

Aus dem Bundesinstitut für gesundheitlichen
Verbraucherschutz und Veterinärmedizin
und
dem Institut für Lebensmittelhygiene
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Isolation und Identifikation glykopeptidresistenter Enterokokkenspezies aus Mastgeflügel

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität

vorgelegt von
Petra Richter
Tierärztin aus Hamburg

Berlin 1999
Journal-Nr.2260

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. H. Hartung
Erster Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. G. Hildebrandt
Zweiter Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. M. Hafez

Tag der Promotion: 23.04.1999

Inhaltsübersicht

	Verzeichnis der Abkürzungen	Seite
1.	Einleitung	1
2.	Schrifttum	2
2.1	Überblick	2
2.2	Taxonomie des Genus <i>Enterococcus</i>	3
2.3	Identifizierung und Differenzierung der Enterokokken	6
2.3.1	Genus <i>Enterococcus</i>	6
2.3.2	Beschreibung der Spezies	8
2.3.2.1	<i>Enterococcus faecalis</i>	9
2.3.2.2	Die <i>Enterococcus faecium</i> Spezies-Gruppe	10
2.3.2.3	Die <i>Enterococcus avium</i> Spezies-Gruppe	14
2.3.2.4	Die <i>Enterococcus gallinarum</i> Spezies-Gruppe	17
2.3.2.5	Die <i>Enterococcus cecorum</i> Spezies-Gruppe	20
2.3.2.6	<i>E. sulfureus</i> , <i>E. saccharolyticus</i> und <i>E. dispar</i>	21
2.4	Resistenzen gegenüber antibiotisch wirksamen Substanzen	22
2.4.1	Wirkung von Glykopeptid-Antibiotika auf Enterokokken	23
2.4.2	Typen der Glykopeptidresistenzen bei Enterokokken	25
2.5	Einsatz von Leistungsförderern in der Geflügelmast	26
2.6	Rechtliche Grundlagen	27
3.	Eigene Untersuchungen	28
3.1	Material	28
3.1.1	Verwendete Nährmedien und Reagenzien	28
3.1.1.1	Isolation und Differenzierung	29
3.1.1.2	Stammsammlung	31
3.1.1.3	Resistenztestung	31
3.1.1.4	Elektrophorese	32
3.1.2	Arbeitsgeräte	33
3.1.3	Untersuchungsmaterial	35
3.1.3.1	Probenentnahme	35

3.2	Methode	37
3.2.1	Probenaufarbeitung	37
3.2.2	Probenbezeichnung	39
3.2.3	Bestimmung der Keimzahl	39
3.2.4	Auswahl der Vancomycin-resistenten Enterokokken	40
3.2.5	Differenzierung der Spezies	40
3.2.6	Aufbewahrung der Stämme	42
3.2.7	Computerunterstützte Identifikation der Stämme	42
3.2.8	MHK-Bestimmung in der Mikrotiterplatte	43
3.2.9	Elektrophoretische Analyse	44
3.2.9.1	Gewinnung der löslichen Zellproteine	44
3.2.9.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	44
3.2.10	Computergestützte Auswertung der Gele	45
3.2.11	Polymerase Chain Reaction: Restriktionsenzymanalyse	46
4.	Ergebnisse	47
4.1	Methodische Erkenntnisse	47
4.2	Übersicht der Resultate	47
4.3	Keimzahlen	49
4.4	Vorkommen und Verteilung	52
4.5	Resistenzverhalten der isolierten Stämme	54
4.6	Nachweis des vanA-Gens	56
4.7	Clusteranalyse	58
5.	Diskussion	63
5.1	Zur Methodenwahl	63
5.2	Keimzahlen	63
5.3	Vorkommen der VRE	64
5.4	Speziesidentifizierung der Isolate	66
5.5	Resistenzverhalten	66
5.6	PCR	68
5.7	Clusteranalyse	68
6.	Schlußfolgerungen	69
7.	Zusammenfassung	70
8.	Summary	71
9.	Literaturverzeichnis	72
10.	Anhang	85

Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
A. bidest.	Aqua bidestillata
A. dest.	Aqua destillata
Alkal. Phos.	Alkalische Phosphatase
API	Analytical-Profil-Index
Argin.	Argininhydrolase
α -Ketogluk.	α -Ketoglukonat
α -Häm.	α -Hämolyse
α -Met.-D.-Glukosid.	α -Methyl-D-Glukosidase
α -Met.-Man.	α -Methyl-Mannosidose
ATCC	American Type Culture Collection
Avo.	Avoparcin
β -Häm.	β -Hämolyse
Beweg.	Beweglichkeit
BHI	Brain Heart Infusion Bouillon
BP	Blutplatte
CATC	Citrat-Azid-Tween-Carbonat-Agar
cfu	colony forming unit
D-Arabit.	D-Arabitol
DIN	Deutsches Institut für Normung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
D-Raffino.	D-Raffinose
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
E.	Enterococcus
EDTA	Ethylendinitrotetraessigsäure
g	relative Zentrifugalbeschleunigung
Galak.	Galaktosidase
GKZ	Gesamtkeimzahl
gram-pos.	gram-positiv
h	Stunde /-n
k. A.	keine Angaben
KbE	Kolonie-bildende Einheiten
2-Ketoglu.	2-Ketoglutamat
KD	Kilodalton
KGW	Kilogrammkörpergewicht
KZ	Keimzahl
l	Liter
L-Arabin.	L-Arabinose
L-Arabit.	L-Arabitol
Manno.	Mannose
Melezit.	Melezitose
MHK	Minimale Hemmstoffkonzentraion
ml	Milliliter
min	Minute
n	Anzahl

NaCl	Natriumchlorid
Nonred. P.	Nichtreduzierender Probenpuffer
NRW	Nordrhein-Westfalen
n. u.	nicht untersucht
PC-Agar	Plate-Count-Agar
PCR	Polymerase Chain Reaktion (Polymerase Kettenreaktion)
PW	Pepton-Wasser
Pyrase-Test	L-Pyrroglutaminsäurepeptidase-Test
RT	Raumtemperatur
Rd.	Rind
Red. Prob. P.	Reduzierender Probenpuffer
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIM	Schwefelwasserstoff-Indol-Motilität
sp., spp.	Spezies
Strep.	Streptokokken
Sw.	Schwein
Tab.	Tabelle
Teico.	Teicoplanin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Umdrehungen/min.
Vanco.	Vancomycin
VP	Voges-Proskauer
VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken

1. Einleitung

Resistenzen gegen Glykopeptidantibiotika werden in zunehmendem Maß bei Enterokokken beobachtet. Besonders in den USA, Spanien, Frankreich und England wurden im letzten Jahrzehnt auf dem humanmedizinischen Sektor vermehrt resistente *E. faecium*-Stämme isoliert. Diese Eigenschaft beruht auf der Expression eines induzierbaren 39,0 kD-Membranproteins, welches den Wirkungsmechanismus des Glykopeptids unterbindet, wobei der Resistenzfaktor konjugativ übertragbar ist.

In der Veterinärmedizin werden Glykopeptidantibiotika neben Therapie und Prophylaxe auch als Leistungsförderer in der Tierproduktion (z.B. Avoparcin) eingesetzt. Diese Dauerapplikation läßt den Verdacht zu, daß sich durch den Selektionsdruck Resistenzen ausbilden. Es entsteht ein vergrößerter Resistenzpool, von dem aus Vancomycin-resistente-Enterokokken in die Umwelt, und folglich auf Mensch und Tier, verbreitet werden können.

Vorliegende Studie gilt dem Vorkommen von glykopeptidresistenten Enterokokkenspezies in Mastgeflügelproduktionsbetrieben, von der Aufzucht über die Schlachtung bis hin zum Endprodukt. Durch phänotypische Charakterisierung anhand mikroskopischer, kultureller und serologischer Verfahren wird die Subspeziesverteilung aufgezeigt und deren Resistenzverhalten (MHK) im Mikrodilutionsverfahren bestimmt. Zur Beurteilung der Frage, ob es sich bei den isolierten resistenten Enterokokken um den gleichen oder unterschiedliche Stämme handelt, dient eine elektrophoretische Analyse des Gesamtzellproteinextraktes.

Letztlich soll in ausgewählten Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE)-Stämmen durch eine PCR das VanA-Gen, welches die übertragbare high-level Resistenz gegen Glykopeptidantibiotika vermittelt, nachgewiesen werden.

2. Schrifttum

2.1 Überblick

Enterokokken sind kleine, rundliche, gram-positive Bakterien, die zum Teil kurze Ketten oder Paare bilden und zur physiologischen Flora des Magen-Darmtraktes bei Mensch und Tier gehören. Als Begleitkeime machen sie im Intestinum einen Anteil von <1% der Gesamtflora aus.

Tabelle 1: Keimarten der Intestinalflora von Mensch, Nutztier und Huhn im Überblick

	Mensch ¹	Nutztier (Rd., Sw.) ²	Huhn ³
Hauptflora, >90%	obligat anaerob	obligat anaerob	strikt anaerob
	- Bacteriodaceae	-Bifidobakterien	-Eubakterien
	- Enterobacteriaceae	-Laktobazillen	-Clostridien
	- Clostridien	-Bacteriodaceae	-Fusobakterien
		-Eubakterien	
Begleitflora, <1%	fakultativ anaerob	fakultativ anaerob	fakultativ anaerob
	- Enterokokken	-E. coli	-Enterokokken
	- Entamoeba	-Enterokokken	-Peptostreptokokken
	- Giardia		-Propionibakterien
Restflora, <0,01%			
	- Staphylokokken	-Clostridien	-Pseudomonas
	- Pseudomonas	-Proteus	-Pilze
	- Pilze	-Staphylokokken	
	- Apath. Corynebakterien	-Pseudomonas	

¹ = nach ROLLE und MAYR (1993)

² = nach WIESMANN (1986)

³ = nach KOLB (1989)

Die Enterokokken sind fakultativ pathogen, d. h. unter bestimmten Umständen können sie Infektionen hervorrufen bzw. an solchen mitwirken. Eine Gefahr besteht besonders bei sogenannten Risikogruppen, wozu immungeschwächte Intensivpatienten, ältere Menschen und Säuglinge gehören.

Enterokokkeninfektionen lassen sich mit den gängigen Antibiotika behandeln (v. a. β -Lactamantibiotika, Aminoglykoside). Verhält sich jedoch ein Erreger gegen diese Antibiotika resistent und/oder besteht eine entsprechende Allergie, müssen Glycopeptidantibiotika wie Vancomycin und Teicoplanin als Reservetherapeutika eingesetzt werden.

Enterokokken finden sich in allen Bereichen des multikausalen Infektionsgeschehens (Infektiöse Faktorenkrankheiten, Mischinfektionen, Hospitalismus), wobei ihre Bedeutung steigt: So stehen sie an dritter Stelle der auslösende Keime bei Harnwegsinfektionen und in 5-15% werden sie als Verursacher bakterieller Endokarditiden (MURRAY 1990) identifiziert. Nach Studien über neonatale Bakteriämien sind Enterokokken in bis zu 42% der Fälle beteiligt (LUGINBUHL et al. 1987).

Gemäß einer Erhebung des Robert Koch-Instituts über Resistenzen der Enterokokken gegen Glycopeptidantibiotika (KLARE et al. 1995) werden etwa 17% der septischen Allgemeininfektionen in Krankenhäusern durch Enterokokken ausgelöst, während ca. 10% der klinisch gesunden Menschen in ihrer Darmflora glycopeptidresistente Enterokokken aufweisen.

2.2 Taxonomie des Genus *Enterococcus*

Der Name *Enterococcus* wurde erstmals im Jahre 1903 in einer Veröffentlichung der Franzosen THIERCELIN und JOUHAUD für gram-positive Diplokokken aus dem menschlichen Intestinaltrakt verwendet. 1906 benannten ANDREWS und HORDER THIERCELINs 'enreocoque' wegen der Fähigkeit der Organismen, kurze und lange Ketten zu bilden, in *Streptococcus faecalis* um. Auf Grund dieser Nomenklatur läßt sich die Geschichte der Enterokokken nicht separat von der des Genus *Streptococcus* betrachten. Über viele Jahre hinweg gab es sehr unterschiedliche Systematiken und Terminologien der Enterokokken, vornehmlich wurden sie als Streptokokken bezeichnet. Beispielhaft sei die Einführung von *Streptococcus faecium*, heute *E. faecium* (Tabelle 1), durch ORLA-JENSEN (1919) erwähnt. Die von LANCEFIELD 1933 entwickelte serologische Methode teilt die Streptokokken (und Enterokokken) aufgrund unterschiedlicher Zellwandeigenschaften in Gruppen ein und benennt diese mit alphabetischen Buchstaben.

1937 schlug SHERMAN ein Klassifikationsschema für Streptokokken mit vier separaten Gruppen vor: pyogenes, viridans, lactis und enterococcus. Hier wurde der Ausdruck *Enterococcus* für Organismen benutzt, die Wachstum bei 10 und 45°C, in 6,5%iger NaCl-Lösung sowie bei pH 9,6 zeigen und 30 min bei 60°C überleben. Außerdem besitzen sie die Fähigkeit, Äsculin zu spalten.

SHERMANs Schema steht in engem Bezug zu der serologischen Klassifikation von LANCEFIELD. Demnach reagieren die pyogenen Streptokokken der Gliederung von SHERMAN mit Gruppe A, B, C, E, F oder G-Antisera, die Milchsäurestreptokokken mit Gruppe N-Antisera. Die Viridans-Klasse läßt keine Gruppenzugehörigkeit erkennen. Enterokokken entsprechen der serologischen Gruppe D. Jedoch nicht alle Enterokokken weisen dieses Merkmal auf, oft werden sie auch der Gruppe Q zugeordnet. In Ausnahmefällen findet sich keine Gruppenzuordnung.

In den folgenden Jahren wurden zunehmend biochemische Eigenschaften zur Enterokokken-Differenzierung herangezogen. Zugleich wurde eine Reihe neuer Enterokokkenspezies aus Lebensmitteln, Tieren und Menschen isoliert.

JONES erweiterte 1978 die Einteilung von SHERMAN und änderte die Bezeichnungen *Enterococcus* und *Viridans* in 'orale' und 'faekale' Enterokokken. Er fügte die Gruppen *Pneumococcus*, *Anaerobic* und 'Andere' Streptokokken hinzu.

Anfang der achtziger Jahre brachte die DNA-Hybridisation Klarheit in die Systematik der Enterokokken. FARROW et al. (1983) zeigten anhand bestimmter biochemischer Leistungen und vor allem der DNA-Hybridisation, daß unterschiedlich benannte Enterokokkenspezies ein und dieselbe Art darstellen. Gleichzeitig bestätigte sich aber eine große Speziesvielfalt.

SCHLEIFER und KILPPER-BÄLZ (1984) belegten durch DNA-DNA- und DNA-rRNA-Hybridisation die grundsätzlichen Unterschiede zwischen *S. faecalis* und *S. faecium* einerseits und den Streptokokken andererseits. Sie schlugen die Eingliederung von 'Streptococcus' *faecalis* und 'Streptococcus' *faecium* in die als Genus neu geschaffene Gruppe der Enterokokken vor (*E. faecalis* und *E. faecium*).

Seit Etablierung des Genus *Enterococcus* 1984 durch SCHLEIFER und KILPPER-BÄLZ sind 19 unterschiedliche Spezies dem Genus *Enterococcus* hinzugefügt worden. Die meisten dieser Arten wurden vom Genus *Streptococcus* transferiert: *E. avium* (COLLINS et al. 1984) für *Strep. avium* (NOWLAN u. DEIBEL 1967), *E. casseliflavus* (COLLINS et al. 1984) für *Strep. casseliflavus* (VAUGHN et al. 1979), *E. durans* (COLLINS et al. 1984) für *Strep. durans* (SHERMAN u. WING 1937), *E. gallinarum* (COLLINS et al. 1984) für *Strep. gallinarum* (BRIDGE u. SNEATH 1982), *E. malodoratus* (COLLINS et al. 1984) für *Strep. faecalis* subsp. *malodoratus* (PETTE 1955), *E. cecorum* (WILLIAMS et al. 1989) für *Strep. cecorum*

(DEVRIESE et al. 1983) und *E. saccharolyticus* (RODRIGUES u. COLLINS 1990) für *Strep. saccharolyticus* (FARROW et al. 1984).

Neubeschreibungen bilden *E. columbae* (DEVRIESE et al. 1990), *E. dispar* (COLLINS et al. 1991), *E. flavescens* (POMPEI et al. 1992), *E. hirae* (FARROW u. COLLINS 1985), *E. mundtii* (COLLINS et al. 1986), *E. pseudoavium* (COLLINS et al. 1989), *E. raffinosus* (COLLINS et al. 1989), *E. seriolicida* (KUSUDAET et al. 1991), *E. solitarius* (COLLINS et al. 1989) und *E. sulfureus* (MARTINEZ-MURCIA u. COLLINS 1991). Tabelle 2 enthält eine Auflistung derzeit anerkannter Enterokokkenarten.

Tabelle 2: Die akzeptierten Spezies des Genus *Enterococcus* (nach DEVRIESE 1993)

Spezies	ehemalige Bezeichnung	Quellennachweis
<i>E. faecalis</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>	SCHLEIFER u. KILPPER-BÄLZ 1984
<i>E. faecium</i>	<i>Streptococcus faecium</i>	SCHLEIFER u. KILPPER-BÄLZ 1984
<i>E. durans</i>	<i>Streptococcus durans</i>	COLLINS et al. 1984
<i>E. gallinarum</i>	<i>Streptococcus gallinarum</i>	COLLINS et al. 1984
<i>E. avium</i>	<i>Streptococcus avium</i>	COLLINS et al. 1984
<i>E. casseliflavus</i>	<i>Streptococcus casseliflavus</i>	COLLINS et al. 1984
<i>E. malodoratus</i>	<i>Strep. faecalis</i> subsp. <i>malodoratus</i>	COLLINS et al. 1984
<i>E. hirae</i>	oB	FARROW u. COLLINS 1985
<i>E. mundtii</i>	oB	COLLINS et al. 1986
<i>E. pseudoavium</i>	oB	COLLINS et al. 1989
<i>E. solitarius</i>	oB	COLLINS et al. 1989
<i>E. raffinosus</i>	oB	COLLINS et al. 1989
<i>E. cecorum</i>	<i>Streptococcus cecorum</i>	WILLIAM et al. 1989
<i>E. columbae</i>	ob	DEVRIESE et al. 1990
<i>E. saccharolyticus</i>	<i>Streptococcus saccharolyticus</i>	RODRIGUES u. COLLINS 1990
<i>E. dispar</i>	ob	COLLINS et al. 1991
<i>E. seriolicida</i>	ob	KUSUDA et al. 1991
<i>E. sulfureus</i>	oB	MARTINEZ-MURCIA u. COLLINS 1991
<i>E. flavescens</i>	oB	POMPEI et al. 1992

oB = ohne Beschreibung

Auf Grund der 16S rRNA Sequenzanalyse des Genus *Enterococcus* zeichnen sich verschiedene Speziesgruppen ab (WILLIAMS et al. 1991, Abb. 1). Die erste Kategorie (*E. faecium*-Gruppe) umfaßt *E. durans*, *E. faecium*, *E. hirae* und *E. mundtii* mit ihrer 16S Sequenz-Ähnlichkeit von 98.7-99.7%. Das zweite Kompartiment, *E. avium*-Gruppe genannt, umschließt *E. avium*, *E. raffinosus*, *E. malodoratus* und *E. pseudoavium* (Ähnlichkeit der 16S rRNA-Sequenz zwischen 99.3 und 99.7%). Die dritte als *E. gallinarum* bezeichnete Gruppe besteht aus *E. casseliflavus* und *E. gallinarum* (99.8% Ähnlichkeit der 16S rRNA-Sequenz). Für *E. faecalis*, *E. saccharolyticus*, *E. sulfureus*, *E. cecorum* und *E. columbae* bestehen individuelle Abstammungs-linien (MARTINEZ-MURCIA u. COLLINS 1991). Dabei weist *E. cecorum* wesentlich mehr Ähnlichkeit zu *E. columbae* auf als zu anderen Enterokokken. *E. solitarius* besitzt phylogenetisch mehr Übereinstimmung mit dem Genus *Tetragenococcus* (ca. 98% 16S rRNA Sequenz-Ähnlichkeit) als mit den Enterokokken (ca. 92-94% 16S rRNA-Sequenz Ähnlichkeit, COLLINS et al. 1990). Zum jetzigen Zeitpunkt liegen für *E. flavescens* noch keine 16S rRNA-Sequenzangaben im zugänglichen Schrifttum vor. Weil die zitierten Arbeiten z.T. während der Vorbereitung und Entstehung des *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Band II) aus dem Jahre 1989 entstanden sind, gibt dieses Standardwerk nur teilweise den aktuellen Stand wieder.

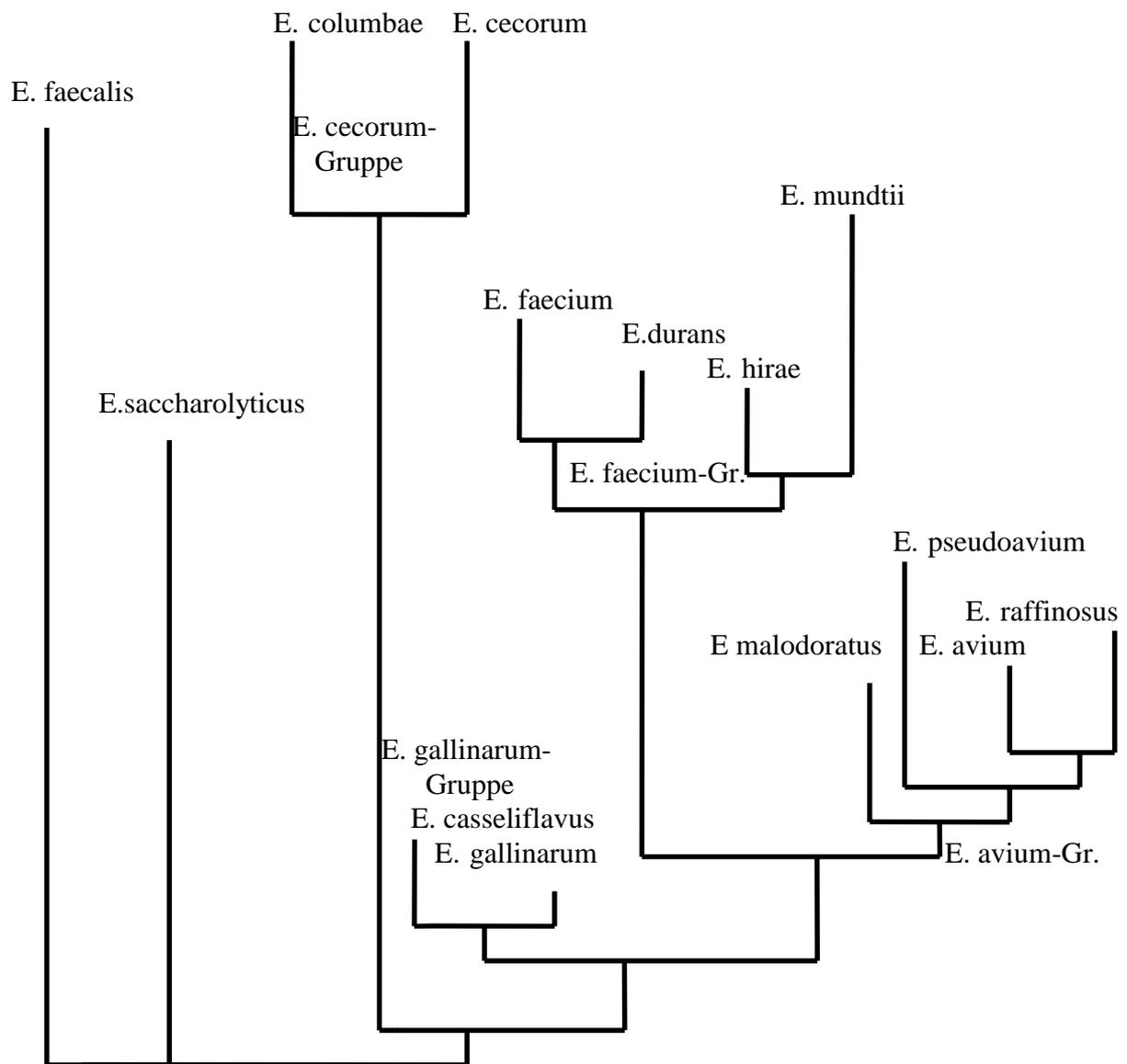


Abb. 1: Stammbaum der Enterokokken, abgeleitet von 16S rRNA-Sequenz-Analysen. Der Abstand zwischen den Längsbalken spiegelt die Homologieverhältnisse (WILLIAMS et al. 1991).

2.3 Identifizierung und Differenzierung der Enterokokken

2.3.1 Genus *Enterococcus*

Mikroskopie:

Auf der Basis des mikroskopischen Bildes allein läßt sich keine Unterscheidung von Enterokokken zu anderen gram-positiven, katalase-negativen Kokken treffen. Enterokokken bilden als max. 2 µm große, runde bis ovale Bakterien kurze oder lange Ketten, gelegentlich liegen sie auch als Paare (Diplokokken) vor.

Außer *E. gallinarum* und *E. casseliflavus* sind die Enterokokkenarten unbeweglich.

Kultivierung:

Enterokokken sind fakultativ anaerobe, katalase-negative Kokken und benötigen generell nähr-stoffreiche Medien. Zur Kultivierung eignen sich Nährböden auf der Basis von Mischpeptonen aus Casein, Sojabohnenmehl und/oder Fleisch, die zusätzlich Hirn- oder Herzinfusion enthalten. Den Agarmedien wird zur Beurteilung der Hämolyse 5% Schafsblut zugesetzt. Auf der Blutplatte wachsen sie als kleine (2-3mm), runde, weiß-graue, glatte Kolonien meist mit α-Hämolyse. Ihr Temperaturoptimum liegt bei 37-39°C, ihre Temperaturtoleranz ist jedoch wesentlich breiter (10-45°C).

Zur Unterdrückung der schneller wachsenden und dominierenden Begleitflora werden Selektivmedien eingesetzt, welche die natürliche Resistenz der Enterokokken gegen Galle, Äsculin (FACKLAM u. MOODY 1970) und Natrium-Azid ausnutzen (REUTER 1992). Außerdem zeigen sie Wachstum in Gegenwart von 2,3,5-Triphenyl-Tetrazoliumchlorid.

Die Einordnung in das Genus *Enterococcus* wird aufgrund der als typisch erachteten phänotypischen Eigenschaften wie folgt vorgenommen:

Wachstum bei pH 9,6, in Medien mit Kochsalz (6,5%), in Medien mit >40% Rindergalle, sowie bei 10 und 45°C. Eine Ausnahme bilden *E. cecorum* und *E. columbae*, die sich bei 10°C nicht vermehren. *E. dispar* und *E. sulfureus* zeigen kein Wachstum bei 45°C (DEVRIESE et al. 1993), überstehen aber eine Erhitzung auf 60°C für eine halbe Stunde.

Allen Enterokokkenspezies ist das Fehlen einer Cytochromoxydase, alkalischer Phosphatase (DEVRIESE et al. 1993) und einer Katalase gemein. SCHLEIFER und KILPPER-BÄLZ (1984) berichteten über das Vorkommen von Pseudo-Katalase bei Anwesenheit von Häm. Enterokokken wachsen nicht in Gegenwart von 0,04%igem Tellurit (Ausnahme: *E. faecalis*) und sind Pyrolidonylarylamidase-positiv (FACKLAM u. WASHINGTON 1991). Mit Ausnahme von *E. mundtii* und *E. casseliflavus* bilden Enterokokken keine Pigmente (COLLINS et al. 1986).

Eine Identifikation der Spezies kann durch Bestimmung der Säureproduktion aus verschiedenen Kohlenhydraten erfolgen. Hierzu wird dem Basalnährmedium ein Indikator zugesetzt, der eine positive Reaktion durch Farbumschlag sichtbar macht. Nicht immer ergeben sich eindeutige Aussagen, da innerhalb einer Spezies auch variables Verhalten vorkommt.

In Tabelle 3 sind Tests für eine Artdifferenzierung zusammengestellt.

Die Voges-Proskauer-Reaktion (VP) und die Ribosefermentation besitzen keinen hohen Differenzierungswert, da positive Ergebnisse bei fast allen Enterokokkenspezies auftreten. Eine Ausnahme bilden *E. saccharolyticus* (VP-negativ) und *E. flavescens* (Ribose-negativ) (RODRIGUES u. COLLINS 1990, POMPEI et al. 1992). Dagegen reagieren nur wenige Streptokokkenarten (*Str. agalactiae*, *Str. uberis* und *Str. porcinus*) in beiden Tests positiv.

Tabelle 3: Charakteristika, die allen Enterokokken gemeinsam sind
(nach DEVRIESE u. POT 1995)

Charakteristik	Ergebnis
Resistenz 40% Galle	+
Wachstum bei:	
10°C und 45°C	+
pH 9,6	+
NaCl 6,5%	+
0,04% Tellurit	+ ¹
β-Glukosidase	+
Urease	-
VP	+ ²
β-Glukuronidase	- ³
Aesculinhydrolyse	+
Säure aus:	
N-Acetylglukosamin	+
D-Arabinose	-
D-Fruktose	+
Galaktose	+
Glukose	+
Glykogen	- ⁴
Inositol	- ⁵
Laktose	+
Maltose	+
D-Mannose	+
Ribose	+ ⁶
Trehalose	+
L-Xylose	-

¹ = *E. faecalis* negativ

² = Negativ nur bei *E. saccharolyticus*

³ = Positiv nur bei den meisten *E. cecorum*-Stämmen

⁴ = Positiv nur bei einigen *E. gallinarum*-, *E. cecorum*- und *E. columbae*-Stämmen

⁵ = verzögert positiv bei *E. raffinosus*

⁶ = Keine Angaben über neuere Spezies

Serologie :

Mit Ausnahme einiger selten vorkommenden Enterokokken weisen alle Arten das LANCEFIELD D-Antigen auf (DEVRIESE u. POT 1995). Nach LANCEFIELD (1933) enthalten die meisten Enterokokken in ihrer Zellwand spezifische Kohlenhydrat-Antigene, die eine Klassifizierung in Gruppen erlauben. Diese Antigene können extrahiert und mit Hilfe von Latexpartikeln, die mit gruppenspezifischen Antikörpern beschichtet sind, nachgewiesen werden. Diese Reaktionskörper agglutinieren in Gegenwart der entsprechenden Antigene, bleiben bei deren Abwesenheit jedoch in Lösung.

2.3.2 Beschreibung der Spezies

Es bietet sich an, die verschiedenen Enterokokkenspezies zu gruppieren und in folgenden phylogenetisch abgeleiteten Speziesgruppen zu beschreiben: *E. faecium*-, *E. gallinarum*-, *E. avium*- und *E. cecorum*-Gruppe (Abb.1). Daneben stehen die stammesgeschichtlich separat zu betrachtende Art *E. faecalis* und die noch weniger gut bekannten Spezies.

Die Speziesgruppen unterscheiden sich markant hinsichtlich ihres Vorkommens, des Wachstums, der chemischen-biochemischen Charakteristiken und der Pathogenität. Tests zur Differenzierung der einzelnen Gruppen und Arten zeigt Tabelle 4.

Tabelle 4: Tests zur Differenzierung der Enterokokken (nach DEVRIESE u. POT 1995)

Test	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i> -Gruppe	<i>E. avium</i> -Gruppe	<i>E. gallinaru</i> m-Gruppe	<i>E. cecorum</i> -Gruppe	<i>E. sulfureus</i>	<i>E. saccha</i> <i>rolyticus</i>
Bewegl.	-	-	-	+	-	-	-
D-Antigen	+	D+	D	+	-	-	-
APPA	-	-	+	-	-	?	?
Pyra	+	+	+	+	-	+	-
VP	+	+	+	+	+	+	-
Aesculin Hy.	+	+	+	+	+	+	+
Alk. Phos.	-	-	-	-	D+	-	-
Säure aus:							
Adonitol	-	-	+	-	-	-	-
L-Arabinose	-	D	D+	+	D	-	-
D-Arabitol	-	-	+	-	D	-	+
L-Arabitol	-	-	D	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	D	-	-	-	-
Glukonat	D+	D	D+	D	+	+	-
Glycerin	+	-	D	D	-	-	-
Inulin	-	-	-	+	+	-	+
2-Ketoglu.	D	-	+	-	D	+	+
Mannitol	+	D	+	+	D	-	+
Melezitose	D+	-	D	D-	D	+	+
Melibiose	-	D	D	+	D	?	+
α -Met-D-Glycosid.	-	-	+	+	D	+	+
D-Raffinose	-	D	D+	D	+	?	+
Ribose	+	+	+	+ ¹	+	+	+
Sorbitol	D+	D-	+	D-	D	-	+
L-Sorbose	-	-	+	-	-	?	D-
Xylitol	-	-	D+	-	D-	-	-
D-Xylose	D-	D	D-	+	D	-	-

+ = Wahrscheinlichkeit pos. Reaktion > 85% D- = meist negativ

- = Wahrscheinlichkeit neg. Reaktion >85% ? = Reaktion noch nicht bekannt

D = Differierend

Pyra = Pyrolidonylarylamidase

D+ = meist positiv

¹ = *E. flavescens* Ribose negativ

2.3.2.1 Enterococcus faecalis

Sequenzanalysen der 16S RNA von *E. faecalis* ergaben eine auffallend abweichende Abstammungslinie innerhalb des Genus. Dem *E. faecalis*-Chromosom selbst wurde wenig Interesse gewidmet, mit Ausnahme einer Restriktionsenzymanalyse für epidemiologische Zwecke. Dagegen galten seinen Transposonen und Plasmiden intensive Studien in den letzten Jahren, da für *E. faecalis* zwei besondere genetische Systeme entdeckt wurden: Sexpheromon-Plasmide und konjugative Transposone.

In einer DNase-resistenten, konjugationsähnlichen Weise werden konjugative Transposone zwischen verschiedenen Zellen derselben oder differenter Spezies übertragen. Offenbar spielen derartige Transposone eine wichtige Rolle in der Verbreitung von antibiotisch resistenzbestimmenden Genen innerhalb der Enterokokken und verwandter Genera.

