Aus dem Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde der Justus-Liebig-Universität Gießen Betreuer: Prof. Dr. M. Bülte

Isolierung und Feintypisierung von Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) aus Geflügel- und Schweinefleisch

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von ROLAND LEMCKE

Tierarzt aus Krefeld- Uerdingen (Nordrhein- Westfalen)

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan:	Prof. Dr. Dr. h.c. B. Hoffmann	
Berichterstatter:	Prof. Dr. M. Bülte	
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer	
Tag der mündlichen Prüfu	ına: 07 07 2003	

Meiner Familie Katharina und Sebastian Heidi, Vedro, Jule, Freddy

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	. 1
II.	LITERATURÜBERSICHT	. 3
1	. Enterokokken	. 3
	1.1 Taxonomische Stellung der Enterokokken	. 3
	1.2 Vorkommen und Bedeutung von Enterokokken	
	1.2.1 Natürliches Vorkommen	
	1.2.2 In Lebensmitteln	
	1.3 Enterokokken als Probiotika	. 6
	1.4 Potentielle Pathogenität von Enterokokken	
	1.4.1 Vorkommen beim Menschen	
	1.4.2 Vorkommen bei Tieren	. 9
2	. Chemotherapeutika	10
_	2.1 Antibakterielle Substanzen	
	2.1.1 Nomenklatur, Wirkungsspektrum, Wirkungsqualität	
	2.2 Glycopeptid-Antibiotika	
	2.2.1 Vancomycin	
	2.2.2 Teicoplanin	
	2.2.3 Avoparcin	
	2.3 Wirkungsmechanismen von Glycopeptiden	13
3	Zusatzstoffe	14
	3.1 Leistungsförderer	14
	3.2 Einsatz von Leistungsförderern	15
4	Antibiotikaresistenz	17
•	4.1 Resistenzmechanismen	
	4.2 Resistenzvermittelnde mobile genetische Elemente	
	4.3 Epidemiologie der Glycopeptid-Resistenz	
5	. Molekularbiologische Methoden	31
J	5.1 Plasmiddarstellung	
	5.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	31
	5.3 Feintypisierungsverfahren	
	5.3.1 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)	
	5.3.2 Randomly Amplified Polymorphic DNS-Methode (RAPD)	

III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	36
1. Material	36
1.1 Probenmaterial	36
1.2 Enterokokken-Isolate	
1.3 Referenzstämme	38
1.4 Material für die Mikrobiologie	39
1.4.1 Nährmedien	39
1.4.2 Reagenzien	40
1.4.3 Verbrauchsmaterial	
1.4.4 Geräte für die Mikrobiologie	40
1.4.5 Stammhaltung und Kultivierung	40
1.4.6 Isolierung, Selektion und Differenzierung	41
1.4.6.1 CATC-Agar	
1.4.6.2 Columbia-CNA-Agar	
1.4.6.3 Phenolrot-Bouillon	
1.5 Material für die Molekularbiologie	42
1.5.1 Reagenzien und Lösungen für die PCR, RAPD und der PFGE	
1.5.1.1 Reagenzien und Lösungen zur DNS-Isolierung (PCR/ RAPD)	
1.5.1.2 Reagenzien zum PCR und RAPD-Ansatz	
1.5.1.3 Reagenzien zum PFGE-Ansatz	
1.5.1.4 Reagenzien zur Gelelektrophorese	
1.5.2 Arbeitsgeräte und weiteres Material	
2. Methoden	
2.1 Mikrobiologische Untersuchungen	
2.1.1 Isolierung von Enterokokken aus Geflügel- und Schweinefleisch	
2.1.2 Identifizierung der Enterokokken-Isolate	
2.1.3 Resistenzbestimmung	
2.1.3.1 Columbia CNA-Agar + Vancomycin	
2.1.3.2 Minimale Hemmkonzentration	
2.2 Molekularbiologische Untersuchungen	
2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	
2.2.1.1 DNS-Präparation	
2.2.1.2 Amplifikationsansatz	
2.2.2 Randomly Amplified Polymorphic DNS-Methode (RAPD)	
2.2.2.1 DNS-Präparation	
2.2.2.2 Amplifikationsansatz	
2.2.3 Gelelektrophorese	
2.2.4 Makrorestriktionsanalyse der genomischen DNS durch die PFGE	
2.2.5 Computerunterstützte Auswertung	
2.2.5.1 Gesamtprofilanalyse	
2.3 Statistische Auswertung	69

IV.		
1	. Mikrobiologische Untersuchungen	. 71
	1.1 Quantitative Bestimmung von Enterokokken	. 71
	1.2 Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE)	. 74
	1.3 Spezies-Differenzierung	
	1.4 Molekularbiologische Untersuchungen	
	1.4.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	
	1.4.2 Randomly Amplified Polymorphic DNA Method (RAPD)	. 97
	1.4.3 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)	
	1.5 Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration	108
2	DISKUSSION Nachweis von Enterokokken aus Lebensmitteln 1.1 Enterokokken- Isolierung mit dem CATC-Agar. 1.2 Enterokokken- Keimzahlen 1.3 Biochemische Differenzierung. Untersuchung von Enterokokken auf Glycopeptidresistenz 2.1 VRE- Selektion mit Vancomycin- supplementiertem Columbia-CNA- Agar Nachweis von Vancomycin-Resistenzgenen in Enterokokken. 3.1 DNA-Isolierung. 3.2 Detektion verschiedener van-Gene mit der PCR.	118 119 119 120 120 121 121
	3.3 Nachweis des <i>van</i> -A-Gens mit der PCR	121 122 122 126 126 127 128 132
VI.	SCHLUSSFOLGERUNGEN	134
VII.	ZUSAMMENFASSUNG	136
VIII	. SUMMARY	138
IX.	ANHANG	140
Χ.	LITERATURVERZEICHNIS	166

Übersicht relevanter bzw. häufig verwendeter Abkürzungen und Einheiten

 α -Häm.: α -Hämolyse

β-Häm.: $\underline{\beta}$ -Hämolyse

Abb.: <u>Abb</u>ildung

Abs.: Absatz

AMG: <u>Arzneimittelgesetz</u>

AP-PCR: <u>Arbitarily Primed polymerase chain reaction</u>

Aqu. bid.: Aqua bidestillata

ATCC: <u>American Type Culture Collection</u>

Avo.: <u>Avo</u>parcin
BP: <u>Blutplatte</u>

Basenpaare

bzw.: <u>b</u>e<u>z</u>iehungs<u>w</u>eise

ca.: <u>circa</u>

CATC-Agar: <u>C</u>itrat-<u>A</u>zid-<u>T</u>ween-<u>C</u>arbonat-<u>Agar</u>

Cfol: Restriktionsendonuklease von <u>Clostridium formioaceticum</u>

cm: Zentimeter

D: Deutschland

Ddel: Restriktionsendonuklease von *Desulfovibrio desulfuricans*

d. h. <u>d</u>as <u>h</u>eißt

Din: <u>D</u>eutsches <u>I</u>nstitut für <u>N</u>ormung

DNS: <u>Desoxyribonucleinsäure</u>

D-Raffino.: <u>D-Raffino</u>se

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und

<u>Z</u>ellkulturen

DTT: <u>Dithiothreitol</u>

E.: <u>Enterococcus</u> oder <u>Escherichia</u>
EDTA: <u>Ethylendinitrotetraessigsäure</u>

EG: Europäische Gemeinschaft

Endonukl. Endonuklease

et al.: <u>et al</u>ibi

etc.: et cetera

EU: <u>E</u>uropäische <u>U</u>nion

evtl.: eventuell

EWG: <u>Europäische Wirtschaftsgemeinschaft</u>

Fa.: <u>Firma</u>

FMG: Futtermittelgesetz

g: <u>G</u>ramm

Galaktosidase

GB: <u>Great Britain (Großbritannien)</u>

ggf.: <u>gegebenenfalls</u>

gram-pos.: gram-positiv

GRE: <u>Glycopeptid-resistente Enterokokken</u>

h: <u>h</u>ora (Stunde/Stunden)

I: <u>I</u>taly (Italien)

i. d. R. <u>i</u>n <u>d</u>er <u>R</u>egel

ISO International Organization for Standardization

JPN Japan

k. A.: <u>k</u>eine <u>A</u>ngaben

KbE: <u>K</u>olonie-<u>b</u>ildende <u>E</u>inheiten(en)

kb: <u>k</u>ilo<u>b</u>ase

kg: <u>K</u>ilogramm

KZ: <u>K</u>eimzah<u>l</u>

I: <u>L</u>iter

L-Arabin.: L-Arabinose

LMBG: <u>L</u>ebens<u>m</u>ittel- und <u>B</u>edarfsgegenständegesetz

log: dekadischer Logarithmus

Manno: Mannose

Mio: <u>Mi</u>lli<u>o</u>nen

Met.- α **-D-Glucosid.:** Methyl- α -D-Glucosidase

MHK: <u>Minimale Hemmstoffkonzentraion</u>

min: Minute/-n

mg: <u>M</u>illigramm

ml: Milliliter

MLEE: <u>Multi-Locus-Enzym-Elektrophorese</u>

mmol: <u>Millimol</u>

MRSA: Methicillin/Oxacillin-resistenter Staphylococcus aureus

n: Stichprobenumfang

n. a.:nicht angegebenn. u.nicht untersuchtNaCI:Natriumchlorid

NL: <u>N</u>ether<u>l</u>ands (Niederlande)

o.g.: oben genannt

p: Wahrscheinlichkeit

PC-Agar: Plate-Count-Agar

PCR: Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)

PFGE: <u>Pulsfeldgelelektrophorese</u>

PMSF: Phenylmethylsulfonylfluorid

pg: <u>P</u>iko<u>g</u>ramm

R.: Resistenz

RAPD: randomly amplified polymorphic DNA-Methode

RKI: Robert-Koch-Institut

rRNS: <u>ribosomale Ribonukleinsäure</u>

RT: Raumtemperatur

Streptokokken oder Staphylokokken

s: Sekunde/-n

SIM: Schwefelwasserstoff-Indol-Motilität

Smal: Restriktionsendonuklease von <u>Serratia ma</u>rcescens

sp., spp.:SpeziesSchw.:SchweinTab.:Tabelle

Teico.: <u>Teico</u>planin

Tris: <u>Tris</u> (hydroxymethyl)-aminomethan

TSB: <u>Tryptic-Soy-Broth</u> (Trypton-Soja-Bouillon)

U/min: <u>U</u>mdrehungen pro <u>Min</u>ute

US/USA: <u>U</u>nited <u>S</u>tates (of <u>A</u>merica)

UV: <u>ultraviolett</u>

V: <u>V</u>olt

VAAREF: Vancomycin-, Ampicillin- und Aminoglycosid-resistenter

Enterococcus faecium

vanA/ vanB/ vanC: <u>Van</u>comycin-Resistenzgen (A, B oder C)

Vanco.: <u>Vanco</u>mycin

VRE: <u>V</u>ancomycin-<u>r</u>esistente <u>E</u>nterokokken

 \tilde{x} Median

 \bar{x} arithmetisches Mittel

x_{max} <u>Max</u>imum/Maximalwert

x_{min} <u>Min</u>imum/Minimalwert

z. B.: <u>z</u>um <u>B</u>eispiel

z. T.: <u>z</u>um <u>T</u>eil

μl <u>Mikrol</u>iter

°C: <u>Grad Celsius</u>

% Prozent

§ Paragraph

> größer als

≥ größer oder gleich

< kleiner als

kleiner oder gleich

I. EINLEITUNG

Das Glycopeptid-Antibiotikum Avoparcin (gebildet von *Streptomyces candidus*) war lange Zeit ein in der Schweine-, Geflügel-, Rinder- und Kälbermast sehr verbreiteter Leistungsförderer.

Es wurde der Verdacht geäußert, dass die Verwendung von Avoparcin in den Tierbeständen zur Entwicklung von Kreuzresistenzen gegenüber Glycopeptid-Antibiotika bei *Enterococcus* (*E*.)- Stämmen beiträgt, und die Wirksamkeit wichtiger Antibiotika beim Menschen eingeschränkt wird (KLARE et al., 1995a,b; WITTE et al., 1995). Dabei geht es um die Glycopeptid- und Reserveantibiotika Vancomycin (gebildet von *Amycolatopsis orientalis*) und Teicoplanin (gebildet von *Actinoplanes teichomyceticus*), die eine ähnliche Strukturformel wie das Avoparcin besitzen. Diese Antibiotika stellen eine wichtige therapeutische Reserve gegen multiresistente *Stapylococcus aureus*- und *Enterococcus*-Stämme dar und sind insbesondere bei der Behandlung immungeschwächter Personen von existentieller Bedeutung. Dies gilt uneingeschränkt auch für Patienten mit lebensbedrohlichen MRSA-Infektionen (Infektionen durch Methicillin/Oxacillin-resistente *Staphylococcus aureus*-Stämme).

Seit Anfang der 90er Jahre wurde in den U.S.A., Dänemark, England und in Deutschland über Krankheitsfälle berichtet, die durch Vancomycin-resistente Entero-kokken (VRE) verursacht worden waren (FRAIMOW et al., 1994; GREEN et al., 1990;

KLARE et al., 1995a, b; WOODFORD et al., 1995a). Am 11. Januar 1996 wurde daher von der Bundesregierung eine nationale Verordnung mit einem Verwendungsverbot für Avoparcin in der Tierernährung erlassen (Bundesanzeiger, 16.01.96). Seit April 1997 hat auch die EU diesem Leistungsförderer die Zulassung gemeinschaftsweit entzogen.

Es stellt sich daher grundsätzlich die Frage, ob durch den Einsatz von Avoparcin oder anderen Fütterungsantibiotika in der Tiermast VRE-Stämme als Ursache für nicht therapierbare Infektionen des Menschen befürchtet werden müssen. Dieses ist zumindest denkbar, da bei unzureichender Schlachthygiene eine fäkale Kontamination nicht auszuschließen ist. Somit könnten Lebensmittel tierischen Ursprungs als Vektoren für solche resistenten *Enterococcus*-Stämme in Frage kommen.

1 Einleitung

In den eigenen Untersuchungen sollte daher untersucht werden:

- Die Prävalenz solcher VRE in Geflügel- und Schweinefleisch im Großraum Gießen von Januar 1996 bis August 1997,
- 2.) das Vorhandensein von *van*A-, *van*B- und *van*C-Genen mithilfe der Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) und
- 3.) die klonale Verwandtschaft *van*A-positiver Isolate aus Lebensmitteln und von Menschen (gleicher Untersuchungszeitraum in Gießen) mithilfe der <u>Randomly Amplified Polymorphic DNA- (RAPD) und der Pulsfeldgelelektrophorese-Methode (PFGE) als DNS-Feintypisierungsverfahren.</u>

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Enterokokken

1.1 Taxonomische Stellung der Enterokokken

Die früher innerhalb der Gattung *Streptococcus* gelisteten fäkalen Streptokokken (*Streptococcus* (*S.*) *faecalis*, ssp. *faecalis*, ssp. *zymogenes*, ssp. *liquefaciens*, *S. faecium*, *S. durans*, *S. bovis*, *S. equinus*, *S. avium* und *S. gallinarum*), sind grampositive und katalasenegative Kokken. Seit ca. einem Jahrzehnt sind sie aufgrund vergleichender 16S- rRNS- und DNS- rRNS-Analysen in der eigenständigen Gattung *Enterococcus* zusammengefasst (COLLINS et al., 1984; SCHLEIFER et al., 1984; LUDWIG et al., 1985). Dabei handelt es sich um eine heterogene Bakteriengruppe, deren Bedeutung als potentielle "Lebensmittelvergifter" und Verderbniserreger immer wieder in der Diskussion steht. Sie wachsen fakultativ anaerob, treten einzeln auf, bilden Paare (Diplokokken) oder kurze Ketten (Streptokokken). Enterokokken sind in der Lage, in Grenzbereichen zu wachsen (Temperaturbereich: 10-45°C, NaCl-Konzentration: bis zu 6,5%, pH: 9,6). Einige Spezies können 30 min bei 60°C überleben (MURRAY, 1990a).

Bisher umfasst diese Gattung 27 biochemisch unterscheidbare Spezies (<u>Tabelle 1</u>): Neben *Enterococcus* (*E.*) faecalis und *E. faecium*, den wichtigsten Spezies innerhalb dieser Gattung, wurden weiterhin *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. hirae*, *E. malodoratus*, *E. mundtii* (SCHLEIFER et al., 1987); *E. cecorum* (WILLIAMS et al., 1989); *E. columbae* (DEVRIESE et al., 1990); *E. dispar* (COLLINS et al., 1991); *E. flavescens* (POMPEI et al., 1992); *E. pseudoavium*, *E. raffinosus*, *E. solitarius* (COLLINS et al., 1989); *E. saccharolyticus* (RODRIGUES et al., 1990); *E. seriolicida* (KUSUDA et al., 1991); *E. sulfureus* (MARTINEZ-MURCIA et al., 1991); *E. asini* (DE VAUX et al., 1998); *E. villorum* (VANCANNEYT et al., 2001); *E. haemoperoxidus*, *E. moraviensis* (SVEC et al., 2001); *E. porcinus*, *E. ratti* (TEIXEIRA et al., 2001); *E. gilus* und *E. pallens* (TYRELL et al., 2002) zugeordnet.

Mittlerweile wurde auch ein festes chromogenes Medium für die Identifizierung von Enterokokken (CHROMagar) entwickelt (MERLINO et al., 1996).

Tabelle 1: Gattung *Enterococcus*

Nr.	Spezies ¹	Lancefield- Gruppe D	Isolation aus:	Literatur
1.	E. faecalis	+	Milch	
2.	E. faecium	+	Milch	
3.	E. avium	+	Kot Tier, Mensch	
4.	E. casseliflavus	+	Pflanzen	
5.	E. durans	+	Milch, etc.	SCHLEIFER, 1987
6.	E. gallinarum	+	Kot Geflügel	
7.	E. hirae	+	Geflügel, Schwein	
8.	E. malodoratus	+	Käse	
9.	E. mundtii	+	Kot Geflügel	
10.	E. cecorum	-	Huhn	WILLIAMS, 1989
11.	E. columbae	-	Taube	DEVRIESE, 1990
12.	E. dispar	-	Mensch	COLLINS, 1991
13.	E. flavescens	+	Mensch	POMPEI, 1992
14.	E. pseudoavium	-	Rindermastitis	
15.	E. raffinosus	+/-	Mensch	COLLINS, 1989
16.	E. solitarius	+	Mensch	
17.	E. saccharolyticus	-	Rinder	RODRIGUES, 1990
18.	E. seriolicida	-	spez. Fischart ²	KUSUDA, 1991
19.	E. sulfureus	-	Pflanzen	MARTINEZ-MURCIA, 1991
20.	E. asini	+	Affen ³	DE VAUX, 1998
21.	E. villorum	?	Ferkel	VANCANNEYT, 2001
22.	E. haemoperoxidus	+	Wasser	SVEC, 2001
23.	E. moraviensis	+	Wasser	0 V L O, 200 I
24.	E. porcinus	?	Tiere	TEIXEIRA, 2001
25.	E. ratti	?	Tiere	TEINEINA, 2001
26.	E. gilus	+	Tiere	TYRELL, 2002
27.	E. pallens	+	Tiere	TTRELL, 2002

¹Ubiquitäres Vorkommen aller Enterokokken: Stuhl/ Kot (Mensch, Tier), Futtermittel, Abwässer, Pflanzen ²Seriola quinqueradiata ³Equus asinus

1.2 Vorkommen und Bedeutung von Enterokokken

1.2.1 Natürliches Vorkommen

Enterokokken sind Bestandteil der natürlichen Darmflora von Mensch und Tier. Sie bilden den überwiegenden Anteil der aeroben gram-positiven Kokken des Darmes, aber auch des weiblichen Genitaltraktes (MAKI und AGGER, 1988). Es sind ca. 10⁴ bis 10⁵ Koloniebildenden Einheiten pro Gramm (KbE/g) in den Faeces zu erwarten. Als Begleitkeime machen sie im Intestinum einen Anteil von <1% der Gesamtflora aus. Aufgrund ihrer Eigenschaften, in Grenzbereichen zu überleben, kommen Enterokokken in einem bemerkenswerten Spektrum von Untersuchungsmaterialien außerhalb des Menschen vor, wie in Staub, Lebensmitteln, Wasser, Abwässern, Futtermitteln und Pflanzen (MURRAY, 1990a).

In gesunden Tieren ist *E. faecium* die vorherrschende Enterokokkenspezies. Das Vorkommen von *E. faecalis* hängt stark vom Alter ab, wobei bei älteren Tieren die Prävalenz auf 10% abfällt. Beim Geflügel können auch *E. gallinarum* und *E. avium* häufig isoliert werden (DEVRIESE et al., 1991, 1992).

1.2.2 In Lebensmitteln

Aus Lebensmitteln sind *E. faecalis* und *E. faecium* die am häufigsten isolierten Enterokokkenarten. Sie gehören zur natürlichen Flora von Rohwürsten und Käse in der Größenordnung von bis zu 10⁷ KbE/g (HAHN, 1984; STILES et al., 1978).

Aufgrund des Vorkommens von Enterokokken im Gastrointestinaltrakt von Tieren ist eine potentielle Enterokokken-Kontamination des Fleisches durch den Schlachtprozess zu erwarten. In Fleisch erreichen sie 10² -10⁵ KbE/g (HAHN, 1984; STILES et al., 1978). Dabei dominiert *E. faecalis* in Rinder- und Schweine- (STILES et al., 1978; FRANZ et al., 1999), sowie wie in Geflügelfleisch (TURTURA und LOREN-ZELLI, 1994; FRANZ et al., 1999).

Häufig wird *E. durans* und *E. faecium* aus roher Milch und verschiedenen Milchprodukten nachgewiesen, während *E. durans* die Pasteurisierung überstehen kann und auch aus Butter isoliert wurde (KIELWEIN, 1978; WESSELS et al., 1988).

In der Wurst- und Käsereitechnologie wird *E. faecium* für die Herstellung fermentierter Lebensmittel als Starter- und Schutzkultur eingesetzt. Neben der wachstumsstimulierenden Wirkung auf Lactis-Streptokokken und Laktobazillen verursachen sie durch Proteolyse eine Geschmacksverstärkung und schnellere Reifung der betreffenden Produkte (HAHN, 1984).

ARIHARA (1994) erweiterte den Einsatz von Enterokokken in der Nahrungsmittelindustrie. Nach dieser Studie stellt die bakterielle Umsetzung von Metmyoglobin in Oximyoglobin durch Enterokokken eine Möglichkeit dar, die Fleischfarbe und qualität zu verbessern bzw. zu erhalten.

Auf der anderen Seite gelten Enterokokken als Hygieneindikatoren für einen unhygienischen Umgang mit Trinkwasser sowie Kindernahrung und dürfen in diesen Lebensmitteln nicht nachgewiesen werden (MOSSEL et al.,1978).

Enterokokken können als Lebensmittelvergifter auftreten, haben aber nur geringe Bedeutung (HAHN, 1984). Aus kontaminierten Lebensmitteln wie Käse, rohem Schinken, Pasteten, Lebergerichten und anderen, die eine Enteritis bei Menschen verursachten, konnten meist *E. faecium* und *E. faecalis* nachgewiesen werden (HEESCHEN, 1999). Enterokokken sind in der Lage, klinisch wirksame biogene Amine wie Histamin und Tyramin zu produzieren (MOSSEL et al., 1978).

1.3 Enterokokken als Probiotika

Probiotika werden definiert als gesundheitsfördernde oder -erhaltende lebensfähige Mikroorganismen für Mensch und Tier. Sie stabilisieren als Futter- oder Nahrungszusatz das natürliche mikroökologische Gleichgewicht der Darmmikroflora und beeinflussen somit positiv die Darmfunktionen hinsichtlich einer besseren Futterverwertung (FULLER, 1989).

In der Tierernährung werden Probiotika aus prophylaktischen und leistungsfördernden Indikationen im engeren Sinne als Ersatz für Antibiotika als Futtermittelzusatzstoffe zur Unterstützung der Mast (Schweine, Geflügel), aber auch therapeutisch zur Gesunderhaltung bei Störungen des mikroökologischen Gleichgewichts der Darmmikroflora eingesetzt (FULLER, 1989).

Für die Zulassung dieser Probiotika wird eine Beschreibung der Stammeigenschaften und ein Nachweis ihrer biologischen Aktivität und Sicherheit (z. B. nicht vorhandene Antibiotika-Resistenzen) gefordert (EG-Richtlinie des Rates 87/153//EWG, HAMMES et al., 1998).

Für die menschliche Ernährung werden einige "probiotische" Sauermilchprodukte, Käsesorten und Rohwürste angeboten. Einige pharmazeutische Präparate für den Menschen enthalten getrocknete Bakterien mit "probiotischem Anspruch" (HAMMES et al., 1998).

Die angepriesene günstige und leistungsfördernde Wirkung auf den Wirtsorganismus soll auf der Ausschaltung der Konkurrenz anderer Mikroorganismen um Nährstoffe und um Haftungsstellen im Darm, auf der Produktion antimikrobieller Substanzen (Bakteriozine), auf Eingriff in die Stoffwechselleistung anderer Bakterien sowie Immunstimulierung beruhen (FULLER, 1989). Im wesentlichen werden Enterokokken, Streptokokken, Laktobazillen, Bifidobakterien, Bazillen und Clostridien als Probiotika eingesetzt (HAMMES et al., 1998; KLEIN, 1999).

Sie sind für diese Indikation nicht geeignet, wenn diese als harmlos geltenden Mikroorganismen Vektoren unerwünschter Eigenschaften wie Antibiotika-Resistenzen oder opportunistische Erreger klinischer Erkrankungen sind. Voraussetzung für den Einsatz bei Mensch und Tier ist daher die genetische Stabilität solcher Stämme und die gesundheitliche Unbedenklichkeit (KLEIN, 1999).

1.4 Potentielle Pathogenität von Enterokokken

1.4.1 Vorkommen beim Menschen

Enterokokken gelten als nicht sehr virulent und als fakultativ pathogen. Sie sind jedoch in der Lage, extrachromosomale Elemente zu akquirieren, die Antibiotika-Resistenzen kodieren. Diese Fähigkeit erlaubt den Enterokokken, sich in Patienten, die antimikrobielle Therapie erhalten, zu vermehren (ACAR et al., 1988). Sie können unter bestimmten Umständen schwere Infektionen hervorrufen, etwa bei immungeschwächten Patienten auf Intensivstationen, älteren Menschen und Säuglingen (MOELLERING, 1998).

Sie werden in allen Bereichen des multikausalen Infektionsgeschehens isoliert (Infektiöse Faktorenkrankheiten, Mischinfektionen, Hospitalismus), wobei ihre Bedeutung steigt. In der Literatur sind wiederholt Erkrankungsfälle beim Menschen aufgrund nosokomialer Infektionen mit Enterokokken beschrieben worden. Weltweit gehören Enterokokken zu den zweit- bis dritthäufigsten Erregern nosokomialer Infektionen Zur Zeit stehen Enterokokken in den USA an dritter Stelle und in Deutschland an zweiter Stelle unter den bei nosokomialen Infektionen isolierten Mikroorganismen. Sie wurden bei 10-14% aller nosokomial erworbenen Infektionen gefunden (WENDT, 1998). Insbesondere Vancomycin-resistente Enterokokken-Stämme sind in den USA bei bis zu 13,6% der Patienten nachgewiesen worden (ANONYMOUS, 1998a).

In der Bundesrepublik Deutschland konnten maximal 5% der Patienten ermittelt werden (ANONYMOUS, 1998a).

Die häufigsten Krankheitsbilder sind: Urogenitalinfektionen, bakterielle Endokarditis, Meningitis, Septikämie, Neugeborenensepsis, Pneumonie, Enteritis, Wund- und Hautinfektionen (MOELLERING, 1998). Dabei haben *E. faecalis* und *E. faecium* als Erreger von Infektionen die größte klinische Bedeutung: *E. faecalis* wird zu 80-90%, *E. faecium* zu 5-15% bei Enterokokken-Infektionen isoliert (GRAY et al., 1991; RUOFF et al., 1990).

Harnwegsinfektionen treten unter den Erkrankungen, die durch Enterokokken hervorgerufen werden, am häufigsten auf (MOELLERING, 1991). Ausgehend von Harnwegsinfektionen kann die Erkrankung mit einer Enterokokken-Septikämie, einer schwerwiegenden Erkrankung mit einer Letalität von 28-58% einhergehen (LEWIS et al., 1990; MAKI et al., 1998; LANDRY et al., 1989).

Enterokokken konnten in ca. 8% positiver Blutkulturen nachgewiesen werden (AN-TALEK et al., 1995; JONES et al., 1994). *E. faecalis* ist der am häufigsten identifizierte grampositive Mikroorganismus bei polimikrobieller Sepsis (LEWIS et al., 1990). Enterokokken sind nach den Streptokokken der Viridans-Gruppe und den Staphylokokken die dritthäufigsten Erreger von Endokarditiden (10-20%, MANDELL et al. 1970; WENDT, 1998). Nach Studien über neonatale Bakteriämien sind Enterokokken in einem Ausbruch bis zu 42% und zu 5% der Fälle beteiligt (LUGINBUHL et al. 1987).

Die Therapie der Wahl bei Enterokokken-Infektionen ist die Kombination von Ampicillin, einem zellwandaktiven Antibiotikum, mit einem Aminoglykosid, um eine synergistische Wirkung zu erzielen. Stellt sich bei der Empfindlichkeitstestung der Enterokokken jedoch heraus, dass es sich um Glykopeptid-resistente Enterokokken handelt, so muß eine differenzierte Resistenztestung der Enterokokken erfolgen, da die Glykopeptid-Resistenz häufig mit einer Multiresistenz einhergeht. Ist ein VRE-Stamm nicht hochgradig gegen die beiden Antibiotika Streptomycin und Gentamicin resistent, dann kann die Kombination aus Ampicillin und Aminoglykosid eingesetzt werden (MOELLERING, 1995; WILSON et al. 1995). Für Harnwegsinfektionen mit VRE scheinen Nitrofurantoin oder Quinolone wirksam zu sein (MURRAY, 1990a)

Das Auftreten und die Verbreitung von mehrfach resistenten Enterokokken (insbesondere *Enterococcus faecium*) zeigt eine beängstigende Entwicklung auf, da keine einheitlich wirksame Therapie mehr existiert (SPERA, 1992). Die Erforschung neuer, gegen VRE wirksamer semisynthetischer Glykopeptide brachte erste Erfolge

(MALABARBA et al., 1995). Erste Untersuchungen beschreiben das Kombinationspräparat Quinupristin/ Dalfopristin (Synercid) als wirksames Antibiotikum gegen VRE (DEVER et al., 1996). Die Arbeitsgruppe um McNEIL et al. beschreiben 2000 eine erfolgreiche Therapie eines mit VRE infizierten Patienten mit Linezolid.

1.4.2 Vorkommen bei Tieren

Auch bei Tieren sind Infektionen und Erkrankungen durch *E. faecalis* und *E. faecium* bekannt. So sind Legehennen in Geflügelbeständen mit Konjunktivitis, Pododermatitis, nekrotische Entzündungen der Kehllappen, Ovariosalpingitis und Peritonitis (KAPITANAKI, 1966; JORTNER et al., 1966; FILLIPOV et al., 1968; MINEV et al., 1969) und bakterielle Endokarditiden bei Schweinen (BATIS et al., 1966), Pferden, Meerschweinchen und Kaninchen beschrieben worden (IHLENBURG, 1960; Übersicht bei: BLOBEL et al., 1994).

Neben der Verbesserung der allgemeinen hygienischen Bedingungen ist die Anwendung von Antibiotika nach Erstellung eines Antibiogrammes indiziert, da zahlreich Resistenzen beschrieben wurden (DERLOT et al., 1991; KRONVALL et al., 1991; LIGOZZI et al., 1991; NOSKIN et al., 1991; PATTERSON et al., 1991 und 1995).

2. Chemotherapeutika

Der Begriff Chemotherapeutika ist eine Sammelbezeichnung für natürlich vorkommende oder synthetisch hergestellte niedermolekulare Substanzen mit (weitgehend) selektiv schädigender Wirkung auf Krankheitserreger u. Tumorzellen durch Blockade des Stoffwechsels. Sie werden in Antibiotika, Antimykotika, Antituberkulotika, Antiparasitika und Zytostatika eingeteilt.

2.1 Antibakterielle Substanzen

2.1.1 Nomenklatur, Wirkungsspektrum, Wirkungsqualität

Antibiotika sind von Schimmelpilzen, Streptomyzeten oder Bakterien gebildete Stoffwechselprodukte und deren (semi-)synthetische Derivate mit hoher Wirkungsintensität. Sie können eine bakteriostatische (z. B. Sulfonamide, Tetrazykline, Chloramphenicol, Makrolid-Antibiotika) oder bakterizide (z. B. Penizilline, Cephalosporine, Aminoglycosid-Antibiotika, Polymyxine) Wirkung entfalten. Alle in der Natur nicht vorkommenden, synthetisch gewonnenen Substanzen mit antimikrobieller Wirkung bezeichnet man auch als antimikrobielle Chemotherapeutika (SIMON, 1991; UNGEMACH, 1999).

Die Einteilung von Antibiotika und Chemotherapeutika kann aufgrund ihrer chemischen Struktur, ihrer biologischen Herkunft oder nach der therapeutischen Anwendung erfolgen.

Man unterscheidet weiterhin Breitspektrum- und Schmalspektrum-Antibiotika. Schmalspektrum-Antibiotika wirken nur gegen bestimmte Erreger, während Breitspektrum-Antibiotika ein mehr oder weniger breites Wirkspektrum besitzen. Als Lokalantibiotika bezeichnet man solche Mittel, die wegen ihrer Toxizität nur lokal anwendbar sind (z. B. Neomycin, Bacitracin, SIMON, 1991).

Unter der Wirkungsqualität oder dem Wirkungstyp wird die Art und Weise verstanden, in der Chemotherapeutika Bakterienpopulationen beeinflussen. Bei einigen Antibiotika wird nur die Vermehrung der Bakterien reversibel gehemmt (Bakteriostase), andere töten die Keime ab (Bakterizidie). Eine vereinfachte Einteilung der Chemotherapeutika hinsichtlich ihrer Wirkungsqualität umfaßt 4 Gruppen (Medizinische Mikrobiologie, UNGEMACH, 1999):

- 1. Immer bakteriostatische Chemotherapeutika (Prototyp: Sulfonamide);
- 2. Vorwiegend bakteriostatische Chemotherapeutika (Prototyp: Tetracycline);
- 3. Immer bakterizide Chemotherapeutika (Prototyp: Aminoglycoside);
- 4. Nur während der Vermehrung der Bakterien bakterizide Chemotherapeutika (Prototyp: Penicilline).

Die Wirkungsmechanismen der Antibiotika, die sogenannten Angriffspunkte sind:

- Hemmung der Zellwandsynthese (Mureinsynthese), z. B. durch Penizilline,
 Cephalosporine;
- 2. Beeinflussung der Zellmembran (Permeabilität), z. B. durch Polymyxine, Colistin;
- 3. Hemmung der DNA- u. RNA-Synthese, z. B. durch Nalidixinsäure;
- 4. Hemmung der Proteinsynthese, z. B. durch Aminoglycosid-Antibiotika, Tetrazykline, Makrolid-Antibiotika;
- 5. Antimetabolitenwirkung, z. B. durch Sulfonamide;

Antibiotika werden bei bakteriellen Infektionskrankheiten eingesetzt; in eindeutigen Fällen erfolgt die Anwendung klinisch-empirisch nach der Wahrscheinlichkeit des Erregers, unter-Umständen nach bakteriologischer Diagnostik u. Resistenzbestimmung der Bakterien (Antibiogramm, SIMON, 1991).

2.2 Glycopeptid-Antibiotika

Die Reserveantibiotika Vancomycin (gebildet von *Amycolatopsis orientalis*) und Teicoplanin (gebildet von *Actinoplanes teichomyceticus*) besitzen eine ähnliche Strukturformel wie das Avoparcin (gebildet von *Streptomyces candidus*) und gehören zur Gruppe der Glycopeptidantibiotika. Vancomycin und Teicoplanin stellen eine wichtige therapeutische Reserve gegen multiresistente *Stapylococcus aureus*- und *Enterococcus*-Stämme dar und sind insbesondere bei der Behandlung immungeschwächter Personen von existenzieller Bedeutung. Dies gilt uneingeschränkt auch für Patienten mit lebensbedrohlichen MRSA-Infektionen. Sie sind daher nur in Notfällen indiziert. (COOK et al., 1978; HERMANS et al., 1987; LUNDSTROM et al., 1995).

2.2.1 Vancomycin

Vancomycin ist seit 1955 bekannt und wird aus Kulturfiltrat von *Amycolatopsis* orientalis isoliert (LECLERCQ und COURVALIN, 1997). Der dringende Bedarf wirksamer Alternativen gegen multiresistente Staphylokokken hat um 1980 die Vancomycin-Forschung neu aktiviert. Es gelang, die Struktur dieses großmolekularen Wirkstoffes aufzuklären. Das komplexe, trizyklische Molekül enthält mehrere funktionelle Gruppen (1 Carboxyl-, 2 Amino- und 3 Phenol-Gruppen) und Voraussetzungen zur Chelatbildung mit Metallionen. Vancomycin wird aus dem Darm nicht resorbiert, daher erfolgt z. B. auch eine orale Verabreichung bei *Clostridium difficile* verursachter Colitis (LUNDSTROM et al., 1995).

2.2.2 Teicoplanin

Teicoplanin ist seit 1989 in die Therapie eingeführt. Dieses dem Vancomycin ähnlichem Glycopeptid-Antibiotikum wird aus Kulturfiltrat von *Actinoplanes teichomyceticus* hergestellt (BABUL et al., 1988).

2.2.3 Avoparcin

Avoparcin (C₅₃H₆O₃₀N₆Cl₃, EWG-Nr. E 715) ist ein Glycopeptid-Antibiotikum und wird aus Kulturfiltrat von *Streptomyces candidus* gewonnen (RICHTER et al., 1996; KLARE et al., 1995a). Das Wirkungsspektrum dieses Antibiotikums umfasst grampositive Bakterien (Staphylokokken, Streptokokken, aerobe und anaerobe Sporenbildner). Es wurde als Leistungsförderer in der Nutztierernährung eingesetzt und war in der Anlage 3 der nationalen Futtermittelverordnung aufgeführt (ANONYMOUS, 1981). Aufgrund des Verdachtes, dass durch den Einsatz von Avoparcin oder anderen Fütterungsantibiotika in der Tiermast VRE-Stämme als Ursache für nicht therapierbare Infektionen des Menschen befürchtet werden müssen, wurde daher am 11. Januar 1996 von der Bundesregierung eine nationale Verordnung mit einem Verwendungsverbot für Avoparcin in der Tierernährung erlassen (Bundesanzeiger; ANONYMOUS, 1996b, ANONYMOUS, 1997b). Seit 30.01.1997 hat auch die EU diesem Leistungsförderer die Zulassung gemeinschaftsweit entzogen (Richtlinie 97/6/EG der Kommission vom 30. Januar 1997).

Die Anwendungsbereiche für Avoparcin sind in der <u>Tabelle 2</u> wiedergegeben (Futtermittel-Verordnung, Anl. 3; ANONYMOUS, 1981).

Tabelle 2: Anwendungsbereiche für Avoparcin nach der FuttermittelVO, Anl. 3

Tierart/ Nutzungsart	Höchstalter der Tiere (Monate)	Gehalt im Alleinfutter (mg je kg)	
		min.	max.
Masthühner		7,5	15
Masttruthühner	16	10	20
Ferkel	4	10	40
Schweine	6	5	20
Kälber	6	15	40
Mastrinder		15	30

Dabei ist die Angabe in der Gebrauchsanweisung zu beachten: "In Ergänzungsfuttermitteln darf die Höchstmenge in der Tagesration nicht überschreiten: 103 mg für 100 kg Tierkörpergewicht, 4,3 mg für jeweils 10 kg Tierkörpergewicht darüber".

2.3 Wirkungsmechanismen von Glycopeptiden

Glycopeptidantibiotika greifen im Gegensatz zu ß-Laktam-Antibiotika nicht ein Zellwandbiosynthese-Enzym, sondern das Substrat an. Sie bilden eine "Bindungstasche' um die beiden endständigen D-Alanyl-D-Alanin-Reste der N-Acetyl-Glucosamin-N-Acetyl-N-Muraminsäure-Pentapeptidprecursoren (N-Ac-Glcn-N-Ac-Mur-L-Ala-D-Gluγ-L-Lys-D-Ala-D-Ala) des Peptidoglycangerüstes aus. Dabei erfolgt die nichtkovalente Bindung über mehrere Wasserstoff-Brückenbindungen. Aufgrund der Größe der gebundenen Glycopeptidmoleküle können die zellwandaufbauenden Enzyme (Transpeptidase, Transglycosidase) durch sterische Behinderung ihre Zielsequenzen nicht erreichen und die Zellwandbiosynthese stoppt. Ihre voluminöse Struktur ist gleichzeitig die Ursache für eine fehlende antibakterielle Wirkung gegen gram-negative Bakterien, da die Glycopeptide die äußere Zellmembran dieser Mikroorganismen nicht durchdringen können (COOK et al., 1978; LECLERCQ und COURVALIN, 1997; KLARE et al., 1998).

3. Zusatzstoffe

Zu den Zusatzstoffen gehören Leistungsförderer, Vitamine, Spurenelemente, Konservierungsstoffe, technische Hilfsstoffe wie Fließhilfsmittel oder Emulgatoren sowie Enzyme und Probiotika (bestimmte Mikroorganismen). Die Zulassung von Zusatzstoffen innerhalb der EU erfolgt unter Zugrundelegung der Richtlinie des Rates 70/524/EWG. Das Futtermittelgesetz regelt die Umsetzung der EU-Zulassung in eine nationale Zulassung (Bayrisches Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten; ANONYMOUS, 1997b; PIONTKOWSKI, 1997; KAMPHUES, 1999).

3.1 Leistungsförderer

Leistungsförderer sind Zusatzstoffe mit pharmakologischer Wirkung und sind in der Anlage 3 der Futtermittelverordnung des Bundes aufgeführt (ANONYMOUS, 1998b). Obwohl einige Futterzusatzstoffe pharmakologische Wirkungen aufweisen, sind sie im Sinne des Futtermittelgesetzes (§2, FMG) keine Arzneimittel, sondern "Werkstoffe der Tierernährung". Zusatzstoffe fallen somit nicht unter die Bestimmungen des Arzneimittelgesetzes (§2 Abs. 3 AMG). Dazu gehören sogenannte Leistungs- und Wachstumsförderer und Stoffe, die zur Prophylaxe bestimmter, verbreitet auftretender Erkrankungen, wie der Coccidiose und der Histomoniasis, eingesetzt werden. Einzelheiten zum Anwendungsbereich zugelassener Leistungsförderer (Tierart, Höchstalter der Tiere), Mindest- und Höchstgehalt in Mischfuttermitteln, ggf. zu Wartezeiten und Deklarationsvorschriften sind ebenfalls in der Anlage 3 der Futtermittelverordnung enthalten. Dabei ist zu beachten, dass einige der als Zusatzstoffe verwendeten Antibiotika und Antikokzidika unter anderen Präparatenamen und in anderer galenischer Zubereitung auch als Arzneimittel zugelassen sind. Wird bei Futterzusatzstoffen der vorgeschriebene Gehalt im Futtermittel unter -oder überschritten oder der Verwendungszweck nicht eingehalten, liegt ein Verstoß gegen futtermittelrechtliche Bestimmungen vor, der entsprechend geahndet wird. Während sich die Nutzen-Risiko-Abwägung bei der Zulassung von Arzneimitteln streng an medizinischen Kriterien orientiert, spielen bei der Zulassung von Zusatzstoffen ökonomische Aspekte eine entscheidende Rolle (Bayrisches Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten; ANONYMOUS, 1997b; PIONTKOWSKI, 1997; KAMPHUES, 1999).

Der Einsatz von Leistungsförderern hat die Steigerung der Mastleistung und somit insbesondere wirtschaftliche Vorteile zum Ziel. Im Gegensatz zu (Fütterungs-) Arzneimitteln darf der Tierhalter Mischfuttermittel, die pharmakologisch wirksame Zusatzstoffe enthalten, direkt vom Futtermittelhersteller bzw. -großhändler oder Futtermittelmischbetrieb beziehen. Diese Tatsache trägt dazu bei, dass die Überwachung der Einhaltung futtermittelrechtlicher Vorschriften erschwert ist. Überschreitungen der zugelassenen Höchstmengen im Futtermittel haben wiederholt zu schweren Intoxikationen ganzer Tierbestände geführt (Bayrisches Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten; ANONYMOUS, 1997b; PIONTKOWSKI, 1997).

3.2 Einsatz von Leistungsförderern

Antibakteriell wirksame Stoffe und sogenannte Probiotika werden in der Nutztiermast und Viehwirtschaft als Leistungsförderer dem Tierfutter in geringer Dosierung zugesetzt und sind für den Landwirt eine sogenannte "Risikoversicherung" (früher als Wachstumsförderer bezeichnet). Kleinere Managementfehler in der Tierhaltung können so ausgeschaltet werden. Diese ergotropen Substanzen haben einen positiven Einfluß auf die Wachstumsraten, der Futterverwertung, der Ausnutzung des Futters bei nicht optimaler Zusammensetzung und bei Geflügel auch der Legeleistung. Die Mastzeiten werden verkürzt, die Aufzuchtverluste und die Durchfallhäufigkeit reduziert. Es kann eine allgemeine Leistungssteigerung zwischen 3-8% erwartet werden (Bayrisches Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten, 1997). Nutritive Antibiotikazulagen wirken an drei Angriffspunkten: Darmflora; Adsorption und endogener Stoffwechsel (soweit das Antibiotikum resorbiert wird). Die Darmflora wird bei nutritiver Anwendung von Antibiotika unterschiedlich beeinflusst. Beispielsweise hemmt Bacitracin hauptsächlich das Wachstum von grampositiven Bakterien, während Tetrazykline auch gramnegative Bakterien, Rikettsien und große Viren beeinflussen. Antibiotika mit breitem Wirkungsbereich sind in der EG nicht mehr als Fütterungsantibiotika zugelassen (KAMPHUES, 1999).

Antibiotika beeinflussen zusätzlich das Darmgewebe (Gewicht und Wandstärke des Dünndarmes sowie Erneuerungsrate der Darmschleimhaut) und erhöhen die Aktivität einiger Verdauungsenzyme. Sie haben einen günstigen Einfluss auf den Gesamtstoffwechsel verschiedener Nähr- und Wirkstoffe: Verbesserung der

N-Retention und der Energieverwertung; Ausübung eines "Spareffektes" bei verschiedenen Vitaminen und Mineralstoffen (KAMPHUES, 1999).

Im engeren Sinne gehören die Antibiotika und Chemotherapeutika zu dieser Gruppe. Ionophore, wie Monensin und Salinomycin, werden bei einigen Tierarten als Leistungsförderer, bei anderen Nutztieren (z.B. Geflügel, Kaninchen) als Antikokzidika verwendet (PIONTKOWSKI, 1997; KAMPHUES, 1999).

Der Marktwert der seit Jahren in etwa konstanten Einsatzmenge soll ca. 35 Mio. DM der volkswirtschaftliche Nutzen nach Angaben der Hersteller ca. 215 Mio. DM betragen. In der Milchviehhaltung werden Leistungsförderer in der EU derzeit nicht eingesetzt, weil keine Zulassung vorliegt. Grundsätzlich kann aber auch in der Milchproduktion mit dem Einsatz von Leistungsförderern ein ökonomischer Nutzen erzielt werden (Bayrisches Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten, 1997).

<u>Tabelle 3</u> gibt den Verbrauch im Jahr 1997 an Antibiotika in der Europäischen Union und der Schweiz wieder (KAMPHUES, 1999).

Tabelle 3: Verbrauch an Antibiotika in der EU und der Schweiz im Jahr 1997

Art des Einsatzes	Tonnen (t)/(%)
Humanmedizin	5.400 (52%)
Tiermedizin	3.494 (33%)
Leistungsförderer	1.599 (15%)
Gesamt	10.493 (100%)

4. Antibiotikaresistenz

Der Begriff "Resistenz" beschreibt in bezug auf antimikrobielle Wirkstoffe eine Unempfindlichkeit oder Widerstandsfähigkeit von Mikroorganismen gegen Antibiotika bzw. Chemotherapeutika, die in Abhängigkeit vom jeweiligen Wirkstoff, den zu untersuchenden Bakterien und den zugrundeliegenden Resistenzmechanismen graduell variieren kann.

Die Resistenzeigenschaften können spezifisch für einen bestimmten Wirkstoff, eine Wirkstoffgruppe bzw. verschiedene Wirkstoffgruppen, aber auch spezifisch für einzelne Bakterienstämme, bestimmte Bakterienspezies, -genera, bzw. –familien vorliegen. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen natürlichen (intrinsischen) und erworbenen Resistenzeigenschaften. (<u>Tabelle 4:</u> BENNET, 1995; SCHWARZ et al., 1999).

Resistente Stämme können regelmäßig dann entstehen, wenn Antibiotika ungezielt, zu oft, zu niedrig dosiert oder ohne Erstellung eines Antibiogramms dem Patienten verabreicht werden. Einmal erworbene Resistenzen können *intra* und *inter speciem* übertragen werden. So ist beispielsweise die Übertragung beispielsweise des *van*A-Gens (codiert die "high-level" Vancomycin-Resistenz) von Enterokokken auf *Arcanobacterium haemolyticum* und *Oerskovia turbata* belegt worden (POWER, 1995). Enterokokken sind natürlich resistent gegen Antibiotika wie Clindamycin, Penicillin G, die meisten Cephalosporine (intrinsische Resistenz, MOELLERING et al., 1991); Erythromycin, Chloramphenicol, Tetracycline (erworbene Resistenz, ACAR et al., 1988); Streptomycin (hochgradige Resistenz durch die Produktion von Steptomycin-Adenyltransferase, MOELLERING et al., 1970, 1991) und Gentamicin. Dagegen ist die Aktivität von Trimethoprim, Cotrimaxol und Ciprofloxacin in vivo unklar (GRAY et al., 1992; WENDT et al., 1998).

Tabelle 4: Natürliche (intrinsische) und erworbene Resistenz (R.)

Resistenzart (R.)	Beschreibung	Beispiele
Natürliche (intrinsische) R.	Natürliche genus- oder spezies- spezifische Eigenschaft der Keime. (Fehlen oder der Unzugänglichkeit der Wirkungsorte der Antibiotika)	-Nalidixinsäureresistenz (Kokken) -Colistin-/Polymyxin-B-Resistenz (Proteus-Keime) -ß-Laktamresistenz (Mycoplasmen) -Makrolidresistenz (<i>E. coli</i>) -Nitrofurantoinresistenz (Pseudomonas)
Erworbene R.	Stammspezifische Eigenschaft durch Mutation und nachfolgen de Selektion durch das antibakterielle Mittel	
Erworbene Extra- Chromosomale R. (infektiöse R.)	die Resistenz wird durch resistenz-vermittelnde mobile genetische Elemente erworben	-Plasmide -Transposons -Genkassetten

4.1 Resistenzmechanismen

Es lassen sich vier verschiedene Resistenzmechanismen unterscheiden, wie in <u>Tabelle 5</u> veranschaulicht wird. (LYON und SKURRAY, 1987; ROBERTS, 1996; LECLERCQ und COURVALIN, 1991; QUINTILLIANI und COURVALIN, 1995; SCHWARZ, et al. 1999; CHOPRA und ROBERTS, 2001)

Tabelle 5: Beispiele für Resistenzmechanismen bei grampositiven und gramnegativen Bakterien

Resistenz-	Resistenz durch		Bakterienart	
mechanismus	gegen		gram +	gram -
enzymatische	Chloramphenicol	Acetyltransferase	х	х
Inaktivierung	Aminoglycoside	Acetyl-, Adenyl- oder Phosphotransferase	х	х
	ß-Lactamantibiotika	ß-Lactamasen	х	х
	Makrolide	Lactonhydrolasen	х	
	Streptogramine	Acetyl- oder Nucleotidyltransferasen	х	
Aktiver Transport	Tetracycline	Effluxsystem	х	х
aus der Bakterienzelle	Makrolide	Effluxsystem	х	
	Fluorchinolone	Effluxsystem	х	х
Chemische Verände- rung oder Schutz der zellulären Angriffsstelle	Tetracycline	ribosomales Schutzprotein	х	х
	Makrolide	rRNS-Methylase	х	х
Ersetzen der empfind- lichen Zielstruktur	Trimethoprim	resistente Dihydrofolatreduktase	х	
durch eine funktionell analoge unempfindliche Struktur	Methicillin	Penicillinbindungsproteine mit veränderter Substratspezifität	х	
	Glycopeptide	Peptidoglycanvorläufer mit reduzierter Bindungsaffinität für Glycopeptide	х	

4.2 Resistenzvermittelnde mobile genetische Elemente

Die entscheidenden resistenzvermittelnden mobilen genetischen Elemente sind Plasmide, Transposons und Genkassetten.

Plasmide sind extrachromosomale Elemente, die in Bakterienzellen als "autonome", meist ringförmig angeordnete, doppelsträngige DNA-Moleküle unterschiedlicher Größe vorliegen und auf denen bestimmte Eigenschaften, die meist einen Selektionsvorteil bieten, kodiert sind. Sie sind zur eigenständigen Replikation (Vermehrung) unabhängig von der chromosomalen DNS befähigt.

Je nach Größe liegen sie in unterschiedlicher Kopienzahl pro Bakterienzelle vor und tragen häufig Antibiotikaresistenzgene.

Gelegentlich findet man neben Antibiotikaresistenzgenen auch Plasmid-lokalisierte Gene, die Resistenzen gegenüber nucleinsäurebindenden Substanzen, Schwermetallionen und/oder Desinfektionsmitteln vermitteln (SCHWARZ et al., 1999).

<u>Tabelle 6</u> stellt die verschiedenen Transfermöglichkeiten von Resistenzplasmiden dar.

Tabelle 6: Transfer von Resistenzplasmiden (BENNET 1995)

Ausbreitung	Vektor
Transduktion	Transfer durch Bakteriophagen in neue bakterielle Wirte
Konjugation	Eigenständiger Transfer eines selbstübertragbaren (konjugativen) Plasmides oder Transposons aus einer Spenderzelle in eine Empfängerzelle
Transformation	Direkte Übertragung reiner Plasmid-DNS in kompetente (aufnahmebereite) Empfängerzellen

In <u>Tabelle 7</u> sind beispielhaft verschiedene Resistenz-Plasmide grampositiver Kokken aufgeführt.

Tabelle 7: Beispiele für Resistenz-Plasmide grampositiver Kokken

Resistenz- Plasmid	Gattung bzw. species	Übertragende Resistenz	Quelle
pAD2	Enterococcus faecalis	Streptomycin, Kanamycin, Erythromycin	CLEWELL et al., 1982
pAMalpha1	Enterococcus faecalis	Tetracyclin	YAGI et al., 1977
pAM beta 1	Enterococcus faecalis	Chloramphenicol, Clindamycin, Erythromycin, Tetracyclin	SCHABERG et al., 1982
pC221, pC223	Staphylococcus aureus	Chloramphenicol	BRENNER et al., 1985 SCHWARZ et al., 1993
pUW3626	Staphylococcus aureus	Gentamicin, Kanamycin, Neomycin, Tobramycin	LYON et al., 1987
n. a.	Staphylococcus intermedius	Penicillin, Streptomycin, Lincomycin, Sulfonamid	WEGENER et al., 1992
pSCS13	Staphylococcus sciuri	Chloramphenicol	SCHWARZ et al., 1993
pSM19035	Streptokokken	Macrolid- Lincosamid- Streptogramin B- Antibiotika	BEHNKE et al., 1980
pIP501	Streptococcus agalactiae	Chloramphenicol, Clindamycin, Erythromycin, Tetracyclin	SCHABERG et al., 1982
pAC1, pAM15346	Streptococcus pyogenes	Chloramphenicol, Clindamycin, Erythromycin, Tetracyclin	SCHABERG et al., 1982
n. a.	Streptococcus Enterococcus Bacillus Clostridium Listeria	Macrolid- Lincosamid- Streptogramin B- Antibiotika	WERKENTHIN et al., 1997

n. a.= nicht angegeben

4.3 Epidemiologie der Glycopeptid-Resistenz

Seit Anfang der 90er Jahre wird in den U.S.A., Dänemark, England und in Deutschland über Krankheitsfälle berichtet, die durch Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) verursacht sind (FRAIMOW et al., 1994; GREEN et al., 1990; KLARE et al., 1995b; WOODFORD et al., 1995a und PEGUES et al., 1997).

