefaciens-Bakterien kommen in der gesamten marinen Umwelt vor. Sie sind natürlicher Bestandteil der Mikroflora gesunder Meerestiere.

Pathogenität

Bei Fischen, die unter starkem Stress stehen, kann *Sh. putrefaciens* äußerlich Läsionen und Geschwüre verursachen. Innere Infektionen können zu Organschäden und Blutvergiftungen führen.

Bei immunsupprimierten Menschen ist der Erreger als Auslöser von schwerwiegenden Haut- sowie Weichteilinfektionen beschrieben worden (DARAI et al. 2012).

2.3 Antibakterieller Wirkmechanismus ausgewählter Antibiotika mit Relevanz in der Aquakultur

Unter die Bezeichnung Antibiotika fallen -mit Ausnahmen- Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen, die zum Selbstschutz gegen andere Bakterien wirken und antinfektiv eingesetzt werden (KÜSTER et al. 2013). Dabei wird zwischen einer bakteriziden (bakterienabtötenden) und bakteriostatischen (wachstums- bzw. vermehrungshemmenden) Wirkung unterschieden (KÜSTER et al. 2013).

Ein hoher Infektionsdruck sowie die Gefahr der massenhaften Ansteckung sind die Hauptgründe, warum Antibiotika in Massentierhaltungen prophylaktisch verabreicht werden.

Die Applikation erfolgt bei Fischen in der Regel über das Wasser oder über das Futter (MARKESTAD & GRAVE 1997, SØRUM, 2006, CABELLO 2006) und ist zur Vermeidung einer hohen Mortalität und somit zur Eingrenzung ökonomischer Verluste von Nöten. Im Folgenden wird auf die Wirkung von solchen antibiotischen Wirkstoffen eingegangen, die in der Fischzucht relevant sind und im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden.

2.3.1 Ampicillin

Das Antibiotikum Ampicillin wird den β -Lactam-Antibiotika zugeordnet, deren strukturelles Merkmal der β -Lactam-Ring ist (KRONTHALER 2009).

Eine Gruppe der β -Lactame sind die Aminopenicilline, zu denen auch das Ampicillin gehört. Hierbei wurden in die Benzylseitenketten des Wirkstoffs Aminoreste integriert, um eine verbesserte Wirkung gegen gram-negative Bakterien zu erzielen. Eine Stabilität gegenüber dem Enzym β -Lactamase besteht nicht (VON CZAPIEWSKI 2010).

Wie bei allen β -Lactamen beruht die bakterizide Wirkung des Ampicillins auf der Hemmung der bakteriellen Peptidoglykan- bzw. Mureinsynthese durch Inaktivierung der an der Synthese beteiligten Transpeptidasen (BENDIX 2003, KRONTHALER 2009, VON CZAPIEWSKI 2010). Dadurch wird der bakterielle Zellwandaufbau gestört.

Da gram-positive Bakterien einen höheren Mureinanteil in ihrer Zellwand haben, können diese mittels β -Lactamen weitaus effektiver behandelt werden als gram-negative Bakterien (KRONTHALER 2009).

2.3.2 Trimethoprim

Bei Trimethoprim handelt es sich um ein synthetisches Antibiotikum, das bakteriostatisch an unterschiedlichen Stufen der bakteriellen Folsäuresynthese wirkt (KRONTHALER 2009, VON CZAPIEWSKI 2010). Das Enzym Dihydrofolatreduktase, das für die Reduktion von Dihydrofolsäure zu Tetrahydrofolsäure zuständig ist, wird durch Trimethoprim blockiert. Da Tetrahydrofolsäure unentbehrlich für die bakterielle Nukleinsäuresynthese ist (KROKER, SCHERKL & UNGEMACH 2002), wirkt das Antibiotikum gezielt einem DNA-Aufbau entgegen.

Trimethoprim wird in der Regel in Kombination mit der ebenfalls bakteriostatisch wirkenden chemisch synthetisierten Substanz Sulfonamid im Verhältnis 1:19 verwendet, um die entsprechende Wirkung bei gleichzeitig reduzierter Dosierung zu steigern (BENDIX 2003, VON CZAPIEWSKI 2010). In Deutschland ist dies die einzige zugelassene Wirkstoffkombination zur Therapie von Fischkrankheiten (VON CZAPIEWSKI 2010, BMELV 2013).

Eine synergistische bakterizide Wirkung zeigen die kombinierten Präparate jedoch nur bei solchen gram-negativen und gram-positiven Bakterien, die nicht dazu fähig sind, Folsäure aus exogenen Quellen aufzunehmen (KRONTHALER 2009, VON CZAPIEWSKI 2010).

2.3.3 Erythromycin

Zur Gruppe der Makrolide, deren strukturelles Charakteristikum der Laktonring ist, gehört das Antibiotikum Erythromycin, das erstmals aus Stoffwechselendprodukten der Bakterienart *Streptomyces erythreus* isoliert wurde (MC GUIRE et al. 1952, MILLROSE 2009).

Aufgrund ihrer besonders hohen Wirksamkeit gegenüber einer Vielzahl von gram-positiven Bakterien werden Makrolide vornehmlich zur Behandlung von gram-positiven Kokken und Stäbchen eingesetzt (KRONTHALER 2009).

Sie wirken bakteriostatisch an der 50S- Untereinheit der Bakterienribosomen.

Indem sie die Elongationsphase der Polypeptidkette am Ribosomen stören, greifen sie in die bakterielle Proteinsynthese ein (MILLROSE 2009). Durch die Bindung an die Untereinheit blockieren sie die Translokation der Peptidyl-t-RNA von der Akzeptor- zur Donorregion, wodurch es zum Abbruch der Proteinbiosynthese kommt (MILLROSE 2009).

2.3.4 Tetracyclin

Tetracyclin gehört der Gruppe der Tetracycline an und wird ebenfalls aus *Streptomyces* Arten synthetisiert (KRONTHALER 2009). Weltweit sind Tetracycline neben der Wirkstoffkombination Trimethoprim/Sulfonamid die am häufigsten eingesetzten antibiotischen Wirkstoffe (VON CZAPIEWSKI 2010).

Einer Studie der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) zufolge hat vor allem der massive globale Einsatz dieser Antibiotikagruppe in der marinen Aquakultur eine große Bedeutung (BLE 2004).

Ähnlich wie Erythromycin stört Tetracyclin die Proteinbiosynthese von Bakterien. Jedoch bindet es nicht an die 50S- sondern an die 30S- Untereinheit der Ribosomen.

Dadurch verhindert der Wirkstoff, dass Aminoacyl-t-RNA an die Akzeptorstelle gebunden wird. Er dringt über spezifische Transportproteine in die Bakterienzelle ein und entfaltet seine bakteriostatistische Wirkung über die Inhibition der Elongationsphase während der Proteinbildung (KRONTHALER 2009).

2.3.5 Gentamicin

Eine bakterizide Wirkung weist das zu den Aminoglykosiden gehörende Antibiotikum Gentamicin auf. Aminoglykoside werden aus *Streptomyces* Arten sowie Vertretern des *Microspora* Bakteriums gewonnen (KRONTHALER 2009).

Auch diese Antibiotika inhibieren die bakterielle Proteinsynthese, indem sie an die 30s- Untereinheit der Ribosomen –an unterschiedliche Zentren- binden (VAKULENKO & MOBASHERY 2003).

Dadurch beeinflussen Aminoglykoside die Translokationsvorgänge während der Proteinbiosynthese so massiv, dass es zu Ablesefehlern der mRNA kommt (VON CZAPIEWSKI 2010). Es entstehen funktionsunfähige „Nonsense“-Proteine, was schließlich zum Zelltod führt. Hauptsächlich gram-negative Bakterien, speziell Enterobakterien und die Spezies *Pseudomonas aeruginosa*, werden mit Hilfe von Aminoglykosiden bekämpft (KRONTHALER 2009), da das Wirkspektrum vergleichbar wenig gram-positive Bakterien abdeckt und z.B. gegenüber Streptokokken lediglich eine geringe Wirksamkeit vorliegt.

2.4 Resistenzentwicklung

2.4.1 Resistenzentstehung und -übertragung

Von einer Antibiotikaresistenz wird gesprochen, wenn bei der therapeutisch wirksamen Konzentration des jeweiligen Wirkstoffes das Bakterium weiterhin vermehrungsfähig bleibt (ALEXY 2003). Differenziert wird dabei zwischen der primären und sekundären Resistenz. Bei der primären Resistenz besitzen alle Stämme der Bakterienart natürlich bedingt Resistenzgene, die u.a. dem Selbstschutz der Bakterien vor eigenen Antibiotika dienen (ADREMONT, CORPET & COURVALIN 1997, FEUERPFIL et al. 1999, ALEXY 2003). Von einer sekundären Resistenz wird gesprochen, wenn es sich um eine erworbene Unempfindlichkeit handelt, die nur einen Teil der Stämme einer Bakterienart betrifft (ALEXY 2003). Durch Mutation von Genen oder durch Aufnahme von Resistenzgenen in die Zelle kann Resistenz erworben werden (KRONTHALER 2009, KÜSTER et al. 2013).

Antibiotikaresistente Bakterien sind in der Umwelt natürlicherweise weit verbreitet, jedoch werden sie durch den breiten Einsatz von Antibiotika aufgrund ihres Überlebensvorteils vermehrt selektiert, was das natürliche Gleichgewicht zwischen antibiotikaproduzierenden und antibiotikaresistenten Bakterien unterbindet (FEUERPFIL et al. 1999, HUTHER 2007). Da unwirksame Antibiotika lediglich durch alternative Antibiotika ersetzt werden und kein deutlicher Rückgang im Antibiotikaverbrauch zu erwarten ist, steigt die Selektion antibiotikaresistenter Bakterien und damit ihr Eintrag in die Umwelt weiter an, wodurch die Resistenzproblematik global enorm an Relevanz gewonnen hat.

Die in Form von Genen abgespeicherten Resistenzeigenschaften liegen auf dem Bakterienchromosom oder auf mobilen genetischen Elementen wie den extrachromosomalen Plasmiden oder den Transposons, die als „springende Gene“ bezeichnet werden (KRÜGER 2002, HUTHER 2007).

Durch den Zellteilungsprozess können Resistenzgene im Zuge eines sogenannten vertikalen Gentransfers auf verwandte Spezies übertragen werden. Über Plasmide können Resistenzinformationen jedoch auch an unverwandte Arten weitergegeben werden, was als horizontaler Gentransfer bezeichnet wird (FEUERPFIL et al. 1999, ALEXY 2003, LABELLA et al. 2013). Dadurch besteht die Gefahr, Informationen für Antibiotikaresistenzen von apathogenen auf pathogene Bakterien zu übertragen (FEUERPFIL et al. 1999).

Des Weiteren sind auf Plasmiden oftmals Informationen für Resistenzen gegenüber einer Vielzahl von unterschiedlichen Antibiotika gespeichert, sodass Bakterien, die dieses Plasmid besitzen, eine Multiresistenz aufweisen (LABELLA et al. 2013).

Ihre enorme Anpassungsfähigkeit hat den Bakterien ermöglicht, verschiedene Resistenzmechanismen zu entwickeln (FEUERPFIL et al. 1999), wodurch bestimmte Antibiotika die Wirkung bei ihnen verfehlen. Dazu gehören:

- ➔ Verhinderung der Antibiotikaaufnahme in die Bakterienzelle
- ➔ Aktive Entfernung des Wirkstoffes aus der Zelle
- ➔ Enzymatische Inaktivierung des Antibiotikums bzw. Modifikation und Abbau
- ➔ Modifizierung von Zielstrukturen in der Bakterienzelle

(FEUERPFIL et al. 1999, HUTHER 2007, KRONTHALER 2009, KÜSTER et al. 2013)

2.4.2 Resistenzmechanismen gegenüber ausgewählten Antibiotika

Ampicillinresistenz

Der bedeutsamste Resistenzmechanismus gegen β -Lactame wie z.B. gegen Ampicillin ist die enzymatische Inaktivierung der Wirkstoffe. Bakterien mit Genen für β -Lactamasen können diese Enzyme produzieren, welche anschließend den β -Lactamring der Antibiotikagruppe hydrolytisch spalten, wodurch der Wirkstoff modifiziert und abgebaut wird (WERCKENTHIN & SCHWARZ 2003, KRONTHALER 2009, VON CZAPIEWSKI 2010).

Als weiterer Resistenzmechanismus, der insbesondere bei gram-positiven Bakterien eine Rolle spielt, ist die Modifikation von penicillinbindenden Proteinen, die als Zielstrukturen fungieren, bekannt (KRONTHALER 2009, VON CZAPIEWSKI 2010).

Daneben können bestimmte gram-negative Bakterien eine Antibiotikaaufnahme gar nicht erst zu Stande kommen lassen, indem sogenannte Porine, die als Transmembranproteine dem Stoffaustausch dienen, reduziert werden bzw. durch Modifikation den Wirkstoff nicht in die Zelle durchlassen (KROKER, SCHERKL & UNGEMACH 2002, VON CZAPIEWSKI 2010). Schließlich gibt es noch die Möglichkeit der energieabhängigen Ausschleusung von β -Lactamen aus der Bakterienzelle über einen aktiven Transport (KRONTHALER 2009, VON CZAPIEWSKI 2010), wobei zelleigene Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) verbraucht wird. Dieser Vorgang der Ausschleusung wird als Efflux-System bezeichnet.

Trimethoprimresistenz

Entscheidend bei einer bakteriellen Resistenz gegen den Wirkstoff Trimethoprim ist die Modifizierung des resistenzvermittelnden Enzyms Dihydrofolreduktase und dessen Überproduktion. (HUOVINEN et al. 1995, VON CZAPIEWSKI 2010).

Das unwirksame Trimethoprim ist in einem solchen Fall nicht mehr dazu fähig, das unempfindliche Enzym zu blockieren, sodass die bakterielle Folsäuresynthese fortgesetzt werden kann.

Erythromycinresistenz

Erythromycinunempfindliche Bakterien können durch eine enzymgesteuerte Ankoppelung von Methylgruppen an den aktiven Bindungsort am Ribosomen einen Angriff durch Makrolide wie Erythromycin verhindern. Diese Veränderung der Zielstruktur führt dazu, dass die Bindungsstärke des antibiotischen Wirkstoffes abnimmt (MILLROSE 2009, KRONTHALER 2009). Ein anderer Resistenzmechanismus beruht auf dem Efflux-System, welches auch bei der Ampicillinresistenz bekannt ist. Das Makrolid-Antibiotikum wird energieabhängig aktiv aus der Bakterienzelle transportiert (KROKER et al. 2002, KRONTHALER 2009).

Tetracyclinresistenz

Die bereits beschriebene aktive Entfernung des Wirkstoffes aus der Bakterienzelle spielt auch bei der Tetracyclinresistenz eine Rolle. Hierbei erfolgt die Ausschleusung des Antibiotikums aus der Zelle durch ein plasmidcodiertes Transportsystem (KRONTHALER 2009).