Sexpheromon-Plasmide scheinen nur in *E. faecalis* vorzukommen. Ihr Mechanismus funktioniert folgendermaßen: Plasmid-tragende Spenderzellen werden durch die Ausscheidung von Pheromonen plasmidfreier möglicher Empfängerzellen zur Synthetisierung eines korrespondierenden, anhaftenden Proteins angeregt. Daraus resultiert eine Annäherung beider Zelltypen, wodurch die konjugative Übertragung des Sexpheromon-Plasmids ermöglicht wird. Das System ist in bemerkenswerter Weise reguliert und vielseitig: Inhibitorpeptide, welche die Effekte der korrespondierenden Sexpheromone neutralisieren, können von den Spenderzellen ausgeschieden werden. Andererseits sind die Spenderzellen in der Lage, Sexpheromone zu produzieren, die in keinem Bezug zu den eigenen Sexpheromonplasmiden stehen (DUNNY 1990; DEVRIESE et al. 1991 b).

Vorkommen

E. faecalis ist häufig der dominierende Enterococcus im menschlichen Darm, wird allerdings bei einigen Menschen von *E. faecium* zahlenmäßig übertroffen. Bei Tieren hängt das Vorkommen des *E. faecalis* stark vom Alter ab. In präruminierenden Kälbern überwiegt die Präsenz von *E. faecalis*, bei Eintagsküken sind *E. faecalis* und *E. faecium* gleich häufig vorhanden. Bei den einige Wochen älteren Tieren fällt die Prävalenz auf 10% (DEVRIESE et al. 1991 d, 1992 a).

Morphologie und Wachstumscharakteristiken

Die *E. faecalis*-Zellen sind meist ovoid und erscheinen einzeln, in Paaren oder in kurzen Ketten. Auf Festnährböden bilden sie runde, glatte und konvexe Kolonien aus. In Gegenwart von Tetrazolium entstehen typische rote Kolonien, in Bouillon Trübung mit Bodensatz. Einige Stämme, die ein Cytolysin-codiertes Plasmid tragen, zeigen β -Hämolyse mit Pferdeblut, jedoch nicht mit Schafsblut. *E. faecalis* wächst in Gegenwart von 0,04% Tellurit als kleine schwarze Kolonie.

Chemische Zusammensetzung

Das Zellwandpeptidoglycan unterscheidet sich von dem anderer Enterokokken. Es gehört zum Lys-Ala 2-3-Typ, während für den Zellwandaufbau anderer Enterokokkenspezies Typ Lysin-D-Asparagin charakteristisch ist.

Biochemische Charakterisierung

Pyruvat, Serin, Citrat, Gluconat, Malat und Arginin können als Energiequellen genutzt werden. Endprodukte der Glukosefermentation mit einem pH-Wert oberhalb des neutralen Bereiches bilden vorwiegend Äthanol, Ameisensäure und Essigsäure. Bei einem pH-Wert

unterhalb von 5 wird hauptsächlich Milchsäure produziert. Die Verstoffwechslung von Glycerol, Gluconat, Malat und Laktose wurde von JACOBS und van DEMARK (1960), LONDON und MEYER (1970), HELLER und RÖSCHENTHALER (1978) sowie BERNSMANN et al. (1982) untersucht.

Unter den extrazellulären Stoffen wurde die Produktion der Proteinase (DEFERNANDO et al. 1991) des Cytolysin und der DNase (BATISH et al. 1982), der Hyaluronidase (ROSAN u. WILLIAM 1966) und der Lipase (CHANDER et al. 1979) erforscht.

Charakteristika, die *E. faecalis* von anderen Enterokokken unterscheiden, sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Pathogenität

E. faecalis ist verantwortlich für einen großen Anteil (> 80% nach MURRAY 1990 sowie DEVRIESE et al. 1993) der Enterokokkeninfektionen beim Menschen. Damit wäre *E. faecalis* der wichtigste Krankheitserreger, doch nimmt vor allem *E. faecium* in den letzten Jahren stark an Bedeutung zu (IWEN et al. 1997).

Diese Dominanz liegt in der hohen natürlichen Resistenz gegen eine Vielzahl von Stoffen wie β -Lactam, Aminoglykoside, Lincosamide, Trimethoprim/Sulphamethoxazole und viele andere antibiotisch wirksame Substanzen begründet.

Bei Tieren dagegen spielt *E. faecalis* als pathogener Erreger eine nur untergeordnete Rolle.

2.3.2.2 Die *Enterococcus faecium* Spezies-Gruppe

(*E. faecium*, *E. durans*, *E. mundtii*, *E. hirae*)

Die Charakteristiken der *E. faecium*-Gruppe sind in Tabelle 5 aufgeführt. Als besonders wichtiges Merkmal gilt, daß diese Gruppe kein oder nur geringes Wachstum in Form kleiner blaugrauer Kolonien in Gegenwart von 0,04% Tellurit zeigt.

Tabelle 5: Tests zur Differenzierung zwischen Spezies der *E. faecium*-Gruppe (nach DEVRIESE u. POT 1995)

Eigenschaften	<i>E. faecium</i>	<i>E. durans</i>	<i>E. hirae</i>	<i>E. mundtii</i>
gelbes Pigment	-	-	-	+
Säure aus:				
L-Arabinose	+	-	-	+
Gluconat	D	-	-	-
Mannitol	D+	-	-	+
Melibiose	D+	-	+	+
α -Met.-D-Man.	D-	-	-	D+
D-Raffinose	-	-	D-	D+
Rhamnose	D-	-	-	D+
Sorbitol	-	-	-	D
Sucrose	D+	-	+	+
D-Xylose	D-	-	-	+

D = Differierend D+ = meist positiv D- = meist negativ

Enterococcus faecium

Die Art *Enterococcus faecium* wurde früher unter der Bezeichnung *Streptococcus faecium* geführt (ORLA-JENSEN 1919).

Über die Verteilung bestimmter Plasmidsequenzen von *E. faecium*-Stämme aus menschlichen Faekalproben berichteten WATANABE et al. (1992). Eine Restriktionsenzymanalyse chromosomaler DNA erwies sich als nützliches Werkzeug zur Bestimmung von Stämmen sowie zum Nachweis von Stammverwandtschaften in epidemiologischen Studien (LACOUX et al. 1992).

Vorkommen

E. faecium ist, zusammen mit *E. faecalis*, die häufigste Enterokokkenspezies im Gastrointestinaltrakt des Menschen. In der Prävalenz gibt es starke geographische Unterschiede, dabei stellt die Nahrung einen entscheidenden Faktor dar (MEAD 1978; NOBLE 1978).

Für Geflügel und Rinder ist bekannt, daß sich die *E. faecium*-Besiedlungsdichte mit zunehmenden Alter verringert (DEVRIESE et al. 1991 d, 1992 a).

E. faecium kommt recht häufig in bestimmten Nahrungsmitteln vor (STILES et al. 1978), wie z.B. in roher Milch (KIELWEIN 1978; WESSELS et al. 1988) und verschiedenen Milchprodukten.

Morphologie und Wachstumscharakteristiken

Die Zellen des unbeweglichen Keims liegen einzeln oder in kurzen Ketten vor und sind längsoval in Richtung der Kette abgeflacht (Staketokokken). Die Kolonien sind glatt, rund, konvex, nicht pigmentiert und können Hämolyse zeigen.

E. faecium produziert blaßrosafarbene Kolonien auf Tetrazolium enthaltenden Selektivnährböden, wie dem SLANETZ und BARTHLEY-Medium (1957). Den gleichen Kolonietyp bilden *E. durans*, *E. hirae* und *E. mundtii*.

Chemische Zusammensetzung

Das Zellwandpeptidoglycan gehört zum Lysin-D-Asparagintyp. Das Gruppe D-Antigen enthält Kojitrose. D-Alanin und L-Lysin stellen über die Hydroxylgruppen der Glucose eine Ester-Verbindung in diesem Polymer her. Weder Menachinon noch Ubichinon, die in bestimmten Enterokokken als nicht-cytochrome Elektronencarrier wirken, wurden in *E. faecium* gefunden (COLLINS u. JONES 1979).

Biochemische Charakterisierung

E. faecium unterscheidet sich in seinen Wachstumsansprüchen und seinem Stoffwechsel in vielen Merkmalen von *E. faecalis*. Der Keim benötigt Folsäure zum Wachstum und ist nicht in der Lage, Pyruvat, Malat, Gluconat oder Serin als Energiequelle zu nutzen. Zudem wächst *E. faecium* nicht in Gegenwart von 0,04% Tellurit (REUTER 1992). Die Spezies besitzt die Enzyme Superoxiddismutase, NADH-Oxidase und L-Laktat-Oxidase, aber keine NADH-Peroxidase oder Pyruvat-Oxidase (ZITZELSBERGER et al. 1984). *E. faecium*-Stämme aus Geflügel spalten Raffinose. Die meisten Rinder- und Hunde-Stämme produzieren Säure aus D-Xylose, während sich Isolate anderer Herkunft D-Xylose-negativ verhalten (DEVRIESE et al. 1987). Die Mehrzahl der Hunde-Stämme reagiert Sorbitol-negativ (DEVRIESE et al. 1992 b).

Pathogenität

Ogleich *E. faecium* wesentlich seltener auftritt als *E. faecalis*, muß dieser Spezies in jüngster Zeit mehr Aufmerksamkeit gewidmet werden, weil vielfache Resistenzen gegen Antibiotika bestehen, die nosokomiale Infektionen und Epidemien ermöglichen (GEORGE u. UTTLEY 1989; MOELLERING 1991). Dagegen sind Erkrankungen bei Tieren bisher nicht beschrieben worden.

Enterococcus durans

Die Spezies *E. durans* wurde erstmalig von SHERMAN und WINGS (1937) als *Streptococcus durans* beschrieben.

Eine Charakterisierung des *E. durans* wurde mit Hilfe der Restriktionsanalyse für epidemiologische Zwecke von LACOUX et al. (1992) vorgenommen. Es besteht annähernd 40% DNA-Homologie zu den *E. faecium*-Stämmen. Die 16S rRNA ähnelt der von *E. faecium*, *E. hirae* und *E. mundtii* (Ähnlichkeit innerhalb der Gruppe: 98,7-99,5%).

Vorkommen

Ursprünglich wurde *E. durans* aus Milch- und Milcherzeugnissen isoliert. Auch nachfolgend wurde der Keim wiederholt in diesen Produkten nachgewiesen, allerdings in geringerer Anzahl als *E. faecalis* und *E. faecium* (BATISH u. RANGANATHAN 1984). WESSELS et al. (1988) isolierten die Spezies zum größten Teil aus Butter. Ungenügend gereinigtes Arbeitsmaterial steht in dem Verdacht, eine wichtige Rolle hinsichtlich der Verbreitung in Molkereibetrieben zu spielen (KIELWEIN 1978).

Im menschlichen Organismus ist der Darm erwartungsgemäß der wesentliche Fundort, allerdings scheint diese Enterokokkenspezies nur bei einer kleinen Anzahl von Menschen vorzukommen (COOPER u. RAMADAN 1955; FINEGOLD et al. 1974). Bei Haustieren wurde er im Darm einiger präruminanter Kälber (DEVRIESE et al. 1992a) und bei jungen Küken (DEVRIESE et al. 1991d) gefunden.

Morphologie und Wachstumscharakteristiken

Die ovoiden Zellen lagern sich zu kurzen Ketten und kleinen Gruppen zusammen. Die Kolonien sind glatt, rund, konvex und unipigmentiert. Einige Stämme zeigen Hämolyse (α - oder β -Hämolyse). Beweglichkeit besteht nicht.

Chemische Zusammensetzung

Es gelten die für *E. faecium* beschriebenen Befunde.

Biochemische Charakterisierung

E. durans präsentiert beinahe alle der gewohnten Enterokokken-Charakteristika und teilt viele der Eigenschaften der *E. faecium*-Gruppe (Tabelle 4). Typische Reaktionen sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Pathogenität

Es liegen keine Berichte über eine Pathogenität von *E. durans* vor.

Enterococcus hirae

rRNA-Sequenzanalysen lassen eine Zugehörigkeit von *E. hirae* zum *E. faecium* Spezies-Cluster erkennen (FARROW u. COLLINS 1985).

Morphologie und Wachstumscharakteristiken

Die Morphologie und Wachstumscharakteristiken entsprechen denen von *E. faecium* (DEVRIESE et al. 1993).

Chemische Zusammensetzung

Die chemische Zusammensetzung von *E. hirae* entspricht der des *E. faecium* (REIZER et al. 1992).

Biochemische Charakterisierung

E. hirae diente für Untersuchungen des Zellwandsyntheseenzym Muramidase. Der Keim besitzt zwei voneinander getrennte Peptidoglykanhydrolasen, sogenannte N-Acetylmuramylhydrolasen, die als *E. hirae* 1 und 2 bezeichnet werden (KARIYAMA u. SHOCKMANN 1992). Andere Untersuchungsfelder waren penicillinbindende Proteine (PIRAZ et al. 1990) und Ionenträger (REIZER et al. 1992).

Die charakteristischen Eigenschaften von *E. hirae* sind in Tabelle 5 aufgezeigt. Die Spezies wird leicht mit *E. durans* verwechselt, kann jedoch durch ihre positive Melibiose-Reaktion und Säureproduktion aus Sucrose abgegrenzt werden. Wahrscheinlich produzieren alle Stämme Säure aus mindestens einem dieser beiden Kohlenhydrate.

Pathogenität

Wie FULLER et al. (1979) nachwiesen, verursacht *E. hirae* in Hühnern eine Wachstumsdepression. Der ursächliche Mechanismus ist noch unbekannt. Weiterhin ruft *E. hirae* bei Hühnern fokale Gehirnekrosen hervor (DEVRIESE et al. 1991 c). Ob für Tiere eine enteropathogene Wirkung besteht, ist bisher ungewiß. FACKLAM und COLLINS (1989) beschrieben acht *E. hirae*-Stämme aus menschlichen Infektionen, doch wurde die Rolle von *E. hirae* in der Humanmedizin bisher nicht näher untersucht.

Enterococcus mundtii

Sequenzanalysen der 16S rRNA ordneten *E. mundtii* innerhalb der *E. faecium* Spezies-Gruppe ein (WILLIAMS et al. 1991).

Vorkommen

E. mundtii scheint typischerweise in Verbindung mit Pflanzen vorzukommen. Isolate aus Tieren und Menschen sind wahrscheinlich als Kontamination anzusehen (COLLINS et al. 1986).

Morphologie und Wachstumscharakteristiken

E. mundtii unterscheidet sich eindeutig durch seine Pigmentierung von *E. faecium* und den anderen Spezies dieser Gruppe (DEVRIESE et al. 1993). Weitere Wachstumscharakteristika finden sich in Tabelle 5.

Chemische Zusammensetzung

Die biochemische Zusammensetzung von *E. mundtii* entspricht der des *E. faecium* (COLLINS et al. 1986).

Biochemische Charakterisierung

Die Pigmentierung des *E. mundtii* wird gewöhnlich nach einem Tag Wachstum sichtbar und prägt sich nach zwei Tagen deutlicher aus. Als Hauptunterscheidungsmerkmal zu den anderen gelbpigmentierten Spezies wird die fehlende Beweglichkeit angesehen. Weitere Tests zur Differenzierung enthält Tabelle 5.

Pathogenität

Infektionen des Menschen mit *E. mundtii* sind bekannt, aber selten (KAUFHOLD u. FERRIERI 1991).

2.3.2.3. Die *Enterococcus avium* Spezies-Gruppe

(*E. avium*, *E. malodoratus*, *E. pseudoavium* und *E. raffinosus*)

Charakteristische Eigenschaften, die für alle Spezies der Gruppe zutreffen, werden in Tabelle 6 aufgeführt. Die *E. avium*-Gruppe lässt sich leicht von anderen Enterokokken durch folgende vier Merkmale unterscheiden: Produktion einer Alanyl-phenyl-alanyl-prolinearylaminidase (APPA) und Metabolisierung des Adonitols, der D-Lyxose und der L-Sorbose.

Tabelle 6: Kohlenhydratfermentations-Tests zur Differenzierung der *E. avium*-Gruppe (nach DEVRIESE u. POT 1995)

Eigenschaften	<i>E. avium</i>	<i>E. pseudoavium</i>	<i>E. malodoratus</i>	<i>E. raffinosus</i>
Säure aus:				
L-Arabinose	+	-	-	+
L-Arabitol	+	-	+	+
Dulcitol	D	-	D+	-
Glycerol	+	-	D	+
Melezitose	+	-	-	+
Melibiose	-	-	+	+
Raffinose	-	-	+	+
Rhamnose	+	-	+	+
D-Tagatose	+	-	+	+
Inositol	-	-	-	+

D = Differierend
D+ = meist positiv
D- = meist negativ

Enterococcus avium

Wie die übrigen Speziesgruppenmitglieder bildet *E. avium* ein deutliches Artencluster innerhalb des Genus *Enterococcus*. Die Homologie innerhalb der Speziesgruppe beträgt zwischen 99.3 und 99.7%.

Vorkommen

NOWLAN und DEIBEL (1967) prägten den Namen *E. avium*, da sie diese Spezies hauptsächlich in Hühnerfaeces fanden. Nach neueren Untersuchungen kommt die Art in Geflügel nicht oder nur selten vor (DEVRIESE et al. 1991 d). Dagegen existiert sie ziemlich häufig in präruminanten Kälbern (DEVRIESE et al. 1992 a) und wird auch aus Schweine- und Hundedärmen isoliert. In Japan wurde *E. avium* häufig bei Kindern, jedoch nicht bei Erwachsenen gefunden (WATANABE et al. 1981).

Morphologie und Wachstumscharakteristiken

Die unbeweglichen Zellen sind ovoid, gewöhnlich paarweise oder in kurzen Ketten gelegen. Die Kolonien erscheinen glatt, rund und konvex sowie etwas kleiner als die der *E. faecalis*- oder *E. faecium*-Stämme. Pigmentation besteht nicht. Es wird typischerweise eine breite, scharf abgegrenzte, doppelzonig vergrünende Hämolyse erzeugt.

Chemische Zusammensetzung

Das Zellwandpeptidoglykan basiert auf Lysin (Lys-D-Asp.). Viele, aber nicht alle Stämme besitzen ein serologisch nachweisbares Gruppe D-Antigen. Auch können Sie mit dem LANCEFIELD Gruppe Q- und A-Antigen reagieren.

Biochemische Charakterisierung

Für das Wachstum werden Folsäure, aber nicht Riboflavin oder Pyridoxal benötigt. Viele Stämme können Gluconat als Energiequelle nutzen, jedoch nicht Pyruvat, Serin, Citrat, Malat und Arginin (NOWLAN u. DEIBEL 1967). *E. avium* zeigt NADH Peroxidase-, NADH Oxidase-, Superoxiddismutase- und L-Laktasedehydrogenase-Aktivität (ZITZELSBERGER et al. 1984). *E. avium* läßt sich von den anderen Spezies mittels Kohlenhydratfermentations-Tests unterscheiden (Tab. 6).

Pathogenität

E. avium kann bei der Entstehung menschlicher Infektionen in seltenen Fällen beteiligt sein (FACKLAM u. COLLINS 1989; RUOFF et al. 1990).

E. malodoratus

E. malodoratus wurde früher als *Streptococcus malodoratus* bezeichnet (PETTE 1955).

Vorkommen

E. malodoratus scheint eine recht seltene Spezies zu sein, die bisher überwiegend beim Menschen nachgewiesen wurde. Aus Katzentonsillen isolierte Stämme, die ursprünglich als *E. raffinosus* beschrieben wurden (DEVRIESE et al. 1992b), konnten später *E. malodoratus* zugeordnet werden (DEVRIESE u. POT 1994). In anderen Haustieren findet man die Art offensichtlich nur in wenigen Fällen, genauso wie im Pflanzenreich, in Lebensmitteln und in Molkereiprodukten, obwohl der Erstdnachweis in Goudakäse erfolgte (PETTE 1955).

Morphologie und Wachstumscharakteristiken

E. malodoratus ähnelt in Morphologie und Wachstumseigenschaften *E. avium*.

Chemische Zusammensetzung

Auch der Zellwand- und Fettsäureaufbau von *E. malodoratus* entspricht *E. avium*.

Biochemische Charakterisierung

E. malodoratus besitzt zwar die Charakteristika der *E. avium*-Speziesgruppe (Tab. 4), differiert aber in seinen Kohlenhydratreaktionen, wie aus Tab. 6 ersichtlich. Prägnant von *E. avium* unterscheidet sich *E. malodoratus* in seiner negativen L-Arabinose- und Melizitose-Reaktion, positiven Raffinose- und Melibiose- und, bis zu einem gewissen Grad, auch in seiner positiven Glycyl-Tryptophan-Arylamidase-Reaktion.

Pathogenität

Zur Pathogenität von *E. malodoratus* liegen keine Veröffentlichungen vor.

E. pseudoavium

Vorkommen

Der einzig beschriebene *E. pseudoavium*-Stamm wurde im Zusammenhang mit einer Kuhmastitis isoliert (COLLINS et al. 1989), die Suche im Darmtrakt und Faeces von Rindern blieb hingegen erfolglos (DEVRIESE et al. 1992 a). Wahrscheinlich ist die Spezies auch bei Rindermastitiden sehr selten anzutreffen.

Morphologie und Wachstumscharakteristiken, chemische Zusammensetzung

Die Beschreibung gleicht der von *E. avium*.

Biochemische Charakterisierung

Das einzig bekannte Isolat von *E. pseudoavium* (COLLINS et al. 1989) wächst nicht in 6.5%-iger NaCl-Lösung und seine Kohlenhydratverstoffwechslung verläuft weniger intensiv als bei den übrigen Mitgliedern der *E. avium*-Speziesgruppe.

Pathogenität

Zur Pathogenität von *E. pseudoavium* liegen keine Veröffentlichungen vor.

E. raffinosus

Die Unterscheidung zwischen *E. raffinosus* und *E. avium* kann sich schwierig gestalten. Differentialdiagnostisch entscheidend ist eine positive Raffinose-Reaktion, welche bei *E. avium* negativ ausfällt (COLLINS et al. 1989), doch gelingt sie nur in den Fällen, in denen statt der kommerziellen API-Teststreifen konventionelle Methoden eingesetzt werden. Die positive L-Arabitol- und Melibiose-Reaktion läßt sich ebenfalls zur Unterscheidung heranziehen (Tab. 6).

GRAYSON et al. (1991) schrieben *E. raffinosus* eine größere Penicillinresistenz als *E. avium* zu, was sich aber nur bei bestimmten Stämmen bewahrheitete.

Vorkommen

Die meisten Isolate des *E. raffinosus* entstammen aus dem Klinikbereich der Humanmedizin. Sein aktuelles Habitat ist unbekannt, sein Auftreten in Tieren eher selten.

Morphologie und Wachstumscharakteristiken, chem. Zusammensetzung

Die bislang beschriebenen Ergebnisse ähneln denen von *E. avium*.

Biochemische Charakterisierung

E. raffinosus wächst nicht oder nur schwach bei 10°C. Weitere Reaktionen enthält Tabelle 6.

Pathogenität

E. raffinosus ähnelt im Bereich der Humaninfektionen *E. avium*. FACKLAM und COLLINS (1989) beschrieben Stämme aus mannigfaltigen klinischen Quellen, einschließlich Wunden, biliären Infektionen und Blutkulturen. Ansteigende Häufigkeiten in bestimmten Kliniken müßten den Effekten eines selektiven Antibiotikadrucks zu Lasten gelegt werden.

2.3.2.4 Die *Enterococcus gallinarum* Spezies-Gruppe

(*E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. flavescens*)

Die *E. gallinarum*-Gruppe umschließt *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* und mit größter Wahrscheinlichkeit auch die Spezies *E. flavescens*, welche 1992 beschrieben wurde (POMPEI et al. 1992). Die Vertreter zeigen im Gegensatz zu den anderen Spezies Beweglichkeit (Tab. 4) und verfügen über eine intrinsische, d.h. natürliche low-level Resistenz gegenüber Vancomycin.

Tabelle 7: Tests zur Differenzierung zwischen Spezies der *E. gallinarum*-Gruppe (nach DEVRIESE et al. 1993)

Eigenschaften	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. casseliflavus</i> / <i>E. flavescens</i> ¹
Gelbes Pigment	-	+ ²
Hippurat	D+	-
Säure aus:		
Sorbitol	D	-
Glycerol	-	D
Glykogen	D	-
D-Cyclodextrin	+	D-
D-Tagatose	+	D-
β-Hämolyse Pferde-Blut-Agar	D+	-
α-Hämolyse Schafblut-Agar	-	D+

D = Differierend

D+ = meist positiv

D- = meist negativ

¹ = *E. flavescens* unterscheidet sich von *E. casseliflavus* nur durch eine negative Ribose-

Reaktion und die fehlende Hämolyse auf Schafblut-Agar.

² = einige Stämme unpigmentiert

E. gallinarum

Zunächst *Streptococcus gallinarum* genannt (BRIDGE u. SNEATH 1982), kann die Unterscheidung von *E. gallinarum* gegenüber *E. casseliflavus* Schwierigkeiten bereiten: Neben der genannten Vancomycinresistenz und Beweglichkeit produzieren beide Arten Säure aus Inulin und D-Xylose (Tab. 7). Dagegen kann die fehlende Pigmentation, meist positive Hippurat-Reaktion und Säureproduktion aus D-Cycloserin zur Identifizierung von *E. gallinarum* dienen.

Vorkommen

Die Spezies *E. gallinarum* wurde bei Geflügel beschrieben und entsprechend benannt (BRIDGE u. SNEATH 1982). DEVRIESE et al. (1991 d) fanden allerdings nur sehr wenige *E. gallinarum*-Stämme in Hühnern und unter den verschiedensten anderen Tieren lediglich einige Stämme bei Katzen. Sein aktuelles Habitat ist unbekannt.

Morphologie und Wachstumscharakteristiken

Die Zellen von *E. gallinarum* sind kokkoid, meist in Paaren oder kurzen Ketten angelegt. Ursprünglich als unbeweglich angesehen, konnten DEVRIESE et al. (1987) eine arttypische Motilität demonstrieren. Die Kolonien sind rund, glatt, konvex und unpigmentiert. *E. gallinarum* zeigt meist β -Hämolyse auf Pferdeblut- aber keine α -Hämolyse auf Schafblut-Agar (WILLIAMSON et al. 1986).

Chemische Zusammensetzung

E. gallinarum weist ein Peptidoglycan vom Lys-D-Asp-Typ auf. Das Gruppe D-Antigen ist nachweisbar.

Biochemische Charakterisierung

E. gallinarum besitzt die üblichen Eigenschaften der Enterokokken (Tab. 3 und 4). Aus Tabelle 7 können die zur Speziesunterscheidung geeigneten Merkmale entnommen werden.

Pathogenität

RUOFF et al. (1990) fanden in einer Serie klinischer Enterokokkenisolate 1% *E. gallinarum*-Stämme. Die Bedeutung jener Vancomycin-resistenten Enterokokken-Spezies liegt in ihrer VanC-Resistenz.

E. casseliflavus

Die Art *E. casseliflavus* wurde früher unter dem Namen *Streptococcus faecium* spp. *casseliflavus* oder *Streptococcus casseliflavus* geführt (VAUGHN et al. 1979). Pigmentation, Beweglichkeit und intrinsische low-level Resistenz (Vancomycin MHK 8-16 $\mu\text{g/ml}$) zählen zu seinen wichtigsten Identifizierungsmerkmalen.

Vorkommen

E. casseliflavus ist assoziiert mit pflanzlichem Material (VAUGHN et al. 1979).

Morphologie und Wachstumscharakteristiken

Normalerweise pigmentiert und beweglich, existieren jedoch auch unbewegliche und nicht pigmentierte Stämme von *E. casseliflavus* (VINCENT et al. 1991). Die Motilität wird am besten bei 30°C getestet. Eine vollständige Färbung stellt sich erst nach 2 Tagen ein. Die Kolonien sind rund, glatt, konvex und pigmentiert. *E. casseliflavus* entwickelt meist α -Hämolyse auf Schafsblut- und keine β -Hämolyse auf Pferdeblut-Agar (WILLIAMSON et al. 1986).

Chemische Zusammensetzung

E. casseliflavus entspricht in seiner chemischen Zusammensetzung *E. gallinarum*.

Biochemische Charakterisierung

Wie aus Tabelle 7 ersichtlich, stimmen die biochemischen Merkmale von *E. casseliflavus* und *E. gallinarum* überein.

Pathogenität

In Ausnahmefällen wird der Keim bei klinischen Infektionen isoliert (RUOFF et al. 1990).

E. flavescens

Bis auf zwei Merkmale decken sich die Eigenschaften des *E. flavescens* mit denen des *E. casseliflavus*. Die negative Ribose-Reaktion sowie das Fehlen der Hämolysereaktion auf Schaf- und Pferdeblut-Agar sind differentialdiagnostisch verwertbar (POMPEI et al. 1992).

2.3.2.5 Die *Enterococcus cecorum* Spezies-Gruppe

(*E. cecorum*, *E. columbae*)

Die zwei Mitglieder der *E. cecorum*-Gruppe können aus tierischem Darminhalt isoliert werden. Beide stehen in weniger enger Beziehung zueinander als die Arten anderer Speziesgruppen (Abb. 1). Ihre Fähigkeit, alkalische Phosphatase zu bilden (Tab. 4), stellt unter den Enterokokken eine Besonderheit dar (WILLIAMS et al. 1989).

Tabelle 8: Tests zur Differenzierung zwischen Spezies der *E. cecorum*-Gruppe (nach DEVRIESE u. POT 1995)

Eigenschaften	<i>E. cecorum</i>	<i>E. columbae</i>
β-Galaktosidase	D-	+
β-Glukuronidase	D+	-
Alkalische Phosphatase	D+	+
Hippurathydrolyse	D-	-
Säure aus:		
L-Arabinose	-	D+
D-Arabitol	D-	D
5-Keto-Gluconat	D	-
α-Methyl-D-Glukosidase	D	+
Mannitol	D	+
Melezitose	D	D-
Rhamnose	D-	D
D-Tagatose	-	D
Sorbitol	D	D+
Trehalose	+	D+
D-Turanose	-	D-
D-Xylose	-	+
Xylitol	-	D-

D = Differierend
D+ = meist positiv
D- = meist negativ

E. cecorum

Vorkommen

Unter allen Enterokokkenspezies wird *E. cecorum* im Intestinaltrakt adulter Hühner am meisten gefundenen (DEVRIESE et al. 1991 d). Weitaus seltener läßt sich der Keim aus Küken oder anderen Vogelarten isolieren. Häufiger als andere Enterokokkenarten weist man ihn bei Jungrindern nach.

Morphologie und Wachstumscharakteristiken

Die unbeweglichen Zellen von *E. cecorum* stellen sich kokkoid, 1-1,3µm groß im Durchmesser, paarig, in kurzen Ketten oder kleinen Gruppen dar. Die Kolonien sind rund,

leicht konvex, teilweise transparent und nicht pigmentiert. Zum Wachstum wird 3-10% CO₂ im Luftgemisch oder eine anaerobe Bebrütung in H₂- und CO₂-Atmosphäre benötigt (DEVRIESE et al. 1983).

Chemische Zusammensetzung

Für *E. cecorum* wurde der Lys-D-Asp-Typ bestimmt (SCHLEIFFER u. KILPPER-BÄLZ 1987). Gruppe D-Antigenität besteht nicht.

Biochemische Charakterisierung

Folgende Eigenschaften sprechen für eine Sonderstellung von *E. cecorum* unter den Enterokokken: Geringes oder kein Wachstum in 6,5%igem NaCl-Medium, kein Wachstum in 0,04%igem NaN₃-Medium; Vermehrung bei einer Temperatur von 45°C aber nicht bei 10°C; Arginin wird nicht hydrolysiert; Pyrrolidonylarylamidase ist negativ, Alkalische Phosphatase ist immer, β-Glukuronidase bei den meisten Stämmen positiv (DEVRIESE et al. 1991 a).

Pathogenität

Nach derzeitigem Wissen scheint *E. cecorum* weder für Hühner noch für andere Tiere pathogen zu sein.

E. columbae

Vorkommen

E. columbae wurde bisher nur in domestizierten Tauben gefunden, wo er der dominante Keim innerhalb der Darmflora gesunder Tiere sein dürfte.

Morphologie und Wachstumscharakteristiken

In Bouillon wächst die Art in kurzen Ketten von 2-4 Kokken. Die Anzüchtung auf Agar gestaltet sich bei einer Bebrütungstemperatur von 35-37°C und einer Atmosphäre von 3-10% CO₂ optimal (WILLIAMS et al. 1989).

Chemische Zusammensetzung

Ein serologisch nachweisbares Gruppe D-Antigen existiert nicht.

Biochemische Charakterisierung

Als Unterscheidungsmerkmal zu *E. cecorum* kann die negative β-Glukuronidase-Reaktion von *E. columbae* herangezogen werden.

Pathogenität

Obgleich nicht primär pathogen für Tauben, wird *E. columbae* regelmäßig aus Wundexsudat dieser Vögel isoliert.

2.3.2.6 *E. sulfureus*, *E. saccharolyticus* und *E. dispar*

Die drei genannten Arten sollen aufgrund ihrer geringeren Bedeutung hier nicht weiter erörtert werden. Zur biochemischen Differenzierung sei auf Tabelle 4 verwiesen. Über die Pathogenität dieser Keime liegen keine Veröffentlichungen vor.

2.4 Resistenzen gegenüber antibiotisch wirksamen Substanzen

Enterokokken haben in den letzten Jahren an Bedeutung in der Humanmedizin gewonnen, nicht wegen ihrer besonderen Pathogenität und Virulenz, sondern aufgrund ihrer zunehmenden Fähigkeit, Resistenzen gegenüber Antibiotika auszubilden (MOELLERING 1991).

Enterokokken besitzen eine ganze Reihe natürlicher Resistenzen, z.B. gegen alle Cephalosporine und Polymyxine, meist auch gegen Lincomycin und Clindamycin sowie auf niedrigem Niveau gegen sämtliche Aminoglycosid-Antibiotika. Hinzu kommt eine hohe Resistenz gegen die verschiedensten Penicilline (z.B. Penicillin G, Methylcillin, Cloxacillin, Oxacillin, Doxacillin, Amoxicillin), die auf einer geringen Affinität des Penicillin-bindenden Proteins beruht (WILLIAMSON et al. 1985).