Die Vancomycin-Resistenz (Van) wird durch verschiedene Gene codiert (*van*A, *van*B, *van*C, *van*D, *van*E und *van*G).

Die Untersuchung auf das sogenannte *van*A-Gen ist aufgrund der darüber vermittelten "high-level"-Vancomycin- (Minimale Hemmkonzentration, [MHK]: 16-1024μg/ml) und Teicoplanin- (MHK: 8-1024μg/ml) Resistenz von besonderem Interesse. Die Resistenz liegt auf konjugativen Plasmiden auf einem sogenannten "springenden Gen" (Transposon, ARTHUR und COURVALIN, 1993; KLARE et al., 1995a, b; WOODFORD et al., 1995a). In *in vitro*-Experimenten gelang die Übertragung des *van*A-Resistenzgens über Plasmide auf *Staphylococcus aureus* (NOBLE et al., 1992) und auf *Listeria*-Stämme (BIAVASCO et al., 1996). Aus den USA, Japan und Hongkong wurde von den ersten intermediären Vancomycin-resistenten *Staphylococcus aureus*-Stämmen berichtet, deren MHK-Werte bei 4-8μg/ml lagen (CDC; ANONY-MOUS, 1997c, d; CHAN YOW CHEONG, 1999). In den U.S.A. wurde 2002 der erste *van*A-positive *Staphylococcus aureus* –Stamm (ANONYMOUS, 2002a, b) isoliert.

Das seltener vorkommende *van*B-Gen hat dabei eine untergeordnete Bedeutung, da es meist nur eine "moderate-high level"-Vancomycin-(MHK: 4-1024µg/ml) Resistenz und seltener eine und "low level"-Teicoplanin- (MHK: 0,25-2µg/ml) Resistenz codiert (QUINTILIANI et al. ,1993).

Das *van*D-Gen codiert für erworbene "moderate-high level"-Vancomycin- (MHK: 64µg/ml) und "low-level"-Teicoplanin- (MHK: 4µg/ml) Resistenz (PERICHON et al., 1997).

Die *van*C- *van*E- und *van*G -Gene sind Träger einer natürlichen "low level"-Vancomycin- (MHK: 2-32μg/ml) und "low-level"-Teicoplanin- (MHK: 0,125-4μg/ml) esistenz (KLARE et al., 1997; COURVALIN, 1999; FINES et al., 1999; McKESSAR et al., 2000).

In <u>Tabelle 8</u> sind die überwiegend eingesetzten Verfahren zur Isolierung von Enterokokken aus Lebensmitteln und klinischem Material aufgelistet.

Tabelle 8: Isolierung und Selektion von Enterokokken mit unterschiedlichen Verfahren und Nährmedien

Jahr	Ursprung	Nährboden	Methode	Literatur
1995	Hühnerkot	Columbia Agar mit 5% Rinderblut und Aeskulin/ Müller-Hinton II Agar	Ausstrich/ Agardiffusionstest	AARESTRUP, 1995
1995		Vergleich: Bile Esculin Azid Agar (BEA) und Colistin-Nalidixinsäure-Agar mit 5% Schafblut mit supplementierten Van- comycin	Ausstrich	BARTON, 1995
1996	Mensch	Vergleich: -Tryptic Soy Broth (64µg/ml Vancomycin)	Ausstrich/ Agardiffusionstest	LANDMAN,1996
		-Müller-Hinton-Agar (20µg/ml Vancomycin) -Bile Esculin Azid Agar (30µg Vancomycin-Plättchen) -Campylobacter blood agar plate (75µg/ml Clindamycin) -Enterococcosel broth (64µg/ml Vancomycin)		
1998	Schweine- u. Hühnerkot	Slanetz und Bartley-Agar mit 6µg/ml Vancomycin	Ausstrich	BUTAYE, 1999a, b
1998	Schweine- u. Hühnerkot	Kanamycin-Aesculin-Azid-Bouillon (KAA) mit 6µg/ml Vancomycin	Anreicherung	BUTAYE, 1999a, b

Die Studie von LANDMAN et al. (1996) ergab, dass mit der Verwendung von Enterococcosel broth mit 64µg/ml Vancomycin die höchste Nachweisraten von VRE erzielt werden konnten. Die unergiebigste Methode war der Agardiffusionstest mit Bile Esculin Azid Agar (30µg Vancomycin-Plättchen). Eine amerikanische Arbeitsgruppe erarbeitete ein Schema für eine schnelle und effiziente Isolierung von VRE innerhalb von 24h, basierend auf Phänotyp- und PCR-Charakterisierung (SAHM et al., 1997).

Nach SPERA und FARBER (1992) sind Vancomycin-resistente Enterokokken in den USA "die nosokomialen Infektionserreger der 90er Jahre". 1995 betrug die Häufigkeit Glycopeptid-resistenter *Enterococcus faecium* 5% (WITTE et al., 1996), wobei ca. 10% der klinisch gesunden Menschen in ihrer Darmflora glycopeptidresistente Enterokokken aufwiesen (KLARE et al., 1995b). Im Herbst 1996 wurde erstmals von einem Ausbruch von VRE in einem deutschen Krankenhaus berichtet (REINHARDT et al., 1996).

<u>Tabelle 9</u> bietet eine chronologische Übersicht der epidemiologischen Daten zur Situation der Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE).

Der Nachweis von "high level"-resistenten VRE in anderen Lebensmitteln, wie z. B. in Milchprodukten ist noch nicht gelungen (nur "low-level"-Resistenzen MHK: 4µg/ml; GIRAFFA et al., 1997; SUZZI et al., 2000).

<u>Tabelle 10</u> gibt eine Ergebnis-Übersicht der Isolierung Vancomycin-resistenter Enterokokken aus unterschiedlichen Untersuchungsmaterialien verschiedener Untersucher wider.

Tabelle 9: Epidemiologische Daten zur Situation Vancomycin-resistenter Enterokokken (VRE)

Jahr	Land	Quelle	Bemerkung	Literatur
1988	GB	human (Klinik)		UTTLEY, 1988
1988	F	human (Klinik)		LECLERCQ, 1988
1990	USA	human (Klinik)		DUTKA-MALEN, 1990
1991	D	human (Klinik)		KLARE, 1992
1992	ı	human (Klinik)	Todesfälle	LIVORNESE, 1992
1992-97	USA	human (Klinik)		BISCHOFF, 1999
1993	USA	human (Klinik)	Epidemische Verbreitung	CHOW, 1993
1993	D	Wasser	Abwasserproben Kläranlagen	KLARE, 1993
1993	D	Fäkalproben aus Tiermastanlagen	Avoparcin-Einsatz	KLARE, 1993, 1995a, 1995b;
	GB			BATES, 1994;
	DK			AARESTRUP, 1995
1993-97	D	human (Klinik)	Epidemiol. Untersuchung ²	ELSNER, 2000
1994	USA	human (Klinik)	Epidemische Verbreitung	SADER, 1994
1994	USA	human (Klinik)	Todesfälle	BOYCE, 1994
1994-95	USA	human (Klinik)	Epidemiol. Untersuchung	BONTEN, 1998
1994-98	AUS	human/ Tiere		BELL, 1998
1995	D	Lebensmittel	Auftauwasser (Geflügel), Schweinehackfleisch	KLARE, 1995a
1995	D	nicht-hospitalisierte Patienten ¹	gesunde Probanden	KLARE, 1995a
1995-96	D	human (Klinik)	Epidemiol. Untersuchung	ENDTZ, 1997
1995-97	Ν	Gefl./Schw Kot		KRUSE, 1999
1995-98	DK	LM ³ : Gefl. ⁴ /Schw. ⁵	nach Avoparcin-Verbot	BAGER, 1999
1996	D	human (Klinik)	Todesfälle	KLARE, 1996
1996	USA	human/ Tiere		COQUE, 1996
1996	J	human (Klinik)	1. Isolation <i>van</i> A-VRE in Japan	FUJITA, 1998
1996	USA	human (Klinik)	Epidemiol. Untersuchung	FRIDKIN, 1998
1996-97	D	human/ LM	Epidemiol. Untersuchung	LEMCKE, 2000
1997	D	human/ Tiere/ LM	nach Avoparcin-Verbot	KLARE, 1999
1997-98	В	Kotproben v. Tieren		BUTAYE, 1999a, b
1998	D	LM: Schw.		KLEIN, 1998a, b
1998	N	human/ Tiere/ LM	nach Avoparcin-Verbot	BORGEN, 2000a, b
2000	I	Gefl./Schw.: LM/Kot		GROSSO, 2000
2001	F	LM: Gefl./Schw.		GAMBAROTTO, 2001
2002	USA	Hunde	Isolation <i>van</i> A-VRE aus Hunden in den USA	SIMJEE, 2002

¹Anteil von VRE: 12 %, ²Epidemiologische Untersuchung, ³Lebensmittel, ⁴Geflügel, ⁵Schwein

AUS: Australien, B: Belgien, D: Deutschland, DK: Dänemark, F: Frankreich, GB: Großbritannien, J: Japan, N: Norwegen, USA: Vereinigte Staaten von Amerika

Tabelle 10: Isolierung Vancomycin-resistenter Enterokokken aus unterschiedlichen Untersuchungsmaterialien verschiedener Untersucher

Jahr	Ursprung	Untersuchungs- nmaterial	Anzahl unter- suchter Proben	Anzahl isolierter Enterokokken	Anzahl isolierter vanA-positiver VRE	E. faecium	E. faecalis	Literatur
1994	Bauernhof ^a	Schweine	?	?	2	2	0	KLARE, 1995b
1995	Metzgereien	Schweine- hackfleisch ¹	?	?	7	7	0	KLARE, 1995a
"	Bauernhof ^a	Geflügel	?	?	4	4	0	KLARE, 1995b
"	Krankenhaus ^a	Geflügel- fleisch	?	?	2	2	0	"
1995	Supermärkte	Geflügel- fleisch (D) ²	?	?	4	4	0	KLARE, 1995a
1995	Supermärkte	Geflügel- fleisch (DK) ²	?	?	1	1	0	33
1995	Supermärkte	Putenfleisch (D) ²	?	?	5	5	0	33
1995	Supermärkte	Putenfleisch (GB) ²	?	?	2	2	0	"
1994	a "	Stuhlproben ³	?	?	1	1	0	KLARE, 1995b
,,	b "	"	?	?	7	5	2	"
,,	C "	"	?	?	1	1	0	33
"	d "	"	?	?	1	1	0	"
,,	e "	"	?	?	2	1	1	33
1995	nichthospitalisierte Personen	Stuhlproben ³	?	?	13	13	0	KLARE, 1995a
1994	Umgebungs- untersuchung	Abwasser	?	?	8	8	0	KLARE, 1995b
1995- 1996	Krankenhäuser (CND)	Stuhlproben ³	?	?	9	9	0	KARLOWSKI, 1999
1995	8 Hühnerfarmen ⁴	Kotproben	5	13	10	10	0	AARESTRUP, 1995 (DK)
"	6 Hühnerfarmen ⁵	"	5	16	0	0	0	AARESTRUP, 1995 (DK)
,,	51 Hühnerfarmen	"	?	176]]		2	AARESTRUP, 1996 (DK)
,,	49 Schweineherde	"	?	230	221	221	0	"
"	hospitalisierte Personen ⁶	Stuhlproben	?	43			0	33
,,	32 Kälberherden	Kotproben	?	59	0	0	0	"
1994	Bauernhof	Abwasser	?	?	35	?	?	BATES, 1994
"	Farm-Tiere	"	?	?	22	?	?	íí
"	Hühnerfarmen	Geflügel- fleisch	?	?	5	?	?	u
1998	6 Schweineherden	Kotproben	180	?	31	31	0	BUTAYE, 1999a, b (B)
	4 Hühnerfarmen ⁷	"	120	?	34	34	0	í í

[?] nicht angegeben ^aSachsen-Anhalt, ^bBerlin, ^cBrandenburg ^dSachsen, ^eParis, B: Belgien, D: Deutschland, DK: Dänemark, GB: Großbritannien, CDN: Kanada, ¹nach Anreicherung in BHI, ²Auftauwasser, ³humaner Ursprung, ⁴konventionelle Haltung, mit Fütterungsantibiotika-Einsatz (Avoparcin), ⁵Ökologische Haltung ohne Fütterungsantibiotika-Einsatz, ⁶Diagnose: Diarrhoe, ⁷Legehennen, ⁸Fleischhähnchen,

Meist sind Vancomycin-resistente Enterokokken multiresistent, daher wird oft die Bezeichnung GRE (Glycopeptid-resistente Enterokokken) oder VAAREF (Vancomycin-, Ampicillin- und Aminoglycosid-resistenter *Enterococcus faecium*) angewendet.

VRE vom VanA-Typ ließen sich nicht nur in klinischem Material finden, sondern konnten auch aus Abwasserproben verschiedener Kläranlagen isoliert werden (KLARE et al., 1993). Ein Selektionsdruck ausgehend aus dem Krankenhausmilieu dieser Regionen war sehr unwahrscheinlich, da eine Anwendung entsprechender Antibiotika im angegebenen Zeitraum sehr selten war (KLARE et al., 1993, 1995a; WITTE und KLARE, 1995).

Es wurde der Verdacht geäußert, dass die Verwendung von Avoparcin in den Tierbeständen zur Entwicklung von Kreuzresistenzen gegen Vancomycin und Teicoplanin, die eine ähnliche Strukturformel wie das Avoparcin besitzen, bei *Enterococcus* (*E*.)- Stämmen beiträgt und die Wirksamkeit dieser Antibiotika beim Menschen eingeschränkt wird (KLARE et al., 1995b; WITTE et al., 1996). Am 11. Januar 1996 wurde daher von der Bundesregierung eine nationale Verordnung mit einem Verwendungsverbot für Avoparcin in der Tierernährung erlassen (Bundesanzeiger; ANONYMOUS, 1996, 1997b, e). Seit April 1997 hat auch die EU diesem Leistungsförderer die Zulassung gemeinschaftsweit entzogen (Richtlinie 97/6/EG der Kommission vom 30. Januar 1997).

Es stellt sich daher grundsätzlich die Frage, ob durch den Einsatz von Avoparcin oder anderen Fütterungsantibiotika in der Tiermast VRE-Stämme als Ursache für nicht therapierbare Infektionen des Menschen befürchtet werden müssen. Dies ist zumindest denkbar, da bei unzureichender Schlachthygiene eine fäkale Kontamination nicht auszuschließen ist. Somit könnten Lebensmittel tierischen Ursprungs als Vektoren für solche resistenten *E.*-Stämme in Frage kommen.

Seit Jahrzehnten werden verschiedene Antibiotika in der industriellen Tiermast als "Wachstumsförderer" eingesetzt. Neben Makroliden (z. B. Tylosin), Streptograminen (z.B. Virginiamycin) und Chinoxalinen (z.B. Carbadox) wird auch das Glykopeptid-Antibiotikum Avoparcin, seit 1976 zu nutritiven Zwecken in der Schweine-, Hühner-und Putenmast in Deutschland eingesetzt. Aufgrund der schlechten Resorbierbarkeit von Avoparcin im Darmlumen der Tiere werden dabei dort Konzentrationen erreicht, die das Entstehen resistenter Bakterien direkt selektieren können (AARESTRUP et

al., 1996). Mehrere Untersuchungen des Robert-Koch-Institutes Wernigerode (KLARE et al., 1993, 1995a, 1995b) sowie auch verschiedene internationale Studien (BATES et al., 1994; AARESTRUP et al., 1995) bewiesen das Vorkommen von glycopeptidresistenten Enterokokken in Fäkalproben aus Tiermastanlagen, die Avoparcin einsetzten, währenddessen ohne diesen Einsatz in entsprechendem Probenmaterial (aus Legehennenanlagen, sowie privaten Schweine- und Hühnerhaltungen) nur glycopeptidempfindliche Enterokokken gefunden wurden. Fäkalproben von Wildtieren des "Nationalparks Hochharz" wiesen ebenso keine VRE auf, wie Proben aus privaten kleineren Kläranlagen (KLARE et al., 1995b). Eine Kreuzresistenz zwischen Avoparcin und den Glykopeptiden aus der Humanmedizin konnte gezeigt werden. Als molekularbiologische Nachweise dienten die Induktion des VanA-Ligase-Proteins in SDS-Polyacrylamid-Gelen durch Vancomycin, Teicoplanin und Avoparcin (VanA-Phänotyp), sowie der spezifische Nachweis des vanA-Gens mittels PCR (KLARE et al., 1995b).

Ebenfalls nach diesem Schema charakterisiert wurden VRE aus dem Auftauwasser kommerzieller Hühner- und Putenprodukte sowie aus frischem Schweinehackfleisch (nach Voranreicherung ohne Antibiotika-Zugabe). Die Gefahr einer möglichen Verbreitung dieser Isolate ausgehend von einem entsprechenden Selektionsdruck in der industriellen Tiermast über die Nahrungskette auf den Menschen konnte durch den Nachweis von VRE in 12% von nicht-hospitalisierten Patienten (gesunden Probanden) erhärtet werden (KLARE et al., 1995a).

Bisherige epidemiologische Studien über Glycopeptid-resistente Enterokokken vom VanA-Typ mit einer molekularbiologischen Untersuchung ihrer *van*A-Cluster beschränkten sich nur auf humane Isolate. Für den Beweis einer möglichen Ausbreitung von VRE aus der industriellen Tierhaltung über die Nahrungskette auf den Menschen ist entscheidend, ob bestimmte molekularbiologische oder epidemiologische Marker bei VRE von Tieren und von Menschen übereinstimmen.

Mehrere Studien belegen eine weite Verbreitung von VRE des VanA-Typs aus Infektionen aus Europa und den U.S.A. (DUTKA-MALEN et al., 1990; KLARE et al., 1992 und 1994; FRIEDEN et al., 1993; CLARK et al., 1993 und HANDWERGER et al., 1995; LANDMAN et al., 1999). Auch innerhalb verschiedener *Enterococcus-*Spezies ist der VanA-Typ am weitesten verbreitet (HALL et al., 1992a, b; DUTKA-MALEN et al., 1994; ROSATO et al., 1995).

Wie in <u>Tabelle 11</u> ersichtlich ist, wird in zunehmendem Maße über eine Verbreitung der Glycopeptidhochresistenz in anderen gram-positiven Erregern berichtet. Es wurden Vancomycin-resistente klinische Isolate von *Oerskovia turbata* und *Arcanobacterium haemolyticum* (POWER et al., 1995), von *Aureobacterium* sp. (NOLTE et al., 1996), von *Bacillus circulans* (FONTANA et al., 1997), von *Streptococcus bovis* (POYART et al., 1997), von *Streptococcus gallolyticus* (MEVIUS et al., 1998), von *Clostridium innocuum* (MORY et al., 1998) und von *Staphylococcus aureus* (ANONYMOUS, 2002a, b) isoliert.

Tabelle 11: Vancomycin-resistente Mikroorganismen*

Isolat	Resistenzgen/	Land	Quelle
	bzw. MHK		
Staphylococcus aureus	4-8µg/ml	U.S.A.	ANONYMOUS, 1997c
Staphylococcus aureus	4-8µg/ml	Japan	ANONYMOUS, 1997d
Staphylococcus aureus	4-8µg/ml	Hongkong	CHAN, 1999
Staphylococcus aureus	vanA	U.S.A.	ANONYMOUS, 2002a,b
Oerskovia turbata	vanA**	England	POWER, 1995
Arcanobact. haemolyticum	vanA**	England	POWER, 1995
Aureobacterium sp.	32µg/ml	U.S.A.	NOLTE, 1996
Bacillus circulans	vanA	Italien	FONTANA, 1997
Streptococcus bovis	<i>van</i> B	Frankreich	POYART, 1997
Streptococcus gallolyticus	vanA/ vanB	Niederlande	MEVIUS, 1998
Clostridium innocuum	8-16µg/ml	Frankreich	MORY, 1998

^{*}Klinische Isolate

<u>Tabelle 12</u> bietet eine Übersicht über die Vancomycin-Resistenzgene. Mittlerweile sind neben den *van*A-, *van*B-, *van*C-, *van*D-, und das *van*E-Gen auch das *van*G-Gen in Enterokokken beschrieben worden. Das *van*G-Gen wurde in einem *E. faecalis*-Isolat (MHK_{Vancomycin}: 16μg/ml, Teicoplanin-sensibel) nachgewiesen (McKESSAR et al., 2000).

^{**1.} Fall: vanA-Gen außerhalb Enterokokken

Tabelle 12: Vancomycin-Resistenz (Van)

Resistenz	Er	Erworbene Resistenz	enz		Natürliche (i	Natürliche (intrinsische) Resistenz	Sesistenz	
Phänotyp	VanA ¹	VanB ²	VanD³	VanC1 ^{4,5}	VanC2 ^{4,6}	VanC3 ^{4,5}	VanE ⁷	VanG ⁸
Gen	vanA	vanB	vanD	vanC1	vanC2	vanC3	vanE	vanG
MHK ^a Vancomycin	16-1024	4-1024	64	2-321	2-32	2-32	2-32	16
MHK Teicoplanin	8-1024	0,25-2	4	0,125-4	0,125-4	0,125-4	0,125-4	0
Spezies	E. faecium, E. faecalis, E. avium, E. durans, E. gallinarum, E. casseliflavus, E. muntii,	E. faecium, E. faecalis	E. faecium	E. gallinarum	E. casseliflavus, E. flavescens	E. flavescens, E. casseliflavus	E. faecalis	E. faecalis
Lokalisation	Plasmid (& Chromosom)	Chromosom (& Plasmid)	Chromosom	Chromosom (?)	Chromosom (?)	Chromosom (?)	(3)	(5)
Mobiles Element	<i>Tn</i> ⁵ 1546 u. a.	Tn 1547	(5)	(3)	(5)	(3)	(3)	(5)
PCR	Primer vanA1: 5'tctgcaatagagatagccgc3' Primer vanA2: 5'ggagtagctatcccagcatt3'	Primer vanB1: 5 gdccgcagcdgcatggaca3′ Primer vanB2: 5 acgatgccgccatcdcctgc3′	Primer vanD1: 5'taaggcgcttgcatataccg3' Primer vanD2: 5'tgcagccaagtatccggtaa3'	Primer vanC1-1: 5 gaaagacaacaggaagaccgc3′ Primer vanC1-2: 5 tegcatcacaagcaccaatc3′	Primer vanC2-1: 5' cggggaagatggcagtat 3' Primer vanC2-2: 5' cgcagggacggtgatttt 3'	Primer vanC3-1: 5'gotttacttattgttcd3' Primer vanC3-2: 5'gottgttctttgacctta3'	Primer vanE1: 5'tgtgtatcggagctgcag3' Primer vanE2: 5'gtcgattctcgctaatcc3'	Primer vanG1: 5'cggttgtgcgtacttggc3' Primer vanG2: 5'ggtaaagccatagtctgg
PCR Amplifikat	377 Bp ^c	529 Bp	605 Bp	796 Bp	484 Bp	224 Bp	513 Bp	810 Bp
Restriktions- analyse	Endonukl. ^d <i>Cfo</i> I	Endonukl. <i>Dde</i> I	(?)	(3)	(?)	(?)	(5)	(5)
Subfragmente	274 Bp + 103 Bp	329 Bp + 200 Bp	(3)	(5)	(5)	(3)	(3)	(5)

¹KLARE (1995a), ²FRAIMOW (1994), ³ PERICHON (1997), ⁴NAVARRO (1994), ⁵CLARK (1998), ⁶SATAKE (1997), ⁷FINES (1999), COURVALIN (1999),

⁸McKESSAR (2000)

^aMinimale Hemmkonzentration (µg/ml), ^bTransposon, ^cBasenpaare, ^dEndonuklease

5. Molekularbiologische Methoden

Die Entwicklung molekularbiologischer Methoden ermöglichte eine genauere Charakterisierung, insbesondere von pathogenen Mikroorganismen (BÜLTE, 1994).

Die Enterokokken wurden aufgrund von Nukleinsäurehybridisierungsmethoden einer eigenen Gattung innerhalb der Familie der *Streptococcaceae* zugeordnet (COLLINS et al., 1984; SCHLEIFER et al., 1984; LUDWIG et al., 1985).

Seit nunmehr vielen Jahren werden genotypische Verfahren in einer breiten Vielfalt erfolgreich eingesetzt. Beispielhaft seien einige etablierte Methoden aufgeführt, die für die Bearbeitung wissenschaftlicher Fragestellungen bei Enterokokken angewendet werden.

5.1 Plasmiddarstellung

Mit der Plasmiddarstellung (KADO und LIU, 1981), konnten bei Enterokokken Antibiotika-resistenzübertragende Plasmide nachgewiesen werden (Streptomycin, Kanamycin, Erythromycin, Tetracyclin, etc.: CLEWELL et al., 1982; YAGI et al., 1977 und SCHABERG et al., 1982).

5.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

MULLIS beschrieb 1987 eine hochempfindliche Methode zur Vervielfältigung spezifischer DNS-Sequenzen, deren Basenabfolge bekannt ist (MULLIS und FALOONA, 1987). Die Polymerase-Kettenreation (PCR) ist charakterisiert durch eine kontinuierliche Wiederholung eines dreizyklischen Verlaufs. Dabei wird durch die Nachahmung der *in vivo*-DNS-Replikation eine exponentielle *in vitro*-Vervielfältigung der DNS erreicht. Die Vervielfältigungsprodukte, die Amplifikate, können gelelektrophoretisch aufgetrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt, unter UV-Licht sichtbar gemacht und weiteren Analysen zugeführt werden. Dabei interkaliert 3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiumbromid (Ethidiumbromid) die DNS-Helix und verändert die Superhelix-Struktur.

Theoretisch ist es möglich, ein einziges Ziel-DNS-Molekül so hoch anzureichern, dass nach abgeschlossener Amplifikation der sonst nicht mögliche Nachweis gelingt (z. B. für die Diagnostik von bakteriellen, viralen und parasitären Erkrankungen).

Das Prinzip der DNS-Amplifikation besteht aus der zyklischen Wiederholung von drei Schritten:

- 1. **Trennung** (Denaturierung) der beiden komplementären DNS-Stränge (Template-DNS) durch Erhitzen auf 94°C.
- 2. "Anbinden" (Hybridisierung, "Annealing") von 2 komplementären Startern (Primer) an je einen der beiden DNS-Stränge bei einer Temperatur zwischen 30 und 60°C (je nach Art und Länge der Primer). Diese Starter sind synthetische DNS-Stücke von etwa 10 bis 30 Nukleotiden, deren Basen so angeordnet sind, dass sie an den Enden des gesuchten Gensegmentes "anbinden".
- 3. **Synthese** der komplementären DNS-Abschnitte vom 3'-Ende der Starter ausgehend entlang der beiden DNS-Einzelstränge mithilfe einer thermostabilen DNS-Polymerase (z.B. Taq-Polymerase, gebildet von *Thermus aquaticus*) bei einem Temperaturoptimum von etwa 72°C (MULLIS und FALOONA, 1987).

Dieses Enzym addiert die in jedem PCR-Ansatz enthaltenen komplementären Nukleotide entsprechend der komplementären DNS.

Nach einem Zyklus liegt eine vollständige Kopie des ursprünglichen DNS-Doppelstranges im Bereich der beiden Startermoleküle vor.

Da die einzelnen Komponenten nicht erneut hinzugegeben werden müssen, kann der gesamte Prozess automatisiert werden.

Enterokokken wurden beispielsweise auf verschiedene Resistenzgene (Vancomycin, Erythromycin) untersucht:

vanA: ARTHUR und COURVALIN, 1993; KLARE, 1995a;

vanB: FRAIMOW et al., 1994;

vanC: NAVARRO et al., 1994; CLARK et al., 1998; SATAKE et al., 1997;

vanD: PERICHON et al., 1997;

vanE: FINES et al., 1999; COURVALIN, 1999;

vanG: McKESSAR et al., 2000;

ermB: WERNER et al.,1996.

Weiterhin wurde mithilfe speziesspezifischer Primer zwischen *E. faecalis, E. faecium*, *E. gallinarum* und *E. casseliflavus*/ *E. flavescens* unterschieden (WOODFORD et al., 1997).

5.3 Feintypisierungsverfahren

Für epidemiologische Fragestellungen werden die folgenden molekularen Methoden angewandt, die es ermöglichen, Infektionsquellen und -wege zurück zu verfolgen und mittels einer Fragmentanalyse vor allem pathogene Mikroorganismen einer *inter-* und *intra-* spezifischen Differenzierung zu unterziehen. Somit ist es möglich, den Verwandtschaftsgrad oder die klonale Identität verschiedener Isolate unterschiedlicher Herkunft oder eines einzelnen Patienten zu bestimmen.

5.3.1 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

Die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) wird zur *intra-* und *inter-* spezifischen Differenzierung bei epidemiologischen Fragestellungen eingesetzt (SCHWARTZ und CANTOR, 1984; McCLELLAND et al., 1987; LAI et al., 1989; GOEHRING et al., 1990; GROTHUES und TÜMMLER, 1991; GOUBY et al., 1992; TOMAYKO et al., 1995). Dabei ergeben sich definierte, stammspezifische Bandenmuster ("Fingerprints"). Der Vergleich von diesen Fragmentlängenmustern verschiedener Isolate ermöglicht die Identifizierung verwandter Stämme und die Bestimmung des klonalen Ursprungs einer Spezies. (MURRAY et al., 1990b; EISENACH, 1992; RÖMLING et al., 1995). Es lassen sich zum Beispiel Infektionsketten im Krankenhaus oder auch Infektionen lebensmittelbedingter Natur nachweisen.

Enterokokken wurden ebenfalls erfolgreich mit der PFGE unter Verwendung der Restriktionsendonuklease *Sma*l feintypisiert (MURRAY et al., 1990b; MIRANDA et al., 1991; EISENACH et al., 1992; MASLOW et al., 1993a; KLARE et al., 1993; BISCHOFF et al., 1999).

Zunächst wird die bakterielle chromosomale DNS in flüssige Agarose in Blöckchen gegossen, damit sie vollständig bleibt und nicht in große Fragmente geschnitten wird. Die Blöckchen werden in einen EDTA-haltigen Puffer (Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat, Tritriplex III) mit lysierender Substanz (z. B. Lysozym) gegeben. Diese diffundiert in den Agaroseblock hinein und lysiert nach deren Aufweichung durch die Detergenzien Desoxycholat und Laurylsarcosin die darin enthaltenen Zellwände der Bakterien. Die nach der Zellyse freiwerdenden DNasen können die chromosomale DNS nicht unkontrolliert zerschneiden, da EDTA deren Cofaktor (Magnesium-Ionen) bindet. Die freigesetzten Proteine (Enzyme) und Ribo-

nukleinsäuren werden durch die Zugabe von Proteinase K, gebildet von *Tritirachium album*, eine der stärksten bekannten Endopeptidasen, in kleine Fragmente gespalten, die aus der Agarose abdiffundieren können. Die großen und fragilen DNS-Moleküle verbleiben hingegen in den Agarblöckchen. Anschließend wird die Proteinase K mit PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) vollständig inaktiviert.

Das DNS-Fingerprinting mit der Pulsfeldgelelektrophorese (<u>Pulsed Field Gel Electrophoresis</u>, PFGE) beruht auf der Spaltung der chromosomalen DNS durch sogenannte "selten schneidende" Restriktionsendonukleasen und der Auftrennung der entstandenen DNS-Fragmente im elektrischen Wechselfeld ("Pulszeiten") bis zu einer Größe von etwa 2000 kilobasen (kb).

Ob ein einzelnes Restriktionsenzym für eine bestimmte DNS geeignet ist, läßt sich anhand des GC-Gehaltes (Anteil von Guanin und Cytosin) der jeweiligen DNS abschätzen. Für Enterokokken ist die Restriktionsendonuklease *Smal*, gebildet von *Serratia marcescens* das Enzym der Wahl und schneidet an folgender Basensequenz (MURRAY et al., 1990b; EISENACH, 1992; RÖMLING et al., 1995; SCHWARZKOPF et al., 1995):

CCC ↓ GGG
GGG ↑ CCC

5.3.2 <u>Randomly Amplified Polymorphic DNS-Methode</u> (RAPD)

Mit einer Modifikation der PCR, der <u>Randomly Amplified Polymorphic DNS</u> -Methode (RAPD, WILLIAMS et al., 1990), oder auch <u>Arbitarily Primed polymerase chain reaction</u> (AP-PCR, WELSH und McCLELLAND, 1990) genannt, kann man mit Zufallsprimern ein genomisches Fingerprinting durchführen.

Die Bezeichnung bedeutet, dass ca. 10 Basen lange, zufällige (*random*), bzw. will-kürliche (*arbitrary*) Primer verwendet werden, deren Hybridisierungsorte mit der genomischen DNS unbekannt sind. Bei komplexen Genomen sind mehrere Bindungsorte zu erwarten. Die Amplifikationsprodukte sind mithilfe der Gelelektrophorese als Bandenspektren, sog. "Fingerprints", darstellbar, die in Abhängigkeit vom Verwandtschaftsgrad der jeweils zu vergleichenden DNS-Genome differieren.

Um Unterschiede in der Genomstruktur sehr eng verwandter, aber nicht identischer Bakterienstämme aufzeigen zu können, ist es erforderlich, mehrere Zufallsprimer einzusetzen (WELSH und McCLELLAND, 1993).

In der Routineuntersuchung wurde diese Methode an grampositiven Kokken (Staphylokokken, Streptokokken) erprobt (JAYARAO et al., 1992; BERG et al., 1994; YOUNG et al., 1994). Enterokokken wurden mit ähnlichen Feintypisierungsmethoden untersucht, wobei allerdings die Ziel-DNS bekannt sein muss (Repititive Sequenzbasierende PCR, MALATHUM et al., 1998).

III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1. Material

1.1 Probenmaterial

Die in dem Zeitraum vom 05.12.1995 bis 15.06.97 im Raum Gießen untersuchten 115 Geflügel- und 50 Schweinefleischproben sind in <u>Anhangstabelle 17</u> weitergehend charakterisiert.

Die Geflügelfleischproben wurden aus zwei verschiedenen Metzgereien, acht Supermärkten und einem Straßenverkaufsstand bezogen. Insgesamt wurden 14 verschiedene Probenarten von 22 verschiedenen Herstellern aus vier verschiedenen Ländern, mit Deutschland (n=61), Niederlande (n=43), Frankreich (n=10) und Ungarn (n=1) berücksichtigt. In der <u>Tabelle 13</u> sind die einbezogenen Proben nach Art und Herkunft aufgeführt.

Tabelle 13: Art und Herkunft einbezogener Geflügelfleischproben

	Anzahl (%) Land Gesamt							
Probenart								
	D							
Hähnchen ¹	19 (63,3)	9 (30,0)	2 (6,7)	0 (0,0)	30 (26,1)			
Hähnchenbrust	4 (6,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (3,5)			
Hähnchenbrustfilets	5 (8,2)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	5 (4,3)			
Extremitäten ²	21 (45,7)	23 (50,0)	1 (2,2)	1 (2,2)	46 (40,0)			
Innereien ³	12 (40,0)	11 (36,7)	7 (23,3)	0 (0,0)	30 (26,1)			
Gesamt	61 (53,0)	43 (37,4)	10 (8,7)	1 (0,9)	115 (100,0)			

¹Hähnchen, Brathähnchen, Stubenküken, Poularde und Suppenhuhn;

Die ausschließlich aus deutscher Herstellung stammenden 50 Schweinefleischproben wurden aus drei verschiedenen Metzgereien und fünf Supermärkten bezogen. In der <u>Tabelle 14</u> sind die einbezogenen Proben nach der Art aufgeführt.

²Hähnchenbeine, -flügel, -keulen, -schenkel;

³Hähnchenherzen, -leber, -mägen, Hühnerklein.

Tabelle 14: Art der einbezogenen Schweinefleischproben

Probenart	Anzahl (%)
Grobe Bratwurst	12 (24,0)
Nürnberger Bratwurst	6 (12,0)
Schweinehackfleisch	5 (10,0)
Schweinemett	18 (36,0)
Thüringer Schweinemett	3 (6,0)
Thüringer Rostbratwurst	6 (12,0)
Gesamt	50 (100,0)

1.2 Enterokokken-Isolate

Als Untersuchungsmaterial lagen 1643 Katalase-negative Enterokokken-Isolate vor, die aus den 114 Geflügel- und 50 Schweinefleischproben isoliert werden konnten.

Zusätzlich wurden 78 klinische Vancomycin-resistente Enterokokken-Isolate aus fünf verschiedenen menschlichen Se- und Exkreten von fünf verschiedenen Kliniken der Justus-Liebig-Universität (Chirurgie, Kinderklinik, Medizinische Klinik, Poliklinik, Seltersbergklinik) einbezogen. Weiterhin wurden zehn Vancomycin-resistente Enterokokken-Isolate aus Stuhlproben nicht- hospitalisierter Personen berücksichtigt (mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. A. Sziegoleit und PD Dr. R. Füssle, Institut für Mikrobiologische Diagnostik, Justus-Liebig-Universität Gießen, <u>Tabelle 15</u>).

Tabelle 15: Vancomycin-resistente Enterokokken, isoliert aus verschiedenen menschlichen Se- und Exkreten

Art der Probe	Anzahl (%)
Stuhlproben nicht hospitalisierter Personen	10 (11,4)
Stuhlproben*	51 (58,0)
Urinproben*	14 (15,9)
Varia (Abstriche, Katheterspitzen, Punktate, etc.)*	9 (10,2)
Blutkulturen*	2 (2,3)
Sputum, Bronchiallavage*	2 (2,3)
Gesamt	88 (100,0)

^{*} Proben klinischer Patienten

1.3 Referenzstämme

Die in den eigenen Untersuchungen einbezogenen Referenzstämme sind in der <u>Tabelle 16</u> aufgeführt.

Tabelle 16: Referenzstämme

	Spezies	Bezeichnung	Herkunft	Merkmal
1.	E. faecium	ATCC 6057	ATCC ¹	
2.	E. faecalis	ATCC 11700	ATCC	
3.	Escherichia coli	ATCC 25922	ATCC	
4.	E. faecium	AW 1	Abwasser, RKI ²	<i>van</i> A-positiv
5.	E. faecium	AW 2	Abwasser, RKI	<i>van</i> A-positiv
6.	E. faecium	70/90	klinisches Isolat, RKI	<i>van</i> A-positiv
7.	E. faecium	6011	klinisches Isolat, RKI	<i>van</i> A-positiv
8.	E. faecium	UW 227	Hühnerfleisch, RKI	<i>van</i> A-positiv
9.	E. faecium	UW 261	Schweinehackfleisch, RKI	<i>van</i> A-positiv
10.	E. faecium	UW 301	Stuhlprobe ³ , RKI	<i>van</i> A-positiv
11.	E. faecium	UW 373	Schweinehackfleisch, RKI	<i>van</i> A-positiv
12.	E. faecium	UW 406	Putenfleisch, RKI	<i>van</i> A-positiv
13.	E. faecium	UW 444/	Stuhlprobe ³ , RKI	<i>van</i> A-positiv
14.	E. faecium	UAA 552	RKI	<i>van</i> B-positiv
15.	E. gallinarum	BA 4174	RKI	vanC1-positiv
16.	E. casseliflavus	ATCC 25788	RKI	vanC2-positiv
17.	E. flavescens	CCM 439	RKI	vanC3-positiv

¹ American Type Culture Collection, Rockeville, USA (ATCC)

² <u>R</u>obert-<u>K</u>och-<u>I</u>nstitut (RKI), Wernigerode; Prof. Dr. Witte und Dr. Klare.

³ Stuhlprobe eines nichthospitalisierten Patienten

1.4 Material für die Mikrobiologie

1.4.1 Nährmedien

Alle Nährmedien wurden bei 121°C 20 Minuten autoklaviert und nach Herstellung bei 4°C aufbewahrt. Die Rezepturen der einzelnen Nährmedien sind im Anhang, Seite 140, wiedergegeben.

1. Verdünnungsflüssigkeit: Gepuffertes Peptonwasser

(Fa. Merck, Darmstadt, 107 216, 106 404)

2. Plate Count-Agar

(Caseinpepton-Glucose-Hefeextrakt-Agar, Fa. Merck, 105463)

Inkubation: 37°C/ 24h

3. CASO-Bouillon

(Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon, Fa. Merck, 105459)

Inkubation: 37°C/ 24h

4. CATC-Agar

(Citrat Azid Tween® Carbonat-Agar[Basis], Fa. Merck, 10279)

Inkubation: 37°C/24-48h

Columbia-CNA-Agar mit Zusatz von 5% Schafblut, 5mg/L Vancomycin und 8mg/L Amphotericin B

(Colistin-Nalidixinsäure-Agar, Becton Dickinson, Heidelberg, 12104, GREEN et al., 1990)

Inkubation: 35°C (5% CO₂)/ 24+48+72h

6. Phenolrot-Bouillon (Basis)

(Fa. Merck, 110987)

Inkubation: 37°C/24-48h

7. SIM-Agar (<u>Sulphide-Indole-Motility-Agar</u>):

(Fa. Oxoid, CM435)

Inkubation: 37°C/24-48h

1.4.2 Reagenzien

- 1. Natriumchlorid zur Analyse (Fa. Merck, 6404)
- 2. Kaliumtellurit-Trihydrat (Fa. Merck, 105 164)
- 3. 3%ige H₂O₂-Lösung (Wasserperoxid Fa. Merck, 107209)

1.4.3 Verbrauchsmaterial

- 1. Stomacherbeutel mit Filtrierschlauch (Bagfilter[®], Model S, Fa. Interscience, St. Nom, Frankreich)
- 2. Diverse Glaspipetten (1ml, 2ml, 5ml, 10ml, 20ml)
- 3. Sicherheitspipettierball (Fa. Roth, Karlsruhe, C 261.1)
- 4. MICROBANKTM-Kryoröhrchen (Mast Diagnostica, Reinfeld, 291 1601)
- 5. Plastik-Petrischalen (Fa. Nerbe, Winsen a. d. Luhe, 09.031.0000)
- 6. 50ml-Glaskolben
- 7. Mikrotiterplatten (Fa. Nerbe, 10.101.0000)

1.4.4 Geräte für die Mikrobiologie

- 1. Stomacher 400 Laboratory Blender (Typ BA 7021, Fa. Seward, London, GB)
- 2. CO₂-Brutschrank (Fa. Heraeus, Typ BB 16)
- 3. Bunsenbrenner: Gasi (Typ 3.340 102, Fa. Schütt Labortechnik, Göttingen, D)

1.4.5 Stammhaltung und Kultivierung

Zur kurzfristigen Stammhaltung von Gebrauchskulturen wurde Plate Count-Agar (PC) als Schrägagarkultur in laborüblichen Reagenzgläsern benutzt. Zur Anzucht frischer Kulturen wurde PC-Agar als Festmedium verwendet. Die Kulturen wurden für den PCR-, RAPD- und PFGE-Ansatz von dem Plate-Count-Agar in CASO-Bouillon überimpft und bei 37°C 18h lang bebrütet.

Die längerfristige Aufbewahrung erfolgte in MICROBANKTM-Kryoröhrchen (Mast Diagnostica, Reinfeld, 291 1601) bei -20°C im Gefrierschrank.

1.4.6 Isolierung, Selektion und Differenzierung

1.4.6.1 **CATC-Agar**

Der CATC-Agar (<u>C</u>itrate <u>A</u>zide <u>T</u>ween <u>C</u>arbonate-Agar) ist ein Selektivagar zum Nachweis von Enterokokken in Fleisch und Fleischwaren, Milchprodukten und sonstigen Nahrungsmitteln (nach der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG: Bestimmung von *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium* in Fleisch und Fleischerzeugnissen, Referenzverfahren; ANONYMOUS, 1996a). Die hohen Konzentrationen an Citrat und Azid hemmen die Begleitflora fast vollständig. Enterokokken reduzieren das farblose 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid zu einem roten Formazan; ihre Kolonien nehmen dadurch eine rote Farbe an, wobei in der Regel *Enterococcus faecalis* dunkelrot- und *Enterococcus faecium* hellrot mit einem farblosen Saum erscheint.

1.4.6.2 Columbia-CNA-Agar

Der Columbia-CNA-Agar (Colistin-Nalidixic-Acid, Becton Dickinson) mit Zusatz von 5% Schafblut wird als Selektiv- und Differentialmedium zur Isolierung und Differenzierung von grampositiven Mikroorganismen aus klinischem und nichtklinischem Probenmaterial empfohlen. Dieses Medium läßt ein üppiges und schnelles Wachstum sowie klar definierte Hämolysereaktionen zu. Der Zusatz von 10 mg/l Colistin und 15mg/l Nalidixinsäure fördert das Wachstum von Staphylokokken und Enterokokken, hemmt hingegen aber *Proteus-*, *Klebsiella-* und *Pseudomonas-*Arten. Vor der Herstellung der Agarplatten wurde 5mg/Liter Vancomycin und 8mg/Liter Amphotericin B zugemischt (Fa. Sigma-Aldrich).

Die Bebrütung erfolgte unter 5% CO₂ bei 37°C für 48h.

1.4.6.3 Phenolrot-Bouillon

Die Phenolrot-Bouillon ist ein Testnährboden zur biochemischen Identifizierung mit der "bunten Reihe" unter Zugabe von Reaktionskörpern (Kohlenhydrate). Die Bebrütung erfolgte bei 37°C bis zu 14 Tagen. Die erfolgte Vergärung des Reaktionskörpers durch die eingeimpfte Kultur äußerte sich in einem Farbumschlag des Phenolrots von Rot nach Gelb.

- 1.5 Material für die Molekularbiologie
- 1.5.1 Reagenzien und Lösungen für die PCR, RAPD und der PFGE
- 1.5.1.1 Reagenzien und Lösungen zur DNS-Isolierung (PCR/ RAPD)
- 1. Chloroform/ Isoamylalkohol (24:1)
- Chloroform zur Analyse, (Fa. Merck, Darmstadt, 102445)
- Isoamylalkohol zur Analyse, (Fa. Merck, 100979)
- **2. CTAB** = Hexadecyltrimethylammoniumbromid (Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen, H-5882),
- **3. Ethanol**, für die Molekularbiologie (Fa. Merck, 108543)
- **4. 2-Propanol** für die Molekularbiologie (Fa. Merck, 108544)
- 5. NaCl-Lösung 5M,

Natriumchlorid für die Molekularbiologie (Fa. Merck, 101540)

6. Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (25:24:1)

(Fa. Roth, Karlsruhe, A 156)

7. Proteinase K-Lösung, 14 mg/ml,

(Fa. Roche Diagnostics, Mannheim, 1373196)

- **8. SDS** 10% (Sodiumdodecylsulfat), (Fa. Roche Diagnostics, 1028 693)
- **9. TE –Puffer**, bestehend aus
- a) Tris-HCI, 1M
- -Tris (hydroxymethyl)-aminomethan für die Molekularbiologie, (Fa. Merck, 101549)
- -Salzsäure, rauchend 37% (Fa. Merck, 100317)
- **b) Na-EDTA**, 100 mM

(Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat für die Molekularbiologie, Tritriplex III, Fa. Merck, 112029)

10. QIAamp Tissue Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, 29304)

1.5.1.2 Reagenzien zum PCR und RAPD-Ansatz

- 1. **Nukleotide**, 25µmol, pH 7,0 (Fa. Roche Diagnostics)
- dATP Li-salt, 1051 440
- dCTP Li-salt, 1051 458
- dGTP Li-salt, 1051 466
- dTTP Li-salt, 1051 482

2. Polymerase und Puffer

- AmpliTaq DNS Polymerase, 5U/µI, (Fa. Perkin Elmer, Weiterstadt, N 8080106)
- 10x PCR Buffer 8811, (Fa. Perkin Elmer, Cetus B 0550340)
- **3. Primer-Sequenzen** (Oligonukleotide, Fa. TIB MOLBIOL, Berlin)
- I) PCR:
- a) vanA-Gen-typisches Amplifikat: 377 Basenpaare (KLARE et al., 1995)

vanA1: 5´ - TCT gCA ATA gAg ATA gCC gC - 3´ (20-mer)

vanA2: 5' - gg AgT AgC TAT CCC AgC ATT - 3' (20-mer)

b) *van*B-Gen-typisches Amplifikat: 529 Basenpaare (FRAIMOW et al., 1994)

vanB1: 5' - gCT CCg CAg CCT gCA Tgg ACA - 3' (21-mer)

vanB2: 5' - ACg ATg CCg CCA TCC TCC TgC - 3' (21-mer)

c) vanC1-Gen-typisches Amplifikat: 796 Basenpaare (CLARK et al., 1998)

vanC1-1: 5´ - gAA AgA CAA CAg gAA gAC CgC - 3´ (21-mer)

vanC1-2: 5´ - ATC gCA TCA CAA gCA CCA ATC - 3´ (21-mer)

d) vanC2-Gen-typisches Amplifikat: 484 Basenpaare (SATAKE et al., 1994)

vanC2-1: 5' - Cgg ggA AgA Tgg CAg TAT - 3' (18-mer)

vanC2-2: 5´ - CgC Agg gAC ggT gAT TTT - 3´ (18-mer)

d) vanC3-Gen-typisches Amplifikat: 224 Basenpaare (CLARK et al., 1998)

vanC3-1: 5' - gCC TTT ACT TAT TgT TCC - 3' (18-mer)

vanC3-2: 5' - gCT TgT TCT TTg ACC TTA - 3' (18-mer)

II) RAPD

"KAY3": 5´-CTg gCg ACT g - 3´ (10-mer, YOUNG et al., 1994)

- 5. Restriktionsendonukleasen und Puffer (Fa. Roche Diagnostics)
- a) Cfol (10 U/µl, gebildet von Clostridium formioaceticum), GCG↓C, 688 541
- b) Ddel (10 U/µl, gebildet von Desulfovibrio desulfuricans), CTNAG, 835293

1.5.1.3 Reagenzien zum PFGE-Ansatz

- 1. **TE (Tris-EDTA)-Puffer** pH 7,6, bestehend aus
- **10mM –Tris-** (hydroxymethyl)-aminomethan für die Molekularbiologie, (Fa. Merck, 101549)
- **1mM EDTA** (Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat für die Molekularbiologie, Tritriplex III, Fa. Merck, 112029)
- Salzsäure (HCI), rauchend 37% (Fa. Merck, 100317)
- Natronlauge (NaOH), reinst etwa 32% (Fa. Merck, 105587)

2. Agarose für Blöckchenherstellung

- InCert Agarose (Fa. Biozym, Hess. Oldendorf, 850121)
- 3. Lysozym 50000 U/mg, (Fa. Roche Diagnostics, 107 255)
- **4. Natriumchlorid** für die Molekularbiologie (Fa. Merck, 101540)
- **5. Brij 35** (Polyoxyethylenlaurylether, Fa. Merck, 801962)
- **6.** Laurylsarcosin (Fa. Sigma, Deisenhofen, L 5777)
- **7. Desoxycholat** (Fa. Merck, 103683)
- **8. Proteinase K-Lösung** 14,6 mg/ml, (Fa. Roche Diagnostics, 1 373 196)
- **9. PMSF** (Phenylmethylsulfonylfluorid, Fa. Roche Diagnostics, 236 608)

10. Isopropanol (2-Propanol für die Molekularbiologie, Fa. Merck, 108544)

11. Restriktionsendonuklease und Puffer

- Smal (gebildet von Serratia marcescens), 5000 Units, (Fa. Roche Diagnostics, 1047 639)
- 10x MultiCore Buffer 8811, (Fa. Roche Diagnostics, 1047 639)
- **6. RNase** 40 U/mg, (Fa. Roche Diagnostics, 109 126)

1.5.1.4 Reagenzien zur Gelelektrophorese

- 1. Agarose
- a) PCR, RAPD: Infinity Agarose Standard, (Fa. Appligene Oncor, Heidelberg,13 00 22)
- b) PFGE: Molecular Biology Certified Agarose, Ultra pure DNS grade Agarose (Fa. BioRad, 162-0133)
- **2. Bromphenolblau** (BPB, Fa. Merck, 1.08122.0005)
- 3. DNS molecular weight marker V + VI (PCR, RAPD), 0,25μg/μl, (Fa. Roche Diagnostics, 1062)
- **4. Ethidiumbromid**, 3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiumbromid (Fa. Merck, 1.11615.0001)
- **5. Ficoll** (Fa. Sigma-Aldrich, F 2878)
- 6. Pulsed-Field Marker (PFGE), 50-1000kb + 0,1-200kb, (Fa. Sigma-Aldrich, D2416)
- 7. TBE (Tris-Borat-EDTA)-Puffer pH 8,0, bestehend aus
- Tris (hydroxymethyl)- aminoethan (Fa. Roth, Karlsruhe, 4855.3)
- Borsäure (Fa. Merck, 1.12015.0500)

- EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure, Tritriplex II), (Fa. Merck, 1.08417.0250)

1.5.2 Arbeitsgeräte und weiteres Material

- 1. PCR-Werkbank, U. V. Chamber 825-UVC/22 (Plas Labs, Lansing, Mi., U.S.A.)
- 2. DNS-Thermal Personal cycler (Fa. Biometra, Göttingen)
- 3. Horizontal-Elektrophoresekammer Blue Marine BM 200/1 (Fa. Boehringer Ingelheim, Heidelberg)
- 4. Power supply Gerät SX 250 (Fa. Hoefer Pharmacia Biotech Inc., San Francisco, USA)
- 5. DNS-Fluorometer DyNA QuantTM 200 (Fa. Hoefer, Nr. 80-6231-24)
- 6. PFGE-Gerät CHEF-DR.TM II System (Fa. Bio-Rad Labs, Richmond, CA, U.S.A., 170-3612-3729)
- 7. Gießform für Blöckchenherstellung, Disposable Plug Mold (Fa. BioRad, 170-3713)
- 8. Spektralphotometer Hit U-2000/1 (Hitachi, Japan Colora Tel.: 07172/1830)
- 9. Fotoapparart MP-4-Plus-Instant Camera System (Fa. Polaroid, Cambridge, Ma., U.S.A.)
- 10. Polaroid Print Film 667 (Fa. AGS GmbH, Heidelberg)
- 11. Transilluminator Mighty Bright UVTM (Fa. Hoefer)
- 12. Personal Computer (PC, mit Intel Pentium Prozessor) und Flachbettscanner
- 13. Bearbeitungs- und Auswertesoftware: GelCompar 4.0 (Fa. Applied Maths, Kortijk, Belgien)
- 14. CO₂ Begasungsbrutschrank BB 16 (Fa. Heraeus, Hanau)
- 15. Kühl- Gefrierkombinationsschrank (Fa. Liebherr, Ochsenhausen)
- 16. Schüttelwasserbad Typ 1083 (Gesellschaft für Labortechnik [GFL], Burgwedel)
- 17. Wasserbad Typ 1002, (GFL)
- 18. Schüttelinkubator Typ 3033 (GFL)
- 19. Tischzentrifuge 5415 C, (Fa. Eppendorf, Hamburg)
- 20. Zentrifuge Megafuge 1.0 (Fa. Heraeus)
- 21. Minischüttler, Minishaker, MINI-SECOUEUR IKA MS 1 (IKA-WORKS, INC., Wilmington, USA)
- 22. Pipetten, (Fa. Eppendorf) 0,5-10µl, 2,0-20µl, 10-100µl, 100-1000µl
- 23. Präzisionswaage A 200 S (Fa. Sartorius, Göttingen)
- 24. Thermo- Magnetrührer IKAMAG RCT basic (Fa. IKA Labortechnik, Staufen)

- 25. Thermomixer 5436 (Fa. Eppendorf)
- 26. Reaktionsgefäß- Ständer (Fa. Fisher Scientific, Nidderau, 640 393 09)
- 27. SafeSkin- Latex- Handschuhe, ungepudert (Fa. Fisher Scientific, 665 107 80)
- 28. Reaktionsgefäße
- a) 1,5 ml (Fa. Eppendorf Nr. 0030 120.086)
- b) Ultradünne PCR Soft Tubes (0,2 ml) (Fa. Biozym, Hess. Oldendorf, 71 09 00)
- c) Ultradünne PCR Soft Tubes (0,5 ml) (Fa. Biozym, 71 09 10)
- 29. Pipettenspitzen:
- a) 10µl (Fa. Eppendorf, 0030 001.168)
- b) 100µl (Fa. Eppendorf, 0030 003.004)
- c) 1000µl (Fa. Eppendorf, 0030 015.002)
- d) Aeroseal Super Filter Pipet Tips (0,1-10 µl), (Fa. AGS GmbH, 50-1011-4518)
- 30. Pipetten-Kästen (autoklavierbar)
- a) Eurobox 10µl (Fa. Eppendorf, 677 271 05)
- b) Eurobox 100µl (Fa. Eppendorf, 677 271 06)
- c) Eurobox 1000µl (Fa. Eppendorf, 677 271 07)
- 31. Kühlboxen "Iso Therm-System"
- a) für 24 Reaktionsgefäße 1,5 ml (Fa. Eppendorf, 3880 001.018)
- b) für 24 Reaktionsgefäße 0,5 ml (Fa. Eppendorf, 3880 000.011)

2. Methoden

2.1 Mikrobiologische Untersuchungen

2.1.1 Isolierung von Enterokokken aus Geflügel- und Schweinefleisch

Der Versuchsaufbau zur Isolierung von Vancomycin-resistenten *E.*-Stämmen (VRE) ist in <u>Abbildung 1</u> dargestellt.