Als weitere Resistenzmechanismen sind der Ribosomenschutz durch entsprechende Schutzproteine und die Inaktivierung des Tetracyclins mittels Enzymen bekannt (VON CZAPIEWSKI 2010).

Gentamicinresistenz

Eine Resistenz gegenüber Aminoglykosiden wird in erster Linie durch eine enzymatische Modifikation von Amino- und Hydroxygruppen der Wirkstoffe ermöglicht. Demzufolge werden die Antibiotika in ihrer Ladung verändert. Dadurch sind sie nicht mehr dazu fähig, an den entsprechenden Stellen der bakteriellen Ribosomen zu binden (VON CZAPIEWSKI 2010). Daneben können resistente Bakterien durch Permeabilitätsänderungen der äußeren Zellmembran eine Wirkstoffaufnahme unterbinden (KRONTHALER 2009, VON CZAPIEWSKI 2010).

3 Hemmstofftests - Material und Methode

3.1 Material

3.1.1 Fischproben

Die hinsichtlich ihres Antibiotikaresistenzverhaltens untersuchten bakteriellen Isolate entstammten Handelsproben von frischen Süßwasserfischarten aus Aquakultur und einer Seewasserfischprobe. Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht zu den insgesamt sechs herangezogenen Fischproben.

Tabelle 1: Informationen zu den Fischproben

Probe	Fischart	Herkunft	Beschaffungsort	Beschaffungszeitpunkt 2013	Untersuchtes Bestandteil
1	Afrikanischer Raubwels**	Niederlande	TOOM-Markt Frischfisch-Theke*	Juni	Filet
2	Regenbogenforelle*** (ganz)	unbekannt	EKZ Mercado Händler Fisherman*	Juni	Hautoberfläche
3	Regenbogenforelle*** (ganz)	Frankreich	TOOM-Markt Frischfisch-Theke*	Juni	Hautoberfläche
4	Regenbogenforelle*** (ganz)	Deutschland	Wochenmarkt Fischfachhandel Scheffler in HH Wilhelmsburg	Juli	Hautoberfläche und Filet
5	Saibling (ganz)	Deutschland	TOOM-Markt Frischfisch-Theke*	September	Hautoberfläche und Filet
6	Rotbarsch	Nordostatlantik	TOOM-Markt Frischfisch-Theke*	September	Filet

* in HH Altona

** *Clarias gariepinus*

*** *Oncorhynchus mykiss*

3.1.2 Bakterienanzucht und –isolierung

Zur Kultivierung der Bakterien wurde eine steril entnommene Menge des Filets von 10 g in einem Beutel mit 90 mL Verdünnungslösung mit Hilfe eines Stomacher® 400 Circulators der Firma Kleinfeld Labortechnik (Sitz: Gehrden) homogenisiert. Aus dieser Suspension wurde eine Verdünnungsreihe von sechs Stufen (1:10 bis 1:10⁶) hergestellt.

Je 200 µL Zellsuspension der jeweiligen Verdünnungsstufe wurden mit einem abgeflamten Drigalski-Spatel auf drei parallel angesetzten Standard-I-Eisenagar Platten, d.h. im Zuge einer Triple-Bestimmung, ausgestrichen. Die angewandte Technik zur Anzucht von Bakterien ist als „Oberflächenspatelverfahren“ bekannt. Anschließend wurden die Platten für 48 Stunden bei Raumtemperatur (ca. 20 °C) bebrütet.

Für die mikrobiologische Untersuchung der Haut wurde ein Abstrich von der gesamten Hautoberfläche mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers genommen und in ein Reagenzglas mit 9 mL V-Lsg aufgenommen. Auf einem Vortexmischer wurde die Lösung gründlich durchgemischt. Die Herstellung der Verdünnungsreihe, Beimpfung der Platten sowie Kultivierung erfolgten nach dem gleichen Prinzip wie bei der Filetuntersuchung.

Nähere Informationen zur Zusammensetzung der Verdünnungslösung und des Standard-I-Eisenagars liefert Anhang I.

Nach der Inkubation erfolgte die Isolierung von Bakterien zur Etablierung von Reinkulturen. Dabei wurden ausgewählte Einzelkolonien mit einer sterilen Einmal-Impföse von den Platten mit der Gesamtkeimzahl genommen und durch Verdünnungsausstrich auf Standard-I-Eisenagar Platten vereinzelt.

3.1.3 Identifizierung der bakteriellen Isolate

Die Züchtung auf Eisenagar diente der Erkennung von potenziellen Shewanellen. Diese sind in der Lage aus schwefelhaltigen Aminosäuren Schwefelwasserstoff zu bilden. Durch die Reaktion von Schwefelwasserstoff mit Eisencitrat kommt es zur Ausfällung von Eisen-(II)-sulfid, was die Schwarzfärbung der Einzelkolonien verursacht (WEBER 2003). Dadurch konnten die jeweiligen Isolate optisch als Shewanellen eingestuft werden.

Um die ausgewählten Reinkulturen zu differenzieren, wurden diese den klassischen mikrobiologischen Untersuchungsmethoden unterzogen:

- Charakterisierung der Bakterienform unter dem Mikroskop
- Gramfärbung zur Klassifizierung in gram-negativ und gram-positiv
- Cytochrom-c-Oxidase-Test mittels Oxidase Bactident®-Teststreifen der Firma Merck (Sitz: Darmstadt) zur Einteilung in oxidase-positiv und oxidase-negativ

Bei allen untersuchten Isolaten handelte es sich um gram-negative Stäbchen.

Anhand des Oxidase-Tests mittels der Teststreifen wurde das bakterielle Isolat auf das Vorhandensein des Enzyms Cytochrom-c-Oxidase überprüft.

Anders als Nicht-Enterobakterien reagieren Enterobakterien oxidase-negativ (KRÖMKER 2006), wodurch eine Bakteriendifferenzierung ermöglicht wird, die für die anschließende Wahl des entsprechenden Identifizierungssystems von entscheidender Bedeutung ist.

Zur endgültigen Identifizierung wurde das API-Schnellbestimmungssystem der Firma bioMérieux Deutschland (Sitz: Nürtingen) herangezogen.

Die gramnegativen, oxidase-positiven Nicht-Enterobakterien wurden mittels Api® 20 NE Teststreifen identifiziert. Für die gramnegativen, oxidase-negativen Bakterien wurde das Api® 20 E Verfahren herangezogen. Die Durchführung beider Systeme erfolgte gemäß Herstelleranleitung.

Diejenigen ausgewählten Isolate, die den Eindruck von Shewanellen vermittelten, wurden nach einer DNA-Isolierung einer PCR Analyse unter Verwendung des iCycler™- Systems der Firma Bio-Rad Deutschland (Sitz: München) unterzogen.

Tabelle 2: PCR Ansatz

10 µl	SensiMix
0,2 µl	Primer 5
0,2 µl	Primer 6
4,6 µl	H ₂ O (Wasser)
5 µl	DNA

Tabelle 3: PCR Bedingungen

Cycle/ Lauf	Temperatur	Dauer	Wiederholung
1	95 °C	5 min	einmal
2 (Schritt 1)	95 °C	1 min	30mal
2 (Schritt 2)	58 °C	1 min	keine
2 (Schritt 3)	72 °C	1 min	keine
3	4 °C	stundenlang	keine

Durch einen enzymatischen Verdau des PCR Produkts mit den Restriktionsenzymen MspI und DdeI mittels des Thermocyclers von Biometra (Sitz: Göttingen) gefolgt von einer Gel-elektrophorese mit dem Elektrophorese-Apparat des Herstellers Roth (Sitz: Karlsruhe) konnten die Shewanellen als solche genau identifiziert werden.

Tabelle 4: Verdau mit MspI und DdeI

5 µl	H ₂ O	Bedingungen des Thermocyclers: 2,5 Stunden bei 37 °C, danach 2 min bei 65°C
1 µl	Puffer Tango	
1 µl	Enzym MspI bzw. DdeI	
3 µl	PCR Produkt	

Das Elektrophorese-Verfahren nutzt die Wanderung geladener Moleküle in einem elektrischen Feld zu Gunsten ihrer Trennung aus. Bei der DNA-Auftrennung zur Charakterisierung einer Spezies diente im Rahmen einer Gelelektrophorese 2%iges Agarosegel als Trägermedium. Die Gelzusammensetzung ist in Tabelle 11 des Anhangs I dargestellt.

Tabelle 5: Ansatz für eine Gelelektrophorese

5 µl	verdaute Probe	Bedingungen: 1,5 Stunden bei 80 Volt
1 µl	Ladepuffer	
100 bp Marker als Referenz		

Nach der Elektrophorese erfolgte die Benetzung des Gels mit einer Ethidiumbromid-Farbstofflösung zur Auswertung bzw. Bilddokumentation am GelDoc UV-Gerät. Da *Shewanella baltica*- Amplifikate mit Hilfe des Enzyms Msp I und *Shewanella putrefaciens*- Amplifikate im Gegenzug dazu mit Dde I zerschnitten werden können (MEYER 2006), konnte im Rahmen der molekularbiologischen Identifizierung zwischen den Spezies *Sh. baltica* und *Sh. putrefaciens* differenziert werden.

Insgesamt 56 identifizierte Isolate wurden für die Hemmstofftests ausgewählt:

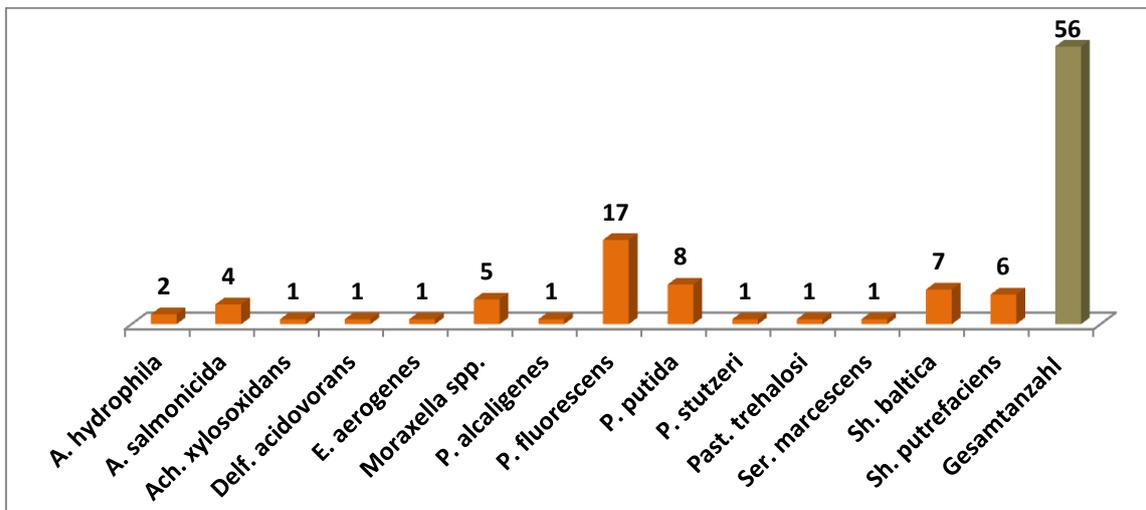


Abbildung 1: Anzahl ausgewählter Isolate der entsprechenden Bakterienarten

Tabelle 12 in Anhang II veranschaulicht genau, wie viele Isolate einer Bakterienart in den einzelnen Fischproben identifiziert und anschließend untersucht wurden.

3.2 Methode

Im Zeitraum vom 04.07.2013 bis zum 10.10.2013 sind die 56 ausgewählten Isolate Hemmstofftests zur Überprüfung ihrer Empfindlichkeit unterzogen worden.

Die Hemmstofftest- Methode ist ein schnell und einfach durchführbares Testverfahren, das für den Großteil aller Bakterien geeignet ist (EUCAST 2013).

Die Methode gewährleistet eine rein qualitative Aussage zur Antibiotikaempfindlichkeit eines Bakteriums, indem sie nach entsprechend ordnungsgemäßer Durchführung aufzeigt, ob sich der Stamm bei der definierten Wirkstoffkonzentration weiterhin vermehrt hat und damit resistent ist. Die Durchführung erfolgte teilweise in Anlehnung an das standardisierte EUCAST- Verfahren zur antibiotischen Empfindlichkeitstestung.

3.2.1 Vorbereitung

Die einzelnen Hemmstofftests wurden in allen Fällen mit frischen Über-Nacht-Kulturen (ÜN-Kulturen) durchgeführt (SCHMID 2009).

Für die Anzucht der ÜN-Kulturen wurden Kulturröhrchen mit Standard-I-Nährbouillon angesetzt. Mittels einer sterilen Pipettenspitze wurde etwas Zellkultur von der Platte aufgenommen und in der Nährlösung suspendiert. Die Inkubation fand -zur Erzeugung einer optimalen Sauerstoffzufuhr innerhalb der Röhrchen- auf einem Schüttelbrett bei Raumtemperatur (20 °C) über Nacht statt.

Für die Kultivierung unter antibiotischen Bedingungen wurden selbst hergestellte Antibiotika-Agar-Platten als Nährmedien verwendet, die hinsichtlich ihrer Zusammensetzung optimale Wachstumsbedingungen für die zu untersuchenden Bakterien lieferten.

Die Platten wurden auf der äußeren Bodenfläche zur Positionsfestlegung der Antibiotikaplättchen markiert, damit beim späteren Belegen der Plättchen ein 2 cm-Abstand zum Rand und ein 3 cm-Mindestabstand zwischen den einzelnen Plättchen eingehalten werden konnte. Ein Ineinandergreifen bei der späteren Ausbildung der Hemmhöfe sollte so gemäß EUCAST-Vorschrift verhindert werden.

Die genaue Zusammensetzung der Standard-I-Nährlösung und des Antibiotika-Agars sind in Anhang I aufzufinden.

3.2.2 Testdurchführung

Der Nährboden wurde mit 3 mL ÜN-Kultur angeimpft. Durch Rotationsbewegungen wurde die Zellsuspension auf der gesamten Bodenfläche verteilt. In den darauffolgenden 30 Minuten wurde die Platte bei Raumtemperatur vorbebrütet (SCHMID 2009).

Nach der Kurzinkubation wurde die überstehende Suspension durch Schrägstellen der Platte am Rand vorsichtig abpipettiert.

Gleich darauf wurden die Antibiotika-Testplättchen unter offener Flamme mit einer sterilen Pinzette auf die markierten Stellen des beimpften Bodens platziert und leicht angedrückt. Je Boden kam ein Plättchen ohne Antibiotikum als Nullmuster hinzu.

Inkubiert wurde bei Raumtemperatur für 24 Stunden.

In Vorversuchen hatten sich höhere Temperaturen, wie sie in den EUCAST-Vorgaben erwähnt werden, als ungeeignet erwiesen, wobei sich 20 °C als optimal gezeigt hatten.