Im direkten Vergleich ist *E. faecium* noch resistenter als *E. faecalis* einzuschätzen. Tabelle 9 gibt einen Überblick zum Verhalten der Enterokokken gegenüber Chemotherapeutika.

Tabelle 9: Resistenzen und Empfindlichkeiten von Enterokokken gegen Chemotherapeutika
(nach WITTE u. KLARE 1995)

Art der Resistenz bzw. Empfindlichkeit	betroffene Chemotherapeutikagruppen bzw. Einzeltherapeutika
natürliche Resistenz	- β -Laktam-Antibiotika: Penicilline, Cephalosporine, Zephamycine -Aminoglykoside -Polymyxine -Lincomycin, Clindamycin
erworbene Resistenz	-Makrolide -Tetracycline -Chloramphenicol -Trimethoprim/Sulfonamid-Kombination -Aminoglykoside -Glykopeptide
mäßige Empfindlichkeit	-Chinolone
gute Empfindlichkeit	-Nitrofurane -Rifampicin -Glykopeptide (steigende Resistenz)

Die fehlende Sensibilität einzelner Enterokokkenspezies für Glycopeptidantibiotika machte sich erst zu Beginn der 90er Jahre bemerkbar (BOYCE et al. 1994). Bis zu diesem Zeitpunkt galten Ampicillin und Vancomycin als Mittel der Wahl bei antibiotikabedürftigen Enterokokkeninfektionen. Bereits vor BOYCE berichteten andere Autoren (UTTLEY et al. 1989) über zunehmende Fälle von Vancomycin-resistenten Enterokokken-Infektionen. Allein in den USA kam es zwischen 1989 und 1993 zu einem 20-fachen Anstieg der Inzidenz von Infektionen mit VRE. Zugleich ist beispielsweise in Dänemark der Einsatz von Vancomycin bei der Behandlung menschlicher Infektionen von 15kg im Jahr 1989 auf 22kg im Jahr 1993 angestiegen (AARESTRUP 1995).

IWEN et al. (1997) zeigte anhand von Daten aus den USA zwischen 1988 und 1995 bei 419 Enterokokkenisolaten aus Blutkulturen einen signifikanten Anstieg von multiresistenten *E. faecium*-Stämmen. Am stärksten war die Resistenzzunahme gegenüber Ampicillin ausgeprägt,

gefolgt von Gentamycin, Vancomycin und Streptomycin. Dabei fällt auf, daß bis 1991 keine Vancomycin- und Gentamycinresistenzen beobachtet wurden, während sich von 1992-1995 ein signifikanter Anstieg abzeichnete. Hingegen nahm das Vorkommen von resistenten *E. faecalis*-Stämmen zwischen 1988 und 1995 sogar ab. Eine Ampicillinresistenz wurde selten, eine Vancomycinresistenz überhaupt nicht in den USA festgestellt.

In Deutschland hingegen isolierten BÜLTE und LEMKE (1996) aus Geflügelfleisch auch *E. faecalis*-Stämme, die ein Resistenzverhalten gegenüber Vancomycin zeigten.

In der Bundesrepublik lag die Häufigkeit des Auftretens glykopeptidresistenter Enterokokken-Stämme aus klinischem Untersuchungsmaterial im Jahr 1995 bei etwa 5% (WITTE u. KLARE 1995).

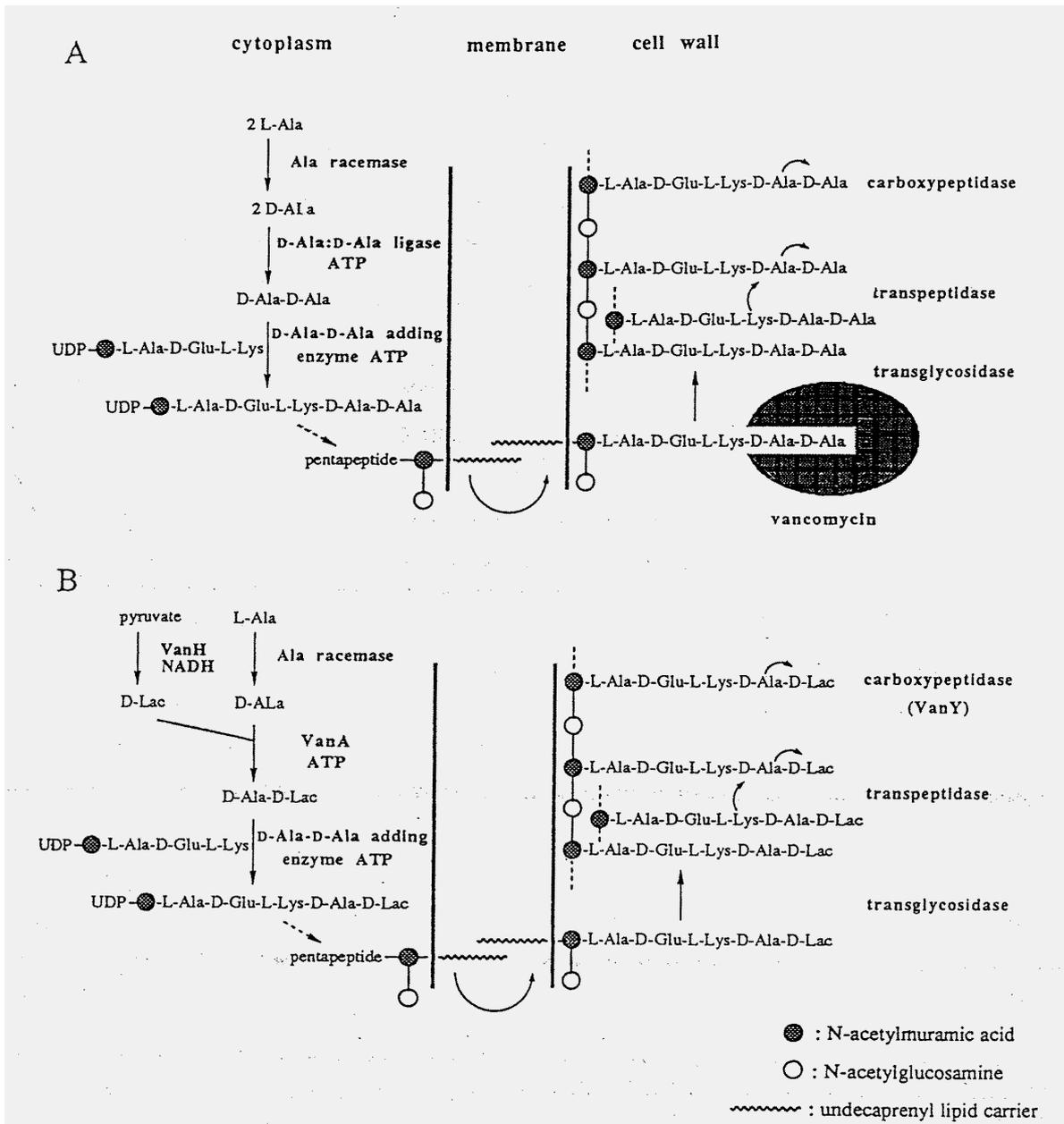
Tab. 10: Resistenzentwicklung isolierter Enterokokkenspezies aus Blutkulturen 1988-1995 (nach IWEN et al. 1997)

Spezies und Zeitabschnitt	Untersuchte Stämme (%)	Anzahl der ermittelten Resistenzen gegen (%)			
		Ampicillin	Gentamycin	Streptomycin	Vancomycin
<i>E. faecalis</i> 1988-1989	78 (84%)	0	2 (2%)	6 (8%)	0
1990-1991	64 (68%)	0	5 (8%)	5 (8%)	0
1992-1993	73 (68%)	1 (1%)	22 (30%)	11 (15%)	0
1994-1995	72 (58%)	0	26 (36%)	15 (21%)	0
<i>E. faecium</i> 1988-1989	12 (13%)	2 (17%)	0	2 (17%)	0
1990-1991	23 (25%)	4 (17%)	0	5 (22%)	0
1992-1993	30 (28%)	14 (47%)	11 (37%)	15 (50%)	7 (23%)
1994-1995	45 (36%)	31 (76%)	13 (29%)	17 (38%)	10 (22%)

2.4.1 Wirkung von Glycopeptidantibiotika auf Enterokokken

Glykopeptide greifen in die Zellwandbiosynthese gram-positiver Bakterien ein, indem sie die Verknüpfung der im Zellinneren synthetisierten und an die äußere Oberfläche der Zellmembran transportierten Zellbausteine verhindern. Aufgrund ihrer stereo-chemischen Struktur können sie sich sackförmig über die für diese Verknüpfung notwendige, aus fünf Aminosäuren bestehende Seitenkette der Zellwandbausteine stülpen. Für die Anheftung des Glykopeptids an das Pentapeptid besitzt der am Ende befindliche D-Alanyl-D-Alanin-Rest besondere Bedeutung, da sich hier die eigentliche Verbindung zwischen Antibiotikum und Pentapeptid des Zellwandbausteins glykopeptidsensibler Enterokokken über Wasserstoffbrücken ausbildet. Sind Glykopeptide an das Pentapeptid angekoppelt, behindern sie durch ihre Molekülgröße die Synthese der langen Ketten und ihre Vernetzung zu einem festen Geflecht. Die Hemmung der Zellwandbiosynthese läßt die Bakterienzelle absterben (bakterizide Wirkung). Bei glykopeptidresistenten Enterokokkenstämmen kann das Glykopeptid-Antibiotikum nicht an das Pentapeptid binden und somit auch nicht die Zellwandbiosynthese hemmen, weil die endständige Aminosäure D-Alanin gegen D-Laktat ausgetauscht wurde.

Abb. 2: Schematische Darstellung der Peptidoglycanbiosynthese in glycopeptidempfindlichen (A) und -resistenten (B) Zellen (nach ARTHUR u. COURVALIN 1993).



Die Gene für die Ausprägung einer sogenannten high-level Glykopeptidresistenz sind auf dem Transposon Tn1546 lokalisiert (ARTHUR u. COURVALIN 1993), das nur in Gegenwart von Glykopeptiden aktiviert wird, ein induzierter Resistenzmechanismus genannter Vorgang. Dieses Transposon besteht aus 10,85 kb und ist zuständig für vier Funktionsbereiche: (1) Transposition, (2) Regulation der Vancomycinresistenzgene (VanR und VanS), (3) Glykopeptidresistenz über die Proteine VanH, VanA und VanX sowie (4) Ausbildung akzessorischer Proteine (VanY und VanZ). Die Peptidproduktion wird kontrolliert durch das VanR- und VanS-Regulationssystem, welches für die Transkription der Resistenzgene VanA, VanH und VanX verantwortlich ist. Die Resistenzgene codieren spezifische Enzyme, die ihrerseits eine Veränderung in der Zellwandbiosynthese bewirken. VanH wurde identifiziert als Dehydrogenase, die Pyruvat zu Laktat umwandelt. Dieser modifizierte Laktat-Rest wird

über die VanA-Ligase in die Zellwand eingebaut. Die Funktion des VanX-Gens ist noch nicht bekannt. Von den akzessorischen Proteinen wurde bisher nur VanY als D-D-Carboxypeptidase identifiziert, die jedoch nicht für die Resistenzausbildung erforderlich ist. Der Nachweis durch Induktion gebildeter Enzyme (VanA und VanX) gelingt mittels gelelektrophoretischer Auftrennung der Proteine der isolierten Zellmembran oder aller in der Enterokokkenzelle vorhandenen Proteine. Das VanA- und VanX-Gen (JENSEN et al. 1998) können mit der Polymerasekettenreaktion (PCR) und anschließender Gel-Elektrophorese nachgewiesen werden .

2.4.2 Typen der Glykopeptidresistenz bei Enterokokken

Bei Enterokokken sind bisher vier Haupttypen der Resistenz gegen Glykopeptide bekannt: VanA- und VanB- als erworbene und VanC- als natürliche Resistenzen. Letztlich wurde eine nicht übertragbare VanD-Resistenz von PERICHON et al. (1997) nachgewiesen.

Die durch das VanA-Gen vermittelte high-level Resistenz besitzt unter Enterokokken die weiteste Verbreitung und ist zwischen verschiedenen Spezies übertragbar. Bei der high-level Resistenz besteht eine gleichzeitige Unempfindlichkeit (Parallel- oder Kreuzresistenz) gegen Vancomycin und Teicoplanin mit hohen minimalen Hemmstoffkonzentrationen (MHK Vancomycin und Teicoplanin: >256 µg/ml). Dieser Resistenztyp läßt sich durch beide Glykopeptide induzieren. Den VanA-Typ repräsentiert hauptsächlich *E. faecium*, er kann aber auch bei *E. faecalis* oder anderen mit der *E. faecium*-Gruppe nahe verwandten Spezies auftreten (ARTHUR u. COURVALIN 1993).

Die durch das Gen VanB vermittelte low-level Resistenz ist ebenfalls übertragbar, wird aber durch eine Teicoplaninempfindlichkeit bei gleichzeitiger Vancomycinresistenz (MHK: 32-128 µg/ml) charakterisiert. Sie kommt meist bei *E. faecalis*, aber auch bei *E. faecium* vor. Der VanB-Resistenzmechanismus ist nur durch Vancomycin induzierbar (HAYDEN et al. 1997).

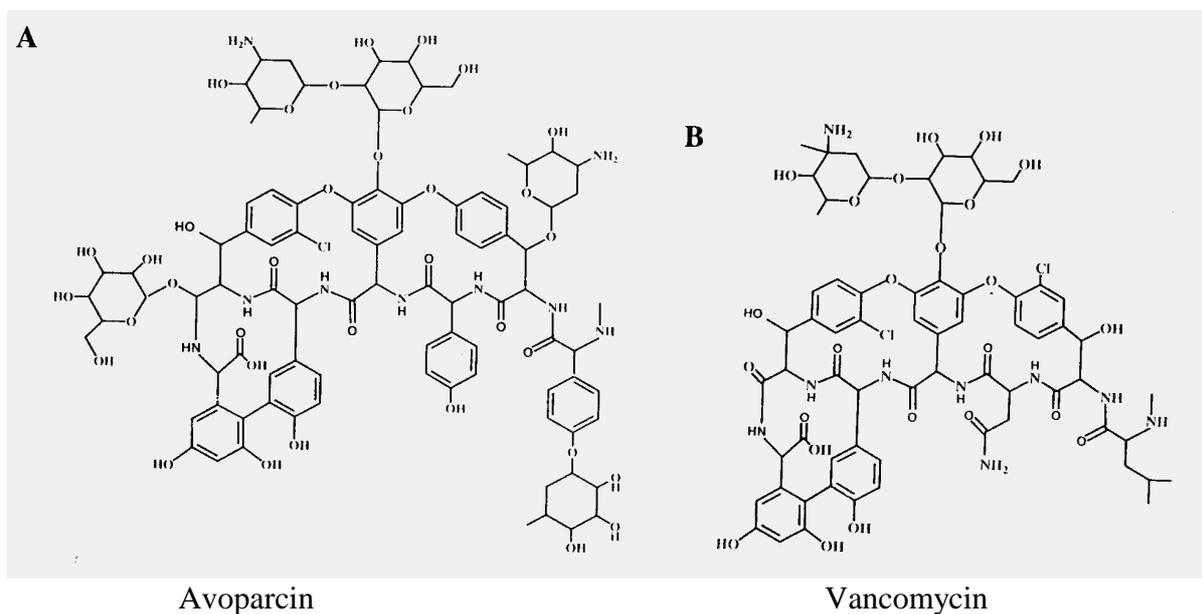
Die durch das VanC-Gen vermittelte natürliche Resistenz kann nicht übertragen werden und findet sich lediglich bei den drei Arten der *E. gallinarum*-Gruppe. Sie ist durch mäßige Empfindlichkeit bis schwache Resistenz gegen Vancomycin (MHK Vancomycin: 2-32 µg/ml) sowie Sensibilität gegen Teicoplanin (MHK: 0,5-1 µg/ml) gekennzeichnet. Auch hier wird die endständige Aminosäure ausgetauscht, jedoch wird D-Alanin nicht durch D-Lactat wie beim VanA- und VanB-Typ ersetzt, sondern durch D-Serin (ARTHUR u. COURVALIN 1993).

Die Aminosäuresequenz des VanD-Typs zeigt 69% Übereinstimmung mit dem VanA- und VanB-Typ sowie 43% Übereinstimmung mit dem VanC-Typ. Der VanD-Typ (PERICHON et al. 1997) zeichnet sich durch eine mittlere Resistenz gegen Vancomycin (MHK: 64 µg/ml) und eine low-level Resistenz gegen Teicoplanin (MHK: 4 µg/ml) aus. Der Resistenzmechanismus gleicht dem des VanA- und VanB-Typs, die endständige Aminosäure D-Alanin wird mithin durch D-Laktat ersetzt. Im Gegensatz zu den beiden anderen Typen besteht indessen keine Übertragbarkeit durch Konjugation.

2.5 Einsatz von Leistungsförderern in der Geflügelmast

Avoparcin ist ein Antibiotikum mit Glykopeptidstruktur und wird von einem *Streptomyces candidus*-Stamm gebildet. Es war bis 1996 als Futtermittelzusatzstoff in Deutschland zugelassen. Seine mikrobiologische Wirkung richtet sich gegen gram-positive Bakterien, wie Staphylokokken, Streptokokken sowie aerobe und anaerobe Sporenbildner (BOHOSIEWICZ 1981). Die Strukturformel von Avoparcin gleicht der des Vancomycins weitgehend (Abb. 3). Die Konzentration Avoparcins im Alleinfutter beim Einsatz als Leistungsförderer für Mastgeflügel liegt mit 5,0-15,0 mg/kg sehr niedrig. Der No-effect-level kann bei 20 mg/kg KGW angesetzt werden. Der Menschen verträglich orale Dosen bis 600 mg.

Abb.3: Strukturformeln von Avoparcin und Vancomycin im Vergleich (nach AARESTRUP 1995).



Glykopeptid-Antibiotika dienen in der Humanmedizin als Reserveantibiotika und besitzen hier eine besondere Bedeutung in der Behandlung von Infektionen durch mehrfachresistente gram-positive Infektionserreger.

WITTE und KLARE (1995) isolierten 1991/92 aus Abwässern kommunaler Kläranlagen von Kleinstädten in ländlichen Gebieten VanA-positive high-level resistente Enterokokken. Epidemiologisch ließ sich dieses VRE-Vorkommen nicht durch den Glykopeptidverbrauch in den umliegenden regionalen Krankenhäusern erklären. Jedoch konnten glykopeptidresistente *E. faecium*-Stämme mit high-level Resistenz in Mastanlagen mit nutritivem Verbrauch von Avoparcin nachgewiesen werden, während sich solche VRE in Proben aus Geflügelanlagen ohne Avoparcin im Futter nicht isolieren ließen. Die Autoren schlußfolgerten, daß die in vielen europäischen Ländern betriebene kommerzielle Tiermast unter Verwendung des Glykopeptid-Antibiotikums Avoparcin große Reservoirs für das Auftreten und die Verbreitung von VRE bzw. Pools der transferablen Glykopeptidresistenz schafft. Bestätigung fanden diese Ergebnisse durch umfangreiche Untersuchungen des Dänischen Veterinärlaboratoriums an Schweine- und Hühnerfarmen, welche Avoparcin zur Mast einsetzten, und an Legehennenfarmen ohne Avoparcineinsatz. Auch norwegische

Untersuchungen von Hühner- und Schweinefarmen mit und ohne Avoparcineinsatz erbrachten analoge Ergebnisse (KRUSE 1995).

Angesichts dieser Situation forderten KLARE und WITTE (1995), daß Antibiotika, die bei der Behandlung von Infektionen beim Menschen Anwendung finden, nicht in der Tierernährung eingesetzt werden sollten.

2.6 Rechtliche Grundlagen

Dänemark und Deutschland haben am 20.5.1995 bzw. am 19.1.1996 auf ihrem Hoheitsgebiet jede Verwendung des Antibiotikums Avoparcin in der Tierernährung verboten. Gemäß den Bestimmungen der Richtlinie 70/524/EWG übermittelten sie den anderen Mitgliedstaaten und der Kommission der Europäischen Gemeinschaften eine ausführliche Begründung ihrer Entscheidung (Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten 1996).

Dänemark und Deutschland vertreten die Auffassung, daß Avoparcin als Antibiotikum der Glykopeptidgruppe bei Applikation im Futtermittel eine Resistenz gegenüber in der Humanmedizin verabreichten Glykopeptiden auslöst. Daher wird ihrer Meinung nach eine der Voraussetzungen der Richtlinie 70/524/EWG für die Zulassung von Zusatzstoffen nicht mehr erfüllt.

Die Kommission der Europäischen Gemeinschaften konsultierte den Wissenschaftlichen Futtermittelausschuß. Nach eingehender Prüfung der Sachlage kam dieses Gremium in der am 21.5.1996 abgegebenen Stellungnahme zu dem Schluß, daß es mangels entscheidender Hinweise darauf, ob zwischen glykopeptidresistenten Enterokokken einerseits und menschlichen Erkrankungen andererseits ein Zusammenhang besteht, keine Notwendigkeit sieht, die Verwendung von Glykopeptiden ausschließlich der Humanmedizin vorzubehalten. Zugleich schlägt der Ausschuß jedoch vor, die Verwendung von Avoparcin als Zusatzstoff unverzüglich einer erneuten Prüfung zu unterziehen. Es sollte untersucht werden, inwieweit eine Resistenzübertragung vom Tier auf den Menschen möglich ist. Als Vorsichtsmaßnahme empfiehlt der Ausschuß außerdem, keine Zulassung für einen Zusatzstoff der Glykopeptidgruppe mit dem gleichen Wirkort und Wirkungsmechanismus wie Avoparcin zu erteilen, solange keine gesicherten Ergebnisse der noch durchzuführenden Forschungsarbeiten vorliegen.

Die wissenschaftlichen Daten reichen zwar nicht aus, um das von Dänemark und Deutschland angeführte Risiko der Resistenzübertragung schlüssig zu belegen, doch erlauben es die vorhandenen Informationen ebensowenig, ein solches Risiko auszuschließen.

Aus diesen Gründen erließ die Kommission der Europäischen Gemeinschaften am 30.1.1997 die Richtlinie 97/6/EG zur Änderung der Richtlinie 70/524/EWG des Rates über Zusatzstoffe in der Tierernährung.

Bis zum 31.12.1998 überprüft die Kommission erneut die Bestimmungen der Richtlinie 97/6/EG unter Zugrundelegung der neuen Ergebnisse, welche die jeweiligen Untersuchungen auf durch Glykopeptide hervorgerufene Resistenzen ergeben.

3. Eigene Untersuchungen

3.1 Material

3.1.1 Verwendete Nährmedien und Reagenzien

3.1.1.1 Isolation und Differenzierung

Enterokokken-Selektivnährmedien

CATC-Agar (Citrat-Azid-Tween-Carbonat-Agar) nach Reuter:

Trockennährbodenbasis der Firma Merck 10279

Pepton aus Casein	15,0 g/l
Hefeextrakt	5,0 g/l
Kaliumdihydrogenphosphat	5,0 g/l
Natriumcitrat	15,0 g/l
Tween 80	1,0 g/l
Agar	15,0 g/l
zusätzlich:	
Natriumcarbonat	2,0 g/l
2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid	0,1 g/l
Natriumazid	0,4 g/l

56 g in 1 l A. dest. lösen und 15 min bei 121°C autoklavieren,
bei 50°C 20 ml einer 10%igen Natriumcarbonat-, 10 ml einer 1%igen 2,3,5-
Triphenyltetrazoliumchlorid- sowie 4 ml einer 10%igen Natriumazid-Lösung einmischen,
anschließend supplementieren mit 50 mg/l Vancomycin

Chromocult Enterokokken-Bouillon):

Merck 1.10294.0100

Peptonmischung	8,6 g/l
Natriumazid	0,6 g/l
Natriumchlorid	6,4 g/l
5-Bromo-4-Indolyl-b-D-Glucopuranosid	0,04 g/l

auf pH 7,5 einstellen

Die Reagenzien in 1 l A. dest. lösen, 15 min bei 121°C autoklavieren

Enterococcosel-Agar:

Becton Dickinson 12205

Trypticase Pepton	17,0 g/l
Thiotone Pepton	3,0 g/l
Hefeextrakt	5,0 g/l
Äskulin	1,0 g/l
Natriumchlorid	5,0 g/l
Ammoniumeisencitrat	0,5 g/l
Natriumcitrat	1,0 g/l
Ochsengalle	10,0 g/l
Natriumazid	0,25 g/l
Agar	13,5 g/l

In 1 l A. dest. suspendieren und lösen, 15 min einweichen lassen,
1 min kochen und anschließend 15 min bei 121 °C autoklavieren

Äsculin-Galle-Agar:

Merck 11432

Fleischextrakt	3,0 g/l
Pepton aus Fleisch	5,0 g/l
Ochsengalle	40,0 g/l
Äsculin	1,0 g/l
Eisen (III)-citrat	0,5 g/l
Agar	14,5 g/l

In 1 l A. dest. lösen, 15 min bei 121°C autoklavieren,
auf pH 6,6 einstellen

Bestätigung der enterokokkenspezifischen Eigenschaften:**Tellurit-NB:**

Plate count-Nährboden (Rezept unter weitere Medien) supplementiert mit 0,04% Tellurit

erhöhte Kochsalzkonzentration:

BHI-Bouillon (Rezept unter Stammsammlung) eingestellt auf NaCl 6,5%

erhöhter pH-Wert:

BHI-Bouillon eingestellt auf pH 9,6

Weitere Medien zur Identifikation und Differenzierung**Peptonwasser:**

Bacto Pepton 1% der Firma Merck	10,0 g/l
NaCl	5,0 g/l
Natriumhydrogenphosphat	9,0 g/l
Kaliumhydrogenphosphat	1,5 g/l

In 1 l A. dest. lösen und 20 min bei 121°C autoklavieren,
auf pH 7,5 einstellen

Blutplatte:

Oxoid CM 55	
Fleischextrakt	10,0 g/l
Pepton	10,0 g/l
Natriumchlorid	5,0 g/l
Agar	15,0 g/l

5-10% defibriniertes Schafsblut

40,0 g der Reagenzien in 1 l A. dest. lösen und 15 min bei 121°C autoklavieren,
dann auf 50°C abkühlen und das Blut zufügen

Plate count-Nährboden:

Oxoid CM 325	
Caseinpepton	5,0 g/l
Hefeextrakt	2,5 g/l
Glukose	1,0 g/l
Agar	9,0 g/l

In 1 l A. dest. lösen und 15 min bei 121°C autoklavieren

VRBG-Agar (Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Glukose-Agar nach Mossel):

Oxoid 10275

Pepton aus Fleisch	7,0 g/l
Hefeextrakt	3,0 g/l
Natriumchlorid	5,0 g/l
D-Glukose	10,0 g/l
Gallesalzmischung	1,5 g/l
Neutralrot	0,03 g/l
Kristallviolett	0,002 g/l
Agar	13,0 g/l

Reagenzien in 1 l A. dest. lösen, schonend sterilisieren, nicht autoklavieren

SIM-Agar (Sulphide-Indole-Motility-Agar):

Oxoid CM 435

Caseinpepton	20,0 g/l
Pepton	6,1 g/l
Eisen(III)-ammoniumsulfat	0,2 g/l
Natriumthiosulfat	0,2 g/l
Agar	3,5 g/l

In 1 l A. dest. suspendieren und bis zum vollständigen Lösen erhitzen,
15 min bei 121 C° autoklavieren**Basalmedium für die Kohlenhydratspaltung:**

Peptonbouillon	100 ml
Bromthymolblau-Lösung	1,2 ml

Gemisch 10 min bei 121°C autoklavieren und abkühlen lassen,
1%iger Kohlenhydratzusatz und 10 min auf 100°C erhitzen,
auf pH 7,2 einstellen**Bromthymolblau-Lösung:**

Bromthymolblau	1,0g
10 M NaOH	25 ml
A. dest.	475 ml

Katalase-Reagenz:3% ige H₂O₂-Lösung**Pyrolidonylarylamidase-Test:**

Oxoid PYR Test DR580M

Latexagglutinations-Test:

Oxoid DR575M

Gramfärbung:

Ausstrich lufttrocknen lassen

vollständig mit Karbolgentianaviolett bedecken, 3 min färben, abschütten,

vollständig mit Lugolscher Lösung bedecken, 2 min einwirken lassen, abschütten,

in Alkohol 2-3 min entfärben, abspülen mit Wasser,

nachfärben mit Fuchsin, 15 sec, abspülen und trocknen

3.1.1.2 Stammsammlung

BHI-Bouillon (Brain-Heart-Infusion-Bouillon):

Oxoid CM 225	
Kalbshirnininfusion	12,5 g/l
Rinderherzinfusion	5,0 g/l
Proteose-Pepton	10,0 g/l
Dextrose	2,0 g/l
NaCl	5,0 g/l
Dinatriumphosphat	2,5 g/l

In 1 l A. dest. Lösen und 15 min bei 121°C autoklavieren,
auf pH 7,4 einstellen

3.1.1.3 Resistenztestung

Müller-Hinton-Bouillon:

Oxoid CM 405	
Rindfleisch	2,0 g/l
Caseinhydrolysat	17,5 g/l
Stärke	1,5 g/l

In 1 l A. dest. lösen und 15 min autoklavieren

Müller-Hinton-Agar:

Oxoid Cm 337	
Rindfleisch	2,0 g/l
Caseinhydrolysat	17,5 g/l
Stärke	1,5 g/l
Agar	11,0 g/l

In 1 l A. dest. lösen und 15 min autoklavieren,
supplementieren mit entsprechenden Antibiotika (siehe unten)

Antibiotika:

Vancomycin Hydrochlorid V-2002 (Sigma)

Teicoplanin Sodium Salt 0172/2 (Hoechst-Roussel Vet GmbH)

Avoparcin Sulfate Analytical Standard D192-167-L3 (Roche)

Referenzstämme:

70/90	E. faecium	MHK: Avo 64 µg/ml, Vanco 256 µg/ml, Teico 64 µg/ml
1529	E. faecalis	MHK: Avo 256 µg/ml, Vanco 256 µg/ml, Teico 64 µg/ml
ATCC 6057	E. faecium	sensibel gegen Vancomycin, Teicoplanin und Avoparcin
DSM 2570	E. faecalis	sensibel gegen Vancomycin, Teicoplanin und Avoparcin

Mc FARLAND Standard No. 0,5:

1%ige BaCl ₂ -Lösung	0,05 ml
1%ige HS ₂ O ₄ -Lösung	9,95 ml

3.1.1.4 Reagenzien und Lösungen für die Elektrophorese

physiologische Kochsalzlösung:

0,9%ige NaCl-Lösung

Lysozymstammlösung:

Lysozym 10,0 mg
0,05 M Tris- HCl- Puffer 0,1 ml

Stammpuffer pH 6,8:

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan 6,06 g
Natriumdodecylsulfat (SDS) 0,4 g
Natriumazid (NaN_3) 0,01 g
Mit A. bidest. auf 80 ml auffüllen,
anschließend mit 4 mol/l HCl auf pH 6,8 einstellen
und mit A. bidest. auf 100 ml auffüllen

Nichtreduzierender Probenpuffer (Nonred. P.):

SDS 1,0 g
EDTA 3,0 mg
 NaN_3 0,01 g
Bromphenolblau 10,0 mg
Stammpuffer 2,5 ml
Mit A. bidest. auf 100 ml auffüllen,
mit 4 mol/l HCl auf pH 6,8 einstellen

Reduzierender Probenpuffer (Red. Prob. P.):

Nonred. P. (siehe oben) 10 ml
Dithiothreitol (DTT)-Lösung (Pharmacia Biotech) 100 μl

Dithiothreitol-Stammlösung (DTT-Lösung):

DTT 250 mg
In 0,5 ml A. bidest. lösen,
direkt vor Gebrauch herstellen

Polyacrylamidgel:

ExcelGel SDS Fertiggele Pharmacia Biotech
Gradient 8-18%
lot 80-1255-53

Pufferstreifen:

ExcelGel SDS Buffer Strips Pharmacia Biotech
Lot 17-1342-01

Marker:

LMW-Electrophoresis Calibrator Kit Pharmacia Biotech
Lot 6080446011

Farbstoff:

PhastGel-Blue R 350 Pharmacia Biotech
Code Nr. 17-0518-01

Färbelösung:

Coomassie R 350 Pharmacia Biotech	1 Tablette
10 %ige Essigsäure	2000 ml

Fixationslösung:

Coomassie R 350 Pharmacia Biotech	0,005 g
Ethanol	90 ml
H ₂ O	180 ml
10% Essigsäure	30 ml

1 h bei Raumtemperatur schütteln

Entfärbelösung:

10% Essigsäure

Präservierungslösung:

Glycerol	25 ml
A. bidest.	225 ml

Zellophanfolie:

Cellophane sheet Pharmacia Biotech
PKG 50

3.1.2. Arbeitsgeräte**Arbeitsgeräte für die Anzucht und Isolierung:**

Eppendorf-Pipetten verschiedener Größen (Eppendorf)
Schraubkappenröhrchen, 2 ml Volumen
Brutschrank (Heraeus Instruments, BK 6160)
Tiefkühlschrank Herafreeze (Heraeus Instruments)
Wasserbad Typ 3047 (Köttermann)
Multipoint A400 (Pharmacia Biotech)
Mikrotiterplatten U-rund mit Deckel (Greiner Labortechnik, 655101)
Photometer (Carl Zeiss, Jena)
Anaerobiersystem, Gaspack (Becton-Dickinson)
Mikroskop Zeiss (Carl Zeiss, Jena)
Reagenzschüttler (Heidolph)
Feinwaage (Sartorius GmbH Göttingen)

Arbeitsgeräte für die Elektrophorese:

Tischzentrifuge Biofuge 13 (Heraeus Instruments GmbH, 219399)

Multiphor II, Elektrophoresekammer (Pharmacia Biotech)

Elektrophoresis Power supply EPS 3500 (Pharmacia Biotech)

Färbeautomat Hoefer Automated Gel Stainer (Pharmacia Biotech)

Eppendorf Thermomixer 5436 gleichzeitig als Wärmeblock genutzt (Eppendorf)

Kühlzentrifuge GC 122 (Heraeus Instruments)

Duran Zentrifugengläser 50 ml (Schott-Mainz)

Eppendorf Reaktionsgefäße 1,5 ml (Eppendorf 0030120.086)

Scanner Eagle eye (Stratagene)

Bearbeitungs- und Auswertesoftware: GelCompare 3.1 (Applied Math, Kortrijk, Belgium)

3.1.3 Untersuchungsmaterial

3.1.3.1 Probenentnahme

Die untersuchten Proben stammten aus 5 konventionellen Geflügelmastbetrieben und 3 ökologisch orientierten kleinbäuerlichen Betrieben (6 Herden) mit Geflügelproduktion im Raum Norddeutschland. Die Zeitspanne der Probenentnahme lag zwischen dem 24.2.97 und 1.9.97. Angaben über Vorbehandlungen der Elterntiere und Bruteier in den Zucht-, Eiproduktions- und Bruteibetrieben existierten für beide Haltungsformen nicht.