In den eigenen Untersuchungen wurden die Enterokokken- Isolate über Selektivmedien aus Geflügel- und Schweinefleisch isoliert. Dabei wurde nach der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 des Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetzes (LMBG): "Bestimmung von *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium* in Fleisch und Fleischerzeugnissen, Referenzverfahren" mit dem CATC-Agar (Citrate Azide Tween Carbonate-Agar) auf Enterokokken untersucht (nach REUTER, 1968, 1978).

Die Schweinehackfleischproben wurden mit einer Alkohol-abgeflammten Edelstahl-Gabel homogenisiert. Jeweils 10g Schweinehackfleisch wurden in einem Stomacherbeutel mit Filtrierschlauch nach Durchmengung mit 90 ml Verdünnungsflüssigkeit (gepuffertes Peptonwasser) mithilfe eines Beutelwalkmischgerätes (Stomacher) homogenisiert.

Bei der Probenvorbereitung von Geflügelfleisch (Geflügelteile mit Haut, Innereien) wurde die ganze Probe eine Minute lang intensiv in einem Stomacherbeutel mit der Verdünnungsflüssigkeit (gepuffertes Peptonwasser) massiert, um die Oberflächenkeime für die weiteren Untersuchungen abzuschwemmen. Es wurde jeweils stellvertretend eine "typische Probe" (Hähnchen, Hähnchenbrust, Hähnchenbrustfilets, "weitere Teilstücke", Geflügelinnereien) gewogen und dessen Oberfläche grob berechnet. Die berechnete Oberfläche wurde der gesamten Enterokokken- KbE in der Verdünnungsflüssigkeit gegenübergestellt, auf das Probengewicht bezogen und ein Standard (cm² Oberfläche pro Gramm Probengewicht) geschaffen, der auf alle Proben angewendet wurde. 1 ml des jeweiligen Homogenisats wurde anschließend im Doppelansatz auf den CATC-Agar im Spatelverfahren aufgetragen. Die Anzüchtung der Enterokokken erfolgte aerob bei 37°C für 48 Stunden in einem Brutschrank der Fa. Heraeus.

2.1.2 Identifizierung der Enterokokken-Isolate

Die Identifizierung der für diese Untersuchung interessierenden Enterokokken-Isolate erfolgte zunächst orientierend auf dem CATC-Agar, wobei *E. faecalis* dunkelrot- und

LEBENSMITTEL: HOMOGENISATION

lacktriangle

CATC - Agar

Differenzierung zwischen *E. faecium* und *E. faecalis* (Inkubation: 48h / 37°C)

lacktriangle

Subkultivierung

lacktriangle

Gram-Färbung

Katalase-Test

UNTERSUCHUNG AUF VANCOMYCIN-RESISTENZ

Columbia CNA-Agar + 5 mg Vancomycin/l (Inkubation: 24h / 37°C, 5% CO₂)

lacktriangle

Polymerase Kettenreaktion (PCR) [vanA-/ vanB-/ vanC-Gen(e)]

FEINTYPISIERUNG

inter et intra speciem

Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

Abb. 1: Fliessdiagramm zur Isolierung und Feintypisierung von Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE)

E. faecium hellrot mit einem farblosen Saum erscheinen sollen. Nach der Gram-Färbung und des Katalase-Tests wurden alle gram-positiven Katalase- negativen Kokken auf Wachstum in Gegenwart von 6,5% NaCl und von 0,04% Tellurit, sowie auf Pigmentation und Beweglichkeit untersucht. Anschließend wurde der Nachweis der biochemischen Eigenschaften durchgeführt.

Als Grundlage für die Auswertung diente die Kohlenhydratfermentation der Isolate. Dabei kam die Phenolrot-Bouillon zum Einsatz. Die Röhrchen (9ml Inhalt) wurden mit jeweils 0,1ml der Reinkulturen (Übernachtkultur in CASO-Bouillon) der zu identifizierenden Stämme beimpft. Dazu wurde 1ml der jeweiligen 10%igen Reaktionskörper-Stammlösung gegeben und 24-48h bei 37°C bebrütet. Zusätzlich wurden Röhrchen ohne Reaktionskörper als Wachstumskontrollen mitbeimpft. Die angewandten Tests mit zusätzlich benutzten Reagenzien und ihre Auswertung (= positiven Reaktionen) sind in <u>Tabelle 17</u> dargestellt.

Tabelle 17: Biochemische Tests und mikroskopische Untersuchung zur Identifizierung der Enterokokkenspezies

Test	Ablesetag	Zusätzliche Untersuchung	Auswertung (Positive Reaktionen)
Gramfärbung	sofort		gram-pos. Kokken
α-Hämolyse	1d	Blutplatte	Zonenbildung
Katalase	sofort	H ₂ O ₂	Blasenbildung
Pigmentation	1-2d	PC-Agar	gelbes Pigment
Beweglichkeit	48-60h	SIM-Medium	Bürstensaum
Wachstum in			
Gegenwart von:			
6,5% NaCl	3d	Caso-Bouillon	Trübung
0,04% Tellurit	1d	Blutplatte	Schwarzfärbung
Säure aus:			Farbumschlag des Indikators nach:
L-Arabinose	2d	Phenolrot-Bouillon	gelb
Mannitol	2d	Phenolrot-Bouillon	gelb
Metthyl-α-D-Glucopyr.*	2d	Phenolrot-Bouillon	gelb
D-Raffinose	2d	Phenolrot-Bouillon	gelb
Ribose	2d	Phenolrot-Bouillon	gelb
Sorbitol	2d	Phenolrot-Bouillon	gelb
D- Xylose	2d	Phenolrot-Bouillon	gelb

^{*}Methyl- α -D-Glucopyranosid

Für die Überprüfung des Wachstums bei einer Konzentration von 6,5% NaCl wurde nicht supplementierte CASO-Bouillon mit einer Kolonie beimpft und 24 h bei 37°C bebrütet. Von dieser Bouillon wurden 0,1ml in eine mit NaCl-supplementierten CASO-Bouillon gegeben. Nach 48h Bebrütung bei 37°C galt eine Trübung der Bouillon mit Bodensatzbildung als positiv.

Zur Überprüfung der Tellurit-Toleranz wurde eine Kolonie auf ein Viertel einer Schafblut-Agarplatte mit 0,04% Telluritzusatz geimpft. Nach 24 h Bebrütung wurde das Wachstum von kleinen grauen oder schwarzen Kolonien als positives Resultat gewertet.

Die Pigmentation wurde auf einer PC-Agar-Platte nachgewiesen. Sie prägte sich nach 24h Bebrütung bei 37°C und anschließender Inkubation der Platte bei Raumtemperatur am deutlichsten aus.

Für die Überprüfung der Katalasereaktion wurde eine Kolonie auf einem Objektträger in einen Tropfen 3%iger H₂O₂-Lösung eingerieben. Enterokokken besitzen keine Katalaseaktivität, so dass hier keine Schaumbildung stattfand.

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

In <u>Tabelle 18</u> ist ein Auswerteschema für die biochemische Differenzierung von ausgesuchten Enterokokkenspezies nach DEVRIESE et al. (1995) wiedergegeben.

Tabelle 18: Biochemische Differenzierung von ausgesuchten

Enterokokkenspezies (nach DEVRIESE et al., 1995 und 1996)

Test	Enterokokkenspezies						
	E. faecium	E. faecalis	E. durans	E. hirae	E. gallinarum	E. casseliflavus	E. flavescens
Gramfärbung	+	+	+	+	+	+	+
α-Hämolyse	+	+	+	+	+	+	+
Katalase	-	_	_	_	_	_	_
Pigmentation	-	-	_	_	_	+	+
Beweglichkeit	-	-	_	_	_	_	+
Wachstum in							
Gegenwart von:							
6,5% NaCl	+	+	+	+	+	+	+
0,04% Tellurit	_	+	_	_	+	+	+
Säure aus:		•	•		•	•	
L-Arabinose	+	_	_	_	+	+	+
Mannitol	+	+	_	_	+	+	+
Metthyl-α-D-Glucopyr.*	_	_	_	_	+	+	+
D-Raffinose	-	-	_	+	_	_	_
Ribose	+	+	+	+	+	+	_
Sorbitol	_	+	_	_	_	_	_
D- Xylose	_	_	_	_	+	+	+

^{*}Methyl-α-D-Glucopyranosid

2.1.3 Resistenzbestimmung

2.1.3.1 Columbia CNA-Agar + Vancomycin

Es wurden jeweils pro Probe zehn als Enterokokken identifizierte Isolate auf dem Vancomycin- und Schafblut-supplementierten Columbia CNA-Agar (<u>C</u>olistin-Nalidixic-Acid) einer orientierenden Prüfung auf Vancomycinresistenz unterzogen (FRAIMOW et al., 1994). Die Bebrütung der Enterokokken erfolgte in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre bei 37°C für 48h in einem CO₂ Brutschrank (Fa. Heraeus).

2.1.3.2 Minimale Hemmkonzentration

Die minimalen Hemmkonzentrationen der Antibiotika Vancomycin und Teicoplanin wurden mit Hilfe des Mikrodilutionsverfahrens gemäß den Richtlinien des National Commitee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS; ANONYMOUS, 1997a) ermittelt.

Zunächst erfolgte die Herstellung von Bakteriensuspensionen der zu untersuchenden Isolate jeweils durch Einbringen einer Kolonie in CASO-Bouillon. Nach Homogenisierung wurden die Suspensionen aerob bei 37°C 24h lang bebrütet. Danach wurde sie (ca. 10⁷-10⁸ KbE/ml) mit steriler Nährlösung so weit verdünnt, bis jeweils eine Dichte von ca. 10⁵ KbE/ml erreicht wurde.

Daraufhin wurden alle Kavitäten der Mikrotiterplatte mit 50µl CASO-Bouillon beschickt. 50µl der jeweiligen Wirkstoffstammlösung (Anhangstabelle 8, Seite 143) wurden in die ersten Kavitäten jeder Reihe gegeben und eine Verdünnungsreihe durchgeführt. Dadurch ergab sich jeweils eine Wirkstoffkonzentration von 512µg/ml in der ersten- und 0,25µg/ml in der letzten Kavität.

Anschließend wurden alle Behältnisse mit je 50µl der CASO-Bouillon-Suspension des zu untersuchenden Isolates beimpft. Gleichzeitig wurden Sterilitäts- und Wachstumskontrollen vorgenommen. Zur Sterilitätskontrolle wurde zum einen eine Reihe mit unbeimpfter Nährlösung (mit Vancomycin- und Teicoplaninzusatz) beschickt, sowie zum anderen 1ml der Vancomycin- oder Teicoplanin-Stammlösung auf eine Nähragarplatte ausgestrichen und aerob bei 37°C für 18h bebrütet. Bei jeder Mikrotiterplatte wurden jeweils drei Positivkontrollen pro Isolat mitgeführt (Wachstumskontrolle ohne Vancomycin- oder Teicoplaninzusatz).

Danach wurden die Mikrotiterplatten abgedeckt und bei 37°C für 18h inkubiert. Als minimale Hemmkonzentration (MHK) war diejenige Konzentrationsstufe anzusehen, bei der gerade kein Wachstum mehr erfolgte. In den Sterilitätskontrollen durfte sich keinerlei Wachstum zeigen, während in den Wachstumskontrollen deutliches Wachstum sichtbar sein musste. Als Kontrollstamm diente in Anlehnung an die NCCLS (1997) *E. coli* (ATCC 25922).

2.2 Molekularbiologische Untersuchungen

2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Alle als resistent identifizierten Stämme wurden in der PCR mit spezifischen Primern auf das "high level"- Vancomycin- Resistenz codierende *van*A-Gen- (KLARE et al., 1995), das "moderate-high level"-Vancomycin-Resistenz codierende *van*B-Gen (FRAIMOW et al., 1994) und die "low level"-Vancomycin-Resistenz codierenden *van*C1,2 und 3-Gene (CLARK et al., 1995 und SATAKE et al., 1994) untersucht. Zur Prüfung der Spezifität der *van*-Gen-typischen Amplifikate wurden die Restriktionsanalysen mit *Cfol* (*van*A) und *Ddel* (*van*B) vorgenommen.

2.2.1.1 DNS-Präparation

Die DNS-Präparation für die PCR erfolgte nach AUSUBEL et al. (1990).

Zunächst erfolgte die Anzüchtung der Vancomycin-resistenten Enterokokken-Isolate auf Plate-Count-Agar (PC) aerob für 48 h bei 37°C. Jeweils 3-4 Kolonien wurden mit einer Platinöse aufgenommen und in Reagenzgläser mit 5ml CASO-Bouillon überführt und für 24 h bei 37°C aerob bebrütet.

1,5ml dieser Bouillonkultur wurden nach gründlicher Durchmischung mittels eines Reagenzglasschüttlers in ein Eppendorfgefäß überführt und bei 13.000rpm 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das verbleibende Pellet in 567µl TE-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 30µl SDS-Lösung (10%) und 3µl Proteinase-K-Lösung (20mg/ml) wurde dieser Ansatz 1h bei 37°C im Wasserbad zwecks Lysierung der Bakterienzellen inkubiert. Zur Vervollständigung der Lysis wurden 100µl 5M NaCl und 80µl CTAB-Lösung zugefügt und nach gründlicher Durchmischung durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipettenspitze für weitere 10min im Wasserbad bei 65°C inkubiert.

Nach Zugabe von 700µl Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung (24:1) und kurzer manueller Schüttelung wurde der Ansatz für 5min bei 13.000rpm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde anschließend vorsichtig mithilfe einer Pipette ohne Berührung der mittleren und unteren Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe von 700µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (25:24:1) und manueller Aufschüttelung wurde erneut für 5min bei 13.000rpm zentrifugiert und danach die obere wässrige Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

Nach Zugabe von 300µl Isopropanol wurde erneut 5min bei 13.000rpm zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das hierbei entstandene Pellet wurde mit 300µl

70%iger Ethanollösung (Lagerung bei -20°C) resuspendiert und der Überstand nach erneuter Zentrifugation (5min bei 13.000rpm) dekantiert. Verbliebene Flüssigkeitsreste wurden mithilfe von Kleenex-Tüchern vorsichtig entfernt und das Pellet bei 37°C im Brutschrank 1h getrocknet (PIEHL, 1995).

In der <u>Abbildung 2</u> ist die Isolierung und Reinigung der DNS (nach AUSUBEL et al., 1990) als Fließdiagramm dargestellt.

Nach Resuspension des Pellets mit 50µl Aqu. bid. wurde die DNS-Lösung 20min im Wasserbad gekocht. 1µl der DNS-Lösung wurde in den Amplifikationsansatz gegeben.

Nach der Isolierung und Reinigung wurde die aus den Enterokokken isolierte DNS-Konzentration mit Hilfe des DNS-Fluorometers DyNA Quant 200 bestimmt. Dabei wurde das Gerät mit Kälberthymus-DNS geeicht und der Nullwert abgeglichen. Dieses ermöglichte die für reproduzierbare Analysen notwendige genaue Einstellung der DNS-Menge in den Versuchsansätzen. Die festgelegte Standardkonzentration von DNS-Menge/Versuchsansatz betrug 10ng.

Anzüchtung				
Übernachtkultur: 1.		CASO-Bouillon		
Zentrifugation:		5 min, 13.000rpm		
	Ze	ellwandlysis		
Resuspension: 36	 67ul	TE-Puffer		
		SDS		
	3µl	Proteinase K		
Inkubation:		1 h bei 37°C		
Zugabe von:	1µ0C	NaCI-Lösung		
		mischen		
8	30µl	CTAB-Lösung		
		mischen		
Inkubation:		10 min bei 65°C		
DNS Extraktion				
Zugabe von: 70	00µl	Chloroform/Isoamylalkohol (24:1), gekühlt schütteln		
Zentrifugation:		5 min, 13000 rpm		
		wässrige Oberphase in neues Reaktionsgefäß überführen		
Zugabe von: 70	00µl	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1), gekühlt		
		schütteln		
Zentrifugation:		5 min, 13000 rpm		
3		wässrige Oberphase in neues Reaktionsgefäß überführen		
E	than	ol Präzipitation		
Zugabe von: 30	00µl	Isopropanol schütteln		
Zentrifugation:		5 min, 13000 rpm		
Zentinugation.		Überstand dekantieren		
Zugabe von: 30)()(I	Ethanol, eisgekühlt		
Lagado von.	σομι	schütteln		
Zentrifugation:		5 min, 13000 rpm		
		Überstand dekantieren		
Trocknung:		1 h bei 37°C		
_	50ul	Aqua bidest		
Inkubation:	'	20 min bei 100°C		

Abb. 2: Isolierung und Reinigung der DNS (nach AUSUBEL et al., 1990)

2.2.1.2 Amplifikationsansatz

Die Beschickung der PCR-Gefäße mit den im folgenden aufgeführten Substanzen erfolgte räumlich getrennt von dem übrigen Arbeitsbereich in einer Sicherheitswerkbank (UV-PCR-Kabinett). Die einzelnen Substanzen wurden in der nachfolgend aufgeführten Reihenfolge einpipettiert (<u>Tabelle 19</u>):

Tabelle 19 : Amplifikationsansatz für die PCR

Zusätze:	Angabe in µl
A. bidest.	18,8
Polymerase-Puffer mit Mg ²⁺ 10x	2,5
dNTP* (10 mM)	0,5
Primer 1 (50 pmol)	0,5
Primer 2 (50 pmol)	0,5
Polymerase (1,0 U)	0,2
DNS	2,0
Inhalt pro Reaktionsgefäß	25

^{*} Desoxyribonucleosidtriphosphat (=dATP, dCTP, dGTP und dTTP) zu gleichen Anteilen.

Nach Vorlage des autoklavierten Aqu. bid. Im ersten Pipettierschritt fand bei jedem weiteren Schritt eine sorgfältige Durchmischung der zugefügten Substanz mit dem im PCR-Gefäß bereits vorhandenen Gemisches statt.

Bei jedem Versuchsansatz lief ein Leerwert mit, der sich von den anderen Ansätzen nur dadurch unterschied, dass statt der DNS die gleiche Menge Aqua bidest zugefügt wurde.

Alternativ wurde bei den meisten Versuchsansätzen zur Arbeitserleichterung und zur Verminderung von eventuellen Kontaminationen ein sog. "Mastermix", bestehend aus Aqua bidest, Puffer, dNTPs, Primer und Taq-Polymerase, hergestellt. Nach sorgfältiger Durchmischung wurde der "Mastermix" entsprechend der Anzahl zu untersuchender Ansätze aliquotiert. Die beiden weiteren Arbeitsschritte erfolgten für jede Probe getrennt.

Während des Pettiervorgangs wurden die PCR-Gefäße sowie die Gefäße mit den zu verwendenden Substanzen bei ca. 4°C in Kühlboxen aufbewahrt.

Sofort nach Beendigung des Pipettiervorgangs wurden die PCR-Gefäße in den DNS-Thermal Cycler gegeben und das Programm gestartet.

Die Amplifizierung der DNS erfolgte bei Einsatz der spezifischen Primer in einem DNS-Thermal Personal cycler nach folgenden Programmen (<u>Tabelle 20</u>):

Tabelle 20: Thermocycler-Programme für die Van-PCR

Cycler-Programm:	va	<i>van</i> A				
Primer:	VAN A1+ VAN A2					
	Denaturierung 94°C	Synthese 72°C				
2x	2min	1min	1min			
30x	1min 30s		30s			
1x			4min			

(Nach KLARE et al., 1995)

Cycler-Programm:	var	Länge: 3h				
Primer:	VAN B1+ VAN B2					
	Denaturierung 94°C	<u> </u>				
30x	1min	1min 2min				
1x			5min			

(Nach FRAIMOW et al., 1994)

Cycler-Programm:	vanC1-3		Länge. 1h 30min	
Primer:	VAN C1-3			
	Denaturierung 94°C	Annealing 58°C	Synthese 72°C	
1x	5min			
30x	30s	30s	30s	
1x			5min	

(Nach CLARK et al., 1998 und SATAKE et al., 1997)

Nach Beendigung dieser Programme kühlte das Gerät die Proben automatisch auf +4°C ab. Die Amplifikate wurden entweder direkt nach der PCR untersucht oder bis zur weiteren Analyse bei -26°C aufbewahrt.

2.2.2 Randomly Amplified Polymorphic DNS-Methode (RAPD)

Für die Differenzierung *van*A-positiver Lebensmittel- und klinischer VRE-Isolate wurde für die RAPD der Random 10-mer Primer "KAY3"- (YOUNG et al., 1994) verwendet.

2.2.2.1 DNS-Präparation

Die DNS-Präparation für die RAPD erfolgte mit QIAamp Tissue Kit (QIAGEN GmbH). <u>Tabelle 21</u> dokumentiert die verwendeten Lösungen dieses Kits, der Versuchsaufbau ist in <u>Abbildung 3</u> dargestellt.

Tabelle 21: Verwendete Lösungen des QIAamp Tissue Kits

Lösung	Auflösung	Lagerbedingungen	Haltbarkeit
Proteinase K	+1,4 ml Aqua bidest	4°C	2-3 Mon
		-20°C	>3 Mon
Puffer ATL		RT	
Puffer AL	AL 1+AL 2	RT, dunkel	1 J
Puffer AW	+40ml Ethanol (96-100%)	RT, dunkel	1 J
Puffer AE		RT, dunkel	

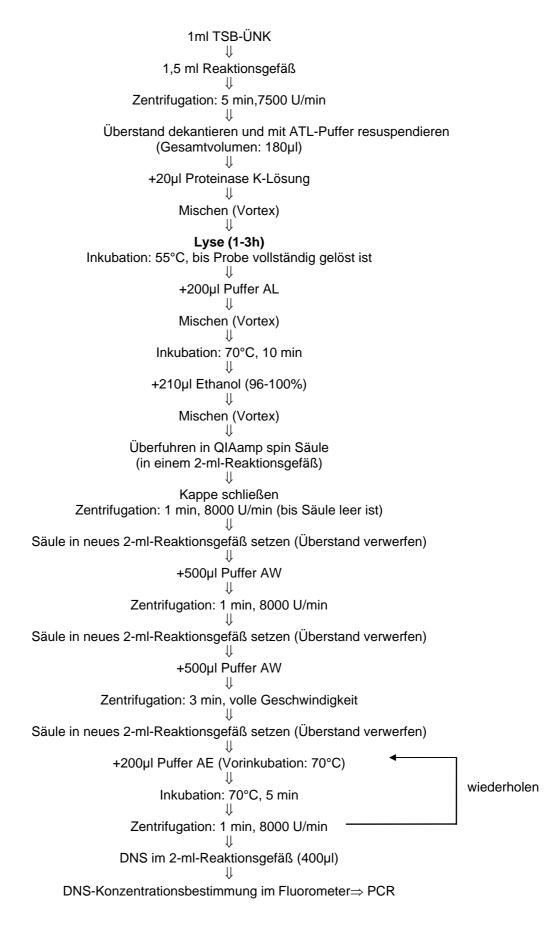


Abb. 3: DNS-Isolierung aus einer Bakteriensuspension mit dem QIAamp Tissue Kit

2.2.2.2 Amplifikationsansatz

Der Amplifikationsansatz für die RAPD-PCR erfolgte nach Tabelle 22.

Tabelle 22: Amplifikationsansatz für die RAPD-PCR

Zusätze:	Angabe in μl	
A. bidest.	18,3	
Polymerase-Puffer mit Mg ²⁺ 10x	2,5	
dNTP* (10 mM)	0,5	
kay3-Primer (20 pmol)	1,0	
Polymerase (1,0 U)	0,2	
DNS	2,0	
Inhalt pro Reaktionsgefäß:	25	

^{*} Desoxyribonucleosidtriphosphat (=dATP, dCTP, dGTP und dTTP) zu gleichen Anteilen.

Die Amplifizierung der DNS erfolgte bei Einsatz des Primers *kay*3 nach YOUNG et al. (1994) in einem DNS-Thermal Personal Cycler nach folgendem Programm (<u>Tabelle 23</u>):

Tabelle 23: Thermocycler-Programm für die RAPD-PCR

Cycler-Programm:	RAPD		Länge: 3h	
Primer:	KAY 3			
	Denaturierung 94°C	Annealing 39°C	Synthese 72°C	
1x	5min			
36x	45s	45s	2min	

Danach: abkühlen auf 4°C, Einfrieren bei –20°C (nach YOUNG et al., 1994)

2.2.3 Gelelektrophorese

Die Gele für die PCR und die RAPD wurden jeweils aus 1,4% Agarose in TBE-Puffer, der auch als Laufpuffer diente, hergestellt. Jeweils 10µl der Amplifikate wurde mit 2µl Bromphenolblau gemischt und in die Geltaschen gegeben. Die Elektrophorese wurde bei 100 V für 90min durchgeführt. Die DNS-Amplifikate wurden für 20min in Ethidiumbromidlösung (ca. 20µl Ethidiumbromid in 1 Liter Wasser) gefärbt. Nicht ge-

bundenes Ethidiumbromid wurde 10min in Leitungswasser ausgewaschen. Die Darstellung der DNS-Amplifikate erfolgte bei einer Wellenlänge von 302nm. Für die fotografische Darstellung wurden Papierbilder verwendet.

Die Marker V oder VI (Fa. Boehringer) wurden bei jeder Gelelektrophorese als Standard für die Molekulargewichtsermittlung amplifizierter DNS-Banden eingesetzt.

2.2.4 Makrorestriktionsanalyse der genomischen DNS durch die PFGE

Eine Übersicht über den Untersuchungsgang zur PFGE, modifiziert nach MIRANDA et al. (1991), MASLOW et al. (1993a, b) und KLARE et al. (1997) ist in <u>Abbildung 4</u> dargestellt.

Die PFGE gliedert sich in mehrere Untersuchungsschritte auf:

1.Tag: Anzucht:

Jeweils eine Kolonie der zu analysierenden *Enterococcus*-Isolate wurden in 20ml CASO-Bouillon für 24h bei 37°C in einem Schüttelinkubator in 50ml-Glaskolben angezüchtet.

2. Tag: Zelllysis:

Die Bakteriensuspension wurde zunächst für 30min im Kühlschrank auf ca. 4°C abgekühlt und danach 10min bei 10.000rpm (4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Sediment in 5ml gekühlten (4°C) TE-Puffer resuspendiert. Dieser Waschvorgang wurde wiederholt, das Sediment in 250µl TE-Puffer resuspendiert.

Die Bakteriensuspension wurde photometrisch auf eine Transmission von ca. 5% bei 620nm eingestellt und in Reaktionsgefässen aufbewahrt.

Die Herstellung der Agaroseblöckchen erfolgte in modifizierter Form nach den Angaben von MASLOW et al. (1993a, b). Hierzu wurde zunächst 1,5%ige InCert-Agarose (15mg InCert-Agarose in 1ml TE-Puffer) zu gleichen Teilen mit der Bakteriensuspension vermischt. Jeweils 100µl der Mischung wurden sofort in den Gießblock gefüllt und 15-30min bei 4°C abgekühlt.

Nach Erstarren der Agaroseblöckchen wurden sie je Blöckchen in 200µl Lysispuffer mit 1mg Lysozym zur Lysis überführt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C in einem Wasserbad.

1.Tag: Anzucht - Eine Kolonie in 20 ml CASO-Bouillon

(Inkubation: 37°C/24h)

2. Tag: Zelllysis - Bakteriensuspension mit TE-Puffer waschen

(Zentrifugation: 10 min/ 10.000 rpm,

Photometrische Einstellung: 5% Transmission)

- in Blöckchenform gießen (InCert-Agarose)

- Lysis: Lysispuffer + Lysozym

(Inkubation: 37°C/24h)

3. Tag: Deproteinisierung - Zugabe von Proteinase K-Lösung

(Inkubation: 56°C/ 24h)

4. Tag: Restriktase-Spaltung - Mehrmals Spülen in TE-Puffer

(Inkubation: Raumtemperatur/ 30min)

- Mehrmals Spülen in TE-Puffer + PMSF

(Inkubation: 56°C/1h)

- Restriktionsendonuklease Smal

(Inkubation: 25°C/24h)

5. Tag: PFGE - Laden des Agarose- Gels mit DNS-Blöckchen

- PFGE- Reaktionsbedingungen:

200 Volt, 14°C 20h: 1-13s, 4h: 13-30s

6. Tag: Auswertung - Färben: 30min Ethidiumbromid-Bad

- Entfärben: 30min Aqua bidest

- Foto- Dokumentation:

- Auswertung: GelCompar

Abb. 4: Fließdiagramm zur Aufbereitung der Bakterien-DNS und Durchführung der PFGE

(modifiziert n. MIRANDA [1991], MASLOW [1993a, b] und KLARE [1997])

3. Tag: Deproteinisierung

Zur Deproteinisierung wurde 5µl Proteinase K-Lösung (14,6 mg/ml) pro Blöckchen) direkt auf den Lysisansatz gegeben und über Nacht bei 56°C in einem Wasserbad inkubiert.

4. Tag: Restriktase-Spaltung

Die Restriktase-Spaltung (Inaktivierung der Proteinase K) erfolgte durch zweimaliges Spülen der Agaroseblöckchen in 200µl TE-Puffer pro Blöckchen mit anschließender 30minütiger Inkubation bei Raumtemperatur, zweimaliges Spülen unterm Abzug in 200µl TE-Puffer und 2µl Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) pro Blöckchen (1h Inkubation im 56°C-Wasserbad) und schließlich erneutes zweimaliges Spülen (30min, Raumtemperatur). PMSF wurde in 2M NaOH verworfen. Die nun gebrauchsfertigen glasklaren Agaroseblöckchen konnten danach in 1ml TE-Puffer pro Blöckchen im Kühlschrank bis zu 3 Monaten aufbewahrt werden, bevor sie ihrer weiteren Verwendung zugeführt wurden.

Restriktion:

Für die intraspezifische Differenzierung *van*A-positiver Lebensmittel- und klinischer VRE-Isolate wurde als Restriktionsendonuklease *Sma*I (40U/µI Stammlösung) für die PFGE verwendet. Es wurden 40U pro Blöckchen benötigt.

Der Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 200µl bestand aus 1µl *Sma*l, 20µl *Sma*l Universalpuffer (10x) und 179 µl Aqua bidest (<u>Tabelle 24</u>).

Tabelle 24: Restriktionsansatz für die PFGE mit der Endonuklease Smal

Ansatz (auf Eis arbeiten):	1 Blöckchen
Smal Universalpuffer (10x) (Boehringer)	20 μΙ
Enzym Smal (40 U/µI)	1 μΙ
Aqua bidest	179 μΙ
Gesamt:	200 μΙ

Die Agaroseblöckchen mit der präparierten DNS (lysierte Bakterien) wurden in dem Ansatz bei 25°C über Nacht im Wasserbad inkubiert.

5. Tag: Pulsfeldgelelektrophorese

Nachdem die Gießform und Kamm mit Ethanol gereinigt wurde, konnte das 1,1%ige Agarose-Laufgel (1,32g Molecular Biology Certified Agarose in 120ml 0,5 x TBE-Puffer) gegossen werden. Nach Einsetzen der Agaroseblöckchen und der Pulsed-Field Marker (0,1-200kb und 50-1000kb, Sigma) in die dafür vorgesehenen Taschen im Agarose-Laufgel, konnte die Auftrennung der DNS mit der Pulsfeldgelelektrophorese mit dem CHEF-DR. TM-Elektrophorese-System II gestartet werden.

Die Elektrophorese-Einheit wurde zunächst in waagerechte Lage versetzt und mit Aqu. bid. 30min vorgespült, danach wurde 2,5 Liter 0,5 x TBE-Puffer eingefüllt und auf eine Temperatur von 14°C vorgekühlt. Das Laufgel wurde anschließend mit Metallunterlage in das Gerät gesetzt. Nach 30min "Temperaturanpassung" wurde das Programm eingestellt und das Gerät eingeschaltet.

Die PFGE erfolgte unter folgenden Reaktionsbedingungen (modifiziert nach EISENACH et al., 1992; KLARE et al., 1997): Bei einer konstanten Stromstärke von 200 Volt wurde die DNS bei 14°C für 20h mit Pulszeiten von 1-13s und für 4h mit Pulszeiten von 13-30s mit linearen Gradienten aufgetrennt. Als Längenstandard diente geschnittene Lambda-DNS. Die Bedingungen des Laufes sind in <u>Tabelle 25</u> dargestellt.

Tabelle 25: Reaktionsbedingungen der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

Pumpen-				Pulszeiten	
Geschwindigkeit	Temperatur	Volt/cm	Volt	Block I	Block II
				1-13 s	13-30s
70	14°C	6	200	20 h	4 h

6. Tag: Auswertung

Nach dem Elektrophoreselauf wurde das Agarosegel 30min in einem Ethidiumbromid-Bad (0,5mg Ethidiumbromid/ 1I Aqua bidest) gefärbt und anschließend 30min in Aqua bidest entfärbt. Die entstandenen DNS-Fragmente wurden im Gel unter UV-Beleuchtung durch diesen spezifisch an Ribonukleinsäuren bindenden Farbstoff sichtbar gemacht und mit einer Polaroid-Kamera photographiert. Die Berechnung der Ähnlichkeit zwischen den untersuchten Kulturen erfolgte nach EISENACH (1992) anhand der folgenden Formel:

2.2.5 Computerunterstützte Auswertung

Für die Auswertung der Fingerprinting-Muster wurde das Gel mit einer Grautiefe von 256 Grautönen und einer Bildpunktdichte von 800 dpi (dots per inch) mit Hilfe eines Flachbettscanners in den Personal Computer übertragen. Die Weiterbearbeitung erfolgte mit dem Computerprogramm GelCompar 4.0 (VAUTERIN et al., 1991). Dieses Computerprogramm dient zur Auswertung von Gelen mit Fingerprinting-Mustern, deren Vergleich mit dem bloßen Auge nur eingeschränkt möglich ist. Es besteht aus den drei Programmteilen "Konvertierung", "Normalisierung" und "Analyse".

Nach der Aufnahme des Gelbildes in das Konvertierungsprogramm wurde der zu untersuchende Bereich des Gels, d.h., der Bereich mit sichtbaren Banden, durch einen flexiblen Rahmen festgelegt und eine schmale Linie für die densitometrische Erfassung der einzelnen Laufstrecken bestimmt. Damit konnte vermieden werden, dass Färbefehler Einfluss auf die Untersuchungsergebnisse nahmen. Die optische Dichte der einzelnen Proteinbanden wurde entlang der für jede einzelne Bahn festgelegten Linie gemessen. Die digitalisierten Rohdaten wurden gespeichert und standen für die anschließenden Bearbeitungsschritte zur Verfügung. Jeder Bahn wurde der entsprechende Name des Isolates zugeordnet.

Das Ziel des folgenden Normalisierungsschrittes war es, die einzelnen Laufstrecken auf den Gelen so zu optimieren, dass sie untereinander vergleichbar wurden. Es sollten hierbei die trotz gleicher Elektrophoresebedingungen unvermeidbaren Längen-

unterschiede der Laufstrecken auf verschiedenen Gelen, sowie der bekannte "smiling-Effekt" (die inneren Bahnen werden schneller als die äußeren durchlaufen) innerhalb eines identischen Gels ausgeglichen werden. Um dieses zu erreichen, mussten alle untersuchten Stämme an einem einmal bestimmten und für die gesamte Untersuchung festgelegten Standardmarker ausgerichtet werden. Dazu dienten die Pulsed-Field Marker (50-1000 kb + 0,1-200 kb). Die Banden der untersuchten Enterokokken-Isolate lagen im Bereich zwischen 50 und 2000 kb. Zum Ausrichten wurden die Banden auf jedem Gel mit den entsprechenden Banden des Standardmarkers verknüpft und danach einander angeglichen. Die neben den Markern liegenden Laufstrecken der Prüfstämme wurden bei diesem Vorgang gleichzeitig ausgerichtet.

Die vorhandene unspezifische Färbung des Hintergrundes konnte durch einen speziellen sogenannten 'rolling disc"-Reduktionsschritt vermindert werden. Dieser Mechanismus ist vom Funktionsprinzip her mit einer im Durchmesser variablen Scheibe zu vergleichen, die unter der densitometrischen Kurve entlangrollt und die dadurch überdeckte Fläche entfernt. So traten die diskriminierenden Banden der einzelnen Profile mehr in den Vordergrund. Der Durchmesser der "rolling-disc" wurde für alle untersuchten Gele gleich gewählt. Die Auflösung der elektrophoretischen Laufstrecke, d. h. die Anzahl der Punkte pro Bahn nach der Normalisierung wurde auf 800 Punkte im Densitogramm festgelegt. Diese Punkte wurden in der Analyse zum Vergleich herangezogen.

In dem abschließenden Analyseschritt konnten die normalisierten Laufstrecken der Prüfstämme miteinander verglichen werden und über die Berechnung der Ähnlichkeiten der Laufstreckenprofile und deren Vergleich eine Einteilung in Gruppen erfolgen.

Zur Analyse der aufbereiteten Daten wurde UPGMA (unweighted pair group method using average linkages), eine hierarchische Methode zur Gruppen- (Cluster-) Bildung, eingesetzt. Bei der Verwendung dieser Methode wurden alle Versuchsergebnisse gleich gewichtet (unweighted), und die einzelnen Stämme wurden immer paarweise verglichen (pair-group). Die Zuordnung eines Stammes zu einem Cluster erfolgte, wenn die durchschnittliche Ähnlichkeit mit diesem größer war als die Ähnlichkeit mit einem anderen Cluster (average linkage).

Die gewählten Einstellungen bei den einzelnen Programmkomponenten von Gel-Compar sind in <u>Anhangstabelle 16</u> aufgeführt. Jedes Isolat wurde auf zwei Agarosegele aufgetragen. Bei einer Ähnlichkeit von $r \ge 95\%$ zwischen zwei Stämmen ging einer dieser beiden Stämme in die Analyse ein.

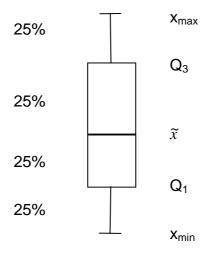
2.2.5.1 Gesamtprofilanalyse

Alle *vanA*-positiven Enterokokken wurden anhand ihres PFGE-Musters untereinander verglichen. Dazu wurden sämtliche Banden der jeweiligen gesamten Laufstrecken der einzelnen Isolate berücksichtigt.

2.3 Statistische Auswertung

Die Datenhaltung und -auswertung sowie die Erstellung der grafischen Abbildungen im Rahmen der Ergebnispräsentation erfolgte auf den Rechnern im lokalen Rechnernetzwerk (LAN) der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die statistischen Auswertungen wurden unter Verwendung des Statistikprogrammpakets BMDP/-Dynamic, Release 7.0, (DIXON, 1993) durchgeführt. Die grafischen Abbildungen wurden auf einem Personalcomputer mit dem Programm PlotIT, Version 2.0, (EISENSMITH, 1993) bzw. PlotIT für Windows, Version 3.20h, (EISENSMITH, 1994) erzeugt.

Zur Beschreibung der Daten wurden arithmetische Mittelwerte (\bar{x}) , Standardabweichungen (s), Minima (x_{min}) , Maxima (x_{max}) und Stichprobenumfänge(n) berechnet und tabellarisch wiedergegeben. Bei rechtsschiefer Verteilung positiver quantitativer Merkmale wurde eine logarithmische Transformation der Daten durchgeführt (KbE). Bei den semiquantitativen Variablen ... erfolgte die Datenbeschreibung durch die Angaben der Mediane (\tilde{x}) , der Quartile (Q1 und Q3) sowie der kleinsten und größten Beobachtungen mit Darstellung im Box-and-Whisker-Plot (vgl. LORENZ, 1996):



Die qualitativen Merkmale wurden nach Gruppen getrennt ausgezählt und in Form von (zweidimensionalen) Häufigkeitstabellen (Kontingenztafeln) dargestellt.

Zur statistischen Prüfung des Gruppeneinflusses auf Signifikanz wurde bei den angenähert normalverteilten Merkmalen [lg(KbE)] eine einfaktorielle Varianzanalyse mit dem Programm BMDP7D durchgeführt.

Für die Gegenüberstellung qualitativer Merkmale wurden Häufigkeitstabellen mit dem Programm BMDP4F erzeugt und mit dem Chi-Quadrat-Test auf signifikante Zusammenhänge geprüft.

Bei der Bewertung der statistischen Signifikanzen wurde das Signifikanzniveau α = 0,05 zugrund gelegt, d. h. Ergebnisse mit p < 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen. Zusätzlich wird – wenn möglich – der exakte p-Wert angegeben.

IV. ERGEBNISSE

1. Mikrobiologische Untersuchungen

1.1 Quantitative Bestimmung von Enterokokken

Die quantitative Bestimmung (Koloniebildende Einheiten [KbE]) von Enterokokken ergab bei den Schweinefleischproben Werte zwischen 3,0x10¹ KbE/g (1,48 log KbE/g, Schweinemett) und 2,4x10³ KbE/g (3,38 log KbE/g, grobe Bratwurst). Bei den Geflügelfleischproben lagen die Werte zwischen 1,6x10⁰ KbE/cm² (0,20 log KbE/cm², Hähnchenbrustfilets) und 5,6x10² KbE/cm² (2,75 log KbE/cm², Hähnchenschenkel). Die Einzelergebnisse der quantitativen Erfassung finden sich in <u>Tabelle 24</u> und <u>25</u>, nach den verschiedenen Probenarten gegliedert, wider. Neben den logarithmierten Werten der Keimzahlen wurden zugleich jeweils auch die Median-, Maximal-/-Minimalwerte und die Standardabweichungen aufgeführt.

Tabelle 24 stellt die angenäherte quantitative Erfassung der Enterokokken der untersuchten Geflügelfleischproben in log KbE/cm² Oberfläche dar. Um eine einheitliche Bezugsgröße zu erhalten, wurde das jeweilige Probengewicht rechnerisch auf die Oberfläche bezogen. Dabei ist die Probenart "Hähnchen" (n=30) stellvertretend aufgeführt für: Hähnchen (n= 17), Brathähnchen (n= 2), Stubenküken (n= 1), Poularde (n= 1) und Suppenhuhn (n= 9); die Probenart "weitere Teilstücke" (n= 46) für: Hähnchenbeine (n= 5), -flügel (n= 11), -keulen (n= 3), und –schenkel (n= 27) und die Probenart "Innereien" (n= 30) für: Hähnchenherzen (n= 4), -leber (n= 7), -mägen (n= 6) und Hühnerklein (n= 13). Abbildung 5 veranschaulicht diese Ergebnisse in einem Blockdiagramm. Beispielsweise zeigt die Säule der Probenart "Hähnchen" den Mittelwert von 0,91 und eine Standardabweichung von 0,55 log KbE/cm² Oberfläche.

Mit den Daten der Koloniebildenden Einheiten (KbE) der Geflügelfleischproben wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse durchgeführt. Hierbei konnte ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den fünf Probenarten festgestellt werden (p < 0,001).

Tabelle 24: Quantitativer Enterokokkengehalt bei 115 untersuchten Geflügelfleischproben (in log KbE/cm² Oberfläche)

Probenart	Anzahl	X _{min}	X _{max}	\overline{x}	\widetilde{x}	S
Hähnchen	30	0,21	2,23	0,91	0,70	0,55
Hähnchenbrust	4	1,47	2,31	1,85	1,80	0,37
Hähnchenbrustfilets	5	0,20	1,32	0,60	0,78	0,45
weitere Teilstücke	46	0,33	2,75	1,18	1,11	0,60
Innereien	30	0,36	2,37	1,42	1,30	0,60
Gesamt	115	0,20	2,75	1,18	1,12	0,61

n = Anzahl der Proben

 $x_{min} = Minimalwert$

x_{max} = Maximalwert s = Standardabweichung

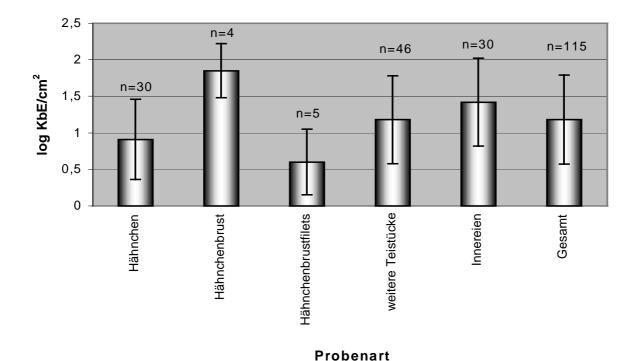


Abb. 5: Quantitativer Enterokokkengehalt bei 115 Geflügelfleischproben (Angabe der Mittelwerte und der Standardabweichungen in log KbE/cm² Öberfläche)

 $[\]overline{x}$ = Mittelwert (arithmetisches Mittel)

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

Tabelle 25: Quantitativer Enterokokkengehalt bei 50 untersuchten Schweinefleischproben (in log KbE/g)

Probenart	Anzahl	X _{min}	X _{max}	\overline{x}	\widetilde{x}	s
Bratwurst	24	1,70	3,38	2,42	2,41	0,46
Hackfleisch	26	1,48	3,26	2,23	2,15	0,55
Gesamt	50	1,48	3,38	2,33	2,28	0,51

Legende: siehe Tab. 24

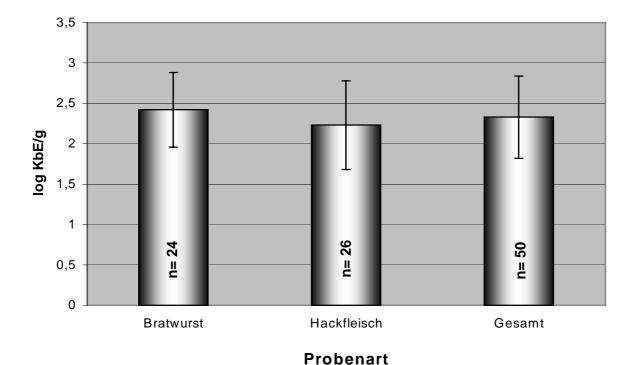


Abb. 6: Quantitativer Enterokokkengehalt bei 50 Schweinefleischproben (Angabe der Mittelwerte und der Standardabweichungen in log KbE/g)

Tabelle 25 gibt die quantitative Erfassung der Enterokokken in den untersuchten Schweinefleischproben in log KbE/g wieder. Dabei ist die Probenart "Bratwurst" (n= 24) stellvertretend aufgeführt für: Grobe Bratwurst (n= 12), Nürnberger Bratwurst (n= 6) und Thüringer Rostbratwurst (n= 6) und die Probenart "Hackfleisch" (n= 26) für Schweinehackfleisch (n= 5), Schweinemett (n= 18) und Thüringer Schweinemett (n= 3) aufgeführt. Abbildung 6 stellt die Ergebnisse graphisch dar. Dabei zeigt die Säule der untersuchten Bratwurstproben den Wert 2,42 log KbE/g und eine Standardabweichung von 0,46 log KbE/g. Aus den Daten der Koloniebildenden Einheiten (KbE) der Schweinefleischproben wurde ebenfalls eine einfaktorielle Varianzanalyse durchgeführt. Hierbei konnte kein Unterschied zwischen diesen beiden Probenarten nachgewiesen werden (p=0,20).

1.2 Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE)

Insgesamt konnten in den eigenen Untersuchungen 1643 *Enterococcus*-Stämme aus 115 Geflügel- und 50 Schweinefleischproben isoliert werden. Eine diesbezügliche Übersicht ist in der <u>Tabelle 26</u> enthalten. Sie gibt gleichzeitig Auskunft über den Anteil der Vancomycin-resistenten Stämme für die beiden Probenarten "Geflügel" und "Schwein". 420 Isolate (25,6%) aus 87 Geflügel (75,7%)- und 24 Schweinefleischproben (48,0%) wiesen Wachstum auf Vancomycin- supplementiertem Columbia CNA-Agar auf und konnten demnach als VRE identifiziert werden (siehe auch <u>Tabelle 28</u>).

Tabelle 26: Zusammenfassende Übersicht zu den aus Geflügel- und Schweinefleischproben isolierten Enterokokken mit gleichzeitiger Angabe des Vancomycin-resistenten Anteils (VRE)

Lebensmittel	Anzahl (%) ¹			
	Isolate VRE-po			-pos.²
Geflügel	1150	(70,0)	358	(31,1)
Schwein	493	(30,0)	62	(12,6)
Insgesamt	1643	(100,0)	420	(25,6)

¹ Prozentualer Anteil an den gesamten Enterokokkenspezies, isoliert aus den jeweiligen Proben;

Eine weitergehende Übersicht ist in der <u>Tabelle 27</u> enthalten. Sie gibt gleichzeitig Auskunft über den Anteil der Vancomycin-resistenten Stämme innerhalb der unterschiedlichen Enterokokken-Spezies für die beiden Probenarten "Geflügel" und "Schwein". Dabei sind die Isolate nicht komplett unabhängig, da sie z. T. aus derselben Probestammen.

Am häufigsten konnte aus Geflügelfleisch *E. faecium* (47,7% aller nachgewiesenen Enterokokken), gefolgt von *E. faecalis* (45,8%) isoliert werden. 23,5% der *E. faecium*-und 17,3% der *E. faecalis*-Isolate erwiesen sich als Vancomycin-resistent (Wachstum auf Columbia CNA-Agar, supplementiert mit 5mg Vancomycin/L).

² Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE, Wachstum auf Columbia CNA-Agar, supplementiert mit 5mg Vancomycin/L)

Tabelle 27: Differenzierende Übersicht zu den aus Geflügel- und Schweinefleischproben isolierten Enterokokken-Spezies mit gleichzeitiger Angabe des Vancomycin-resistenten Anteils (VRE)

Enterococcus spp.	Lebensmittel	Anzahl (%)¹			
		Isola	ite	VRE-p	os. ²
	Geflügel	546	(69,6)	160	(29,3)
E. faecium	Schwein	238	(30,4)	24	(10,1)
	Insgesamt	784	(47,7)	184	(23,5)
	Geflügel	511	(67,9)	105	(20,5)
E. faecalis	Schwein	242	(32,1)	25	(10,3)
	Insgesamt	753	(45,8)	130	(17,3)
	Geflügel	34	(87,2)	34	(100,0)
E. gallinarum	Schwein	5	(12,8)	5	(100,0)
	Insgesamt	39	(2,4)	39	(100,0)
	Geflügel	14	(63,6)	14	(100,0)
E. casseliflavus	Schwein	8	(36,4)	8	(100,0)
	Insgesamt	22	(1,3)	22	(100,0)
	Geflügel	1	(100,0)	1	(100,0)
E. flavescens	Schwein	0 (0,0)			
	Insgesamt	1	(0,1)	1	(100,0)
	Geflügel	34	(100,0)	34	(100,0)
E. durans	Schwein		0 (0	,0)	
	Insgesamt	34	(2,1)	34	(100,0)
	Geflügel	10	(100,0)	10	(100,0)
E. hirae	Schwein		0 (0	,0)	
	Insgesamt	10	(0,6)	10	(100,0)
Geflügel		1150	(70,0)	358	(31,1)
Schwein		493	(30,0)	62	(12,6)
Insgesamt		1643	(100,0)	420	(25,6)

Tabelle 28 gibt die Ergebnisse des Nachweises von Vancomycin-resistenten Enterokokken in 115 Geflügel- und 50 Schweinefleischproben, nach Herkunftsländern geordnet, wieder. VanB-Gen-positive Stämme konnten in keiner Probe nachgewiesen werden.

Prozentualer Anteil an den gesamten Enterokokkenspezies, isoliert aus den jeweiligen Proben;
 Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE, Wachstum auf Columbia CNA-Agar, supplementiert mit 5mg Vancomycin/L)

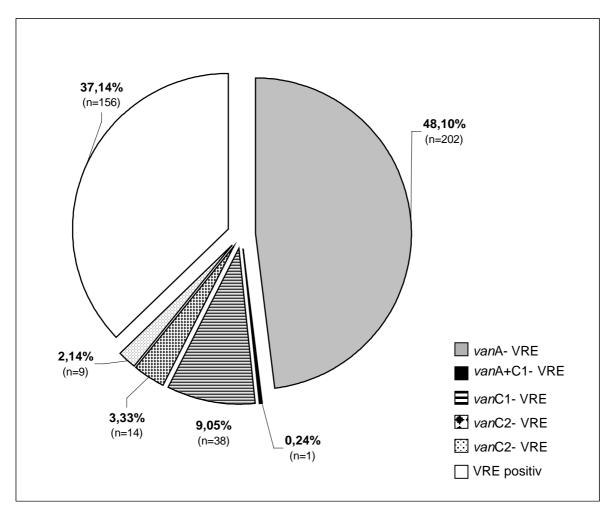


Abb. 7: Prozentuale Verteilung des Vorkommens verschiedener Resistenz-Gene bei Vancomycin-resistenten Enterokokken (n=420) aus Geflügel- und Schweinefleisch

vanA-VRE: Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE), nur vanA-Gen-positiv

vanA+C1-VRE: VRE, vanA- und vanC1-Gen-positiv

vanC1-VRE: VRE, nur vanC1-Gen-positivvanC2-VRE: VRE, nur vanC2-Gen-positiv

vanC2+3-VRE: VRE, vanC2- und vanC3-Gen-positiv

VRE positiv: VRE, Wachstum auf Columbia CNA-Agar, supplementiert mit 5mg Vancomycin/L, kein be-

kanntes Van-Gen nachweisbar

<u>Abbildung 7</u> veranschaulicht die prozentuale Verteilung des Vorkommens verschiedener Resistenz-Gene in Vancomycin-resistenten Enterokokken aus Geflügel- und Schweinefleisch. Dabei ist zu erkennen, dass bei 37,14% der Isolate (n=156, weißer Abschnitt) die geprüften Gene nicht nachweisbar waren. Bei 48,1% der Isolate (n=202, grauer Abschnitt) konnte das *van*A-Gen nachgewiesen werden.