Abbildung 2: Durchführung von Hemmstofftests

Bei den Antibiotikaplättchen handelte es sich um industriell hergestellte Mastdiscs® der Firma MAST GROUP LIMITED (Hauptsitz: Bootle), vertrieben vom Tochterunternehmen MAST DIAGNOSTICA (Sitz: Reinfeld).

Der antibiotische Wirkstoff war in den Plättchen in definierter Konzentration enthalten. Getestet wurden die unter Punkt 2.3 erläuterten Antibiotika Ampicillin, Erythromycin, Trimethoprim, Gentamicin und Tetracyclin.

Die therapeutische Konzentration der vier ersten genannten Antibiotika wurde unter Berücksichtigung der EUCAST- und CLSI-Vorgaben ausgewählt. Die verwendete Tetracyclinkonzentration entsprach den standardisierten Vorgaben der BSAC.

Tabelle 6: Verwendete Antibiotikakonzentrationen

Antibiotikum	µg/ Plättchen
AMP	10
ERY	15
TM	5
GENT	10
TET	10

3.3.3 Messung von Hemmhöfen

Nach der 24stündigen Inkubation hatte sich auf den meisten Böden ein deutlich erkennbarer Bakterienrasen gebildet. Daneben waren um bestimmte Antibiotikaplättchen makroskopisch sichtbare Höfe zu verzeichnen.

Die Plättchen hatten die Feuchtigkeit aus dem Agar aufgenommen, woraufhin der antibiotische Wirkstoff in den Boden diffundiert war. Aufgrund dieses Prozesses ist der Test auch unter dem Namen „Agardiffusionstest“ bekannt (SCHMID 2009).

Hatte das jeweilige Isolat empfindlich auf den entsprechenden Wirkstoff reagiert, wurden Zellen um das Plättchen herum abgetötet, d.h. es hatte sich ein Hemmhof gebildet.

In Fällen, in denen kein Hemmhof zu erkennen war bzw. der Hof < 1 mm war, wurde das Isolat als resistent eingestuft.

Von jedem einzelnen Hemmhof, der entstanden war, wurde mit Hilfe eines Lineals der Durchmesser ausgemessen. Der Hemmhofdurchmesser entspricht dem Abstand zwischen Antibiotikaplättchen und Hofaußenrand.

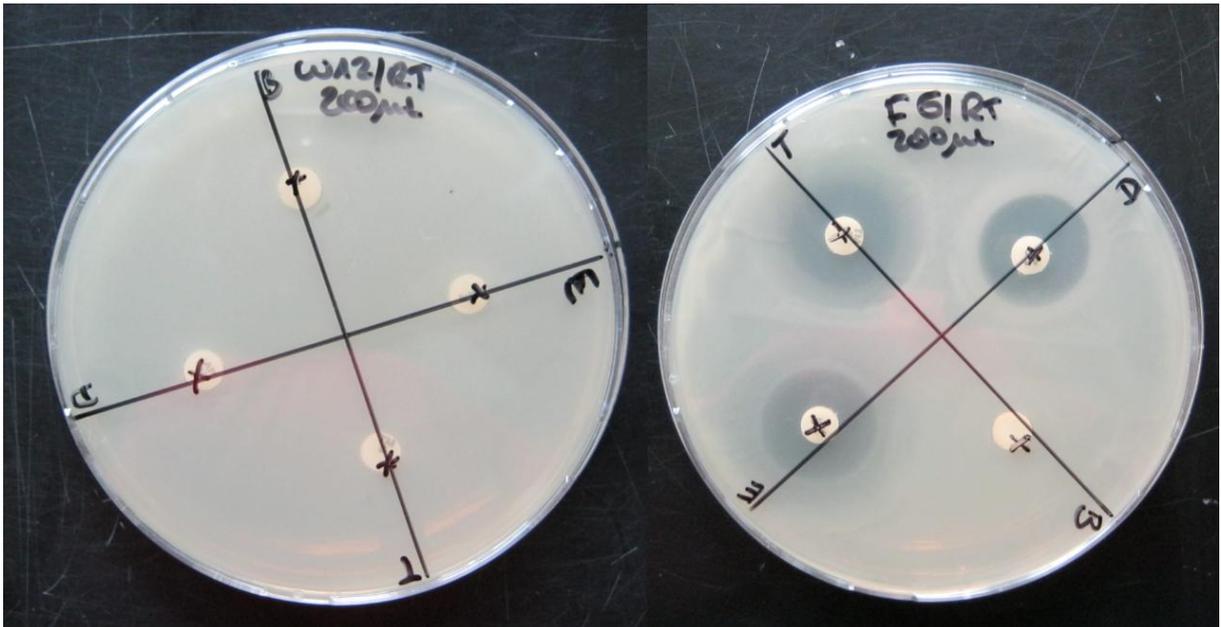


Abbildung 3: Platte ohne Hemmhofbildungen (links) im Vergleich zu einer Platte mit Hemmhöfen (rechts)

Zur Absicherung bzw. Überprüfung eines kritischen Ergebnisses (z.B. wenn der Hemmhof eine Größe von lediglich 1 bis 2 mm aufwies) wurde in den anfänglichen Tests das entsprechende Isolat auf das jeweilige Antibiotikum mehrmals hinsichtlich seiner Empfindlichkeit untersucht. In einigen unsicheren Fällen wurde ein Stamm auf alle Antibiotika mehrmals überprüft.

Um von Grund auf sichere Werte zu erhalten, wurden bei den späteren Tests alle Isolate auf ein und dasselbe Antibiotikum mindestens zweimal getestet, d.h. es wurde mindestens eine Doppelbestimmung durchgeführt. Eine Triplebestimmung erfolgte bei solchen Bakterium-Wirkstoff-Kombinationen, bei denen andere Stämme der Spezies zuvor unsichere Ergebnisse zeigten bzw. bei denen aufgrund vorheriger Ergebnisse von vornherein erwartet wurde, dass kein Hemmhof entstehen wird.

Wie oft eine Bakterienart auf die einzelnen Antibiotika getestet wurde, führt Tabelle 13 im Anhang II auf. Diese liefert gleichzeitig einen Überblick über die Anzahl der insgesamt durchgeführten Tests.

4 Resultate

Bei einem Großteil der untersuchten Isolate waren Hemmhöfe entstanden.

Unter Zuhilfenahme des Programms Microsoft Excel Office 2007 wurden die erhobenen Daten bezüglich der Hemmhofgrößen erfasst und statistisch ausgewertet.

Eine vollständige Übersicht zu den manuell gemessenen Werten liefert die Komplettauswertung in Anhang III.

Für ein Isolat, das auf ein und dasselbe Antibiotikum mehrmals getestet wurde, wurde der Median von den gemessenen Hemmhofgrößen erfasst und als Grundlage für die weitere statistische Auswertung bzw. für die Ergebnisdarstellung und -beurteilung herangezogen. Anschließend wurden für jede Bakteriengattung aus den erfassten Einzelwerten der Isolate der Median, der Mittelwert und die Standardabweichung für den jeweils getesteten Wirkstoff ermittelt.

Anhang IV veranschaulicht die statistische Auswertung in tabellarischer Form.

Im Folgenden wird speziell auf die Testergebnisse von solchen Bakterienarten eingegangen, die öfter als einmal isoliert und als solche identifiziert wurden.

Dazu gehören:

- *Aeromonas hydrophila* sowie *Aeromonas salmonicida*
- *Moraxella* spp.
- *Pseudomonas putida* und *Pseudomonas fluorescens*
- *Shewanella baltica* sowie *Shewanella putrefaciens*

Da keines der 56 Isolate in irgendeinem Test eine Resistenz gegenüber den Antibiotika Tetracyclin und Gentamicin bzw. gegenüber deren Wirkstoffkonzentration von 10µg/PL gezeigt hatte, werden die Testergebnisse dieser beiden Antibiotika nicht weiter ausgeführt.

4.1 Resistenzverhalten untersuchter Isolate gegenüber ausgewählten Antibiotika

4.1.1 Aeromonaden

Ein resistentes Auftreten war bei den *Aeromonas* Isolaten lediglich bei den Tests mit Ampicillin zu beobachten. Beide *A. hydrophila* Isolate sowie zwei der vier *A. salmonicida* Isolate wiesen keine eindeutigen Hemmhöfe um die Ampicillinplättchen auf.

Der angrenzende Wachstumsrasen war in diesen Fällen genauso deutlich sichtbar und konfluent wie an der Stelle des Kontrollplättchens.

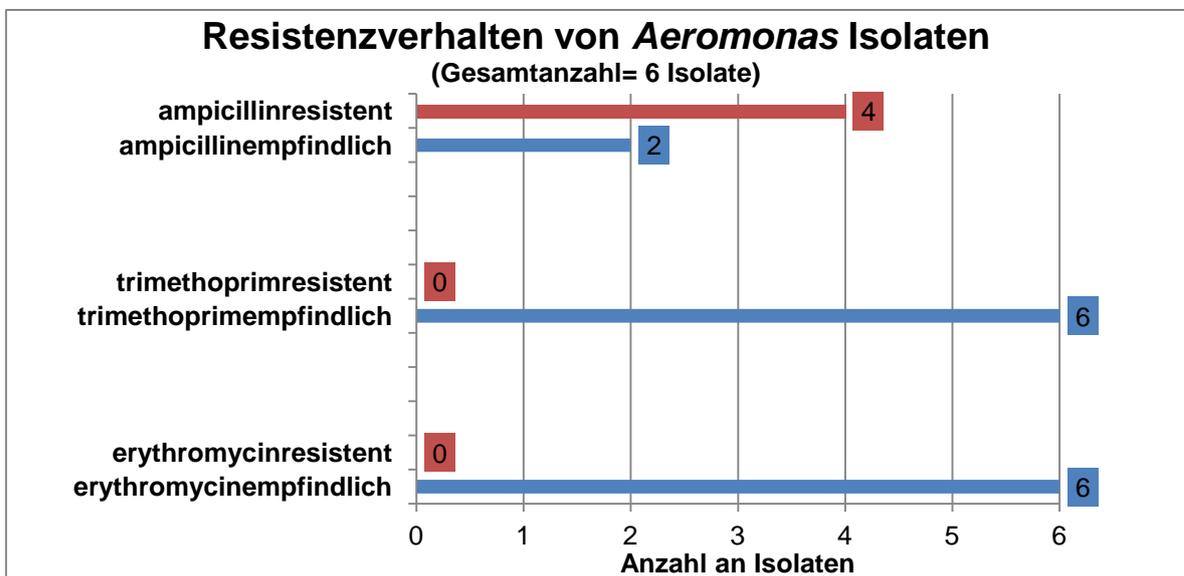


Abbildung 4: Resistenzverhalten von *Aeromonas* Isolaten

4.1.2 Moraxellen

Die Hemmstofftests mit den *Moraxella* Isolaten hatten lediglich bei den Untersuchungen auf Trimethoprimresistenz positive Ergebnisse gezeigt.

Drei der fünf *Moraxella* Isolate zeigten ein resistentes Verhalten bezüglich Trimethoprim bzw. bezüglich der Konzentration von 15µg/PL.

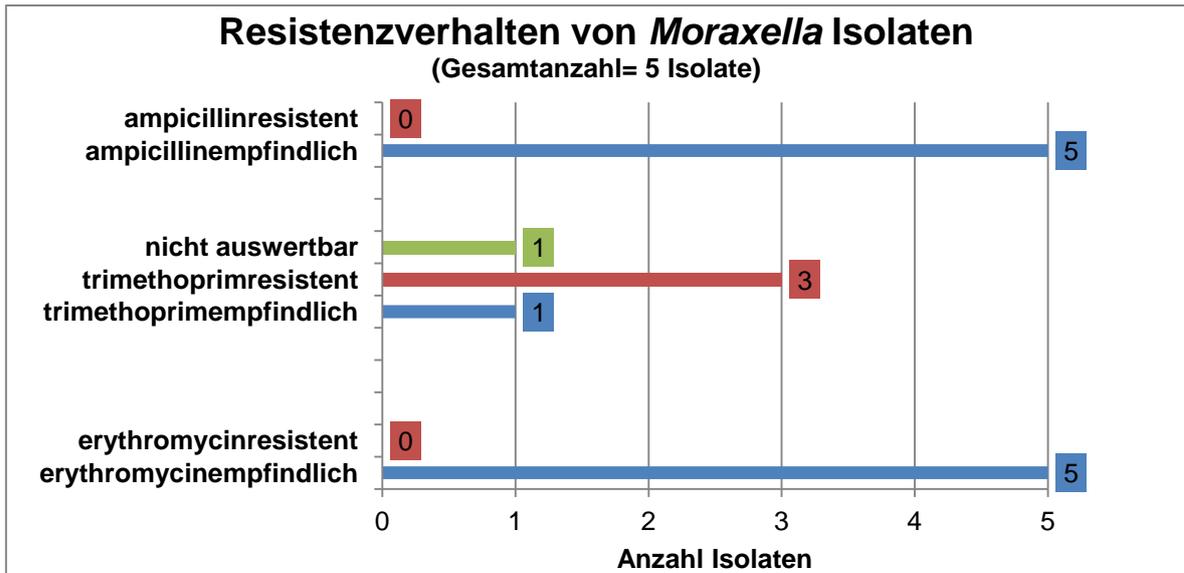


Abbildung 5: Resistenzverhalten von *Moraxella* Isolaten

4.1.3 Pseudomonaden

96 % der untersuchten *Pseudomonaden* erwiesen sich als resistent gegenüber Ampicillin und Trimethoprim. Zu den 96 % gehörten alle *P. fluorescens* Isolate. Ein einziges *P. putida* Isolat erwies sich als empfindlich gegenüber Ampicillin und Trimethoprim. Knapp ein Viertel der gesamten *Pseudomonas* Isolate zeigte Empfindlichkeit gegenüber Erythromycin auf.