Die Tiere der drei kleinbäuerlichen Betriebe waren zwischen 6 und 8 Wochen alt, die untersuchten 6 Herden wiesen eine Größe von 2000-3000 Tieren auf. Die Fütterung bestand größtenteils aus betriebseigenen Futtermitteln. Das Grundprinzip der ökologischen Aufzucht schließt den prophylaktischen Einsatz von Antibiotika aus. Fütterungsarzneimittel sowie Leistungsförderer werden folglich nicht eingesetzt. Allerdings wird zur Kokzidienprophylaxe in den ersten Lebensstagen Monensin verwendet.

In den ökologisch orientierten kleinbäuerlichen Betrieben wurden die Futter- und Umgebungsproben am Schlachttag gezogen. Die Schlachtung der Herden 1-4 fand jeweils im Anschluß an Herden aus konventioneller Haltung im gleichen Schlachthof statt. Die Schlachtung der Herden 5 und 6 erfolgte als Hofschlachtung.

Die Herden der konventionellen Großbetriebe umfaßten jeweils zwischen 23 000 und 24 000 Tiere, die zum Zeitpunkt der Schlachtung ein Alter von 34-35 Tagen besaßen. Diese Vögel wurden vom ersten bis zum sechsten Lebenstag mit dem Kükenstarter Apralan (Aminocyclitol-Antibiotikum) und mit dem Kokzidiostatikum Monensin vorbehandelt. Zusätzlich wurde Herde 7 mit Neomycinsulfat für drei Tage (23.-26. Tag) und Herde 2 mit Colistinsulfat für ebenfalls drei Tage (25.-27. Tag) therapiert.

In den konventionellen Geflügelmastbetrieben wurden die Futter- und Umgebungsproben bei der Schlachtgeflügeluntersuchung einen Tag vor der Schlachtung entnommen. Die Schlachtung aller konventionell gehaltener Herden fand im gleichen Schlachthof statt.

Um ein möglichst breites Spektrum zu erfassen, wurden die Proben aus den Bereichen Stall, Schlachthof und Lebensmittelendprodukt entnommen. Bei den Proben aus dem Stall handelte es sich um Kot-, Futter-, Tränke- und Staubproben. Im Schlachthof wurden Abstriche der Transportkisten und der Kloaken sowie Brühmaschinen-, Rupfmaschinenabwasser- und Schlachtierkörperproben entnommen. Eine zusammenfassende Auflistung der Probenentnahmestellen enthalten Tab. 11 a und 11 b.

Alle Proben wurden auf dem Transport vom Probenentnahmeort zum Labor gekühlt.

Tabelle 11 a: Probenanzahl und Entnahmestellen pro Herde, kleinbäuerliche Haltung

Entnahmestelle	Herde 1	Herde 2	Herde 3	Herde 4	Herde 5	Herde 6
Futter	1	1	1	1	1	1
Tränke	1	1	1	1	1	1
Staub	1	1	1	1	1	1
Kot	5	5	5	5	4	4
Transportkistenabstr.	3	3	3	3	-	-
Kloakenabstrich	3	3	3	3	4	4
Brühbottich	1	-	-	-	1	1
Rupfmaschine	1	-	-	-	1	1
Broiler	5	5	5	5	2	2

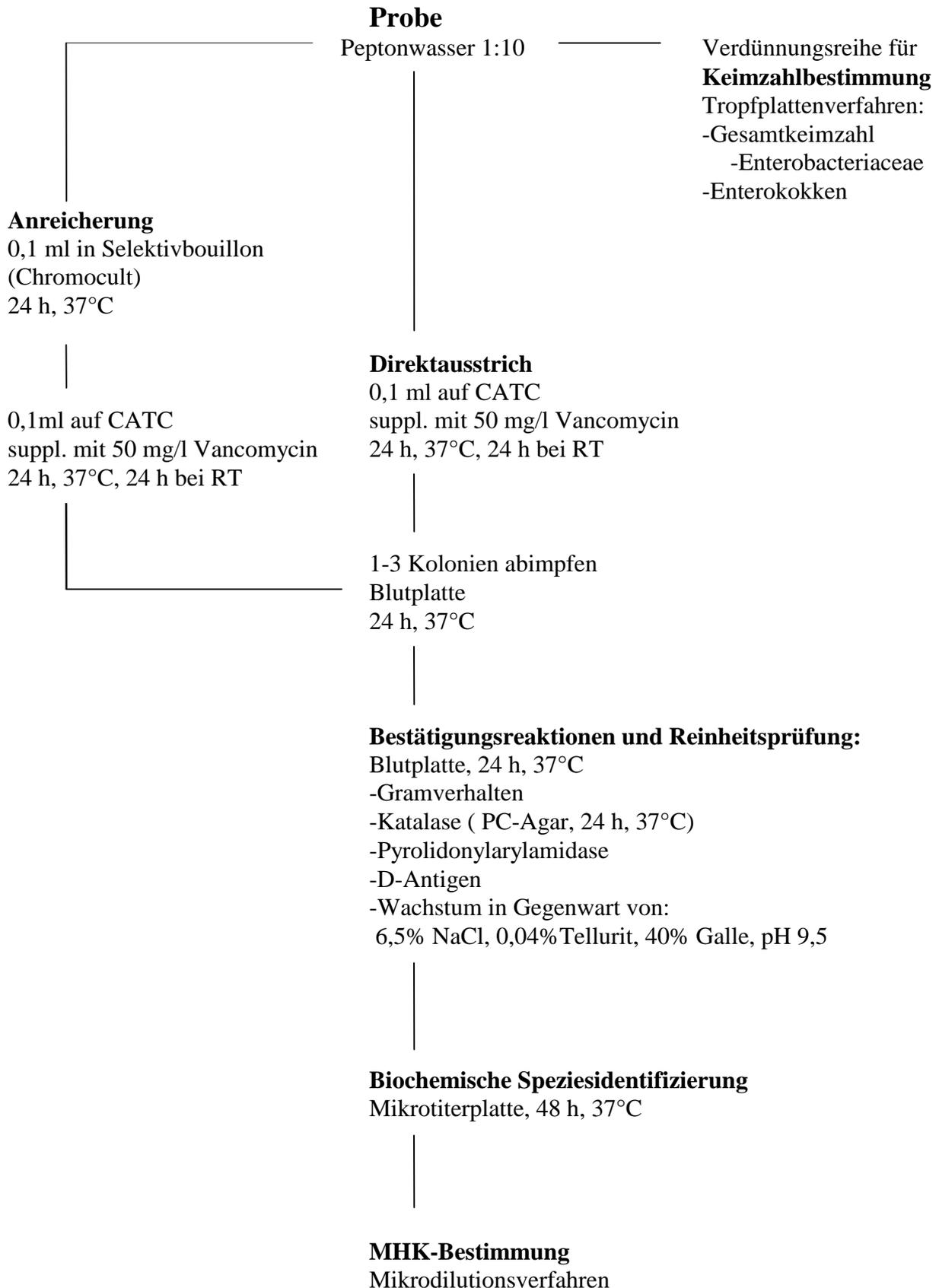
Tabelle 11 b: Probenanzahl und Entnahmestellen pro Herde, konventionelle Haltung

Entnahmestelle	Herde 7	Herde 8	Herde 9	Herde 10	Herde 11
Futter	1	1	1	1	1
Tränke	1	1	1	1	1
Staub	1	1	1	1	1
Kot	5	5	5	5	5
Transportkistenabstr.	3	3	3	3	3
Kloakenabstrich	5	5	5	5	5
Brühbottich	1	1	1	1	1
Rupfmaschine	1	1	1	1	1
Broiler	5	5	5	5	5

3.2 Methode

3.2.1 Probenaufarbeitung

Die insgesamt 223 genommenen Proben wurden nach folgendem Fließschema untersucht:



Alle Proben wurden direkt und, parallel dazu nach einer Anreicherung in einem Selektivmedium (Chromocult-Bouillon), auf mit 50 mg/l Vancomycin supplementiertem CATC- Agar ausgespatelt, 24 h bei 37°C und anschließend 24 h bei Raumtemperatur bebrütet. Die Enterokokken reduzieren das 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid zu roten Formazan. Dadurch nehmen die Kolonien einen roten Farbton an. Diese Reaktion wird durch Lichteinwirkung verstärkt.

Bei festem Material wurde jeweils 1 g Probe in 9 ml NaCl mittels Reagenzschüttler gelöst und verarbeitet. Die Schlachtkörper wurden eine Minute lang in Peptonwasser (Menge: jeweils die Hälfte des Schlachtkörpergewichtes in ml) in einem Plastikbeutel geschüttelt, um die Oberflächenkeime für die weiteren Untersuchungen abzuschwemmen. Die Abstriche sind in 4,5 ml NaCl aufgeschwemmt worden. Von diesem Ausgangsmaterial wurden 0,1 ml auf den Selektivnährboden gegeben und 1 ml in die Anreicherungsbouillon überführt.

Dieser Versuchsaufbau diente zur Isolierung Vancomycin-resistenter Enterokokken (VRE). Im nächsten Schritt wurden einzelne rosa- oder pinkfarbene Kolonien von dem CATC-Selektivnährboden auf die Blutplatte überführt. Bei enterokokkenspezifischem Wachstum auf der Blutplatte (2-3 mm Durchmesser, α -Hämolyse, rund, glatt, glänzend, grau-weiß bis gelblich) ließen sich anschließend die enterokokkencharakteristischen Kriterien überprüfen. Diese sind: Gramverhalten, Pyridonylarylamidase, D-Antigen, Wachstum bei NaCl-Konzentration von 6,5%, pH 9,5 sowie bei 40% Galle, Wachstum bei 0,04% Tellurit, Pigmentation und Beweglichkeit.

Zur Überprüfung des Gramverhaltens wurde jedes Isolat auf einem Objektträger ausgestrichen und nach Gram gefärbt. Gram-positive Bakterien erschienen blau.

Für den Pyrase-Test wurden 3-4 Kolonien auf eine der Reaktionskarten ausgestrichen, so daß ein deutlicher Fleck entstand. Drei Tropfen Puffer wurden auf die Testfläche getropft und die Karte 5 min inkubiert. Anschließend wurden drei Tropfen Farbwentwickler auf die Testfläche gegeben. Nach ca. 20 sec zeigte eine Rotfärbung die Pyrase-Aktivität an.

Zur Überprüfung des D-Antigens wurden 2-5 Kolonien in ein Extraktionsenzym einpipettiert und 10 min bei 37°C inkubiert. Ein Tropfen dieses Extraktionsenzym wurde mit einem Tropfen Latexreagenz auf einer Reaktionskarte gemischt und 30 sec geschwenkt. Nach 1 min manifestierte sich ein positives Ergebnis als deutliche Agglutination.

Für die Überprüfung des Wachstums bei pH 9,5 und NaCl 6,5% wurde eine BHI-Bouillon mit einer Kolonie beimpft und 24 h bei 37°C bebrütet. Von dieser Bouillon wurden 0,1 ml in eine mit NaCl supplementierte und 0,1 ml in eine auf pH 9,5 eingestellte BHI-Bouillon gegeben. Nach 48 h Bebrütung bei 37°C gilt eine Trübung der Bouillon mit Bodensatzbildung als positives Ergebnis.

Zur Testung der Galletoleranz wurde eine Kolonie auf einer Viertelplatte eines Galle-Äsculin-Nährbodens ausgestrichen. Nach 24 h Bebrütung bei 37°C zeigten sich im positiven Fall kleine schwarze Kolonien auf braungefärbtem Nährboden.

Für die Überprüfung der Tellurit-Toleranz wurde eine Kolonie auf ein Viertel eines PC-Agars mit 0,04% Telluritzusatz geimpft. Nach 24 h Bebrütung wurde das Wachstum von kleinen grauen oder schwarzen Kolonien als positives Resultat gewertet.

Um die Pigmentation und die Katalaseaktivität zu testen, wurde eine PC-Agar-Platte beimpft. Die Pigmentation prägte sich nach 24 h Bebrütung bei 37°C und anschließendem Stehenlassen der Platte bei Raumtemperatur am deutlichsten aus.

Für die Überprüfung der Katalasereaktion wurde eine Kolonie auf einem Objektträger in einen Tropfen 3% H₂O₂ eingerieben. Enterokokken besitzen keine Katalaseaktivität, so daß hier keine Schaumbildung entstand.

Die Überprüfung der Beweglichkeit erfolgte im SIM-Medium. Das Röhrchen wurde mit einer Kolonie im Stich beimpft und 48-60 h bei 37°C bebrütet. Bei Beweglichkeit bildete sich ein gläserbürstenartiges Wachstum aus.

Vor der abschließenden Speziesidentifizierung über die Biochemie und der Bestimmung des Resistenzverhaltens wurde eine Reinheitsprüfung der isolierten Kolonien durchgeführt. Hierfür wurde nochmals eine Blutplatte mit einer der zu untersuchenden Kolonieart im Verdünnungsausstrich beimpft, 24 h bei 37°C bebrütet und makroskopisch auf einheitliches Aussehen der Kolonien untersucht.

3.2.2 Probenbezeichnung

Die untersuchten Proben wurden fortlaufend von 1-223 nummeriert. Die in die weiteren Untersuchungen eingehenden VRE-positiven Proben behielten ihre Nummer bei. Aus den einzelnen VRE-positiven Proben hervorgehende Stämme wurden zusätzlich mit fortlaufenden, kleinen Buchstaben belegt.

3.2.3 Bestimmung der Keimzahl

Im Tropfplattenverfahren nach §35 LMBG wurden die Gesamtkeimzahl, Enterobacteriaceae- und Enterokokkenkeimzahl bestimmt.

Mit Peptonwasser wurde eine Dezimalverdünnungsreihe hergestellt. Jeweils 0,05 ml der erhaltenen Verdünnungsstufen wurden im Doppelansatz auf die Nährböden aufgetropft, bebrütet und ausgezählt. Bei der Berechnung der Keimzahl pro ml oder g fanden die niedrigste auswertbare und die nächst höhere Verdünnungsstufe Berücksichtigung. Die Berechnung der Keimzahl erfolgte nach folgender Gleichung:

$$\bar{C} = \frac{\sum c}{n_1 \cdot 1 + n_2 \cdot 0,1} d$$

Hierin bedeuten:

- \bar{C} = gewogenes arithmetisches Mittel
- $\sum c$ = Summe der Kolonien aller Sektoren, die zur Berechnung herangezogen werden (niedrigste und nächsthöhere auswertbare Verdünnungsstufe)
- n_1 = Anzahl der Sektoren der niedrigsten auswertbaren Verdünnungsstufe
- n_2 = Anzahl der Sektoren der nächsthöheren Verdünnungsstufe
- d = Faktor der niedrigsten ausgewerteten Verdünnungsstufe; hierbei handelt es sich um die auf n_1 bezogene Verdünnungsstufe

Die Keimzahl je g ergibt sich durch Multiplikation des C-Wertes mit dem Verdünnungsfaktor.

3.2.4 Auswahl der vancomycinresistenten Enterokokken

Von jeder bewachsenen CATC-Platte wurden je 1-3 rosa und/oder pinkfarbene Einzelkolonien auf eine Blutplatte und auf PC-Agar abgeimpft und diese 24 Stunden bei 37°C bebrütet. Zeigte die CATC-Selektivplatte ausschließlich das Wachstum nur einer Kolonieart, wurden mindestens zwei Einzelkolonien überimpft. Nach diesem Vorgehen wurden aus 134 VRE-positiven Proben 281 VRE-Stämme gewonnen.

Diese Kolonien sind auf Gramverhalten, Hämolyse und Katalase untersucht worden. Alle Isolate, die sich hierbei als gram-positive Kokken, katalase-negativ und mit einer α -Hämolyse zeigten, wurden auf Wachstum in Gegenwart von Galle, 6,5% NaCl, pH 9,5, 0,04% Tellurit, Pyrolydonylarylamidase, D-Antigen, Pigmentation und Beweglichkeit untersucht und anschließend biochemisch differenziert. Die angewandten Tests mit zusätzlich benutzten Reagenzien und ihre Auswertung (= positiven Reaktionen) sind in Tabelle 12 dargestellt.

3.2.5. Differenzierung der Spezies

Nach Isolierung und Bestätigungsreaktionen wurde eine biochemische Differenzierung in der Mikrotiterplatte durchgeführt. Als Grundlage für die Auswertung diente die Kohlenhydratfermentation der Isolate. Die entsprechenden Platten wurden im Labor angefertigt (FACKLAM u. COLLINS 1989). Sie enthielten 23 der zu überprüfenden Reaktionen und eine Wachstumskontrolle, die Kohlenhydrate wurden dem Basalmedium in 1%iger Konzentration beigelegt.

Zur Differenzierung wurde eine Einzelkolonie auf eine Blutplatte abgeimpft und 24 Stunden bei 37°C bebrütet. Mehrere Kolonien dieser Reinkultur wurden in 3 ml steriles A. dest. eingerieben bis eine leichte Trübung entstand. Anschließend wurden 0,1 ml dieser Suspension jedem Reaktionsnöpfchen der Platte zugeführt und diese 48 h bei 37°C bebrütet.

Alle durchgeführten biochemischen Tests, Ablesetag und zusätzliche Reagenzien sowie ihre Auswertung sind ebenfalls in Tabelle 12 aufgeführt.

Tab.12: Angewandte biochemische Tests und mikroskopische Untersuchung zur Identifizierung der Enterokokkenspezies

Test	Ablesetag	Zusätzliches Reagenz	Auswertung (Positive Reaktionen)
Gramfärbung	sofort		gram-pos. Kokken
α -Hämolyse	1 d	Blutplatte	Zonenbildung
Katalase	sofort	H ₂ O ₂	Blasenbildung
Pigmentation	1-2 d	Blutplatte	gelbes Pigment
D-Antigen	sofort	Latexreagenz	Agglutination
Pyrase-Test	sofort	Farbentwickler	Rotfärbung
Beweglichkeit	48-60 h	SIM-Medium	Bürstensaum
Wachstum in Gegenwart von:			
pH 9,5	3 d		Trübung
6,5% NaCl	3 d		Trübung
0,04% Tellurit	1 d		Schwarzfärbung
40% Galle	1 d	Galle-Äsculin-Agar	Braunfärbung
			Farbumschlag des Indikators nach:
Alkal. Phosphatase	2 d		gelb
Säure aus:			
Arginin	2 d	Paraffinverschluß	blau
Adonitol	2 d		gelb
L-Arabinose	2 d		gelb
D-Arabitol	2 d		gelb
Calcium-Gluconat	2 d		gelb
Glycerin	2 d		gelb
Inulin	2 d		gelb
2-Ketoglu.	2 d		gelb
Mannitol	2 d		gelb
α -Met.-D-Glukosid.	2 d		gelb
L-Sorbose	2 d		gelb
Melibiose	2 d		gelb
Sorbitol	2 d		gelb
Succrose	2 d		gelb
D-Xylose	2 d		gelb
L-Arabitol	2 d		gelb
Dulcitol	2 d		gelb
Inositol	2 d		gelb
Trehalose	2 d		gelb
α -Met.D-Man.	2 d		gelb
D-Raffinose	2 d		gelb
Rhamnose	2 d		gelb

3.2.6 Aufbewahrung der Stämme

Die durch die oben genannten Reaktionen als Enterokokken identifizierten Keime wurden bei -80°C eingefroren. Dafür wurden einer 24 h bebrüteten BHI-Bouillon 0,5 ml Glycerin zugesetzt und daraus 0,7 ml in ein steriles Schraubglasfläschchen mit Glaskugeln überführt und tiefgefroren.

3.2.7 Computergestützte Identifikation der Spezies

Die Auswertung aller biochemischen Ergebnisse erfolgte mittels computergestützter Keimidentifizierung unter Verwendung des EDV-Programmes „Bacmain“ (Entwicklung und freundliche Überlassung: Robert Koch-Institut Wernigerode, Dr. Clauss). Die Tabelle 13 zeigt als Grundlage der Auswertung die Wahrscheinlichkeiten (in Prozent) für einen positiven Test der betreffenden Spezies.

Tabelle 13: Grundlage für die Auswertung der biochemischen Ergebnisse bei der computergestützten Keimidentifizierung mit dem Programm „Bacmain“ (Dr. Clauss, Robert Koch-Institut, Wernigerode):

Test	E. faecalis	E. faecium-Gruppe	E. avium-Gruppe	E. gallinarium-Gruppe	E. cecorum-Gruppe
VP	85	85	85	85	85
Ribose	85	85	85	50	85
Pigmentation	15	50	15	50	15
Beweglichkeit	5	5	5	95	5
D-Antigen	85	65	50	85	15
Alk. Phos.	15	15	15	15	65
Arginin	85	85	15	85	15
Adonitol	15	15	85	15	15
Arabinose	15	50	65	85	50
D-Arabitol	15	15	85	15	50
L-Arabitol	15	15	50	15	15
Dulcitol	15	15	50	15	15
Gluconat	65	50	65	50	85
Glycerin	85	15	50	50	15
Inulin	15	15	15	15	85
α-Ketogluk.	50	15	85	15	50
Mannitol	85	50	85	85	50
Melibiose	15	50	50	85	50
α-Met-D-Gluko.	15	15	85	85	50
D-Raffinose	15	50	65	50	85
Sorbitol	65	35	85	65	50
L-Sorbose	15	15	85	15	15
D-Xylose	35	50	35	85	50

3.2.8 MHK-Bestimmung der VRE-Isolate in der Mikrotiterplatte

Die Prüfung der Antibiotikaempfindlichkeit erfolgte im Mikrodilutionsverfahren (DIN 58 940 1996) durch Ermittlung der minimalen Hemmstoffkonzentration. Von der Blutplatte wurden 5 ml Müller-Hinton-Bouillon mit 4-5 Einzelkolonien der zu testenden Stämme beimpft. Anschließend wurde die Bouillon im Schüttelbad bebrütet, bis bei Trübungsmessungen der McFARLAND-Standard Nr.0,5 erreicht war. Dieser Standard entspricht einer Keimzahl von $1,5 \times 10^8$ Keime pro ml Bouillon.

Tabelle 14: Herstellung der Bariumsulfat-Trübungsreihe nach McFARLAND (nach BURKHARDT 1992)

Standard	0,5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
BaCl ₂ (1%ig) (ml)	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
H ₂ SO ₄ (1 ml)	9,95	9,9	9,8	9,7	9,6	9,5	9,4	9,3	9,2	9,1	9,0
Bakterienkeimzahl/ml ($\times 10^8$)	1,5	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30

1 ml dieser Bouillon wurde mit 9 ml steriler NaCl verdünnt und davon 0,02 ml in jedes Nöpfchen einer U-Mikrotiterplatte als Stempelvorlage pipettiert.

Unter Verwendung eines A400 Multipoint Inoculators wurden die mit antibiotikahaltigem Nährböden beschickten Mikrotiterplatten mit 1 µl der hergestellten Verdünnung pro Nöpfchen beimpft. Die Keimdichte des Inokulats betrug zwischen 10^6 und 10^7 Keimen pro ml. Die Ablesung der Platten erfolgte nach 24 und 48 Stunden. Die Anordnung der Glykopeptidkonzentrationen im Nährboden sind in Abbildung 4 dargestellt. Bei diesem Vorgehen können pro Mikrotiterplatte max. 3 Stämme auf ihre Antibiotikaempfindlichkeit getestet werden. Pro Testansatz wurden jeweils zwei sensible Kontrollstämme (DSM 2570, E. faecalis und ATCC 6057, E. faecium) und zwei resistente Kontrollstämme (ATCC 70/90, E. faecium und DSM 1528, E. faecalis) mitgeführt.

Abb.4: Anordnung der Glykopeptidkonzentrationen (µg/ml) auf der Mikrotiterplatte

Avo.	Vanco.	Teico.	Avo.	Vanco.	Teico.	Avo.	Vanco.	Teico.
256	256	256	256	256	256	256	256	256
128	128	128	128	128	128	128	128	128
64	64	64	64	64	64	64	64	64
32	32	32	32	32	32	32	32	32
16	16	16	16	16	16	16	16	16
8	8	8	8	8	8	8	8	8
4	4	4	4	4	4	4	4	4
WK	WK	WK	WK	WK	WK	WK	WK	WK

WK = Wachstumskontrolle

3.2.9 Elektrophoretische Analyse

3.2.9.1 Gewinnung der löslichen Zellproteine

Die Gewinnung der Bakteriensuspension erfolgte von Blutplatten, die 24 h bei 37°C aerob bebrütet worden waren. Die Kolonien wurden mit 5 ml steriler 0,9% NaCl abgespatelt, in sterile Zentrifugengläser überführt, mit steriler NaCl-Lösung austariert und 20 min bei 3800g zentrifugiert. Nach Absaugen und Verwerfen des Überstandes wurde dieser Vorgang zweimal wiederholt. Das so gewonnene Pellet wurde mit 0,01 ml Homogenitätspuffer resuspendiert, in Eppendorfgefäße überführt, gemischt und bei -20°C tiefgefroren.

Durch Zugabe von Lysozymstammllösung, eine zehnmünütige Inkubation bei 95°C im Wärmeblock und anschließender Zentrifugation (10 min 3800g) wurden die Bakterien zur Proteingewinnung aufgeschlossen. Der Überstand wurde in Eppendorfgefäße überführt und entweder direkt für die Elektrophorese eingesetzt oder bei - 20°C eingefroren.

3.2.9.2 Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid (SDS)-Gelelektrophorese

Es wurde eine horizontale Polyacrylamidgelelektrophorese durchgeführt, wobei Tris-Glycin-Gradientengele mit einer Konzentration von 8-18% Polyacrylamid eingesetzt wurden. Verwendet wurden Fertiggele mit 22 Taschen und Fertigpufferstreifen.

Bei der Vorbehandlung der Proben wurden 50 µg Feuchtwicht der Prüfstämme in 450 µl Red. Prob.-Puffer aufgelöst und geschüttelt. Es wurden eine 1:10 und eine 1:20 Verdünnung hergestellt. Zu beiden Verdünnungen wurden jeweils 5 µl Lysozym zugesetzt und 30 min bei 37°C im Thermomixer inkubiert. Allen Proben, außer dem Marker, wurde 50 µl 20% SDS-Lösung zugefügt und diese Mischung 3-5 min bei 95°C im Thermomixer gekocht. Anschließend erfolgte nochmals eine zehnmünütige Zentrifugation der Proben bei 6000g und der unverzügliche Einsatz des Überstandes im Versuch oder Einfrieren bei -20°C.

Jeweils 2 µl der Proben, der Kontrollstämme und des Markers wurden auf das Gel aufgetragen. Der Marker wurde immer auf die Positionen 1, 8, 15 und 22 gebracht, die Kontrollen auf Positionen 2 bis 5.

Die angelegte elektrische Spannung betrug zu Beginn der Laufzeit 240 V und am Ende der 75-80 minütigen Laufzeit ca. 740 V. Während der gesamten Elektrophorese wurde eine Stromstärke von 50 mA konstant gehalten.

Nach der Lösung des Gels von der Elektrophoresekammer wurden die Proteinbanden im Färbeautomaten mit Colloidal Coomassie blue (Tabelle 15) gefärbt.

Tabelle 15: Verfahrensschritte im Färbeautomaten zur Anfärbung der Proteinbanden im Elektrophorese-Gel (zu Reagenzien siehe 3.1.1.4)

Schritt-Nr.:	Lösung	Zeit
1	Fixierung	20 min
2	Entfärber	2 min
3	0,02% Coomassie-blue	60 min
4	Entfärber	10 min
5	Entfärber	30 min
6	Entfärber	80 min
7	Entfärber	80 min
8	Präservierung	über Nacht

Das Gel verblieb über Nacht in einer Präservierungslösung und wurde anschließend mit Zellophanfolie bespannt. Die Trocknung erfolgte direkt im Anschluß an den Färbevorgang 24 h bei Raumtemperatur. Danach konnte die überstehende Folie abgeschnitten und das Gel beschriftet werden.

3.2.10 Computerunterstützte Auswertung der Gele

Für die Auswertung wurden die Gele mit Hilfe eines Scanners in den PC übertragen. Die Weiterbearbeitung erfolgte mit dem Programm Gelcompar 3.1 (VAUTERIN et al. 1991). Dieses Computerprogramm dient der Auswertung von Gelen mit so vielen Banden, daß ein Vergleich mit dem bloßen Auge nur eingeschränkt möglich ist. Die Software besteht aus drei unterschiedlichen Programmteilen, die bei der Bearbeitung eines Gels nacheinander durchlaufen werden: Konvertierung, Normalisierung und Analyse.

Im Konvertierungsschritt wurden die sichtbaren Bahnen durch einen Rahmen festgelegt und durch eine schmale Linie die Laufstrecke densitometrisch erfaßt. Die Proteinbanden wurden für jede einzelne Bahn entlang der festgelegten Linie bestimmt. Jeder Bahn ordnete man den entsprechenden Genus-, Spezies- und Stammmamen zu. Die digitalisierten Rohdaten wurden für die weitere Bearbeitung gespeichert.

Um die Laufstrecken auf den Gelen untereinander vergleichen zu können, wurden sie im Normalisierungsschritt optimiert. Trotz gleicher Elektrophoresebedingungen entstehen unvermeidbare Längenunterschiede der Laufstrecken auf den verschiedenen Gelen, welche auf diese Weise ausgeglichen werden sollen. Alle untersuchten Stämme wurden hierfür an einem auf jedem Gel vierfach mitgeführten Standardmarker ausgerichtet. Die Auflösung der Laufstrecke wurde auf 800 Punkte im Densitogramm festgelegt, auf denen die vergleichende Analyse basierte.

Im Analyseschritt konnten die normalisierten Laufstrecken der Stämme miteinander verglichen werden und über die Berechnung der Ähnlichkeiten der Profile eine Einteilung in Gruppen (Cluster) erfolgen. Zur Erstellung eines Dendrogramms wurden die aufbereiteten Daten mit UPGMA (unweighted pair group method using average linkages) bearbeitet, einer Statistikmethode des Gelcompar 3.1 Computerprogramms. Bei dieser Methode wurden alle Versuchsergebnisse gleich gewichtet und die einzelnen Stämme immer paarweise miteinander verglichen. Die Proteinmuster sämtlicher Stämme wurden einander gegenübergestellt, wobei

die vollständige Laufstrecke der Proben durch eine Gesamtprofilanalyse erfaßt wurde. Die Zuordnung zu einem Cluster geschah, wenn die durchschnittliche Ähnlichkeit mit diesem größer war als die Ähnlichkeit mit einem anderen Cluster.

3.2.11 Polymerase Chain Reaktion (PCR): Restriktionsenzymanalyse

Bei der Restriktionsenzymanalyse werden Enzyme, sogenannte Restriktionsendonucleasen, eingesetzt, die an der DNA des zu prüfenden Stammes bestimmte Basensequenzen erkennen und sie hier zerschneiden. Es kann sowohl Plasmid-DNA als auch genomische DNA erfaßt werden. Durch die Gel-Elektrophorese lassen sich die erhaltenen Fragmente trennen. Die so entstandenen charakteristischen Bandenmuster werden miteinander verglichen und können visuell oder mit dem Computer ausgewertet werden.

50 ausgesuchte Stämme wurden am Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde der Justus-Liebig Universität, Gießen, in fünf zeitlich voneinander getrennten Ansätzen mittels den spezifischen Primern vanA I (5'-TCT GCA ATA GAG ATA GCC GC, Position 443-462) und vanA II (5'- GG AGT AGC TAT CCC AGC ATT, Position 819-800) auf das high-level Vancomycinresistenz codierende VanA-Gen untersucht (KLARE et al. 1995). Zur Prüfung der Spezifität des VanA-Gen-typischen Amplifikates wurde eine Restriktionsenzymanalyse vorgenommen.

Die Aufbereitung der DNA erfolgte nach AUSUBEL et al. (1990), wobei die DNA unter folgenden Reaktionsbedingungen mit Hilfe des Primers amplifiziert wurde:

Nach einer initialen Denaturierungsphase bei 94°C für 5 min folgten 35 Zyklen mit dem Profil 94°C für 45 sec zur Denaturierung, 39°C für 45 sec für die Annealingphase und 72°C für 2 min zur Synthese. Die Amplifikate wurden in 2%igen Agarose-Gelen bei 10 V/cm elektro-phoretisch dargestellt.

4. Ergebnisse

4.1 Methodische Erkenntnisse

In Vorversuchen waren verschiedene Materialien und Geräte erprobt und die Eignung einzelner Modifikationen für den Nachweis und die Identifikation Vancomycin-resistenter Enterokokkenspezies geprüft worden.

Bei der Auswahl der Selektivnährböden erzielte der CATC-Agar nach REUTER (Merck) die besten Ergebnisse. Die Begleitflora wurde weitgehendst gehemmt und die Enterokokken nahmen eine spezifisch rote Farbe an. Im Vergleich dazu erbrachten sowohl der Äskulin-Galle-Agar (Merck) als auch der Enterococcosel-Agar (Becton-Dikinson) und der Galle-Äskulin-Agar (Oxoid) weniger spezifische Ergebnisse, denn die Begleitflora wurde hier ungenügend gehemmt und die Identifizierung der Enterokokken gestaltete sich entsprechend schwierig.

Im Gegensatz zu den Angaben von REUTER (1992) sowie SCHLEIFER und KILPPER-BÄLZ (1984) wuchs *E. faecium* auf 0,04%igem Telluritnährboden, wobei sämtliche Isolate kleine, grau-schwarze Kolonien entwickelten.