Tabelle 28: Nachweis von Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) in einbezogenen Geflügel- und Schweinefleischproben, nach unterschiedlichen Herkunftsländern aufgeschlüsselt

Land	Lebensmittel	Anzahl (%) ¹		
	Tierart	Gesamt	VRE-pos. ²	
	Schwein	50 (45,0)	24 (48,0)	
Deutschland	Geflügel	61 (55,0)	44 (72,1)	
	Gesamt	111 (67,3)	68 (61,3)	
Niederlande	Geflügel	43 (37,4)	33 (76,7)	
Frankreich	Geflügel	10 (8,7)	10 (100,0)	
Ungarn	Geflügel	1 (0,9)	1 (100,0)	
	Schwein	50 (30,3)	24 (48,0)	
Gesamt	Geflügel	115 (69,7)	87 (75,7)	
	Gesamt	165 (100,0)	111 (67,3)	

¹Prozentualer Anteil an den gesamten untersuchten Proben (Schwein, Geflügel) des jeweiligen Landes

Nachfolgend sind in den <u>Tabellen 29</u> bis <u>32</u> die jeweils zugrundeliegenden Daten für die Gegenüberstellung verschiedener Untersuchungsergebnisse bezüglich der Isolierung Vancomycin-resistenter Enterokokken (VRE) aus Geflügel- und Schweinefleisch aufgeführt. In den <u>Tabellen 33</u> bis <u>36</u> sind die Daten in Bezug auf die Herkunftsländer dargestellt.

Anschließend wurden aus den Daten Häufigkeitstabellen mit dem Programm BMDP4F erzeugt und mit dem Chi-Quadrat-Test auf signifikante Zusammenhänge geprüft.

Tabelle 29: Statistischer Vergleich der Häufigkeit von Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE), isoliert aus Geflügel- und Schweinefleisch, mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests

	Geflügel	Schwein	Gesamt
ja	87 (75,7%)	24 (48,0%)	111 (67,3%)
nein	28 (24,3%)	26 (52,0%)	54 (32,7%)
Gesamt	115 (69,7%)	50 (30,3%)	165 (100,0%)

Die zugrundeliegenden Daten für den Chi-Quadrat-Test für Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) aus Geflügel- und Schweinefleisch sind in <u>Tabelle 29</u> aufgeführt.

² Wachstum auf Columbia CNA-Agar, supplementiert mit 5mg Vancomycin/L)

Dabei ergeben sich bei χ^2 =12,10 und einer Überschreitungswahrscheinlichkeit von p < 0,001 statistisch hoch signifikante Unterschiede, denn aus den untersuchten Geflügelfleischproben konnten mit 75,7% (n= 87) mehr VRE isoliert werden als aus Schweinefleisch (48,0%; n= 24).

Tabelle 30: Statistischer Vergleich der Häufigkeit von *van*A-positiven VRE, isoliert aus Geflügel- und Schweinefleisch, mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests

	Geflügel	Schwein	Gesamt
ja	36 (31,3%)	0 (0,0%)	36 (21,8%)
nein	79 (68,7%)	50 (100,0%)	129 (78,2%)
Gesamt	115 (69,7%)	50 (30,3%)	165 (100,0%)

Die Daten für den Chi-Quadrat-Test bezüglich der Isolierung vanA-positiver VRE sind in <u>Tabelle 30</u> aufgeführt. Hier ergeben sich bei χ^2 =20,02 und p < 0,0001 statistisch hoch signifikante Unterschiede, denn nur aus Geflügelfleisch konnten mit 31,3% (n= 36) vanA-positive VRE isoliert werden.

Tabelle 31: Statistischer Vergleich der Häufigkeit von *van*A- und *van*C-positiven VRE, isoliert aus Geflügel- und Schweinefleisch, mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests

	Geflügel	Schwein	Gesamt
ja	14 (12,2%)	0 (0,0%)	14 (8,5%)
nein	101 (87,8%)	50 (100,0%)	151 (91,5%)
Gesamt	115 (69,7%)	50 (30,3%)	165 (100,0%)

Der Chi-Quadrat-Test für die Daten von vanA- und vanC-positiven VRE ist in <u>Tabelle</u> 31 aufgeführt. Es ergeben sich bei χ^2 =6,654 und p < 0,01 statistisch signifikante Unterschiede.

Tabelle 32: Statistischer Vergleich der Häufigkeit von *van*C-positiven VRE, isoliert aus Geflügel- und Schweinefleisch, mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests

	Geflügel	Schwein	Gesamt
ja	19 (16,5%)	5 (10,0%)	24 (14,5%)
nein	96 (83,5%)	45 (90,0%)	141 (85,5%)
Gesamt	115 (69,7%)	50 (30,3%)	165 (100,0%)

Der Chi-Quadrat-Test für die Daten von vanC-positiven VRE ist in <u>Tabelle 32</u> aufgeführt. Es ergeben sich bei χ^2 = 1,1925 und p = 0,27 keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Tabelle 33: Statistischer Vergleich der Häufigkeit von Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE), isoliert aus Geflügelfleisch unterschiedlicher Länder, mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests

	Deutschland	Niederlande	Frankreich	Gesamt
ja	44 (72,1%)	33 (76,7%)	10 (100,0%)	87 (76,3%)
nein	17 (27,9%)	10 (23,3%)	0 (0,0%)	27 (52,0%)
Gesamt	61 (53,5%)	43 (37,7%)	10 (8,8%)	114 (100,0%)

Die zugrundeliegenden Daten für den Chi-Quadrat-Test für Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) aus Geflügel- und Schweinefleisch aus unterschiedlichen Ländern sind in <u>Tabelle 33</u> aufgeführt. Dabei ergeben sich bei χ^2 = 3,69 und einer Überschreitungswahrscheinlichkeit von p = 0,157 keine statistisch signifikanten Unterschiede. Unterschiede zwischen der Prävalenz in allen Ländern sind also hier nicht nachweisbar.

Tabelle 34: Statistischer Vergleich der Häufigkeit von *van*A-positiven VRE, isoliert aus Geflügelfleisch unterschiedlicher Länder, mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests

	Deutschland	Niederlande	Frankreich	Gesamt
ja	14 (23,0%)	13 (30,2%)	9 (90,0%)	36 (31,6%)
nein	47 (77,0%)	30 (69,8%)	1 (10,0%)	78 (68,4%)
Gesamt	61 (53,5%)	43 (37,7%)	10 (8,8%)	114 (100,0%)

Die Daten für den Chi-Quadrat-Test bezüglich der Isolierung vanA-positiver VRE aus Proben unterschiedlicher Länder sind in <u>Tabelle 34</u> aufgeführt. Hier ergeben sich bei χ^2 =17,93 und p < 0,001 statistisch hoch signifikante Unterschiede. Im Vergleich zu den aus Deutschland (23%) und den Niederlanden (30,2%) stammenden Geflügelfleischproben konnten aus 90% der französischen Proben vanA-positive VRE isoliert werden.

Tabelle 35: Statistischer Vergleich der Häufigkeit von *van*A-und *van*C-positiven VRE, isoliert aus Geflügelfleisch unterschiedlicher Länder, mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests

	Deutschland	Niederlande	Frankreich	Gesamt
ja	8 (13,1%)	6 (13,9%)	0 (0,0%)	14 (12,3%)
nein	53 (86,9%)	37 (86,1%)	10 (100,0%)	100 (87,7%)
Gesamt	61 (53,5%)	43 (37,7%)	10 (8,8%)	114 (100,0%)

Der Chi-Quadrat-Test für die Daten von vanA- und vanC-positiven VRE aus Proben unterschiedlicher Länder ist in <u>Tabelle 35</u> aufgeführt. Es ergeben sich bei $\chi^2 = 1,55$ und p = 0,46 keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Tabelle 36: Statistischer Vergleich der Häufigkeit von *van*C-positiven VRE, isoliert aus Geflügelfleisch unterschiedlicher Länder, mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests

	Deutschland	Niederlande	Frankreich	Gesamt
ja	11 (18,0%)	8 (18,6%)	0 (0,0%)	19 (16,7%)
nein	50 (82,0%)	35 (81,4%)	10 (100,0%)	95 (83,3%)
Gesamt	61 (53,5%)	43 (37,7%)	10 (8,8%)	114 (100,0%)

Das Ergebnis des Chi-Quadrat-Tests für die Daten von vanC-positiven VRE aus Proben unterschiedlicher Länder ist in <u>Tabelle 36</u> aufgeführt. Es ergeben sich bei $\chi^2 = 2,20$ und p = 0,33 keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den verglichenen Herkunftsländern.

1.3 Spezies-Differenzierung

Nach dem biochemisch basierten Typisierungsschema von DEVRIESE et al. (1995, 1996) konnte *E. faecium* zu 47,7% (n= 784), *E. faecalis* zu 45,8% (n= 753), *E. gallinarum* zu 2,4% (n= 39), *E. durans* zu 2,1% (n= 34), *E. casseliflavus* zu 1,3% (n= 22), *E. hirae* zu 0,6% (n= 10) und *E. flavescens* zu 0,1% (n= 1) als Spezies identifiziert werden. Die humanmedizinisch-klinischen Isolate wurden ebenfalls biochemisch differenziert. Die Ergebnisse sind in <u>Tabelle 37</u> dargestellt.

Tabelle 37: Ergebnisse der biochemischen Differenzierung von Enterokokken spp. menschlichen Ursprungs

Spezies		Anzahl (%)	
	Gesamt	vanA-VRE ²	VRE ¹
E. faecium	84 (95,5)	80 (95,2)	4 (66,7)
E. faecalis	3 (3,4)	2 (2,4)	1 (16,7)
E. durans	1 (1,1)	0 (0,0)	1 (16,7)
Gesamt	88 (100)	82 (93,2)	6 (6,8)

¹ Vancomycin-resistente Enterokokken, die das *van*A-Gen besitzen

² Vancomycin-resistente Enterokokken, die kein Van-Gen besitzen (*van*A, *van*B, *van*C, *van*D, *van*E)

1.4 Molekularbiologische Untersuchungen

1.4.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

In den eigenen Untersuchungen gelangten 5 Primerpaare für den jeweils spezifischen Nachweis des *van*A-, *van*B-, *van*C1-, *van*C2- und des *van*C3-Genes zum Einsatz.

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurde für jedes Isolat dreimal in zeitlich voneinander getrennten Versuchsansätzen geprüft.

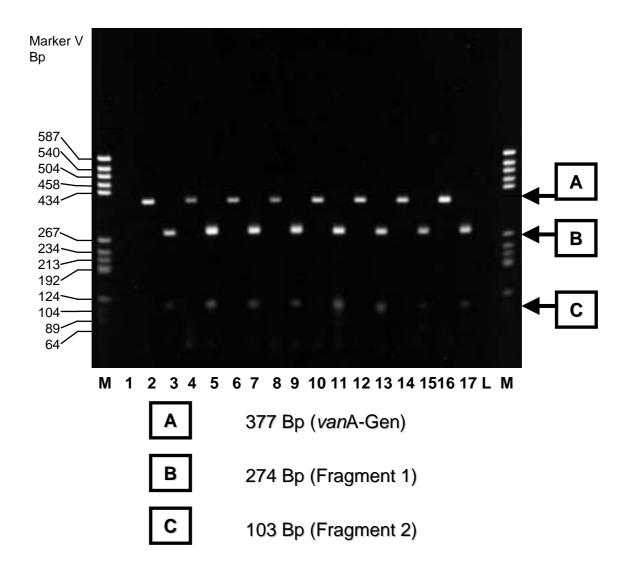
Die Spezifität des *van*A- und *van*B-typischen Amplifikates wurde mit Restriktionsanalysen belegt.

Das *van*A-Gen (377bp) wurde mit *Cfol* in zwei Fragmente (Fragment A: 274 bp, Fragment B: 103 bp), das *van*B-Gen (529bp) wurde mit *Ddel* ebenfalls in zwei Fragmente gespalten (Fragment A: 320 bp, Fragment B: 209 bp).

In der <u>Abbildung 8</u> sind beispielhaft Ergebnisse der PCR-Untersuchungen zum *van*A-Gen veranschaulicht.

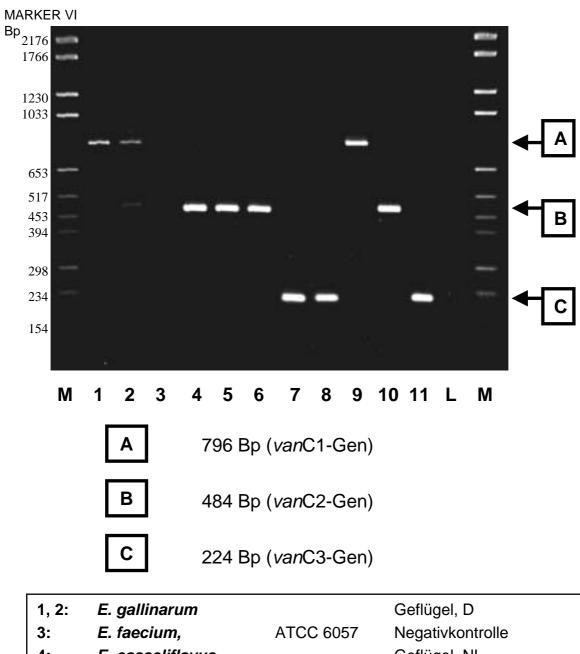
Dabei hat das *van*A-Gen-typische Amplifikat eine Grösse von 377 Basenpaaren (A; Spuren 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 und 16). Nach Restriktionsanalyse mit *Cfol* belegen die beiden Fragmente 1 (B; 274 Bp) und 2 (C; 103 Bp) die Spezifität des Amplifikates (Spuren 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 und 17). In Spur 1 ist die Negativkontrolle, in Spur 2 die Positivkontrolle aufgetragen. "L" bezeichnet den Leerwert, "M" den Längenstandard V der Fa. Roche Diagnostics (Marker V: 64, 89, 104, 124, 192, 213, 234, 267, 434, 458, 504, 540 und 587 Basenpaare).

Für die PCR-Untersuchungen zum *van*C-Gen sind Ergebnisse beispielhaft in der Abbildung 9 dargestellt Das *van*C1-Gen-typische Amplifikat besitzt eine Größe von 796 Basenpaaren (A; Spuren 1, 2, und 9 [Positivkontrolle]), das *van*C2-Gen-typische Amplifikat besitzt eine Größe von 484 Basenpaaren (B; Spuren 4, 5, 6 und 10 [Positivkontrolle]) und das *van*C3-Gen-typische Amplifikat besitzt eine Größe von 224 Basenpaaren (C; Spuren 7, 8 und 11 [Positivkontrolle]). In Spur 3 ist die Negativkontrolle aufgetragen. "L" bezeichnet den Leerwert, "M" den Längenstandard VI der Fa. Roche Diagnostics (Marker VI: 154, 234, 298, 394, 453, 517, 653, 1033, 1230, 1766 und 2176 Basenpaare).



1:	E. faecium	ATCC 6057	Negativkontrolle
2:	E. faecium	Geflügel, D	Positivkontrolle
4,8:	E. faecium	Geflügel, D	
6,12:	E. faecalis	Geflügel, NL	
10,14:	E. hirae	Geflügel, NL	
16:	E. faecium	klinische Isolate	e, D
3,5,7,9,11,13,1	5,17:	Restriktionsfrag	jmente
L:	Leerwert		
M:	Marker V		

Abb. 8: Gelelektrophoretische Darstellung des van A-Amplifikats vor und nach Restriktionsanalyse



1, 2:	E. gallinarum		Geflügel, D
3:	E. faecium,	ATCC 6057	Negativkontrolle
4:	E. casseliflavus		Geflügel, NL
6,7:	E. casseliflavus		Geflügel, D
5,8:	E. casseliflavus		Schwein, D
9:	E. gallinarum,	BA 4174	vanC1-Positivkontrolle
10:	E. casseliflavus,	ATCC 25788	vanC2-Positivkontrolle
11:	E. flavescens,	CCM 439	vanC3-Positivkontrolle
L:	Leerwert		
M:	Marker VI		

Abb. 9: Gelelektrophoretische Darstellung der *van*C-Amplifikate

In der <u>Tabelle 38</u> sind die Ergebnisse dieser PCR-Typisierungsuntersuchungen für die *van*A- und die einzelnen *van*C- Resistenzgene wiedergegeben. Das *van*A- Gen konnte nur in Isolaten aus Geflügelfleisch nachgewiesen werden. Am häufigsten erwiesen sich Stämme der Spezies *E. faecium* als high-level-resistent (*van*A-Gen-positiv), aber auch bei *E. faecalis-*, *E. durans-*, *E. hirae-* und *E. gallinarum-*Stämmen konnte das *van*A-Gen nachgewiesen werden. Dabei war in einem Fall *E. gallinarum* gleichzeitig Träger des *van*C1-Gens. Wie in der Literatur beschrieben, konnten die *van*C-Gene ausschließlich bei *E. gallinarum-* (*van*C1), *E. casseliflavus-* (*van*C2+3) oder bei *E. flavescens-*Stämmen (*van*C2+3) nachgewiesen werden. Die Isolierung dieser Enterokokken-Spezies gelang sowohl aus Geflügel- als auch aus Schweinefleisch.

Tabelle 38: Anzahl der aus Geflügel- und Schweinefleischproben isolierten Enterokokken-Spezies mit gleichzeitiger Angabe des Vancomycinresistenten Anteils (vanA+C)

Enterococcus spp.	Lebens-					An	zahl (%) ¹				
эрр.	mittel	V	anA²	van	A+C1 ³	v	<i>an</i> C1⁴	V	anC2⁵	van	C2+C3 ⁶
	Gefl.	127	(23,3)			1	0	(0,0)			
E. faecium	Schw.						0	(0,0)			
	Ges.	127	(16,2)				0	(0,0)			
	Gefl.	31	(6,1)				0	(0,0)			
E. faecalis	Schw.						0	(0,0)			
	Ges.	31	(4,1)				0	(0,0)			
	Gefl.	0	(0,0)	1	(2,9)	33	(100,0)		0 (0	0,0)	
E. gallinarum	Schw.		0 ((0,0)		5	(100,0)		0 (0	0,0)	
	Ges.	0	(0,0)	1	(2,6)	38	(100,0)		0 (0	0,0)	
	Gefl.			0	(0,0)			13	(92,9)	1	(7,1)
E. casseliflavus	Schw.			0	(0,0)			1 (12,5) 7 (87,5)			(87,5)
	Ges.						(36,4)				
	Gefl.			0 (0,0) 1 (100,0)			(100,0)				
E. flavescens	Schw.			0 (0,0)							
	Ges.			0 (0,0) 1 (100,0			(100,0)				
	Gefl.	34	(100,0)	0 (0,0)							
E. durans	Schw.						0	(0,0)			
	Ges.	34	(100,0)				0	(0,0)			
	Gefl.	10	(100,0)				0	(0,0)			
E. hirae	Schw.						0	(0,0)			
	Ges.	10	(100,0)				0	(0,0)			
Geflügel		202	(17,6)	1	(0,1)	33	(2,9)	13	(1,1)	2	(0,2)
Schwein			0 (0,0)		5	(1,0)	1	(0,2)	7	(1,4)
Insgesamt		202	(12,3)	1	(0,1)	38	(2,3)	14	(0,9)	9	(0,5)

¹ Prozentualer Anteil an den gesamten Enterokokkenspezies, isoliert aus den jeweiligen Proben; ² VRE, nur *van*A-Gen-positiv;

Gefl.: Geflügelfleisch; Schw.: Schweinefleisch; Ges.: Gesamt

³ VRE, *van*A- <u>und</u> *van*C1-Gen-positiv;

⁴VRE, nur *van*C1-Gen-positiv;

⁵VRE, nur *van*C2-Gen-positiv;

⁶ VRE, vanC2- und vanC3-Gen-positiv.

In der <u>Abbildung 10</u> ist das Vorkommen Vancomycin-resistenter Enterokokken aus 115 untersuchten Geflügelfleischproben, unabhängig vom Herkunftsland, auf Basis der im einzelnen detektierten Resistenzgene zusammenfassend dargestellt. Das *van*A-Gen konnte bei insgesamt 203 Isolaten (127 *E. faecium*, 31 *E. faecalis*, 34 *E. durans*, 10 *E. hirae* und ein *E. gallinarum*) aus 50 (43,4%) Geflügelfleischproben nachgewiesen werden. Davon wurden aus 14 Proben gleichzeitig *van*A- <u>und van</u>C-positive VRE isoliert.

Untergliedert man diese Daten nach einzelnen Herkunftsländern, so zeigt sich, dass jeweils aus deutscher, niederländischer und französischer Produktion stammenden Geflügelfleischproben *van*A-positive VRE isoliert werden konnten.

Die prozentuale Verteilung des VRE- Vorkommens in den aus Deutschland stammenden Geflügelfleischproben ist in der <u>Abbildung 11</u> wiedergegeben. Aus 36,1% (n=22) der 61 untersuchten deutschen Geflügelfleischproben wurden *van*A-positive "high level"-VRE isoliert.

Die Vergleichsdaten ergeben sich für die 43 niederländischen Proben aus der <u>Abbildung 12</u>. Bei diesen Proben konnten zu 44,2% (n=19) *van*A-positive "high level"-VRE isoliert werden.

Abbildung 13 veranschaulicht, dass der Anteil *van*A-positiver "high level"-VRE bei den 10 Proben aus Frankreich bei 90,0% (n=9) liegt.

Insgesamt konnten aus 28,7% der Geflügel- (n=33) und 10% der Schweinefleischproben (n=5) *van*C-positive VRE nachgewiesen werden. *Van*C-positive VRE konnten in 32,6% (n=14) der untersuchten niederländischen Geflügelfleischproben im Vergleich zu 31,1% (n=19) der Geflügelfleischproben aus Deutschland isoliert werden.

Das *van*C1-Gen konnte bei 39 *E. gallinarum*-Isolaten aus 24 (20,9%) Geflügelfleischproben und einer Schweinefleischprobe (2,0%) nachgewiesen werden. Dabei erwies sich ein *E. gallinarum*-Stamm aus einer deutschen Probe als *van*A- <u>und</u> gleichzeitig *van*C1-Gen-positiv. Auffällig erscheint, dass dieses Gen zu ähnlich großen Anteilen (ca. 23%) in deutschen (n=14) als auch in niederländischen Proben (n=10) nachweisbar war.

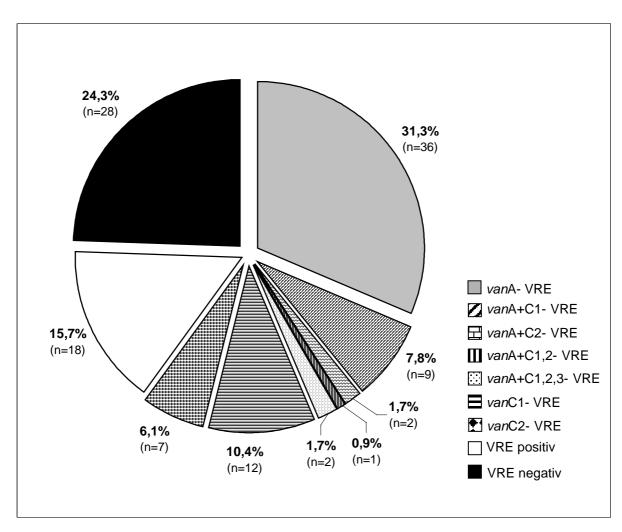


Abb. 10: Prozentuale Verteilung des Vorkommens Vancomycin-resistenter Enterokokken aus 115 untersuchten Geflügelfleischproben (Gesamtübersicht)

vanA-VRE: Proben mit Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE), nur vanA-Gen-positiv

vanA+C1-VRE:Proben mit VRE, vanA- und vanC1-Gen-positivvanA+C2-VRE:Proben mit VRE, vanA- und vanC2-Gen-positiv

vanA+C1,2-VRE: Proben mit VRE, vanA-, vanC1 und vanC2-Gen-positiv

vanA+C1,2,3-VRE: Proben mit VRE, vanA-, vanC1-, vanC2 und vanC3-Gen-positiv

vanC1-VRE:Proben mit VRE, nur vanC1-Gen-positivvanC2-VRE:Proben mit VRE, nur vanC2-Gen-positiv

vanC2+3-VRE: Proben mit VRE, nur vanC2-und vanC3-Gen-positiv

VRE positiv: Proben mit VRE, Wachstum auf Columbia CNA-Agar, supplementiert mit

5mg Vancomycin/L, kein bekanntes Van-Gen nachweisbar

VRE negativ: Proben ohne VRE

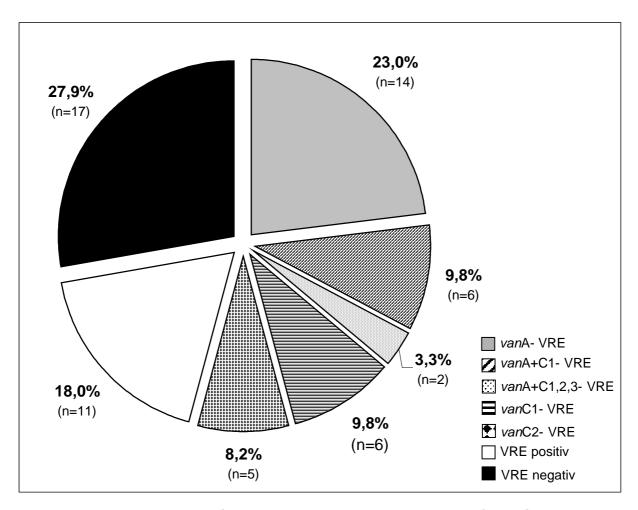


Abb. 11: Prozentuale Verteilung des Vorkommens Vancomycin-resistenter Enterokokken aus 61 Geflügelfleischproben deutscher Herkunft

Legende: siehe Abb. 10

Das *van*C2-Gen konnte bei einem *E. flavescens*- und 22 *E. casseliflavus*-Isolaten aus 12 (10,4%) Geflügelfleischproben und vier (8,0%) Schweinefleischproben nachgewiesen werden. Auch hier ist die prozentuale Verteilung mit 11,5% (n=7) bei den deutschen Proben ähnlich wie beim niederländischen Geflügel mit 11,6% (n=5).

Das *van*C3-Gen konnte bei einem *E. flavescens*- und acht *E. casseliflavus*-Isolaten aus zwei (3,3%) deutschen Geflügelfleischproben und drei (6,0%) Schweinefleischproben, aber weder aus niederländischen noch aus französischen Proben nachgewiesen werden. Dabei erwiesen sich ein *E. flavescens*- und acht *E. casseliflavus*-Isolate als *van*C2- und *van*C3-Gen-positiv.

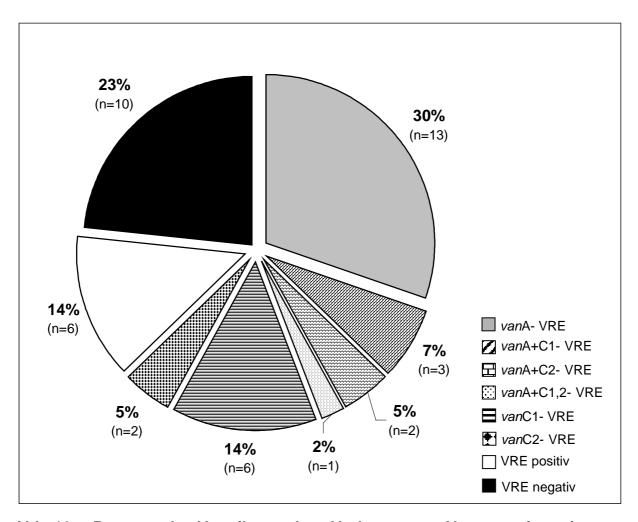


Abb. 12: Prozentuale Verteilung des Vorkommens Vancomycin-resistenter Enterokokken aus 43 Geflügelfleischproben niederländischer Herkunft

Legende: siehe Abb. 10

Aus sämtlichen französischen Geflügelfleischproben (n= 10) konnten VRE isoliert werden. Dabei wurden in 90% der Proben (n= 9) *van*A-positive und in keiner Probe *van*C-positive VRE nachgewiesen.

Aus der einzigen ungarischen Geflügelfleischprobe konnten zwar VRE-isoliert werden, sie besaßen aber weder das *van*A-, noch das *van*B- oder das *van*C -Gen.

In <u>Abbildung 14</u> werden die Daten für die 50 aus deutscher Produktion stammenden Schweinefleischproben dargestellt. In keinem Fall konnte das *van*A-Gen detektiert werden.

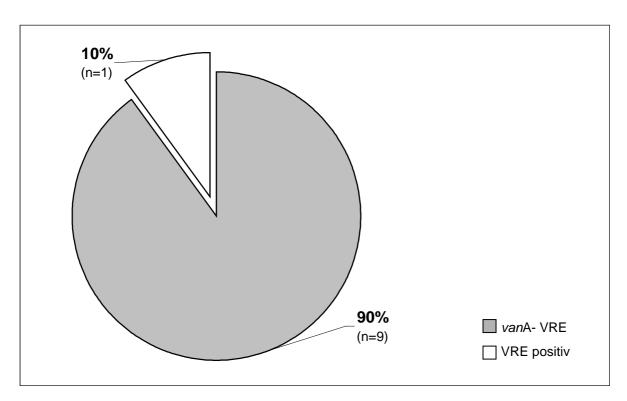


Abb. 13: Prozentuale Verteilung des Vorkommens Vancomycin-resistenter Enterokokken aus 10 Geflügelfleischproben französischer Herkunft

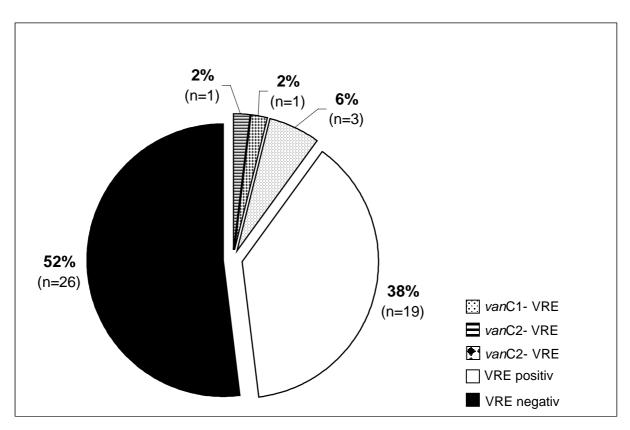


Abb. 14: Prozentuale Verteilung des Vorkommens Vancomycin-resistenter Enterokokken aus 50 Schweinefleischproben deutscher Herkunft

Die Einzeldaten zu den Enterokokken aus sämtlichen Geflügelfleischproben sind in Anhangstabelle 17 aufgeführt. In der Anhangstabelle 18 wird das Vorkommen von Vancomycin-resistenten Enterokokken in Geflügelfleischproben unterschiedlicher Hersteller wiedergegeben.

Dabei ist auffällig, dass das *van*A-Gen bei Enterokokken-Stämmen in Erzeugnissen von allen acht einbezogenen Herstellern regelmäßig nachgewiesen werden konnte. Mit 59,2% (n=27) der Proben fiel der Hersteller A in diesem Zusammenhang besonders auf. Immerhin wurde dieses Gen auch bei Stämmen aus 22,2% (n=36) der Proben des Herstellers H nachgewiesen.

In den <u>Tabellen 39</u> und <u>40</u> sind diese Ergebnisse nach Art der Geflügelfleischprobe aufgeschlüsselt. <u>Tabelle 39</u> gibt das Vorkommen von VRE bezogen auf die Probenart wider, in der <u>Tabelle 40</u> ist eine differenzierte Auflistung der nachgewiesenen Resistenz-Gene bei den jeweiligen Isolaten einer Probenkategorie enthalten. Das *van*A-Gen konnte beispielsweise in 20% der Hähnchen-Proben (Hähnchen, Brathähnchen, Stubenküken, Poularde und Suppenhuhn, n=30), 34,8% der "weiteren Geflügel-Teilstücke" (Hähnchenbeine, -flügel, -keulen, -schenkel; n=46) und 33,3% der Geflügel-Innereien (Hähnchenherzen, -leber, -mägen, Hühnerklein; n=30) nachgewiesen werden.

In den <u>Tabellen 41</u> und <u>42</u> sind die Ergebnisse für Schweinefleischproben gleichermaßen differenziert aufgeschlüsselt. <u>Tabelle 41</u> gibt das Vorkommen von VRE bezogen auf die Probenart wieder, in der <u>Tabelle 42</u> ist die Auflistung der nachgewiesenen Resistenz-Gene bei den jeweiligen Isolaten enthalten. Beispielsweise wurde das *van*C1-Gen in 4,2% der Bratwurst-Proben (Grobe Bratwurst, Nürnberger Bratwurst und Thüringer Rostbratwurst; n=24), aber in keiner Hackfleischprobe (Schweinehackfleisch, Schweinemett und Thüringer Schweinemett; n=24) nachgewiesen.

Tabelle 39: Vorkommen von Vancomycin-resistenten Enterokokken in Geflügelfleischproben

	Probenart					Anzahl (%) ^a				
30 (26.1) 19 (63.3) 6 (20.0) 1 (3.3) VRE³ VRE³		Proben	VRE-	vanA-	vanA+C1-	vanA+C2-		vanA+C1,2,3-	vanC1-	vanC2-
30 (26,1)19 (63,3)6 (20,0)1 (3,3)0 (0,0)2 (6,7)1 (3,6)4 (3,5)4 (100,0)1 (25,0)2 (40,0)2 (40,0)1 (20,0)1 (20,0)30 (26,1)40 (87,0)16 (34,8)6 (13,0)0 (0,0)1 (2,2)0 (0,0)10 (21,7)30 (26,1)19 (21,8)12 (33,3)0 (0,0)2 (100,0)1 (0,9)2 (1,7)12 (10,4)			Pos.1	VRE ²	VRE^3	VRE^4	VRE^5	VRE^6	VRE ⁷	VRE
4 (3,5)4 (100,0)1 (25,0)2 (40,0)2 (40,0)0 (0,0)1 (20,0)Licke ^c 46 (40,0)40 (87,0)16 (34,8)6 (13,0)0 (0,0)1 (2,2)0 (0,0)10 (21,7)30 (26,1)19 (21,8)12 (33,3)0 (0,0)2 (100,0)2 (1,7)1 (0,9)2 (1,7)12 (10,4)	Hähnchen ^b	30 (26,1)	19 (63,3)	6 (20,0)	1 (3,3)	0	(0,0)	2 (6,7)	1 (3	(3)
5 (4,3) 5 (100,0) 1 (20,0) 2 (40,0) 0 (0,0) 0 (0,0) 1 (20,0) 1 (20,0) \mathbf{u} (40,0) 40 (87,0) 16 (34,8) 6 (13,0) 0 (0,0) 1 (2,2) 0 (0,0) 10 (21,7) 30 (26,1) 19 (21,8) 12 (33,3) 0 (0,0) 2 (100,0) 2 (1,7) 1 (0,9) 2 (1,7) 12 (10,4)	Hbrust	4 (3,5)	4 (100,0)	1 (25,0)			0 (0,0)			2 (50,0)
46 (40,0) 40 (87,0) 16 (34,8) 6 (13,0) 0 (0,0) 1 (2,2) 0 (0,0) 10 (21,7) 30 (26,1) 19 (21,8) 12 (33,3) 0 (0,0) 2 (100,0) 0 (0,0) 0 (0,0) 115 (100,0) 87 (76,7) 36 (31,3) 9 (7,8) 2 (1,7) 1 (0,9) 2 (1,7) 1 (0,4)	Hbrustfilets	5 (4,3)	5 (100,0)	1 (20,0)	2 (40,0)		0 (0,0)		1 (20,0)	0 (0,0)
30 (26,1) 19 (21,8) 12 (33,3) 0 (0,0) 2 (100,0) 2 (100,0) 0 (0,0) 115 (100,0) 87 (76,7) 36 (31,3) 9 (7,8) 2 (1,7) 1 (0,9) 2 (1,7) 12 (10,4)	weitere Teilstücke ^c	46 (40,0)	40 (87,0)	16 (34,8)	6 (13,0)	0 (0,0)	1 (2,2)	0 (0,0)	10 (21,7)	
115 (100,0) 87 (76,7) 36 (31,3) 9 (7,8) 2 (1,7) 1 (0,9) 2 (1,7) 12 (10,4)	Innereien ^d	30 (26,1)	19 (21,8)	12 (33,3)	0 (0,0)	2 (100,0)		0 (0,0)		3 (42,9)
	Insgesamt	115 (100,0)	87 (76,7)	ന	9 (7,8)	2 (1,7)	1 (0,9)	2 (1,7)	12 (10,4)	7 (6,1)

Prozentualer Anteil an den gesamten untersuchten Probenarten (Geflügel); ^bHähnchen, Brathähnchen, Stubenküken, Poularde und Suppenhuhn;

^cHähnchenbeine, -flügel, -keulen, -schenkel; ^dHähnchenherzen, -leber, -mägen, Hühnerklein; 93

Wachstum auf Columbia CNA-Agar, supplementiert mit 5mg Vancomycin/L (vanA- und vanC1-Gen-positiv)
(vanA- und vanC2-Gen-positiv)
(vanA-, vanC1 und vanC2-Gen-positiv)
(vanA-, vanC1- vanC2- und vanC3-Gen-positiv) (nur vanA-Gen-positiv) ¹ Proben mit Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE):

(nur vanC1-Gen-positiv)

In keiner Probe konnte das van B-Gen oder gleichzeitig das van C2- und das van C3-Gen nach gewiesen werden

Tabelle 40: Resistenz-Gen-Profil von Enterokokken aus Geflügelfleisch

Probenart				Anzahl (%) ^a	_a_		
	Isolate	VRE-Pos.1	vanA-VRE ²	vanA-+C1-VRE ³	vanC1-VRE⁴	vanC2-VRE ⁵	vanC2+C3-VRE ⁶
Hähnchen ^b	300 (15,7)	66 (22,0)	27 (9,0)	1 (0,3)	5 (1,7)	2 (0,7)	2 (0,7)
Hähnchenbrust	40 (2,1)	8 (20,0)	2 (5,0)	0 (0,0)	(0	2 (5,0)	0(0,0)
Hähnchenbrustfilets	50 (2,6)	18 (36,0)	12 (24,0)	0 (0,0)	4 (8,0)	0	0 (0,0)
weitere Teilstücke ^c	460 (24,1)	163 (27,8)	87 (18,9)	0 (0,0)	23 (5,0)	2 (0,4)	0 (0,0)
Innereien ^d	300 (15,7)	103 (34,3)	74 (24,7)	0 (0,0)	1 (0,3)	7 (2,3)	0 (0,0)
Insgesamt	1150 (100,0)	358 (31,1)	202 (17,6)	1 (0,1)	33 (2,9)	13 (15,7)	2 (0,2)

^aProzentualer Anteil an den Enterokokken, isoliert aus den jeweiligen Probenarten (Geflügel); ^bHähnchen, Brathähnchen, Stubenküken, Poularde und Suppenhuhn; ^cHähnchenbeine, -flügel, -keulen, -schenkel; ^dHähnchenherzen, -leber, -mägen, Hühnerklein;

1 Vancomycin-resistente Enterokokken (Wachstum auf Columbia CNA-Agar, supplementiert mit 5mg Vancomycin/L) (vanA- und vanC1-Gen-positiv) (nur vanC1-Gen-positiv) (nur vanC2-Gen-positiv) (nur vanA-Gen-positiv)

vanC2- und vanC3-Gen-positiv)

In keinem Isolat konnte das van B-Gen nachgewiesen werden

Tabelle 41: Vorkommen von Vancomycin-resistenten Enterokokken in Schweinefleischproben

Probenart			Anzahl (%)		
	VRE-pos.1	vanC1-VRE ²	vanC2-VRE ³	vanC2+3-VRE ⁴	Gesamt
Bratwurst*	12 (50,0)	1 (4,2)	0 (0,0)	1 (4,2)	24 (48,0)
Hackfleisch**	12 (46,2)	0 (0,0)	1 (3,8)	2 (7,7)	26 (52,0)
Insgesamt	24 (48,0)	1 (2,0)	1 (2,0)	3 (6,0)	50 (100,0)

¹ Vancomycin-resistente Enterokokken (Wachstum auf Columbia CNA-Agar, supplementiert mit 5mg Vancomycin/L)

Tabelle 42: Resistenz-Gen-Profil von Enterokokken aus Schweinefleisch

E. spp.	Probenart			Anzahl (%)		
		Gesamt	VRE-pos. ¹	vanC1-VRE2	vanC2-VRE ³	vanC2+3-VRE ⁴
E. faecium	Bratwurst [*]	117 (49,2)	12 (27,2)		0 (0,0)	
	Hackfleisch**	121 (50,8)	12 (17,6)		0 (0,0)	
	Insgesamt	238 (48,3)	24 (10,1)		0 (0,0)	
E. faecalis	Bratwurst [*]	87 (48,4)	17 (52,0)		0 (0,0)	
	Hackfleisch**	155 (51,6)	8 (12,2)		0 (0,0)	
	Insgesamt	242 (49,1)	25 (10,3)		0 (0,0)	
E. gallinarum	Bratwurst [*]	5 (100,0)	5 (100,0)	5 (100,0)	0	(0,0)
	Hackfleisch**			0 (0,0)		
	Insgesamt	5 (1,0)	5 (100,0)	5 (100,0)	0	(0,0)
E. casseliflavus	Bratwurst [*]	1 (12,5)	1 (100,0)	0 (0	0,0)	1 (100,0)
	Hackfleisch**	7 (87,5)	7 (100,0)	0 (0,0)	1 (14,3)	6 (85,7)
	Insgesamt	8 (1,6)	8 (100,0)	0 (0,0)	1 (12,5)	7 (87,5)
Bratwurst*		240 (48,7)	35 (45,0)	5 (4,2)	0 (0,0)	1 (1,7)
Hackfleisch**		253 (51,3)	27 (18,5)	0 (0,0)	1 (0,6)	6 (3,5)
Insgesamt		493 (100,0)	62 (12,6)	5 (1,0)	1 (0,2)	7 (1,4)

^{*}Grobe Bratwurst, Nürnberger Bratwurst, Thüringer Rostbratwurst;

²VRE (nur *van*C1-Gen-positiv)

³VRE (nur *van*C2-Gen-positiv)

⁴VRE (vanC2- und vanC3-Gen-positiv)

^{**}Schweinehackfleisch, Schweinemett, Thüringer Schweinemett;

¹ Proben, in denen Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) nachgewiesen wurden (Wachstum auf Columbia CNA-Agar, supplementiert mit 5mg Vancomycin/L)
² Proben, in denen VRE nachgewiesen wurden (nur *van*C1-Gen-positiv)

⁽nur vanC2-Gen-positiv)

⁴ (vanC2- und vanC3-Gen-positiv)

<u>Tabelle 43</u> veranschaulicht die Ergebnisse der Resistenzbestimmung und der *van*-Gen-Nachweise bei den berücksichtigten humanmedizinisch-klinischen Isolaten. Das *van*A-Gen wurde in 94,1% der Isolate aus Stuhlproben Erkrankter (n=51) und in 80,0% der Stuhlproben nicht hospitalisierter Ausscheider (n=10) nachgewiesen. Es wurden nur präsumptiv Vancomycin-resistente Enterokokken in die Untersuchung einbezogen (Dissertation in Arbeit, Jörn Treustedt, Institut für Mikobiologische Diagnostik, Prof. Dr. A. Sziegoleit und PD Dr. R. Füssle).

Tabelle 43: Vancomycin-resistente Enterokokken aus humanmedizinischem Untersuchungsmaterial (Anzahl [%])

Art des Untersuchungsmaterials	Gesamt	VRE ²	vanA-VRE ³
Stuhlprobe nicht hospitalisierter Ausscheider	10 (11,4)	2 (20,0)	8 (80,0)
Proben klinischer Patienten:			
Stuhlproben	51 (58,0)	3 (5,9)	48 (94,1)
Urinproben	14 (15,9)	1 (7,1)	13 (9,3)
Varia ¹	9 (10,2)	0 (0,0)	9 (100,0)
Blutkulturen	2 (2,3)	0 (0,0)	2 (100,0)
Sputum, Bronchiallavage	2 (2,3)	0 (0,0)	2 (100,0)
Gesamt	88 (100,0)	6 (6,8)	82 (93,2)

¹ Abstriche, Katheterspitzen, Punktate, etc.

² Proben mit Vancomycin-resistenten Enterokokken, die kein *van*-Gen besitzen (Agardiffusionstest)

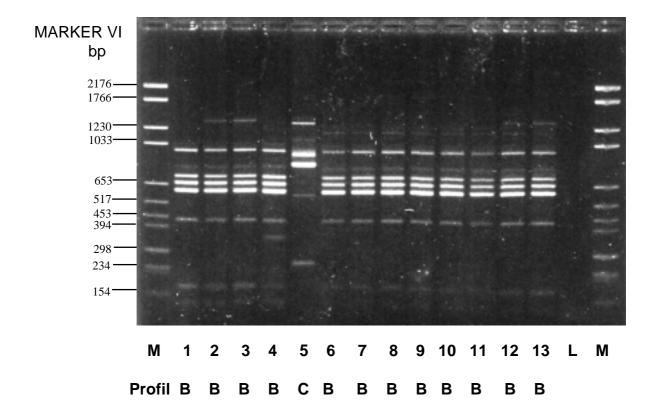
³ Proben mit Vancomycin-resistenten Enterokokken, die das *van*A-Gen besitzen

1.4.2 Randomly Amplified Polymorphic DNA Method (RAPD)

Alle Enterokokken, bei denen das *van*A-Gen nachgewiesen werden konnte, wurden mit der RAPD-Methode untersucht. Dazu konnten 203 Isolate aus Geflügelfleischproben sowie 82 Isolate humanen Ursprungs einbezogen werden. Die jeweiligen Bandenmuster konnten in zwei zeitlich voneinander abgegrenzten Durchgängen mit dem Primer "*Kay*3" reproduziert werden. Dabei konnten die Spezies *E. faecium, E. faecalis, E. durans, E. hirae, E. casseliflavus und E. gallinarum* jeweils einem typischen Bandenmuster zugeordnet werden.

Die Ergebnisse der RAPD von 11 *van*A-positiven Isolaten Erkrankter und zwei Isolaten von nicht hospitalisierten Ausscheidern sind beispielhaft in der <u>Abbildung 15</u> dargestellt. Dabei ist das RAPD-Muster von *E. faecium* ("B") durch vier Banden mit Molekulargewichten von ca. 580, 660, 720 und 1000 Basenpaaren charakterisiert, die bei *E. faecalis*-Stämmen ("C") nicht nachzuweisen waren.

Für diese Spezies erwiesen sich die beiden Banden mit Molekulargewichten von ca. 800 und 900 Basenpaaren charakteristisch. Somit ist mit der RAPD die Spezies *E. faecium* deutlich von *E. faecalis* zu unterscheiden.



1-3 und 6-13:	E. faecium,	Erkrankte, Deutschland
4:	E. faecium,	Ausscheider, Deutschland
5:	E. faecalis,	Ausscheider, Deutschland
L:	Leerwert	
M:	Marker VI	

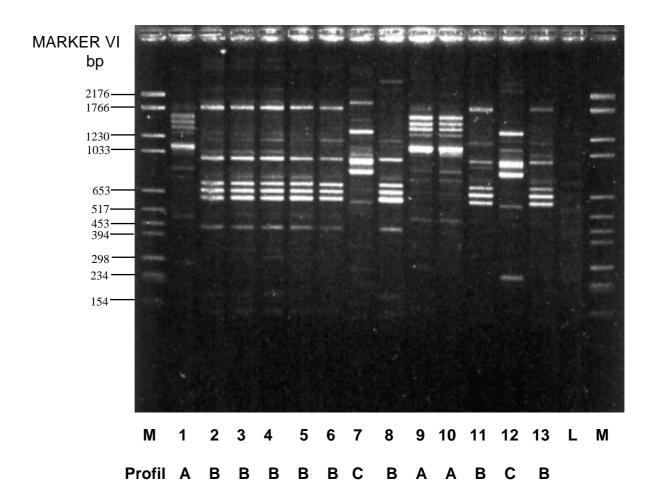
Abb. 15: RAPD-Profile ausgewählter Vancomycin-resistenter Enterokokken von Erkrankten und Ausscheidern

In der <u>Abbildung 16</u> sind die Ergebnisse der RAPD von 10 Geflügelfleisch- und drei Referenzstämmen veranschaulicht. Demnach entspricht das Bandenmuster "A" der Spezies *E. durans*, das Bandenmuster "B" *E. faecium* und das Bandenmuster "C" *E. faecalis*.

Bei dem Bandenmuster "B" für *E. faecium* sind wieder die vier charakteristischen Banden zu erkennen. Auch Bandenmuster "C" für *E. faecalis* ist identifizierbar.

Das RAPD-Muster von *E. durans* ("A") ist durch fünf Banden mit Molekulargewichten von ca. 1100, 1300, 1400, 1500 und 1600 Basenpaaren charakterisiert.

Bandenmuster "A" unterscheidet sich deutlich von "B" und "C", somit ist zumindest auszuschließen, das es sich hierbei um *E. faecium* oder *E. faecalis* handelt. Da 10 biochemisch als *E. durans* identifizierte Stämme ein von Bandenmuster "A" abweichendes Muster aufwiesen, ist nur für die vorliegenden Stämme eine Zuordnung möglich. Es werden weitergehende Untersuchungen notwendig sein, um diese Ergebnisse verifizieren zu können.



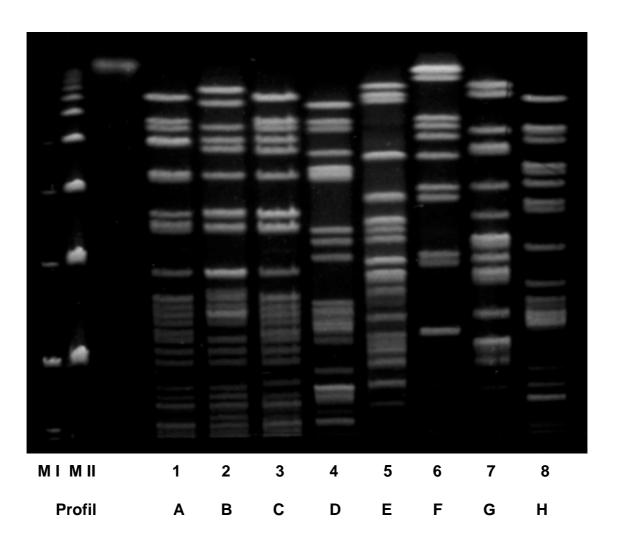
1,9,10:	E. durans,	Geflügel,	Niederlande
2-5 und 13:	E. faecium,	Geflügel,	Frankreich
6:	E. faecium,	ATCC 6057	
7:	E. faecalis,	ATCC 11700	
8:	E. faecium,	<i>van</i> B-positiv,	Deutschland
11:	E. faecium,	Geflügel,	Niederlande
12:	E. faecalis,	Geflügel,	Frankreich
L:	Leerwert		
M:	Marker VI		

Abb. 16: RAPD-Profile ausgewählter Vancomycin-resistenter Enterokokken (Geflügel, Referenzstämme)

1.4.3 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

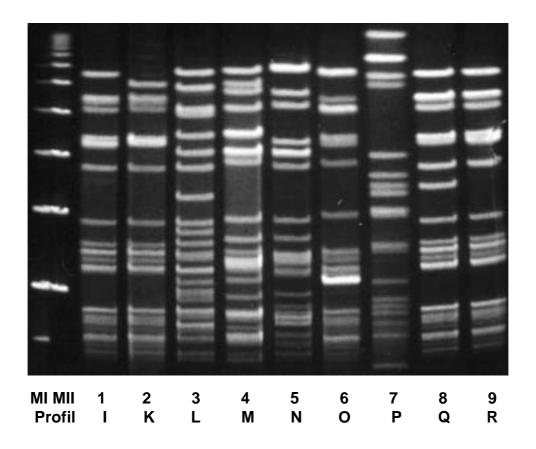
Alle Enterokokken, bei denen das *van*A-Gen nachgewiesen werden konnte, wurden weiterhin mit der PFGE unter Zuhilfenahme der Restriktionsendonuklease *Sma*l untersucht. Einige Resultate der PFGE von *van*A-positiven klinischen und Geflügelfleisch-Isolaten sind beispielhaft in der <u>Abbildung 17</u> und <u>18</u> veranschaulicht.

Die Untersuchungen mit der PFGE zeigen, dass die aus dem humanmedizinischklinischen Bereich stammenden *van*A-positiven *E. faecium*-Isolate (Profile A, B und C) von denen aus Lebensmitteln (Profile D, H, I, K, L, M, N, Q und R) deutlich abzugrenzen sind. Zudem sind die Enterokokken aus den Lebensmittelproben durch eine beachtliche genotypische Heterogenität gekennzeichnet.



1-3:	E. faecium,	klinische Isolate,	Deutschland
4,8:	E. faecium,	Geflügel,	Deutschland
5,7:	E. hirae,	Geflügel,	Niederlande
6:	E. durans,	Geflügel,	Niederlande
МІ	Marker (0,1 - 200kb)		
MII	Marker (50 - 1000kb)		

Abb. 17: PFGE- Profile ausgewählter *van*A-resistenter Enterokokken (VRE, Teil 1)



1,2 und 8,9:	E. faecium,	Geflügel,	Frankreich
3-6:	E. faecium,	Geflügel,	Deutschland
7:	E. faecalis,	Geflügel,	Frankreich
мі	Marker (0,1 - 200kb)		
M II	Marker (50 - 1000kb)		

Abb. 18: PFGE- Profile ausgewählter *van*A-resistenter Enterokokken (VRE, Teil 2)

Mit der Auswertesoftware GelCompar 3.1 (Fa. Applied Maths) wurden die Bandenmuster der PFGE-Untersuchungen analysiert. Diese Ergebnisse sind beispielhaft als Dendrogramme in den <u>Abbildungen 19, 20</u> und <u>21</u> dokumentiert. Die Prozentangaben beschreiben den Grad der Ähnlichkeiten.

In der <u>Abbildung 19</u> sind die Bandenmuster von 29 *E.*- Isolaten aus Geflügelfleischproben mit sieben *E.*- Isolaten von nicht hospitalisierten Patienten und acht klinischen *E.*- Isolaten sowie mit einem Referenzstamm verglichen worden. Auch hier zeigt sich die genotypische Heterogenität der Enterokokken. Es ist erkennbar, dass die PFGE-Muster der Geflügel-Isolate "112s4" und "128s1" untereinander zu 87% übereinstimmen. Im Vergleich zu dem klinischen Isolat "ST2350" und dem Referenzstamm ATCC 6057, die ebenfalls untereinander eine Übereinstimmung von 87% aufweisen, ist nur eine 78%ige Übereinstimmung zwischen diesen *Smal*-Restriktionsmustern zu erkennen (Geflügel- und klinisches Isolat). Eine völlige Übereinstimmung der Muster ist bei den aus Geflügelfleisch isolierten *Enterococcus faecium*-Stämmen ist lediglich bei "127m3" und "133m13", "129m3" und "135m3" sowie "101m1" und "103m1" gegeben.