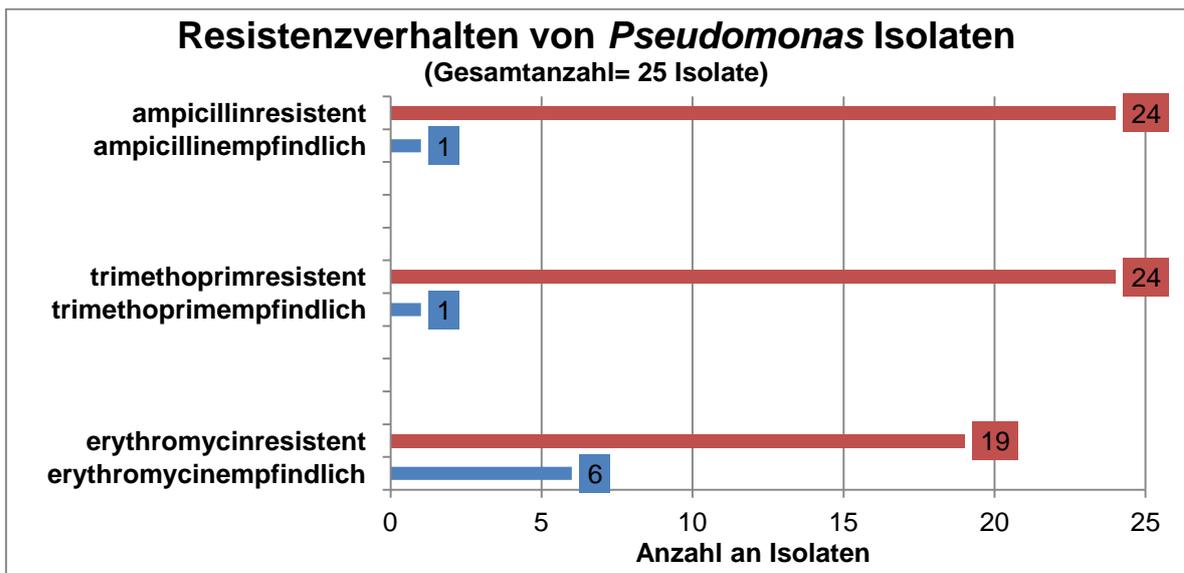


Abbildung 6: Resistenzverhalten von *Pseudomonas* Isolaten

4.1.4 Shewanellen

Von den 13 untersuchten *Shewanella* Isolaten hatten sich etwa 20 % als resistent gegenüber Ampicillin gezeigt. Bei nur einem Isolat war im Rahmen der Resistenzprüfung kein Hemmhof um das Trimethoprimplättchen ersichtlich, der Rest zeigte sich empfindlich. Eine Resistenz gegenüber Erythromycin bzw. gegenüber der entsprechenden Konzentration wurde bei keinem der 13 Isolate festgestellt.

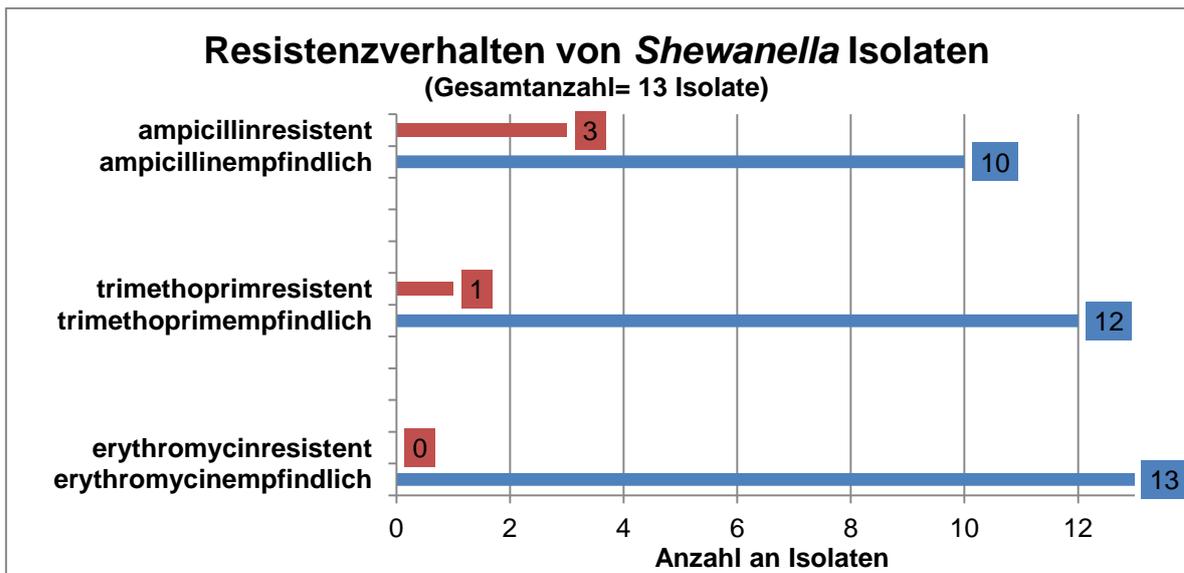


Abbildung 7: Resistenzverhalten von *Shewanella* Isolaten

4.2 Zusammenfassung der Hemmstofftestergebnisse

Insgesamt zeigten sich von den 56 Isolaten grob Zweidrittel resistent gegenüber Ampicillin. Ebenfalls deutlich mehr als die Hälfte aller Isolate verhielt sich trimethoprimresistent. Bei knapp 40 % aller Isolate wurde eine Erythromycinunempfindlichkeit festgestellt. Gentamicin- und Tetracyclinresistenzen konnten nicht nachgewiesen werden:

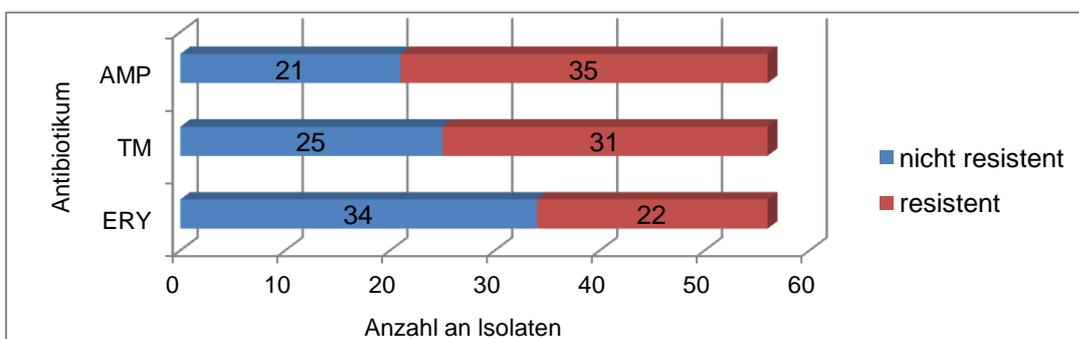


Abbildung 8: Gesamtanzahl resistenter Isolate gegenüber ausgewählten Antibiotika

5 Diskussion

5.1 Statistische Bewertung der Hemmstofftestergebnisse

In Ergänzung zum Anhang IV werden zur Veranschaulichung der Datenqualität der *Pseudomonas* Isolate die statistischen Parameter Mittelwert, Standardabweichung und Median im Zusammenhang mit der Empfindlichkeitsprüfung auf Ampicillin, Trimethoprim und Erythromycin zusammengefasst:

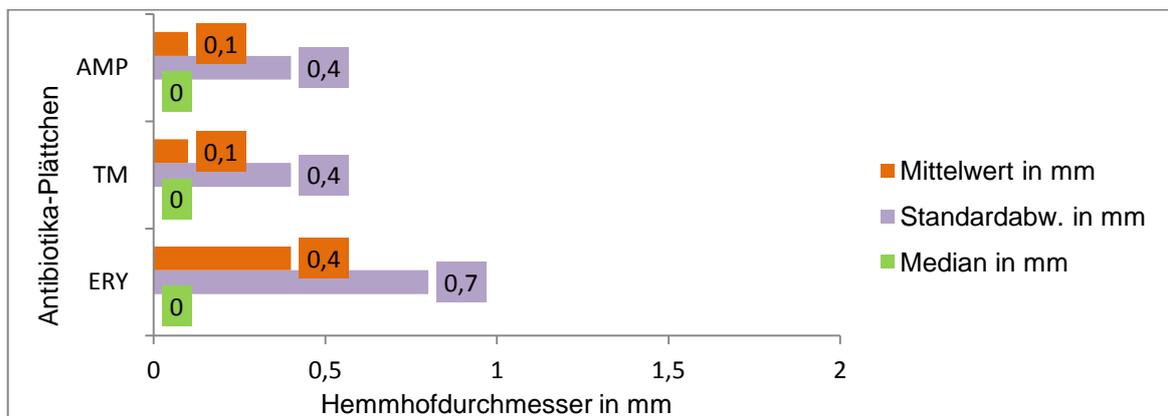


Abbildung 9: Durchschnittswert, Standardabweichung und Median der Messwerte aus der AMP-, TM-, und ERY-Empfindlichkeitsprüfung von Pseudomonaden

Sowohl aus den Untersuchungsdaten zur Ampicillinresistenz als auch aus den Daten zur Trimethoprimresistenz wurde ein Mittelwert von 0,1 mm für die Hemmhofgröße ermittelt. Dieser weicht nur extrem geringfügig vom Orientierungswert „0“ ab, der eine gänzliche Resistenz des Isolats darstellt. Die Standardabweichung von 0,4 mm bedeutet, dass die Messwerte im Durchschnitt um 0,4 mm vom Mittelwert abweichen. Aufgrund eines einzigen Außereißers mit einer Hemmhofgröße von 2 mm sind die Messwerte in der kompletten Datenreihe nicht identisch, wodurch die erwähnenswerte Standardabweichung zu Stande kommt. Der Mittelwert ist ein statistisches Maß, das auf Ausreißer besonders anfällig reagiert, wodurch die Einbeziehung des Medians notwendig wird.

Die geringe Standardabweichung deutet auf gute Messwerte und damit auf eine repräsentative Daten- bzw. Testreihe hin.

Aus der Datenreihe zur Erythromycinresistenz gehen ein etwas höherer Mittelwert und eine höhere Standardabweichung hervor, da rund 25 % der Werte nicht bei 0 mm liegen. In allen drei Fällen der Antibiotikaempfindlichkeitsprüfung beträgt der Median 0 mm, d.h. mindestens 50 % aller *Pseudomonas* Isolate sind ampicillin-, trimethoprim-, bzw. erythromycinresistent.

Bewertung der Datenrepräsentativität von *Pseudomonas* Isolaten aus der AMP- und TM-Empfindlichkeitstestung anhand eines Einstichproben-t-Tests:

Relevante Größen:

Hypothetischer Mittelwert der Grundgesamtheit, $\mu_0 = 0$ mm
Mittelwert der Stichprobe, $x_{(\text{mittel})} = 0,1$ mm
Ermittelte Standardabweichung, $s = 0,4$ mm
Wahrer Mittelwert der Grundgesamtheit, $\mu =$ unbekannt
Anzahl an Isolaten, $n = 25$ Isolate
Angenommene Irrtumswahrscheinlichkeit, α -Fehler = 0,05 (5 %)
Freiheitsgrade = $n - 1 = 24$

Nullhypothese: $\mu = \mu_0$ Prüfgröße = $t = \frac{x(\text{mittel}) - \mu(0)}{s} * \sqrt{n} = \underline{1,25}$
Alternativhypothese: $\mu \neq \mu_0$

Zur Beurteilung der ermittelten Prüfgröße ist der entsprechende Grenzwert notwendig. Dieser ist in der Tabelle zur „Student“-t-Verteilung nach GOSSET festgelegt und beträgt bei 24 Freiheitsgraden und einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% den Wert 1,711. Der empirische t-Wert der Untersuchung von 1,25 liegt damit unter dem kritischen Wert, sodass die Nullhypothese angenommen und die Alternativhypothese verworfen werden kann. Das Ergebnis kann unter Berücksichtigung eines Signifikanzniveaus von 5 % als nicht-zufallsbedingt und dadurch als signifikant eingestuft werden. Mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% kann davon ausgegangen werden, dass der vermutete Mittelwert der Grundgesamtheit von 0 mm dem wahren Wert der Grundgesamtheit entspricht. Daraus lässt sich mit hoher Wahrscheinlichkeit schließen, dass die gesamten *P. fluorescens*- und *P. putida*-Isolate der untersuchten Fischproben einen Hemmhof von durchschnittlich 0 mm aufweisen bzw. im Durchschnitt ampicillin- und trimethoprimresistent sind.

Um die Testergebnisse der *Aeromonas* Isolate statistisch wahrheitsnaher zu bewerten, ist eine größere Stichprobe bzw. Datenreihe von Nöten. Zur Berechnung eines Medians sind in der Regel mindestens 12 Daten notwendig.

Gleiches gilt für die Ergebnisse mit den *Moraxella* Isolaten. Eine Datenreihe von 5 Messwerten ist für die Ermittlung des Medians nicht ausreichend, sodass lediglich eine Tendenz über die Repräsentativität der ermittelten Daten zur Ampicillin-, Trimethoprim- und Erythromycinresistenz abgegeben werden kann.

Für eine geeignete Datenanalyse mittels Durchschnittswert und Standardabweichung sind die Werte im Hinblick auf die Datenmenge ebenfalls zu klein und zu stark voneinander abweichend.

Zur Veranschaulichung der Testergebnisse von *Shewanella* Isolaten bietet sich die statistische Zusammenfassung mit Hilfe von Quartilen im Boxplot an. Bei den Werten innerhalb der Datenmenge handelt es sich um Extremwerte, die teilweise stark voneinander abweichen. Die Ermittlung und Bewertung eines Durchschnittswertes mit Bezugnahme auf die Standardabweichung wäre aufgrund der starken Streuung demzufolge ungeeignet.

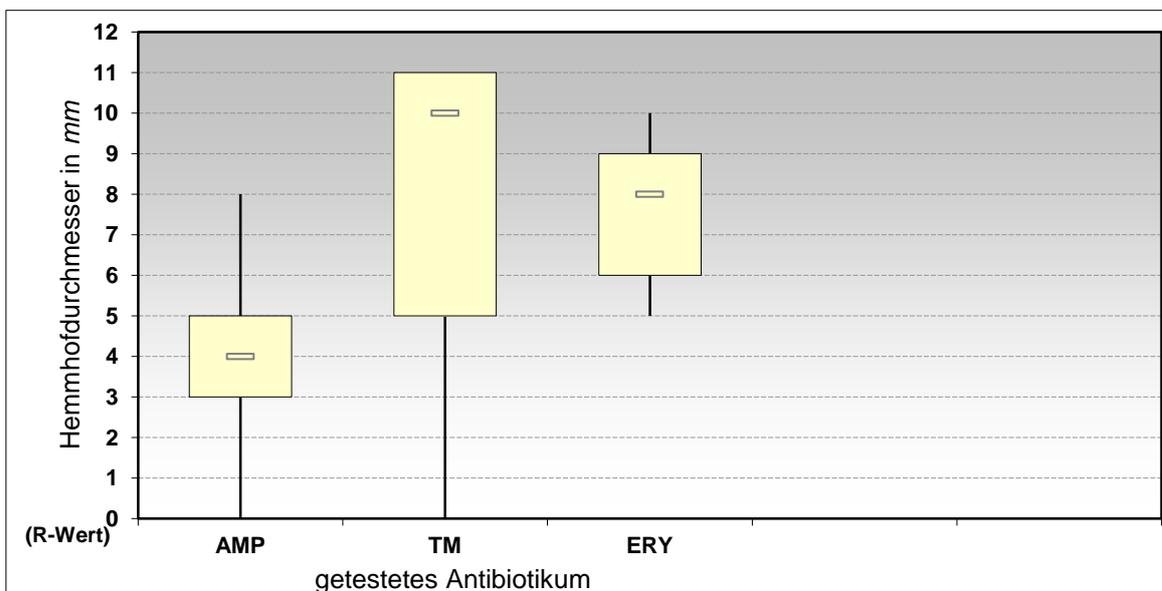


Abbildung 10: Verteilung der Messwerte aus der AMP-, TM- und ERY- Empfindlichkeitsprüfung von Shewanellen

Ausgehend von den Messwerten der Ampicillinresistenz-Tests lässt sich anhand des entsprechenden Boxplots aufzeigen, dass 50 % der Messwerte im Bereich zwischen 3 und 5 mm liegen und dadurch nah am 4mm-Median sind. Weitere 25 % befinden sich im Bereich zwischen 5 und 8 mm. Das bedeutet, dass nur 25 % der Daten einen kleineren Wert als 3 mm haben bzw. nahe oder gleich dem Resistenzwert (R-Wert) „0“ sind.