Bei der Festlegung einer optimalen Vancomyckonzentration im Nährboden ist zu beachten, daß schwerpunktmäßig Keime mit hoher VanA-Resistenz erfaßt werden sollten. Diese Bedingung erfüllte eine Zugabe von Vancomycin 50 mg/l Substrat. In Vorversuchen erlaubte der Einsatz geringerer Mengen des Wirkstoffes (5-30 mg/l) ein Wachstum glykopeptidsensibler Enterokokken, die sich in untypisch kleinen Kolonien darstellten, was sich als Verharren in der lag- bzw. Anlaufphase interpretieren ließ (SCHLEGEL 1981). Die glykopeptidsensiblen Stämme zeigten nach Rekultivierung auf Vancomycin-freien Nährböden wieder ein physiologisches Wachstum in Form 2-3 mm großer, runder, glatter Kolonien.

Wegen der Bedienungsfreundlichkeit wurden die Prüfung der biochemischen Reaktionen (Tab. 12) und die Resistenztests in Mikrotiterplatten durchgeführt. Diese Platten wurden nach Anweisung gefertigt und dem Basalmedium Indikatoren sowie die entsprechenden Kohlenhydrate als 1%ige Zusätze hinzugefügt (Tabelle 12). Für die Resistenztestung fand Müller-Hinton Agar als Grundlage Verwendung, wobei die Antibiotika als wasserlösliche Zusatzstoffe in den entsprechenden Konzentrationen zugefügt wurden.

Zur Konservierung wurden die Platten bei -20°C bis zum Einsatz im Versuch eingefroren.

Für die elektrophoretischen Untersuchungen erwies es sich als vorteilhaft, horizontale Gradientengele zu verwenden, da sie eine optimale Auflösung und Trennschärfe gewährleisteten. Der Einsatz von selbst hergestellten Polyacrylamidgelen erschien unter der Maßgabe der Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit nicht angebracht.

Als geeignete Färbemethode empfahl sich die Coomassie-Färbung aufgrund ihrer einfachen Anwendung und hohen Empfindlichkeit. Die Färbeergebnisse waren zufriedenstellend, so daß sich der Einsatz aufwendigerer Methoden erübrigte.

4.2 Übersicht der Resultate

Die Untersuchung 223 verschiedener Proben aus Geflügelmastbetrieben und deren Umgebung erbrachte 134 VRE-positive Ergebnisse (= 60.1%). Während aus konventionellen Großbetrieben die Proben zu 87.8% VRE enthielten, fielen bei der kleinbäuerlichen Haltung lediglich 30,5% der Proben positiv aus (Tabelle 16).

Aus diesen 134 positiven Proben ließen sich insgesamt 281 unterschiedliche VRE-Stämme anzüchten. Bei den VRE-Isolaten handelte es sich ausschließlich um E. faecium-Stämme, die ein high-level Resistenzverhalten aufzeigten.

Tabelle 16: Häufigkeit VRE kontaminierter Proben

	n	VRE positive	%- Anteil
Kleinbäuerliche Haltung	108	33	30,5
Konventionelle Haltung	115	101	87,8
gesamt	223	134	60,1

VRE = Vancomycin-resistente Enterokokken

n = Probenzahl

Kleinbäuerlich = Betriebe mit ökologisch orientierter Aufzuchtmethode

Konventionell = Betriebe mit herkömmlicher, intensiver Mast

In den Tabellen 17 a und b wird der Prozentsatz an Proben, bei denen VRE nachgewiesen wurden, auf die 11 untersuchten Herden bezogen

Der Anteil VRE-positiver Resultate aus den kleinbäuerlich aufgezogenen Herden bewegte sich überwiegend zwischen 20 und 26% mit einem Extremwert von 63% (Herde 3). Bei den 5 konventionell aufgezogenen Herden lag die Häufigkeit VRE-positiver Ergebnisse stets über 73%.

Tabelle 17 a: VRE-positive Proben bei 6 Herden aus kleinbäuerlichen Betrieben mit ökologisch orientierter Aufzucht

Kleinbäuerl. Herde	Probenanzahl	VRE-positiv	%-Anteil
1.	21	5	23,8
2.	19	4	26,3
3.	19	12	63,1
4.	19	4	21,0
5.	15	3	20,0
6.	15	4	26,6

Tab. 17 b: VRE-positive Proben bei 5 Herden aus konventionellen Großbetrieben mit intensiv orientierter Aufzucht

Konventionelle Herde	Probenanzahl	VRE-positiv	%-Anteil
7.	23	23	100
8.	23	19	82,6
9.	23	20	86,9
10.	23	22	95,6
11.	23	17	73,9

4.3 Keimzahlen

Die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen, gegliedert nach den verschiedenen Entnahmestellen, finden sich in Tabelle 18. Mit den logarithmierten Werten der Keimzahlen je Gramm Probe wurden die Mittel- und Medianwerte sowie Minima und Maxima aufgeführt. Der Medianwert besitzt immer dann eine hohe Aussagekraft, wenn das Ergebnis einer oder mehrerer Proben unter der Nachweisgrenze des Verfahrens lag, d.h. beim Tropfplattenverfahren $\log < 2,00$ KbE/g.

Tabelle 18: Keimzahlen der untersuchten Proben (in log KbE/g oder ml)

	Gesamtkeimzahl		Enterobacteriaceae-Keimzahl		Enterokokken-Keimzahl	
	PC-Agar		VRBG-Agar		CATC-Agar	
	72 h, 37 C°, aerob		48 h, 30 C°, anaerob		24 h, 37 C°, aerob, 24 h RT	
	Kleinbäuerl	Konvent.	Kleinbäuerl	Konvent.	Kleinbäuerl	Konvent.
Entnahmestelle						
Futter	n = 6	n = 5	n = 6	n = 5	n = 6	n = 5
x min.	4,60	3,11	3,30	2,61	< 2,00 ⁽¹⁾	< 2,00 ⁽¹⁾
x max.	7,79	5,89	5,70	4,00	3,60	2,48
\bar{x}	5,67	4,25	3,66	2,85	2,67	2,11
\tilde{x}	5,47	3,6	3,04	2,30	2,00	2,00
Tränke	n = 6	n = 5	n = 6	n = 5	n = 6	n = 5
x min.	3,51	3,11	< 2,00 ⁽¹⁾	< 2,00 ⁽¹⁾	2,30	< 2,00 ⁽¹⁾
x max.	6,40	4,78	4,48	2,32	3,04	2,18
\bar{x}	4,51	3,71	2,98	2,00	2,5	2,04
\tilde{x}	4,87	3,11	2,5	2,00	2,35	2,00
Staub	n = 6	n = 5	n = 6	n = 5	n = 6	n = 5
x min.	5,60	5,51	2,30	< 2,00 ⁽¹⁾	< 2,00 ⁽¹⁾	2,70
x max.	7,20	6,70	4,00	2,26	4,48	4,72
\bar{x}	6,00	6,18	2,30	2,05	2,00	3,31
\tilde{x}	6,16	6,28	2,92	2,00	2,25	3,30
Kot	n = 28	n = 25	n = 28	n = 25	n = 28	n = 25
x min.	6,60	6,60	5,11	3,46	5,11	2,30
x max.	9,36	8,98	7,40	6,08	6,50	5,78
\bar{x}	8,55	7,43	6,44	5,19	5,95	3,61
\tilde{x}	8,39	7,15	6,40	5,40	5,83	3,34
Transportk.	n = 12	n = 15	n = 12	n = 15	n = 12	n = 15
x min.	4,60	5,90	< 2,00 ⁽¹⁾	4,00	2,30	2,48
x max.	6,46	8,69	6,00	7,79	6,81	5,50
\bar{x}	5,05	7,30	3,96	5,91	3,95	3,99
\tilde{x}	5,41	7,28	4,69	5,95	3,66	4,04
Kloakenab.	n = 20	n = 25	n = 20	n = 25	n = 20	n = 25
x min.	< 2,00 ⁽¹⁾	5,43	< 2,00 ⁽¹⁾	3,48	< 2,00 ⁽¹⁾	2,30
x max.	8,30	6,96	7,84	6,78	6,08	5,58
\bar{x}	6,03	6,07	4,88	5,33	3,50	3,85
\tilde{x}	5,89	6,00	4,93	5,48	2,93	3,68

	Gesamtkeimzahl		Enterobacteriaceae-Keimzahl		Enterokokken-Keimzahl	
	PC-Agar		VRBG-Agar		CATC-Agar	
	72 h, 37 C°, aerob		48 h, 30 C°, anaerob		24 h, 37 C°, aerob, 24 h RT	
	Kleinbäuerl.	Konvent.		Kleinbäuerl.	Konvent.	Kleinbäuerl.
Entnahme- stelle						
Brühbottich	n = 3	n = 5	n = 3	n = 5	n = 3	n = 5
x min.	2,48	6,64	< 2,00 ⁽¹⁾	3,48	< 2,00 ⁽¹⁾	2,78
x max.	8,34	7,94	5,15	4,30	2,48	3,80
\bar{x}	6,48	6,99	4,43	4,01	2,07	3,35
\tilde{x}	8,34	6,78	5,15	4,00	2,00	3,50
Rupfmasch.	n = 3	n = 5	n = 3	n = 5	n = 3	n = 5
x min.	4,04	6,60	5,51	4,38	< 2,00 ⁽¹⁾	3,40
x max.	8,30	7,81	6,15	5,04	4,38	4,34
\bar{x}	7,16	7,31	5,96	4,744	3,59	3,82
\tilde{x}	8,30	7,48	6,14	4,69	4,38	3,76
Broiler	n = 24	n = 25	n = 24	n = 25	n = 24	n = 25
x min.	3,48	3,48	3,30	< 2,00 ⁽¹⁾	< 2,00 ⁽¹⁾	< 2,00 ⁽¹⁾
x max.	6,43	5,55	6,43	5,95	5,26	3,58
\bar{x}	5,86	4,50	5,28	3,68	3,79	2,45
\tilde{x}	6,04	4,48	5,30	3,62	3,87	2,30

n = Anzahl der Proben

\bar{x} = Mittelwert (arithmetisches Mittel)

\tilde{x} = Medianwert (der Median halbiert die Reihe der nach ihrer Größe geordneten Daten)

x min = Minimalwert

x max = Maximalwert

(1) = Wert unter der Nachweisgrenze des Verfahrens

Zur Visualisierung der mikrobiologischen Profile der unterschiedlichen Entnahmestellen in Abhängigkeit von der Haltungsform erfolgt eine summarische graphische Darstellung der Mittelwerte in den Abbildungen 5 und 6.

Die Profile der beiden Haltungsarten im Vergleich zeigen ein ähnliches Verteilungsmuster der Keimzahlen in Abhängigkeit vom Entnahmeort. Die aerobe Gesamtkeimzahl schwankt zwischen 4,11 und 8,79 log KbE/g. Dabei liegen die Werte der kleinbäuerlichen Haltung tendenziell um ca. eine log-Einheit höher. Lediglich bei den Transportkisten und den Kloakenproben schnitten die konventionellen Haltungsformen schlechter ab.

Die Enterobacteriaceae kommen in größerer Besiedlungsdichte als die Enterokokken vor, eine Ausnahme bilden Staub und Tränke der konventionellen Haltung. Im Vergleich der beiden Haltungsformen besteht auch hier eine deutlich geringere Kontamination bei der konventionellen Haltung.

In beiden Betriebsformen weisen Proben aus Untersuchungsmaterial mit intensivem Kotkontakt (Transportkisten, Kloakenabstriche, Kot) eine vergleichsweise hohe Belastung mit Enterokokken auf.

Abb. 5: Mikrobiologisches Profil der Mittelwerte von Proben aus kleinbäuerlicher Haltung in Abhängigkeit von der Entnahmestelle

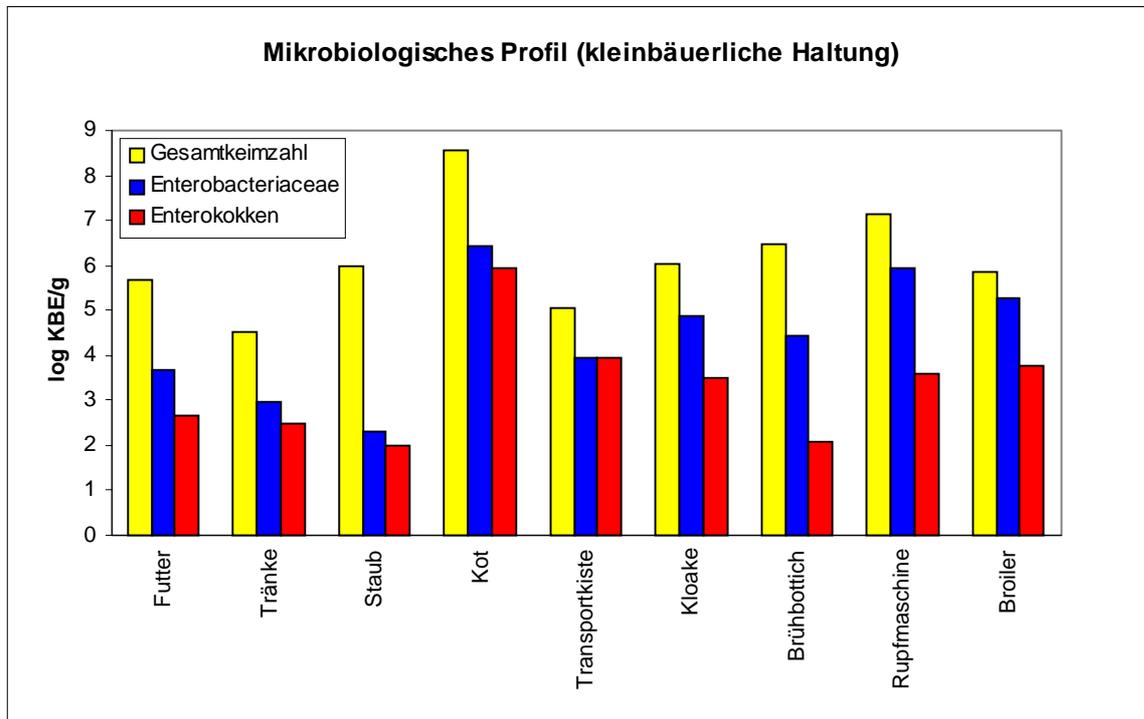
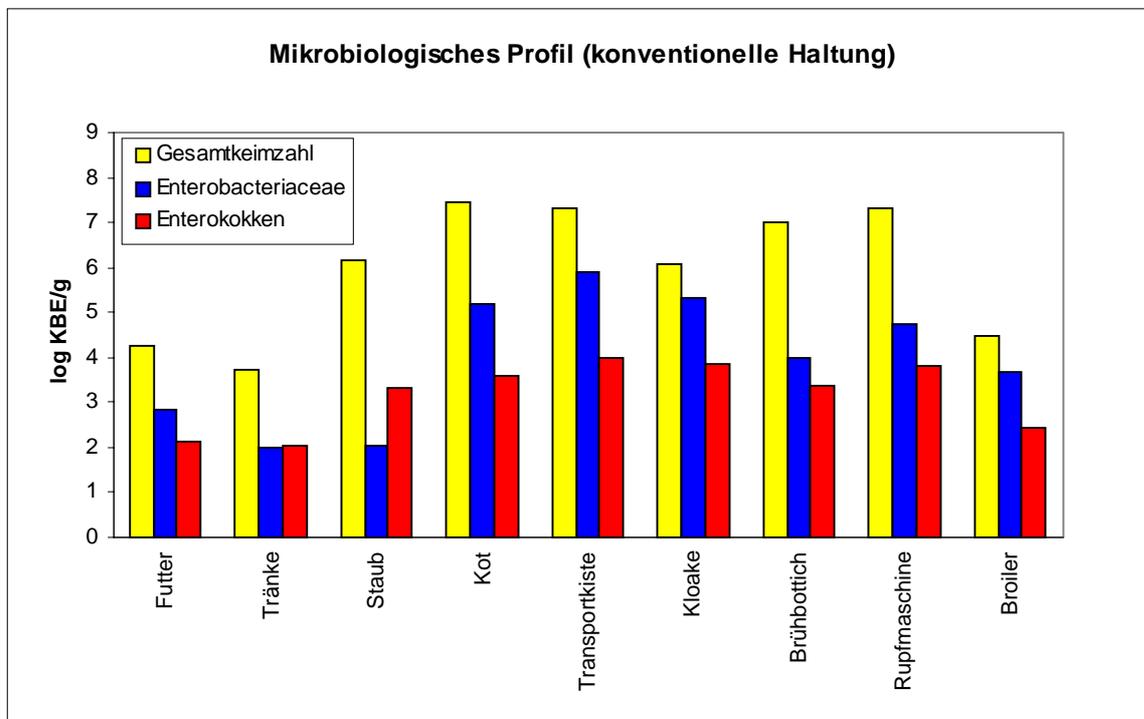


Abb. 6: Mikrobiologisches Profil der Mittelwerte von Proben aus konventioneller Haltungsform in Abhängigkeit von der Entnahmestelle



4.4 Vorkommen und Verteilung der VRE-Stämme

Tabelle 19 zeigt Vorkommen und Häufigkeit der isolierten VRE-Stämme in Abhängigkeit von der Produktionsart und den einzelnen Herden. Unter den VRE-positiven Isolaten war ausschließlich *E. faecium* vertreten. Andere nachgewiesene Enterokokkenspezies, wozu *E. casseliflavus*, *E. hirae*, *E. durans* und *E. faecalis* gehörten, erwiesen sich jedoch als vancomycinsensibel.

Tabelle 19: Isolierte VRE-Stämme in Abhängigkeit von Haltungsform und Herde (siehe Anhang)

Kleinbäuerliche Herden	Anzahl der isolierten VRE-Stämme
1.	10
2.	6
3.	10
4.	22
5.	4
6.	5

Konventionelle Herden	Anzahl der isolierten VRE-Stämme
7.	60
8.	46
9.	38
10.	45
11.	36

- VRE = Vancomycin-resistente Enterokokken (*E. faecium*)
 Kleinbäuerlich = Betrieb mit ökologisch orientierter Aufzucht der Herden
 Konventionell = Großbetrieb mit intensiv orientierter Aufzuchtmethod

Eine differenzierte Aufgliederung der Ergebnisse in Abhängigkeit von Haltungsform und Entnahmeort enthält Tabelle 20. In Tabelle 21 wird die Relation VRE-positiver Proben zur jeweiligen Gesamtprobenzahl unter zusätzlicher Berücksichtigung der Herden aufgeführt. Die Aufstellungen verdeutlichen die Schwerpunkte des VRE-Vorkommens. So erwiesen sich die untersuchten Umgebungsproben (Staub, Futter und Tränke) in den kleinbäuerlichen Herden mit drei Ausnahmen (Staub/Herde 2, Futter/Herde 3 und Tränke/Herde 4) als negativ. Hingegen ist die Umwelt konventioneller Herden deutlich höher belastet: Alle Staubproben der Herden 7-11 fielen positiv aus, bei Herde 7 zusätzlich die Tränke- und Futterprobe und bei Herde 10 die Tränkeprobe.

Das größte VRE-Vorkommen fand sich in Proben, die von Tierkörpern und Schlachtstätten stammten. Sämtliche Broiler sowie während des Schlachtprozesses entnommene Proben (Kloakenabstrich, Brühbottich, Rupfmaschine) erwiesen sich bei den konventionellen Herden als positiv. Für die kleinbäuerliche Haltung ergab sich ein weniger klares Bild. Für die Herden 5 und 6 zeigten die Broiler, die Proben des Brühbottichs und bei Herde 6 auch der Rupfmaschine negative Ergebnisse. Alle anderen Proben aus dem Bereich des Schlachtprozesses waren positiv.

Die Kotproben aus den Beständen besaßen eine ähnliche Verteilung der Häufigkeit: Während alle konventionellen Herden positiv ausfielen, erbrachten 3 der 6 untersuchten kleinbäuerlichen Herden keine VRE-Isolate.

Tabelle 20 a und b: Übersicht des Anteils VRE-positiver Proben in Abhängigkeit von
Haltungsform und Entnahmestelle.

Tab. 20 a:

Kleinbäuerliche Haltung Entnahmestelle:	Probenanzahl	VRE-positive Proben
Futter	6	1
Tränke	6	2
Staub	6	0
Kot	28	11
Transportkistenabstrich	12	4
Kloakenabstrich	20	3
Brühbottich	3	1
Rupfmaschine	3	2
Broiler	24	9

Tab. 20 b:

Konventionelle Haltung Entnahmestelle:	Probenanzahl	VRE-positive Proben
Futter	5	1
Tränke	5	2
Staub	5	5
Kot	25	24
Transportkistenabstrich	15	15
Kloakenabstrich	25	21
Brühbottich	5	5
Rupfmaschine	5	5
Broiler	25	23

Tabelle 21a und b: Relation VRE-positiver Proben in Abhängigkeit von Haltungsform, Entnahmestelle und Herden

Tab. 21 a:

Kleinbäuerliche Haltung	Herde 1 n Proben: VRE-positiv	Herde 2 n Proben: VRE-positiv	Herde 3 n Proben: VRE-positiv	Herde 4 n Proben: VRE-positiv	Herde 5 n Proben: VRE-positiv	Herde 6 n Proben: VRE-positiv
Futter	1:0	1:0	1:1	1:0	1:0	1:0
Tränke	1:0	1:0	1:0	1:1	1:0	1:1
Staub	1:0	1:0	1:0	1:0	1:0	1:0
Kot	5:0	5:0	5:4	5:4	4:0	4:3
Transportkistenabstr.	3:1	3:0	3:0	3:3	-	-
Kloakenabstr.	3:0	3:0	3:0	3:1	4:2	4:0
Brühbottich	1:1	-	-	-	1:0	1:0
Rupfmaschine	1:1	-	-	-	1:1	1:0
Broiler	5:2	5:4	5:0	5:3	2:0	2:0

Tab. 21 b:

Konventionelle Haltung	Herde 7 n Proben: VRE-positiv	Herde 8 n Proben: VRE-positiv	Herde 9 n Proben: VRE-positiv	Herde 10 n Proben: VRE-positiv	11 n Proben: VRE-positiv
Futter	1:1	1:0	1:0	1:0	1:0
Tränke	1:1	1:0	1:0	1:1	1:0
Staub	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1
Kot	5:5	5:4	5:5	5:5	5:5
Transportkistenabstr.	3:3	3:3	3:3	3:3	3:3
Kloakenabstr.	5:5	5:5	5:4	5:5	5:2
Brühbottich	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1
Rupfmaschine	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1
Broiler	5:5	5:4	5:5	5:5	5:4

4.5 Resistenzverhalten der isolierten Stämme

Der Isolierung von Enterokokkenstämmen aus dem Probenmaterial auf CATC-Agar, der mit 50 µg/ml Vancomycin supplementiert war, folgte die Bestimmung der minimalen Hemmstoffkonzentration (MHK) durch Mikrodilution (DIN 58940 1996).

Die Ergebnisse der Resistenzuntersuchungen sind im Anhang in der Übersichtstabelle 24 mit zugehörigem Datum der Probennahme, Entnahmestelle und Herkunft aufgelistet.

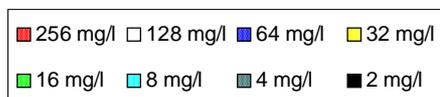
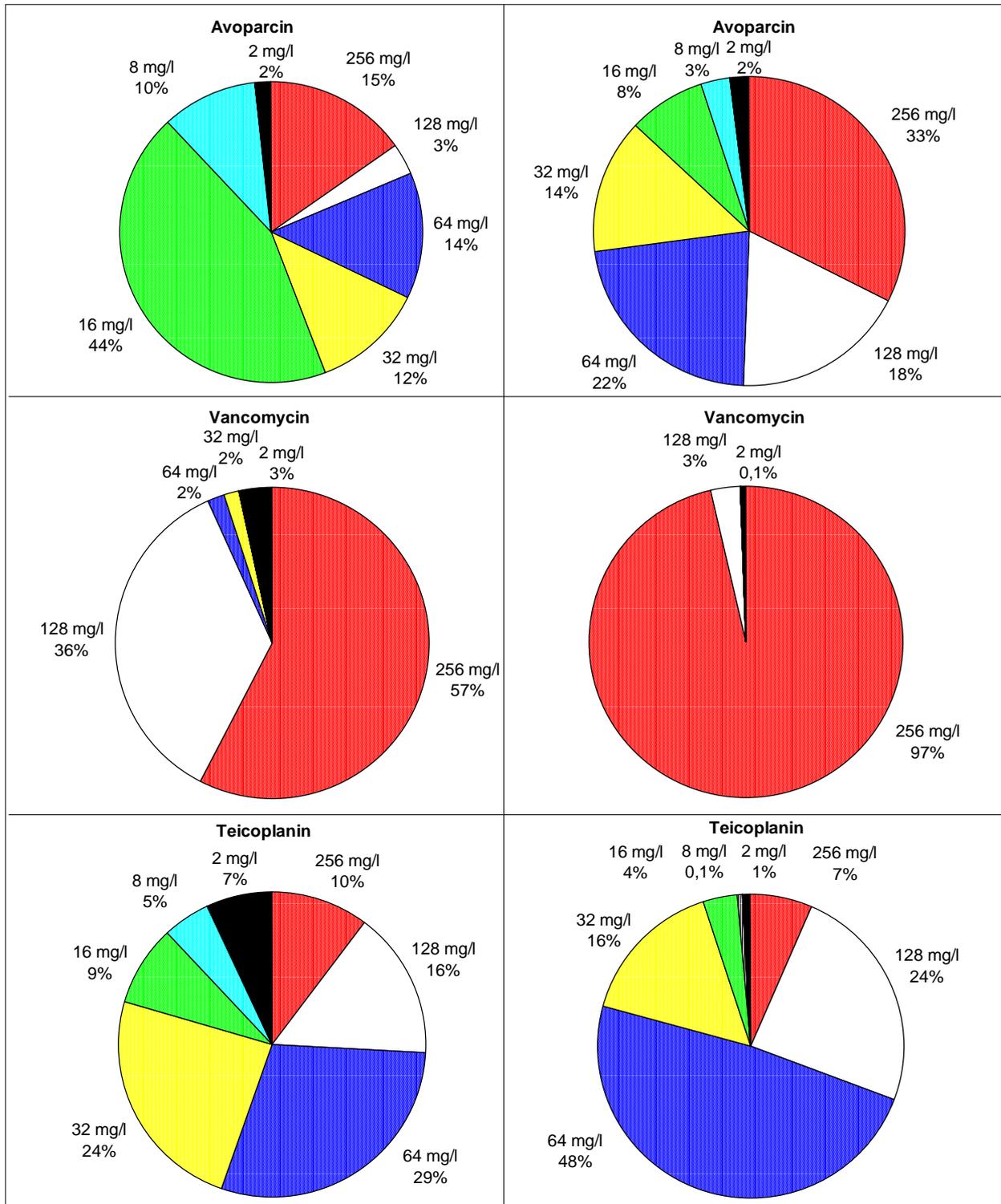
Zusammenfassend zeigt Abbildung 7 das unterschiedliche Resistenzverhalten (mit Angabe der MHK) der Enterokokken gegenüber Vancomycin, Avoparcin und Teicoplanin, aufgliedert nach den beiden ausgewählten Betriebsformen der Geflügelmast.

Abb. 7:
Minimalen Hemmstoffkonzentrationen für Avoparcin,
Teicoplanin der Isolate aus beiden Haltungformen

Übersicht der ermittelten
Vancomycin und

Kleinbäuerliche Haltung (n=56)

Konventionelle Haltung (n=225)



Da in der Humanmedizin lediglich Vancomycin und Teicoplanin zum Einsatz kommen, existieren auch nur für diese beiden Glykopeptidantibiotika MHK-Richtlinien des National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS 1997). Gemäß dieser Norm sind Isolate mit einer MHK bis 4 µg/ml als sensibel, Isolate mit einer MHK zwischen 8 und 16 µg/ml als intermediär und Isolate mit einer MHK von >32 µg/ml als resistent einzustufen. Für Avoparcin empfehlen SCHULZ und SAHM (1993) und AARESTRUP (1995) folgende MHK-Grenzwerte: sensibel < 8 µg/ml, intermediär 16-32 µg/ml und resistent >32 µg/ml.

Insgesamt wurden 225 Stämme aus den konventionellen Betrieben und 56 Stämme aus der kleinbäuerlichen Haltung auf ihre Glykopeptidantibiotikaempfindlichkeit untersucht. In beiden Haltungformen bestand eine prägnante Vancomycinresistenz, jedoch lag sie bei der konventionellen Haltung auf einem wesentlich höheren Niveau. Hier wiesen 97% der Isolate eine MHK von über 256 µg/ml auf und 3% eine MHK von 128 µg/ml. Im Vergleich dazu fand sich bei der kleinbäuerlichen Haltung die MHK von >256 µg/ml nur zu 57%, und die MHK von 128 µg/ml trat zu 36% auf (vgl. Tab. 23).

Die MHK-Titer von Avoparcin überschritten verschiedentlich die 256 µg/ml Grenze, jedoch in geringer Häufigkeit. Im Durchschnitt erwiesen sich die Enterokokkenstämme somit resistenter gegen Vancomycin als gegen Avoparcin, wobei die Isolate aus kleinbäuerlicher Haltung zu höherer Sensibilität tendierten. Die niedrigsten, ca. 3 Titerstufen geringeren Resistenzen fanden sich beim Teicoplanin. Hier differierten die Resistenzprofile der zwei überprüften Haltung-formen nur unwesentlich.

Bei Betrachtung der einzelnen Herden aus kleinbäuerlicher Haltung war stets eine hohe (>256 µg/ml) Vancomycinresistenz zu beobachten. Eine Avoparcinresistenz fehlte meist, die Werte lagen im Intermediärbereich (16-32 µg/ml). Eine Ausnahme bildeten indessen die 8 Isolate der Herden 5 und 6 mit Vancomycinresistenzen >256 µg/ml.

Tab. 22: Übersicht der ermittelten Sensibilität

Haltungsform	Sensibilität	Vancomycin	Teicoplanin	Avoparcin
kleinbäuerliche Haltung n=56	sensibel	3%	7%	12%
	intermediär	-	14%	56%
	resistent	97%	79%	32%
Konventionelle Haltung n=225	sensibel	0,1%	1%	5%
	intermediär	-	4,1%	22%
	resistent	100%	95%	73%

4.6 Nachweis des VanA-Gens

Ausgewählte VRE-Stämme (n = 50) wurden mit der Polymerasekettenreaktion (PCR) und spezifischen Primern auf das high-level Vancomycinresistenz codierende VanA-Gen (ARTHUR u. COURVALIN 1993) untersucht. Bei 48 Isolaten handelte es sich um VanA positive E. faecium-Stämme, bei einem Isolat um einen E. faecalis-Stamm und bei einem Isolat um einen sensiblen E. faecium-Stamm. Grundlage für die Auswahl dieser 48 Stämme waren zum einen ihre wachstumsspezifisch und biochemisch gesicherte Identifikation, zum anderen wurden von jeder Haltungform und Herde stellvertretend Isolate ausgewählt. Im Fall

der konventionellen Haltung wurden Isolate aus der größten Gruppe mit einer hohen Vancomycin- und Avoparcinresistenz (>256 µg/ml) untersucht. Bei der kleinbäuerlichen Haltung wurden Isolate gewählt, die sich durch Vancomycinresistenz (>256 µg/ml) und Avoparcin MHK-Werten im Intermediärbereich (16-32 µg/ml) auszeichneten.

Bis auf zwei Ausnahmen, ließ sich das VanA-Gen nachweisen. Die Isolate 109 b (*E. faecium*) und 26 a (*E. faecalis*) zeigten kein VanA-Gen.

Tabelle 23: Ausgewählte Isolate, bei denen das Vorliegen des VanA-Gens mittels PCR überprüft wurde

Isolat-Nr.:	Spezies	CATC+ Vanco. ¹	VanA- Gen	Isolat-Nr.:	Spezies	CATC+ Vanco. ¹	VanA- Gen
5 b	E. fm	+	+	125 a	E. fm	+	+
7 a	E. fm	+	+	126 b	E. fm	+	+
7 b	E. fm	+	+	130 b	E. fm	+	+
10	E. fm	+	+	136 a	E. fm	+	+
16 b	E. fm	+	+	138 c	E. fm	+	+
18 b	E. fm	+	+	139 a	E. fm	+	+
19	E. fm	+	+	142 a	E. fm	+	+
26 a	E.fc	-	-	142 b	E. fm	+	+
34 b	E. fm	+	+	145 a	E. fm	+	+
41 a	E. fm	+	+	157 b	E. fm	+	+
46 a	E. fm	+	+	158 a	E. fm	+	+
51 c	E. fm	+	+	163 a	E. fm	+	+
55 b	E. fm	+	+	165 a	E. fm	+	+
65 a	E. fm	+	+	181 b	E. fm	+	+
69 b	E. fm	+	+	182 b	E. fm	+	+
73 a	E. fm	+	+	183 a	E. fm	+	+
77 a	E. fm	+	+	184 a	E. fm	+	+
80 b	E. fm	+	+	186 b	E. fm	+	+
90 a	E. fm	+	+	187 a	E. fm	+	+
92 b	E. fm	+	+	189 b	E. fm	+	+
109 b	E. fm	-	-	191 b	E. fm	+	+
112 b	E. fm	+	+	206 a	E. fm	+	+
113 b	E. fm	+	+	209 a	E. fm	+	+
118 b	E. fm	+	+	220 b	E. fm	+	+
124 b	E. fm	+	+	222 a	E. fm	+	+

E.fm = *E. faecium*

E. fc = *E. faecalis*

¹ = Wachstum auf CATC-Agar supplementiert mit 50 mg/l Vancomycin

4.7 Clusteranalyse

Auf grund der Gesamtprofilproteinanalyse aller 48 untersuchten, VanA-Gen-positiven Stämme zeichneten sich zwei Cluster ab: Cluster A mit einem Anteil von 81,6% und Cluster B mit 18,4%. Grundlage für die Einteilung in Cluster war die Berechnung der Ähnlichkeiten der Laufstreckenprofile (siehe Kapitel 3.2.10, computerunterstützte Auswertung der Gele).

Die beiden Hauptgruppen besitzen eine Ähnlichkeit der Proteinbanden von mehr als 90%, wobei innerhalb von Cluster A eine Übereinstimmung von mehr als 92% und innerhalb des Cluster B von mehr als 94% besteht (Abb. 8 und 9).