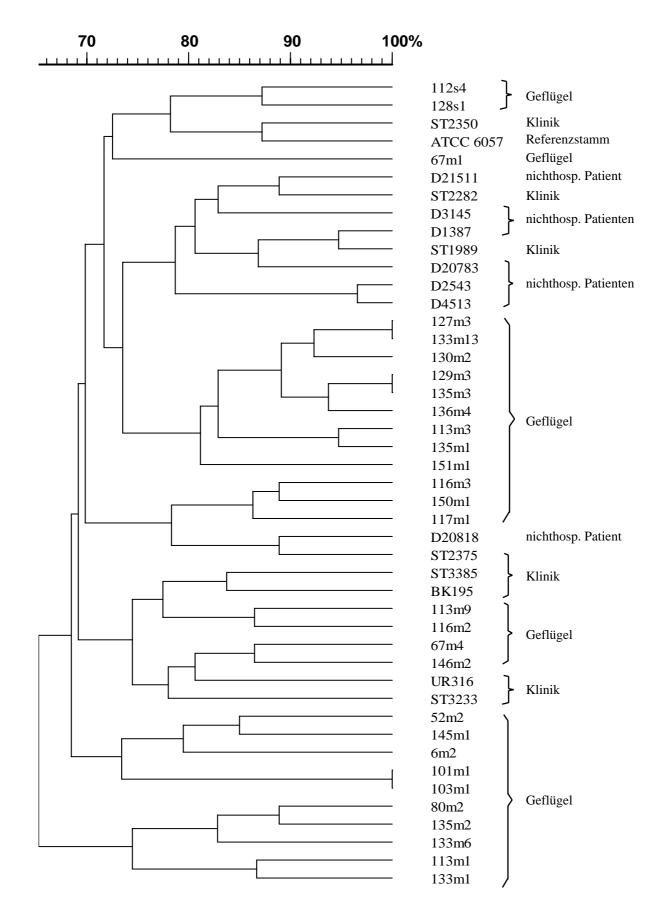


Abbildung 19: Dendrogramm verschiedener *E. faecium*-Isolate unterschiedlichen Ursprungs

105 Ergebnisse

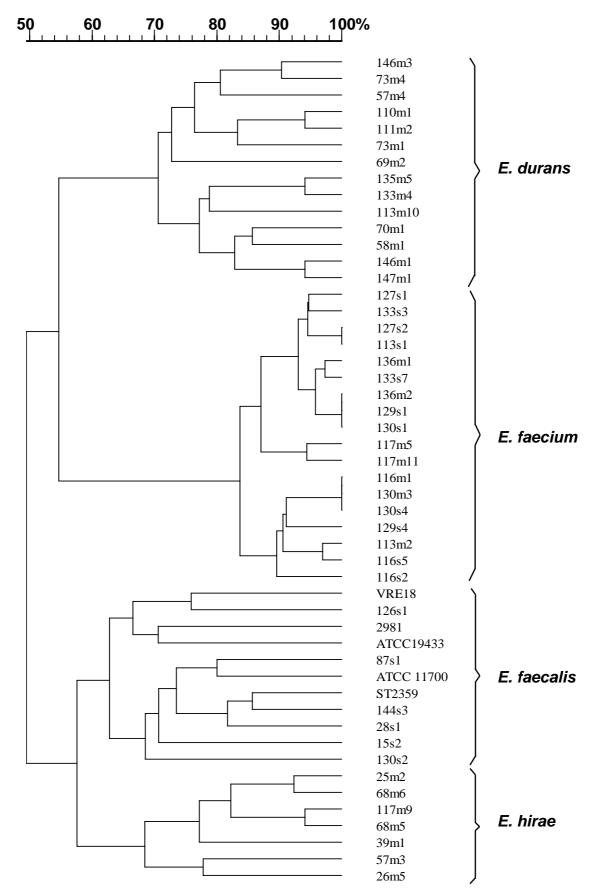


Abb. 20: Dendrogramm verschiedener *van*A-Gen-positiver *E. faecium*-, *E. faecalis*-, *E. durans- und E. hirae*-Isolate unterschiedlichen Ursprungs

In <u>Abbildung 20</u> ist ein Dendrogramm verschiedener *van*A-Gen-positiver *E. faecium*-, *E. faecalis*-, *E. durans- und E. hirae*-Isolaten unterschiedlichen Ursprungs (Geflügelfleisch) beispielhaft dargestellt. Es ist also möglich, anhand der Bandenmuster die Ergebnisse der biochemischen und der RAPD- *intra-speciem*-Untersuchungen zu bestätigen.

Die Gruppe der *E. faecium*-Isolate haben mit der *E. durans*-Gruppe eine 54%ige, die Gruppe der *E. faecalis*-Isolate haben mit der *E. hirae*-Gruppe eine 58%ige Übereinstimmung der Bandenmuster. Untereinander sind die Muster zu 48% übereinstimmend.

In <u>Abbildung 21</u> ist ein Dendrogramm von ausgesuchten *E. faecalis*-Isolaten eines nicht-hospitalisierten Patienten und Geflügelfleischproben dargestellt. Dabei fällt auf, dass die Muster der Stämme "112s1" (Geflügelfleisch) und "D1392" (nicht hospitalisierter Patient) zu 80% übereinstimmen.

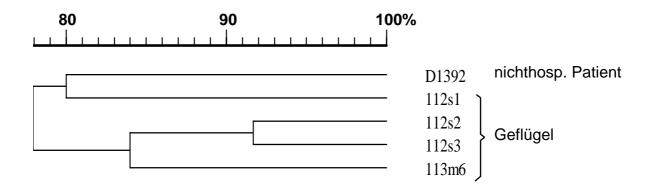


Abbildung 21: Dendrogramm ausgesuchter *E. faecalis*-Isolate von einem nichthospitalisierten Patienten und Geflügelfleischproben

1.5 Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration

Gemäß einer Empfehlung des National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS 1997) sind Isolate mit einer minimalen Hemmkonzentration (MHK) bei Vancomycin und Teicoplanin bis 2µg/ml als "sensibel", Isolate mit einer MHK zwischen 4 und 8µg/ml als "intermediär empfindlich" und Isolate mit einer MHK von >16µg/ml als "resistent" einzustufen.

Die minimalen Hemmkonzentrationen bei den aus Geflügel- und Schweinefleisch isolierten Enterokokken sind für Vancomycin in der <u>Tabelle 44</u> dargestellt.

Die entsprechenden Daten sind für Vancomycin in der <u>Abbildung 22</u> (VRE-positive Isolate), <u>Abbildung 23</u> (*van*A-positive VRE), <u>Abbildung 24</u> (*van*C-positive VRE) und <u>Abbildung 25</u> (VRE insgesamt) veranschaulicht.

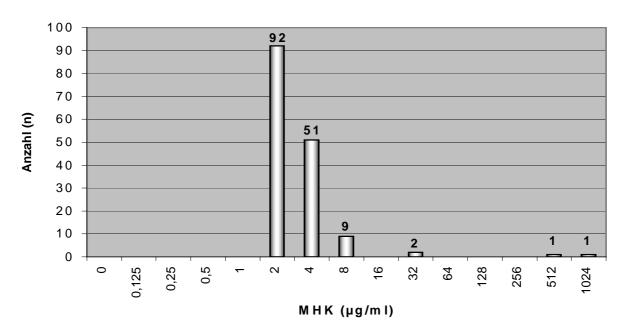


Abb. 22: Minimale Hemmkonzentration (MHK) in μg/ml der 156 aus Geflügel- und Schweinefleisch isolierten VRE^{*} (Vancomycin)

^{*}Vancomycin-resistente Enterokokken (Wachstum auf Columbia CNA-Agar, supplementiert mit 5mg Vancomycin/L, kein bekanntes Van-Gen nachweisbar).

Tabelle 44: Minimale Hemmkonzentration in µg/ml der aus Geflügel- und Schweinefleisch isolierten Enterokokken (Vancomycin)

Isolate						An	Anzahl (%)					
	0-1	2	4	8	16	32	64	128	526	512	1024	Gesamt
VRE-pos.1	0 (0,0)	0 (0,0) 92 (59,0) 51 (32,7) 9 (5,8)	51 (32,7)	9 (5,8)	0 (0,0)	0 (0,0) 2 (1,3)		0 (0,0)		1 (0,6)	1 (0,6)	156 (37,1)
vanA-VRE ²				0 (0,0)				3 (1,5)	3 (1,5) 24 (11,9) 91 (45,0) 84 (41,6)	91 (45,0)	84 (41,6)	202 (48,1)
vanA+C1-VRE ³					0 (0,0)					1 (100,0)	1 (100,0) 0 (0,0)	1 (0,1)
vanC1-VRE⁴	0 (0,0)	0 (0,0) 4 (10,5) 15 (39,5) 19 (50,0)	15 (39,5)	19 (50,0)				0 (0,0)				38 (9,0)
vanC2-VRE⁵	0 (0,0)	0 (0,0) 9 (64,3)	4 (28,6)	1 (7,1)				0 (0,0)				14 (3,3)
vanC2,3-VRE ⁶	0 (0,0)	0 (0,0) 4 (44,4) 5 (55,6)	5 (55,6)									9 (2,1)
Insgesamt	0 (0,0)	0 (0,0) 109 (26,0) 75 (17,9) 29 (6,9)	75 (17,9)	29 (6,9)	0 (0,0) 2 (0,5)	2 (0,5)	0 (0,0)	3 (0,7)	24 (5,7)	93 (22,1)	85 (20,2)	0 (0,0) 3 (0,7) 24 (5,7) 93 (22,1) 85 (20,2) 420 (100,0)

¹ Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE, Wachstum auf Columbia CNA-Agar, supplementiert mit 5mg Vancomycin/L)
² VRE, nur *vanA*-Gen-positiv
³ VRE, *vanA*- <u>und</u> *vanC*1-Gen-positiv
⁴ VRE, nur *vanC*1-Gen-positiv
⁵ VRE, nur *vanC*2-Gen-positiv
⁶ VRE, nur *vanC*2-Gen-positiv

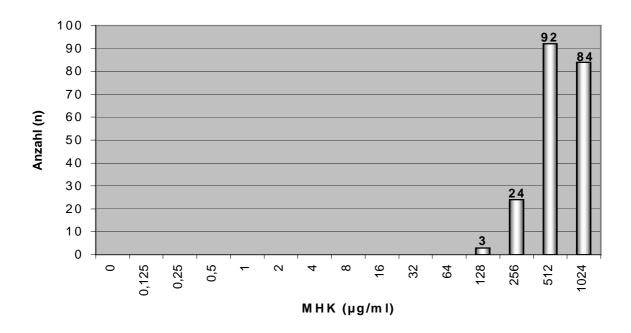


Abb. 23: Minimale Hemmkonzentration (MHK) in μg/ml der 203 aus Geflügelfleisch isolierten *van*A-positiven Enterokokken^{*} (Vancomycin)

In <u>Abbildung 22</u> sind die MHK-Werte für Vancomycin für die 156 aus Geflügel- und Schweinefleisch isolierten VRE dargestellt. Bei insgesamt 156 Enterokokken war keines der untersuchten *van*-Gene nachweisbar. Die MHK lag bei Vancomycin zwischen 2 und 1024µg/ml.

In <u>Abbildung 23</u> wird die MHK-Verteilung der 203 ausschließlich aus Geflügelfleisch isolierten *van*A-positiven Enterokokken für Vancomycin dokumentiert.

Bei den Untersuchungen war auffällig, dass ein *E. faecium*-Isolat einer Stuhlprobe einer nicht hospitalisierten Person und zwei *E. faecium*- Isolate aus Schweinefleisch zwar jeweils "high-level" Vancomycin- und Teicoplanin-Resistenzen (Abbildung 27) aufwiesen, bei denen aber weder das *van*A- noch ein anderes geprüftes *van*-Gen nachgewiesen werden konnte.

^{*}Vancomycin-resistente Enterokokken (nur *van*A-Gen-positiv), inklusive eines *E. gallinarum*-Isolates (*van*A+*van*C1-positiv).

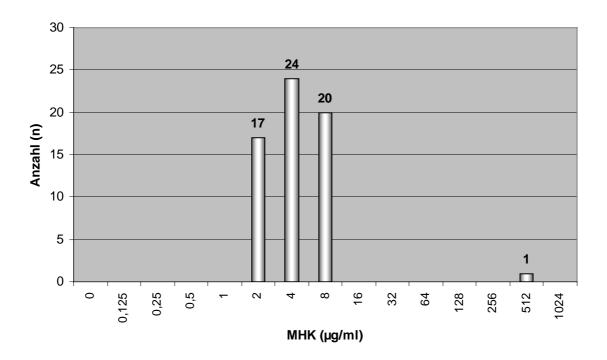


Abb. 24: Minimale Hemmkonzentration (MHK) in μg/ml der 62 aus Geflügel- und Schweinefleisch isolierten *van*C-positiven VRE^{*} (Vancomycin)

Die MHK aller *van*A-positiven Enterokokken lag bei Vancomycin zwischen 128 und 1024µg/ml und bei Teicoplanin zwischen 16 und 1024µg/ml.

In <u>Abbildung 24</u> wird die MHK-Verteilung der 62 aus Geflügel- und Schweinefleisch isolierten *van*C-positiven Enterokokken für Vancomycin dargestellt. Die *van*C-positiven Enterokokken wiesen bei Vancomycin einen MHK-Bereich von 2-8 μg/ml auf. Wie vorher erwähnt, wurde bei einem *E. gallinarum*- Isolat (MHK_{Vancomycin}: 512μg/ml, MHK_{Teicoplanin}: 64μg/ml) gleichzeitig das *van*A- sowie das *van*C1-Gen nachgewiesen.

^{*}Vancomycin-resistente Enterokokken (nur *van*C-Gen-positiv), inklusive eines *E. gallinarum*-Isolates (*van*A+*van*C1-positiv)

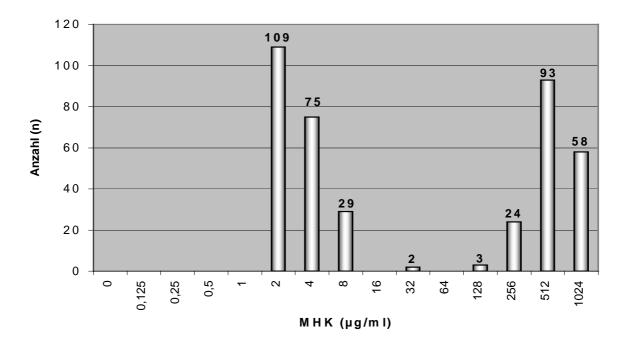


Abb. 25: Minimale Hemmkonzentration (MHK) in μg/ml von 420 aus Geflügelund Schweinefleisch isolierten VRE^{*} (Vancomycin)

Die <u>Abbildung 25</u> bietet eine zusammenfassende Übersicht über die MHK-Verteilung aller aus Geflügel- und Schweinefleisch isolierten VRE für Vancomycin. Es ist zu erkennen, dass sich jeweils ein Peak zwischen den MHK-Bereichen von 2-8 (213 VRE-Stämme) und 256-1024 μg/ml (175 VRE-Stämme) befindet.

^{*} Vancomycin-resistente Enterokokken (Wachstum auf Columbia CNA-Agar, supplementiert mit 5mg Vancomycin/L)

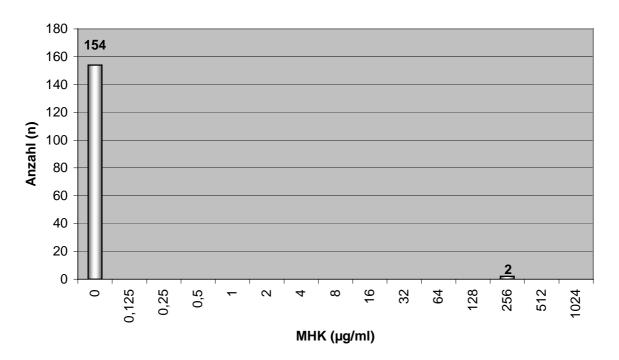


Abb. 26: Minimale Hemmkonzentration (MHK) in μg/ml der 156 aus Geflügelund Schweinefleisch isolierten VRE* Enterokokken* (Teicoplanin)

Die minimalen Hemmkonzentrationen bei den aus Geflügel- und Schweinefleisch isolierten Enterokokken sind für Teicoplanin in der <u>Tabelle 45</u> dargestellt.

Des weiteren sind die entsprechenden Daten für Teicoplanin in der <u>Abbildung 26</u> VRE-positive Isolate), <u>Abbildung 27</u> (*van*A-positive VRE), <u>Abbildung 28</u> (*van*C-positive VRE) und <u>Abbildung 29</u> (VRE insgesamt) präsentiert.

In <u>Abbildung 26</u> ist zu erkennen, dass 154 VRE eine Teicoplanin- MHK von 0µg/ml und 2 VRE eine MHK von 256µg/ml aufweisen. Die beiden "high-level"- Teicoplaninresistenten Isolate waren ebenfalls "high-level"- Vancomycin- resistent. Diese Isolate tragen weder das *van*A- noch das *van*B- oder das *van*C- Gen.

^{*} Vancomycin-resistente Enterokokken (Wachstum auf Columbia CNA-Agar, supplementiert mit 5mg Vancomycin/L, kein bekanntes Van-Gen nachweisbar).

Tabelle 45: Minimale Hemmkonzentration in µg/ml der aus Geflügel -und Schweinefleisch isolierten Enterokokken (Teicoplanin)

											Anzahl (%)					
Isolate	0	0,125	92,0	9 '0	l l	7	8	91	01	32	79	128	526	212	1024	Gesamt
VRE-pos.1	154 (98,7)							•	0 (0,0)				2 (1,3)	0) 0	0 (0,0)	156 (37,1)
vanA-VRE ²			0 (0,0)	<u>(</u>				6 (3	(0,	5 (2,5)	6 (3,0) 5 (2,5) 31 (15,3)	42 (20,8)	39 (19,3)	39 (19,3) 53 (26,2) 26 (12,9)	26 (12,9)	202 (48,1)
vanA+C1-VRE ³				3	0 (0,0)	<u> </u>					1 (100,0)		0 (0,0)	(0,		1 (0,1)
vanC1-VRE⁴	38 (100,0)										0 (0,0)					38 (9,0)
vanC2-VRE⁵	14 (100,0)										0 (0,0)					14 (3,3)
vanC2,3-VRE ⁶	9 (100,0)										0 (0,0)					9 (2,1)
Insgesamt	215 (51,2)			0 (0 (0,0)			6 (1	,4)	5 (1,2)	32 (7,6)	6 (1,4) 5 (1,2) 32 (7,6) 42 (10,0) 41 (9,8)	41 (9,8)	53 (12,6)	26 (6,2)	53 (12,6) 26 (6,2) 420 (100,0)

¹ Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE, Wachstum auf Columbia CNA-Agar, supplementiert mit 5mg Vancomycin/L)
² VRE, nur *van*A-Gen-positiv
³ VRE, *van*A- <u>und</u> *van*C1-Gen-positiv
⁴ VRE, nur *van*C1-Gen-positiv
⁵ VRE, nur *van*C2-Gen-positiv
⁶ VRE, nur *van*C2-Gen-positiv

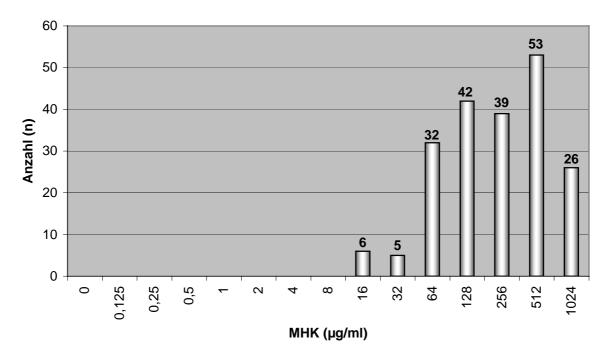


Abb. 27: Minimale Hemmkonzentration (MHK) in μg/ml der 203 aus Geflügelfleisch isolierten *van*A-positiven Enterokokken^{*} (Teicoplanin)

^{*} Vancomycin-resistente Enterokokken (nur *van*A-Gen-positiv), inklusive eines *E. gallinarum*-Isolates (*van*A+*van*C1-positiv).

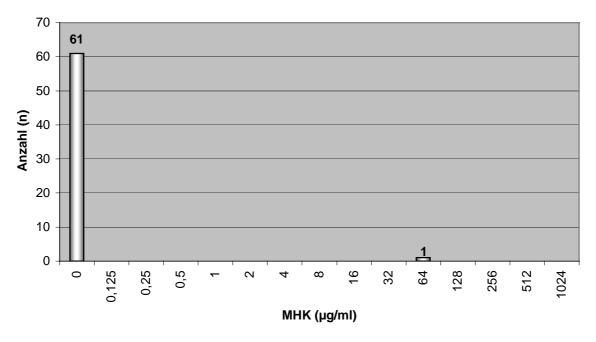


Abb. 28: Minimale Hemmkonzentration (MHK) in μg/ml der 62 aus Geflügel- und Schweinefleisch isolierten *van*C-positiven VRE^{*} (Teicoplanin)

^{*}Vancomycin-resistente Enterokokken (nur *van*C-Gen-positiv), inklusive eines *E. gallinarum*-Isolates (*van*A+*van*C1-positiv)

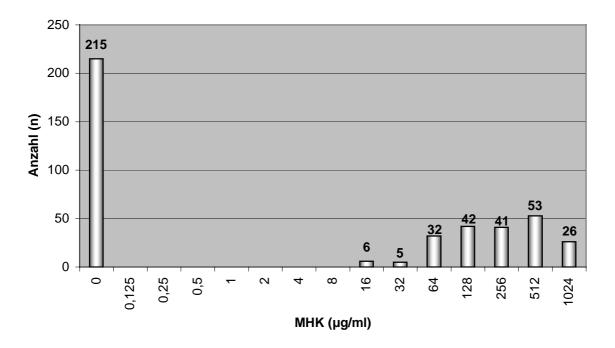


Abb. 29: Minimale Hemmkonzentration (MHK) in μg/ml der gesamten 420 aus Geflügel- und Schweinefleisch isolierten VRE^{*} (Teicoplanin)

In <u>Abbildung 27</u> wird die Aussage anderer Untersucher bestätigt, dass *van*A-positive VRE eine Teicoplanin-MHK von mindestens 16µg/ml aufweisen.

<u>Tabelle 46</u> gibt die Ergebnisse der Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) von Enterokokken menschlichen Ursprungs wider.

Tabelle 46: Ergebnisse der Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) von Enterokokken menschlichen Ursprungs

Resistenzeigenschaft	MH	łK³
Resistenzeigenschaft	Vancomycin	Teicoplanin
VRE ¹	1-512	0,25-512
vanA-VRE ²	64-1024	4-1024

¹Vancomycin-resistente Enterokokken, die kein Van-Gen besitzen (*van*A, *van*B, *van*C, *van*D, *van*E)

^{*} Vancomycin-resistente Enterokokken (Wachstum auf Columbia CNA-Agar, supplementiert mit 5mg Vancomycin/L)

³ Vancomycin-resistente Enterokokken, die das *van*A-Gen besitzen

³ Minimale Hemmkonzentration (MHK) in µg/ml

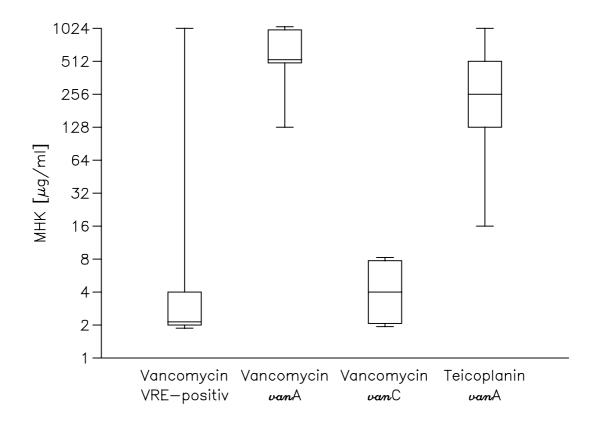


Abb. 30: Box-and-Whisker-Plot-Darstellung der Verteilung der Minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) von Vancomycin und Teicoplanin

Abbildung 30 veranschaulicht die Verteilung der Minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) von Vancomycin und Teicoplanin im Box-and-Whisker-Plot (vgl. LORENZ, 1996). Dabei ist beispielsweise in der zweiten Spalte zu erkennen, dass 50 % der vanA-positiven Isolate (Werte zwischen Q_1 und Q_3) gegenüber Vancomycin eine MHK zwischen 512 und 1.024 µg/ml aufwiesen. In der vierten Spalte zeigt sich im Vergleich dazu, dass 50 % der vanA-positiven Isolate gegenüber Teicoplanin eine MHK zwischen 128 und 512 µg/ml aufwiesen. Alle Isolate, bei denen ausschliesslich das vanC-Gen nachgewiesen wurde, wiesen gegenüber Vancomycin eine MHK zwischen 2 und 8 µg/ml auf (vgl. III. Eigene Untersuchungen, 2.3 Statistische Auswertungen, Seite 69).

V. DISKUSSION

In den eigenen Untersuchungen sollte das Vorkommen Vancomycin- resistenter Enterokokken in im Großraum Gießen angebotenem Geflügel- und Schweinefleisch von Januar
1996 bis August 1997 untersucht werden. Weiterhin sollten die isolierten Enterokokken
mithilfe der Polymerase Kettenreaktion (PCR) auf das Vorhandensein der *van*A-, *van*Bund *van*C- Resistenzgene überprüft werden. Abschließend sollten *van*A-positive Isolate
aus Lebensmitteln und von Menschen (gleicher Untersuchungszeitraum in Gießen) einer
intraspezifischen Differenzierung mithilfe der Randomly Amplified Polymorphic DNA(RAPD) und der Pulsfeldgelelektrophorese-Methode (PFGE) als DNS-Feintypisierungsverfahren unterzogen werden.

1. Nachweis von Enterokokken aus Lebensmitteln

1.1 Enterokokken- Isolierung mit dem CATC-Agar

Die vorliegende Untersuchung liefert Informationen zum Vorkommen glycopeptidresistenter Enterokokken, isoliert aus im Großraum Gießen angebotenem Geflügel- und Schweinefleisch von Januar 1996 bis August 1997.

Für die Untersuchung von Geflügel- und Schweinefleisch auf Enterokokken erwies sich der CATC-Agar als sehr gut geeignet. Die eigenen Ergebnisse von weitergehenden Differenzierungen mit einer modifizierten bunten Reihe (nach DEVRIESE et al., 1995, 1996) sowie auch mit den molekularbiologischen Feintypisierungsverfahren (RAPD, PFGE) zeigen allerdings, dass mit dieser § 35- Methode nicht nur *E. faecalis* und *E. faecium* detektiert werden können, sondern wesentlich mehr Spezies, wie z. B. *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. flavescens*, *E. gallinarum* und *E. hirae*.

Diese § 35- Methode ist ausschließlich für den – zugleich differenzierenden - Nachweis von *E. faecium* und *E. faecalis* ausgerichtet. Die eigenen Untersuchungsergebnisse belegen hingegen, dass dieses Medium möglicherweise für die Detektion aller bekannten Enterokokken (23 verschiedene Subtypen) geeignet erscheint. Andere Untersucher haben ebenfalls den CATC-Agar erfolgreich zur Untersuchung von Lebensmitteln auf Enterokokken eingesetzt (REUTER, 1992).

1.2 Enterokokken- Keimzahlen

Die Enterokokken- Keimzahlen lag bei den Schweinefleischproben zwischen 3,0x10¹ KbE/g (1,48 log KbE/g, Schweinemett) und 2,4x10³ KbE/g (3,38 log KbE/g, grobe Bratwurst) und liegen im Bereich der Literaturangaben zwischen 10² bis zu 10⁵ KbE/g (HAHN, 1984; STILES et al., 1978). Bei den Geflügelfleischproben lagen die angenäherten Werte zwischen 1,6x10⁰ KbE/cm² (0,20 log KbE/cm², Hähnchenbrustfilets) und 5,6x10² KbE/cm² (2,75 log KbE/cm², Hähnchenschenkel).

In den eigenen Untersuchungen wurde der Enterokokken- Oberflächenkeimgehalt bestimmt. In der Literatur sind lediglich Angaben für den Oberflächengesamtkeimgehalt beschrieben worden. ELLERBROEK et al. (1996) schlugen Richtwerte für Geflügelfleisch von 5,0 log KbE/g (Halshaut) für die mesotrophe Gesamtflora und 3,8 log KbE/g (Brusthaut) für *Enterobacteriaceae* vor. In den USA existieren Richtwerte für Gesamtkeimzahlen auf frischem Geflügelfleisch von 3,0-4,0 log KbE/cm² (SHAPTON et al., 1993).

1.3 Biochemische Differenzierung

In den eigenen Untersuchungen konnten 1643 *Enterococcus*-Stämme aus 115 Geflügelund 50 Schweinefleischproben isoliert werden. Dabei konnte *E. faecium* zu 47,7% (n= 784), *E. faecalis* zu 45,8% (n= 753), *E. gallinarum* zu 2,4% (n= 39), *E. durans* zu 2,1% (n= 34), *E. casseliflavus* zu 1,3% (n= 22), *E. hirae* zu 0,6% (n= 10) und *E. flavescens* zu 0,1% (n= 1) als Spezies identifiziert werden.

APPELBAUM et al. beschrieben 1984 das kommerzielle API20S-Testkit. Neben anderen Streptokokken konnte dieses Kit zur Identifizierung von *E. faecalis* und *E. faecium* herangezogen werden. 1986 beschrieben die gleichen Autoren das IDS RapID STR-System zur Identifizierung von u. a. *E. faecalis, E. faecium, E. durans, E. casseliflavus* und *E. gallinarum*. Neueste Erkenntnisse bezüglich der biochemischen Eigenschaften der Enterokokken bewogen DEVRIESE et al. 1995 und 1996 eine bunte Reihe, wie sie in der vorliegenden Arbeit Anwendung finden, mit zusätzlichen Kohlehydraten zu empfehlen. MANERO erstellte 1999 einen "biochemischen Schlüssel" für die Identifizierung von Enterokokken. Eine Münchener Arbeitsgruppe entwickelte für die Differenzierung von *E. faecalis* und *E. faecium* und gleichzeitiger Überprüfung auf Vancomycin-Resistenz die Mikrotiterplatte "FaecaDiff" (MÜTZEL-GRAMANN, 1998).

Andere Untersucher haben für die Identifizierung von *E. faecium* PCR-Methoden entwickelt (CHENG et al., 1997; MORRISON et al., 1997).

Die in dieser Arbeit untersuchten humanmedizinisch-klinischen Isolate wurden ebenfalls biochemisch differenziert. Dabei konnte *E. faecium* zu 95,5% (n= 84), *E. faecalis* zu 3,4% (n= 3) und *E. durans* zu 1,1% (n= 1) identifiziert werden.

2. Untersuchung von Enterokokken auf Glycopeptidresistenz

2.1 VRE- Selektion mit Vancomycin- supplementiertem Columbia-CNA- Agar

Für die anschließende orientierende Überprüfung der isolierten Enterokokken auf Vancomycin- Resistenz ist der Columbia CNA- Agar, supplementiert mit 5 % Schafblut und 5 mg Vancomycin/Liter als Screening– Methode sehr gut geeignet. Aufgrund der gewählten niedrigen Vancomycin- Konzentration (5mg/l, oder 5µg/ml) können auch VRE isoliert werden, die nicht nur "high- level"- Resistenz- (*van*A, *van*B, *van*D), sondern auch "lowlevel"- Resistenzgene (*van*C, *van*E, etc.) besitzen.

Andere Untersucher setzten den mit 50mg Vancomycin/I supplementierten CATC-Agar erfolgreich zur Isolierung Vancomycin-resistenter Enterokokken vom Mastgeflügel und deren Umfeld ein. (ELLERBROEK et al., 1999)

Einige Forschungsgruppen verwendeten erfolgreich den CATC-ähnlichen Enterococcosel-Agar (BUTAYE et al., 1999a, b; MELLMANN et al., 2000) oder die Kanamycin-Aesculin- Azid- (KAA)- Bouillon (BUTAYE et al., 1999a, b), jeweils ebenfalls mit Vancomycin supplementiert.

Unter den insgesamt 1643 selbst isolierten *Enterococcus*-Stämmen befanden sich 420 Stämme aus 87 Geflügel- und 24 Schweinefleischproben, die als Vancomycin-resistent identifiziert wurden. Zur Identifizierung von VRE wurden in einer Arbeit von ENDTZ et al. (1998) acht verschiedene kommerzielle Testmethoden (Agar Dilution, Plättchendiffusionstest, E-test, Agar screen, Vitek GPS-TA und GPS-101, MicroScan rapid panels) verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass die Ergebnisse der automatisierten Methoden bei den "low-level"- resistenten VRE unbefriedigend waren. *Van*A-positive VRE wurden mit allen Verfahren nachgewiesen, *van*B-positive VRE wurden mit "Vitek GPS-TA" und "MicroScan rapid panels" häufig nicht nachgewiesen, *van*C-positive VRE konnten nur mit dem "E-test" und dem "Agar screen" ermittelt werden. Ein mittlerweile kommerziell erhältlicher Agar-Nährboden mit Eskulin und Natriumazid wurde für eine verbesserte Anwendung zur Identifizierung von VRE entwickelt (Firma Heipha Diagnostica, Eppelheim, Deutschland; 1. Plattenhälfte: 9mg Vancomycin/ Liter; 2. Plattenhälfte: 6mg Teicoplanin/ Liter; VAN HORN et al., 1996).

Es wurden in den eigenen Untersuchungen bei 67,3% der untersuchten Proben (n=111) VRE nachgewiesen- in 75,7% (n=87) der Geflügelfleischproben sowie in 48,0% (n=24) Schweinefleischproben.

3. Nachweis von Vancomycin-Resistenzgenen in Enterokokken

3.1 DNA-Isolierung

Die Enterokokken-DNA ist in der vorliegenden Arbeit nach Ausubel et al. 1990 (PCR) und mit den QIAamp Tissue Kit (RAPD) isoliert worden. Beispielsweise verwendete KLARE den Ionentauscher Celex 100 Resin der Fa. BioRad Laboratories für eine schnelle und einfache Enterokokken-DNA-Isolierung (KLARE et al., 1997b).

3.2 Detektion verschiedener van-Gene mit der PCR

Mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion sollten alle präsumtiv Vancomycin-resistenten Enterokokken auf das Vorkommen von Resistenzgenen untersucht werden. Dabei stellte sich heraus, dass die PCR-Methode für die Identifizierung des "high level"-Vancomycin-Resistenz-Gens (*vanA*), aber auch der "low level"-Vancomycin-Resistenz-Gene (*vanC1*, *vanC2* und *vanC3*) in Enterokokken aufgrund der Sensitivität und Reproduzierbarkeit sehr gut geeignet ist.

3.3 Nachweis des van-A-Gens mit der PCR

Das *van*A-Gen konnte in *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. durans*, *E. hirae* und in *E. gallinarum* nachgewiesen werden. Die Untersuchungen anderer Forschungsgruppen bestätigen diese Aussage (KLARE et al., 1995a, b; DUTKA-MALEN et al., 1995; EVERS et al., 1996; PERLADA et al., 1997; LECLERCQ und COURVALIN, 1997; WEGENER et al., 1997; VAN DEN BRAAK et al., 1998; KRUSE et al., 1999; ROBREDO et al., 2000).

Das *van*A- Gen konnte bei 93,2% der in dieser Arbeit untersuchten humanmedizinisch-klinischen Isolate (n=82) nachgewiesen werden (*E. faecium:* 95,2% [n= 84], *E. faecalis:* 2,4% [n= 2]). In der Literatur wurde ebenfalls die Isolation von "high-level"-VRE aus hospitalisierten Patienten beschrieben (GUIOT et al., 1991; GORDON et al., 1992; GORDTS et al., 1995; HOEFFLER et al., 1997; HWANG et al., 1998; ELSNER et al., 2000; PESET et al., 2000; VAN DEN BRAAK et al., 1998 und 2000b). Eine Studie ergab, dass dieses Problem europaweit verbreitet ist (SCHOUTEN et al., 2000). In Kanada waren 1999 bei 26% der durch Enterokokken verursachten nosokomialen Infektionen VRE beteiligt (McKESSAR et al., 2000).

KARLOWSKI et al. (1999) isolierten von 1995 bis 1996 aus 1200 humanen Stuhlproben aus 12 kanadischen Krankenhäusern 1487 Enterokokken (601 *E. faecalis*, 675 *E. faecium*, 124 *E. gallinarum* und 77 *E. casseliflavus*). Dabei wurde bei 9 E. *faecium*-Isolaten das *van*B-Gen nachgewiesen.

1996 wurde der erste *van*A-positive *Enterococcus faecium*-Stamm in Japan von einer hospitalisierten Patientin isoliert (FUJITA et al., 1998).

3.4 Nachweis des *van*-B-Gens mit der PCR

Das *van*B-Gen konnte in keinem Fall nachgewiesen werden; somit kann zumindest die Aussage bestätigt werden, dass dieses Gen seltener vorkommt (BOYCE et al., 1994; WOODFORD et al., 1995b)

3.5 Nachweis der *van*-C-Gene mit der PCR

Das vanC1-Gen konnte bei E. gallinarum-Isolaten aus Geflügelfleisch und Schweine-fleisch nachgewiesen werden. Dabei war ein E. gallinarum-Isolat vanA- und vanC1-Genpositiv. Das vanC2-Gen konnte bei E. flavescens- und E. casseliflavus-Isolaten aus Geflügelfleisch und Schweinefleisch nachgewiesen werden. Das vanC3-Gen konnte bei einem E. flavescens- und E. casseliflavus-Isolaten aus Geflügelfleisch und Schweinefleisch nachgewiesen werden. Dabei war ein E. flavescens- und acht E. casseliflavus-Isolate vanC2- und vanC3-Gen-positiv. Andere Arbeitsgruppen bestätigen die Ergebnisse dahingehend, dass das vanC1-Gen in E. gallinarum, das vanC2- Gen in E. casseliflavus und in E. flavescens und das vanC3-Gen ebenfalls in E. casseliflavus und in E. flavescens vorkommen kann. Auch der gleichzeitige Nachweis des vanC2- und des vanC3-Gens in einem Isolat ist beschrieben worden (SATAKE et al., 1997; CLARK, et al., 1998).

3.6 Ergebnisse anderer Untersuchungsgruppen

1997 entwickelten PATEL et al. eine Multiplex-PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) zum Nachweis von vanA, vanB, vanC1, vanC2 und vanC3-Genen. Dabei werden die nach der PCR erhaltenen Amplifikate mit der Restriktionsendonuclease Mspl verdaut. Es entstehen für die verschiedenen van-Gene spezifische Fragmente und können so identifiziert werden.

Eine Australische Arbeitsgruppe untersuchte 248 Isolate humanen und tierischen Ursprungs ebenfalls mit einer Multiplex-PCR auf verschiedene *van*-Gene. Dabei konnte das *van*A-Gen bei 83 (82 *E. faecium*, 1 *E. faecalis*), das *van*B-Gen bei 50 (40 *E. faecium*, 10

E. faecalis), das vanC1-Gen bei 42 E. gallinarum-Stämmen und die vanC2 und C3-Gene bei 9 E. casseliflavus-Stämmen nachgewiesen werden (BELL et. al., 1998). Andere Forschergruppen etablierten ebenfalls Multiplex-PCR-Verfahren zum Nachweis von van-Genen in Enterokokken (POULSEN et al., 1999; JAYARATNE et al., 1999; PETRICH et al., 1999; MONSTEIN et al., 2000).

VanC-positive VRE (*E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. flavescens*) sind zu ca. 5% in Stuhlproben von hospitalisierten- sowie nichthospitalisierten Patienten nachgewiesen worden. Demzufolge gehören diese Keime (und deren "low-level"-Resistenz) zur natürlichen Darmflora des Menschen (TOYE et al., 1997).

Ebenfalls eingesetzt wurde die Reserve Transkription Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) um spezifische mRNS der *van*A- und *van*B-Gene zu detektieren (PRIVITERA et al., 1999).

BUTAYE wies 1999 bei älteren Schweinen *van*A-positive VRE nach, bei denen aktuell keine Fütterungsantibiotika eingesetzt wurden (*E. faecium-*, *E. hirae-*, *E. durans-*, *E. casseliflavus-* und E. *gallinarum-*Stämme). Es konnte aber nicht ausgeschlossen werden, dass diese zu einem früheren Zeitpunkt mit entsprechenden Antibiotika gefüttert wurden und sich diese VRE als resistente Flora nun etabliert hatten. Weiterhin wies diese Forschungsgruppe *E. faecalis-*, *E. faecium-*, *E. hirae-*, *E. durans-*, *E. casseliflavus-* und E. *gallinarum-*Stämme in Geflügelkot nach.

Der Nachweis von Enterokokken mit *van*C-Genen in Geflügel- oder Schweinefleisch ist mittlerweile ebenfalls beschrieben worden (GROSSO et al., 2000; RADU et al., 2001; GAMBAROTTO et al., 2001).

Die höhere Nachweisrate an *van*A-resistenten Enterokokken in 31,3% der untersuchten Geflügelfleischproben (n=36) deckt sich mit Angaben anderer Untersucher (KLARE et al., 1995a, b; WITTE et al., 1995; WEGENER et al., 1997; KLEIN et al., 1998a, b; QUEDNAU et al., 1998b; ROBREDO et al., 2000). Eine Niederländische Arbeitsgruppe konnte sogar in 70% der untersuchten ähnlichen Probenmaterialien *van*A-positive VRE nachweisen (VAN DEN BRAAK et al., 1998). Im Gegensatz zu diesen Autoren konnten in den eigenen Untersuchungen beim Schweinefleisch keine *van*A-positiven, jedoch bei 20 Proben (49%) "low level"-Resistenzen gefunden werden.

In Anbetracht der Tatsache, dass der Avoparcin-Einsatz in Deutschland seit Januar 1996 verboten ist, erscheint der Prozentsatz von 23,0% beim Vorkommen des *van*A- Gens in deutschem Geflügelfleisch immer noch recht hoch. Das Vorkommen von VRE trotz antibiotikafreier Aufzucht und Haltung bewies auch die Arbeitsgruppe KRUSE et al. (1999), die bei Kotproben zu 9% VRE nachweisen konnte. Andererseits konnten KLARE et al. (1995a, b) 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. Eine weitere Erklärung für ein von der Haltungsform unabhängiges VRE-Vorkommen könnten Enterokokken belastete Bruteier bieten. MATTHES und HANSCHKE (1977) sowie THOMPSON et al., (1980) diskutierten bereits sehr frühzeitig den Infektionsweg über die Elterntiere. Bisher fehlt es aber an Untersuchungen an Elterntieren, die diese Möglichkeit belegen könnten. 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 Klimaanlagen, Bauelemente mit der Möglichkeiten zur Staubansammlung, Tränkesysteme sowie Entsorgungsanlagen für den Kot an. Durch den Schlachtprozess und die Verarbeitung ist eine Kreuzkontamination nicht ausschließen. (HEIDER et al., 1992). Auch der Mensch kommt als Quelle für VRE-Einschleppungen in Betracht (JORDENS et al., 1994; VAN DER AU-WERA et al., 1996). Selbst Kinder ohne offensichtliche klinische Infektion, aber mit kolonisierten VRE im Gastrointestinaltrakt könnten Patienten im Krankenhaus infizieren (SINGH-NAZ et al., 1999). KLARE et al. identifizierten beispielsweise 1995 bei einer in Sachsen-Anhalt durchgeführten Studie an klinisch gesunden Menschen 12% als VRE-Ausscheider. Auch andere Untersucher wiesen, wenn auch mit 2% deutlich geringer, unter klinisch gesunden Menschen VRE-Ausscheider nach (ENDTZ et al., 1997). Auch in den überprüften Betrieben könnte das Personal mithin nicht nur als sekundär kontaminierende Quelle zu identifizieren sein, sondern VRE bereits primär einschleppen. Andere Untersucher konnten nur aus den Stuhlproben hospitalisierter Patienten VRE isolieren (COQUE et al., 1996).

Es ist vorstellbar, dass andere Vektoren (Nager, Parasiten) ebenfalls als sekundär kontaminierende Faktoren in Betracht kommen. Nachgewiesen sind z. B. Argas-Arten (Zecken) als Überträger von Salmonellen, Chlamydien und Pasteurellen oder Getreide-

schimmelkäfer als Ursache für die Verbreitung von Salmonellen, *E. coli* und anderen geflügelpathogenen Mikroorganismen (RIBBECK, 1992). Auch kontaminierte Produktionsmittel, also nicht nur Futter und Tränke, sondern auch Arbeitsgeräte und Stallinventar dürfen nicht außer acht gelassen werden.

Als Ursache für diese VRE-Prävalenz 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. (1998a, b) in einem Fütterungsversuch mit Avoparcin (15 mg/kg) keine VRE in 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.

Nachdem Ende 1995 der Einsatz von Avoparcin in Dänemark verboten wurde, stellten BAGER et al. 1999 im Untersuchungszeitraum von 1995-1998 eine signifikante Herabsenkung der VRE-Nachweisrate bei Schweine- und Geflügelschlachtkörpern fest. Auch in Norwegen konnten noch vier Jahre nach dem Avoparcin-Verbot VRE in Kotproben von 5 Geflügelfarmen isoliert werden (BORGEN et al., 2000a, 2000b). 18 Monate nach dem EU-weiten Avoparcin-Verbot sank die Nachweisrate von *van*A-positiven VRE in Lebensmitteln in Italien von 14,6% auf 8% (PANTOSTI et al., 1999) und in Deutschland von 12% in 1994 auf 6% in 1996 und auf 3% in 1997 (KLARE et al., 1999).

Die vorliegenden eigenen Untersuchungen wurden zu einem Zeitpunkt durchgeführt, nämlich Januar 1996, als der Einsatz des Futtermittelzusatzstoffes Avoparcin in Deutschland bereits verboten war. Diese Maßnahme hatte sich aber noch nicht nachhaltig auf das Vorkommen von VRE-Stämmen ausgewirkt, jedenfalls nicht während des Untersuchungszeitraumes der eigenen Arbeiten.

4. Feintypisierungsuntersuchungen an Enterokokken

203 *van*A-positive Isolate aus Lebensmitteln (Geflügelfleisch) und 82 *van*A-positive Isolate von Menschen (gleicher Untersuchungszeitraum in Gießen) wurden mithilfe der Randomly Amplified Polymorphic DNA- (RAPD) und der Pulsfeldgelelektrophorese-Methode (PFGE) untersucht.

Die herkömmlichen phänotypischen Typisierungen von bakteriellen Krankheitserregern, wie Lysotypie und Serotypie, werden bei Enterokokken nicht angewendet, da sie bei dieser Bakteriengruppe zu keiner ausreichenden Diskriminierung der zu untersuchenden Stämme führen. Für medizinisch wichtige Enterokokken ist bereits eine direkte Typisierung über die PCR möglich (CHENG et al., 1997; SATAKE et al., 1997). Ein schneller Nachweis von Enterokokken aus klinischem Material mit dem Enterokokken-spezifischen tuf-Gen-Abschnittes ist ebenfalls beschrieben worden. Das tuf-Gen codiert den Verlängerungsfaktor EF-Tu (KE et al., 1999).

Eine Vielzahl moderner molekularbiologischer Methoden ist für eine epidemiologische Charakterisierung von Mikroorganismen beschrieben worden (TENOVER et al., 1997). Ribotyping bzw. eine Amplifikation der rRNS-Intergen-Regionen mit spezifischen Primerpaaren ist eine bei gram-negativen und gram-positiven Bakterien häufig angewendete Typisierungsmethode mit mäßiger Diskriminierung (MASLOW et al., 1993b und CUNY et al., 1996). Bei Enterokokken führte Ribotyping aber zu keiner Diskriminierung zwischen Stämmen, die mit anderen Methoden als eindeutig verschieden dokumentiert werden konnten (GORDILLO et al., 1993; KÜHN et al., 1995). Eine Amplifikation der 16S-23S rRNS intergenischen Region mit einer anschließenden Restriktion der PCR-Produkte ermöglichte eine Zuordnung der *Enterococcus*-Isolate in ihre jeweilige Spezies, aber keine Differenzierung innerhalb der Spezies (TYRRELL et al., 1997).

4.1 Plasmidmuster

Eine Typisierung anhand der Plasmidmuster wird bei gram-negativen Bakterien noch immer für einen ersten epidemiologischen Überblick eingesetzt, kann aber neben anderen Problemen (instabile Plasmidmuster) speziell bei *Enterococcus faecium* aufgrund der geringen Plasmidanzahl nicht angewendet werden (WOODFORD et al., 1993).

4.2 RAPD-PCR (Randomly amplified polymorphic DNA-PCR)

Die RAPD-PCR (Randomly amplified polymorphic DNA-PCR, auch arbitrarily primed PCR) wird als eine sehr effiziente und ökonomische Methode zur Stammcharakterisierung bei gleichzeitig sehr guter Diskriminierung angesehen (WILLIAMS et al., 1990). Das zugrunde liegende Prinzip ist eine PCR mit nur einem, sehr kurzem Primer, der entsprechend seiner geringen Größe viele Bindungsstellen auf beiden Strängen der DNS besitzt. Bei entsprechend günstiger Primerkonstellation (Bindung auf beiden komplementären Strängen in einem Bereich von < 2 kbp) wird der dazwischenliegende Abschnitt amplifiziert. Das Ergebnis der PCR ist ein Fragmentmuster, anhand dessen sich die verschiedenen Stämme voneinander unterscheiden lassen. Der entscheidende Nachteil liegt in der Methode an sich, da eine PCR mit nicht-spezifisch bindenden Primern durch viele Faktoren beeinflusst werden kann. Ein hohes Maß an Optimierung ist für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse innerhalb eines Labors erforderlich, was einen Vergleich der Typisierungsergebnisse aus verschiedenen Laboratorien erheblich erschwert (TYLER et al., 1997).

Die RAPD stellte sich in Verbindung mit der DNA-Isolierung mit dem QIAamp Tissue Kit in der vorliegenden Arbeit als ein zuverlässiges und reproduzierbares Verfahren für die Feintypisierung *inter speciem* heraus. Es war mit dem Primer "KAY 3" möglich, zwischen *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. durans* und *E. hirae* anhand der spezifischen Bandenmuster reproduzierbar zu unterscheiden. Die Ergebnisse wurden mit den biochemischen Untersuchungen in der bunten Reihe bestätigt. Diese Methode erwies sich jedoch bei Einsatz des zuvor erwähnten Primers als nicht geeignet für eine Differenzierung *intra speciem*.

Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen liefern somit einen weiteren Beitrag für die effiziente und schnelle Identifizierung von Enterokokken. Andere Untersucher konnten ähnliche Ergebnisse auf dem Sektor der molekularbiologischen Identifizierung mithilfe der PCR, RAPD und RFLP erzielen. Bisher hat allerdings keine Forschergruppe die gleichen Untersuchungen mit der RAPD in der Verbindung mit dem Primer "KAY 3" verfolgt bzw. präsentiert.

Eine schwedische Arbeitsgruppe setzte einen anderen universellen Primer für die Identifizierung von Enterokokken ein (3' ACg CgC CCT 5'; QUEDNAU et al., 1998a, b). Anhand der in der Veröffentlichung erkennbaren Bandenmuster ist allerdings ebenfalls festzustellen, dass sich beispielsweise die Bandenmuster von drei E. *faecalis*-Stämmen

unterschiedlicher Herkunft deutlich voneinander unterscheiden. Somit könnte man vermuten, dass die Reproduzierbarkeit nicht gegeben zu sein scheint.

Andere Forschergruppen versuchten ebenfalls, Enterokokken und auch Streptokokken mittels Einsatz von universellen Primern zu identifizieren. Dabei gelang es, Mastitis-Erregern wie *Streptococcus (S.) agalactiae*, *S. uberis* sowie *E. faecium* unterschiedlichen Bandenmustern zuzuordnen (JAYARAO et al., 1994). Andere Untersucher entwickelten eine RAPD zur Identifizierung von Milchsäurebakterien wie z. B. *Lactobacillus (L.) acidophilus*, *L. reuteri* und *L. plantarum* sowie von *E. faecalis* und *E. faecium* (COCCONCELLI et al., 1995).

4.3 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

Die Methode der Wahl zur Charakterisierung von *Enterococcus-Isolaten* und einer großen Anzahl anderer gram-positiver und gram-negativer Erreger, ist die <u>Pulsfeldgele-lektrophorese</u> (PFGE, MURRAY et al., 1990a; HALL et al., 1992b; JOHNSON et al., 1995). Sie erreicht ein Niveau der Diskriminierung von Stämmen innerhalb einer Spezies, welches mindestens dem der MLEE und der RAPD-PCR entspricht, allerdings bei gleichzeitig hoher Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (TOMAYKO et al., 1995; PIEHL et al., 1995; BERT et al., 1997; VAN DEN BRAAK et al., 2000a).

Die <u>Pulsfeldgele</u>lektrophorese ist nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit als sehr gut reproduzierbare Methode für die Feintypisierung von Enterokokken besonders zu empfehlen. Die Ergebnisse sind mit dem GelCompar-Programm zuverlässig und schnell als Dendrogramm auszuwerten.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten *Enterococcus*-Isolate wurden durch eine Analyse der genomischen DNS nach *Sma*I-Verdau und Auftrennung im Pulsfeldgel untersucht (RÖMLING et al., 1995). Als Kriterium für eine enge Verwandtschaft (Klonalität) zwischen den Stämmen gilt eine sogenannte 3-Banden-Regel von TENOVER et al. (1995). Danach werden Stämme als gleich betrachtet, deren Fragmentmuster sich durch höchstens 3 Banden voneinander unterscheiden. Ein 2- bzw. 3-Banden-Unterschied kann bereits durch ein einfaches mutatives Ereignis hervorgerufen werden (Punktmutation in der Zielsequenz der *Sma*I-Endonuclease/ Entstehung eines neuen Erkennungssites für *Sma*I - 3-Banden-Shift; Insertion bzw. Deletion eines kleinen Fragmentes - 2-Banden-Shifts).

Die DNS-Feintypisierungsergebnisse der *intra speciem-* und *inter speciem-* Differenzierung mit der PFGE und anschliessender Clusteranalyse mit einem computergestützten

Auswertesystem zeigte, dass sich die Isolate aus dem Geflügelfleischbereich von den aus humanmedizinisch-klinischen Bereich stammenden deutlich voneinander unterschieden.

Für eine epidemiologische Untersuchung von übergeordneten Verwandtschaftsgruppen innerhalb einer Art, kann durch die Anwendung der PFGE durchaus eine "Überdiskriminierung" diskutiert werden (PFALLER et al., 2001).

Hierbei sei auf das aus der Pulsfeld-Gelanalyse hervorgegangene Dendrogramm verwiesen, in welchem die Stämme entsprechend der Heterogenität ihrer *Sma*l-Muster in Gruppen geordnet werden. Die dargestellten Cluster zeigten Isolate unterschiedlicher Herkunft in gleichen Gruppen. Dabei zeichnen sich die untersuchten *Enterococcus*-Isolate durch eine beachtliche genotypische Heterogenität aus, d. h., dass sich die Übertragung des *van*A-Gens nicht nur auf genetisch eng miteinander verwandte *Enterococcus*-Spezies beschränkt. Das Dendrogramm zeigt, dass die größte Homologie zwischen einem Isolat aus Geflügelfleisch und einem klinischen Isolat bei 78% liegt. Somit konnte die Polyklonalität der VRE-Stämme in dieser Arbeit anhand einer größeren Anzahl an Isolaten bestätigt werden, wobei die aus dem humanmedizinisch-klinischen Bereich stammenden *van*A-positiven *E. faecium*-Isolate von denen aus Lebensmitteln deutlich abzugrenzen sind.