Eine noch größere Spannweite ist bei der Datenreihe der Trimethoprimresistenz-Tests erkennbar. Der Minimum- und der Maximum-Wert weisen einen Abstand von 11 mm zueinander auf. Etwa 75 % aller Werte liegen im Bereich zwischen 5 und 11 mm, wobei der Median von 10 mm nahe am Maximum und weit entfernt vom Resistenz-Orientierungswert „0“ ist.

Die Messwerte aus den Erythromycinresistenz-Tests verteilen sich innerhalb einer geringeren Spannweite von 5 mm. 50 % der Daten weisen als mittlere Hälfte einen Wert zwischen 6 und 9 mm auf, wobei die restlichen unteren 25 % und oberen 25 % nahe der mittleren Hälfte liegen.

5.2 Kritische Reflektion der Untersuchung und Methode

Auch wenn nur ein Teil der untersuchten Aeromonaden und Moraxellen Resistenzen aufgewiesen hat, ist es erforderlich, die Werte in die Bewertung mit einzubeziehen, da jeder resistente Stamm ein positives Ergebnis darstellt. Es kann durchaus vorkommen, dass nur ein Stamm oder nur wenige Stämme einer untersuchten Bakterienart bzw. -gattung Resistenz gegenüber einem bestimmten Antibiotikum zeigen, sofern diese Isolate das Resistenzgen in sich tragen bzw. übertragen bekommen haben. Abweichungen bezüglich der Hemmhofgrößen in der Datenreihe sind in solchen Fällen natürlich und müssen nicht zwangsläufig auf eine fehlerhafte Methodendurchführung hinweisen bzw. eine geringe Repräsentativität der Datenreihe bedeuten.

Demzufolge hat die Erkenntnis, dass vier der sechs *Aeromonas* Isolate ampicillinresistent und drei der fünf *Moraxella* Isolate trimethoprimresistent waren, Relevanz, sodass Aussagen zur allgemeinen Resistenzlage von Aeromonaden und Moraxellen zulässig sind.

Die Hemmstofftest-Methode ist ein kostengünstiges, schnell und relativ unkompliziert durchführbares Testverfahren.

Aufgrund der weitestgehend positiven Ergebnisse erwies sich die Methode im Rahmen der vorliegenden Arbeit als geeignet für die Überprüfung von Verderbsbakterien hinsichtlich ihres Antibiotikaresistenzverhaltens.

Die untersuchten Bakterienarten favorisieren ähnliche Wachstumsbedingungen, sodass die angepasste Methode in unveränderter Form bei allen Isolaten durchgeführt werden konnte. Weil die anfänglichen Tests teils in Form von Probeversuchen zur optimalen Anpassung der Methode an die vorliegenden Bedingungen durchgeführt wurden, hatten sich bezüglich der Anzahl an Parallelbestimmungen für jedes einzelne Isolat leichte Unterschiede ergeben. Zur Ermittlung vergleichbarer und reproduzierbarer Daten sollte in zukünftigen Testreihen die Anzahl an Parallelbestimmungen bei jedem Isolat gleich sein.

Allerdings ist die Ergebnisaussagekraft eines Hemmstofftests beschränkt. Es lässt sich lediglich sagen, ob eine Unempfindlichkeit gegenüber dem jeweiligen Antibiotikum bei der definierten Konzentration vorliegt oder nicht. Ob eine Resistenz bei allen Konzentrationen des Wirkstoffs zu erwarten ist bzw. ab welcher Konzentration eine potentielle Empfindlichkeit zu erwarten wäre, kann mit dem Test im Falle einer vorliegenden Resistenz nicht wiedergegeben werden. Gleichzeitig lässt sich nicht beurteilen, ob im Falle einer Empfindlichkeit bei Erhöhung der Konzentration doch eine Resistenz vorliegen würde.

Diese wäre unter Umständen bei einer Konzentrationserhöhung von Gentamicin denkbar, da im Rahmen der durchgeführten Gentamicinresistenz-Tests die Hemmhofdurchmesser im Durchschnitt nur bei 3 mm lagen und damit nicht besonders groß waren.

Für die untersuchten Fischverderbsbakterien gibt es nach der Durchführungsvorschrift M42-P des CLSI keine Grenzwerte zur Klassifizierung der Antibiotikaempfindlichkeiten in die Stufen ‚sensibel‘, ‚intermediär‘ und ‚resistent‘ (KRONTHALER 2009, VON CZAPIEWSKI 2010), sodass sich die ermittelten Hemmhofgrößen ausgehend von den jeweiligen Wirkstoffkonzentrationen nicht kategorisieren lassen.

Als weiterführende Ergänzung der vorliegenden Untersuchung würde sich die Bestimmung der MHK anbieten. Dabei wird die niedrigste Wirkstoffkonzentration ermittelt, die ein Bakterienwachstum -makroskopisch betrachtet- gerade noch hemmt (VON CZAPIEWSKI 2010). Konzentrationen unter der MHK würden Resistenz bedeuten.

Da von einigen Bakterienarten nur ein Isolat identifiziert aber als resistent bewertet wurde, besteht hierbei weiterführender Untersuchungsbedarf zur Stärkung der Aussagekraft. Daneben würde sich eine Methodenkontrolle mittels Kontrollstämmen anbieten, ist aber in diesem Fall aufgrund vorliegender Empfindlichkeiten neben Resistenzen nicht zwingend erforderlich.

Zur endgültigen Absicherung der Ergebnisse eignen sich molekularbiologische Untersuchungen der Isolate, da tatsächlich resistente Stämme das entsprechende Resistenzgen aufweisen sollten.

5.3 Schlussfolgerung und Bedeutung für den Menschen

Aquakulturen sind „Resistenzpools“ mit offenen Systemen (VON CZAPIEWSKI 2010). Von den Antibiotika, mit denen in der Fischzucht therapiert wird, gehen etwa 80 % über das Wasser und den Boden in die Umwelt über (CABELLO et al. 2013). Dort bleiben die Wirkstoffe weiterhin aktiv und führen zur Selektion entsprechend resistenter Umweltbakterien. Daneben werden die resistenten Bakterien in umliegende Regionen abgeschwemmt (CABELLO et al. 2013).

Der vom Fisch ausgehende Eintrag in die Umwelt erfolgt entweder in unresorbierter Form über Faeces oder im Anschluss an eine Absorption über Sekretion (BJÖRKLUND et al. 1990, HEKTOEN et al. 1995, CAPONE et al. 1996, BURKA et al. 1997, LE & MUNEKAGE 2004, ARMSTRONG et al. 2005, SØRUM 2006).

In häufigen Fällen nehmen kranke Fische Antibiotika nur unvollständig auf, wodurch die suboptimale verbleibende Wirkstoffkonzentration zur Resistenzentwicklung bei den vorliegenden Bakterien beitragen kann (VON CZAPIEWSKI 2010).

Durch das Aufkommen von Resistenzen bei Fischpathogenen wird der prophylaktische Einsatz von potenten Antibiotika in der Aquakultur uneffektiv (L'ABEE-LUND & SØRUM 2001, SØRUM 2006). Gleichzeitig besteht die Gefahr der Übertragung sowohl der resistenten Bakterien selbst als auch derer Resistenzdeterminanten auf Bakterien bzw. Pathogene von anderen lebensmittelliefernden Tieren und Menschen (CABELLO 2006).

Das Resistenzproblem erstreckt sich dadurch über die Aquakultur und die aquatische Umwelt in den Agrarbereich, terrestrischen Tierbereich und über die Lebensmittelverarbeitung bis hin zum Menschen als Verbraucher und Patient.

Wenn fakultativ pathogene bzw. humanpathogene Bakterien, die gegen humanmedizinisch relevante Antibiotika resistent reagieren, durch eine Infektion, orale Aufnahme oder Kontaktkontamination auf den Menschen übertragen werden, wird eine Abtötung der Pathogene im Sinne einer herkömmlichen Antibiotikatherapie zu einer Herausforderung.

Um Rückschlüsse auf das Resistenzverhalten einer gesamten Wirkstoffklasse zu ziehen, genügt es, das Isolat auf eine einzige Vertretersubstanz hinsichtlich der Empfindlichkeit zu überprüfen (WERCKENTHIN et al. 2005). Das im Rahmen der Arbeit festgestellte auffällige Ampicillin-Resistenzverhalten der Pseudomonaden lässt also darauf zurückschließen, dass die Isolate auch gegenüber anderen β -Lactamen ein ausgeprägtes Resistenzverhalten aufweisen.

Darüber hinaus wird anhand der Hemmstofftestergebnisse der Trimethoprimresistenz-Untersuchungen deutlich, dass die therapeutische Verlässlichkeit des in deutschen Aquakulturen gängigen Wirkstoffs Trimethoprim stark nachgelassen hat.

Weiterhin legen die Untersuchungsergebnisse eine hohe Resistenzrate bei den *Pseudomonas* Isolaten dar. Ein Großteil der untersuchten *Pseudomonaden* weist sogar Mehrfachresistenzen in Form einer gleichzeitigen Unempfindlichkeit gegenüber Ampicillin, Trimethoprim und Erythromycin auf.

Pseudomonaden haben ein unkalkulierbares Resistenzverhalten, weswegen *Pseudomonas*-Infektionen –vor allem bei einer vorliegenden Multiresistenz- mittels antibiotischer Therapie schwer zu beherrschen sind.

Eine besonders gefährdete Verbrauchergruppe ist hierbei die Risikogruppe der YOPIS („Young“-„Old“-„Pregnant“-„Immunosuppressed“). Aufgrund des abgeschwächten Immunsystems würde eine entsprechende Infektion mit resistenten pathogenen Bakterien eine gesundheitskritische Situation im Sinne einer Verbreitung und Selektion der resistenten Pathogene im Körper darstellen, wenn das eingesetzte Antibiotikum nicht mehr wirkt.

Die Resistenzproblematik spielt nicht nur für die Risikogruppe in medizinischer Hinsicht eine Rolle sondern auch für jeden einzelnen Verbraucher. Aufgrund der extrem hohen Anzahl enthaltener Resistenzkeime, sollte bei der Fischzubereitung immer auf ein striktes Durcherhitzen des Lebensmittels zur Vermeidung der Aufnahme resistenter Bakterien geachtet werden. Bei der Lagerung von Fisch als Lebensmittel stellt insbesondere der Kühlschrank eine potentielle Gefahrenzone für die Übertragung resistenter Keime auf andere Lebensmittel dar. Eine unsachgemäße Fischlagerung kann schnell zu einer Kreuzkontamination führen, die insbesondere dann problematisch ist, wenn die Keimübertragung auf roh verzehrbare Lebensmittel erfolgt.

Aus der vorliegenden Untersuchung hatte sich ergeben, dass resistente Keime sowohl auf der Hautoberfläche als auch im Filet gefunden wurden.

Bei den im Rahmen der Arbeit untersuchten Bakteriengattungen *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Moraxella* und *Shewanella* handelt es sich um natürlich vorkommende Umweltbakterien, sodass deren nachgewiesenen Resistenzen zu einer vermehrten Selektion resistenter Bakterien in der gesamten Umwelt führen können.

Daneben ist die Resistenzentwicklung bedingt durch die gute Anpassungsfähigkeit von Bakterien ein unvorhersehbarer aber zu erwartender Prozess.

Aus den Ergebnissen lässt sich herleiten, dass die bakterielle Resistenzproblematik in der Aquakultur und der aquatischen Umwelt sowohl in nationalen als auch in internationalen Fischzuchtbetrieben eine Bedeutung hat.

Eine Regulierung und Standardisierung des Antibiotikaeinsatzes, Maßnahmen zur Verbesserung der hygienischen Bedingungen und der Einsatz von Impfstoffen haben in entwickelten Ländern gezeigt, dass ein exzessiver Antibiotikaeinsatz für eine produktive Aquakultur nicht notwendig ist (GRAVE et al. 1996, MARKESTAD & GRAVE 1997, GRAVE et al. 1999, LILLEHAUG et al. 2003, SØRUM 2006).

Daneben kann als alternative Anwendung das Aufsalzen des Wassers zur Hemmung bakteriellen Wachstums beitragen (VON CZAPIEWSKI 2010).

Im Jahr 2011 waren laut BLE und Statistischem Bundesamt rund 89 % der auf dem deutschen Markt angebotenen Fische und Fischerzeugnisse importiert worden.

Weil sich die Versorgung hierzulande größtenteils auf eingeführte Erzeugnisse stützt, ist die Regulierung des Antibiotikaeinsatzes in Aquakulturen exportierender Ländern umso wichtiger zur Eindämmung des Resistenzproblems und damit auch zur Sicherstellung des Verbraucherschutzes in Deutschland.