Innerhalb beider Cluster zeigen 25 Isolate (51%) paar- oder gruppenweise eine Übereinstimmung von über 98%. Dabei liegt in der Regel keine Zugehörigkeit zur Entnahmestelle vor. Eine Ausnahme bilden die Isolate 189 b und 187 a aus Herde 3, Kot; 7 a und 7 b aus Herde 5, Kloakenabstrich; 165 a und 163 a aus Herde 1, Broiler. Bei diesen drei Paaren ist die Herkunft der Proben jeweils identisch.

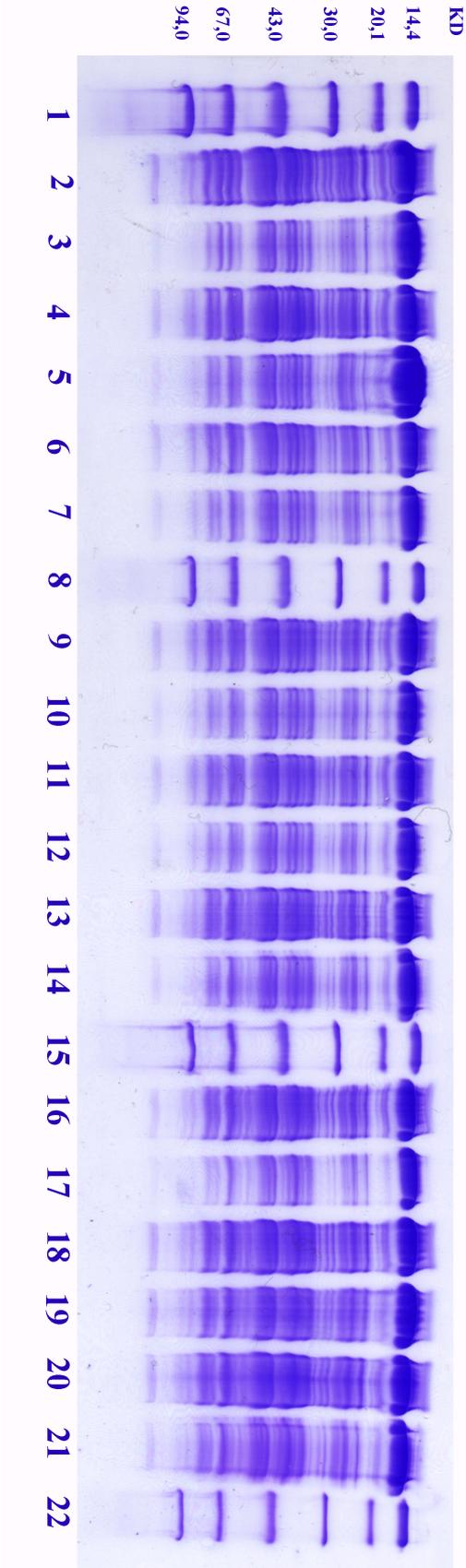
Cluster A umfaßt alle Proben der Herden 3-11, außer Isolat 157 b (Herde 1).

Die Herden 1-4 stammen aus zwei ökologisch orientierten Kleinbetrieben in NRW. Die Herden 7-11 gehörten zu unterschiedlichen Betrieben konventioneller Haltung im südlichen Brandenburg. Insgesamt läßt sich für Cluster A keine eindeutige Zuordnung zu Haltungsform, Region, Mastbetrieb, Herde oder Entnahmestelle vornehmen.

Cluster B enthält die Proben der Herde 1 und 2 mit zwei Ausnahmen: Isolat 34 b (Herde 7) und Isolat 125 a (Herde 11). Die Herden 1 und 2 stammten aus einem ökologisch orientierten Kleinbetrieb in NRW. In diesem Cluster wäre also eine Zuordnung nach Haltungsform und Betrieb denkbar.

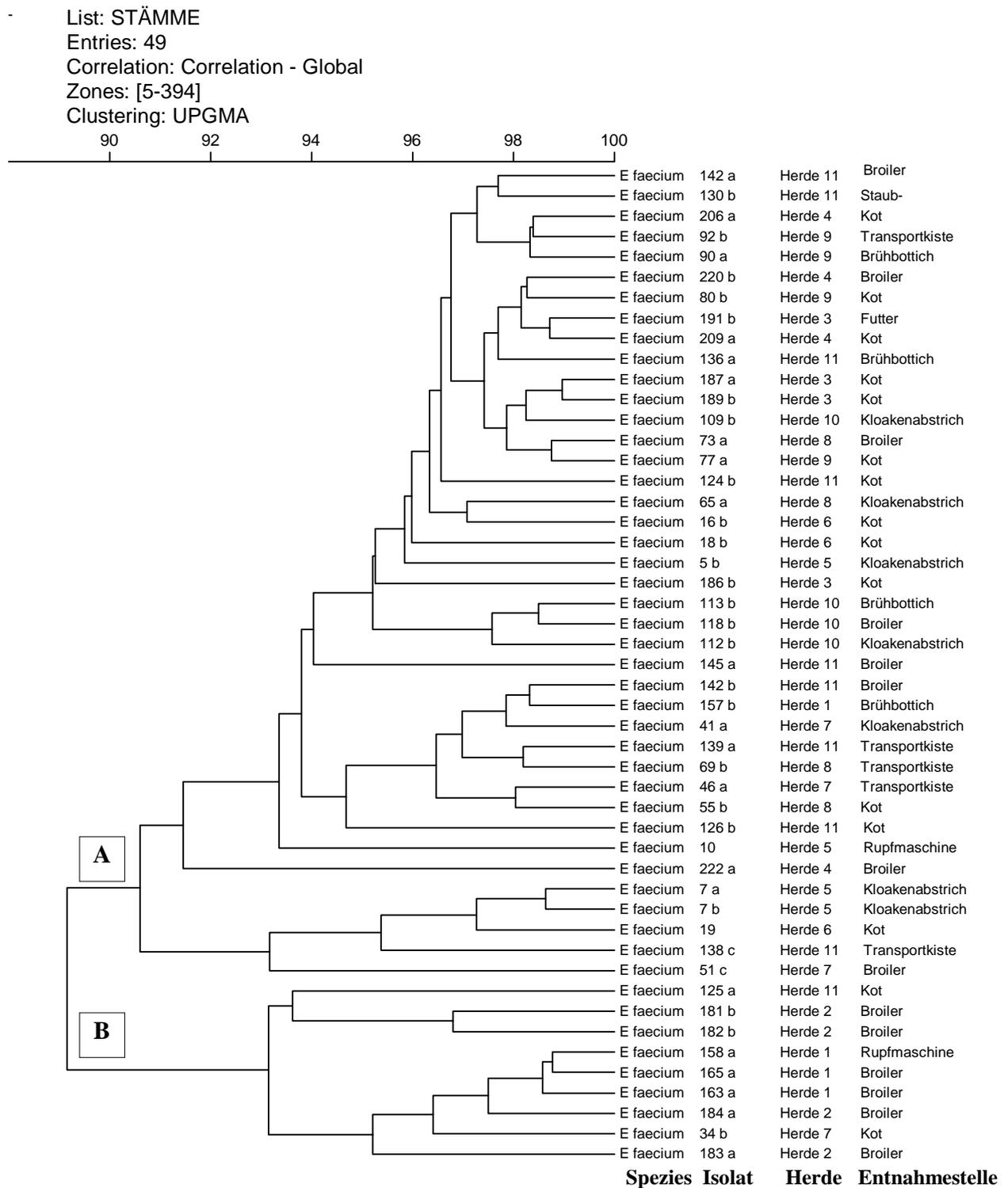
Abb. 9 zeigt als Dendrogramm die angesprochenen Zusammenhänge. Der Punkt, durch den zwei der untersuchten Stämme mit anderen Stämmen verbunden werden, gibt die Ähnlichkeit dieser Stämme untereinander in Prozent an. Dieser Übereinstimmung können mit Hilfe der im oberen Bildrand eingefügten Skala Prozent-Werte zugeordnet werden.

Abb. 8: Gelelektrophoretische Auftrennung der löslichen Zellproteine einiger Enterokokkenstämme



1, 8, 15, 22	LMW-Marker
2	ATCC 6057 (<i>E. faecium</i>)
3	ATCC 6057 Verdünnung 1:2
4	DSM 7090 (<i>E. faecalis</i>)
5	DSM 7090 Verdünnung 1:2
6	112 b (<i>E. faecium</i>)
7	112 b Verdünnung 1:2
9	113 b (<i>E. faecium</i>)
10	113 b Verdünnung 1:2
11	118 b (<i>E. faecium</i>)
12	118 b Verdünnung 1:2
13	124 b (<i>E. faecium</i>)
14	124 b Verdünnung 1:2
16	125 a (<i>E. faecium</i>)
17	125 a Verdünnung 1:2
18	126 b (<i>E. faecium</i>)
19	126 b Verdünnung 1:2
20	130 b (<i>E. faecium</i>)
21	130 b Verdünnung 1:2

Abb. 9: Dendrogramm aller in die Untersuchung einbezogener Stämme



Die als Kontrollen ebenfalls in der Untersuchung mitgeführten Referenzstämme ATCC 7090 (*E. faecium*) und DSM 1529 (*E. faecalis*) zeigten gegenüber den Untersuchungsstämmen nur geringgradige Abweichungen. Es erfolgte eine Zuordnung der Kontrollen zu beiden Clustern (Übereinstimmung über 90%).

Das Dendrogramm, das auf der UGMA-Clusteringmethode des Gelcompare 3.1 beruht, zeigt eine hohe Übereinstimmung der Stämme. Andere Darstellungsmöglichkeiten, wie z. B. NJ-Clustering des Gelcompare 3.1 Programms, hingegen verdeutlichen die vorhandenen Unterschiede der Isolate und Kontrollstämme.

Abb. 10 zeigt eine Auswertung auf der Basis des NJ-Clustering. In der Graphik korrelieren die Entfernungsverhältnisse der Stämme mit dem Ähnlichkeitsgrad der Laufstreckenprofile ihrer Proteine. Erwartungsgemäß hebt sich in dieser Darstellungsform der *E. faecalis*-Kontrollstamm sowohl vom *E. faecium*-Kontrollstamm als auch von den *E. faecium*-Prüfstämmen ab, obwohl der Unterschied im Densitogramm nicht so offensichtlich ist. Zwischen beiden Untersuchungsstämmen fallen die metrischen Abstände, und somit die Unterschiede der Laufstreckenprofile, geringer aus.

Abb. 10: Darstellung der Ähnlichkeitsverhältnisse zwischen Untersuchungs- und Kontrollstämmen

List:Vergleich

Entries: 9

Correlation: Correlation - Fine

Zones: [5-394]

Clustering: NJ

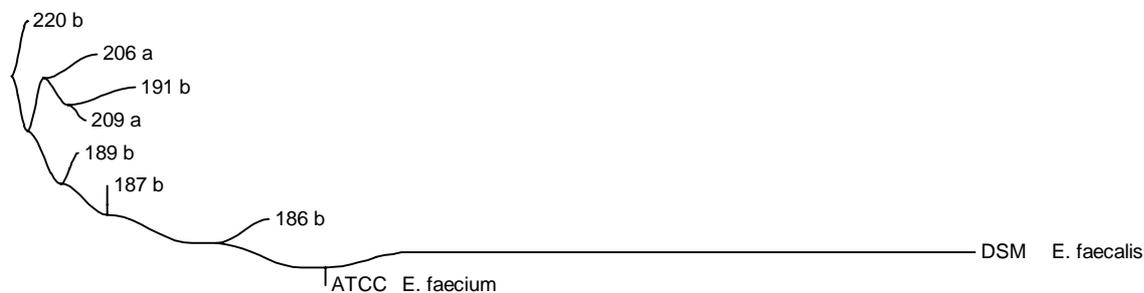
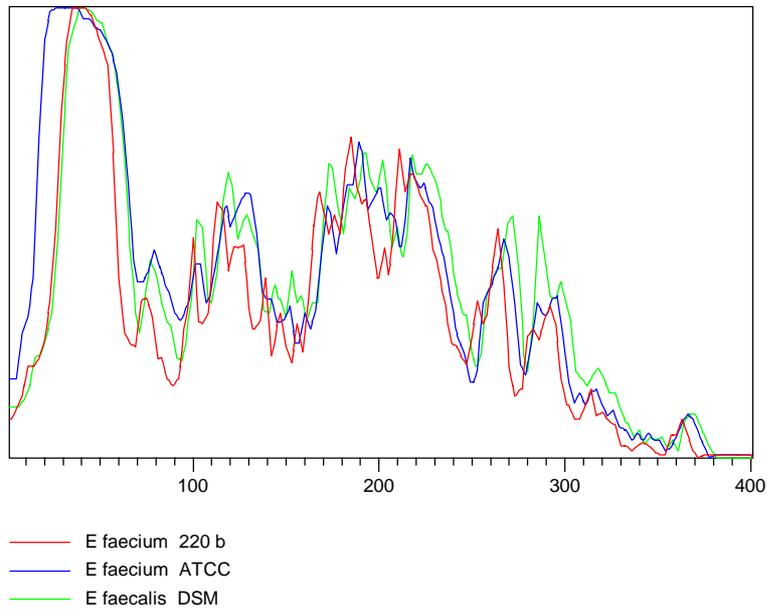


Abb. 11: Densitogramm im Vollprofil der beiden Kontrollstämme im Vergleich mit dem Isolat-Nr. 220 b.



x-Achse: Einteilung der Gelelektrophoretischen Laufstrecke (mm)

y-Achse: Absorption

Das Densitogramm verdeutlicht die Abhängigkeit zwischen der optische Dichte der Banden und ihrer gelelektrophoretischen Laufstrecke. Es liefert die Daten für die Auswertung durch Gelcompare 3.1.

In der Abbildung erscheinen die Laufstreckenprofile der drei beispielhaft ausgewählten Stämme (Kontrollstämme ATCC und DSM, Untersuchungsstamm 220 b) beinahe identisch.

5. Diskussion

5.1 Zur Methodenwahl

Die vorliegende Untersuchung liefert Informationen zu Vorkommen und Resistenzverhalten glykopeptidresistenter Enterokokken sowohl in konventionell produzierenden Mastgeflügelbetrieben als auch in kleinbäuerlichen, ökologisch orientierten Haltungen ohne Antibiotikaeinsatz.

Insgesamt wurden 223 Proben aus verschiedenen Stationen von der Mast über die Schlachtung bis zur Verarbeitung entnommen. Aus diesem Material ließen sich 281 VRE-Stämme isolieren, die biochemisch identifiziert und deren Resistenzeigenschaften im Mikrodilutionsverfahren ermittelt wurden. Der Nachweis des VanA-Gens von 49 ausgewählten Isolaten wurde mittels PCR durchgeführt. Eine Gesamtzellproteinelektrophorese dieser 49 *E. faecium*-Isolate mit anschließender Clusteranalyse sollte der Frage nach den phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnissen unter den VRE klären.

Die Bedeutung resistenter *E. faecium*-Stämme für die Humanmedizin liegt in der Eigenschaft begründet, daß Glykopeptidresistenzen übertragen werden können (ARTHUR u. COURVALIN 1993; KLARE et al. 1993; HAYDEN et al. 1997). Falls resistente Stämme über Lebensmittel zum Menschen gelangen, ist nicht nur eine Besiedelung des Menschen sondern auch eine Übertragung der Resistenzen auf bereits vorhandene Flora denkbar (WITTE u. KLARE 1995). Da Glykopeptide in der Humanmedizin als Reserveantibiotika eingesetzt werden, muß als präventive Maßnahme das Auftreten glykopeptidresistenter Enterokokken vor allem in Lebensmitteln tierischer Herkunft unterbunden werden.

Aus diesen Gründen konzentrierten sich die vorliegenden Untersuchungen auf die Ermittlung des Resistenzverhaltens von Enterokokken gegenüber den drei Glykopeptiden Vancomycin, Teicoplanin und Avoparcin sowie auf den Nachweis des VanA-Gens.

Die angewandte Methode ermöglichte es im Rahmen der Aufgabenstellung, sowohl Vorkommen als auch Resistenzverhalten der VRE aufzuzeigen. Ergänzend sollte der Frage nach den phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnissen nachgegangen werden. Die Prüfung der Stämme auf ihre physiologischen und biochemischen Eigenschaften erbrachte im Rahmen der vorliegenden Arbeit zwar die Zuordnung der Untersuchungsstämme zur Spezies *Enterococcus faecium*, stammesspezifische Aussagen waren aber nicht zu erreichen.

5.2 Keimzahlen

Die Gesamtkeimzahl der Broiler am Ende der Schlachtung betrug für die konventionelle Haltung $\log 4,84$ KbE/ml Spülflüssigkeit und für die kleinbäuerliche Haltung $\log 6,16$ KbE/ml. Entsprechende Werte für Enterobacteriaceae liegen bei $\log 3,87$ und $\log 5,81$ KbE/ml. Der deutlich höhere Keimgehalt der kleinbäuerlichen Proben kann seine Ursache in den unterschiedlichen Schlachttechniken haben, zumal im ökologischen Bereich der Hygiene oft weniger Aufmerksamkeit geschenkt wird.

ELLERBROEK et al. (1996) schlugen Richtwerte für Geflügelfleisch von $\log 5,0$ KbE/g (Halshaut) für die mesotrophe Gesamtflora und $\log 3,8$ KbE/g (Brusthaut) für Enterobacteriaceae vor. In den USA existieren Richtwerte für Gesamtkeimzahlen auf frischem Geflügelfleisch von $\log 3,0$ - $4,0/\text{cm}^2$ (SHAPTON et al. 1993). Ein Vergleich dieser Richtwerte ist jedoch nur unter Berücksichtigung der jeweils angewandten Untersuchungsmethode möglich.

Erwartungsgemäß ähnelten sich in den Probematerialien Faeces, Kloaken- und Transportkistenabstrich die Verteilungsmuster der drei untersuchten Keimgruppen (Gesamtkeime, Enterobacteriaceae, Enterokokken). Der wesentliche Grund für dieses Resultat wäre in der zentralen Rolle des Kotes zu suchen, der auch die Flora in der Kloake und auf der Oberfläche von Transportkisten determiniert. Daß unter allen Entnahmestellen die Enterokokkenkeimzahlen hier die höchsten Werte annehmen, verwundert nicht, weil diese Bakterienart im Darmtrakt natürlicher Weise vorkommt.

Im Gegensatz zu den übrigen Entnahmestellen dominierten im Staub die Enterokokken gegenüber den Enterobacteriaceae. Der Befund erklärt sich aus der hohen natürlichen Resistenz dieser gram-positiven Keime gegenüber Umwelteinflüssen.

Eine Beziehung zwischen der Anwesenheit von VRE und der Enterokokkenkeimzahl konnte nicht nachgewiesen werden.

5.3 Vorkommen der VRE

Bezogen auf alle untersuchten Bereiche wurden zu 60,1% VRE nachgewiesen, in den konventionellen Betrieben zu 87,8%, in den kleinbäuerlichen Haltungen nur zu 30,5%. Die hohe Nachweisrate an VRE deckt sich mit den Ergebnissen von KLARE et al. (1995) sowie BÜLTE und LEMCKE (1996).

In Anbetracht der Tatsache, daß die kleinbäuerlichen Geflügelmastbetriebe nach eigenen Aussagen in den letzten Jahren keinerlei Antibiotika einsetzten, erscheint der Prozentsatz von 30,5% immer noch recht hoch. Der prozentuale Anteil VRE-positiver Proben lag allerdings bei fünf der sechs Herden zwischen 20 und 26%, während die Herde 3 einen Prozentsatz von über 63% erreichte und damit das Gesamtmittel verzerrte.

Das Vorkommen von VRE trotz antibiotikafreier Aufzucht und Haltung bestätigte auch KRUSE (1995), denn im Rahmen von Kotuntersuchungen wurden zu 9% VRE nachgewiesen. Andererseits konnten KLARE et al. (1995) sowie AARESTRUP (1995) keine VRE aus Fleischproben (Huhn und Schwein) isolieren, die von Tieren ohne Avoparcin-Fütterung stammten.

Epidemiologisch ist zu berücksichtigen, daß bei einer VRE freien Aufzucht eine Kontamination der Tierkörper im Schlachtprozeß stattfinden kann. In welchem Ausmaß auch andere Kontaminationsquellen existieren, zeigen die vorliegenden Erhebungen.

Nur bei drei der sechs Herden (Herde 1, 2 und 5) fanden sich in der Umwelt (Entnahmestellen: Futter, Tränke, Staub, Kot) keine VRE-Stämme. Die weiteren Proben aus dem Bereich Schlachtung und Verarbeitung zeigten wiederholt bei allen Herden kleinbäuerlicher Betriebe geringes VRE-Vorkommen (vgl. Tab. 20 b). Weil die Herden 1-4 im Anschluß an den Schlachtprozeß konventionell gehaltener Tiere an gleicher Stätte geschlachtet wurden, läßt sich eine Kreuzkontamination nicht ausschließen.

Eine mögliche Erklärung für ein von der Haltungsform unabhängiges VRE-Vorkommen könnten Enterokokken belastete Bruteier bieten. MATTHES und HANSCHKE (1977) sowie THOPMSON et al. (1980) diskutierten die Kontamination von Bruteiern durch die Elterntiere. Bisher fehlt es aber an Studien, welche die Untersuchungen auch auf die Elterntiere ausdehnen.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit stellt das Stallmüdigkeit genannte Phänomen dar. Danach können Keime über bestimmte Zeit im Stall persistieren und sich dort vor allem infolge fortlaufender Passagen in immer neuen Wirtspopulationen, mehr oder weniger massiv, anreichern. Als Nischen hierfür bieten sich Belüftungs- und Klimaanlage, Bauelemente mit der Möglichkeiten zur Staubsammlung, Tränkesysteme sowie Entsorgungsanlagen für den Kot an (HEIDER et al. 1992).

Auch der Mensch fungiert als Quelle für VRE-Einschleppungen. KLARE et al. identifizierte 1995 bei einer in Sachsen-Anhalt durchgeführten Studie an klinisch gesunden Menschen 12% der Untersuchten als VRE-Ausscheider. Auch in den überprüften Betrieben könnte das Personal mithin nicht nur als sekundär kontaminierende Quelle zu identifizieren sein, sondern VRE bereits primär einschleppen.

Andere belebte Vektoren (Nager, Parasiten) kommen ebenfalls als sekundär kontaminierende Faktoren in Betracht. Nachgewiesen sind z. B. Argas-Arten (Zecken) als Überträger von Salmonellen, Chlamydien und Pasteurellen oder Getreideschimmelkäfer als Ursache für die Verbreitung von Salmonellen, E. coli und anderen geflügelpathogenen Mikroorganismen (RIBBECK 1992). Folglich muß man auch bei der vorliegenden Studie davon ausgehen, daß die genannten Vektoren auch potentielle Quellen von VRE bilden können.

Kontaminierte Produktionsmittel, also nicht nur Futter und Tränke, sondern auch Arbeitsgeräte und Stallinventar dürfen nicht außer acht gelassen werden.

Gerade im Hinblick auf das noch ungeklärte, nicht unerhebliche VRE-Vorkommen in den kleinbäuerlichen, ökologisch orientierten Betrieben wäre auch an den zeitlichen Faktor im Wechsel der Haltungsform zu denken. Die in der vorliegenden Studie untersuchten kleinbäuerlichen Betriebe wechselten vor ca. 4 Jahren zu einer ökologisch orientierten Haltung einschließlich des Verzichts auf Antibiotikaeinsatz.

Dieser Wechsel birgt zum einem generell die Gefahr der Verstärkung verschiedener Einschleppungsmöglichkeiten für VRE. Andererseits besteht nunmehr das Risiko, daß die vor dem Haltungswechsel selektierten VRE-Stämme persistieren.

Auch wenn das Vorkommen von VRE in ökologischen Haltungsformen etwas überrascht, darf jedoch die große Häufigkeit VRE-positiver Proben bei den konventionellen Herden mit einem Prozentsatz von 73% bis sogar 100% nicht vergessen werden (vgl. Tab. 21 a).

Als Ursache für diese VRE-Prävalenz mögen zwar die bei den kleinbäuerlichen Betrieben genannten Faktoren ebenfalls eine Rolle spielen, doch wäre vor allem an den Selektionsdruck durch Einsatz von Antibiotika zu denken. In der konventionellen Aufzucht werden Antibiotika zu Therapie und Prophylaxe verwendet. Die Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß dieser Einsatz die Entstehung von Resistenzen fördert. Auch AARESTRUP (1995) wies in einer dänischen Studie zu 77% VRE aus Proben konventioneller Betriebe nach.

Tierbestände, bei denen Glykopeptidantibiotika als Wachstumsförderer in der Vergangenheit benutzt wurden und in denen heute mannigfaltige Antibiotika für Prophylaxe und Therapie zur Anwendung kommen, weisen nach AARESTRUP (1995) einen größeren Anteil VRE-Stämme auf, als Populationen kleinbäuerlich ökologisch orientierter Betriebe. Demgegenüber wiesen KLEIN et al. (1998) in einem Fütterungsversuch mit Avoparcin (15 mg/kg) keine VRE im Faeces der Hühner nach.

Auf die Gefahr der Bildung eines Resistenzpools an VRE weisen auch WITTE und KLARE (1995) hin. Danach besteht einerseits die Möglichkeit der direkten Verbreitung von VRE über die Fäkalien der kommerziell gehaltenen Masttiere. Andererseits ist parallel ein Weg über den Schlachtprozeß und über die Nahrungskette denkbar.

Die vorliegenden Untersuchungen wurden zu einem Zeitpunkt durchgeführt, als der Einsatz des Futtermittelzusatzstoffes Avoparcin schon seit einem Jahr verboten war. Diese Maßnahme hatte sich aber noch nicht nachhaltig auf das Vorkommen von VRE-Stämmen ausgewirkt. Die Befunde in den ökologischen Betrieben liegen auf der gleichen Linie, denn sie sprechen für einen langsamen Rückgang in der Häufigkeit Vancomycin-resistenter Isolate trotz Verzichts auf jeglichen Antibiotikaeinsatz.

5.4 Speziesidentifizierung der Isolate

Für die Differenzierung der Spezies des Genus *Enterococcus* wurden hauptsächlich Stoffwechselleistungen herangezogen (SCHLEIFER u. KILPPER-BÄLZ 1984; FACKLAM u. COLLINS 1989). Um die verschiedenen isolierten Stämme nach der Durchführung von 34 biochemischen, mikroskopischen und morphologischen Tests, die in Tabelle 12 zusammengefaßt sind, zu identifizieren, wurde ein computergestütztes EDV-Programm (Bacmain) benutzt.

In Vorversuchen war mit diesem System eine Vielzahl von Enterokokkenspezies identifiziert worden, wozu *E. gallinarum*, *E. avium*, *E. faecalis*, *E. mundtii*, *E. hirae*, *E. casseliflavus* sowie *E. faecium* gehörten.

Im Hauptversuch ließ sich unter Zusatz von Vancomycin (50 µg/ml) im Probenansatz ausschließlich *E. faecium* isolieren. Dieser Befund entspricht insoweit den Erwartungen, als *E. faecium* die am häufigsten vorkommende Enterokokkenspezies im Gastrointestinaltrakt von Schwein, Rind und Geflügel darstellt, wobei mit zunehmendem Alter der Tiere die Besiedlungsdichte abnimmt (DEVRIESE et al. 1991 d, 1992 a). Beim Menschen hingegen liegt eine Besiedelung von *E. faecium* und *E. faecalis* zu gleichen Anteilen vor.

Aufgrund des häufigen Auftretens und seiner induzierbaren, konjugativen high-level Resistenz besteht für *E. faecium* ein hoher Selektionsvorteil. AARESTRUP (1995) sowie WITTE und KLARE (1995) konnten ebenfalls in Untersuchungen von Schweine- und Geflügelfleisch ausschließlich high-level resistente *E. faecium*-Stämme nachweisen. Demgegenüber isolierten BÜLTE und LEMCKE (1996) sowie DAZO (1996) auch resistente *E. faecalis*-Stämme.

In der Erhebung von DAZO (1996) wurden die resistenten *E. faecalis*-Stämme hauptsächlich aus Rindfleisch angezüchtet, sie wiesen jedoch keine Vancomycinresistenz auf. Als Ursache für die in größerer Anzahl isolierten *E. faecalis*-Stämme wird hier der Mensch als Quelle des Eintrags angesehen. Demgemäß gilt *E. faecalis* als Indikator der Hygiene im relativ ausgedehnten Schlacht- und Verarbeitungsprozess.

BÜLTE und LEMCKE (1996) gelang es sogar, aus Geflügelfleisch high-level resistente *E. faecalis*-Stämme anzuzüchten. Mittels PCR wurde bei diesen Isolaten auch das VanA-Gen nachgewiesen. Die wenigen vergleichbaren Arbeiten sprechen ausschließlich für ein Vorkommen von *E. faecium* mit high-level VanA vermittelter Resistenz (WITTE u. KLARE 1995; AARESTRUP 1995) oder es findet keine genaue Unterscheidung der VRE statt (KRUSE 1996). Bei Würdigung dieser Befunde hat im Erhebungsbereich der vorliegenden Arbeit offenbar keine Kontamination der Masttiere mit *E. faecalis* durch das Personal während der Mast oder im Schlachtbetrieb stattgefunden.

5.5 Resistenzverhalten

Nach Isolierung der 281 *E. faecium*-Stämme aus dem Probenmaterial mittels CATC-Agar, supplementiert mit 50 µg/ml Vancomycin, wurde die minimale Hemmstoffkonzentration von Vancomycin, Teicoplanin und Avoparcin im Mikrodilutionsverfahren festgestellt. Die Tabelle 24 im Anhang gibt die ermittelten MHK-Werte nach Herden aufgeschlüsselt wieder.

Bei 48 Stämmen, die alle Untersuchungsbereiche abdeckten, wurde mittels PCR die Existenz des VanA-Gens nachgewiesen. Die durch Vancomycin und Teicoplanin induzierbare high-

level Resistenz zeichnet sich durch eine hohe Vancomycinresistenz ($>256 \mu\text{g/ml}$) und gleichzeitige Teicoplaninresistenz aus (ARTHUR u. COURVALIN 1993). Dieser kombinierte Resistenztyp trat bei den isolierten *E. faecium*-Stämmen beider Haltungsformen auf.

Insgesamt ergab sich aus den Proben der konventionellen Haltungsart ein höherer Anteil an Resistenzen als aus den Proben kleinbäuerlicher Haltung, vor allem bei Vancomycin. Alle Stämme verhielten sich zumindest gegen zwei der getesteten Glykopeptidantibiotika unempfindlich.

Zum Zeitpunkt der Studie war der Leistungsförderer Avoparcin, wie bereits erwähnt, seit mehr als einem Jahr verboten, und trotzdem zeigten Stämme aus konventionellen Betrieben eine häufige und stark ausgeprägte Resistenz gegen Avoparcin. Die Isolate aus dem ökologischen Umfeld besaßen jedoch eine geringere Avoparcinresistenz. Oft lagen hier die Werte im Intermediärbereich. Insofern dürfte die Gabe avoparcinhaltiger Futtermittel einen Anstieg der Resistenzen bewirkt haben.

In bezug auf die Vancomycinresistenz verhalten sich die Isolate der kleinbäuerlichen Betriebe ähnlich wie die Stämme der konventionellen Mastanlagen. 97% der konventionellen Haltung und 57% der kleinbäuerlichen Haltung wiesen eine MHK von $>256 \mu\text{g/ml}$ auf (siehe Abb. 7). Weiterhin liegt der Anteil einer MHK von $128 \mu\text{g/ml}$ mit 36% bei der kleinbäuerlichen Haltung gegenüber 3% der konventionellen Haltung wesentlich höher. Demnach besteht eine Vancomycinresistenz auf etwas niedrigerem Niveau.

Hinsichtlich der Teicoplaninresistenz fällt ein relativ geringer Prozentsatz der MHK-Titerstufe $>256 \mu\text{g/ml}$ auf. Bei der konventionellen Haltung beträgt sie 7% im Gegensatz zu 10% bei der kleinbäuerlichen Haltung. Die meisten Werte liegen im Bereich zwischen $128 \mu\text{g/ml}$ und $32 \mu\text{g/ml}$. Insofern kann von einem einheitlichen Resistenzverhalten auf niedrigerem Niveau ausgegangen werden.

Obwohl keine Antibiotika und speziell auch keine Leistungsförderer in den Betrieben der kleinbäuerlichen Haltung in den letzten Jahren eingesetzt wurden, sind zu 20-26% VRE-Stämme aus den Proben isoliert worden. Bei einer Herde waren es sogar 63%. Laut LACEY (1975) und DEVRIESE und HAJEK (1980) soll nach dem Absetzen eines Antibiotikums der Anteil resistenter Keime, soweit es sich um übertragbare Resistenzen handelt, rasch zurückgehen. Allerdings wurden von den Autoren keine konkreten Zeitangaben gemacht.

Nur bei drei der Herden kleinbäuerlicher Haltungsform fanden sich in der Aufzuchtphase keine VRE. Eine Kontamination der Tiere dürfte somit bereits im Stall und deren Umgebung erfolgt sein, und zwar unabhängig von der Haltungsform.

Die epidemiologische Bedeutung von resistenten *E. faecium*-Stämmen liegt in der Fähigkeit von Enterokokken, Glykopeptidresistenzen zu übertragen (ARTHUR u. COURVALIN 1993; KLARE et al. 1993; HAYDEN et al. 1997). Falls resistente Stämme über Lebensmittel in den Intestinaltrakt des Menschen gelangen, ist eine Übertragung der Resistenzen auf die Darmflora denkbar (WITTE u. KLARE 1995). Aus diesem Grund muß das Auftreten resistenter Enterokokken in Lebensmitteln generell als unerwünscht angesehen werden, zumal Glykopeptide in der Humanmedizin eingesetzt werden.

5.6 PCR

50 der 281 als resistent identifizierten Stämmen wurden in der Polymerasekettenreaktion (PCR) mit spezifischen Primern auf das VanA-Resistenzgen untersucht, davon erwiesen sich 48 als VanA positiv. Zur Prüfung der Spezifität des VanA-Gen-typischen Amplifikates wurde die Restriktionsanalyse mit Cfol vorgenommen. Der Nachweis des VanA-Gens bestätigte die Ergebnisse des Resistenztestes, indem VRE sowohl in den konventionellen als auch in den kleinbäuerlichen Betrieben nachgewiesen wurden.