Die diesbezüglich geäußerten Befürchtungen, dass der Einsatz von Avoparcin in der Tiermast nicht therapierbare Infektionen des Menschen durch VRE-Stämme verursachen würde (FRANZ et al., 1999), kann aufgrund eigener Befunde nicht belegt werden. Die eigenen Ergebnisse deuten vielmehr darauf hin, dass Lebensmittel tierischen Ursprungs durch den Einsatz von Fütterungsantibiotika in der Tiermast als weitere Quelle für die Resistenz-Entwicklung angesehen werden müssen. Obwohl der Einsatz von Avoparcin verboten wurde, konnten weiterhin VRE-Stämme aus Geflügelfleisch, vornehmlich aus den Niederlanden, isoliert werden.

Die vorliegenden Ergebnisse eigener Untersuchungen werden durch die Resultate anderer Untersucher bestätigt. Diese Autoren setzen für die gleiche Fragestellung ebenfalls die PFGE ein , um Stämme aus dem humanmedizinisch-klinischen Bereich mit solchen aus dem Tierhaltungsbereich zu vergleichen. Sie fanden ebenfalls unterschiedliche Bandenmuster (WITTE et al., 1995; KLARE et al., 1997a; BISCHOFF et al., 1999; DESCHEEMAEKER, et al., 1997 und 1999; OZAWA et al., 2002).

Da die in der vorliegenden Arbeit einbezogenen humanen und tierischen Stämme zwar

ähnliche, aber nicht identische Bandenmuster aufwiesen, muss die Frage der klonalen Identität sehr vorsichtig diskutiert werden (KLUYTMANS et al., 1995). Die grundsätzliche genetische Heterogenität von Enterokokken konnte von mehreren Arbeitsgruppen nachgewiesen werden (MATO et al., 1996; MORRISON et al., 1999; REINERT et al., 1999). Zudem wurde beobachtet, dass die Bandenmuster der Enterokokken-Isolate über einen längeren Zeitraum (bis zu 160 Tagen) in den gleichen Patienten "leicht" variieren können, die fehlende genetische Stabilität ist demnach offensichtlich ein weiterer Grund für die Heterogenität der Enterokokken (BONTEN et al., 1998).

Zwei skandinavische Arbeitsgruppen untersuchten Stuhlproben von Farmern und Geflügelkot in Geflügelmästereien. Dabei stellte sich heraus, das in einem Fall in Norwegen (SIMONSEN et al., 1998) jeweils *van*A-positive VRE-Isolate (Mensch und Geflügel) nachgewiesen werden konnten, die nur in einer PFGE-Bande differierten. In Dänemark fand man sogar nach dem PFGE-Bandenmuster identische *van*A-positive VRE bei Puten und dem Puten-Farmer. Die Autoren interpretierten dies als einen Beweis für den möglichen Infektionsweg von Tier zu Mensch (VAN BELKUM et al., 1996). Zu ähnlichen Schlussfolgerungen kam man nach Untersuchungen in Deutschland (KLARE et al., 1995a) und den Niederlanden (VAN DEN BOGAARD et al., 1997; STOBBERINGH et al., 1999).

Mithilfe der Amplified-fragment length polymorphism (AFLP) konnten *E. faecium*-Isolate anhand der Fragmentsmuster in vier AFLP-Genogruppen eingeteilt und somit ein wirtsspezifisches Vorkommen von *E. faecium*-Subtypen nachgewiesen werden. Dabei wurden die Isolate von nicht hospitalisierten Patienten mit denen aus Schweinen in Genogruppe A eingeteilt, Gruppe B bildeten Isolate von Hühnern und Puten, Gruppe C bildeten Isolate von hospitalisierten Patienten, Kälbern, Katzen und Hunden und Gruppe D wurde ausschließlich aus Isolaten von Kälbern gebildet (WILLEMS et al.; 2000).

Diese Untersuchungen zeigen, dass es sicherlich sehr schwierig ist, eine genetische epidemiologische Beziehung zwischen Isolaten verschiedenen Ursprungs herzustellen. Dennoch muss beachtet werden, dass mit *in vitro-*Experimenten die Übertragung des *van*A-Resistenzgens auf *Staphylococcus aureus* und auch andere Mikroorganismen nachgewiesen wurde (NOBLE et al., 1992). Nach der Erstbeschreibung eines *Staphylococcus aureus* Isolates (ANONYMOUS, 1997c), das nur noch intermediär gegenüber Vancomycin sensibel ist (VISA), besteht die Gefahr, dass sich durch den langzeitigen Einsatz von Glycopeptiden in der Therapie bei Methicillin-resistenten *Staphylococcus*

aureus Isolaten (MRSA) eine Resistenz gegenüber dieser Substanzgruppe entwickelt (GEISEL et al., 1999). Bisher wurden 7 VISA beschrieben (MHK: 8-16μg/ml): Japan (A-NONYMOUS, 1997c), Michigan und New Jersey, USA (ANONYMOUS, 1997d), Limogues, Frankreich (PLOY et al., 1998), Nordrhein-Westfalen und Berlin, Deutschland (ANONYMOUS, 1998a). In Hongkong wurde der erste Vancomycin- intermediär sensible *S. aureus*-Stamm (VISA, Minimale Hemmkonzentration: 8μg/ml) bei einer Patientin isoliert (CHAN YOW CHEONG, 1999). Erst kürzlich trat in Michigan (USA) der erste dokumentierte Fall einer Infektion mit Vancomycin-resistenten *Staphylococcus aureus* (VRSA) bei einem Dialysepatienten auf (ANONYMOUS, 2002a, b). Es erscheint daher angebracht, Lebensmittel tierischen Ursprungs auch auf Vancomycin-resistente *Staphylococcus aureus*-Stämme zu untersuchen.

Jeweils eine 100%ige Übereinstimmung der PFGE-Muster sind bei den aus Geflügelfleisch isolierten *Enterococcus faecium*-Stamm "127m3" (Frankreich) und "133m13" (Supermarkt in Giessen, keine genaue Ursprungsangabe), bei "129m3" und "135m3" (jeweils Supermarkt in Giessen, keine genaue Ursprungsangabe) und schließlich bei "101m1" und "103m1" (identischer Hersteller in den Niederlanden) zu erkennen. Es konnte also ein Enterokokken-Klon aus ein- und demselben Ursprung mehrmals isoliert werden. Dies könnte bedeuten, dass eine gewisse genetische Stabilität eines Klons innerhalb eines Bestandes existiert (Hersteller aus den Niederlanden). Weiterhin ist es möglich, dass der Supermarkt in Giessen Geflügelfleisch von ein und demselben französischen Lieferanten bezieht und dies nicht deklariert. Somit wäre die 100%ige Übereinstimmung zu erklären. Ebenfalls zeigen diese Ergebnisse, dass offensichtlich länderspezifische Enterokokken-Klone existieren.

Eine amerikanische Arbeitsgruppe untersuchte im Zeitraum von 1988 bis 1992 105 klinische Enterokokken-Isolate aus 31 amerikanischen Krankenhäusern. Dabei konnte in den Isolaten das *van*A-Gen zu 67%-, das *van*B-Gen zu 24,8 %- und das *van*C-Gen zu 4,8% nachgewiesen werden. Es konnte noch nicht zwischen *van*C1, 2 und 3 unterschieden werden. Die anschließenden DNA-Feintypisierungen ergaben eine klare Überlegenheit der PFGE gegenüber der Plasmidanalyse. Auch hier konnte mit der PFGE (Restriktionsanalyse mit *Smal*) eine Polyklonalität der Enterokokken- Bandenmuster festgestellt werden (CLARK et al., 1993). Andere Arbeitsgruppen legten ähnliche Ergebnisse vor (ENDTZ et al., 1997; FRIDKIN et al., 1998).

Die Methode ist weiter entwickelt worden, mittlerweile sind in der Literatur Protokolle beschrieben, bei der die Untersuchung nur noch einen Tag dauert. Neben der Wirtschaftlichkeit würde auch die Praxisrelevanz verbessert (MATUSHEK et al., 1996; TURABE-LIDZE et al., 2000).

Mithilfe der PFGE (Restriktionsendonuclease: *Sma* I) und mit der DNA-Hybridisierung ist zusammen mit biochemischen Reaktionen eine Identifikation von *E. faecalis* gelungen (COQUE et al., 1995).

4.4 Repititive Sequence-Based PCR

Eine neuere Methode, die Repititive Sequence-Based PCR wurde 1998 von MALATHUM et al. an Enterokokken getestet und mit der PFGE verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass diese Methode ebenfalls reproduzierbare Ergebnisse liefert, für nähere Aussagen müssen allerdings noch weitere Untersuchungen erfolgen. Bei einem Vergleich konnte die PFGE mehr überzeugen.

5. Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration

Gemäß einer Empfehlung des National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, ANONYMOUS, 1997a) sind Isolate mit einer Minimalen Hemmkonzentration (MHK) bei Vancomycin und Teicoplanin bis 2µg/ml als sensibel, Isolate mit einer MHK zwischen 4 und 8µg/ml als intermediär und Isolate mit einer MHK von >16µg/ml als resistent einzustufen.

Die "high-level" Vancomycin- und Teicoplanin-resistenten vanA- bzw. vanB- negativen Isolate (Stuhlprobe einer nicht hospitalisierten Person und zwei *E. faecium-* Isolate aus Schweinefleisch) könnten ein bisher unbeschriebenes Vancomycin-Resistenzgen tragen. Die in der neueren Literatur beschriebenen vanD- (PERICHON et al., 1997) und vanG-Gene (McKESSAR et al., 2000) wurden in dieser Arbeit nicht berücksichtigt.

Die MHK aller *van*A-positiven Enterokokken lag bei Vancomycin zwischen 128 und 1024μg/ml und bei Teicoplanin zwischen 16 und 1024μg/ml. In der Literatur sind ebenfalls *van*A-positive VRE mit MHK-Werten von 64-1024μg/ml (Vancomycin) und 8-512μg/ml (Teicoplanin) beschrieben worden (KLARE et al., 1995b)

Die *van*C-positiven Enterokokken wiesen bei Vancomycin eine MHK von 2-8 μg/ml auf, bei Teicoplanin wiesen sie eine MHK von 0μg/ml auf.

Wie vorher erwähnt, wurde bei einem *E. gallinarum*- Isolat (MHK_{Vancomycin}: 512μg/ml, MHK_{Teicoplanin}: 64μg/ml) gleichzeitig das *van*A- sowie das *van*C1-Gen nachgewiesen.

Mittlerweile werden andere Antibiotika für die Behandlung von Enterokokken-Infektionen in der Klinik getestet. Dabei stellte sich heraus, dass Fluoroquinolone nicht bzw. nur bedingt einsatzfähig sind (ELIOPOULOS, 1993). In vitro-Untersuchungen ergaben, dass Sparfloxacin, Clinafloxazin (VAZQUEZ et al., 1993) und Streptogramin (Quinupristin/Dalfopristin; COLLINS et al., 1993; RISTOW et al., 1995; DEVER et al., 1996 und McGEER et al., 2000) gut gegen VRE wirksam sind.

Klinische VRE-Infektionen konnten mit Ampicillin/Sulbactam und Gentamicin in hoher Dosierung erfolgreich behandelt werden (MEKONEN et al., 1995; MOUTHON et al., 1997).

VI. SCHLUSSFOLGERUNGEN

- **1.** Die Verwendung eines CATC-Agars nach REUTER (1978) erlaubt es, Enterokokken in Proben aus Geflügel- und Schweinefleisch nachzuweisen. Dabei können in anschließenden biochemischen Untersuchungen *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. flavescens*, *E. durans* und *E. hirae* identifiziert werden.
- **2.** Mit Hilfe der biochemischen Prüfung nach DEVRIESE (1995) in Verbindung mit der RAPD (Primer Kay 3) und der PFGE (Restriktionsenzym *Smal*) ist eine sichere und reproduzierbare Speziesidentifizierung möglich.
- **3.** VRE sind bei Geflügelfleisch regelmäßig nachweisbar. Sie sind durch den Besitz der Resistenzgene *van*A ("high-level"-Resistenz), *van*B ("moderate-high-level"-Resistenz) und *van*C ("low-level"-Resistenz) charakterisiert.
- **4.** Obwohl der Avoparin-Einsatz in Deutschland seit Januar 1996 verboten war, konnten weiterhin *van*A-positive VRE in Geflügelfleischproben nachgewiesen werden. Dies lässt die Annahme zu, dass
 - a) eine Kontamination über belebte bzw. unbelebte Faktoren stattgefunden haben kann,
 - b) VRE seit Jahren in den Geflügel-Ställen persistieren und nicht durch intensive Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen getilgt wurden,
 - c) auch andere Fütterungsantibiotika als Avoparcin glycopeptidresistente Mikroorganismen selektieren,
 - d) weiterhin Avoparcin als Masthilfsmittel eingesetzt wird,
 - e) als weitere Ursache des hohen VRE-Vorkommens der Einsatz von Antibiotika in Therapie und vor allem in der Prophylaxe in Betracht kommt.
- **5.** 203 mittels PCR untersuchten VRE-Isolate, also Stämme die im Mikrodilutionsverfahren eine Vancomycin-MHK von mindestens 128µg/ml besitzen, erwiesen sich als Träger des *van*A-Gens.
- **6.** *E. faecium* stellt den dominierenden *van*A-Gen-Träger in den überprüften Geflügelfleischproben dar.

- **7.** Die PCR-Analyse widerlegt die Annahme (ARTHUR 1993; KLARE et al. 1995), dass ein high-level Resistenzverhalten an das Vorhandensein des *van*A-Gens gekoppelt ist. In der vorliegenden Arbeit wurden 3 Isolate (Schweinefleisch, klinisches Isolat) als "high level"-resistente VRE identifiziert, die weder das *van*A- noch das *van*B-Gen besitzen.
- **8.** Die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) ist unter Verwendung der Restriktionsendonuclease *Sma*l für die Feintypisierung von Enterokokken besonders zu empfehlen. Die Ergebnisse sind mit dem GelCompar-Programm zuverlässig und schnell als Dendrogramm in einer Clusteranalyse auszuwerten.
- **9.** Die PFGE-Feintypisierungsergebnisse eigener Untersuchungen geben keinen Hinweis auf eine enge genetische Verwandtschaft zwischen *Enterococcus*-Stämmen aus Lebensmitteln und klinischem Bereich.
- **10.** Die Clusteranalyse der PFGE-Bandenmuster von Enterokokken aus Deutschland und den Niederlanden zeigte höchstens eine 85%ige Ähnlichkeit (zwei *E. faecalis*-Isolate). Innerhalb dieser Länder treten mehrmals Isolate mit 100%iger Ähnlichkeit auf. Demnach existierten vermehrt endemische Stämme, d.h. es herrschen Länderspezifische "PFGE-Bandenmuster-Typen" bei den Enterokokken vor.
- **11.** Die Randomly Amplified Polymorphic DNA-Methode (RAPD) stellte sich in Verbindung mit der DNA-Isolierung mit dem QIAamp Tissue Kit (Fa. Quiagen) in der vorliegenden Arbeit als ein zuverlässiges und reproduzierbares Verfahren für die Feintypisierung von Enterokokken *inter speciem* heraus.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Enterokokken gehören zu den häufigsten nosokomialen Infektionserregern (Harnwegs- und Wundinfektionen, Sepsis, Endocarditis). Die zunehmende Resistenzentwicklung bei *Enterococcus* (*E*.)-Stämmen vor allem gegen die Glycopeptidantibiotika Vancomycin (gebildet von *Amycolatopsis orientalis*) und Teicoplanin (gebildet von *Actinoplanes teichomyceticus*) ist Grundlage für intensive Untersuchungen. Die Anwendung des Fütterungsantibiotikums Avoparcin wurde aufgrund des Verdachtes, dass dessen Verwendung in der Tiermast zur Entwicklung von Kreuzresistenzen gegen diese Antibiotika bei Enterokokken führt, in Deutschland im Januar 1996 und in der EU im April 1997 untersagt.

In eigenen Untersuchungen sollten Enterokokken aus 115 Geflügel- und 50 Schweinefleischproben auf dem CATC-Agar (Citrat Azid Tween Carbonat Agar) isoliert und zunächst einer orientierenden Überprüfung auf Vancomycin-Resistenz auf dem Columbia CNA Agar (Colistin Nalidixin Azid Agar, supplementiert mit 5% Schafblut und 5 mg Vancomycin/I) unterzogen werden . Klinische Isolate und Referenzstämme wurden in den Untersuchungen einbezogen. Von 1691 E.-Isolaten aus den Geflügelund Schweinefleischproben konnten mithilfe des Vancomycin- supplementierten Columbia CNA Agar 420 Isolate als Vancomycin-resistent identifiziert werden.

Alle 420 als resistent identifizierten *E.* Isolate wurden mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit spezifischen Primern zum Nachweis der Vancomycin-Resistenz-vermittelnden *van*-Gene untersucht ("high level": *van*A; "moderate-high level": *van*B; "low level": *van*C1, *van*C2 und *van*C3). Die Spezifität der *van*-Gentypischen Amplifikate wurde mithilfe der Restriktionsanalyse unter Verwendung der *Cfol-* (*van*A) und *Ddel-* (*van*B) Endonucleasen überprüft. Für die intraspezifische Differenzierung *van*A-positiver VRE-Isolate wurde für die Randomly Amplified Polymorphic DNA-Methode (RAPD) der Primer "*kay*3"- und für die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) die Restriktionsendonuclease *Smal* verwendet.

Das *van*A-Gen konnte bei 203 Isolaten (127 *E. faecium*, 31 *E. faecalis*, 34 *E. durans*, 10 *E. hirae* und ein *E. gallinarum*) aus 50 (43,5%) Geflügelfleischproben, in keinem Fall bei Isolaten aus Schweinefleischproben nachgewiesen werden. Das *van*B-Gen konnte in keinem Fall ermittelt werden.

Das *van*C1-Gen konnte bei 39 *E. gallinarum*-Isolaten aus 24 (20,7%) Geflügel-fleischproben und einer Schweinefleischprobe (2,0%) nachgewiesen werden. Dabei war ein *E. gallinarum*-Isolat *van*A- <u>und</u> *van*C1-Gen-positiv. Das *van*C2-Gen konnte

bei einem *E. flavescens*- und 22 *E. casseliflavus*-Isolaten aus 12 (10,4%) Geflügelfleischproben und vier (8,0%) Schweinefleischproben nachgewiesen werden. Das *van*C3-Gen konnte bei einem *E. flavescens*- und acht *E. casseliflavus*-Isolaten aus zwei (1,7%) Geflügelfleischproben und drei (6,0%) Schweinefleischproben nachgewiesen werden. Dabei war ein *E. flavescens*- und acht *E. casseliflavus*-Isolate *van*C2- <u>und van</u>C3-Gen-positiv. *Van*C-positive VRE konnten in 33 Geflügel- (28,7%) und fünf Schweinefleischproben (10,0%) nachgewiesen werden. Davon konnten aus 14 Geflügelfleischproben VRE isoliert werden, die das *van*A- und das *van*C-Gen besitzen.

Alle Enterokokken, bei denen das *van*A-Gen nachgewiesen werden konnte, wurden mit der RAPD- und der PFGE-Methode einer Feintypisierung unterzogen. Die RAPD stellte sich in Verbindung mit der DNA-Isolierung mit dem QIAamp Tissue Kit in der vorliegenden Arbeit als ein zuverlässiges und reproduzierbares Verfahren für die Feintypisierung *inter speciem* heraus. Es konnten die biochemisch identifizierten Spezies *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. casseliflavus* und *E. gallinarum* mithilfe des universellen Primers "*kay*3" jeweils einem spezifischen Bandenmuster zugeordnet und demnach eindeutig identifiziert werden.

Die Untersuchungen mit der PFGE zeigen, dass aus dem humanmedizinischklinischen Bereich stammende Isolate von denen aus Lebensmitteln deutlich abzugrenzen sind. Zudem sind die Enterokokken durch eine beachtliche genotypische Heterogenität gekennzeichnet.

Die Ergebnisse der PFGE-Untersuchungen und die Ähnlichkeiten der Feintypisierungs-Bandenmuster einiger *Enterococcus*-Isolate konnten anhand von Dendrogrammen dokumentiert werden. Es zeigt sich, dass die größte Übereinstimmung der *Smal-*Restriktionsmuster zwischen den Isolaten aus Geflügelfleisch und den klinischen Isolaten bei 78% liegt.

Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Lebensmittel tierischen Ursprungs durch den Einsatz von Fütterungsantibiotika in der Tiermast als weitere Quelle für die Resistenz-Entwicklung angesehen werden müssen. Auch nach dem Avoparcin-Verbot sind weiterhin VRE-Stämme nachzuweisen.

VIII. SUMMARY

Enterococci belong to the most frequent nosocomial infection exciters (urinary tract and wound infections, sepsis, endocarditis). The increasing resistance development in *Enterococcus* (*E*.) strains particularly against the glycopeptides antibiotics vancomycin (produced by *Amycolatopsis orientalis*) and teicoplanin (produced by *Actinoplanes teichomyceticus*) is basis for intensive investigations. The application of the feeding antibiotic avoparcin was forbidden due to the suspicion that its use leads in the animal mast to the development of cross-resistances against these antibiotics with enterococci, in Germany since January 1996 and in the European Union since April 1997.

In own examinations from 115 poultry and 50 pork samples, enterococci were isolated on the CATC agar (<u>C</u>itrate <u>A</u>zide <u>T</u>ween <u>C</u>arbonat agar) and submitted first of an orienting examination on vancomycin resistance on the Columbia CNA agar (<u>C</u>olistin <u>N</u>alidixin <u>A</u>zide agar, supplemented with 5% sheep blood and 5 mg vancomycin/l). Clinical Isolate and reference strains were included in the investigations.

Out of 1691 *E.*-isolates from poultry and pork samples 420 isolates could be identified as vancomycin resistant using vancomycin supplemented Columbia CNA agar.

All 420 as resistant identified *E*. isolates were examined with the polymerase chain reaction (PCR) with specific primers for the proof of the vancomycin resistance obtaining van genes. ("high level": *van*A; "moderate high level": *van*B; " low level ": *van*C1, *van*C2 and *van*C3). The specificity of the van gene typical amplicons was proved by restriction analysis using *Cfol* (*van*A) and *Ddel* (*van*B) endonucleases. For the intraspecific differentiation of *van*A positive VRE Isolate we used for the <u>randomly amplified polymorphic DNA method</u> (RAPD) the primer "*kay*3"- and for the pulsed field gel electrophoresis (PFGE) the restriction endonuclease *Smal*.

The *van*A gene was found in 203 isolates (127 *E. faecium*, 31 *E. faecalis*, 34 *E. du-rans*, 10 *E. hirae* and one *E. gallinarum*) exclusively from 50 (43,5%) poultry samples, in no case in isolates from pork samples. We could not detect strains possessing the *van*B gene.

The *van*C1-Gen could be proven in 39 *E. gallinarum* isolates from 24 (20,7%) poultry samples and a pork sample (2,0%). One *E. gallinarum* isolate was *van*A- <u>and</u> *van*C1 gene positive. The *van*C2-Gen could be proven in one *E. flavescens* and 22 *E. casseliflavus* isolates from 12 (10,4%) poultry samples and four (8,0%) pork samples. The *van*C3-Gen could be proven in one *E. flavescens* and eight *E. casseliflavus* iso-

Summary 138

lates from two (1,7%) poultry samples and three (6,0%) pork samples. One *E. flavescens* and eight *E. casseliflavus* isolates was vanC2 and vanC3 gene positive. *Van*C positive VRE could be detected in 33 poultry (28,7%) and five pork samples (10,0%). Of it we could detect VRE possessing *van*A <u>and van</u>C genes in 14 poultry samples. All enterococci, possessing the *van*A gene, were examined with the RAPD and the PFGE method. The RAPD turned out in connection with the DNA isolation with the QIAamp tissue kit in the available work as a reliable and reproducible procedure for the fine classification *inter speciem*. The biochemical identified species *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. casseliflavus* and *E. gallinarum* could be assigned with the universal primer "*kay*3" in each case a specific banding pattern and therefore likewise identified.

The investigations with the PFGE show that the isolates from the humane clinical area is to be defined of those from food clearly. Besides the enterococci is characterized by a considerable genotypic heterogeneity.

The results of the PFGE investigations and the similarities of the banding patterns of some *Enterococcus* isolate could be documented on the basis of dendrograms. It is shown that the largest agreement of the *Smal* restriction pattern is between the isolates from poultry and the clinical isolates about 78%.

The results permit the conclusion that food of animal origin must be regarded by the application of feeding antibiotics in the animal mast as the further source for the resistance development. Also after the avoparcin prohibition further VRE strains are to be proven.

IX. ANHANG

Material für die Mikrobiologie

Rezepturen für die verwendeten Nährmedien

Alle Nährmedien wurden bei 121°C 20 Minuten autoklaviert und nach Herstellung bei 4°C in Dunkelheit aufbewahrt.

Anhangstabelle 1: Zusammensetzung der Verdünnungsflüssigkeit

(Gepuffertes Peptonwasser)

Menge	Bestandteil	Bezug
1,0g	Pepton (Casein, tryptisch verdaut)=Trypton	Fa. Merck, Darmstadt, 107 216
8,5g	Natriumchlorid	Fa. Merck, 106 404
ad 1000 ml	Aqua bidest	

Anhangstabelle 2: Zusammensetzung des Plate Count-Agars

(Caseinpepton-Glucose-Hefeextrakt-Agar, Fa. Merck, 105463)

Menge	Bestandteil
5,0g	Pepton aus Casein
2,5g	Hefeextrakt
1,0g	D(+)-Glucose
14,0g	Agar-Agar
ad 1000 ml	Aqua bidest

Anhangstabelle 3: Zusammensetzung der CASO-Bouillon

(Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon, Fa. Merck, 105459)

Menge	Bestandteil
17,0g	Pepton aus Casein
3,0g	Pepton aus Sojamehl
2,5g	D(+)-Glucose
5,0g	Natriumchlorid
2,5g	di-Kaliumhydrogenphosphat
ad 1000 ml	Aqua bidest

Anhangstabelle 4: Zusammensetzung des CATC-Agars

(Citrat Azid Tween® Carbonat-Agar [Basis], Fa. Merck, 10279)

Menge	Bestandteil
15,0g	Pepton aus Casein
5,0g	Hefeextrakt
5,0g	Kaliumhydrogenphosphat
15,0g	Natriumcitrat
1,0g	Tween [®] 80
15,0g	Agar-Agar

Zusätzlich:

Menge	Bestandteil	Bezug
2,0g	Natriumcarbonat	Fa. Merck, 106392
0,1g	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid	Fa. Merck, 108380
0,4g	Natriumazid	Fa. Merck, 106688
ad 1000 ml	Aqua bidest	

Anhangstabelle 5: Zusammensetzung des Columbia-CNA-Agars mit Zusatz von 5% Schafblut, 5mg/L Vancomycin und 8mg/L Amphotericin B

(Colistin-Nalidixinsäure-Agar, Becton Dicinson, Heidelberg, 12104, nach GREEN et al. 1994)

Menge	Bestandteil	
12,0g	Pankreatisch abgebautes Casein	
5,0g	Peptisch abgebautesTiergewebe	
3,0g	Hefeextrakt	
3,0g	Rindfleischextrakt	
1,0g	Maisstärke	
5,0g	Natriumchlorid	
13,5	Agar Agar	
10,0mg	Colistin	
10,0mg	Nalidixinsäure	
50 ml	Steriles, defibriniertes Schafblut	

Zusätzlich:

Menge	Bestandteil	Bezug
5,0mg	Vancomycin	Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen, V2002
8,0mg	Amphotericin B	Fa. Sigma-Aldrich, A 4888
ad 1000 ml	Aqua bidest	

Anhangstabelle 6: Zusammensetzung der Phenolrot-Bouillon (Basis)

(Fa. Merck, 110987)

Menge	Bestandteil
5,0g	Pepton aus Casein
5,0g	Pepton aus Fleisch
5,0g	Natriumchlorid
18,0mg	Phenolrot
ad 1000 ml	Aqua bidest

Zusätzlich:

Menge	Bestandteil	Bezug
10,0g	L(+)-Arabinose	Fa. Merck, 101492
10,0g	D(-)-Mannit	Fa. Merck, 105982
10,0g	Melibiose	Fa. Merck, 112240
10,0g	Methyl-α-D-glucopyranosid	Fa. Sigma-Aldrich, M 9376
10,0g	Raffinose	Fa. Merck, 107549
10,0g	Ribose	Fa. Merck, 107605
10,0g	Saccharose	Fa. Merck, 107651
10,0g	D(-)-Sorbit	Fa. Merck, 107758
10,0g	D(+)-Xylose	Fa. Merck, 108689

Anhangstabelle 7: Zusammensetzung des SIM-Agars

(Sulphide-Indole-Motility-Agar, Fa. Oxoid, CM435)

Menge	Bestandteil
20,0g	Pepton aus Casein
6,1g	Pepton
0,2g	Eisen(III)-ammoniumsulfat
0,2g	Natriumthiosulfat
3,5 g	Agar
ad 1000 ml	Aqua bidest

Anhangstabelle 8: Herstellung von Wirkstoffstammlösungen für die Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Vancomycin (2048mg/ml, 98%, Fa. Sigma) Teicoplanin (2048mg/ml, 94,3%, Fa. Hoechst, Bad Soden am Ts.)

Bestandteil	Vancomycin	Teicoplanin
Wirkstoff-Menge	25mg	25mg
Aqua bidest (autoklaviert)	2,0ml	2,0ml
CASO-Bouillon	9,96ml	9,52ml

Material für die Molekularbiologie

Rezepturen für Lösungen für die PCR, RAPD und der PFGE

Alle Lösungen sind zu autoklavieren und bei 4°C aufzubewahren

Reagenzien und Lösungen zur DNS-Isolierung (PCR und RAPD):

Anhangstabelle 9: Herstellung einer CTAB-Lösung:

Stammlösung	1 Liter
NaCl	4,1g
СТАВ	10,0g
Aqua bidest	ad 100 ml

Anhangstabelle 10: Herstellung von TE-Pufferlösung (pH 8,0):

Stammlösung	1 Liter
1 M Tris- (hydroxymethyl)-aminomethan	121,14g
100 mM EDTA (Tritriplex III)	37,224g
Aqua bidest	ad 1 Liter

Reagenzien zum PFGE-Ansatz:

Anhangstabelle 11: Herstellung von TE-Pufferlösung (pH 7,6):

Stammlösung	1 Liter
10mM Tris- (hydroxymethyl)-aminomethan	1,2114g
1 mM EDTA (Tritriplex III)	0,37224g
Aqua bidest	ad 1 Liter

Anhangstabelle 12: Ansetzen eines Lysispuffers (pH 7,6):

Stammlösung: Lysispuffer	500 ml
1 M NaCl	29,3 g
6 mM Tris	363 mg
100 mM EDTA (Tritriplex III)	18,61 g
0,5 % Brij (Polyoxyethylenlaurylether)	2,5 g
0,5 % Laurylsarkosin	2,5 g
0,2 % Desoxycholat	1,0 g
Aqua bidest	ad 500 ml

Anhangstabelle 13: Herstellung einer PMSF-Lösung

(gelöst in Isopropanol, -20°C-Lagerung)

Stammlösung	1 Liter
100mM PMSF	0,17419g
Isopropanol	ad 10ml

Anhangstabelle 14: Herstellung von Ethidiumbromidlösungen

(nicht autoklavieren)

Stammlösung	10ml
Ethidiumbromid	0,1g
Aqua bidest / sterilfiltriert	+10ml

Gebrauchslösung	1,5 Liter
Stammlösung	50 μΙ
Aqua bidest	+1,5 l

Anhangstabelle 15: Herstellung von 10xTBE-Pufferlösung

(pH 8,0; bei 4°C aufbewahren):

Stammlösung	1 Liter
0,5M Tris- (hydroxymethyl)-aminomethan	60,60g
0,5M Borat	30,90g
10mM EDTA (Tritriplex II)	2,92g
Aqua bidest	ad 1 Liter

Anhangstabelle 16: Einstellungen der einzelnen Programmkomponenten von GelCompar 3.1

Bearbeitungsschritt	Gewählte Option						
1. Konvertierung							
Anzahl der untersuchten Banden	11						
Auflösung	800dpi						
Rescaling	jede Bahn						
Kurvenglättung ("smoothing")	0						
Anzahl der Korrekturpunkte	4						
Breite der densometrischen Messung	3						
Breite des als Bild zu reproduzierenden Gelstreifens	40						
Track search algorithm	System II						
2. Normalisierung							
Auflösung	800dpi						
Kurvenglättung	3pt						
Hintergrundreduktion	"rolling disc" Scheibendurchmesser 8						
Rescale track	ja						
3. Analyse							
Optimierung	"fine alignement"						

Anhangstabelle 17: Übersicht der untersuchten Geflügel- und Schweinefleischproben

								,		T	
		lsolate						3m3 3m4		5m1	6m4
	•	vanC2+3						0		0	0
	4	vanC3						0		0	0
	vanC ⁴	VanC2						7		0	0
	/ai	1'Jnsv						0		-	_
		E. flavescens						0		0	0
	•	E. casseliflavus						7		0	0
	•	E. gallinarum						0		-	_
		IdsznA				0		7		-	-
		lsolate									6m2 6m3
		Е. Һігае									0
	•	E. durans									0
	vanA³	E. flavescens									0
	an,	E. casseliflavus									0
4.	×	E. gallinarum									0
ate		E. faecalis									0
Ö		E. faecium									2
te Is		IdsznA				0	0	0	0	0	2
uch	⊒ ¥²	Teicoplanin				0	0	00	0	00000	0 256 256 0 0
Untersuchte Isolate	MHK ² µg/ml	Vancomycin				2 2	2 4	2 2	2		2.2
Ď		lsolate				11V1 11V2	2112 21113	3m3 3m4	4m3	5m1 5m4 5s2 5s3 5s4	6m1 6m2 6m3 6m4 6m5
		E. hirae	Ĺ	L	L	0	0	0	0	0	0
		E. durans				0	0	0	0	0	0
	ш	E. flavescens				0	0	0	0	0	0
	VRE	E. casseliflavus				0	0	2	0	0	0
	>	E. gallinarum				0	0	0	0	~	~
		E. faecalis				0	0	0	0	က	0
		E. faecium				2	2	0	_	~	4
		ldszaA	0	0	0	2	2	2	1	r,	5
		E. hirae	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	•	E. durans	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ţ	E. flavescens	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Gesamt	E. casseliflavus	0	0	0	0	0	7	0	0	0
	SS	E. gallinarum	0	0	0	0	0	0	0	_	1
	e Ge	E. faecalis	2	2	3	2	2	2	2	5	5
		E. faecium	5	5	0	5	5	က	5	4	4
		Gesamt	10	10	3	10	10	10	10	10	10
		Herkunft	ص 1	0	۵			-	0	0	0
		Gewicht					1000g	1120g		1050g	300g
Probenart				Hackfleisch (Schw)	Mett (Schw)	Mett (Schw)	Hähnchen	Hähnchen	Mett (Schw)	Hähnchen	Hähnchenschenkel
	muts d				04.12.95	04.12.95	12.12.95	18.12.95	02.01.96	02.01.96	02.01.96 Hä
		zisenA	1	1=	=	1	2	ო	4	2	9

147

⁶Deutschland ⁷Niederlande ⁸Frankreich ⁹Ungarn

² Minimale Hemmkonzentration

³ VRE, *van*A-Gen-positiv ⁴ VRE, *van*C-Gen-positiv ⁵ Schweinefleisch

Anhangstabelle 17 (Fortsetzung 1): Übersicht der untersuchten Geflügel- und Schweinefleischproben

		lsolate	7m3	8m2			11m4		13m1 13s5									22m3		
				3			1											2		
		vanC2+3	0	0			0		0									0		
	ပွ	£3nsv	0	0			0		0									0		
	vanC	SOney	_	1			1		2									1		
	_	1'Onev	0	0			0		0									0		
		E. flavescens	0	0			0		0									0		
		E. casseliflavus	1	1			1		2									1		
		E. gallinarum	0	0			0		0									0		
		IdsznA	-	1	0	0	1		7		0		0	0			0	-		0
		lsolate									15s2 15s5									
		E. hirae									0									
		E. durans									0									
	vanA	E. flavescens									0									
4	/ai	E. casseliflavus									0									
ate	_	E. gallinarum									0									
9		E. faecalis									7									
<u>s</u>		E. faecium									0									
Untersuchte Isolate		IdsznA	0	0	0	0	0		0		77		0	0			0	0		0
tersu	MHK µg/ml	Teicoplanin	0	0	0	00	0		0 0		2 128 2 128		0000	00			0	0		0 0
n D	< <u>3</u>	Vancomycin	3 2	2 4	1 4	4 4	n4 8 n6 4		n1 2 55 2		52 512 55 512		2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2	n3 2			3.1	n3 4		34 8 35 2
		E. hirae Isolate	0 7m3	0 8m2	0 9m1	10m4 0 10s1	11m4 0 11m6		13m1 0 13s5		15s2 0 15s5		17m1 17s2 17s4 0 17s5	18m3 0 18s3			0 21s1	0 22m3		24s4 0 24s5
		E. durans	0	0	0	0	0 (0		0		0	0			0	0		0
		E. flavescens	0	0 (0	0	0		0		0		0	0			0	0		0
	VRE	E. casseliflavus	1	1	0	0	1 (2 (0		0	0			0	1 (0
	>	E. gallinarum	0	0 1	0	0	0 1		0		0		0	0			0	0		0
		E. faecalis	0	0	0	-	0 (0		7		3	1			1 (0		2 (
		E. faecium	0	0	1	-	1		0		0		-	-			0	0		0
		F. mae	0	1	1	7) 2	0	2	0	7	0	4	2	0	0	1	0	0	2
		E. durans E. hirae	0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0	0	0 0
		E. flavescens	0	0	0	0	0 (0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Gesamt	E. casseliflavus	_	1	0	0	1 (0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0
	Sa	E. gallinarum	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	(C)	E. faecalis	2	2	_	4	5	2	4	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	5
		E. faecium	4	4	2	9	4	2	4	2	2	2	2	2	2	2	2	4	2	2
		Gesamt	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Herkunft	0	D 1	٦	₽ Z	0	٦	0	1	₽ Z	٦	1	0	٦	0	٦	٦	0	NL 1
		Gewicht	238g	238g	1130g	636g	950g	1120g	500g	450g	430g	483g	450g	947g	1120g		1300g	500g	474g	546g
Probenart		Hähnchenbrust	Hähnchenbrust	Suppenhuhn	Hähnchenschenkel	Hähnchenflügel	Hackfleisch (Schw)	Hähnchenleber	Hähnchenkeulen	Hähnchenbeine	Hühnerklein	Hähnchenkeulen	Hähnchenflügel	Poularde	Mett (Schw)	Suppenhuhn	Hühnerklein	Hühnerklein	Hähnchenschenkel	
Datum		08.01.96	08.01.96	08.01.96	08.01.96	08.01.96	08.01.96	16.01.96	16.01.96	16.01.96	16.01.96	16.01.96	16.01.96	16.01.96	16.01.96	23.01.96	23.01.96	23.01.96	23.01.96	
zisenA				8	6	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24

Anhangstabelle 17 (Fortsetzung 2): Übersicht der untersuchten Geflügel –und Schweinefleischproben

		lsolate		26m3			27m1		28m1								
				2			7		2								
		vanC2+3				0		0	0								
	ပ	vanC3				0		0	0								
	vanC	VanC2				7		0	1								
	>	1 Juev				0			0								
		E. flavescens				0		0	0								
		E. casseliflavus				~		0	1								
		E. gallinarum				0			0								
		IdszaA	0			_		~	-	0	0	0	0	0	0		
		lsolate	25m2	26m2	26m5				28s1								
		E. hirae	1			1			0								
		E. durans	0			1			0								
	۲	E. flavescens	0			0			0								
a)	vanA	E. casseliflavus	0			0			0								
ate		E. gallinarum	0			0			0								_
log		E. faecalis	0			0			-								
<u> </u>		E. faecium	0			2			0								_
chte		IdsznA	~			2		0	1	0	0	0	0	0	0		
Untersuchte Isolate	MHK µg/ml	Teicoplanin					00000			0 0	0 0	0	0	0	0		
Unte	S 5	Vancomycin									0 0		4	4	4		
		lsolate	25m1 25m2 25s1 25s4	26m2 26m3	26m5 26m5 26s2	26s3 26s5	27m1 27m2 27m3 27m5 27m5	27s4 27s5	28m1 28s1 28s5	29m3 29s4	30m5 30s2	31m2	32m1	33s1	34s1		
		E. hirae	_			_		0	0	0	0	0	0	0	0		
		E. durans	0			1		0	0	0	0	0	0	0	0		
	Щ	E. flavescens	0			0		0	0	0	0	0	0	0	0		
	VRE	E. casseliflavus	0			1		0	0	0	0	0	0	0	0		
		E. gallinarum	0			0			7	0	0	0	0	0	0		
		E. faecalis	7			3		<u>ო</u>	2		_	0	0	7	_		
		Anzahl E. faecium	4			7 1		7	3 0	2	2	1	1	1 0	1	0	0
		E. hirae	_			1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		E. flavescens E. durans	0					0	0 (0	0	0 (0	0 (0	0	0
	Ĭ	E. casseliflavus	0			1 (1 C	0	0	0	0	0	0	0	0
	sal	E. gallinarum	0			0			. 0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Gesamt	E. faecalis	2			2		2	5 (2	2	2	2	2	2	2	2
	J	E. faecium	4			7		4	4	2	2	2	2	2	2	2	2
		Gesamt	10			10		10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Herkunft	¥			NL		N	NL	D	D	D	D	D	D	D	Ω
																	-
		Gewicht	9419			337g		316g	275g								
																	_
			<u></u>			Ä		J.	u _é		≥	√		(_N	<u>آ</u>		
			üge			əqe		erz(äge	(<u>w</u>	ch	ch	<u>×</u>	ch	ch	<u>×</u>	<u>×</u>
	Nanada i i		enf			enl		h.	mu	Sch	(6	t (S	Sch	t (S	(3)	Sch	Sch
robenart		12000doxQ	Jch			nch		che	che	Mett (Schw)	/urs	/urs	Mett (Schw)	/urs	/urs	Mett (Schw)	Mett (Schw)
			Hähnchenflügel			Hähnchenleber		Hähnchenherzen	Hähnchenmägen	Me	Bratwurst (Schw)	Bratwurst (Schw)	Me	Bratwurst (Schw)	Bratwurst (Schw)	Me	Me
			エ			エ		Ĭ	当		Ä	B		Ŗ	Ŗ		
																	_
			23.01.96			23.01.96		23.01.96	96.	96.	96.	23.01.96	23.01.96	96.	96.	96.	96.
		Datum				.01		.0	23.01.96	23.01.96	23.01.96	.01	.01	23.01.96	23.01.96	30.01.96	30.01.96
			23			23		23	23	23	23	23	23	23	23	30	30
		zisanA	25			26		27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
		_,oou v	7			7		7	2	2	က	3	ო	က	ന	ന	က

Anhangstabelle 17 (Fortsetzung 3): Übersicht der untersuchten Geflügel- und Schweinefleischproben

		lsolate	m2			m1									9ш	m6 s4	9s
		otrio2	37m2			40m1									49m6	50m6 50s4	51s6
		vanC2+3	-			0									0	7	0
	ပ	£2nev	0			0									0	0	0
	vanC	Sangy	0			0									1	0	0
	>	1'Onev	0			1									0	0	_
	,	E. flavescens	0			0									0	0	0
		E. casseliflavus				0										7	0
		E. gallinarum	0			1									0	0	~
		ldsznA	-		0	1	0				0				1	2	7
		lsolate			39m1		41m4 41m9										
		E. hirae			١		0										
		E. durans			0		0									-	
	Α̈́	E. flavescens			0		0										
4	vanA	E. casseliflavus			0		0										
ate		E. gallinarum			0		0										
0		E. faecalis			0		0			_							
<u>s</u>		E. faecium			0		2				_						
Untersuchte Isolate		IdsznA	0		-	0	7				0				0	0	0
ersu	MHK µg/ml	Teicoplanin	000000		2 512	00	2 512 2 512				0				00	0000	0000
Unt	≥ ∺	Vancomycin	2 - 2 2 4 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2		1 512	1 2 2 3	14 512 19 512				1 2				2 2	5 4 6 6 2 6 5 6 2 6 6 7 8 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9	2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2
		lsolate	37m2 37s1 37s2 37s3 37s4 37s5 37s5		39m1	40m1 40m3	41m4 41m9				45m1				49m6 49s2	50m6 50s4 50s5 50s6	51s2 51s5 51s6 51s6
		E. hirae	0		_	0	0				0				0	0	0
		E. durans	0		0	0	0				0				0	0	0
	VRE	E. casseliflavus E. flavescens	0		0 (0 (0				0 0				0	0	0
	>	E. gallinarum	-		0 0	0	0 (0				0 1) 2	
		E. faecalis	0 9		0	0 1	0 0				0				1	2 0	3
		E. faecium	0		0	1 (2 (1					0	0
		IdsznA	~	0	-	2	8	0	0	0	-	0	0	0	7	4	4
		E. hirae	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		E. durans	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	¥	E. flavescens	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	am	E. casseliflavus	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0
	Gesamt	E. gallinarum	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	~
	Ŏ	E. faecalis	5	2	2	5	5	2			2	2	2	2	5	4	4
		E. faecium	4	2	4	4	2	2	2	_	2	2	5	2	4	4	2
		Gesamt	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Herkunft	٥	D	NL	N	D	۵	۵	D	۵	D	D	D	D	D	D
		345iwəÐ			601g	673g	458g										519g
			_	_			4						_	_			
			Bratwurst (Schw)	Bratwurst (Schw)	Hähnchenbeine	Hähnchenschenkel	Hähnchenbrust	Bratwurst (Schw)	Bratwurst (Schw)	(wr	Bratwurst (Schw)	(wr	Bratwurst (Schw)	Bratwurst (Schw)	(wr	(wr	Hähnchenschenkel
Probenart) # (S)	3t (5	enk	nsc	ient	¥ (⊱	¥ (⊱	Mett (Schw)	3 (S	Mett (Schw)	st (5	st (\$	Mett (Schw)	Mett (Schw)	วรเ
			urs	/urs	Jch	her	nch	/urs	/urs)#	/urs	tt (/urs	/urs	, #	it (her
			atw	atw	ähr	nnc	lähı	atv	atv	Me	atv	Me	atw	atw	Me	Me	hnc
			<u></u>	Ŗ	I	Hä	I	ä	ä		ā		Br	Br			H H H H H
mużsū			ဖ	9	9		9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	
			30.01.96	30.01.96	30.01.96	30.01.96	30.01.96	07.02.96	07.02.96	07.02.96	07.02.96	12.02.96	12.02.96	12.02.96	12.02.96	17.04.96	17.04.96
			0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	7.0	7.0	7.0	7.0	2.0	2.0	2.0	2.0	7.0	7.0
			ñ	3	3	3	ñ	0	0	0	0	1	1	1	-	-	- -
		zisenA	37	38	39	40	14	42	43	4	45	46	47	48	49	50	51
		2,034 V	m	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	Ŋ	5

Anhangstabelle 17 (Fortsetzung 4): Übersicht der untersuchten Geflügel- und Schweinefleischproben

		ejsiosi	5286	53D3			56m7	57m2 57s2 57s3 57s4 57s8
	•	vanC2+3	0	0			0	0
	ပ	vanC3	0	0			0	0
	vanC	VanC2	0	0			0	0
	Š	13nsv	_	1			-	5
	•	E. flavescens	0	0			0	0
	•	E. casseliflavus	0	0			0	0
	•	E. gallinarum	~	-			-	5
		ldsznA	-	1	0	0	0	ro.
		lsolate	52m1 52m2				56m6	57m3 57m4
		E. hirae	0				0	-
		E. durans	0				-	-
	≰	E. flavescens	0				0	0
	vanA	E. casseliflavus	0				0	0
te	>	E. gallinarum	0				0	0
S		E. faecalis	0				0	0
SC		E. faecium	8				0	0
hte		IdsznA	7	0	0	0	-	0
Untersuchte Isolate	MHK µg/ml	Teicoplanin	128 128 0	0000	000000	0	400000	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
Unte	₩ Mg/	Vancomycin	512 512 4 8	8 5 5 5	444444	2	2,8 4 4 4 4	8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8
		lsolate	52m1 52m2 52s1 52s6	53s2 53s3 53s4 53D3	54m1 54m2 54m3 54m4 54m5 54s1	55m1	56m6 56m7 56m8 56s6 56s7 56s8	57m2 57m3 57m4 57s2 57s3 567s4 57s6 57s6 57s7
		E. hirae	0	0	0	0	0	-
		E. durans	0	0	0	0	~	-
	ш	E. flavescens	0	0	0	0	0	0
	VRE	E. casseliflavus	0	0	0	0	0	0
	>	E. gallinarum	_	1	0	0	-	5
	•	E. faecalis	_	3	7	0	က	က
		E. faecium	7	0	2	_	-	0
		IdsznA	4	4	7	1	ဖ	10
		E. hirae	0	0	0	0	0	-
		E. durans	0	0	0	0	-	-
		E. flavescens	0	0	0	0	0	0
	Gesamt	E. casseliflavus	0	0	0	0	0	0
	Sa	E. gallinarum	_	1	0	0	_	2
	e e	E. faecalis	4	5	5	2	5	е
		E. faecium	2	4	5	2	က	0
	-	Gesamt	10	10	10	10	9	10
		Herkunft			0	D 1	٦ -	Z Z
		Gewicht	500g	500g	1300g	500g		
		,,,,,,,,,,	26		13.	50	55	99
		Probenart	Hähnchenflügel	Hähnchenschenkel	Hähnchen	Hähnchenklein	Hähnchenbeine	Hähnchenbeine
		muts Q	20.05.96 H	20.05.96 Hä	20.05.96	20.05.96 F	19.06.96 H	19.06.96 H
		zisenA	52	53	45	22	999	25

Anhangstabelle 17 (Fortsetzung 5): Übersicht der untersuchten Geflügel –und Schweinefleischproben

		lsolate		59m1 59m2 59s1 59s2	60m6 60m8 60m9 60s10 60s11					
		vanC2+3		4	0				Щ	Ш
	vanC	SJnsv		0	0				\vdash	\vdash
	ā	Sansy		0	0				\vdash	Н
	-	1'Onev		0	5				ш	
		E. flavescens		0	0				ш	Ш
		E. casseliflavus		4	0					Ш
		E. gallinarum		0	5					
		ldsznA	0	4	ro	0	0	0		
	_	lsolate	58m1 58m2 58m3 58m3 58m4 58m7 58m7 58s1 58s6 58s6							
	-	E. hirae	0						\vdash	H
		E. durans	2						Н	Н
	vanA	E. flavescens	0						\vdash	Ы
a)	Va	E. casseliflavus	0						Ш	Ш
ate	_	E. gallinarum	0							Ш
6		E. faecalis	0							
<u>S</u>		E. faecium	7							П
Untersuchte Isolate		ldsznA	0	0	0	0	0	0		
ersu	MHK µg/ml	Teicoplanin	128 128 128 128 128 64 64 64 256 256	00000	000000	0000	0	256 256		
Unt	도 함	Vancomycin	512 512 512 512 512 512 512 74 74	4 4 4 4 4 4	888888	0000	5	512 512		
		lsolate	58m1 58m2 58m3 58m4 58m5 58m7 58s1 58s6 58s6	59m1 59m2 59s1 59s2 59s6 59s6	60m6 60m8 60m9 60s4 60s10	61s1 61s3 61s5 61s6	62m4	63m3 63m4		
		E. hirae	0	0	0	0	0	0		1 1
		E. durans	2	0	0	0	0	0		
	ш	E. flavescens	0	0	0	0	0	0		
	VRE	E. casseliflavus	0	4	0	0	0	0		
	>	E. gallinarum	0	0	2	0	0	0	-	
		E. faecalis	7	2 (9	0 (0		H
	-	E. faecium			_				-	\vdash
	-	IdsznA	10 7	0 9	9	4 0	1 1	2 2	0	0
		E. hirae	0	0	0	0	0	0	0	0
		E. durans	2	0	0	0	0	0	0	0
		E. flavescens	0	0	0	0	0	0	0	0
	Gesamt	E. casseliflavus	0	4	0	0	0	0	0	0
	sa	E. gallinarum	0	0	2	0	0	0	0	0
	ě	E. faecalis		3	2	2	2	2	2	2
	0		1						-	-
		E. faecium	2	3	3	2	5	2	2 (2
		Gesamt	10	10	10	10	10	10	10	10
		Herkunft	NF	٥	٥	Q	a	Q	Q	D
		Gewicht	6629							
		Probenart	Hühnerklein	Mett (Schw)	Bratwurst (Schw)	Bratwurst (Schw)	Mett (Schw)	Bratwurst (Schw)	Mett (Schw)	Bratwurst (Schw)
		MużsQ	19.06.96	19.06.96	19.06.96	19.06.96	98.02.08	03.07.96	03.07.96	
		zisenA	28	59	09	61	62	63	64	65

Anhangstabelle 17 (Fortsetzung 6): Übersicht der untersuchten Geflügel- und Schweinefleischproben

																													٦
		lsolate																											
		vanC2+3																											
	vanC	SONBY																			-								_
	Na Na	13nsv Sancv																											_
	•	E. flavescens							i																			ŀ	٦
		E. casseliflavus																											
	•	E. gallinarum																			-								
		IdsznA	0					•	0					0	0				•	•							0)	
		lsolate		67m1	67m2	67m3	67m4	67m5	o/mo	68m1	68m3	68m4	68m5	68m6	69m1 69m2	70m1	70s1	70s2	70s3	;		,	73m1	/3m2	73m4	73m5	73m6 73m7	Π	
				67	67	67	67	67	٥/	89	8	88	89	99	69 69	70	2	2	2 5	:		i	33	3 5	2 5	3.5	73	2	
		E. hirae							0					2	0				_	+	-						0	+	_
	4	E. durans							2					0	1	+			7	+-	-	-					- 22	+	_
	vanA	E. casseliflavus E. flavescens							0					0 0	0 0	+			_	+-								+	-
te	ž	E. gallinarum		t					0					0	0	+-			_	+	\dagger	\dagger						+	\dashv
0		E. faecalis		İ					0					0	0	+			4	_	T	_					0	+	╗
<u>S</u>		E. faecium						(٥					4	0				c	,		1					2	1	
Untersuchte Isolate		IdsznA	0						٥					9	2				ĸ								7		
ersu	MHK µg/ml	Teicoplanin		256				128	_	256				128	128 128	_	64			_		_				128			
Unt	N Pg	Vancomycin		512	512	512	512	512	212	512	512	512	512	512	512 512	128	512	512	512	2			512	712	712	512	512 512 512		
		Isolate	66s4 66s5 66s6	67m1	67m2	67m3	6/m4	67m5	g W	68m1	68m3	68m4	68m5	68m6	69m1 69m2	70m1	70s1	25	70s3	5		1	73m1	/3m2	73m4	73m5	73m6 73m7	T	٦
		0,01031	99	67,	671	671	5 5	671	10	88	3 &	88	681	68 1	69	70	2	2	2 2	2		ľ	3 3	2 6	2 6	2 6	2 2 2		
		E. hirae	0					C	0					2	0				0)							С	,	
		E. durans	0						0					0	2				_	+-							ľ	+	_
	VRE	E. casseliflavus E. flavescens	0						0 0					0 0	0 0	-				+-	+						0	+	-
	>	E. gallinarum	0))					0	0	+				+	\vdash							+	-
		E. faecalis	က						5					0	0	+-			7	+							0	+	┪
		E. faecium	0					Ć	٥					4	0				C)							2		
		ldsznA	ო					¢	٥					9	2				Ľ	0	۰	>					_		0
		E. hirae	0			-			0					2	0				C	_	+-	-					С	_	0
		E. durans	0						0					0	2	+			_	-	+	_					r.	+	0
	Ħ,	E. casseliflavus E. flavescens	0						0 0					0 0	0 0	+				_	+	-						+	0
	Gesamt	E. gallinarum	0	H))					0	0	+				+	+	+						+	0
	Ge	E. faecalis	5	T					4					4	4	+			Ľ	_	+	+					m	+	2
		E. faecium	5						٥					4	4	_			7		_	-					^		2
		JmssəĐ	10					,	10					10	10				5	10	4	2					10	9	10
		Herkunft	۵					c	ם					△	Q				_	ء اد	٥	٥						2	Z
		11101420						č	60					2g	1271a)			,	2 7	0 7	6 /						9 2	g
		Gewicht						,	1340g					392g	127				0210	10740	11072	-					3200		290g
			(wr											Hähnchenbrustfilets					<u> </u>	5							ē	5 9	en
			Bratwurst (Schw)					9	len					.nstl	Jen				Hähnchanfling	2	9	<u>_</u>					Hähnchenleber		Hähnchenherzen
		Probenart	rst (3	n C					nbr	nct				ģ	2	1	3					her		je l
			Wu					2	написиеи					che	Hähnchen				7	Hähnchen	Породоро	<u> </u>					hnc		JUC.
			Brat					_						lähr					:0 I	-	ľ						: T	1 2	Наг
				L					-							-				+	1	+							
			03.07.96					Ċ	85					2.96	.96				39 70 SC	90.	30'	9					96		98.
		Datum	3.07					,	23.07.96					23.07.96	23.07.96				× 07	23.07.06	20 70 66	5					23.07.96		23.07.96
			8					ć	Ý					2	23				ç	į	i	í					2,	i	Ý
		sisenA	99					1	٥/					89	69				9	2 2		4					73		74
				1																		_1_						1_	