Anhang I: Nährmedien und Chemikalien

Tabelle 7: Zusammensetzung der Verdünnungslösung

	g/500 mL destilliertes Wasser
NaCl	4,25
Pepton aus Fleisch ¹	0,5

Tabelle 8: Zusammensetzung des Standard-I-Eisenagars

	g/500 mL destilliertes Wasser
Standard-I-Nähragar ¹	18,5
Pepton	7,5 g
Hefeextrakt	1,5 g
NaCl	3,0 g
D(+)-Glucose	0,5 g
Agar-Agar	6,0 g
Natriumthiosulfat-Pentahydrat ¹	0,24
Eisen-III-Citrat-Hydrat ²	0,15

Tabelle 9: Zusammensetzung der Standard-I-Nährbouillon¹

	g/ 500mL destilliertes Wasser
Pepton	7,5
Hefeextrakt	1,5
NaCl	3
D(+)-Glucose	0,5

Tabelle 10: Zusammensetzung des Antibiotika-Agars³

	g/ 500 mL destilliertes Wasser
Pepton aus Fleisch	3
Pepton aus Casein	2
Hefeextrakt	1,5
Fleischextrakt	0,75
Dextrose	0,5
Agar	7,5

Tabelle 11: Zusammensetzung des Agarosegels

TAE-Puffer	80 mL
Agarose	1,6 g

¹ industriell hergestellt von der Firma Merck (Sitz: Darmstadt)

² industriell hergestellt von der Firma AppliChem (Sitz: Darmstadt)

³ industriell hergestellt von der Firma Fluka (Sitz: Buchs)

Anhang II: Herkunft der Isolate und Testanzahl

Tabelle 12: Anzahl identifizierter Isolate der jeweiligen Bakterienart in den einzelnen Fischproben

Bakterienart	Herkunft							
	Probe 1	Probe 2A	Probe 3A	Probe 4A	Probe 4B	Probe 5A	Probe 5B	Probe 6
<i>A. hydrophila</i>	1		1					
<i>A. salmonicida</i>	1				1			2
<i>Ach. xylooxidans</i>					1			
<i>P. acidovorans</i>				1				
<i>P. aerogenes</i>		1						
<i>Moraxella spp.</i>				3	1		1	
<i>P. alcaligenes</i>		1						
<i>P. fluorescens</i>	4		1	1	1	3	4	3
<i>P. putida</i>	4					1	2	1
<i>P. stutzeri</i>	1							
<i>Past. trehalosi</i>							1	
<i>Ser. marcescens</i>		1						
<i>Sh. baltica</i>	5	2						
<i>Sh. putrefaciens</i>	2	3						1
Gesamtanzahl	18	8	2	5	4	4	8	7

Probe 1 : Welsfilet (TOOM-Markt)	Probe 4 : Regenbogenforelle (Wochenmarkt)	A : Haut B : Filet
Probe 2 : Regenbogenforelle (EKZ Mercado)	Probe 5 : Saibling (TOOM-Markt)	
Probe 3 : Regenbogenforelle (TOOM-Markt)	Probe 6 : Rotbarschfilet (TOOM-Markt)	

Tabelle 13: Anzahl an Hemmstofftests mit den ausgewählten Wirkstoffen

	Anzahl an Isolaten	Anzahl an AMP-Tests	Anzahl an TM-Tests	Anzahl an ERY-Tests	Anzahl an TET-Tests	Anzahl an GENT-Tests
<i>A. hydrophila</i>	2	2	2	7	2	3
<i>A. salmonicida</i>	4	12	10	7	7	7
<i>Ach. xylooxidans</i>	1	3	3	2	2	2
<i>Delf. acidovorans</i>	1	3	3	2	2	2
<i>E. aerogenes</i>	1	1	1	1	1	1
<i>Moraxella spp.</i>	5	10	11	11	10	10
<i>P. alcaligenes</i>	1	1	1	4	1	1
<i>P. fluorescens</i>	17	31	31	34	29	35
<i>P. putida</i>	8	17	14	16	12	12
<i>P. stutzeri</i>	1	1	1	1	1	1
<i>Past. trehalosi</i>	1	2	2	2	2	2
<i>Ser. marcescens</i>	1	1	1	1	1	1
<i>Sh. baltica</i>	7	12	8	7	7	7
<i>Sh. putrefaciens</i>	6	8	11	7	7	7
Gesamtanzahl	56	104	99	102	84	91

Anhang III: Ergebnisse der Hemmstofftests vom 04.07.2013 bis zum 11.10.2013

Isolat/ Probencode	Identifizierte Bakterienart	Hemmhofdurchmesser der Antibiotikaplättchen (nach 24 Std)				
		AMP in mm	TM in mm	ERY in mm	TET in mm	GENT in mm
		(10µg/PL)	(5µg/PL)	(15µg/PL)	(10µg/PL)	(10µg/PL)
W8 (1.Platte)	<i>A. hydrophila</i>	---	3	2	(7)	3
W8 (2.Platte,1.Plättchen)	<i>A. hydrophila</i>			1		
W8 (2.Platte,2.Plättchen)	<i>A. hydrophila</i>			1		
W8 (2.Platte,3.Plättchen)	<i>A. hydrophila</i>			1		
F2-1 (1.Platte)	<i>A. hydrophila</i>	---	4	2	8	2
F2-1 (2.Platte,1.Plättchen)	<i>A. hydrophila</i>			1,5		1,5
F2-1 (2.Platte,2.Plättchen)	<i>A. hydrophila</i>			1,5		
W1 (1.Platte)	<i>A. salmonicida</i>	---	9	6	9	4
W1 (2.Platte,1.Plättchen)	<i>A. salmonicida</i>	1				
W1 (2.Platte,2.Plättchen)	<i>A. salmonicida</i>	1				
W1 (2.Platte,3.Plättchen)	<i>A. salmonicida</i>	---				
F3-8 (1.Platte)	<i>A. salmonicida</i>	2	10	9	11	4
F3-8 (2.Platte)	<i>A. salmonicida</i>	2	9	9	11	4
F3-8 (3.Platte)	<i>A. salmonicida</i>	3	9			
R1 (1.Platte)	<i>A. salmonicida</i>	(1)	(6)	6	5,5	3
R1 (2.Platte)	<i>A. salmonicida</i>	(1)	(5)	5	5,5	3
R1 (3.Platte)	<i>A. salmonicida</i>	(0,5)	5			
R7 (1.Platte)	<i>A. salmonicida</i>	---	(9)	5	4	3
R7 (2.Patte)	<i>A. salmonicida</i>	---	(10)	5	4	3
R7 (3.Patte)	<i>A. salmonicida</i>		(0,5)			

Isolat/ Probencode	Identifizierte Art	AMP	TM	ERY	TET	GENT
F3-9 (1.Platte)	<i>Ach. xylosoxidans</i>	---	---	---	4	3,5
F3-9 (2.Platte)	<i>Ach. xylosoxidans</i>	---	---	---	4	3,5
F3-9 (3.Platte)	<i>Ach. xylosoxidans</i>	---	---			
F3-1(1.Platte)	<i>Delf. acidovorans</i>	---	3	4	3	2
F3-1(2.Platte)	<i>Delf. acidovorans</i>	---	3	4	2	2
F3-1(3.Platte)	<i>Delf. acidovorans</i>	---	3			
F1-6	<i>E. aerogenes</i>	3	5	---	4	4
F3-2 (1.Platte)	<i>Moraxella spp.</i>	10	(2)	6	7	5,5
F3-2 (2.Platte)	<i>Moraxella spp.</i>	10	3	6	7	5,5
F3-4 (1.Platte)	<i>Moraxella spp.</i>	14	---	7	8	5
F3-4 (2.Platte)	<i>Moraxella spp.</i>	14	---	7	8	5,5
F3-5 (1.Platte)	<i>Moraxella spp.</i>	10	---	4	4,5	5,5
F3-5 (2.Platte)	<i>Moraxella spp.</i>	10	---	4	4,5	5,5
F3-7 (1.Platte)	<i>Moraxella spp.</i>	11	n.a.	7	6	5,5
F3-7 (2.Platte)	<i>Moraxella spp.</i>	11	n.a.	7	6	5,5
S13 (1.Platte)	<i>Moraxella spp.</i>	2,5	---	(4)	3,5	3,5
S13 (2.Platte)	<i>Moraxella spp.</i>	3	---	(4)	3,5	4
S13 (3.Platte)	<i>Moraxella spp.</i>		n.a.	(5)		
W4 (1.Platte)	<i>P. fluorescens</i>	---	---	2	6	3
W4 (2.Platte,1.Plättchen)	<i>P. fluorescens</i>			2		
W4 (2.Platte,2.Plättchen)	<i>P. fluorescens</i>			2		
W4 (2.Platte,3.Plättchen)	<i>P. fluorescens</i>			2		
W15 (1.Platte)	<i>P. fluorescens</i>	---	---	---	3	2

Isolat/ Probencode	Identifizierte Art	AMP	TM	ERY	TET	GENT
W15 (2.Platte,1.Plättchen)	<i>P. fluorescens</i>					2
W15 (2.Platte,2.Plättchen)	<i>P. fluorescens</i>					2
W15 (2.Platte,3.Plättchen)	<i>P. fluorescens</i>					2
W16	<i>P. fluorescens</i>	---	---	---	8	3
W19	<i>P. fluorescens</i>	---	---	---	5	3
F2-2 (1.Platte)	<i>P. fluorescens</i>	---	---	---	3	2
F2-2 (2.Platte,1.Plättchen)	<i>P. fluorescens</i>					1
F2-2 (2.Platte,2.Plättchen)	<i>P. fluorescens</i>					1
F2-2 (2.Platte,3.Plättchen)	<i>P. fluorescens</i>					1
F3-3 (1.Platte)	<i>P. fluorescens</i>	---	---	1,5	6	3
F3-3 (2.Platte)	<i>P. fluorescens</i>	---	---	1,5	6	3
F3-3 (3.Platte)	<i>P. fluorescens</i>	---	---			
F3-6 (1.Platte)	<i>P. fluorescens</i>	---	---	2	4,5	1,5
F3-6 (2.Platte)	<i>P. fluorescens</i>	---	---	2	4,5	2
F3-6 (3.Platte)	<i>P. fluorescens</i>	---	---			
S2 (1.Platte)	<i>P. fluorescens</i>	---	---	---	3	3
S2 (2.Platte)	<i>P. fluorescens</i>	---	---	---	3	3
S3 (1.Platte)	<i>P. fluorescens</i>	---	---	---	3	2
S3 (2.Platte)	<i>P. fluorescens</i>	---	---	---	3,5	2
S4 (1.Platte)	<i>P. fluorescens</i>	---	---	(1)	6	3,5
S4 (2.Platte)	<i>P. fluorescens</i>	---	---	(1)	6	3,5
S4 (3.Platte)	<i>P. fluorescens</i>			(0,5)		
S7 (1.Platte)	<i>P. fluorescens</i>	---	---	---	6	3
S7 (2.Platte)	<i>P. fluorescens</i>	---	---	---	6	3
S8 (1.Platte)	<i>P. fluorescens</i>	---	---	---	5	3
S8 (2.Platte)	<i>P. fluorescens</i>	---	---	---	6	2

Isolat/ Probencode	Identifizierte Art	AMP	TM	ERY	TET	GENT
S9 (1.Platte)	<i>P. fluorescens</i>	---	---	---	3	1,5
S9 (2.Platte)	<i>P. fluorescens</i>	---	---	---	3	1,5
S12 (1.Platte)	<i>P. fluorescens</i>	---	---	---	2	1,5
S12 (2.Platte)	<i>P. fluorescens</i>	---	---	---	2	1
R4 (1.Platte)	<i>P. fluorescens</i>	---	---	---	4	2
R4 (2.Platte)	<i>P. fluorescens</i>	---	---	---	4	2
R5 (1.Platte)	<i>P. fluorescens</i>	---	---	(1)	5,5	4
R5 (2.Platte)	<i>P. fluorescens</i>	---	---	(2)	5	3,5
R5 (3.Platte)	<i>P. fluorescens</i>			(0,5)		
R6 (1.Platte)	<i>P. fluorescens</i>	---	---	---	3,5	2
R6 (2.Platte)	<i>P. fluorescens</i>	---	---	---	3,5	2
W						
W2	<i>P. putida</i>	---	---	---	6	3
W7 (1.Platte)	<i>P. putida</i>	(---)	---	---	7	3
W7 (2.Platte,1.Plättchen)	<i>P. putida</i>	---				
W7 (2.Platte,2.Plättchen)	<i>P. putida</i>	---				
W7 (2.Platte,3.Plättchen)	<i>P. putida</i>	---				
W17	<i>P. putida</i>	1	(2)	---	10	3
W17 (2.Platte,1.Plättchen)	<i>P. putida</i>	2	2			
W17 (2.Platte,2.Plättchen)	<i>P. putida</i>	2				
W18	<i>P. putida</i>	---	---	---	9	3
S1 (1.Platte)	<i>P. putida</i>	---	---	(---)	5,5	3,5
S1 (2.Platte)	<i>P. putida</i>	---	---	(---)	6	3,5
S1 (3.Platte)	<i>P. putida</i>			(0,5)		
S10 (1.Platte)	<i>P. putida</i>	---	---	(---)	5	3
S10 (2.Platte)	<i>P. putida</i>	---	---	(---)	5,5	4

Isolat/ Probencode	Identifizierte Art	AMP	TM	ERY	TET	GENT
S10 (3.Platte)	<i>P. putida</i>			2		
S11 (1.Platte)	<i>P. putida</i>	---	---	(---)	4,5	3
S11 (2.Platte)	<i>P. putida</i>	---	---	(---)	5,5	3
S11 (3.Platte)	<i>P. putida</i>			(0,5)		
R3 (1.Platte)	<i>P. putida</i>	---	(---)	(2)	6	3,5
R3 (2.Platte)	<i>P. putida</i>	---	(---)	(2)	6	3,5
R3 (3.Platte)	<i>P. putida</i>		---	3,5		
 						
F1-7 (1.Platte)	<i>P. alcaligenes</i>	7	---	2	6	3
F1-7 (2.Platte,1.Plättchen)	<i>P. alcaligenes</i>			2		
F1-7 (2.Platte,2.Plättchen)	<i>P. alcaligenes</i>			2		
F1-7 (2.Platte,3.Plättchen)	<i>P. alcaligenes</i>			2		
 						
W12	<i>P. stutzeri</i>	---	---	---	2	3
 						
S5 (1.Platte)	<i>Past. trehalosi</i>	11	14	14	7	5
S5 (2.Platte)	<i>Past. trehalosi</i>	11	14	13	7	4
 						
F1-5	<i>Ser. marcescens</i>	5	5	6	8	4
 						
W3	<i>Sh. baltica</i>	3	6	6	8	4
W5 (1.Platte)	<i>Sh. baltica</i>	(1)	(2)	6	8	4
W5 (2.Platte,1.Plättchen)	<i>Sh. baltica</i>	---	5			
W5 (2.Platte,2.Plättchen)	<i>Sh. baltica</i>	---				
W9	<i>Sh. baltica</i>	5	---	6	8	4
W11 (1.Platte)	<i>Sh. baltica</i>	(2)	11*	8	9	3
W11 (2.Platte,1.Plättchen)	<i>Sh. baltica</i>	---				

Isolat/ Probencode	Identifizierte BA	AMP	TM	ERY	TET	GENT
W11 (2.Platte,2.Plättchen)	<i>Sh. baltica</i>	---				
W11 (2.Platte,3.Plättchen)	<i>Sh. baltica</i>	---				
W13	<i>Sh. baltica</i>	8	10*	9	8	3
F1-1	<i>Sh. baltica</i>	7	11	8	9	4
F1-8	<i>Sh. baltica</i>	8*	10*	10*	13*	4*
W6	<i>Sh. putrefaciens</i>	5	11	9	9	3
W10	<i>Sh. putrefaciens</i>	4	11	6	6	3
F1-2 (1.Platte)	<i>Sh. putrefaciens</i>	3	(2)	10	8	4
F1-2 (2.Platte,1.Plättchen)	<i>Sh. putrefaciens</i>		4			
F1-2 (2.Platte,2.Plättchen)	<i>Sh. putrefaciens</i>		4			
F1-2 (2.Platte,3.Plättchen)	<i>Sh. putrefaciens</i>		5			
F1-3	<i>Sh. putrefaciens</i>	3	7	6	9	3
F1-4	<i>Sh. putrefaciens</i>	5	5	(8)	12*	3*
R2 (1.Platte)	<i>Sh. putrefaciens</i>	---	(10)	5	5	3,5
R2 (2.Platte)	<i>Sh. putrefaciens</i>	---	(8)	5	5	3,5
R2 (3.Platte)	<i>Sh. putrefaciens</i>	---	(10)			