5.7 Clusteranalyse

Für die horizontale Polyacrylamid-Gelelektrophorese der löslichen Zellproteine wurden die Gele zur Auswertung mittels Scanner in den PC übertragen und mit dem Programm Gelcompar 3.1 (VAUTERIN et al. 1991) bearbeitet. Das auf diese Weise gewonnene Dendrogramm findet sich in Abb. 9.

Ziel einer Clusteranalyse der isolierten Stämme bildete die Aussage, inwieweit von einer Homogenität der Enterokokkenspezies innerhalb von Mastbetrieben ausgegangen werden kann, und welche Zusammenhänge zur Herkunft der Herden sich ableiten lassen. Des weiteren diente die Clusteranalyse der Verifikation der Spezies-Diagnose.

Alle untersuchten Stämme zeigen eine hohe Ähnlichkeit der Proteinbanden von mindestens 92%, womit sich die biochemische Identifizierung bestätigte. In der vorliegenden Arbeit besitzen 51% der mit dieser Methode untersuchten Stämme sogar eine Ähnlichkeit von über 98%. COSTAS et al. (1993) bewertet das Ergebnis von Ähnlichkeiten über 96,3% zwischen Proteinmustern gleicher Stämme der Spezies *Heliobacter* auf verschiedenen Gelen als sehr gut reproduzierbar.

In der Clusteranalyse stellten sich zwei Hauptgruppen dar, Cluster A und Cluster B, die eine Übereinstimmung der Proteinmuster von mehr als 90% besaßen. Demnach gibt es einen hohen Grad der Verwandtschaft bei den *E. faecium*-Stämmen.

Insgesamt ergab sich für Cluster A keine eindeutige Beziehung zu Haltungsfarm, Region, Mastbetrieb, Herde oder Entnahmestelle. Für Cluster B war eine Zuordnung nach Haltungsfarm und Betrieb möglich, denn die Isolate stammten aus zwei Herden eines kleinbäuerlich orientierten Mastbetriebs. Cluster A hingegen enthielt Isolate zweier ökologisch orientierter Kleinbetriebe und fast alle Isolate der konventionellen Haltungsfarm.

6. Schlußfolgerungen

1. Die Verwendung eines CATC-Agars nach REUTER (1985) mit 50 mg Vancomycin/l erlaubt es, Vancomycin-resistente Enterokokken in Proben aus Mastgeflügel und dessen Umfeld nachzuweisen.
2. Das 34 Tests umfassende Differenzierungsverfahren in Kombination mit dem Computerprogramm Bacmain ermöglicht eine sichere Speziesidentifizierung.
3. Bei 5 von 6 Hühnerherden aus kleinbäuerlichen, ökologisch orientierten Masthaltungen erwiesen sich die Proben zu höchstens 26% mit VRE belastet, bei der Herde 3 betrug die Isolierungsrate 63%. Da diese Betriebe bewußt auf den Einsatz von Antibiotika verzichteten, muß entweder eine Kontamination über belebte bzw. unbelebte Faktoren stattgefunden haben oder die VRE persistieren seit Jahren in diesen Ställen.
4. Konventionell orientierte Mastbetriebe wiesen im Durchschnitt zu 87,8% VRE positive Proben auf. Neben den bereits für die ökologisch orientierten Betriebe aufgeführten Quellen kommt hier als weitere Ursache des hohen VRE-Vorkommens der Einsatz von Antibiotika in Therapie und vor allem Prophylaxe in Betracht. Eine Wechselwirkung zwischen Antibiotikaeinsatz und VRE-Vorkommen erscheint plausibel, obgleich auch dort Avoparcin seit über einem Jahr nicht mehr verwendet werden durfte.
5. 48 mittels PCR untersuchten VRE-Isolate, also Stämme die im Mikrodilutionsverfahren eine Vancomycin MHK von mindestens 256 µg/ml besitzen, erwiesen sich als Träger des VanA-Gens.
6. Die PCR-Analyse bestätigte die Annahme (ARTHUR 1993; KLARE et al. 1995), daß ein high-level Resistenzverhalten an das Vorhandensein des VanA-Gens gekoppelt ist.
7. Die Clusteranalyse zeigte eine Ähnlichkeit der 48 VanA-positiven Isolate von über 90%. Bei 51% ließ sich sogar eine Übereinstimmung von über 98% nachweisen. Die Isolate stehen demnach in enger verwandtschaftlicher Beziehung.
8. *E. faecium* stellt den dominierenden VanA-Träger in den überprüften Geflügelmastbetrieben dar.
9. Die Keimbelastung, gemessen an der aeroben Gesamtkeimzahl sowie der Zahl an Enterobacteriaceae und Enterokokken, fiel im kleinbäuerlichen Bereich meist höher aus als in den konventionellen Mastbetrieben.

7. Zusammenfassung

In den letzten Jahren gewinnen einige Stämme der Gattung *Enterococcus* als fakultativ pathogene Erreger in der Humanmedizin an Bedeutung. Während noch vor 10 Jahren Enterokokken nicht zu den nosokomialen Sepsiserregern zählten, werden sie heute bereits für ca. ein Fünftel der septischen Allgemeininfektionen verantwortlich gemacht. Dieser Anstieg begründet sich vor allem auf ihrer besonderen Fähigkeit, Resistenzen gegenüber antimikrobiell wirksame Substanzen auszubilden. Entsprechende Untersuchungen ergaben natürliche Resistenzen gegen Cephalosporine, Aminoglykoside, Polymyxine und Makrolidantibiotika sowie erworbene Empfindlichkeiten gegenüber Tetracyclinen, Chloramphenicol sowie Glykopeptiden und Chinolonen, wobei letztere nur mäßig ausgeprägt ist. Mit diesem Phänomen verbindet sich das aktuelle Versagen von Reserveantibiotika wie Vancomycin und Teicoplanin in der Intensivmedizin.

Die hohe Glykopeptidunempfindlichkeit wird durch die Präsenz des high-level Resistenzgens VanA gekennzeichnet. Diese high-level Resistenz wird mittels Transposonen übertragen. Sie äußert sich in einer durch Vancomycin und Teicoplanin induzierbaren Unempfindlichkeit mit einer MHK von $>256 \mu\text{g/ml}$.

Ziel der Studie war es, Vorkommen und Empfindlichkeit Vancomycin-resistenter Enterokokken (VRE) zu erfassen sowie Zusammenhänge zwischen Glykopeptidresistenzen und dem Einsatz von Avoparcin in der Tierproduktion aufzuzeigen. Das Glykopeptid Avoparcin wurde in der Tiermast als Leistungsförderer eingesetzt und weist eine dem Teicoplanin und Vancomycin ähnliche Struktur auf. Allerdings ist seit Januar 1996 diese Applikation gesetzlich unterbunden worden, da man die Entwicklung von Kreuzresistenzen und Resistenzpools fürchtete.

Die untersuchten Proben stammten aus Geflügelmastbetrieben. Zur Klärung möglicher Zusammenhänge zwischen Avoparcinverfütterung und Resistenzverhalten wurden Betriebe zweier unterschiedlicher Haltungsformen ausgewählt: Einerseits konventionell, also potentiell mit dem Einsatz von Avoparcin (bis zu dessen Verbot) als Futtermittelzusatz arbeitende Großbetriebe und andererseits ökologisch, also unter dem Verzicht von Fütterungsarzneimitteln produzierende Kleinbetriebe.

Um ein möglichst breites Spektrum der Infektionskreise zu erfassen, wurden die Proben aus den Bereichen Stall, Schlachthof und Lebensmittelendprodukt gezogen.

Es wurden insgesamt 223 Proben entnommen und 281 VRE-Stämme isoliert. Zunächst wurde von allen VRE-Stämmen nach kulturmorphologischen, biochemischen und serologischen Kriterien die Artzugehörigkeit bestimmt. Anschließend wurde die Glykopeptidempfindlichkeit im Mikrodilutionsverfahren geprüft. Bei 48, auf grund von Herkunft, Haltungsform und Resistenzverhalten ausgewählten Isolaten, wurde mittels PCR das VanA-Gen nachgewiesen. Von diesen Isolaten wurde eine horizontale Polyacrylamidgelelektrophorese durchgeführt, und die Gele durch eine Clusteranalyse mit dem Programm Gelcompar 3.1 ausgewertet.

60,1% der Gesamtproben erwiesen sich bei Anzüchtung auf einem mit 50 mg Vancomycin/l supplementierten CATC-Agar als VRE positiv. Bei den Proben kleinbäuerlicher Haltung fielen 30,5% VRE-positiv aus, hingegen 87,8% der Proben konventioneller Großbetriebe. Bei den VRE-Isolaten handelte es sich ausschließlich um *E. faecium*-Stämme mit einem high-level Resistenzverhalten. Das VanA-Gen wurde bei allen ausgewählten Isolaten nachgewiesen. Die Clusteranalyse zeigte eine Übereinstimmung der Proteinmuster von mehr als 90% und weist damit einen hohen verwandtschaftlichen Grad nach.

8. Summary

Isolation and identification glycopeptid-resistant enterococcus species

In the field of human medicine in recent years, several strains of the enterococcus species have been gaining significance as facultative pathogenic agents. While as recently as 10 years ago enterococci did not figure as nosocomial septic agents, today they are held responsible for some fifth of all general septic infections. This rise is attributable above all to the special capability of these agents to develop resistance to substances with anti-microbial effects. Studies of these agents describe their natural powers of resistance to cephalosporins, aminoglycosides, polymyxins and macrolidantibiotics, acquired powers of resistance to tetracyclines, chloramphenicol and glycopeptides, and merely moderate sensitivity to chinolones. An associated effect in intensive medicine is the current failure of reserve antibiotics such as vancomycin and teicoplanin.

This high degree of insensitivity to glycopeptides is characterized by the presence of the high-level resistance gene VanA. With transposones, this high-level resistance demonstrates a transferrable resistance with an MHK of more than 256 µg/ml; the same level of inducible resistance is achieved with vancomycin and teicoplanin.

The target of the study was to demonstrate the incidence and resistance behaviour of vanycomycin-resistant enterococci (VRE), as well as the connections between powers of resistance to glycopeptide and the deployment of Avoparcin in livestock production. Avoparcin is likewise a glycopeptide; it was used in livestock breeding as performance booster and has a structural formula similar to that of Teicoplanine and Vancomycin. Since January 1996, however, the usage of Avoparcin has been outlawed due to the fact that it must be assumed that cross-over resistances can develop and lead to the creation of a resistance pool.

The samples examined are derived from poultry-breeding operations. In order to investigate the potential links described above, enterprises with different operating forms were chosen. These were conventional poultry farms, on the one hand, i.e. large-scale operations which potentially deployed Avoparcin (until its prohibition) as feed additive, and on the other hand ecological operations, i.e. small-scale farms raising livestock without medicinal additives to fodder.

To collect data on as wide a spectrum as possible, samples were taken from the following areas: poultry house, slaughterhouse, and carcass.

223 samples were taken from the various areas, and 281 VRE strains were isolated. Initially, the species was identified in line with culture-morphological, biochemical and serological criteria. Once this was done, the glycopeptide sensitivity was tested by means of the microdilution method. The VanA gene of selected isolates (n=48) was proven by means of PCR. The selection criteria were origin, form of livestock holding, and resistance behaviour. A horizontal polyacrylamide-gel electrophoresis was conducted on the basis of these isolates. The gels were analyzed with a cluster analysis furnished by the software program Gelcompar 3.1.

60.1% of all samples proved to be VRE positive. Of this total, 87.8% of the samples originated from conventional large-scale operations, and 30.5% from small-scale farms. In the case of the VRE isolates, these were exclusively *E.faecium* strains with high-level resistance behaviour. The VanA gene was detected in all selected isolates. The cluster analysis showed an agreement of more than 90% in the protein samples, and thus proves a high degree of relationship.

9. Literaturverzeichnis

- Aarestrup, F. M. (1995)
Occurrence of glycopeptide resistance among *Enterococcus faecium* isolates from conventional and ecological poultry farms.
Microb. Drug Resist. 3, 255-267
- Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG. Verfahren zur Probennahme und Untersuchung von Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und Bedarfsgegenständen (1996).
Bundesgesundheitsamt
Beuth Verlag GmbH, Berlin u. Köln.
- Andrews, F.W. und Horder, T.J. (1906)
A study of the streptococci pathogenic for man.
Lancet 2, 708-713
- Arthur, M. und Courvalin, P. (1993)
Genetic and mechanisms of glycopeptid resistance in enterococci.
Antimicrob. Agents Chemoth., Aug. 1993, 1563-1571
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidmann, J. G., Smith, J. A. und Struhl (1990)
Current protocols in molecular biology.
Bd.1, Kap. 2.4.1., John Wiley & Sons, Chicester
- Batish, V. K., Chandler, H. und Ranganathan, B. (1982)
Characterisation of desoxyribonuclease positive enterococci isolated from milk and milk products.
J. Food Protec. 45, 348-351
- Batish, V. K. und Ranganathan, B. (1984)
Occurrence of enterococci in milk and milk products. II. Identification and characterization of prevalent types.
New Zealand J. Dairy Science and Technol. 19, 189-196
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1984)
Williams, A. und Wilkins, C.
Baltimore, Band 2, Kap. Lactobacillae
- Bernsmann, P., Alpert, C. A., Muss, P., Deutscher, J. und Hengstenberg, W. (1982)
The bacterial PEP-dependent phosphotransferase system mechanism of glyconate phosphorylation in *Streptococcus faecalis*.
FEBS Lett. 138, 101-103
- Bohosiewicz, H (1981)
Ausgewählte toxikologische Probleme in der industriellen Geflügelzucht.
Zycie Weter, Warszawa 56, Nr.4

- Boyce, J., Opal, S. M., Chow, J. W., Zervos, M. J., Potter-Bynoe, G., Sherman, C. B., Romulo, C., Fortna, S. und Medeiros, A. (1994)
 Outbreak of multidrug-resistant *Enterococcus faecium* with transferable VanB class vancomycin resistance.
J. Clin. Microb., May 1994, 1148-1153
- Bridge, P. D. und Sneath, P. H. A. (1982)
Streptococcus gallinarum sp. nov. and *Streptococcus oralis* sp. nov.
J. Appl. Bacteriol. 32, 410-415
- Bülte, M. und Lemcke, R (1996)
 Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) in Geflügel- und Schweinefleisch.
 Tagungsbericht der 48. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, S. 207
- Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten (11.1.1996)
 Verordnung über die Aufhebung der futtermittelrechtlichen Zulassung von Avoparcin und Ronidazol als Zusatzstoffe.
 Bundesanzeiger Nr. 10/ 96, 397
- Burkhardt, F. (1992)
 Mikrobiologische Diagnostik
 5. Auflage, 780-781, Thieme Verlag Stuttgart
- Chander, H., Ranganathan, B. und Singh, J. (1979)
 Role of some fatty acids on the growth and lipase production by *Streptococcus faecalis*.
J. Food Sci. 44, 1566-1567
- Collins, M. D. und Jones, D. (1979)
 The distribution of isoprenoid quinones in streptococci of serological groups D and N.
J. Gen. Microbiol. 114, 27-33
- Collins, M. D., Jones, D., Farrow, J. A. E., Kilpper-Bälz, R. und Schleifer, K. H. (1984)
Enterococcus avium nom. rev., comb. nov. ; *E. casseliflavus* nom. rev., comb. nov.;
E. durans nom. rev., comb. nov.; *E. gallinarium* comb. rev., and *E. malodoratus* sp. nov.
Int. J. System. Bacteriol. 34, 220-223
- Collins, M. D., Farrow, J. A. E., und Jones, D. (1986)
Enterococcus mundtii sp. nov.
Int. J. System. Bacteriol. 36, 8-12
- Collins, M. D., Facklam, R.R., Farrow, J. A. E. und Williamson, R. (1989)
Enterococcus raffinosus sp. nov., *Enterococcus solitarius* sp. nov. and *Enterococcus pseudoavium* sp. nov.
FEMS Microb. Lett. 57, 283-288

- Collins, M. D., Williams, A. M. und Wallbanks, S. (1990)
The phylogeny of *Aerococcus* and *Pediococcus* as determined by 16S rRNA sequence analysis: description of *Tetragenococcus* gen. nov.
FEMS Microbiol. Lett. 57, 283-262
- Collins, M. D., Rodrigues, U. M., Pigott, N. E. und Facklam, R.R. (1991)
Enterococcus dispar sp nov. a new enterococcus species from human sources.
Lett. Appl. Microbiol. 12, 95-98
- Cooper, K. E. und Ramadan, F. M. (1955)
Studies on the differentiation between human and animal pollution by means of faecal streptococci.
J. Gen. Microbiol. 12, 180-190
- Costas, M., On, S.L.W., Owen, R.J., Lopez-Urquijo, L. und Lastowica, A.J. (1993)
Differentiation of *Heliobacter* species by numerical analysis of their one-dimensional electrophoretic protein patterns.
System. Appl. Microbiol. 16, 396-404
- Dazo, K. B. C. (1996)
Antimicrobial susceptibility of *Enterococcus* spp. isolated from minced meat samples from an EU-approved meat establishment in Berlin, Germany.
Faculty of Veterinary Medicine, Berlin
Postgraduate Studies in Tropical Veterinary Medicine
- Deibel, R.H. (1964)
The group D streptococci.
Bacteriol. Reviews 28, 330-366
- Defernando, G. D. G., Hernandez, P. E., Burgos, J., Sanz, B. und Ordonez, J. H. (1991)
Extracellular proteinase from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*.
Folia Microbiol. 36, 429-436
- Devriese, L. A. und Hajek, V. (1980)
Identification of pathogenetic *Staphylococci* isolated from animals and food derived from animals.
J. Appl. Bacteriol. 49, 1-11
- Devriese, L.A., Dutta, G. N., Farrow, J. A. E., Van de Kerckhove, A. und Phillips, B. A. (1983)
Streptococcus cecorum, a new species isolated from chickens.
Int. J. System. Bacteriol. 33, 772-776
- Devriese, L.A., Van de Kerckhove, A., Kilpper-Bälz, R. und Schleifer, K. H. (1987)
Characterisation and identification of *Enterococcus* species isolated from animals.
Int. J. System. Bacteriol. 37, 258-259

- Devriese, L. A., Facklam, R. R., Hollis, D. und Collins, M. D., (1989)
Identification of Gram-positive coccal and coccobacillary vancomycin-resistant bacteria.
J. Clin. Microbiol. 27, 724- 730
- Devriese, L. A., Ceyskens, K., Rodrigues, U. M. und Collins, M.D. (1990)
Enterococcus columbae, a species from pigeon intestines.
FEMS Microbiol. Lett. 71, 247-252
- Devriese, L. A., Ceyskens, K. und Haesebrouck, F. (1991a)
Characteristics of *Enterococcus cecorum* strains from different animal species
Lett. Appl. Microbiol. 12, 137-139
- Devriese, L. A., Collins, M. D. und Wirth, R. (1991b)
The genus *Enterococcus*.
in Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. und Schleifer, K. H.:
The Prokaryotes, Springer-Verlag
New York, USA, 1465-1481
- Devriese, L. A., Ducatelle, R., Uyttendaele, E. und Haesebrouck, F. (1991c)
Enterococcus hirae infection and focal necrosis of the brain of chicks.
Vet. Rec. 129, 316
- Devriese, L. A., Hommez, J., Wyffels, R. und Haesebrouck, F. (1991d)
Composition of the enterococcal and streptococcal intestinal flora of poultry.
J. Appl. Bacteriol. 71, 46-50
- Devriese, L. A., Laurier, L., De Herdt, P. und Haesebrouck, F. (1992a)
Enterococcal and streptococcal species isolated from faeces of calves, young cattle and dairy cows.
J. Appl. Bacteriol. 72, 29-31
- Devriese, L. A., Crus Colque, J. I., De Herdt, P. und Haesebrouck, F. (1992b)
Identification and composition of the tonsillar and anal enterococcal and streptococcal flora of the dogs and cats.
J. Appl. Bacteriol. 73, 421-425
- Devriese, L. A., Pot, B. und Collins, M. D. (1993)
Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups.
J. Appl. Bacteriol. 75, 399-408
- Devriese, L. A. und Pot, B. (1995)
The genus *Enterococcus*.
in Wood, B. J. B. und Holzappel, W. H.:
The genera of the lactic acid bacteria.
University of Strathclyde, Department of Bioscience and Biotechnology
Glasgow, UK, 328-367

- DIN 58 940, Teil 8, (1996)
 Methoden der Empfindlichkeitsprüfung von bakteriellen Krankheitserregern (außer Mycobakterien) gegen Chemotherapeutika; MHK der Testsubstanzen bei Kontrollstämmen für die Mikrodilution.
 Beiblatt 1 zu DIN 58 9402 Teil 8, 382-388
- Dunny, G. M. (1990)
 Genetic functions and cell-cell interaction in the pheromone inducible plasmid transfer system of *Enterococcus faecalis*.
 Molecular Microbiol. 4, 689-696
- Ellerbroek, L., Dam-Lu, N. L., Krause, P. und Weise, E. (1996)
 Use of bioluminescence assay for rapid estimation of microbial numbers in poultry meat. Concerted Action CT94-1456 „Microbial control in the meat industry“
 Perugia, 5-8 Feb. 1996, 486-489
- Facklam, R.R. und Moody, M. D. (1970)
 Presumptive identification of group D-streptococci: the bile-esculin test.
 Appl. Microbiol. 20, 245-250
- Facklam, R.R. und Collins, M.D. (1989)
 Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme.
 J. Clin. Microbiol. 27, 731-734
- Facklam, R.R. und Washington, J. A. (1991)
 Streptococcus and related catalase-negative gram-positive cocci.
 in Balows, A., Hausler, W. J., Herrmann, K. L., Isenberg, H. und Shadomy, J. H.:
 Manual of Clinical Microbiology
 Washington DC, 238-257.
- Farrow, J. A. E., Jones, D., Phillips, B. A. und Collins, M. D. (1983):
 Taxonomic studies on some group D streptococci.
 J. Gen. Microbiol. 129, 1423-1432.
- Farrow, J. A. E., Kruze, J., Phillips, B. A., Bramley, A. J. und Collins, M. D. (1984)
 Taxonomic studies on *Streptococcus bovis* and *Streptococcus equinus*: Description of *Streptococcus alactolyticus* sp. nov. and *Streptococcus saccharolyticus* sp. nov.
 System. Appl. Microb. 5, 467-482
- Farrow, J. A. E. und Collins, M. D. (1985)
Enterococcus hirae, a new species that includes amino acid assay stain NCDO 1258 and strains causing growth depression in young chickens.
 Int. J. System. Bacteriol. 35, 73-75
- Finegold, S. M., Attebery, H. R. und Sutter, V. (1974)
 Effects of a diet on human flora: comparison of Japanese and American diet.
 American J. Clin. Nutrition 27, 1465-1469

- Fuller, R., Coates, M. E. und Harrison, G. F. (1979)
The influence of spezific bacteria and a filterable agent on the growth of gnotobiotic chicks.
J. App. Bacteriol. 46, 335-342
- George, R. C. und Uttley, A. H. C. (1989)
Susceptibility of enterococci and epidemiology of enterococcal infections.
Epidemiol. Inf. 103, 403-416
- Grayson, M. L., Elipoulos, G. M., Wennersten, C. B., Ruoff, K. L., Klimm, K., Sapico, F. L., Bayer, A. S. und Moellering, A. C. (1991)
Comparison of *Enterococcus raffinosus* with *Enterococcus avium* on the basis of penicillin susceptibility, penicillin-binding protein analysis, and high-level aminoglycosid resistance.
Antimicrob. Agents Chemother. 3, 1408-1412
- Hayden, M. K., Picken, R. N. und Sahn, D. F. (1997)
Heterogeneous expression of glycopeptide resistance in enterococci associated with transfer of VanB.
Antimicrob. Agents Chemother. April 1997, 872-874
- Heider, G., Monreal, G. und Meszaros, J. (1992)
Krankheiten des Wirtschaftsgeflügels.
Verlag Gustav Fischer, Stuttgart, 1992, Band 1, Kap.11, 227-231
- Heller, K. und Rösenthaller, R. (1978)
 β -D-Phosphogalactosidase-galactohydrolase of *Streptococcus faecalis* and the inhibition of its synthesis by glucose.
Canadian J. Microb. 24, 512-515
- Iwen, P. C., Kelly, D. M., Linder, J. und Hinrichs, S. H. (1996)
Revised approach for identification and detection of ampicillin and vancomycin resistance in *Enterococcus* species by using MicroScan Panels.
J. Clin. Microbiol., July 1996, 1779-1783
- Iwen, P. C., Kelly, D. M., Linder, J. und Hinrichs, S. H. (1997):
Change in prevalence and antibiotic resistance of enterococcus species from blood cultures over an 8-year period.
Antimicrob. Agents Chemother. Feb. 1997, 494-495.
- Jacobs, N.J, und Van Demark, P.J. (1960)
Comparison of the mechanism of glycerol oxidation in aerobically and anaerobically grown *Streptococcus faecalis*.
J. Bacteriol. 79, 532-538

- Jensen, L. B., Ahrens, P., Dons, L., Jones, R. N., Hammerum, A. M. und Aarestrup, F. M. (1998)
Molecular analysis of Tn1546 in *Enterococcus faecium* isolated from animals and humans.
J. Clin. Microbiol., Feb. 1998, 437-442
- Jones, D. (1978)
Composition and differentiation of the genus *Enterococcus*.
in Skinner, F.A. und Quesnel, L.B.:
Streptococci
Academic Press, London, UK, 1-49.
- Kariyama, R. und Shockmann, G. D. (1992)
Extracellular and cellular distribution of muramidase-2 and muramidase-1 of *Enterococcus hirae* ATCC 9790.
J. Bacteriol. 174, 3236-3241
- Kaufhold, A. und Ferrieri, P. (1991)
Isolation of *Enterococcus mundtii* from normally sterile body sites in two patients.
J. Clin. Mikrob. 29, 1075-1077
- Kielwein, G. (1978)
Vorkommen und Bedeutung von Enterokokken in Milch und Milchprodukten.
Arch. Lebensmittelhyg. 29, 127-128
- Klare, I., Coatz, E., Al-Obheid, S., Wagner, J., Rodloff, A.C. und Witte, W. (1992)
Glycopeptidresistenz bei *Enterococcus faecium* aus Besiedlungen und Infektionen von Patienten aus Intensivstationen Berliner Kliniken und einem Transplantationszentrum.
ZAC Zschr. Antimicrob. Antineoplast. Chemother. 10, 45-53
- Klare, I., Wagner, J., Rodloff, A.C., Witte, W. und Hakenbeck, R. (1992)
Overproduction of a penicillin-binding protein is not the only mechanism of penicillin resistance in *Enterococcus faecium*.
Antimicrob. Agents Chemother. 36, 783-787
- Klare, I., Heier, H., Clauss, H. und Witte, W. (1993)
Environmental strains of *Enterococcus faecium* with inducible high-level resistance to glycopeptides.
FEMS Microbiol. Lett. 106, 23-30 und Addendum *FEMS Microbiol. Lett.* 107, 349
- Klare, I., Heier, H., Clauss, H., Reissbrodt, R. und Witte, W. (1995)
VanA-mediated high-level glycopeptid resistance in *Enterococcus faecium* from animal husbandry.
FEMS Microbiol. Lett. 125, 165-172
- Klare, I. und W. Witte (1997)
Glykopeptidresistente Enterokokken: zur Situation in Deutschland.
Hyg. Mikrobiol. 1, 31-38

- Klein, G., Pack, A. C. Hallmann und Reuter, G. (1998)
 Vancomycin resistant enterococci in raw minced meat in Germany and the influence of avoparcin on the occurrence of VRE in poultry.
 4. Weltkongress, Lebensmittelinfektionen und intoxicationen, 7-12 Juni 1998
 S-B30, 484-489
- Kolb, E. (1989)
 Lehrbuch der Physiologie der Haustiere, 5. Auflage
 Verlag Gustav Fischer, Stuttgart
 Teil 1, Kap. 6.7, 350-351
- Kommission der Europäischen Gemeinschaften (1997)
 Richtlinie 97/6/EG der Kommission vom 30.1.1997 zur Änderung der Richtlinie 70/524/EWG des Rates über Zusatzstoffe in der Tierernährung.
 Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften Nr. L 35/11, 2. 97
- Kruse, H. (1995)
 The use of avoparcin as a feed additive and the occurrence of vancomycin resistant *Enterococcus* spp. in poultry production.
 Report from the Norwegian College of Veterinary Medicine and the State Veterinary Laboratories, Department of Pharmacology, Oslo
- Kusuda, R., Kawai, K., Salati, F., Banner, C. R., and Fryer, J.L. (1991)
Enterococcus seriolicida sp. nov., a fish pathogen.
 Int. J. System. Bacteriol. 41, 406-409
- Lacey, R. W. (1975)
 Antibiotic resistance plasmids of *Staphylococcus aureus* and their clinical importance.
 Bacteriol. Rev. 39, 1-32
- Lacoux, P. A., Jordens, J. Z., Fenton, C. M, Guiney, M. und Pennington, T. H. (1992)
 Characterisation of enterococcal isolates by restriction enzyme analysis of genomic DNA.
 Epidemiol. Inf. 109, 69-80
- Lancefield, R.C. (1933)
 A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci.
 J. Experiment. Med. 57, 571-595
- London, J. und Meyer, E.Y. (1970)
 Malate utilisation by group D streptococci. Regulation of malic enzym synthesis by an inducible malate permease.
 J. Bacteriol. 102, 130-135
- Luginbuhl, L. M., Rotbart, H. A., Facklam, R. R., Roe, M. H. und Elliot, J. A. (1987)
 Neonatal enterococcal sepsis: causecontrol study and discription of an outbreak.
 Pediatr. Infect. Dis. 6, 1022-1030

- Martinez-Murcia, A. J. und Collins, M. D. (1991)
 Enterococcus sulfureus, a new yellow-pigmented Enterococcus species.
 FEMS Microbiol. Lett. 80, 69-74
- Matthes, S. und Hanschke, J. (1977)
 Experimentelle Untersuchungen zur Übertragung von Bakterien über das Hühnerei.
 Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 90, 200-203
- Mead, G. C. (1978)
 Streptococci in the intestinal flora of man and other non-ruminant animals.
 in Skinner, F. A. und Quesnel, L. B.
 Streptococci
 Academic Press, London, UK, 245-261
- Moellering, R. (1991)
 The Enterococcus: a classic example of the impact of antimicrobial resistance on
 therapeutic options.
 J. Antimicrob. Chemoth. 28, 1-12
- Murray, B. E., (1990)
 The life and time of Enterococcus.
 Clin. Microbiol. Rev., Jan 1990, 40-65
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (1997)
 Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically.
 NCCLS Doc. M7-A4 17, 12-13
- Noble, C. J. (1978)
 Carriage of group D streptococci in the human bowel.
 J. Clin. Pathol. 4, 1182-1186
- Nowlan, S. S. und Deibel, R. H. (1967)
 Group Q streptococci. I. Ecology, serology, physiology and relationship to established
 enterococci.
 J. Bacteriol. 94, 291-296
- Nusser, E. (1991)
 Charakterisierung klinischer Isolate und einiger Kultursammlungs- und Probiotika-
 Produktionsstämme der Spezies Enterococcus faecium und Enterococcus faecalis durch
 extrazelluläre Enzyme, Chemotherapeutika-Resistenz und Plasmid-Darstellung.
 Vet. med. Dissert., Berlin
- Orla-Jensen, S. (1919)
 The lactic acid bacteria
 Memoirs of the Royal Academy of Sciences in Denmark.
 Section of Sciences 5, 81-197

- Perichon, B., Reynolds, P. und Courvalin, P. (1997)
 VanD-type glycopeptide resistant *Enterococcus faecium* BM 4339.
Antimicrob. Agents Chemother., Sept. 1997, 2016-2018
- Pette, J. W. (1978)
 Damage and recovery in streptococci.
 in Skinner, F. A. und Quesnel, L. B.:
Streptococci
 Academic Press, London, UK, 349-369
- Pette, J. W. (1955)
 De vorming van zwavelwaterstof in Gouds kaas, veroorzaakt door melkzuurbacterien.
Netherlands Milk Dairy J. 10, 291-302
- Piraz, G., El Kharroubi, A., Van Beeumen, J., Choeme, E., Coyette, J. und Ghuysen, J. M. (1990)
 Characterisation of an *Enterococcus hirae* penicillin-binding Protein 3 with low penicillin affinity.
J. Bact. 172, 6856-6862
- Pompei, R., Berlutti, F., Thaller, M.C., Ingianni, A., Cortis, G. und Dainelli, B. (1992)
Enterococcus flavescens sp. nov., a new species of enterococci of clinical origin.
Int. J. Syst. Bacteriol. 42, 365-369
- Reizer, J., Reizer, A. und Saier, M. H. (1992)
 The putative Na⁺/H⁺ antiporter (NapA) of *Enterococcus hirae* is homologous to the putative K⁺/K⁺ antiporter (KefC) of *Escherichia coli*.
FEMS Microbiol. Lett. 94, 161-164
- Reuter, G. (1985)
 Selective media for group D streptococci.
Int. J. Food Microbiol. 2, 103-114
- Reuter, G. (1992)
 Culture media for enterococci and group D-streptococci.
Int. J. Food Microbiol. 17, 101-111
- Ribbeck, R. (1992)
 Parasitäre Erkrankungen, Arthropodenbefall.
 in Heider, G., Monreal, G. und Meszaros, J:
Krankheiten des Wirtschaftsgeflügels
 Verlag Fischer, Stuttgart, 1992, Band 2, 439-460, Kap. 56
- Rodrigues, U. und Collins, M. D. (1990)
 Phylogenetic analysis of *Streptococcus saccharolyticus* based on 16S rRNA sequencing.
FEMS Microbiol. Lett. 71, 231-234