Anhangstabelle 17 (Fortsetzung 7): Übersicht der untersuchten Geflügel- und Schweinefleischproben

			lsolate																						
			vanC2+3																						
		vanC	S S Nev															1							
		ž	1'Onev																						
			E. flavescens																						
			E. casseliflavus																						
			E. gallinarum																						
			ldszaA	0													•	>	0					0	0
			Isolate	75s1 75s2 75s3 75s4 75s5					80m1	80m2	80m3	80m4	80m5	80m6	80m7	80m8	80m9	8081	81m1 81m2						87s1
		-	E. hirae	0					8	ω	ω	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	ω		` >	<u> </u>						0
		-	E. durans	0														0	0						0
		٨	E. flavescens	0													(>	0						0
4.		vanA	E. casseliflavus	0													•	•	0						0
ate			E. gallinarum	0														2	0						0
sol			E. faecalis	9 (o	0	<u> </u>	_		_		-
te Is		•	Anzahl E. faecium	0 9														10 10	7					0	1 0
Untersuchte Isolate	<u> </u>	_	Teicoplanin						12	2	2	2	2	2	2	2	512		512						
ers	MHK	hg/ml		64 64 64 128 64 64 64							2	5	5	5	5	2	ر ا کا	Ω.	2 2	<u> </u>				0	128
Unte	Σ	рц	Vancomycin	256 256 256 256 256 256 256						512						512			512					4	512 4
			Isolate	75s1 75s2 75s3 75s4 75s5 75s6					80m1	80m2	80m3	80m4	80m5	80m6	80m7	80m8	80m9	RUSI	81m1 81m2					86s1	87s1 87s2
			E. hirae	0													(>	0					0	0
		ļ.	E. durans	0													(>	0					0	0
		VRE	E. flavescens	0														>	0					0	0
		>	E. gallinarum E. casseliflavus	0 0))	0					0 0	0 0
		-	E. faecalis	9														5		-				-	2 (
			E. faecium	0														2	N					0	0
			ldsznA	9	0	0	0	0										10	7	0	0	0	0	-	2
			E. hirae	0	0	0	0	0										5	0	0	0	0	0	0	0
			E. durans	0	0	0	0	0									(>	0	0	0	0	0	0	0
		+	E. flavescens	0	0	0	0	0										0	0	0	0	0	0	0	0
		an	E. gallinarum E. casseliflavus	0 (0 (0 (0 (0										2	0	0	0	0 (0	0 (0
		Gesamt	E. faecalis	0 9	5 0	5 0	9	5 0))	5	5 0	5 0	5 0	5 0	5 0	5 0
		9	E. faecium	4	2	2	2	2										2	2	+	-	2	5	5	2
			Gesamt	10	10	10	10	10										2	2	Η_	10	10	10	10	10
			Herkunft	٦ -	D 1		1 1	1										ו			1	D 1		٦ ۲	F ⁸ 1
			774117 20	Z		_	1	Ľ										4		Ľ	Ľ	1	Ľ	Z	Ш
			Gewicht	328g	500g	500g	500g	500g									0	booc	500g	500g	500g	500g	500g	1000g	972g
				8	5	τ)	Ω	Ω										_			2	2	5		σ
				yen	_	_	_	_									-	Hannchenschenkei	Hähnchenschenkel	jel	Jel	gen	ě	Hähnchenschenkel	
				näç	deir	deir	deir	deir									-	cue	she	ıflüç	ıflüç	mäg	Jeb	che	Jen
			Probenart	lenr	Hühnerklein	Hühnerklein	Hühnerklein	Hühnerklein										Sue)SUE	Hähnchenflügel	Hähnchenflügel	Jen	Hähnchenleber	ens(Hähnchen
				ınch	lühr	lüh	łüh	lüh									-	či L)che	hnc	hnc	ınch	hnc	Che	Häh
				Hähnchenmägen	1			-									1	lan	l ähr	Hä	Hä	Hähnchenmägen	Η̈́	lähr	_
	_																			-	_				
				96	96.	96.	96.	96.									Č	96	96	96.	96.	96.	96.	96.	96.
			Datum	23.07.96	12.11.96	12.11.96	12.11.96	12.11.96									3	12.11.96	12.11.96	12.11.96	12.11.96	12.11.96	12.11.96	19.11.96	19.11.96
				23	12	12	12	12	L								_ ;	7		12	12	12	12	18	16
			zisenA	75	92	77	82	79									9	80	81	82	83	84	85	98	87
					<u> </u>	<u> </u>		<u> </u>										-			1 -		1 -		

Anhangstabelle 17 (Fortsetzung 8): Übersicht der untersuchten Geflügel- und Schweinefleischproben

		amoci														s1								
		Isolate														101s1								
		vanC2+3														0								
	vanC	£3nsv														0								
	Ja J	Sangy														0								
		l'Onev		-	_											1							_	
		E. flavescens		_												0							_	
		E. casseliflavus		_												0							_	
	-	Anzahl E. gallinarum			0		0		0		0					1 1							0	
		lsolate	88m1 88m3													101m1		103m1	103m2	103m3	103M4			
		E. hirae	8 8													10		10	9	9	2		0	
	-	E. durans		_												0							0	
	⋖	E. flavescens		_	+											0							0	\dashv
	vanA	E. casseliflavus		_	+											0							0	\dashv
ē	~~	E. gallinarum		+	+											0							0	\dashv
<u>a</u>		E. faecalis		_	+											0							0	\dashv
SC		E. faecium	•	_	T											1							4	\dashv
Untersuchte Isolate	-	IdsznA			0		0		0		0					1							4	
rsuc	후 Ē	Teicoplanin	512 0 256	0	0		0		0		0					64 0		64	64	64	4 0	00	0	
Jnte	MHK µg/ml	Vancomycin	512 4 512	۰ ۱	2 2		2		2		4					256 4		256	256	256		2 2		
		lsolate	88m1 88m2 88m3	_	+-		92m1		94s1		96s1					101m1 101s1		103m1	103m2	103m3	103m4	103m5	103s2	
	_	E. hirae	C	0	0		0		0		0					0						(0	
		E. durans	C) (_		0		0		0					0							0	
	VRE	E. flavescens	C	_	_		0		0		0					0							0	
	₹.	E. casseliflavus	C	0	0		0		0		0					0						(0	
		E. gallinarum	C) (0		0		0		0					1						•	0	
		E. faecalis	7	_	_		0		1		1					0							7	
	_	E. faecium	٥) (0		_		0		0					1							2	
		ldsznA	_	+	-	0	-	0	-	0	1	0	0	0	0	2	0					ı	7	0
		E. hirae	C	_		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0						_	0
		E. durans	C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					•	0	0
	Ħ	E. flavescens		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					•	0	0
	ац	E. casseliflavus		_	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0						-	0
	Gesamt	E. gallinarum		_	_	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0						-	0
	G	E. faecalis	ц	+	_	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	4	2	_					-+	2
		E. faecium	ц		_	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2							2
		Gesamt	5			10	10	10	10	- 10	10	10	10	- 10	- 10	10	10							10
		Herkunft	Ц	-		z	۵	z	۵	₹	D	О	٥	z	N	N	z					:	4	Δ
		Gewicht	7007	130g	1000g	1500g	1500g	1400g	1300g	1400g				1032g	492g	450g	458g						826g	1336g
		Probenart	4.40 20 20 20 20 20 20 20 20 20 20 20 20 20	Hähnchen	Suppenhuhn	Hähnchen	Suppenhuhn	Hähnchen	Suppenhuhn	Hähnchen	Hackfleisch (Schw)	Bratwurst (Schw)	Bratwurst (Schw)	Hähnchenschenkel	Hähnchenschenkel	Hähnchenschenkel	Hähnchenschenkel						Hähnchentlügel	Hähnchen
		Datum	90	19.11.96	19.11.96	19.11.96	19.11.96	19.11.96	19.11.96	22.11.96	22.11.96	22.11.96	22.11.96	22.11.96	02.12.96	02.12.96	02.12.96						_	02.12.96
		Ansatz	Ö	8 8	8	91	95	93	94	92	96	26	86	66	100	101	102						103	104

Anhangstabelle 17 (Fortsetzung 9): Übersicht der untersuchten Geflügel- und Schweinefleischproben

			lsolate	105m1 105s1						111m1	11182							
		•	S+2Jnev	-							0							
		ပွ	vanC3	0							0							
		vanC	VanC2	0														
		_	1)nev	_							_							
			E. flavescens	0							0							
			E. casseliflavus	_							_							
			E. gallinarum	_							_							
			IdsznA	8			0	0	0		7	0					0	
			lsolate	105s5					110m1	111m2		112s1 112s2 112s3 112s4	113m1 113m2 113m3	113m5 113m5	113m6 113m9	113m10 113e1	11382	
			E. hirae	0					0		0	0					0	
		_	E. durans	0					1		_	0					7	
		vanA	E. flavescens	0					0		0	0			-		0	
		va	E. casseliflavus	0					0		0	0					0	
te			E. gallinarum	0					0		0	0					0	
Sa			E. faecalis	0					0		0	ო					_	П
SC			E. faecium	_					0		0	-					8	П
hte			IdsznA	-			0	0	1		-	4					10	П
Untersuchte Isolate	¥	Ē	Teicoplanin	32 0 0			0	0	512 0	0 512	00	256 256 256 256 256	512 512 512 512	256 512	512	512	512	
nter	УН W	mg/ml	Vancomycin	4 4 256			4	7	512 4	4 512	4 4	512 512 512 512 512	512 512 512 512	512	512	512	512	
ō			lsolate	105m1 105s1 105s2 105s5			108s1	109m1	110m1 110s1	111m1 111m2	111s1 111s2	112s1 112s2 112s3 112s4			113mb	113m10	113s2	
			E. hirae	0			0	0	0		0	0					0	
			E. durans	0			0	0	1		1	0					7	
		VRE	E. flavescens	0			0	0	0		0	0					0	
		8	E. casseliflavus	_			0	0	0		_	0					0	
			E. gallinarum	_			0	0	0		_	0					0	
			E. faecalis	-			7	0	1		_	က					_	
			E. faecium	~			0	1	0		0	-					∞	
			IdsznA	4	0	0	1	1	2		4	4					10	0
		ļ	E. hirae	0	0	0	0	0	0		0	0					0	0
		L	E. durans	0	0	0	0	0	1			0					_	0
		Ħ	E. flavescens	0	0	0	0	0	0		0	0					0	0
		an	E. casseliflavus	~	0	0	0	0	0		_	0					0	0
		Gesamt	E. gallinarum	~	0	0	0	0	0		_	0					0	0
		Ō	E. faecalis	က	2	2	2	2	5		4	4					_	2
			E. faecium	2	2	2	2	9	4	<u></u>	3	9			_	_	8	2
			Gesamt	10	10	10	10	10	10		10	10					10	10
			Herkunft	٥	۵	۵	Ω	٥	N		¥	ш					ш	ш
			Gewicht	1238g					471g		902g	500g					500g	500g
			Probenart	Hähnchen	Bratwurst (Schw)	Bratwurst (Schw)	Mett (Schw)	Hackfleisch (Schw)	Hähnchenbeine		Hähnchenflügel	Hähnchenflügel					Hühnerklein	Hähnchenmägen
			Muted	02.12.96	02.12.96	02.12.96	02.12.96	02.12.96	02.12.96		02.12.96	02.12.96					02.12.96	02.12.96
			Ansatz	105	106	107	108	109	110		1	112					113	114

Anhangstabelle 17 (Fortsetzung 10): Übersicht der untersuchten Geflügel- und Schweinefleischproben

		lsolate						
		vanC2+3						
	vanC	Vanc3						H
	20	VanC1						H
		E. flavescens						H
	-	E. casseliflavus						П
		E. gallinarum						
		ldszaA	0	0	0	0		
		lsolate	115m1 115m2 115m3 115m4 115m5	116m1 116m2 116m3 116m4 116s1 116s2 116s3	117m1 117m2 117m3 117m4 117m5 117m1			
		E. hirae	0	0	1			
	∢	E. durans	4	0	0			
	vanA	E. flavescens	0	0	0			
Ø	Š	E. casseliflavus	0	0	0			\sqcup
ate		E. gallinarum	0	0	0			$\vdash \vdash$
30		E. faecium E. faecalis	0	0 6	0 9			Н
Untersuchte Isolate		IdsznA	ت 1	6	9 2	0		H
nch	~ =	Teicoplanin	128 128 512 512 0 0 0	512 256 512 512 512 512 512 512	512 128 128 512 512 512	000		H
ersı	MHK µg/ml	Vancomycin	00000	512 512 5512 5512 5512 5512 5512 5512 5	512 5 512 12 512 12 512 5 512 5 512 5 512 5 512 5			H
ī	< 3	αίονισοοσελ				8 2 2		
)		lsolate	115m2 115m3 115m3 115m4 115m4 115s1 115s2 115s3 115s4	116m2 116m3 116m4 116s1 116s2 116s3 116s4	117m1 117m2 117m3 117m5 117m5	118s2 118s3 118s4		
	-	E. hirae	0	0	1	0		
		E. durans	4	0	0	0		
	VRE	E. flavescens	0	0	0	0		
	×	E. casseliflavus	0	0	0	0		
		E. gallinarum	0	0	0	0		
		E. faecalis	5	0	0	3		
		E. faecium	-	6	9	0		
		IdsznA	10	6	2	3	0	0
		E. hirae	0	0	~	0	0	0
		E. durans	4	0	0	0	0	0
	=	E. flavescens	0	0	0	0	0	0
	a	E. casseliflavus	0	0	0	0	0	0
	Gesamt	E. faecalis E. gallinarum	0	0	0	0	0 9	0
	9		5		8	2		
		E. faecium	-	6	9	5		
		JmssəĐ	10	10	10	10	10	10
		Herkunft	ш	Ш	٥	τ°	Ω	뉟
		Gewicht	5009	5009	500g	1000g	1200g	1300g
		Probenart	Hähnchenleber	Hühnerklein	Hähnchenherzen	Hähnchenschenkel	Suppenhuhn	Suppenhuhn
		Mutsu	02.12.96	02.12.96	02.12.96	02.12.96	02.12.96	02.12.96
		sisenA	115	116	117	118	119	120

Anhangstabelle 17 (Fortsetzung 11): Übersicht der untersuchten Geflügel- und Schweinefleischproben

		ejsiosi									121m2		121s1		121s4							
		vanC2+3														_						
	vanC	S)nsv														0						
	Na	VanC2														0						
		1'Onsv														7						
		E. flavescens														_						
		E. casseliflavus														0						
		E. gallinarum														7						
		IdszaA							0							က					0	0
		lsolate	127m1	127m3 127m4	127m5	127s1	127s2	12783 12784	127s5			1Z1m3									126s1	128s1
		E. hirae							1							0					0	0
	-	E. durans							0							0					0	0
	vanA	E. flavescens							0							0					0	0
	70	E. casseliflavus							0							0					0	0
3te		E. gallinarum							0							0					0	0
0		E. faecalis							1							0					1	0
<u>S</u>		E. faecium							7							7					0	1
hte		IdsznA				_	_	_	9		-			-		7					1	-
Untersuchte Isolate	MHK µg/ml	Teicoplanin	512	128	128	512	512	512	512						0						64	32
Inte	Z Š	Vancomycin	512 2				512	512 512	512						2 2						512	128
)		lsolate	127m1 127m2	127m3 127m4	127m5	127s1	127s2	12783 12784	127s5	121m1	121m2	121m3	121s1	12182	12183 12184						126s1	128s1
		E. hirae							_							0					0	0
		E. durans							0							0					0	0
	VRE	E. flavescens							0							_					0	0
	=	E. casseliflavus							0							0					0	0
		E. gallinarum							0							7					0	0
		E. faecium E. faecalis							8							3					0 1	1 0
		IdsznA							10							6	0	0	0	0	1	_
		E. hirae							1							0	0	0	0	0	0	0
		E. durans							0							0	0	0	0	0	0	0
		E. flavescens							0							_	0	0	0	0	0	0
	Ξ	E. casseliflavus							0							0	0	0	0	0	0	0
	Sa	E. gallinarum							0							7	0	0	0	0	0	0
	Gesamt	E. faecalis							1 (m	2	2	2	2	2	4
		E. faecium							8							4	2	2	2	2	2	9
		Gesamt							10							10	10	10	10	10	10	10
		Herkunft							ч							Ω	Δ	Δ	Ω	Ω	Q	ш
		Gewicht							372g							1200g					392g	332g
		Probenart							Hähnchenherzen							Hähnchen	Bratwurst (Schw)	Bratwurst (Schw)	Mett (Schw)	Hackfleisch (Schw)	Hähnchenmägen	Hähnchenleber
		Datum							14.03.97							02.12.96	14.03.97	14.03.97	14.03.97	14.03.97	14.03.97	14.03.97
		zisenA							127							121	122	123	124	125	126	128

Anhangstabelle 17 (Fortsetzung 12): Übersicht der untersuchten Geflügel- und Schweinefleischproben

		lsolate																					
		3,5,55,																					
		vanC2+3																					
	vanC	E Suev																					
	Š	Sansy																					
	-	E. flavescens																					
	-	E. casseliflavus																					
	-	E. gallinarum																					
	•	IdsznA 					0						0	•	0								0
		19024													_			_	(v 4			
		Isolate	129m1 129m2 129m3	129m5	129s1 129s2	129s3 129s4	129s5	130m1 130m2	130m3	130s1	130s2	130s3 130s4	130s5		132s1	133m1	133m3	133m4	133m6	133m12 133m14	13382	129s3	129s5
		3,5 55	129 129 129	2 22	2 2	5,5	129	5 5	5 5	<u> </u>	<u>3</u>	<u> </u>	13(13,	133	<u> </u>	5	33	333	5	2	129
	-	E. hirae					0						0		0					•			0
	_	E. durans					0						0		_								2
	vanA	E. flavescens					0						0		0								0
	Va	E. casseliflavus					0						0		0								0
ate		E. gallinarum					0						0		0								0
ö		E. faecalis					7						7		0								7
<u>S</u>		E. faecium					6						7		0								9
hte		ldsznA					6						6	0	_								10
Untersuchte Isolate	y =	Teicoplanin	256 64 64	6 4	512 512	32 512	512	00	28	00	0	00	0	00	32	256	256 256	256	256	256	256	512	512
ırsı	MHK µg/ml																				2	2	
ıte	≥ ₹	Vancomycin	512 512 512	512 512	512 512	256 512	512	512 512	512	512	128	512 512	256	ω 4	256	512	512	512	512	512	256	512	512
5													5	일 ;;									
		lsolate	129m1 129m2 129m3	29m5	129s1 129s2	129s3 129s4	129s5	130m1 130m2	30m3	130s1	130s2	130s3 130s4	130s5	131m2 131s1	132s1	133m1	133m3	133m4	133m6	133m12 133m14	133s2	129s3	129s5
			227				_	$\stackrel{\sim}{\sim}$	`` ;		_		1	~ ~		7	- ` ` 	÷	`` ;	. c.	. –	_	
	-	E. hirae					0						0	0	0								0
		E. durans					0						0		1								2
	VRE	E. casseliflavus E. flavescens					0 0						0 0	0	0 0								0 0
	_	E. gallinarum					0						0		0								0
	-	E. faecalis					_						2		0								7
	-	E. faecium					6						7	0	0								9
	•	עוודמווו					0																10
		IdsznA					10						6	7	1								
	-	E. hirae					0						0	0	0								0
		E. durans					0						0		1								2
	Ħ	E. casseliflavus E. flavescens					0 0						0 0	0	0 0								0 0
	sal	E. gallinarum					0						0		0								0
	Gesamt	E. faecalis					1						2	2	4								2
	U	E. faecium					6						8	4	2								9
		Gesamt					10						10	- 6	10								10
							7						_		7								7
		Herkunft					Ω						□	뉟	\forall								Ω
		Gewicht					494g						486g	570g	640g								1528g
		,,,,,,,,,					4						4	21	79								15
							_						_	<u></u>									_
							hke						nke	ş	_								h K
							che						che	che	klei								che
		Probenart					ens						ens	ens	Hühnerklein								ens
							Ch						ch	Š	lüh)C
							Hähnchenschenkel						Hähnchenschenkel	Hähnchenschenkel	T								Hähnchenschenkel
							I						I	I									I
							26						26	97	26								26
		Datum					14.03.97						14.03.97	14.03.97	14.03.97								14.03.97
							14						14.	4.	14.								14.
-							6						0		2								3
		zisenA					129						130	131	132								133
																							_

Anhangstabelle 17 (Fortsetzung 13): Übersicht der untersuchten Geflügel- und Schweinefleischproben

Highnorherwagen 1000g N Highnorherworker 1000g N Highnorherwagen 1000g N Highnorherworker 1000g N				l							
Highnortenwiggen High meschenkel High mesc								s1			11 2 12
Highrochemungen 10009 N. 1000 10009 N. 10000 N. 1000			atsloal					138			114
Highnorherwagen 1000g N Highnorherwell 1000g N Highnorherwel								-			
Highnorhenmaggen 1989 19			vanC2+3					0			0
Highnorhenmaggen 1989 19		5						0			0
Highnichendige 1542g 1 1 1 1 1 1 1 1 1		, Ya						0			7
Hährichenmägen 1900 Ni 10 10 10 10 10 10 10 1		-						_			0
Probenation 1960		-						_			2 0
Highrichenmidgen 1960g N.		_						1			0
Highrochemkel 1000g N Highrochemkel 1000g 100					0	0	0	1	0		7
Hamchenflige Suppensive Hamchenflige		1-1									
Hamchenflige Suppensive Hamchenflige		ISOIRE		5m2 5m3 5m3 5m3 5m6	3m,5 3m,5 3m,5 3m,5 3m,5 3m,5 3m,5 3m,5			981 981			
Highnortennentinger 10000g NL 10 10 10 10 10 10 10 1			, · ·		13, 13, 13, 13, 13, 13, 13, 13, 13, 13,	130			2, 2, 2, 2, 2, 5, 5, 5, 5, 5, 5, 5, 5, 5, 5, 5, 5, 5,		
Hähnchenntiige			E. hirae		0	0			0		
Hähnchennigen 5000 N Hühnchchenkel 10000 N H		_				0			5		
Hähnchennigen 5000 N Hühnchchenkel 10000 N H		ju.			0	0			0		
Hähnchenmägen 500 N N N N N N N N N	4	20									
Hähnchenmägen 500 N N N N N N N N N	ate										
Hähnchenmägen 500 N N N N N N N N N	sol			_						_	
Hähnchenmägen 500 N N N N N N N N N	e is							_		-	
Hähnchenmägen 500 N N N N N N N N N	ht						•	0			0
Hähnchenmägen 500g N Hähnchenmägen 500g N Hähnchenmägen 500g N 1388 138	enc	ᆂ	Teicoplanin		256 256 256 256 256 256 256	512 512 512 512 0 0 0	000	0	512 512 512 512 512		0000
Hähnchenmägen 500g N Hähnchenmägen 500g N Hähnchenmägen 500g N 1388 138	er	MF.	vancomycin		22222		222	4	222222		0000
Hähnchenmägen 500g N Hähnchenmägen 500g N Hähnchenmägen 500g N 1388 138	Jnt		.,	_						_	
Hähnchenmägen Hühnerkein Hühnerkein Hühnerkein 5009 E. dalinarun Hühnerkein 5009 E. dalinarun Hühnerkein 5009 E. dalinarun E. dali	_		อาธาอรา		5m1 5m2 5m3 5m3 5m5 5m6	3m1 3m2 3m3 3m4 3s1 3s2 3s3 3s4 3s5	7s1 7s4 7s5	3s1	9m1 9m3 9m3 9m5		m1 m2 1s2 1s3
Hähnchenmägen Hühnerklein		0,0 03		135 135 135 135 135 135	136 136 136 136 136 136 136 136	137 137 137	138	139 139 139 139 139		14 1 4 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	
Hähnchenmägen Hühnerklein		E. hirae			0	0	0			0	
Hähnchenmägen Hühnerschenkel 1542g Suppenhuhn Hühnchenmägen 1000g 10 10 10 10 10 10					_	0	0	0	r ₂		0
Hähnchenmägen Hühnerschenkel 1542g Suppenhuhn Hühnchenmägen 1000g 10 10 10 10 10 10		끭	E. flavescens		0	0	0	0	0		0
Hähnchenmägen Hühnerschenkel 1000g Hühnerschenkel 1000g 10 10 10 10 10 10		```			0	0	0	0	0		7
Hähnchenmägen Hähnchenmägen Hühnerschenkel Hühner											0
Hähnchennägen Hühnerschenkel Hühnchennägen Suppenhuhn Hühnerschenkel Hühnchennägen Hühnerschenkel Hühnerschen		-									2
Hähnchennägen Hühnchenkein 500g NL Hühnchenkein 500g NL 10 0 0 0 0 0 0 0 Hühnchenmägen 500g NL 10 0 0 0 0 0 0 0 Hühnchenmägen 500g NL 10 0 0 0 0 0 0 0 Hühnchenmägen 500g 0 0 0 0 0 0 0 0 0					2	4	0	0	0		0
Hähnchenmägen Hühnerschenkei 1542g D 10 D E. durans Hühnerschenkei 1000g NL 10 D D E. durans D D E. durans D D E. durans D D D E. durans D D D D D D D D D			IdsznA	0	9	6	က	1	9	0	4
Hähnchenmägen 500 NL Hühnerschenkel 1000g NL 10 0 0 0 0 0 0 0 0			E. hirae	0	0	0	0	1	0	0	0
Probenart Probenart Hähnchenritige 9549 NL 10 5 5 6 6 6 6 6 6 6 6				0	~	0	_	0	2	0	0
Hähnchenflügel 954g NL 1000g NL Herkunft 1000g NL 10 5 E. fæcium 1000g NL 10 5 Hühnerschenkel 1000g NL 10 5 E. fæcium 10 10 10 10 10 10 10 1		Ħ						_			0
Hähnchenflügel 954g NL 1000g NL Herkunft 1000g NL 10 5 E. fæcium 1000g NL 10 5 Hühnerschenkel 1000g NL 10 5 E. fæcium 10 10 10 10 10 10 10 1		ä									7
Hähnchenflügel 954g NL 1000g NL Herkunft 1000g NL 10 5 E. fæcium 1000g NL 10 5 Hühnerschenkel 1000g NL 10 5 E. fæcium 10 10 10 10 10 10 10 1		es									2 0
Probenart Suppenhuhn Suppenhuhn Suppenhuhn 1060g Gewicht 100 10 10 10 10 10 10		Ö									
Probenart Suppenhuhn 1060g NL Hähnchenflügel 954g NL Hühnerschenkel 1000g NL Hühnerschenkel 1000g NL Hühnerklein 500g NL Hühnerklein 500g NL											3
Probenart Suppenhuhn 1060g Hähnchenflügel 954g Hühnerschenkel 1000g Hühnerschenkel 1000g Hühnerschenkel 500g Hühnerklein 500g			tms292	1	7	1	7	11	5	۲	10
Probenart Suppenhuhn 1060g Hähnchenflügel 954g Hühnerschenkel 1000g Hühnerschenkel 1000g Hühnerschenkel 500g Hühnerklein 500g			Herkunft	뉟	٥	뒫	뉟	₹	뒫	뉟	뒫
Probenart Suppenhuhn Hähnchenflügel Hühnerschenkel Hühnerschenkel Hühnerschenkel Hühnerschenkel Hühnerklein				 							
Probenart Suppenhuhn Hähnchenflügel Hühnerschenkel Hühnerschenkel Hühnerschenkel Hühnerschenkel Hühnerklein			านวเพอก	50g	42g	<u>p</u>) 20g	00g	0)0g	500g
			740,1100	1 <u>0</u>	154	95	100	10	20	50	50
				٦	nke	jel	<u>k</u>	kel)eu	_	ě
				hur	che	ıflüç	hen	hen	mäć mäć	kleii	Jek
			Probenart	en	sue	her	rscl	rscl	nər	her	her
				ddn	che	hnc	ne	hne	l c	lüh	Hähnchenleber
				S	lähr	Hä	皇	Hü	اعتا	_	Ξ
7 9 7 9 7 9 7 9 7 9 7 9 7 9 7 9 1 1 1 1 1 1 1 1 2 2 3 4 4 5 6 6 7 8 8 9 8 9 9 1 1 1 2 2 2 3 4 4 5 6 6 7 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 8 <t< th=""><th></th><th></th><th></th><th></th><th></th><th></th><th></th><th></th><th></th><th></th><th></th></t<>											
				97	26	26	97	97	76	.97	97
14.03.97 14.03.97 14.03.97 14.03.97 14.03.97 14.03.97 14.03.97			Datum	.03	.03.	.03.	03.	.03	03.	.03	14.03.97
$\begin{vmatrix} 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 $				14	4	4	4	14	4,	14	4
			עוופמוד	4	ίΰ	Q	ŗ.	85	6	9	
2182nA 26 13 13 14 15 15 15 15 15 15 15			2,63u y	5	13	13	13	13	13	14	141

Anhangstabelle 17 (Fortsetzung 14): Übersicht der untersuchten Geflügel- und Schweinefleischproben

						_				
		lsolate				145m7			148m1	149s1
						4 5			14	17
		VanC2+3				C			0	0
	vanC	vanC3				C			0	0
	Va	VanG2				C			0	0
		VanC1				0			1	
		E. casseliflavus E. flavescens					1		0 0	0 0
		E. gallinarum							1	1
	•	IdsznA	0		0			0	1	-
					 		+			
		lsolate			144s1 144s3 144s4 144s5	145m1 145m2 145m3 145m4 145m7 145m8 145m8	146m1 146m2 146m3	147m1 147m2 147m3		
					2 2222	4 4 4 4 4 4 4 4	2 4 4	4 4 4		
		E. hirae			0	•		0		
	≰	E. durans			0		8	3		
	vanA	E. casseliflavus E. flavescens			0		0	0 0		
ā	>	E. gallinarum			0	-	0	0		
ja		E. faecalis			25			0		
Sc		E. faecium			0	· ·		0		
te		ldsznA	0		5	σ	က	3	0	0
Untersuchte Isolate	~ =	Teicoplanin	000		256 256 256 256 256 256 256	128 128 128 128 64 64 64	256 256 64 0	128 128 128	0	0 0
ers	MHK µg/ml				2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2	212 212 213 214 215 215 215 215 215 215 215 215 215 215				
Jut	< 1	Vancomycin	000					512 512 512 512	4	2 8
		lsolate	142s1 142s2 142s3		14481 14482 14483 14484 14485 14486	145m1 145m2 145m3 145m4 145m5 145m7 145m8 145m9	146m1 146m2 146m3 146s1	147m1 147m2 147m3	148m1	149m1 149s1
		, i i	4 4 4		4 4 4 4 4 4	4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4	4 4 4 4	14 14 14	148	14,
		E. hirae	0		0	0	0	0	0	0
		E. durans	0		0	C	2	3	0	0
	VRE	E. flavescens	0		0	C	0	0	0	0
	>	E. casseliflavus	7		0	C	1	0	0	0
	ŀ	E. gallinarum	0		0	0		0	1	7
		E. faecium E. faecalis	0		9		-	0 0	0 0	1 0
		IdeznA	က	0		5		3	1	2
		E. durans E. hirae	0	0 0	0	0		0	0 (0
	ŀ	E. flavescens	0	0	0			0 3	0 0	0 0
	Ę	E. casseliflavus	0	0				0	0	0
	sa	E. gallinarum	0	0	+	\		0	_	_
	Gesamt	E. faecalis	Ω	2	9	\		5	2	4
		E. faecium	5	2	4	w.	ო	2	4	5
		Gesamt	10	10	10	ç	9	10	10	10
		Herkunft	뉟	¥				D	D	D
		Gewicht	562g	1091g	1000a	2,50	984g	968g	527g	552g
			L.	1	7	α	0,	55	3)	(1)
			ke <u></u>		<u> </u>				ke	kel
			hen	hh		Ş	Ę.	H.	hen	hen
		Probenart	ıscl	ınhı	- Isc	4	jche	ıche	ารด	JSC
		,	jei	Suppenhuhn	<u> </u>	E Handhad	Hähnchen	Hähnchen	ihei	the
			Hähnchenschenkel	Su	Hähnchenschenkel	Ī	=		Hähnchenschenkel	Hähnchenschenkel
			H.						Hä	Нä
			Ž.	7	7	_	,	7	7	21
		Datum	3.9	3.9	13.9	4	6.4	14.9	9.4	94.9
		33,30	14.03.97	14.03.97	14.03.97	26.04.97	26.04.97	26.04.97	26.04.97	26.04.97
				-						
		zisenA	142	143	441	ት 44 ጽ	146	147	148	149
										_

Anhangstabelle 17 (Fortsetzung 15): Übersicht der untersuchten Geflügel- und Schweinefleischproben

		lsolate	150s1	151m2					156m1 156m2			159m3 159m4
		vanC2+3	0	0					0			0
	vanC	vanC3	0	0					0			0
	ā	vanC2	0	0					0			0
	_	1'Jnsv	_	_					2			2
		E. flavescens	0	0					0			0
		E. casseliflavus	0	0					0			0
		E. gallinarum	_	_					2			2
		IdsznA	-	-		0	0	0	2	0	0	2
		lsolate	150m1 150m2 150m3 150m4	151m1 151m3							158m1 158m2	159m1
		E. hirae	0	0							0	0
	1	E. durans	က	0							0	0
	Ž	E. flavescens	0	0							0	0
	vanA	E. casseliflavus	0	0							0	0
te		E. gallinarum	0	0							0	0
Sla		E. faecalis	0	0							0	0
SC		E. faecium	4	7							2	2
hte		IdsznA	4	2		0	0	0	0	0	2	2
rsuc	MHK µg/ml	Teicoplanin	512 512 0 0	512 0 512		0000	000	0 0 0	0	0	128 256	256 512 0 0 0
Untersuchte Isolate	≥ g	Vancomycin	512 2 512 3 512 4 512 5 2 8	1 512 2 8 3 512		2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2	000	0 0 0 0	4 4	4	256 512	512 512 3 8 4 8 5 2
١		lsolate	150m1 150m2 150m3 150m4 150m4 150m5	151m1 151m2 151m3		153m1 153m2 153m3 153m4 153m5	154m2 154m3 154m4	155m1 155m2 155m4 155m5	156m1 156m2	157m1	158m1 158m2	159m1 159m2 159m3 159m4 159m5
		E. hirae	0	0		0	0	0	0	0	0	0
		E. durans	က	0		0	0	0	0	0	0	0
	VRE	E. flavescens	0	0		0	0	0	0	0	0	0
	>	E. casseliflavus	0	0		0	0	0	0	0	0	0
		E. gallinarum	~	_		0	0	0	2	0	0	2
		E. faecalis	0	0		0	0	0	0	0	0	0
		E. faecium	5	2		5	3	4	0	1	2	3
		IdsznA	9	က	0	5	က	4	2	1	2	5
		E. hirae	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		E. durans	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		E. flavescens	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Ξ	E. casseliflavus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Sa	E. gallinarum	_	_	0	0	0	0	2	0	0	2
	Gesamt	E. faecalis	4	2		2	5	2	2	2	2	2
		E. faecium	D.	4	2	2	2	2	3	2	2	က
		Jmssant	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Herkunft	٥	٥	Ω	D	٥	٥	О	О	О	٥
		Gewicht	398g						712g	700g	612g	794g
		Probenart	Hähnchenbrustfilets	Hähnchenbrustfilets	Mett (Schw)	Mett (Schw)	Bratwurst (Schw)	Bratwurst (Schw)	Hähnchenbrustfilets	Hähnchenbrustfilets	Hähnchenschenkel	Hähnchenschenkel
		Datum	26.04.97 Hä	26.04.97 Hä	20.05.97	20.05.97	20.05.97 B	20.05.97 B	21.05.97 Hä	21.05.97 Hä	21.05.97 Hä	21.05.97 Hä
		Ansatz	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159

Anhangstabelle 17 (Fortsetzung 16): Übersicht der untersuchten Geflügel- und Schweinefleischproben

				_	_	_	
		lsolate	160s1 160s2	160s3	161s1		
		vanC2+3		0	0		6
	ပ	vanC3		0	0		0
	vanC	Sangy		0	0		ħΙ
	>	1:Onev					68
				3	_		
		E. flavescens		0	0		ı
		E. casseliflavus		0	0		22
		E. gallinarum		3	1		36
		IdsznA		3	1		79
		Isolate					
		E. hirae					10
	_	E. durans					34
late	vanA	E. flavescens					0
	Ja	E. casseliflavus					0
		E. gallinarum					ļ
		E. faecalis					31
20		E. faecium					721
hte i		IdsznA		0	0		203
such	¥ <u>E</u>	Teicoplanin	00	0	0		
Untersuchte Isolate	MHK µg/ml	Vancomycin	4 4	4	8		
Ō		Isolate	160s1 160s2	160s3	161s1		
		E. hirae		0	0		10
		E. durans		0	0		34
	ш	E. flavescens					<u>ι</u>
	VRE	E. casseliflavus		0	0 (22
	>			0	0		
		E. gallinarum		3	1		39
		E. faecalis		0	0		130
		E. faecium		0	0		184
		ldsznA		3	1	0	450
		E. hirae		0	0	0	10
		E. durans		0	0	0	34
		E. flavescens		0	0	0	ı
	Gesamt	E. casseliflavus		0	0	0	22
	ă	E. gallinarum		3	1	0	39
	ě	E. faecalis		2	4	5 (753
	0						
		E. faecium		2	2	2	487
		JmssəĐ		10	10	10	1643
		Herkunft		N	N	Ω	
		Gewicht		443g	460g		
		Probenart		Hähnchenschenkel	Hähnchenschenkel	Mett (Schw)	Gesamt
		Matum		21.05.97	21.05.97	21.05.97	
		zisenA		160	161	162	

Anhangstabelle 18: Aus Geflügelfleischproben verschiedener Herkunftsländer isolierte Enterokokken

ı								•	(70)						
E. spp.	Land							Anza	Anzahl (%)						
		VRE	VRE-Pos.1	van	vanA-VRE ²	vanA-+C1-VRE ³	1-VRE3	vanC	vanC1-VRE ³	van	vanC2-VRE⁴	vanC2	vanC2+C3-VRE ⁵	Ge	Gesamt
	D	101	(33,8)	08	(26,8)				0(0)	(567	(54,8)
	N	28	(15,2)	18	(8'6)				(0'0) 0	•				184	(33,7)
E. faecium	ш	31	(53,4)	67	(20,0)				(0'0) 0	•				89	(10,6)
	I						(0'0) 0	(0						2	(6,0)
	Insgesamt	160	(29,3)	127	(23,3)				0 (0,0)	(546	(47,5)
	Ο	36	(13,2)	10	(3,7)				0 (0,0)					272	(53,2)
	N	25	(26,3)	14	(7,1)				(0'0) 0	_				198	(38,7)
E. faecalis	ш	14	(38,9)	7	(19,4)				0 (0,0)					36	(7,0)
	I	3	(00'0)					0 (0,0)	(0,					9	(1,0)
	Insgesamt	105	(20,5)	31	(6,1)				(0'0) 0					511	(44,4)
	О	18	(100,0)	0	(0,0)	-	(2,6)	17	(94,4)		0 (0,0)	(0)		18	(52,9)
E. gallinarum	N	16	(100,0)		(0,0) 0	(0,		16	(100,0)		0(0)0	(0'(16	(47,1)
	Insgesamt	34	(100,0)	0	(0,0)	-	(5,9)	33	(97,1))) 0	0 (0,0)		34	(3,0)
	D	2	(100,0)			0 (0 (0,0)			9	(85,7)	1	(14,3)	2	(20,0)
E. casseliflavus	NL	2	(100,0)			0 (0(0,0)			7	(100,0)	0	(0,0)	2	(20,0)
	Insgesamt	14	(100,0)			0 (0	0 (0,0)			13	(92,9)	1	(7,1)	14	(1,2)
E. flavescens	D	1	(100,0)				0 (0,0)	(0)				1	(100,0)	1	(100,0)
	Insgesamt	1	(100,0)				0(0,0)	(0,				1	(100,0)	1	(0,1)
	D	8	(100,0)	8	(100,0)				0 (0,0)	(8	(23,5)
	NL	21	(100,0)	21	(100,0)				0 (0,0)	(21	(61,8)
E. durans	F	2	(100,0)	9	(100,0)				0 (0,0)	(9	(14,7)
	Insgesamt	34	(100,0)	34	(100,0)				0 (0,0)	(34	(3,0)
	D	2	(100,0)	9	(100,0)				0 (0,0)	(9	(50,0)
E. hirae	NL	4	(100,0)	4	(100,0)				0 (0,0)	(7	(40,0)
	ш	1	(100,0)	1	(100,0)				0 (0,0)	(l	(10,0)
	Insgesamt	10	(100,0)	10	(100,0)				(0,0) 0	(10	(0,9)
٥		176	(58,9)	103	(16,9)	-	(0,2)	17	(2,8)	9	(1,0)	7	(0,3)	610	(53,0)
NF		128	(29,8)	22	(13,3)	0	(0,0)	16	(3,7)	7	(1,6)	0	(0,0)	430	(37,4)
L		51	(51,0)	42	(42,0)				0 (0,0)			•		100	(8,7)
I		က	(30,0)					0 (0,0)	(0,					9	(6,0)
Insgesamt	amt	358	(31,1)	202	(17,6)	_	(0,1)	33	(2,9)	13	(1,1)	7	(0,2)	1150	(100,0)

* Prozentualer Anteil an den gesamten Enterokokkenspezies, isoliert aus Proben der jeweiligen Länder, ¹ Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE, Wachstum auf Columbia CNA-Agar, supplementiert mit 5mg Vancomycin/L); ² VRE, nur vanA-Gen-positiv; ³ VRE, vanA- <u>und</u> vanC1-Gen-positiv; ⁴ VRE, nur vanC2-Gen-positiv; ⁵ VRE, vanC2-Gen-positiv; ⁵ VRE, vanC2-Gen-positiv; once vanC2-Gen-positiv; once vanC2-Gen-positiv; once vanC2-Gen-positiv; once vanC3-Gen-positiv.

Anhangstabelle 19: Vorkommen von Vancomycin-resistenten Enterokokken in Geflügelfleischproben unterschiedlicher Hersteller

Hersteller			Anza	hl (%)*			
		Gesamt	VRE-pos. ¹	vanA-VRE ²	sonstige ³		
	A 1	7 (25,9)	7 (100,0)	4 (57,1)	2 (28,6)		
	A 2	1 (3,7)	1 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)		
Α	A 3	17 (63,0)	14 (82,4)	12 (70,6)	1 (5,9)		
A	A 4	1 (3,7)		0 (0,0)			
	A 5	1 (3,7)		0 (0,0)	_		
	Gesamt	27 (23,5)	22 (81,5)	16 (59,3)	3 (11,1)		
	B 1	2 (50,0)	2 (100,0)	2 (100,0)	0 (0,0)		
В	B 2	2 (50,0)		0 (0,0)	-		
В	Gesamt	4 (3,5)	2 (50,0)	2 (50,0)	0 (0,0)		
	C 1	5 (45,5)	5 (100,0)	3 (60,0)	1 (20,0)		
С	C 2	6 (50,0)	4 (66,7)	2 (33,3)	2 (33,3)		
O	Gesamt	11 (9,6)	9 (81,8)	5 (45,5)	3 (27,3)		
D		4 (3,5)	3 (75,0)	5 (25,0)	1 (25,0)		
Е		4 (3,5)	4 (100,0)	4 (100,0)	0 (0,0)		
	F 1	1 (16,7)	1 (100,0)	1 (100,0)	0 (0,0)		
F	F 2	2 (33,3)	1 (50,0)	1 (50,0)	0 (0,0)		
•	F 3	3 (50,0)	3 (100,0)	3 (100,0)	0 (0,0)		
	Gesamt	6 (5,2)	5 (83,3)	5 (83,3)	0 (0,0)		
	G 1	1 (20,0)	1 (100,0)	1 (100,0)	0 (0,0)		
G	G 2	4 (80,0)	4 (100,0)	4 (100,0)	0 (0,0)		
	Gesamt	5 (4,3)	5 (100,0)	5 (100,0)	0 (0,0)		
н	H 1	6 (16,7)	6 (100,0)	4 (66,7)	2 (33,3)		
	H 2	13 (36,1)	9 (69,2)	1 (7,7)	5 (38,5)		
	H 3	12 (33,3)	5 (41,7)	1 (8,3)	2 (16,7)		
	H 4	1 (2,8)	1 (100,0)	0 (0	0,0)		
	H 5	4 (11,1)	2 (50,0)	2 (50,0)	0 (0,0)		
	Gesamt	36 (31,3)	23 (63,9)	8 (22,2)	9 (25,0)		
Rest		18 (15,7)	14 (77,8)	4 (22,2)	3 (16,7)		
Insgesamt		115 (100,0)	87 (75,7)	50 (43,5)	19 (16,5)		

^{*}Prozentualer Anteil an den gesamten untersuchten Geflügelfleischproben des jeweiligen Herstellers

¹Nachweis von Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) in den Proben, Wachstum auf Columbia CNA-Agar, supplementiert mit 5mg Vancomycin/L);

²Nachweis *van*A-Gen-positiver VRE in den Proben (*van*A, *van*A- <u>und</u> *van*C1, *van*A- <u>und</u> *van*C2, *van*A- *van*C1 <u>und</u> *van*C2, *van*A- *van*C1- *van*C2- <u>und</u> *van*C3);

³Nachweis *van*B-, nur *van*C1-, nur *van*C2-, nur *van*C2- <u>und</u> *van*C3-Gen positiver VRE in den Proben.

X. LITERATURVERZEICHNIS

AARESTRUP, F. (1995)

Occurence of glycopeptide resistance among *Enterococcus faecium* isolates from conventional and ecological poultry farms.

Microb. Drug Resistance 1, 255-257.

AARESTRUP, F., P. AHRENS, M. MADSEN, L. PALLESCEN, R. POULSEN und H. WESTH (1996)

Glycopeptide susceptibility among Danish *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates of animal and human origin and PCR identification of genes within the VanA-cluster.

Antimicrob. Agents Chemother. 40, 1938-1940.

ACAR, J. und A. BUU-HOI (1988)

Resistance patterns of important gram-positive pathogens.

J. Antimicrob. Chemother. 21, 41-47.

ANTALEK, M., J. MYLOTTE, A. LESSE und J. SELLICK (1995)

Clinical and molecular epidemiology of *Enterococcus faecalis* bacteremia, with special reference to strains with high-level resistance to gentamicin.

Clin. Infect. Dis. 20, 103-109.

APPELBAUM, P., M. JACOBS, J. HEALD, W. PALKO, A. DUFFETT, R. CRIST und P. NAUGLE (1984)

Comparative evaluation of the API 20S system and the automicrobic system grampositive identification card for species identification of streptococci.

J. Clin. Microbiol. **19**, 164-168.

APPELBAUM, P., M. JACOBS, W. PALKO, E. FRAUENHOFFER und A. DUFFETT (1986)

Accuracy and reproducibility of the IDS RapID STR system for species identification of streptococci.

J. Clin. Microbiol. 23, 843-846.

ARIHARA, K., R. CASSENS und J. LUCHANSKY (1994)

Metmyoglobinreduktion durch Enterokokken.

Fleischwirtschaft 74, 1249-1250.

ARTHUR, M. und P. COURVALIN (1993)

Genetics and mechanism of glycopeptide resistance in enterococci.

Antimicrob. Agents Chemother. **37**, 1563-1571.

AUSUBEL, F., R. BRENT, R. KINGSTON, D. MOORE, J. SEIDMANN, J. SMITH und K. STRUHL (1990)

Current Protocols in Molecular Biology.

Vol. 1, Kap. 2.4.1, Chichester, John Wiley.

BABUL, N. und M. PASKO (1988)

Teicoplanin: A new glycopeptide antibiotic complex.

Drug. Intell. Clin. Pharm. 22, 218-226.

BAGER, F., F. AARESTRUP, M. MADSEN und H. WEGENER (1999)

Glycopeptide resistance in *Enterococcus faecium* from broilers and pigs following discontinued use of avoparcin.

Microb. Drug. Resist. 5, 53-56.

BARTON, A. und G. DOERN (1995)

Selective media for detecting gastrointestinal carriage of vancomycin-resistant enterococci.

Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 23, 119-122.

BATES, J., J. JORDENS und D. GRIFFITHS (1994)

Farm animals as a putative reservoir for vancomycin-resistant enterococcal infection in man.

J. Antimicrob. Chemother. 34, 507-514.

BATIS, J., I. SENK und I. BRGLEZ (1966)

Streptococcal endocarditis in pigs.

Vet. Arh. 36, 337-345.

zitiert in: **BLOBEL, H. und T. SCHLIESSER (1994)** Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren Streptokokken-Infektionen und Rotlauf.

Bd. II, Teil 2, 2. Auflage, 95-100.

BEHNKE, D., P. TOMICH und D. CLEWELL (1980)

Electron microscopic mapping of deletions on a streptococcal plasmid carrying extraordinarily long inverted repeats.

Plasmid. 4, 139-147.

BELL, J., J. PATON und J. TURNIDGE (1998)

Emergence of vancomycin-resistant enterococci in Australia: phenotypic and genotypic characteristics of isolates.

J. Clin. Microbiol. 36, 2187-2190.

BENNET, P. (1995)

The spread of drug resistance.

zitiert in: BAUMBERG, S., J. YOUNG, E. WELLINGTON und J. SAUNDERS

Population genetics in bacteria.

University Press, Cambridge. 317-344.

BERG, D., N. AKOPYANTS und D. KERSULYTE (1994)

Fingerprinting microbial genomes using the RAPD or AP-PCR method.

Methods in molecular and cellular biology. 5, 13-24.

BERT, F., C. BRANGER und N. LAMBERT-ZECHOVSKY (1997)

Pulsed-field gel electrophoresis is more discriminating than multilocus enzyme electrophoresis and random amplified polymorphic DNA analysis for typing pyogenic streptococci.

Curr. Microbiol. 34, 226-229.

BIAVASCO, F., E. GIOVANETTI, A. MIELE, C. VIGNAROLI, B. FACINELLI und P. VARALDO (1996)

In vitro conjugative transfer of *van*A vancomycin resistance between enterococci and Listeriae of different species.

Eur. J. Microbiol. Infect. Dis. 15, 50-59.

BISCHOFF, W., T. REYNOLDS, G. HALL, R. WENZEL und M. EDMOND (1999)

Molecular epidemiology of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* in a large urban hospital over a 5 year period.

J. Clin. Microbiol. 37, 3912-3916.

BLOBEL, H. und T. SCHLIESSER (1994)

Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren Streptokokken-Infektionen und Rotlauf.

Bd. II, Teil 2, 2. Auflage, 95-100.

BONTEN, M., M. HAYDEN, C. NATHAN, T. RICE und R. WEINSTEIN (1998)

Stability of vancomycin-resistant enterococcal genotypes isolated from long-term-colonized patients.

J. Infect. Dis. 177, 378-382.

BORGEN, K., G. SIMONSEN, A. SUNDSFJORD, Y. WASTESON, O. OLSVIK und H. KRUSE (2000a)

Continuing high prevalence of VanA-type vancomycin-resistant enterococci on Norwegian poultry farms three years after avoparcin was banned.

J. Appl. Microbiol. 89, 478-485.

BORGEN, K., M. SORUM, H. KRUSE und Y. WASTESON (2000b)

Persistence of vancomycin-resistant enterococci (VRE) on Norwegian broiler farms.

FEMS Microbiol. Lett. 191, 255-258.

BOYCE, J., S. OPAL, J. CHOW, M. ZERVOS, G. POTTER-BYNOE, C. SHERMAN, R. ROMULO, S. FORTNA und A. MEDEIROS (1994)

Outbreak of multi drug resistant *Enterococcus faecium* with transferable *van*B class vancomycin resistance.

J. Clin. Microbiol. 32, 1148-1153.

BRENNER, D. und W. SHAW (1985)

The use of synthetic of synthetic oligonucleotides with the universal templates for rapid DNA sequencing: results with staphylococcal replicon pC221. EMBO J. **4,** 561-568.

BÜLTE, M. (1994)

Eignung molekularbiologischer Verfahren für die Lebensmittelmikrobiologie-Status quo und Perspektiven.

Arch. Lebensmittelhyg. 45, 103-106.

BUTAYE, P., L. DEVRIESE, H. GOOSSENS, M. IEVEN und F. HAESEBROUCK (1999a)

Enterococci with acquired vancomycin resistance in pigs and chickens of different age groups.

Antimicrob. Agents Chemother. 43, 365-366.

BUTAYE, P., L. DEVRIESE und F. HAESEBROUCK (1999b)

Comparison of direct and enrichment methods for the selective isolation of vancomycin-resistant enterococci from feces of pigs and poultry.

Microb. Drug Resist. **5**, 131-134.

CHAN, YOW CHEONG (1999)

South China Morning Post, 11.08.99.

CHENG, S., F. McCLESKEY, M. GRESS, J. PETROZIELLO, R. LIU, H. NAMDARI, K. BENINGA, A. SALMEN und V. DELVECCHIO (1997)

A PCR assay for identification of *Enterococcus faecium*.

J. Clin. Microbiol. 35, 1248-1250.

CHOPRA, I. und M. ROBERTS (2001)

Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance.

Microbiol. Mol. Biol. Rev. 65, 232-260.

CHOW, J., A. KURIZA, D. SHLAES, M. GREEN, D. SAHM und M. ZERVOS (1993)

Clonal spread of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* between patients in three hospitals of two states.

J. Clin. Microbiol. **31**, 1609-1611.

CLARK, N., R. COOKSLEY, B. HILL, J. SWENSON und F. TENOVER (1993)

Characterization of glycopeptide resistant enterococci from U.S. hospitals. Antimicrob. Agents Chemother. **37**, 2311-2317.

CLARK, N., L. TEIXEIRA, R. FACKLAM und F. TENOVER (1998)

Detection and differentiation of *van*C1, *van*C2 and *van*C3 glycopeptide resistance genes in enterococci.