Symbole:

AMP : Ampicillin		: kein Test	n.a. : nicht auswertbar	S : Saibling
TM : Trimethoprim	PL	: Plättchen Antibiotikum	W : Wels	R : Rotbarsch
ERY : Erythromycin	---	: kein Hof	F1 : Forelle, Mercado	
TET : Tetracyclin	()	: schwache, nicht ganz klare Hofbildung	F2 : Forelle, TOOM	
GENT : Gentamicin	*	: Einzelkolonien auf dem Hof/ am Hofrand	F3 : Forelle, Wochenmarkt	

Anhang IV: Statistische Auswertung

Tabelle 14: Pseudomonaden

Probe/Isolat	AMP*	TM*	ERY*	TET*	GENT*
W2	0	0	0	6	3
W7	0	0	0	7	3
W17	2	2	0	10	3
W18	0	0	0	6	3,5
S1	0	0	0	6	3,5
S10	0	0	0	5,3	3,5
S11	0	0	0	5	3
R3	0	0	2	6	3,5
W4	0	0	2	6	3
W15	0	0	0	3	2
W16	0	0	0	8	3
W19	0	0	0	5	3
F2-2	0	0	0	3	1
F3-3	0	0	1,5	6	3
F3-6	0	0	2	4,5	1,8
S2	0	0	0	3	3
S3	0	0	0	3,3	2
S4	0	0	1	6	3,5
S7	0	0	0	6	3
S8	0	0	0	5,5	2,5
S9	0	0	0	3	1,5
S12	0	0	0	2	1,3
R4	0	0	0	4	2
R5	0	0	1	5,3	3,8
R6	0	0	0	3,5	2
Median	0	0	0	5,3	3
Mittelwert	0,1	0,1	0,4	5,1	2,7
Standardabw.	0,4	0,4	0,7	1,8	0,8

*Alle Tabellenwerte sind in mm angegeben und stellen die gemessene bzw. ermittelte Größe des Hemmhofdurchmessers des jeweiligen Antibiotikums dar.

Tabelle 15: Aeromonaden

Probe/Isolat	AMP*	TM*	ERY*	TET*	GENT*
W8	0	3	1	7	3
F2-1	0	4	1,5	8	1,8
W1	0,5	9	6	9	4
F3-8	2	9	9	11	4
R1	1	5	5,5	5,5	3
R7	0	9	5	4	3
Median	0,3	7	5,3	7,5	3
Mittelwert	0,6	6,5	4,7	7,4	3,1
Standardabw.	0,8	2,8	3,0	2,5	0,8

Tabelle 16: Moraxellen

Probe/Isolat	AMP*	TM*	ERY*	TET*	GENT*
F3-2	10	2,5	6	7	5,5
F3-4	14	0	7	8	5,3
F3-5	10	0	4	4,5	5,5
F3-7	11	n.a.	7	6	5,5
S13	2,8	0	4	3,5	3,8
Median	10,0	0,0	6,0	6,0	5,5
Mittelwert	9,6	0,6	5,6	5,8	5,1
Standardabw.	4,1	1,3	1,5	1,8	0,8

Tabelle 17: Shewanellen

Probe/Isolat	AMP*	TM*	ERY*	TET*	GENT*
W3	3	6	6	8	4
W5	0	3,5	6	8	4
W9	5	0	6	8	4
W11	0	11	8	9	3
W13	8	10	9	8	3
F1-1	7	11	8	9	4
F1-8	8	10	10	3	4
W6	5	11	9	9	3
W10	4	11	6	6	3
F1-2	3	4	10	8	4
F1-3	3	7	6	9	3
F1-4	5	5	8	12	3
R2	0	10	5	5	3,5
Median	4	10	8	8	3,5
Mittelwert	3,9	7,7	7,5	7,8	3,5
Standardabw.	2,8	3,7	1,7	2,2	0,5

Literaturverzeichnis

ADREMONT, A., CORPET, D., COURVALIN, P. (1997). Antibiotikaresistenz. Spektrum der Wissenschaft, S. 50-57

ALEXY, R. (2003). Antibiotika in der aquatischen Umwelt: Eintrag, Elimination und Wirkung auf Bakterien. Freiburg: Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

ALTINOK, I., KAYIS, S., CAPKIN, E. (2006). *Pseudomonas putida* infection in rainbow trout, in: *Aquaculture*, Vol. 261, S. 850-855

ALTWEGG, M. (1999). Aeromonas and Plesiomonas, in: *Manual of Clinical Microbiology*, Vol. 7. Washington DC, USA: American Society for Microbiology, S. 507-516

AMG. Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln - Arzneimittelgesetz (2013).

URL: http://www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/amg_1976/gesamt.pdf.

Stand: 06.01.2014

ARMSTRONG, S. M., HARGRAVE, B. T., HAYA, K. (2005). Antibiotic use in finfish aquaculture: modes of action, environmental fate and microbial resistance, in: *Handbook of Environmental Chemistry*, Vol. 5M, S. 341-357

AUSTIN, B., ADAMS, C. (1996). The Genus Aeromonas. Chichester, UK: John Wiley & Sons, S. 197-244

BARTON, B. A., IWAMA, G. K. (1991). Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids, in: *Annual Review of Fish Diseases*, Vol. 1, S. 3-26

BAUMGART, J. (2001). Mikrobiologische Untersuchungen von Lebensmitteln. Hamburg: Behr's Verlag

BENDIX, A. (2003). Entwicklung einer Methode zum Nachweis von Rückständen ausgewählter Antibiotika und Chemotherapeutika in Hühnereiern mittels mikrobiologischem Hemmstofftest. Hannover: Tierärztliche Hochschule Hannover

BJÖRKLUND, H., BONDESTAM, J., BYLUND, G. (1990). Residues of oxytetracycline in wild fish and sediments from fish farms, in: *Aquaculture*, Vol. 86, S. 359-367

BLE. Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (2004). Ökologische Fischproduktion: Struktur, Entwicklung, Probleme, politischer Handlungsbedarf. URL: <http://orgprints.org/4200/1/4200-02OE314-ble-naturland-2004-status-fisch.pdf>. Stand: 09.01.2014

BMELV. Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft & Verbraucherschutz (2013). Entwicklung einer nachhaltigen Aquakultur in Deutschland. Deutscher Bundestag. URL: <http://dip21.bundestag.de/dip21/btd/17/144/1714485.pdf>. Stand: 06.01.2014

BMG, BMELV, BMBF (2011). DART - Deutsche Antibiotika-Resistenzstrategie. URL: http://www.bmg.bund.de/fileadmin/dateien/Publikationen/Gesundheit/Sonstiges/Bericht_DART_Deutsche_Antibiotika-Resistenzstrategie.pdf. Stand: 06.01.2014

BSAC. British Society for Antimicrobial Chemotherapy (2013). BSAC Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing, URL: http://bsac.org.uk/wp-content/uploads/2012/02/Version-12-Apr-2013_final.pdf. Stand: 09.01.2014

BURKA, J. F., HAMMELL, K. L., HORSBERG, T. E., JOHNSON, G. R., RAINNIE, D. J., SPEARE, D. J. (1997). Drugs in salmonid aquaculture - a review, in: *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, Vol. 20, S. 333-349

BVL (2012). Berichte zur Resistenzmonitoringstudie 2009: Resistenzsituation bei klinisch wichtigen tierpathogenen Bakterien, in: *BVL-Reporte*, Vol. 7, Nr. 2, S. 1

BVL (2013). Berichte zur Lebensmittelsicherheit 2011: Nationaler Rückstandskontrollplan (NRKP) und Einfuhrüberwachungsplanplan (EÜP), in: *BVL-Reporte*, Vol. 7, Nr. 8, S. 27

CABELLO, F. C. (2004). Antibiotics and aquaculture in Chile: implications for human and animal health, in: *Revista Medica de Chile*, Vol. 132, Nr. 8, S. 1001-1006

CABELLO, F. C. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment, in: *Environmental Microbiology*, Vol. 8, Nr. 7, S. 1137-1144

CABELLO, F. C., GODFREY, H. P., TOMOVA, A., IVANOVA, L., DÖLZ, H., MILLANAO, A., BUSCHMANN, A. H. (2013). Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health, in: *Environmental Microbiology*, Vol. 15, Nr. 7, S.1917-1942

CAPONE, D. G., WESTON, D. P., MILLER, V., SHOEMAKER, C. (1996). Antibacterial residues in marine sediments and invertebrates following chemotherapy in aquaculture, in: *Aquaculture*, Vol. 145, S. 55-75

CARPENTER, R. J., HARTZELL J., FORSBERG, J. A., BABEL, B. S., GANESAN, A., (2008). *Pseudomonas putida* war wound infection in a US marine: A case report and a review of the literature, in: *Journal of Infection*, Vol. 56, S. 234-240

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute (2006). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that grow Aerobically; Approved Standard - Seventh Edition, URL: <http://isoforlab.com/phocadownload/csli/M7-A7.pdf>. Stand: 09.01.2014

DARAI, G., HANDERMANN M., SONNTAG, H.-G., ZÖLLER, L. (2012). Lexikon der Infektionskrankheiten des Menschen: Erreger, Symptome, Diagnose, Therapie & Prophylaxe. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, Band 12, S. 806

ENRIGHT, M. C., MCKENZIE, H. (1997). Moraxella (Branhamella) catarrhalis - clinical and molecular aspects of a rediscovered pathogen, in: *Journal of Medical Microbiology*, Vol. 46, S. 360-371

EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2013). Handbuch - EUCAST Blättchendiffusionstest zur antimikrobiellen Empfindlichkeitstestung. URL: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/Germany/Handbuch_v_3.0_EUCAST_Disk_Test_final.pdf. Stand: 09.01.2014

FEUERPFEIL, I., LÓPEZ-PILA, J., SCHMIDT, R., SCHNEIDER, E., SZEWZYK, R. (1999). Antibiotikaresistente Bakterien und Antibiotika in der Umwelt, in: *Bundesgesundheitsblatt – Gesundheitsforschung – Gesundheitsschutz*, Vol. 42, Nr. 1, S. 37-50

FONNESBECH VOGEL, B., VENKATESVARAN, K., SATOMI, G., GRAM, L. (2005). Identification of *Shewanella baltica* as the most important H₂S-producing species during iced storage of Danish marine fish, in: *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 71, Nr. 11, S. 6689-6697

GERMAP 2010 (2011). Antibiotika-Resistenz und -Verbrauch: Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland. Rheinbach: Antiinfectives Intelligence Gesellschaft für klinisch-mikrobiologische Forschung und Kommunikation mbH, S. 24

GOLDBURG, R., NAYLOR, R. (2005). Future seascapes, fishing, and fish farming, in: *Frontiers in Ecology and the Environment*, Vol. 3, Nr. 1, S. 21-28

GOLDBURG, R. J., ELLIOTT M. S., NAYLOR, R. L. (2001). Marine Aquaculture in the United States: Environmental Impacts and Policy Options. Arlington, VA, USA: Pew Oceans Commission, S. 1-33

GRAVE, K., LINGAAS, E., BANGEN, M., RØNNING, M. (1999). Surveillance of the overall consumption of antibacterial drugs in humans, domestic animals and farmed fish in Norway in 1992 and 1996, in: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Vol. 43, S. 243-252

GRAVE, K., MARKESTAD, A., BANGEN, M. (1996). Comparison in prescribing patterns of antibacterial drugs in salmonid farming in Norway during the periods 1980-1988 and 1989-1994, in: *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, Vol. 19, S. 184-191

GÜNTHER, J., KERN, W. V., NINK, K., SCHRÖDER, H., DE WITH, K. (2003). Solange sie noch wirken... Kommentare und Analysen zum Antibiotikaverbrauch in Deutschland. Bonn & Freiburg: WIdO & Universitätsklinikum Freiburg

HEGGER-GRAVENHORST, C. (2012). Die Erfassung von Verbrauchsmengen für Antibiotika bei Lebensmittel liefernden Tieren vor dem Hintergrund der tierärztlichen Betreuung. Hannover: Tierärztliche Hochschule Hannover

HEKTOEN, H., BERGE, J. A., HORMAZABAL, V., YNDESTAD, M. (1995). Persistence of antibacterial agents in marine sediments, in: *Aquaculture*, Vol. 133, S. 175-184

HUOVINEN, P., SUNDSTRÖM, L., SWEDBURG, G., SKÖLD, O. (1995). Trimethoprim and sulphonamide resistance, in: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 39, S. 279-289

HUTHER, S. K. (2007). Zum Vorkommen von Antibiotika-resistenten Bakterien und ausgewählten Resistenzgenen in Fleisch. München: Ludwig-Maximilians-Universität

JACOBY, G. A. (2005). Mechanisms of Resistance to Quinolones, in: *Clinical Infectious Diseases*, Vol. 41, Nr. 2, S. 120-126

KAYSER, F. H., BÖTTGER, E. C., ZINKERNAGEL, R. M., HALLER, O., ECKERT, J., DEPLAZES, P. (2010). Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, Band 12, S. 292

KROKER, R., SCHERKL, R., UNGEMACH, F. R. (2002). Chemotherapie bakterieller Infektionen, in: *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*, Band 2. Stuttgart: Enke Verlag, S. 353-393

KRÖMKER, V. (2006). Kurzes Lehrbuch - Milchkunde und Milchhygiene. Stuttgart: Parey Verlag, Band 1, S. 131

KRONTHALER, F. X. (2009). Untersuchungen zur in-vitro-Antibiotikaempfindlichkeit aerober Bakterien beim Wirtschaftsgeflügel mittels Agardiffusionstest und Bouillon-Mikrodilutionsmethode. München: Ludwig-Maximilians-Universität

KÜSTER, A., LEHMANN, S., HEIN, A., SCHÖNFELD, J. (2013). Antibiotika in der Umwelt - Wirkung mit Nebenwirkung, in: *Umwelt & Mensch - Informationsdienst*, Vol. 1, S.18-28

KRÜGER, M. (2002). Allgemeine Bakteriologie, in: Medizinische Mikrobiologie - Infektions- und Seuchenlehre. Stuttgart: Enke Verlag

L'ABEE-LUND, T. M., SØRUM, H. (2001). Class 1 integrons mediate antibiotic resistance in the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* worldwide, in: *Microbial Drug Resistance*, Vol. 7, S. 263-272

LE, T. X., MUNEKAGE, Y. (2004). Residues of selected antibiotics in water and mud from shrimp ponds in mangrove areas in Viet Nam, in: *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 49, S. 922-929 S. 922-929

LFGB. Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch (2005). URL: <http://www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/lfgb/gesamt.pdf>. Stand: 06.01.2014

LILLEHAUG, A., LUNESTAD, B. T., GRAVE, K. (2003). Epidemiology of bacterial diseases in Norwegian aquaculture - a description based on antibiotic prescription data for the ten-year period 1991 to 2000, in: *Disease of Aquatic Organisms*, Vol. 53, S. 115-125

MARKESTAD, A., GRAVE, K. (1997). Reduction of antibacterial drug use in Norwegian fish farming due to vaccination, in: *Fish Vaccinol*, Vol. 90, S. 365-369

MCGUIRE, J. M., BUNCH, R. L., ANDERSON, R. C., BOAZ, H. E., FLYNN, E. H., POWELL, H. M., SMITH, J. W. (1952). [Ilotycin, a new antibiotic.], in: *Schweizerische Medizinische Wochenschrift*, Vol. 82, S. 1064-1065.