- Rolle, M. und Mayr, A. (1993)
Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 6. Auflage
Vorkommen und Verbreitung von Pilzen und Bakterien.
Verlag Enke, Stuttgart
Teil 4, 509, Kap. 9
- Rosan, B. und William, N. B. (1966)
Serology of strains of *Streptococcus faecalis* which produce hyaluronidase.
Nature 212, 1275
- Ruoff, K. L., De La Maza, L., Murtagh, M. J., Spargo, J. D. und Ferraro, M. J. (1990)
Species identities of enterococci isolated from clinical specimens.
J. Clin. Microb. 28, 435-437
- Schlegel, H. G. (1981)
Wachstumsphasen der Bakterien und Pilze.
In Rolle, M. und Mayr, A.:
Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 6. Auflage
Verlag Enke, Stuttgart, Teil 4, 483, Kap. 5
- Schleifer, K.H. und Kilpper-Bälz, R. (1984)
Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus*
nom. Rev. as *Enterococcus faecalis* comb. Nov. And *Enterococcus faecium* comb. nov.
Int. J. Syst. Bacteriol. 34, 31-34
- Schleifer, K.H. und Kilpper-Bälz, R. (1987)
Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci,
enterococci and lactococci: a review.
Syst. App. Microbiol. 10, 1-19
- Schulz, J. E. und Sahm, D. F. (1993)
Reliability of the E-Test for detection of ampicillin, vancomycin, and high-level
aminoglycosid resistance in enterococcus spp.
J. Clin. Microbiol., Dec. 1993, 3336-3339
- Shapton, D. A. und Shapton, N. F. (1993):
Safe processing of foods.
Butterwort-Heinemann Ltd., Oxford, 400-427
- Sherman, J. M. (1937)
The *Streptococci*.
Bacteriol. Rev. 1, 3-97
- Sherman, J. M. und Wing, H. U. (1937)
Streptococcus durans.
J. Dairy Science 28, 165-167

- Slanetz, L. W. und Bartley, C. H. (1957)
 Numbers of enterococci in water, sewage and feces determined by the membrane filter technique with an improved medium.
J. Bacteriol. 74, 591-595
- Stiles, M. E., Ramji, N. W., Ng, L. K. und Paradis, D.C. (1978)
 Incidence of group D streptococci with other indicator organisms in meats.
Canadian J. Microbiol. 24, 1502-1508
- Thiercelin, E. und Jouhaud, L. (1903)
 Reproduction de l'enterocoque; taches centrales; granulations peripheriques et microblastes.
Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie Paris 55, 686-688
- Thompson, J. K., Patterson, J. T. und Gibbs, P. A. (1980)
 The use of a new phage set for typing poultry strains of *Staphylococcus aureus* obtained from seven countries.
Br. Poult. Sci. 21, 315-330
- Uttley, A. H. C., George, R. C., Naidoo, J., Woodford, N., Johnson, A. P., Collins, C. H., Morrison, D., Gifillan, A. L., Fitch, L. E. und Heptonstall, J. (1989)
 High-level vancomycin-resistant enterococci causing hospital infections.
Epidem. Infect. 103, 173-181
- Vaughn, D. H., Riggsby, W.S. und Mundt, J.O. (1979)
 Desoxyribonucleic acid relatedness of strains of yellow-pigmented group D streptococci.
Int. J. Syst. Bacteriol. 29, 204-212
- Vauterin, L., Swings, J. und Kersters, K. (1991)
 Grouping of *Xanthomonas campestris* pathovars by SDS-PAGE of proteins.
J. Gen. Microbiol. 137, 1677-1687
- Vincent, S., Knight, R. G., Green, M., Sahm, D. F. und Shlaes, D. M. (1991)
 Vancomycin susceptibility and identification of motile enterococci.
J. Clin. Microbiol. 29, 2333-2337
- Watanabe, T., Shimahashi, H., Kawai, Y. und Mutai, K. (1981)
 Study on Streptococci. I. Distribution of faecal streptococci in man.
Microb. Immunol. 25, 257-269
- Watanabe, T., Kumata, H., Sasamoto, M. und Shimizu-kadota, M. (1992)
 The distribution of homologous enterococcal plasmid DNA sequences in human faecal isolates.
J. Appl. Bacteriol. 73, 131-135

- Wegener, H. C., Madsen, M., Nielsen, N. und Aarestrup, F. M. (1997)
Isolation of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* from food.
Int. J. Food Microbiol. 35, 57-66
- Wessels, D., Jooste, P. J. und Mostert, J. F. (1988)
Die voorkoms van *Enterococcus* species in melk en suiwelprodukte.
Suid Afrikaans Tydskrif vir Suiwelkunde 20, 68-72
- Wiesmann, E. (1986)
Gast-Wirt-Beziehungen
Medizinische Mikrobiologie, 6. Auflage
Verlag Thieme, Stuttgart, 8, Kap. 1
- Williams, A. M., Farrow, J. A. E. und Collins, M. D. (1989)
Reverse transcriptase sequencing of 16S ribosomal RNA from *Streptococcus cecorum*.
Lett. Appl. Microbiol. 8, 185-189
- Williams, A. M., Rodrigues, J. A. E. und Collins, M. D. (1991)
Intragenetic relationship of enterococci as determined by reverse transcriptase sequencing
of small -subunit rRNA.
Res. Microb. 142, 67-74
- Williamson, R., Lebouguenec, C., Gutmann, L. und Horaud, T. (1985)
One or two low affinity penicillin-binding proteins may be responsible for the range of
susceptibility of *Enterococcus faecium* to benzylpenicillin.
J. Gen. Microbiol. 131, 1933-1940
- Williamson, R., Gutmann, L., Horaud, T., Delbos, F. und Acar, J. F. (1986)
Use of penicillin-binding proteins for the identification of enterococci.
Gen. Microbiol. 132, 1929-1937
- Witte, W. und Klare, I. (1995)
Resistenzen gegen Glykopeptidantibiotika bei Enterokokken.
Jahresbericht Robert Koch-Institut 1995, 25-41
- Zitzelsberger, W., Götz, F. und Schleifer, K.H. (1984)
Distribution of superoxid dismutases, oxidases, and NADH peroxidase in various
streptococci.
FEMS Microbiol. Lett. 21, 243-246

10. Anhang

Tab. 24: Übersicht der Spezieszugehörigkeit, Herkunft und Resistenzverhalten der isolierten Enterokokken-Stämme

Isolat-Nr.	Spezies	Datum der Probenahme	Herkunft	Entnahmestelle	VanA-Gen	Resistenzverhalten		
						Avo.	Vanco.	Teico.
157 a	E. faecium	8.7.97	Herde 1	Brühbottich	n.u.	128	>256	64
157 b	E. faecium	8.7.97	Herde 1	Brühbottich	+	32	>256	128
158 a	E. faecium	8.7.97	Herde 1	Rupfmaschine	+	>256	>256	128
158 b	E. faecium	8.7.97	Herde 1	Rupfmaschine	n.u.	16	128	16
160 a	E. faecium	8.7.97	Herde 1	Transportkiste	n.u.	16	>256	32
160 b	E. faecium	8.7.97	Herde 1	Transportkiste	n.u.	16	>256	16
163 a	E. faecium	8.7.97	Herde 1	Broiler	+	8	>256	32
163 b	E. faecium	8.7.97	Herde 1	Broiler	n.u.	64	>256	64
165 a	E. faecium	8.7.97	Herde 1	Broiler	+	8	>256	>256
165 b	E. faecium	8.7.97	Herde 1	Broiler	n.u.	16	>256	>256
181 a	E. faecium	8.7.97	Herde 2	Broiler	n.u.	16	>256	32
181 b	E. faecium	8.7.97	Herde 2	Broiler	+	16	>256	64
182 a	E. faecium	8.7.97	Herde 2	Broiler	n.u.	8	>256	64
182 b	E. faecium	8.7.97	Herde 2	Broiler	+	32	>256	64
183 a	E. faecium	8.7.97	Herde 2	Broiler	+	>256	>256	128
184 a	E. faecium	8.7.97	Herde 2	Broiler	+	8	128	64
186 a	E. faecium	8.7.97	Herde 3	Kot	n.u.	16	>256	8
186 b	E. faecium	8.7.97	Herde 3	Kot	+	16	>256	32
187 a	E. faecium	8.7.97	Herde 3	Kot	+	64	>256	32
187 b	E. faecium	8.7.97	Herde 3	Kot	n.u.	32	>256	32
189 a	E. faecium	8.7.97	Herde 3	Kot	n.u.	32	>256	32
189 b	E. faecium	8.7.97	Herde 3	Kot	+	64	>256	128
190 a	E. faecium	8.7.97	Herde 3	Kot	n.u.	16	128	64
190 b	E. faecium	8.7.97	Herde 3	Kot	n.u.	16	128	32
191 a	E. faecium	8.7.97	Herde 3	Futter	n.u.	16	64	64
191 b	E. faecium	8.7.97	Herde 3	Futter	+	16	128	64
206 a	E. faecium	8.7.97	Herde 4	Kot	+	16	>256	>256
206 b	E. faecium	8.7.97	Herde 4	Kot	n.u.	16	128	64
207 a	E. faecium	8.7.97	Herde 4	Kot	n.u.	16	128	64
207 b	E. faecium	8.7.97	Herde 4	Kot	n.u.	16	128	8
208 a	E. faecium	8.7.97	Herde 4	Kot	n.u.	16	>256	32
208 b	E. faecium	8.7.97	Herde 4	Kot	n.u.	32	>256	32
209 a	E. faecium	8.7.97	Herde 4	Kot	+	8	32	8
209 b	E. faecium	8.7.97	Herde 4	Kot	n.u.	64	>256	128
211 a	E. faecium	8.7.97	Herde 4	Tränke	n.u.	16	128	32
211 b	E. faecium	8.7.97	Herde 4	Tränke	n.u.	16	128	16
214 a	E. faecium	8.7.97	Herde 4	Kloakenabstrich	n.u.	16	128	16
214 b	E. faecium	8.7.97	Herde 4	Kloakenabstrich	n.u.	16	>256	32
216 a	E. faecium	8.7.97	Herde 4	Transportkiste	n.u.	32	128	32
216 b	E. faecium	8.7.97	Herde 4	Transportkiste	n.u.	16	128	32
217 a	E. faecium	8.7.97	Herde 4	Transportkiste	n.u.	32	128	64
217 b	E. faecium	8.7.97	Herde 4	Transportkiste	n.u.	16	128	64
218 a	E. faecium	8.7.97	Herde 4	Transportkiste	n.u.	64	128	64
218 b	E. faecium	8.7.97	Herde 4	Transportkiste	n.u.	16	128	64
220 a	E. faecium	8.7.97	Herde 4	Broiler	n.u.	16	>256	64

Isolat-Nr.	Spezies	Datum der Probenahme	Herkunft	Entnahmestelle	VanA-Gen	Resistenzverhalten:		
						Avo.	Vanco.	Teico.
220 b	E. faecium	8.7.97	Herde 4	Broiler	+	64	128	>256
222 a	E. faecium	8.7.97	Herde 4	Broiler	+	8	>256	128
222 b	E. faecium	8.7.97	Herde 4	Broiler	n.u.	16	128	16
5 b	E. faecium	24.2.97	Herde 5	Kloakenabstrich	+	>256	>256	128
7 a	E. faecium	24.2.97	Herde 5	Kloakenabstrich	+	>256	128	16
7 b	E. faecium	24.2.97	Herde 5	Kloakenabstrich	n.u.	>256	>256	64
10	E. faecium	24.2.97	Herde 5	Rupfmaschine	+	>256	>256	>256
16 a	E. faecium	3.3.97	Herde 6	Kot	n.u.	>256	>256	>256
16 b	E. faecium	3.3.97	Herde 6	Kot	+	>256	>256	>256
18 b	E. faecium	3.3.97	Herde 6	Kot	+	8	>256	8
19	E. faecium	3.3.97	Herde 6	Kot	+	>256	>256	64
31 a	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Kot	n.u.	16	>256	64
31 b	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Kot	n.u.	>256	>256	64
31 c	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Kot	n.u.	>256	>256	32
31 d	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Kot	n.u.	>256	>256	32
32 a	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Kot	n.u.	8	>256	>256
32 b	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Kot	n.u.	64	>256	>256
33a	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Kot	n.u.	>256	>256	>256
33 b	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Kot	n.u.	64	>256	128
33 c	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Kot	n.u.	128	>256	>256
33 d	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Kot	n.u.	>256	>256	>256
34 a	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Kot	n.u.	>256	>256	>256
34 b	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Kot	+	>256	>256	>256
34 c	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Kot	n.u.	64	>256	128
34 d	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Kot	n.u.	>256	>256	32
35 a	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Kot	n.u.	>256	>256	128
35 b	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Kot	n.u.	>256	>256	64
35 c	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Kot	n.u.	>256	>256	64
35 d	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Kot	n.u.	>256	>256	64
36 a	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Futter	n.u.	>256	>256	128
36 b	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Futter	n.u.	>256	>256	64
37 a	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Tränke	n.u.	32	>256	128
37 b	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Tränke	n.u.	128	>256	32
38 a	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Staub	n.u.	32	>256	64
38 b	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Staub	n.u.	16	>256	32
39 a	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Kloakenabstrich	n.u.	>256	>256	128
39 b	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Kloakenabstrich	n.u.	16	>256	16
39 c	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Kloakenabstrich	n.u.	>256	>256	128
40	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Kloakenabstrich	n.u.	128	>256	128
41 a	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Kloakenabstrich	+	>256	>256	>256
41 b	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Kloakenabstrich	n.u.	>256	>256	>256
42 a	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Kloakenabstrich	n.u.	>256	>256	>256
42 b	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Kloakenabstrich	n.u.	>256	>256	128
43 a	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Kloakenabstrich	n.u.	>256	>256	>256
43 b	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Kloakenabstrich	n.u.	>256	>256	>256
44 a	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Brühbottich	n.u.	>256	>256	128
44 b	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Brühbottich	n.u.	>256	>256	64
45 a	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Rupfmaschine	n.u.	>256	>256	64
45 b	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Rupfmaschine	n.u.	>256	>256	>256
45 c	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Rupfmaschine	n.u.	>256	>256	64
45 d	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Rupfmaschine	n.u.	>256	>256	16

Isolat-Nr.	Spezies	Datum der Probenahme	Herkunft	Entnahmestelle	VanA-Gen	Resistenzverhalten:		
						Avo.	Vanco.	Teico.
46 a	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Transportkiste	+	8	>256	64
46 b	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Transportkiste	n.u.	>256	>256	32
46 c	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Transportkiste	n.u.	8	>256	64
46 d	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Transportkiste	n.u.	>256	>256	64
47 a	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Transportkiste	n.u.	32	>256	64
47 b	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Transportkiste	n.u.	128	>256	32
47 c	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Transportkiste	n.u.	32	>256	64
47 d	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Transportkiste	n.u.	64	>256	64
48 a	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Transportkiste	n.u.	32	>256	32
48 b	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Transportkiste	n.u.	64	>256	32
49 a	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Broiler	n.u.	128	>256	64
49 b	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Broiler	n.u.	32	>256	64
50	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Broiler	n.u.	16	>256	64
51 a	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Broiler	n.u.	32	>256	64
51 b	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Broiler	n.u.	64	>256	32
51 c	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Broiler	+	8	>256	64
52 a	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Broiler	n.u.	64	>256	64
52 b	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Broiler	n.u.	32	>256	64
53 a	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Broiler	n.u.	64	>256	64
53 b	E. faecium	28.4.97	Herde 7	Broiler	n.u.	32	>256	64
55 a	E. faecium	2.5.97	Herde 8	Kot	n.u.	32	>256	64
55 b	E. faecium	2.5.97	Herde 8	Kot	+	64	>256	64
55 c	E. faecium	2.5.97	Herde 8	Kot	n.u.	128	>256	16
56 a	E. faecium	2.5.97	Herde 8	Kot	n.u.	16	128	32
56 b	E. faecium	2.5.97	Herde 8	Kot	n.u.	8	128	32
57 a	E. faecium	2.5.97	Herde 8	Kot	n.u.	32	>256	32
57 c	E. faecium	2.5.97	Herde 8	Kot	n.u.	64	128	64
58 a	E. faecium	2.5.97	Herde 8	Kot	n.u.	32	>256	32
58 b	E. faecium	2.5.97	Herde 8	Kot	n.u.	64	>256	64
58 c	E. faecium	2.5.97	Herde 8	Kot	n.u.	64	>256	16
61 a	E. faecium	2.5.97	Herde 8	Staub	n.u.	>256	>256	32
61 b	E. faecium	2.5.97	Herde 8	Staub	n.u.	>256	128	16
61 c	E. faecium	2.5.97	Herde 8	Staub	n.u.	64	>256	16
62 a	E. faecium	2.5.97	Herde 8	Kloakenabstrich	n.u.	64	>256	32
62 b	E. faecium	2.5.97	Herde 8	Kloakenabstrich	n.u.	32	>256	64
62 c	E. faecium	2.5.97	Herde 8	Kloakenabstrich	n.u.	128	>256	16
63 a	E. faecium	2.5.97	Herde 8	Kloakenabstrich	n.u.	64	>256	128
63 b	E. faecium	2.5.97	Herde 8	Kloakenabstrich	n.u.	128	>256	128
63 c	E. faecium	2.5.97	Herde 8	Kloakenabstrich	n.u.	128	>256	128
64 a	E. faecium	2.5.97	Herde 8	Kloakenabstrich	n.u.	>256	>256	128
64 b	E. faecium	2.5.97	Herde 8	Kloakenabstrich	n.u.	16	>256	32
65 a	E. faecium	2.5.97	Herde 8	Kloakenabstrich	+	8	>256	64
65 c	E. faecium	2.5.97	Herde 8	Kloakenabstrich	n.u.	>256	>256	64
66 a	E. faecium	2.5.97	Herde 8	Kloakenabstrich	n.u.	32	>256	32
66 b	E. faecium	2.5.97	Herde 8	Kloakenabstrich	n.u.	64	>256	64
67 a	E. faecium	2.5.97	Herde 8	Brühbottich	n.u.	32	>256	32
67 b	E. faecium	2.5.97	Herde 8	Brühbottich	n.u.	16	>256	128
68 a	E. faecium	2.5.97	Herde 8	Rupfmaschine	n.u.	32	>256	128
68 b	E. faecium	2.5.97	Herde 8	Rupfmaschine	n.u.	32	>256	128
68 c	E. faecium	2.5.97	Herde 8	Rupfmaschine	n.u.	128	>256	128
69 a	E. faecium	2.5.97	Herde 8	Transportkiste	n.u.	128	>256	128

Isolat-Nr.	Spezies	Datum der Probenahme	Herkunft	Entnahmestelle	VanA-Gen	Resistenzverhalten:		
						Avo.	Vanco.	Teico.
69 b	E. faecium	2.5.97	Herde 8	Transportkiste	+	128	>256	128
69 c	E. faecium	2.5.97	Herde 8	Transportkiste	n.u.	32	128	32
70 b	E. faecium	2.5.97	Herde 8	Transportkiste	n.u.	16	>256	32
70 c	E. faecium	2.5.97	Herde 8	Transportkiste	n.u.	64	>256	64
71 a	E. faecium	2.5.97	Herde 8	Transportkiste	n.u.	64	>256	32
71 c	E. faecium	2.5.97	Herde 8	Transportkiste	n.u.	64	>256	32
72 a	E. faecium	2.5.97	Herde 8	Broiler	n.u.	16	>256	64
72 b	E. faecium	2.5.97	Herde 8	Broiler	n.u.	16	>256	64
73 a	E. faecium	2.5.97	Herde 8	Broiler	+	64	>256	128
73 b	E. faecium	2.5.97	Herde 8	Broiler	n.u.	64	>256	64
73 c	E. faecium	2.5.97	Herde 8	Broiler	n.u.	128	>256	128
74 a	E. faecium	2.5.97	Herde 8	Broiler	n.u.	64	>256	32
74 b	E. faecium	2.5.97	Herde 8	Broiler	n.u.	16	>256	32
75 a	E. faecium	2.5.97	Herde 8	Broiler	n.u.	64	>256	64
75 b	E. faecium	2.5.97	Herde 8	Broiler	n.u.	16	>256	128
77 a	E. faecium	10.6.97	Herde 9	Kot	+	16	>256	64
77 b	E. faecium	10.6.97	Herde 9	Kot	n.u.	>256	>256	64
78 a	E. faecium	10.6.97	Herde 9	Kot	n.u.	32	>256	64
78 b	E. faecium	10.6.97	Herde 9	Kot	n.u.	32	>256	32
79 a	E. faecium	10.6.97	Herde 9	Kot	n.u.	64	>256	64
80 a	E. faecium	10.6.97	Herde 9	Kot	n.u.	64	>256	64
80 b	E. faecium	10.6.97	Herde 9	Kot	+	>256	>256	128
81 a	E. faecium	10.6.97	Herde 9	Kot	n.u.	16	>256	64
81 b	E. faecium	10.6.97	Herde 9	Kot	n.u.	128	>256	64
84 a	E. faecium	10.6.97	Herde 9	Staub	n.u.	128	>256	128
84 b	E. faecium	10.6.97	Herde 9	Staub	n.u.	128	>256	128
86 a	E. faecium	10.6.97	Herde 9	Kloakenabstrich	n.u.	64	>256	64
86 b	E. faecium	10.6.97	Herde 9	Kloakenabstrich	n.u.	32	>256	128
87 a	E. faecium	10.6.97	Herde 9	Kloakenabstrich	n.u.	>256	>256	64
87 b	E. faecium	10.6.97	Herde 9	Kloakenabstrich	n.u.	64	>256	64
88 a	E. faecium	10.6.97	Herde 9	Kloakenabstrich	n.u.	32	>256	128
88 b	E. faecium	10.6.97	Herde 9	Kloakenabstrich	n.u.	64	>256	128
89 a	E. faecium	10.6.97	Herde 9	Kloakenabstrich	n.u.	64	>256	128
89 b	E. faecium	10.6.97	Herde 9	Kloakenabstrich	n.u.	>256	>256	64
90 a	E. faecium	10.6.97	Herde 9	Brühbottich	+	16	>256	64
90 b	E. faecium	10.6.97	Herde 9	Brühbottich	n.u.	64	>256	64
91 a	E. faecium	10.6.97	Herde 9	Rupfmaschine	n.u.	64	>256	64
91 b	E. faecium	10.6.97	Herde 9	Rupfmaschine	n.u.	>256	>256	64
92 a	E. faecium	10.6.97	Herde 9	Transportkiste	+	32	>256	64
92 b	E. faecium	10.6.97	Herde 9	Transportkiste	n.u.	>256	>256	128
93 a	E. faecium	10.6.97	Herde 9	Transportkiste	n.u.	64	>256	64
93 b	E. faecium	10.6.97	Herde 9	Transportkiste	n.u.	128	>256	64
94 a	E. faecium	10.6.97	Herde 9	Transportkiste	n.u.	>256	>256	64
94 b	E. faecium	10.6.97	Herde 9	Transportkiste	n.u.	64	>256	64
95 a	E. faecium	10.6.97	Herde 9	Broiler	n.u.	32	>256	128
95 b	E. faecium	10.6.97	Herde 9	Broiler	n.u.	32	>256	64
96 a	E. faecium	10.6.97	Herde 9	Broiler	n.u.	32	>256	128
96 b	E. faecium	10.6.97	Herde 9	Broiler	n.u.	>256	128	64
97 a	E. faecium	10.6.97	Herde 9	Broiler	n.u.	32	>256	128
97 b	E. faecium	10.6.97	Herde 9	Broiler	n.u.	64	>256	128
98 a	E. faecium	10.6.97	Herde 9	Broiler	n.u.	64	>256	64

Isolat-Nr.	Spezies	Datum der Probenahme	Herkunft	Entnahmestelle	VanA-Gen	Resistenzverhalten:		
						Avo.	Vanco.	Teico.
99 a	E. faecium	10.6.97	Herde 9	Broiler	n.u.	64	>256	128
99 b	E. faecium	10.6.97	Herde 9	Broiler	n.u.	128	>256	64
100 a	E. faecium	14.6.97	Herde 10	Kot	n.u.	32	>256	64
100 b	E. faecium	14.6.97	Herde 10	Kot	n.u.	128	>256	64
101 a	E. faecium	14.6.97	Herde 10	Kot	n.u.	64	>256	32
101 b	E. faecium	14.6.97	Herde 10	Kot	n.u.	>256	>256	64
102 a	E. faecium	14.6.97	Herde 10	Kot	n.u.	>256	>256	64
102 b	E. faecium	14.6.97	Herde 10	Kot	n.u.	32	>256	616
103 a	E. faecium	14.6.97	Herde 10	Kot	n.u.	>256	>256	64
103 b	E. faecium	14.6.97	Herde 10	Kot	n.u.	>256	>256	64
104 a	E. faecium	14.6.97	Herde 10	Kot	n.u.	64	>256	32
104 b	E. faecium	14.6.97	Herde 10	Kot	n.u.	>256	>256	64
106	E. faecium	14.6.97	Herde 10	Tränke	n.u.	64	>256	64
107 a	E. faecium	14.6.97	Herde 10	Staub	n.u.	128	>256	64
107 b	E. faecium	14.6.97	Herde 10	Staub	n.u.	128	>256	64
108 a	E. faecium	14.6.97	Herde 10	Kloakenabstrich	n.u.	128	>256	64
108 b	E. faecium	14.6.97	Herde 10	Kloakenabstrich	n.u.	128	>256	64
109 a	E. faecium	14.6.97	Herde 10	Kloakenabstrich	n.u.	>256	>256	64
109 b	E. faecium	14.6.97	Herde 10	Kloakenabstrich	-	16	>256	128
110 a	E. faecium	14.6.97	Herde 10	Kloakenabstrich	n.u.	>256	>256	32
110 b	E. faecium	14.6.97	Herde 10	Kloakenabstrich	n.u.	>256	>256	64
111 a	E. faecium	14.6.97	Herde 10	Kloakenabstrich	n.u.	>256	>256	64
111 b	E. faecium	14.6.97	Herde 10	Kloakenabstrich	n.u.	16	>256	32
111 c	E. faecium	14.6.97	Herde 10	Kloakenabstrich	n.u.	16	>256	64
112 a	E. faecium	14.6.97	Herde 10	Kloakenabstrich	n.u.	64	>256	64
112 b	E. faecium	14.6.97	Herde 10	Kloakenabstrich	+	16	>256	64
112 c	E. faecium	14.6.97	Herde 10	Kloakenabstrich	n.u.	>256	>256	64
113 a	E. faecium	14.6.97	Herde 10	Brühbottich	n.u.	32	>256	64
113 b	E. faecium	14.6.97	Herde 10	Brühbottich	+	>256	>256	64
114 a	E. faecium	14.6.97	Herde 10	Rupfmaschine	n.u.	>256	>256	64
114 b	E. faecium	14.6.97	Herde 10	Rupfmaschine	n.u.	>256	>256	64
115 a	E. faecium	14.6.97	Herde 10	Transportkiste	n.u.	>256	>256	64
115 b	E. faecium	14.6.97	Herde 10	Transportkiste	n.u.	128	>256	32
116 a	E. faecium	14.6.97	Herde 10	Transportkiste	n.u.	>256	>256	64
116 b	E. faecium	14.6.97	Herde 10	Transportkiste	n.u.	>256	>256	64
117 a	E. faecium	14.6.97	Herde 10	Transportkiste	n.u.	>256	>256	64
117 b	E. faecium	14.6.97	Herde 10	Transportkiste	n.u.	>256	>256	64
118 a	E. faecium	14.6.97	Herde 10	Broiler	n.u.	>256	>256	64
118 b	E. faecium	14.6.97	Herde 10	Broiler	+	>256	>256	128
119 a	E. faecium	14.6.97	Herde 10	Broiler	n.u.	64	>256	32
119 b	E. faecium	14.6.97	Herde 10	Broiler	n.u.	>256	>256	64
120 a	E. faecium	14.6.97	Herde 10	Broiler	n.u.	128	>256	64
120 b	E. faecium	14.6.97	Herde 10	Broiler	n.u.	32	>256	32
121 a	E. faecium	14.6.97	Herde 10	Broiler	n.u.	>256	>256	64
121 b	E. faecium	14.6.97	Herde 10	Broiler	n.u.	8	128	64
122 a	E. faecium	14.6.97	Herde 10	Broiler	n.u.	128	>256	64
122 b	E. faecium	14.6.97	Herde 10	Broiler	n.u.	>256	>256	64
123 a	E. faecium	18.6.97	Herde 11	Kot	n.u.	>256	>256	64
123 b	E. faecium	18.6.97	Herde 11	Kot	n.u.	128	>256	128
124 a	E. faecium	18.6.97	Herde 11	Kot	n.u.	128	>256	128
124 b	E. faecium	18.6.97	Herde 11	Kot	+	128	>256	128

Isolat-Nr.	Spezies	Datum der Probenahme	Herkunft	Entnahmestelle	VanA-Gen	Resistenzverhalten:		
						Avo.	Vanco.	Teico.
125 a	E. faecium	18.6.97	Herde 11	Kot	+	>256	>256	128
125 b	E. faecium	18.6.97	Herde 11	Kot	n.u.	128	>256	128
126 a	E. faecium	18.6.97	Herde 11	Kot	n.u.	128	>256	128
126 b	E. faecium	18.6.97	Herde 11	Kot	n.u.	128	>256	128
127 a	E. faecium	18.6.97	Herde 11	Kot	n.u.	64	>256	64
127 b	E. faecium	18.6.97	Herde 11	Kot	n.u.	64	>256	128
130 a	E. faecium	18.6.97	Herde 11	Staub	n.u.	128	>256	128
130 b	E. faecium	18.6.97	Herde 11	Staub	n.u.	>256	>256	128
131 a	E. faecium	18.6.97	Herde 11	Kloakenabstrich	n.u.	128	>256	128
131 b	E. faecium	18.6.97	Herde 11	Kloakenabstrich	n.u.	>256	>256	128
131 c	E. faecium	18.6.97	Herde 11	Kloakenabstrich	n.u.	64	>256	128
134 a	E. faecium	18.6.97	Herde 11	Kloakenabstrich	n.u.	128	>256	64
134 b	E. faecium	18.6.97	Herde 11	Kloakenabstrich	n.u.	>256	>256	64
136 a	E. faecium	18.6.97	Herde 11	Brühbottich	n.u.	128	>256	64
136 b	E. faecium	18.6.97	Herde 11	Brühbottich	n.u.	64	>256	64
137 a	E. faecium	18.6.97	Herde 11	Rupfmaschine	n.u.	128	>256	32
137 b	E. faecium	18.6.97	Herde 11	Rupfmaschine	n.u.	32	>256	64
138 a	E. faecium	18.6.97	Herde 11	Transportkiste	n.u.	>256	>256	128
138 b	E. faecium	18.6.97	Herde 11	Transportkiste	n.u.	64	>256	64
138 c	E. faecium	18.6.97	Herde 11	Transportkiste	n.u.	128	>256	128
139 a	E. faecium	18.6.97	Herde 11	Transportkiste	n.u.	128	>256	>256
139 b	E. faecium	18.6.97	Herde 11	Transportkiste	n.u.	128	>256	>256
139 c	E. faecium	18.6.97	Herde 11	Transportkiste	n.u.	128	>256	128
140 a	E. faecium	18.6.97	Herde 11	Transportkiste	n.u.	64	>256	128
140 b	E. faecium	18.6.97	Herde 11	Transportkiste	n.u.	>256	>256	64
141 a	E. faecium	18.6.97	Herde 11	Broiler	n.u.	>256	>256	64
141 b	E. faecium	18.6.97	Herde 11	Broiler	n.u.	>256	>256	128
142 a	E. faecium	18.6.97	Herde 11	Broiler	n.u.	64	>256	64
142 b	E. faecium	18.6.97	Herde 11	Broiler	n.u.	>256	>256	128
143 a	E. faecium	18.6.97	Herde 11	Broiler	n.u.	64	>256	128
143 b	E. faecium	18.6.97	Herde 11	Broiler	n.u.	64	>256	128
145 a	E. faecium	18.6.97	Herde 11	Broiler	n.u.	64	>256	32

MHK in µg/ml:

Vancomycin und Teicoplanin <4 sensibel
8-16 intermediär
>32 resistent

Avoparcin <8 sensibel
16-32 intermediär
>32 resistent

n.u. nicht untersucht

Herrn Prof. G. Hildebrandt danke ich für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas und der kritischen Durchsicht des Manuskripts.

Für die Einführung in das Arbeitsgebiet, für die intensive und freundliche Betreuung bei der Durchführung sowie für die Unterstützung und konstruktive Kritik bei der Anfertigung meiner Arbeit gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. Ellerbroek vom BgVV Berlin.

Mein Dank für die unermüdliche Motivation, Diskussionsbereitschaft und Unterstützung bei der Anfertigung meiner Arbeit gilt ganz besonders Frau Dittmar und Frau Fester.

Für die freundliche Unterstützung und konstruktiven Anregungen danke ich Frau Dr. Dinger vom BgVV in Wernigerode.

Frau Dr. Koglin danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. Clauss vom Robert Koch-Institut in Wernigerode für die freundliche Überlassung des EDV-Programms "Bacmain".

Für die freundliche Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit danke ich Herrn Prof. Bülte und Herrn Dr. Lemcke vom Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde der Justus-Liebig-Universität in Giessen.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Weiß und Frau Dahms vom Institut für Biometrie am Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin für die geduldige und kompetente Beratung zu Fragen der Datenanalyse und statistischer Auswertung.

Lebenslauf

Name	Petra Richter
geboren am	23.3.64
Geburtsort	Hamburg
Familienstand	ledig
Schulbildung	1970-1974 Grundschule Alter Teichweg 1974- 1978 Gymnasium Klosterschule 1975- 1980 Realschule Tieloh 1976- 1984 Gymnasium Hermelinweg
Berufsausbildung	1984- 1986 Sozialarbeit in der Altenpflege 1987- 1989 MTLA-Schule am Krankenhaus St. Georg in Hamburg
Berufstätigkeit	1989- 1990 als MTA in Hamburg
Studium	WS 1990/91- WS 1995/96 Studium der Veterinärmedizin an der Freien Universität in Berlin
Approbation als Tierärztin	Juli 1996
Beruflicher Werdegang	seit Juli 1996 Doktorandin am Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin seit Juli 1996 Praxisassistentin und Vertretungen in einer Berliner Kleintierpraxis

Selbständigkeitsversicherung

Die vorliegende Arbeit habe ich auf folgender Grundlage selbständig verfaßt:

- der im Literaturverzeichnis angegebenen Literatur und
- der im Labor erlangten Kenntnisse in der Differenzierung von Mikroorganismen.

Die Arbeit ist nicht schon einmal in einem früheren Promotionsverfahren angenommen oder abgelehnt worden.