MEYER, C. (2006). Molekularbiologische Differenzierung von *Shewanella putrefaciens* und *Shewanella baltica* - Differentiation of *Shewanella putrefaciens* and *Shewanella baltica* by molecular-biological methods, in: Jahresbericht 2006 - Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, S. 86-87

MILLROSE, M. (2009). Die Wirkung verschiedener Makrolid-Antibiotika im Vergleich zu Quinupristin/Dalfopristin auf Endothelzellen *in vitro*. Berlin: Charité - Universitätsmedizin

NAYLOR, R., BURKE, M. (2005). Aquaculture and Ocean Resources: Raising Tigers of the Sea, in: *Annual Review of Environment and Resources*, Vol. 30, S. 185-218

NIELSEN, M. E., HOI, L., SCHMIDT A. S., QIAN, D., SHIMANDA, T., SHEN, J. Y., LARSEN, J. L. (2001). Is *Aeromonas hydrophila* the dominant motile *Aeromonas* species that causes disease outbreaks in aquaculture production in the Zhejiang province of Cina?, in: *Diseases of Aquatic Organisms*, Vol. 46, S. 23-29

NAYLOR, R. L., GOLDBURG, R. J., PRIMAVERA, J.H., KAUTSKY, N., BEVERIDGE M. C. M., CLAY, J., FOLKE, C., LUBCHENKO, J., MOONEY, H., TROELL, M. (2000). Effect of aquaculture on world fish supplies, in: *Nature*, Vol. 405, S. 1017-1024

NAYLOR, R. L., EAGLE, J., SMITH, W. L. (2003). Salmon aquaculture in the Pacific Northwest: A global industry with local impacts, in: *Environment*, Vol. 45, S. 18-39

SELBITZ H.J. (2007). Bakterielle Krankheiten der Tiere, in: Medizinische Mikrobiologie - Infektions- und Seuchenlehre, Band 8. Stuttgart: Enke Verlag, S.393-558

SCHMID, S. (2009). Agardiffusionstest - Arbeitsanleitung.
URL: <http://www.eduhi.at/dl/AGARDIFFUSIONSTEST.pdf>. Stand: 09.01.2014

SMOLOWITZ, R. (1998). *Pseudomonas putida* infections of the oyster toadfish (*Opsanus tau*), in: *The Biological Bulletin*, Vol. 195, S. 229-231

SØRUM, H. (2006). Antimicrobial drug resistance in fish pathogens, in: *Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin*. Washington DC, USA: American Society for Microbiology, S. 213-238

VAKULENKO, S. B., MOBASHERY, S. (2003). Versatility of aminoglycosides and prospects for their future, in: *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 16, S. 430-450

Verordnung (EG) Nr. 178/2002. Basis - VO (2002). URL: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2002R0178:20080325:de:PDF>. Stand: 06.01.2014

Verordnung (EG) Nr. 470/2009. Rückstandshöchstmengen-Verordnung (2009). URL: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:152:0011:0022:de:PDF>. Stand: 06.01.2014

Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 "zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs" (1990). URL: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1990R2377:20080816:DE:PDF>. Stand 06.01.2014

Verordnung über das datenbankgestützte Informationssystem über Medizinprodukte des Deutschen Instituts für Medizinische Dokumentation und Information - DIMDIV (2002). URL: <http://www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/dimdiv/gesamt.pdf>. Stand: 06.01.2014

Verordnung über Nachweispflichten der Tierhalter für Arzneimittel, die zur Anwendung bei Tieren bestimmt sind. Tierhalter-Arzneimittel-Nachweisverordnung (2006). URL: <http://www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/anthv/gesamt.pdf>. Stand: 06.01.2014

Verordnung über tierärztliche Hausapotheken - TÄHAV (2009). URL: http://www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/t_hav/gesamt.pdf. Stand: 01.06.2014

VON CZAPIEWSKI, E. (2010). Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen mit dem Verfahren der Bouillon-Mikrodilution bei pathogenen Bakterien von Fischen und molekulare Charakterisierung von Resistenzgenen. Hannover: Tierärztliche Hochschule Hannover

WEBER, H. (2003). Mikrobiologie der Lebensmittel/ Fleisch - Fisch - Feinkost. Hamburg: Behr's Verlag, Band 1, S. 685

WERCKENTHIN, C., BOTTNER, A., HAFEZ H. M., HARTMANN, K., KASKE, M., KEHRENBURG, C., KIETZMANN, M., KLARMANN, D., KLEIN, G., KRABISCH, P., KUHN, T., LUHOFER G., RICHTER, A., SCHULZ, B., SCHWARZ, S., SIGGE, C., TRAEGER, W., WALDMANN, K. H., WALLMANN, J. (2005). Kreuzresistenzen gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen in der Veterinärmedizin: Molekulare Grundlagen und praktische Bedeutung für die Empfindlichkeitsprüfung, in: *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift*, Vol. 118, S. 471-480

WERCKENTHIN C., SCHWARZ, S. (2003): Kreuzresistenzen: Beurteilung von Antibiogrammen, Auswahl von antimikrobiellen Wirkstoffen für die *in-vitro* Empfindlichkeitsprüfung und molekulare Grundlagen, in: Manuskript zur 22. Arbeits- und Fortbildungstagung Bakteriologie des Arbeitskreises Veterinärmedizinischer Infektionsdiagnostik (AVID) der DVG, Staffelstein, 17.-19.09.2003

WILKE (2000). Leitlinien für den sorgfältigen Umgang mit antimikrobiell wirksamen Tierarzneimitteln Stand: 1999, in: *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, Vol. 43, Nr. 3, S. 235-236

YOSHINO, Y., KITAZAWA, T., KAMIMURA, M., TATSUNO, K., OTA, Y., YOTSUYANAGI, H. (2010). *Pseudomonas putida* bacteremia in adult patients: five case reports and a review of the literature, in: *Journal of Infection & Chemotherapy*, Vol.17, Nr. 2, S. 278-282

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anzahl ausgewählter Isolate der entsprechenden Bakterienarten.....	21
Abbildung 2: Durchführung von Hemmstofftests.....	23
Abbildung 3: Platte ohne Hemmhofbildungen (links) im Vergleich zu einer Platte mit..... Hemmhöfen (rechts).....	25
Abbildung 4: Resistenzverhalten von <i>Aeromonas</i> Isolaten.....	27
Abbildung 5: Resistenzverhalten von <i>Moraxella</i> Isolaten.....	28
Abbildung 6: Resistenzverhalten von <i>Pseudomonas</i> Isolaten.....	28
Abbildung 7: Resistenzverhalten von <i>Shewanella</i> Isolaten.....	29
Abbildung 8: Gesamtanzahl resistenter Isolate gegenüber ausgewählten Antibiotika.....	29
Abbildung 9: Durchschnittswert, Standardabweichung und Median der Messwerte aus der AMP-, TM- und ERY-Empfindlichkeitsprüfung von Pseudomonaden.....	30
Abbildung 10: Verteilung der Messwerte aus der AMP-, TM- und ERY-..... Empfindlichkeitsprüfung von Shewanellen.....	32

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Informationen zu den Fischproben.....	18
Tabelle 2: PCR Ansatz.....	20
Tabelle 3: PCR Bedingungen.....	20
Tabelle 4: Verdau mit MspI und DdeI.....	21
Tabelle 5: Ansatz für eine Gelelektrophorese.....	21
Tabelle 6: Verwendete Antibiotikakonzentrationen.....	24
Tabelle 7: Zusammensetzung der Verdünnungslösung.....	38
Tabelle 8: Zusammensetzung des Standard-I-Eisenagars.....	38
Tabelle 9: Zusammensetzung der Standard-I-Nährbouillon.....	38
Tabelle 10: Zusammensetzung des Antibiotika-Agars.....	38
Tabelle 11: Zusammensetzung des Agarosegels.....	38
Tabelle 12: Anzahl identifizierter Isolate der jeweiligen Bakterienart in den einzelnen..... Fischproben.....	39
Tabelle 13: Anzahl an Hemmstofftests mit den ausgewählten Wirkstoffen.....	39
Tabelle 14: Pseudomonaden.....	46
Tabelle 15: Aeromonaden.....	47
Tabelle 16: Moraxellen.....	47
Tabelle 17: Shewanellen.....	47

ZUSAMMENFASSUNG

Um Daten zur aktuellen Antibiotikaresistenzlage von Verderbserregern aus Fischen der Aquakultur zu sammeln, wurden im Zeitraum vom Juli 2013 bis zum Oktober 2013 Hemmstofftests mit 56 bakteriellen Isolaten durchgeführt.

Die getesteten Bakterien wurden aus insgesamt sechs frischen Handelsproben isoliert, von denen fünf aus dem Süßwasser und eine aus dem Seewasser stammten. Primär analysiert wurden Bakteriengattungen, die öfter als einmal identifiziert wurden. Zur zentralen Untersuchungsgruppe gehörten 25 *Pseudomonas*-, sechs *Aeromonas*-, fünf *Moraxella*- und 13 *Shewanella*-Isolate. Geprüft wurde die Empfindlichkeit gegenüber definierten therapeutischen Konzentrationen der ausgewählten Antibiotika Ampicillin, Trimethoprim, Erythromycin, Tetracyclin und Gentamycin.

Die Hemmstofftest-Methode wurde bei jedem Isolat in übereinstimmender Form unter weitgehender Berücksichtigung der Vorschriften nach EUCAST-Standard durchgeführt. Zur Anpassung der Methode an das vorliegende bakterielle Spektrum und an die Inkubationsbedingungen wurde die Methode entsprechend optimiert. Als resistent wurde ein Isolat bei einer manuell gemessenen Hemmhofgröße von < 1mm bzw. 0 mm eingestuft.

Von den 56 Isolaten erwiesen sich etwa 63 % als ampicillin-, knapp 55 % als trimethoprim- und rund 40 % als erythromycinresistent. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung konnten weder Tetracyclin- noch Gentamycinresistenzen nachgewiesen werden. Ein Resistenzverhalten war vor allem bei den untersuchten Isolaten der Spezies *P. fluorescens* und *P. putida* im Ausmaß einer Multiresistenz zu erkennen. Abgesehen von einem einzigen *P. putida* Isolat zeigten sich fast alle 25 primär untersuchten Pseudomonaden unempfindlich gegenüber Ampicillin und Trimethoprim. Etwa Dreiviertel der Isolate wiesen zusätzlich eine Unempfindlichkeit gegenüber Erythromycin auf.

Für die Empfindlichkeitstestung fischtypischer Verderbserreger gegenüber therapeutisch relevanten Antibiotika hatte sich die Methode als geeignet festgestellt. Die Untersuchung ergab, dass die Verlässlichkeit des in Deutschland zugelassenen Wirkstoffes Trimethoprim zur Behandlung von Fischkrankheiten anzuzweifeln ist und dass Resistenzen nicht nur bei der großen Gruppe der Pseudomonaden sondern auch bei Aeromonaden sowie ansatzweise auch bei Moraxellen und Shewanellen von Bedeutung sind. Die Untersuchungsergebnisse verdeutlichen das expandierende Ausmaß der weltweiten Resistenzproblematik durch die vermehrte Selektion resistenter Umweltbakterien. Beobachtet wird dies vor allem in Bereichen, in denen Antibiotika verstärkt eingesetzt werden, was insbesondere für Aquakulturbetriebe zutrifft.

ABSTRACT

To obtain data relating to the current antibiotic resistance situation of spoilage bacteria from fish in aquaculture, disk diffusion tests had been conducted with 56 isolates during the period from July 2013 to October 2013.

The tested bacteria were isolated from six fish samples offered in fresh fish counters. Five samples originated from fresh water and one sample was a sea water fish. Genera of bacteria which were identified more than once were primarily analysed. The main tested group consisted of 25 *Pseudomonas*, six *Aeromonas*, five *Moraxella* and 13 *Shewanella* isolates. Defined therapeutic concentrations of the choosed antibiotics ampicillin, trimethoprim, erythromycin, tetracycline and gentamycin were used for the susceptibility testing.

By largely accounting the regulations of EUCAST-Standard the disk diffusion method was conducted with every isolate in the same way. Only an optimization was made to adjust the method to the available bacteria species and incubation conditions.

In cases in which the measured inhibition zone diameter was smaller than 1 mm or 0 mm the isolate was categorized as resistant.

On the whole about 63 % of the 56 isolates had been recognized as ampicillin resistant. 55 % had shown trimethoprim resistance and nearly 40 % were unsusceptible to erythromycin. There were no cases in which gentamycin or tetracycline resistance was detected. Especially isolates of the species *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* showed resistant behavior in form of multiresistance. Except for one single *P. putida* isolate nearly all primarily tested pseudomonads were ampicillin and trimethoprim resistant. About three-quarters of the isolates were erythromycin resistant in addition.

As the result of this study the method can be seen as appropriate relating to the antimicrobial susceptibility testing of fish-typical spoilage bacteria. The investigation points to the fact that the therapeutic reliability of trimethoprim permitted to be used against fish diseases in Germany decreases conspicuously. Besides, antibiotic resistance is not only an important issue in the big group of *Pseudomonas* but is noticed in the tests with *Aeromonas*, *Moraxella* and *Shewanella* as well.

The investigation results indicate the expanding extent of the worldwide antibiotic resistance problem due to the increasing selection of resistant, partly even multiresistant, environmental bacteria. This process is particularly of high relevance in areas where large amounts of antibiotics are used. The high number of resistant bacteria isolated from the tested fish species shows that antibiotics should be used in aquaculture more regulated.

Eidesstaatliche Erklärung

„Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit ohne fremde Hilfe selbständig verfasst und nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht.“

Hamburg, den _____