J. Clin. Microbiol. 36, 2294-2297.

CLEWELL, D., P. TOMICH, M. GAWRON-BURKE, A. FRANKE und Y. YAGI (1982)

Mapping of *Streptococcus faecalis* plasmids pAD1 and pAD2 and studies relating to transposition of Tn917.

J. Bacteriol. 152, 1220-1230.

COCCONCELLI, P., D. PORRO, S. GALANDINI und L. SENINI (1995)

Development of RAPD protocol for typing of strains of lactic acid bacteria and enterococci.

Lett. Appl. Microbiol. 21, 376-379.

COLLINS, M., D. JONES, J. FARTOW, R. KLIPPER-BÄLZ und K. SCHLEIFER (1984)

Enterococcus avium nom. rev., comb. nov; *E. casseliflavus* nom. rev., comb. nov.; *E. durans* nom. rev., comb. nov.; *E. gallinarum* comb. nov.; and *E. malodoratus* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. **34,** 220-223.

COLLINS, M., R. FACKLAM, J. FARROW und R. WILLIAMSON (1989)

Enterococcus raffinosus sp. nov., Enterococcus solitarius sp. nov. and Entero-coccus pseudoavium sp. nov.

FEMS Microbiol. Lett. 57, 283-288.

COLLINS, M., U. RODRIGUES, N. PIGOTT und R. FACKLAM (1991)

Enterococcus dispar sp. nov. a new *Enterococcus* species from human sources. Lett. Appl. Microbiol. **12**, 95-98.

COLLINS, L., G. MALANOSKI, G. ELIOPOULOS, C. WENNERSTEN, M. FERRARO und R. MOELLERING JR. (1993)

In vitro activity of RP59500, an injectable streptogramin antibiotic, against vancomycin-resistant gram-positive organisms.

Antimicrob. Agents Chemother. 37, 598-601.

COURVALIN, P. (1999)

pers. Mitteilung.

COOK, F. und W. FARRAR (1978)

Vancomycin revisited.

Ann. Intern. Med. 88, 813-818.

COQUE, T. und B. MURRAY (1995)

Identification of *Enterococcus faecalis* strains by DNA hybridization and pulsed-field gel electrophoresis.

J. Clin. Microbiol. **33**, 3368-3369.

COQUE, T., J. TOMAYKO, S. RICKE, P. OKHYUSEN und B. MURRAY (1996)

Vancomycin-resistant enterococci from nosocomial, community, and animal sources in the United States.

Antimicrob. Agents Chemother. 40, 2605-2609.

CUNY, C., H. CLAUS und W. WITTE (1996)

Discrimination of *S. aureus* strains by PCR for r-RNA gene spacer size polymorphism and comparison to *Sma*l macrorestriction patterns. Zbl. Bakt. **283**, 466-476.

DERLOT, E. und P. COURVALIN (1991)

Mechanismus and implications of glycopeptide resistance in enterococci. Am. J. Med. **91**, 82-85.

DESCHEEMAEKER, P., C. LAMMENS, B. POT, P. VANDAMME und H. GOOSSENS (1997)

Evaluation of arbitrarily primed PCR analysis and pulsed-field gel electrophoresis of large genomic DNA fragments for identification of enterococci important in human medicine.

Int. J. Syst. Bacteriol. 47, 555-561.

DESCHEEMAEKER, P., S. CHAPELLE, L. DEVRIESE, P. BUTAYE, P. VANDAMME und H. GOOSSENS (1999)

Comparison of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* Isolates and glycopeptide resistance genes of Human and animal origins.

Antimicrob. Agents Chemother. 43, 2032-2037.

DE VAUX, A., G. LAGUERRE, C. DIVIES und H. PREVOST (1998)

Enterococcus asini sp. nov. isolated from the caecum of donkeys (*Equus asinus*). Int. J. Syst. Bacteriol. **48**, 383-387.

DEVER, L., S. SMITH, D. DEJESUS, M. MASUREKAR, D. PATEL, Z. KAMINSKI und W. JOHANSON JR. (1996)

Treatment of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* infections with an investigational streptogramin antibiotic (quinupristin/ dalfopristin): a report of fifteen cases.

Microb. Drug. Resist. 2, 407-413.

DEVRIESE, L., K. CEYSSENS, U. RODRIGUES und M. COLLINS (1990)

Enterococcus columbae, a species from pigeon intestines. FEMS Microbiol. Lett. **71**, 247-252.

DEVRIESE, L., J. HOMMNEZ, R. WYFFELS und F. HAESEBROUCK (1991)

Composition of the enterococcal and streptococcal intestinal flora of poultry. J. Appl. Bacteriol. **71**, 46-50.

DEVRIESE, L., L. LAURIER, P. DE HERDT und F. HAESEBROUCK (1992)

Enterococcal and streptococcal species isolated from faeces of calves, young cattle and dairy cows.

J. Appl. Bacteriol. 72, 29-31.

DEVRIESE, L. und B. POT (1995)

The genus *Enterococcus*.

in **WOOD, B. und W. HOLZAPFEL:** The genera of the lactic acid bacteria. University of Strathclyde, Department of Bioscience and Biotechnology Glasgow, UK, 328-367.

DEVRIESE, L., B. POT, K. KESTERS, S. LAUWERS und F. HAESEBROUCK (1996)

Adifikation of Methyl-α-D-Glucopyranoside: a useful test to differentiate Enterococcus casseliflavus and Enterococcus gallinarum from Enterococcus faecium species group and from Enterococcus faecalis.

J. Clin. Microbiol. 34, 2607-2608.

DIXON, W. (Chief Editor, 1993)

BMDP Statistical Software Manual.

Volume 1 and 2. University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London.

DUTKA-MALEN, S., R. LECLERCQ, V. COUTANT, J. DUVAL und P. COURVALIN (1990)

Phenotypic and genotypic heterogeneity of glycopeptide resistance determinants in gram positive bacteria.

Antimicrob. Agents Chemother. 34, 1875-1879.

DUTKA-MALEN, S., B. BLAIMONT, G. WAUTERS und P. COURVALIN (1994)

Emergence of high level resistance to glycopeptides in *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus*.

Antimicrob. Agents Chemother. 38, 1675-1677.

DUTKA-MALEN, S., S. EVERS und P. COURVALIN (1995)

Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR.

J. Clin. Microbiol. 33, 24-27.

EISENACH, K. (1992)

Chromosomal restriction fragment analysis by pulsed field gel electrophoresis. In: **ISENBERG, H.** (ed.): Clinical Microbiology Procedures Handbook. 10.5.c.1-10.5.c.11.

EISENSHMITH, S. (1993)

PlotIT – Graphics & Statistics.

Scientific Programming Enterprises, Haslett, MI 48840 USA.

EISENSHMITH, S. (1994)

PlotIT for Windows.

Scientific Programming Enterprises, Haslett, MI 48840 USA.

ELIOPOULOS, G. (1993)

Increasing problems in the therapy of enterococcal infections.

Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 12, 409-412.

ELLERBROEK, L., N. DAM-LU, P. KRAUSE und E. WEISE (1996)

Use of bioluminescence assay for rapid estimation of microbial numbers in poultry meat.

Concerted Action CT94-1456 "Microbial control in the meat industry".

ELLERBROEK, L., P. RICHTER, L. BOUCHETTE, R. LEMCKE, M. BÜLTE, E. WEISE und G. HILDEBRANDT (1999)

Isolation und Identifikation glycopeptidresistenter Enterokokkenspezies aus Mastgeflügel.

Abstract und Poster 40. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Dtsch. Vet. Med. Ges. (DVG), Eigenverlag der DVG, Gießen.

ELSNER, H., I. SOBOTTKA, H. FEUCHT, E. HARPS, C. HAUN, D. MACK, R. GANSCHOW, R. LAUFS und P. KAULFERS (2000)

Nosocomial outbreak of vancomycin-resistant Enterococcus faecium at a German university pediatric hospital.

Int. J. Hyg. Environ. Health. 203, 147-152.

ENDTZ, H., N. VAN DEN BRAAK, A. VAN BELKUM, J. KLUYTMANS, J. KOELE-MAN, L. SPANJAARD, A. VOSS, A. WEERSINK, C. VANDENBROUCKE-**GRAULS, A. BUITING, A. VAN DUIN und H. VERBRUGH (1997)**

Fecal carriage of vancomycin-resistant enterococci in hospitalized patients and those living in the community in The Netherlands.

J. Clin. Microbiol. **35**, 3026-3031.

ENDTZ, H., N. VAN DEN BRAAK, A. VAN BELKUM, W. GOESSENS, D. KREFT, A. STROEBEL und H. VERBRUGH (1998)

Comparison of eight methods to detect vancomycin resistance in enterococci. J. Clin. Microbiol. **36**, 592-594.

EVERS, S., R. QUINTILIANI JR. und P. COURVALIN (1996)

Genetics of glycopeptide resistance in enterococci.

Microb. Drug. Resist. 2, 219-223.

FILLIPOV, F. und M. KAPITANAKI (1968)

Chronischer Verlauf der Streptokokkenseptikämie bei Hühnern. Veterinariia. 45, 37-39.

FINES, M., B. PERICHON, P. REYNOLDS, D. SAHM und P. COURVALIN (1999)

VanE, a new type of acquired glycopeptide resistance in Enterococcus faecalis BM 4405.

Antimicrob. Agents Chemother. 43, 2161-2164.

FONTANA, R., M. LIGOZZI, C. PEDROTTI, E. PADOVANI und G. CORNAGLIA (1997)

Vancomycin resistant Bacillus circulans carrying the vanA gene responsible for vancomycin resistance in enterococci.

Eur. J. Microbiol. Infect. Dis. 16, 473-474.

FRAIMOW, H., D. JUNGKIND, D. LANDER, D. DELSO und J. DEAN (1994)

Urinary tract infection with an Enterococcus faecalis isolate that requires vancomycin for growth.

Ann. Intern. Med. 121, 22-26.

FRANZ, C., W. HOLZAPFEL und M. STILES (1999)

Enterococci at the crossroads of food safety? Int. J. Food Microbiol. 47, 1-24.

FRIDKIN, S., D. YOKOE, C. WHITNEY, A. ONDERDONK und D. HOOPER (1998)

Epidemiology of a dominant clonal strain of vancomycin-resistant *Enterococcus* faecium at separate hospitals in Boston, Massachusetts.

J. Clin. Microbiol. 36, 965-970.

FRIEDEN, T., S. MUNSIFF, D. LOW, B. WILLEY, G. WILLIAMS, Y. FAUR, W. EISNER, S. WARREN und B. KREISWIRTH (1993)

Emergence of vancomycin resistant enterococci in New York City. Lancet. **342**, 76-79.

FUJITA, N., M. YOSHIMURA, T. KOMORI, K. TANIMOTO und Y. IKE (1998)

First report of the isolation of high-level vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from a patient in Japan.

Antimicrob. Agents Chemother. 42, 2150.

FULLER, R. (1989)

Probiotics in man and animals.

J. Appl. Bact. 66, 365-378.

GAMBAROTTO, K., M. PLOY, F. DUPRON, M. GIANGIOBBE und F. DENIS (2001)

Occurrence of vancomycin-resistant enterococci in pork and poultry products from a cattle-rearing area of france.

J. Clin. Microbiol. 39, 2354-2355.

GEISEL, R., F. SCHMITZ und W. WITTE (1999)

Vancomycin intermediär sensible *S. aureus* Isolate- Eine neue Dimension der Multiresistenzentwicklung bei MRSA? Mikrobiol. **9,** 125- 128.

GIRAFFA, G. und F. SISTO (1997)

Susceptibility to vancomycin of enterococci isolated from dairy products. Lett. Appl. Microbiol. **25**, 335-338.

GOERING, R. und T. DUENSING (1990)

Rapid field inversion gel electrophoresis in combination with an rRNA gene probe in the epidemiological evaluation of Staphylococci.

J. Clin. Microbiol. **28**, 426-429.

GORDILLO, M., K. SINGH und B. MURRAY (1993)

Comparison of ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis for subspecies differentiation of strains of *Enterococcus faecalis*.

J. Clin. Microbiol. 31, 1570-1574.

GORDTS, B., H. VAN LANDUYT, M. IEVEN, P. VANDAMME und H. GOOSSENS (1995)

Vancomycin-resistant enterococci colonizing the intestinal tracts of hospitalized patients.

J. Clin. Microbiol. **33**, 2842-2846.

GORDON, S., J. SWENSON, B. HILL, N. PIGOTT, R. FACKLAM, R. COOKSEY, C. THORNSBERRY, W. JARVIS und F. TENOVER (1992)

Antimicrobial susceptibility patterns of common and unusual species of enterococci causing infections in the United States. Enterococcal Study Group. J. Clin. Microbiol. **30**, 2373-2378.

GOUBY, A., M. CARLES-NURIT, N. BOUZIGES, G. BOURG, R. MESNARD und P. BOUVET (1992)

Use of pulsed field gel electrophoresis for investigation of hospital outbreaks of *Acinetobacter baumannii*.

J. Clin. Microbiol. **30**, 1588-1591.

GRAY, J., D. STEWART und S. PEDLER (1991)

Species identification and antibiotic susceptibility testing of enterococci isolated from hospitalized patients.

Antimicrob. Agents. Chemother. 35, 1943-1945.

GRAY, J. und S. PEDLER (1992)

Antibiotic-resistant enterococci.

J. Hosp. Infect. 21, 1-14.

GREEN, M., R. WADOWSKI und K. BARBADORA (1990)

Recovery of vancomycin-resistant gram-positive cocci from children.

J. Clin. Microbiol. 28, 484-488.

GROSSO, M., A. CAPRIOLI, P. CHINZARI, M. FONTANA, G. PEZZOTTI, A. MANFRIN, E GIANNATALE, E. GOFFREDO und A. PANTOSTI (2000)

Detection and characterization of vancomycin-resistant enterococci in farm animals and raw meat products in Italy.

Microb. Drug Resist. 6, 313-318.

GROTHUES, D. und B. TÜMMLER (1991)

New approaches in genome analysis by pulded field gel electrophoresis: application to the analysis of *Pseudomonas* species.

Mol. Microbiol. 5, 2763-2776.

GUIOT, H., W. PEETERMANS und F. SEBENS (1991)

Isolation of vancomycin-resistant enterococci in haematologic patients.

Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 10, 32-34.

HAHN, G. (1984)

Enterokokken: Ihre Bedeutung als Krankheitserreger, Indikatorkeime und Starterkulturen im Bereich der Lebensmittelhygiene in: Neue Erkenntnisse über die Erreger bakterieller Lebensmittel-Infektionen.

Schweizerische Gesellschaft für Lebensmittelhygiene (SGLH).

Schriftenreihe 14, 67-82.

HALL, L. und R. WILLIAMS (1992a)

Vancomycin resistant *Enterococcus durans*.

Lanced. **340**, 1105.

HALL, L., B. DUKE, M. GUINEY und R. WILLIAMS (1992b)

Typing of *Enterococcus* species by DNA restriction fragment analysis.

J. Clin. Microbiol. **30**, 915-919.

HAMMES, P. und D. HALLER (1998)

Wie sinnvoll ist die Anwendung von Probiotika in Fleischwaren? Fleischwirtschaft **78**, 301-306.

HANDWERGER, S., J. SKOBLE, L. DISCOTTO und M. PUCCI (1995)

Heterogeneity of the *van*A gene cluster in clinical isolates of enterococci from the northeastern United States.

Antimicrob. Agents. Chemother. 39, 362-368.

HEESCHEN, W. und G. HAHN (1999)

Handbuch Lebensmittelhygiene, Mikrobieller Verderb. Behr's Verlag, ISBN 3-86022-525-1, Kap. 2.2.1, S. 2-4

HEIDER, G., MONREAL, G. und J. MESZAROS (1992)

Krankheiten des Wirtschaftsgeflügels.

Verlag Gustav Fischer, Stuttgart, 1992, Band 1, Kap.11, 227-231.

HERMANS, P. und M. WILHELM (1987)

Vancomycin.

Mayo. Clin. Proc. 62, 901.

HOEFFLER, D. und U. ZIMMERMANN (1997)

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci. Lancet **350**, 739.

HWANG, Y., B. BRINTON, R. LEONARD, S. BLUE, M. WOODS und K. CARROLL (1998)

Investigation of an outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a low prevalence university hospital.

J. Investig. Med. 46, 435-443.

IHLENBURG, H. (1960)

Experimentelle Prüfung der Streptokokken der serologischen Gruppe D als Endocarditis-Erreger.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 73, 189-193.

JAYARATNE, P. und C. RUTHERFORD (1999)

Detection of clinically relevant genotypes of vancomycin-resistant enterococci in nosocomial surveillance specimens by PCR.

J. Clin. Microbiol. **37**, 2090-2092.

JAYARAO, B. und S. OLIVER (1994)

Polymerase chain reaction-based DNA Fingerprinting for identification of *Streptococcus* and *Enterococcus* species isolated from bovine milk.

J. food. Prot. **57**, 240-248.

JOHNSON, J., S. WEAGANT, K. JINNEMAN und J. BRYANT (1995)

Use of pulsed-field gelelectrophoresis for epidemiological study of *Escherichia coli* 01 57:H7 during a food-borne outbreak.

Appl. Environ. Microbiol. 61, 2806-2808.

JONES, R., E. KEHRBERG, M. ERWIN, S. ANDERSON und F. GROUP (1994)

Prevalence of important pathogens and antimicrobial activity of parenteral drugs at numerous medical centers in the United States. I. Study on the threat of emerging resistances: real or perceived?

Diag. Microbiol. Infect. Dis. 19, 203-215.

JORDENS, J., J. BATES und D. GRIFFITHS (1994)

Faecal carriage and nosocomial spread of vancomycin-resistant *Enterococcus* faecium.

J. Antimicrob. Chemother. 34, 515-528.

JORTNER, B. und C. HELMBOLDT (1966)

The histopathology of avian valvular endocarditis due to non-haemolytic streptococci. Lab Invest. **15**, 1127-1130.

KADO, C. und S. LIU (1981)

Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. J. Bact. **145**, 1365-1373.

KAMPHUES, J. (1999)

Leistungsförderer mit antibiotischer Wirkung aus der Sicht der Tierernährung. Proceed. 23. Kongress Antibiotikaresistenz der Dtsch. Vet. Med. Ges. (DVG). Eigenverlag der DVG (ISBN 3-930511-67-3), Gießen, S. 77-96.

KAPITANAKI, M. (1966)

A comparative study of streptococcal infections in chickens. Veterinariia. **43**, 47-50.

KARLOWSKY, J., G. ZHANEL und D. HOBAN (1999)

Vancomycin-resistant enterococci (VRE) colonization of high-risk patients in tertiary Canadian hospitals.

Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 35, 1-7.

KE, D., F. PICARD, F. MARTINEAU, C. MENARD, P. ROY, M. OUELLETTE und M. BERGERON (1999)

Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci.

J. Clin. Microbiol. **37**, 3497-3503.

KIELWEIN, G. (1978)

Vorkommen und Bedeutung von Enterokokken in Milch und Milchprodukten. Arch. Lebensmittelhyg. **29**, 127-128.

KLARE, I., E. COLLATZ, S. AL-OBEID, J. WAGNER, A. RODLOFF und W. WITTE (1992)

Glycopeptidresistenz bei *Enterococcus faecium* aus Besiedelungen und Infektionen von Patienten aus Intensivstationen Berliner Kliniken und einem Transplantationszentrum.

ZAC Zschr. Antimicrob. antineoplast. Chemother. 10, 45-53.

KLARE, I., H. HEIER, H. CLAUS und W. WITTE (1993)

Environmental strains of *Enterococcus faecium* with inducible high-level resistance to glycopeptides.

FEMS Microbiol. Lett. 106, 165-172. Erratum in: 107, 349.

KLARE, I., und W. WITTE (1994)

Neue Resistenzeigenschaften bei bakteriellen Erregern von Krankenhausinfektionen.

Bundesgesundhbl. 1, 17-24.

KLARE, I., H. HEIER, H. CLAUS, G. BÖHME, S. MARIN, G. SELTMANN, R. HAKENBECK, V. ANTANASSOVA und W. WITTE (1995a)

Enterococcus faecium strains with vanA mediated high level glycopeptide resistance isolated from animal foodstuffs and faecal samples of humans in the community.

Microb. Drug Resistance 125, 165-172.

KLARE, I., H. HEIER, H. CLAUS, R. REISSBRODT und W. WITTE (1995b)

VanA-mediated high-level glycopeptide resistance in *Enterococcus faecium* from animal husbandry.

FEMS Microbiol. Lett. **125**, 165-172.

KLARE, I., W. WITTE, A. REINHARDT, H. JUST, U. EßINGER und D. HÖFFLER (1996)

Ausbrüche von Infektionen mit *van*A-positiven high-level glycopeptidresistenten *Enterococcus faecium* (VRE) in Deutschland.

Abstract-Band 48. Jahrestagung der Dtsch. Ges. f. Hyg. u. Mikrobiol. (DGHM). Eigenverlag der DGHM, Bonn, S. 154.

KLARE, I., und W. WITTE (1997a)

Glykopeptidresistente Enterokokken: Zur Situation in Deutschland.

Hyg. u. Mikrobiol. **2**, 31-38.

KLARE, I., C. KONSTABEL, und R. BASTROP (1997b)

Simple and rapid extraction of enterococcal DNA suitable for PCR of vancomycin resistance genes by use of the ion exchanger Chelex 100 Resin.

In: Methodische Entwicklungen in der mikrobiologischen Nukleinsäure-Diagnostik, Abstract Band 3./ 4. Posterworkshop, Dez. 1995/ Dez.1996, Berlin.

Eigenverlag der Hyg. Med., Berlin, S. 33-34.

KLARE, I. und R. REISSBRODT (1998)

Glycopeptide-resistant enterococci (GRE).

Biotest Bulletin 6, 59-64.

KLARE, I., D. BADSTUBNER, C. KONSTABEL, G. BOHME, H. CLAUS und W. WITTE (1999)

Decreased incidence of VanA-type vancomycin-resistant enterococci isolated from poultry meat and from fecal samples of humans in the community after discontinuation of avoparcin usage in animal husbandry.

Microb. Drug Resist. 5, 45-52.

KLEIN, G., A. PACK, C. HALLMANN und G. REUTER (1998a)

Vancomycin resistent enterococci in raw minced meat in Germany and the influence of avoparcin on the occurence of VRE in poultry.

4. Weltkongress, Lebenmittelinfektionen und -intoxikationen, 7-12 Juni 1998. S-B **30**, 484-489

KLEIN, G., A. PACK und G. REUTER (1998b)

Antibiotic resistance patterns of enterococci and occurrence of vancomycinresistant enterococci in raw minced beef and pork in Germany.

Appl. Environ. Microbiol. **64**, 1825-1830.

KLEIN, G. (1999)

Resistenzverhalten von Mikroorganismen in Lebensmitteln.

Proceed. 23. Kongress Antibiotikaresistenz der Dtsch. Vet. Med. Ges. (DVG).

Eigenverlag der DVG (ISBN 3-930511-67-3), Gießen, S. 97-111.

KLUYTMANS, J., W. VAN LEEUWEN, W. GOESSENS, R. HOLLIS, S. MESSER, L. HERWALDT, H. BRUINING, M. HECK, J. ROST, N. VAN LEEUWEN, A. VAN BELKUM und H. VERBRUGH (1995)

Food-initiated outbreak of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* analyzed by pheno- and genotyping.

J. Clin. Microbiol. **33**, 1121-1128.

KRONVALL, G., S. RINGERTZ, S. NYSTROM, M. RYLANDER und E. THEODORSSON (1991)

Comparison of 30 microgram and 120 microgram gentamicin disks for the prediction of gentamicin resistance in *Enterococcus faecalis*. APMIS. **99**, 887-892.

KRUSE, H., B. JOHANSEN, L. RORVIK und G. SCHALLER (1999)

The use of avoparcin as a growth promoter and the occurrence of vancomycinresistant *Enterococcus* species in Norwegian poultry and swine production. Microb. Drug Resist. **5**, 135-139.

KÜHN, I., L. BURMAN, S. HAEGGMAN, B. TULLUS und B. MURRAY (1995)

Biochemical fingerprinting compared with ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis of DNA for epidemiological typing of enterococci. J. Clin. Microbiol. **33**, 2812-2817.

KUSUDA, R., K. KAWAI, F. SALATI, C. BANNER und J. FRYER (1991)

Enterococcus seriolicida sp. nov., a fish pathogen.

Int. J. Syst. Bacteriol. 41, 406-409.

LAI, E., B. BIRREN, S. CLARK, M. SIMON und L. HOOD (1989)

Overview- Pulsed field gel electrophoresis. BioTechniques **7**, 34-42.

LANDMAN, D., J. QUALE, E. OYDNA, B. WILLEY, V. DITORE, M. ZAMAN, K. PATEL, G. SAURINA und W. HUANG (1996)

Comparison of five selective media for identifying fecal carriage of vancomycinresistant enterococci.

J. Clin. Microbiol. 34, 751-752.

LANDMAN, D., F. VOLKERT, V. MANIKAL, G. SAURINA, Y. RUAN, E. OYDNA, C. PAROLA und J. QUALE (1999)

Vancomycin- resistant enterococci in Brooklyn, New York: A moment in time. Clin. Inf. Dis. **29**, 1587-1588.

LANDRY, S., D. KAISER und R. WENZEL (1989)

Hospital stay and mortality attributed to nosocomial enterococcal bacteremia: a controlled study.

Am. J. Infect. Control. 17, 323-329.

LECLERCQ, R., E. DERLOT, J. DUVAL und P. COURVALIN (1988)

Plasmid mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus* faecium.

New Engl. J. Med. 319, 157-161.

LECLERCQ, R. und P. COURVALIN (1991)

Bacterial resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics by target modification.

Antimicrob. Agents Chemother. 35, 1267-1276. Erratum in: 35, 2165.

LECLERCQ, R. und P. COURVALIN (1997)

Resistance to glycopeptides in enterococci.

Clin. Infect. Dis. 24, 545-54; 555-556.

LEMCKE, R. und M. BÜLTE (2000)

Occurrence of the vancomycin-resistant genes *van*A, *van*B, *van*Cl, *van*C2 and *van*C3 in *Enterococcus* strains isolated from poultry and pork.

Int. J. Food Microbiol. 60, 185-194.

LIGOZZI, M., M. ALDEGHERI, S. PREDARI und R. FONTANA (1991)

Detection of penicillin-binding proteins immunologically related to penicillin-binding protein 5 of *Enterococcus hirae* ATCC 9790 in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*.

FEMS Microbiol. Lett. **67**, 335-339.

LIVORNESE, L., S. DIAS, C. SAMEL, B. ROMANOWSKI, S. TAYLOR, P. MAY, P. PITSAKIS, G. WOODS, D. KAYE, M. LEVISON und C. JOHNSON (1992)

Hospital aquired infektion with vancomycin resistant *Enterococcus faecium* transmitted by electronic thermometers.

Ann. Int. Med. 177, 112-116.

LEWIS, C. und M. ZERVOS (1990)

Clinical manifestation of enterococcal infections

Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 9, 111-117.

LORENZ, R. (1996)

Grundbegriffe der Biometrie.

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York (3. Aufl.).

LUNDSTROM, T. und J. SOBEL (1995)

Vancomycin, Trimethoprim-Sulfamethoxazole and Rifampin.

Inf. Dis. Clin. N. Am. 9, 747-767.

LUDWIG, W., E. SEEWALDT, R. KILPPER-BÄLZ, K.SCHLEIFER, L. MAGRUM, C. WOESE, G. FOX und E. STACKEBRANDT (1985)

The phylogenetic position of *Streptococcus* and *Enterococcus*.

J. Gen. Microbiol. 131, 543-551.

LUGINBUHL, L., H. ROTBART, R. FACKLAM, M. ROE und J. ELLIOT (1987)

Neonatal enterococcal sepsis: case-control study and description of an outbreak. Pediatr. Infect. Dis. J. **6**, 1022-26.

LYON, B. und B. SKURRAY (1987)

Antimicrobial resistance of Staphylococcus aureus: genetic basis.

Microbiol. Rev. **51**, 88-134.

MAKI, D. und W. AGGER (1998)

Enterococcal bacteremia: Clinical features, the risk of endocarditis, and management.

Medicine 67, 246-269.

MALABARBA, A., R. CIABATTI, R. SCOTTI, B. GOLDSTEIN, P. FERRARI P, M. KURZ, B. ANDREINI und M. DENARO (1995)

New semisynthetic glycopeptides MDL 63,246 and MDL 63,042, and other amide derivatives of antibiotic A-40,926 active against highly glycopeptide-resistant VanA enterococci.

J. Antibiot. **48**, 869-883.

MALATHUM, K., K. SINGH, G. WEINSTOCK und B. MURRAY (1998)

Repititive sequence based PCR versus pulsed field gel electrophoresis for typing of *Enterococcus faecalis* at the subspecies level.

J. Clin. Microbiol. 36, 211-215.

MANDELL, G., D. KAYE und M. LEVINSON (1970)

Enterococcal endocarditis: an analysis of 38 patients observed at the New York Hospital-Cornell Medical Center.

Arch. Int. Med. 125, 258-264.

MANERO, A. und A. BLANCH (1999)

Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key.

Appl. Environ. Microbiol. 65, 4425-4430.

MARTINEZ-MURCIA, A. und M. COLLINS (1991)

Enterococcus sulfureus, a new yellow-pigmented Enterococcus species.

FEMS Microbiol. Lett. 80, 69-74.

MASLOW, J., A. SLUTSKY und R. ARBEIT (1993a)

Application of pulsed-field gel electrophoresis to molecular epidemiology.

In: PERSING, D., T. SMITH, F. TENOVER und T. WHITE (eds.).

Diagnostic Molecular Microbiology, Mayo Foundation, Rochester, USA: 563-572.

MASLOW, J., M. MULLIGAN und R. ARBEIT (1993b)

Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms.

Clin. Infect Dis. 17, 153-164.

MATTHES, S. und HANSCHKE, J. (1977)

Experimentelle Untersuchungen zur Übertragung von Bakterien über das Hühnerei. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. **90**, 200-203.

MATO, R., H. DE LENCASTRE, R. ROBERTS und A. TOMASZ (1996)

Multiplicity of genetic backgrounds among vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates recovered from an outbreak in a New York City hospital. Microb. Drug Resist. **2**, 309-317.

MATUSHEK, M., M. BONTEN und M. HAYDEN (1996)

Rapid preparation of bacterial DNA for pulsed-field gel electrophoresis. J. Clin. Microbiol. **34**, 2598-2600, Erratum in: J. Clin. Microbiol. **35**, 536.

McCLELLAND, M., R. JONES, Y. PATEL und M. NELSON (1987)

Restriction endonucleases for pulsed field mapping of bacterial genomes. Nucl. Ac. Res. **15**, 5985-6005.

McGEER, A. und D. LOW (2000)

Vancomycin-resistant enterococci. Semin. Respir. Infect. **15**, 314-326.

McKESSAR, S., A. BERRY, J. BELL, J. TURNIDGE und J. PATON (2000)

Genetic characterization of *van*G, a novel vancomycin resistance locus of *Enterococcus faecalis*.

Antimicrob. Agents Chemother. 44, 3224-3228.

McNEIL, S., N. CLARK, P. CHANDRASEKAR und C. KAUFFMAN (2000)

Successful treatment of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia with linezolid after failure of treatment with synercid (quinupristin/dalfopristin). Clin. Infect. Dis. **30**, 403-404.

MELLMANN, A., D. ORTH, M. DIERICH, F. ALLERBERGER, I. KLARE und W. WITTE (2000)

Nosocomial cross transmission as a primary cause of vancomycin-resistant enterococci in Austria.

J. Hosp. Infect. 44, 281-287.

MERLINO, J., S. SIARAKAS, G. ROBERTSON, G. FUNNELL, T. GOTTLIEB und R. BRADBURY (1996)

Evaluation of CHROMagar Orientation for differentiation and presumptive identification of gram-negative bacilli and *Enterococcus* species.

J. Clin. Microbiol. 34, 1788-1793. Erratum in: J. Clin. Microbiol. 35, 2190.

MEVIUS, D., L. DEVRIESE, P. BUTAYE, P. VANDAMME, M. VERSCHURE und K. VELDMAN (1998)

Isolation of glycopeptide resistant *Streptococcus gallolyticus* strains with *van*A, *van*B, and both *van*A and *van*B genotypes from faecal samples of veal calves in The Netherlands.

J. Antimicrob. Chemother. 42, 275-276.

MEKONEN, E., G. NOSKIN, D. HACEK und L. PETERSON (1995)

Successful treatment of persistent bacteremia due to vancomycin-resistant, ampicillin-resistant *Enterococcus faecium*.

Microb. Drug Resist. 1, 249-253.

MINEV, M. und I. MINEVA (1969)

Untersuchungen einer Streptokokkose beim Hund.

Kongr. Mikrobiol. Sofija, bulg. Akad. Naukite. 2, 309-313.

MIRANDA, A., K. SINGH und B. MURRAY (1991)

DNA fingerprinting of *Enterococcus faecium* by pulsed field gel electrophoresis may be a useful epidemiologic tool.

J. Clin. Microbiol. 29, 2752-2757.

MOELLERING, R., C. WENNERSTEN, T. MEDREK und A. WEINBERG (1970)

Prevalence of high level resistance to aminoglycosides in clinical isolates of enterococci.

Antimicrob. Agents Chemother. 7, 335-340.

MOELLERING, R. (1991)

The *Enterococcus*: a classic example of the impact of antimicrobial resistance on therapeutic options.

J. Antimicrob. Chemother. 28, 1-12.

MOELLERING, R. (1995)

Enterococcus species, Streptococcus bovis, and Leuconostoc species

In: MANDELL, G., J. BENNET, R. DOLIN et al.

Principles and practice of infectious diseases, fourth edition.

Vol 1. New York, Edinburg, London, Madrid, Melbourne, Milan, Tokyo: Churchill Livingston, S. 1826-1835.

MOELLERING, R. (1998)

Vancomycin resistant enterococci.

Clin. Infect. Dis. 26, 1196-1199.

MONSTEIN, H., Y. JOHANSSON und J. JONASSON (2000)

Detection of vancomycin resistance genes combined with typing of enterococci by means of multiplex PCR amplification and multiple primer DNA sequencing. APMIS **108**, 67-73.

MORRISON, D., B. JONES, C. EGLETON und B. COOKSON (1997)

PCR typing of *Enterococcus faecium*. An evaluation.

Adv. Exp. Med. Biol. 418, 387-391.

MORRISON, D., N. WOODFORD, S. BARRETT, P. SISSON und B. COOKSON (1999)

DNA banding pattern polymorphism in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and criteria for defining strains.

J. Clin. Microbiol. 37, 1084-1091.

MORY, F., A. LOZNIEWSKI, V. DAVID, J. CARLIER, L. DUBREUIL und R. LECLERCQ (1998)

Low-level vancomycin resistance in *Clostridium innocuum*.

J. Clin. Microbiol. 36, 1767-1768.

MOSSEL, D., P. BIJKER und I. EELDERING (1978)

Streptokokken der Lancefield-Gruppe D in Lebensmitteln und Trinkwasser- Ihre Bedeutung, Erfassung und Bekämpfung.

Arch. Lebensmittelhyg. 39, 121-127.

MOUTHON, L., J. MAINARDI und L. GUTMANN (1997)

Treatment of infections caused by highly resistant enterococci.

Int. J. Antimicob. Agents. 8, 233-238.

MÜTZEL-GRAMANN, M. (1998)

Mikrotiterplatten zur Differenzierung von *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium*- "FaecaDiff".

Mikrobiol. **8,** 97-98.

MULLIS, K. und F. FALOONA (1987)

Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction methods.

Enzymol. 155, 335-350.

MURRAY, B. (1990a)

The life and times of the Enterococcus.

Clin. Microbiol. Rev. 3, 46-65.

MURRAY, B., K. SINGH, J. HEATH, B. SHARMA und G. WEINSTOCK (1990b)

Comparison of genomic DNA of different enterococcal isolates using restriction endonucleases with infrequent recognition sites.

J. Clin. Microbiol. **28**, 2059-2063.

NAVARRO, F. und P. COURVALIN (1994)

Analysis of genes encoding D-alanine-D-alanine ligase-related enzymes in *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus flavescens*.

Antimicrob. Agents. Chemother. 38, 1788-93.

NOBLE, W., Z. VIRANI und R. CREE (1992)

Co-transfer of vancomycin resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*.

FEMS. Microbiol. Lett. 93, 195-198.

NOLTE, F., K. ARNOLD, H. SWEAT, E. WINTON und G. FUNKE (1996)

Vancomycin resistant *Aureobacterium* species cellulitis and bacteremia in a patient with acute myelogenous leukaemia.

J. Clin. Microbiol. 34, 1992-1994.

NOSKIN, G., M. TILL, B. PATTERSON, J. CLARKE und J. WARREN (1991)

High-level gentamicin resistance in *Enterococcus faecalis* bacteremia.

J. Infect. Dis. 164, 1212-1215.

OZAWA, Y., K. TANIMOTO, T. NOMURA, M. YOSHINAGA, Y. ARAKAWA und Y. IKE (2002)

Vancomycin-resistant enterococci in humans and imported chickens in Japan. Appl. Environ. Microbiol. **68**, 6457-6461.

PANTOSTI, A., M. DEL GROSSO, S. TAGLIABUE, A. MACRI und A. CAPRIOLI (1999)

Decrease of vancomycin-resistant enterococci in poultry meat after avoparcin ban. Lancet **354**, 741-742.

PATEL, R., J. UHL, P. KOHNER, M. HOPKINS und F. COCKERILL, 3RD (1997)

Multiplex PCR detection of vanA, vanB, vanC-1, and vanC-2/3 genes in enterococci.

J. Clin. Microbiol. 35, 703-707.

PATTERSON, J., K. SINGH und B. MURRAY (1991)

Epidemiology of an endemic strain of beta-lactamase-producing *Enterococcus faecalis*.

J. Clin. Microbiol. **29**, 2513-2516.

PATTERSON, J., A. SWEENEY, M. SIMMS, N. CARLEY, R. MANGI, J. SABETTA und R. LYONS (1995)

An analysis of 110 serious enterococcal infections. Epidemiology, antibiotic susceptibility and outcome.

Medicine (Baltimore) **74**, 191-200.

PEGUES, D., C. PEGUES, P. HIBBERD, D. FORD und D. HOOPER (1997)

Emergence and dissemination of a highly vancomycin resistant *van*A strain of *Enterococcus faecium* at a large teaching hospital.

J. Clin. Microbiol. 35, 1565-1570.

PERICHON, B., P. REYNOLDS und P. COURVALIN (1997)

VanD-type glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* BM4339. Antimicrob. Agents Chemother. **41**, 2016-2018.

PERLADA, D., A. SMULIAN und M. CUSHION (1997)

Molecular epidemiology and antibiotic susceptibility of enterococci in Cincinnati, Ohio: a prospective citywide survey.

J. Clin. Microbiol. 35, 2342-2347.

PESET, V., P. TALLON, C. SOLA, E. SANCHEZ, A. SARRION, C. PEREZ-BELLES, A. VINDEL, E. CANTON und M. GOBERNADO (2000)

Epidemiological, microbiological, clinical, and prognostic factors of bacteremia caused by high-level vancomycin-resistant *Enterococcus* species.

J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 19, 742-749.

PETRICH, A., K. LUINSTRA, D. GROVES, M. CHERNESKY und J. MAHONY (1999)

Direct detection of *van*A and *van*B genes in clinical specimens for rapid identification of vancomycin resistant enterococci (VRE) using multiplex PCR. Mol. Cell. Probes **13**, 275-281.

PFALLER, M., J. ACAR, R. JONES, J. VERHOEF, J. TURNIDGE und H. SADER (2001)

Integration of molecular characterization of microorganisms in a global antimicrobial resistance surveillance program.

Clin. Infect. Dis. 32, 156-167.

PIEHL, I., M. BÜLTE und G. REUTER (1999)

Pulsfeld-Gelelektrophorese zur Feindifferenzierung von Mikroorganismen- ein Beitrag zur Charakterisierung von Probiotika-Stämmen.

Proceed. 40. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Dtsch. Vet. Med. Ges. (DVG), Eigenverlag der DVG, Gießen, S. 226-233.

PIONTKOWSKI, A. (1997)

Fütterungsarzneimittel: Aspekte zu Rechtsgrundlagen und zur Überwachung. Amtstierärztl. Dienst. Lebensmittelk. **4,** 219-221.

PLOY, M., C. GRELAUD, C. MARTIN, L. DE LUMLEY und F. DENIS (1998)

First clinical isolate of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a French hospital.

Lancet 351, 1212.

POMPEI, R., F. BERLUTTI, M. THALLER, A. INGIANNI, G. CORTIS und B. DAINELLI (1992)

Enterococcus flavescens sp. nov., a new species of enterococci of clinical origin. Int. J. Syst. Bacteriol. **42**, 365-369. Erratum in: **43**, 190.

POULSEN, R., L. PALLESEN, N. FRIMODT-MOLLER und F. ESPERSEN (1999)

Detection of clinical vancomycin-resistant enterococci in Denmark by multiplex PCR and sandwich hybridization.

APMIS **107**, 404-412.

POWER, E., Y. ABDULLA, H. TALSANIA, W. SPICE, S. AATHITHAN und G. FRENCH (1995)

VanA genes in vancomycin resistant clinical isolates of Oerskovia turbata and Arcanobacterium (Corynebacterium) haemolyticum.

J. Antimicrob. Chemother. 36, 595-606.

POYART, C., C. PIERRE, G. QUESNE, B. PRON, P. BERCHE und P. TRIEUCUOT (1997)

Emergence of vancomycin resistance in the genus Streptococcus:

Characterization of a vanB transferable determinant in Streptococcus bovis.

Antimicrob. Agents Chemother. 41, 24-29.

PRIVITERA, O., F. SISTO, V. GIUFFRIDA, M. PUNTORIERI, C. CASCONE, I. DI SILVESTRO, G. RAPPAZZO und S. STEFANI (1999)

Reverse transcription polymerase chain reaction method for the detection of glycopeptide resistance in enterococci.

J. Microbiol. Methods. **35**, 95-100.

QUEDNAU, M., S. AHRNE, A. PETERSSON und G. MOLIN (1998a)

Identification of clinically important species of *Enterococcus* within 1 day with randomly amplified polymorphic DNA (RAPD).

Curr. Microbiol. 36, 332-336.

QUEDNAU, M., S. AHRNE, A. PETERSSON und G. MOLIN (1998b)

Antibiotic-resistant strains of *Enterococcus* isolated from Swedish and Danish retailed chicken and pork.

J. Appl. Microbiol. 84, 1163-1170.

QUINTILIANI, R., S. EVERS und P. COURVALIN (1993)

The *van*B gene confers various levels of self-transferable resistance to vancomycin in enterococci.

J. Inf. Dis. **167**, 1220-1223.

QUINTILIANI, R. und P. COURVALIN (1995)

Mechanisms of resistance to antimicrobial agents.

In: MURRAY, P., E. BARON, M. PFALLER, F. TENOVER und R. YOLKEN (eds.) Manual of Clinical Microbiology, 6th edn, ASM, Washington D.C., 1308-1326.

RADU, S., H. TOOSA, R. RAHIM, A. REEZAL, M. AHMAD, A. HAMID, G. RUSUL und M. NISHIBUCHI (2001)

Occurrence of the *van*A and *van*C2/C3 genes in *Enterococcus* species isolated from poultry sources in Malaysia.

Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 39, 145-153.

REINERT, R., G. CONRADS, J. SCHLAEGER, G. WERNER, W. WITTE, R. LUTTICKEN und I. KLARE (1999)

Survey of antibiotic resistance among enterococci in North Rhine-Westphalia, Germany.

J. Clin. Microbiol. **37**, 1638-1641.

REINHARDT, A., I. KLARE, H. JUST und W. WITTE (1996)

First reported outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE) of VanA-type in Germany.

36th ICAAC New Orleans, J 36.

REUTER, G. (1968)

Erfahrungen mit Nährböden für die selektive mikrobiologische Analyse von Fleischerzeugnissen.

Arch. Lebensmittelhyg. 19, 53-57 und 84-89.

REUTER, G. (1978)

Selektive Kultivierung von "Enterokokken" aus Lebensmitteln tierischer Herkunft. Arch. Lebensmittelhyg. **29**, 128-131.

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 J. MESZAROS

Krankheiten des Wirtschaftsgeflügels Verlag Fischer, Stuttgart, 1992,

Band 2, 439-460, Kap. 56.

RICHTER, A. und W. LÖSCHER (1996)

Zusatzstoffe mit pharmakologischer Wirkung

in: FREY, H. und W. LÖSCHER (Hrsg)

Lehrbuch der Pharmakoklogie und Toxikologie für die Veterinärmedizin,

Enke Verlag Stuttgart, 718-724.

RISTOW, T., G. NOSKIN, J. WARREN und L. PETERSON (1995)

In vitro activity of RP 59500 (quinupristin/dalfopristin) and ramoplanin against vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*.

Microb. Drug Resist. 1, 335-339.

ROBERTS, M. (1996)

Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility and distribution.

FEMS Microbiol. Rev. 19, 1-24.

ROBREDO, B., K. SINGH, F. BAQUERO, B. MURRAY und C. TORRES (2000)

Vancomycin-resistant enterococci isolated from animals and food.

Int. J. Food Microbiol. **54**, 197-204.

RODRIGUES, U. und M. COLLINS (1990)

Phylogenetic analysis of *Streptococcus saccharolyticus* based on 16S rRNA sequencing.

FEMS Microbiol. Let. 71, 231-234.

RÖMLING, U., R. FISLAGE und B. TÜMMLER (1995)

Theorie und Anwendung der Makrorestriktionsanalyse für die klonale Analyse von Erregern.

Immun. Infekt. 23, 4-8.

ROSATO, A., J. PIERRE, D. BILLOT-KLEIN, A. BUU-HOI und L. GUTMANN (1995)

Inducible and constitutive expression of resistance of glycopeptides and vancomycin dependence in glycopeptide resistant *Enterococcus avium*.

Antimicrob. Agents Chemother. 39, 830-833.

RUOFF, K., L. DE LA MAZA und M. MURTAGH (1990)

Species identities of enterococci isolated from clinical specimens.

J. Clin. Microbiol. 28, 435-437.

SADER, H., M. PFALLER, F. TENOVER, R. HOLLIS und R. JOHNES (1994)

Evaluation and characterization of multiresistant *Enterococcus faecium* from 12 U.S. medical centers.

J. Clin. Microbiol. 32, 2840-2842.

SAHM, D., L. FREE, C. SMITH, M. EVELAND und L. MUNDY (1997)

Rapid characterization schemes for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci.

J. Clin. Microbiol. **35**, 2026-2030.

SATAKE, S., N. CLARK, D. RIMLAND, F. NOLTE und F. TENOVER (1997)

Detection of vancomycin resistant enterococci in fecal samples by PCR.

J. Clin. Microbiol. **35**, 2325-2330.

SCHABERG, D., D.CLEWELL und L. GLATZER (1982)

Conjugative transfer of R-plasmids from *Streptococcus faecalis* to *Staphylococcus aureus*.

Antimicrob. Agents Chemother. 22, 204-207.

SCHLEIFER, K., R. KILPPER-BÄLZ, J. KRAUS und F. GEHRING (1984)

Relatedness and classification of *Streptococcus mutans* and "mutans-like" streptococci.

J. Dent. Res. 63, 1047-1050.

SCHLEIFER, K. und R. KILPPER-BÄLZ (1987)

Molecular and chemotaxonomie approaches to the classification of streptococci, enterococci and lactococci: A review.

Syst. Appl. Microbiol. 10, 1-19.

SCHOUTEN, M., J. HOOGKAMP-KORSTANJE, J. MEIS und A. VOSS (2000)

Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Europe. European VRE Study Group.

Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 19, 816-822.

SCHWARTZ, D. und C. CANTOR (1984)

Separation of yeast chromosome sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis.

Cell. 37, 67-75.

SCHWARZ, S. und H. BLOBEL (1993)

Molekularbiologische Untersuchungen zur Resistenz von *Staphylococcus sciuri* gegenüber Chloramphenicol.

Mh. Vet.-Med. 48, 123-127.

SCHWARZ, S. und C. WERCKENTHIN (1999)

Molekularbiologische Aspekte der Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen.

Proceed. 23. Kongress Antibiotikaresistenz der Dtsch. Vet. Med. Ges. (DVG), Eigenverlag der DVG (ISBN 3-930511-67-3), Gießen, S. 18-34.

SCHWARZKOPF, A., C. CUNY und W. WITTE (1995)

Bestimmung der Fragmentmuster der genomischen DNA mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese bei *Staphylococcus aureus*.

Ein Vorschlag zur Standardisierung.

Bundesgesundheitsbl. 6, 215-219.

SHAPTON, D. und N. SHAPTON (1993)

Safe processing of foods.

Butterwort-Heinemann Ltd., Oxford, 400-427.

SIMJEE, S., D. WHITE, P. McDERMOTT, D. WAGNER, M. ZERVOS, S. DONABEDIAN, L. ENGLISH, J. HAYES und R. WALKER (2002)

Characterization of Tn1546 in Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated from canine urinary tract infections: Evidence of gene exchange between human and animal enterococci.

J. Clin. Microbiol. 40, 4659-4665.

SIMON, C. (1991)

Antibakterielle Chemotherapie.

In: HAHN, H., D. FALKE und P. KLEIN (Hrsg.)

Medizinische Mikrobiologie,

Springer Verlag Berlin, ISBN 3-540-19389-8, 588-590.

SIMONSEN, G., H. HAAHEIM, K. DAHL, H. KRUSE, A. LOVSETH, O. OLSVIK und A. SUNDSFJORD (1998)

Transmission of VanA-type vancomycin-resistant enterococci and *van*A resistance elements between chicken and humans at avoparcin-exposed farms.

Microb. Drug Resist. 4, 313-318.

SINGH-NAZ, N., A. SLEEMI, A. PIKIS, K. PATEL und J. CAMPOS (1999)

Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* colonization in children.

J. Clin. Microbiol. **37**, 413-416.

SPERA, R. und B. FARBER (1992)

Multiple resistant Enterococcus faecium.

J. Am. Med. Ass. 268, 2563-2564.

STILES, M., N. RAMJI und D. PARADIS (1978)

Incidence of group D streptococci with other indicator organisms in meats. Canadian J. Microbiol. **24**, 1502-1508.

STOBBERINGH, E., A. VAN DEN BOGAARD, N. LONDON, C. DRIESSEN, J. TOP und R. WILLEMS (1999)

Enterococci with glycopeptide resistance in turkeys, turkey farmers, turkey slaughterers, and (sub)urban residents in the south of The Netherlands: evidence for transmission of vancomycin resistance from animals to humans?

Antimicrob. Agents Chemother. 43, 2215-2221.

SUZZI, G., M. CARUSO, F. GARDINI, A. LOMBARDI, L. VANNINI, M. GUERZONI, C. ANDRIGHETTO und M. LANORTE (2000)

A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese (semicotto caprino).

J. Appl. Microbiol. **89**, 267-274.

SVEC, P., L. DEVRIESE, I. SEDLÁCEK, M. BAELE, M. VANCANNEYT, F. HAESEBROUCK, J. SWINGS und J. DOSKAR (2001)

Enterococcus haemoperoxidus sp. nov. and Enterococcus moraviensis sp. nov., isolated from water.

Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51, 1567-1574.

TEIXEIRA, L., M. CARVALHO, M. ESPINOLA, A. STEIGERWALT, M. DOUGLAS, D. BRENNER und R. FACKLAM (2001)

Enterococcus porcinus sp. nov. and Enterococcus ratti sp. nov., associated with enteric disorders in animals.

Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51, 1737-1743.

TENOVER, F., R. ARBEIT, R. GOERING, P. MICKELSEN, B. MURRAY, D. PERSING und B. SWAMINATHAN (1995)

Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing.

J. Clin. Microbiol. 33, 2233-2239.

TENOVER, F., R. ARBEIT und R. GOERING (1997)

How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: A review for healthcare epidemiologists.

Infect. Control Hosp. Epidemiol. 18, 426-439.

THAL, L., S. DONABEDIAN, B. ROBINSON-DUNN, J. CHOW, L. DEMBRY, D. CLEWELL, D. ALSHAB und M. ZERVOS (1998)

Molecular analysis of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* isolates collected from Michigan hospitals over a 6-year periode

J. Clin. Microbiol. **36**, 3303-3308.

THOMPSON, J., PATTERSON, J. und P. GIBBS (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.

TOMAYKO, J. und B. MURRAY (1995)

Analysis of *Enterococcus faecalis* isolates from intercontinental sources by multilocus enzyme electrophoresis and pulsed-field gel electrophoresis.

J. Clin. Microbiol. 33, 2903-2907.

TOYE, B., J. SHYMANSKI, M. BOBROWSKA, W. WOODS und K. RAMOTAR (1997)

Clinical and epidemiological significance of enterococci intrinsically resistant to vancomycin (possessing the *van*C genotype).

J. Clin. Microbiol. 35, 3166-3170. Erratum in: J. Clin. Microbiol. 36, 1469.

TURABELIDZE, D., M. KOTETISHVILI, A. KREGER, J. MORRIS und A. SULAKVELIDZE (2000)

Improved pulsed-field gel electrophoresis for typing vancomycin-resistant enterococci J. Clin. Microbiol. **38**, 4242-4245.

TURTURA, G. und P. LORENZELLI (1994)

Gram-positive cocci isolated from slaughtered poultry. Microbiol. Res. **149**, 203-213.

TYLER, K., G. WANG, S. TYLER und W. JOHNSON (1997)

Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens.

J. Clin. Microbiol. **35**, 339-346.

TYRRELL, G., R. BETHUNE, B. WILLEY und D. LOW (1997)

Species identification of enterococci via intergenic ribosomal PCR.

J. Clin. Microbiol. **35**, 1054-1060.

TYRRELL, G., L. TURNBULL, L. TEIXEIRA, J. LEFEBVRE, G. CARVALHO, R. FACKLAM, M. und M. LOVGREN (2002)

Enterococcus gilvus sp. nov. and Enterococcus pallens sp. nov. isolated from human clinical specimens.

J. Clin. Microbiol. 40, 1140-1145.

UNGEMACH, F. (1999)

Antibiotika und Resistenzproblematik.

Dt. Tierärztebl. 3, 224-227.

UTTLEY, A., C. COLLINS, J. NAIDOO und R. GEORGE (1988)

Vancomycin resistant enterococci.

Lancet. 1, 57-58.

VAN BELKUM, A., N. VAN DEN BRAAK, R. THOMASSEN, H. VERBROUGH und H. ENDTZ (1996)

Vancomycin-resistant enterococci in cats and dogs (letter).

Lancet 348, 1038-1039.

VANCANNEYT, M., C. SNAUWAERT, I. CLEENWERCK, M. BAELE, P. DESCHEEMAEKER, H. GOOSSENS, B. POT, P. VANDAMME, J. SWINGS, F. HAESEBROUCK und L. DEVRIESE (2001)

Enterococcus villorum sp. nov., an enteroadherent bacterium associated with diarrhoea in piglets.

Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51, 393-400.

VAN DEN BRAAK, N., A. VAN BELKUM, M. VAN KEULEN, J. VLIEGENTHART, H. VERBRUGH und H. ENDTZ (1998)

Molecular characterization of vancomycin-resistant enterococci from hospitalized patients and poultry products in The Netherlands.

J. Clin. Microbiol. 36, 1927-1932.

VAN DEN BRAAK, N., E. POWER, R. ANTHONY, H. ENDTZ, H. VERBRUGH und VAN BELKUM (2000a)

Random amplification of polymorphic DNA versus pulsed field gel electrophoresis of *Smal* DNA macrorestriction fragments for typing strains of vancomycin-resistant enterococci.

FEMS Microbiol. Lett. 192, 45-52.

VAN DEN BRAAK, N., A. OTT, A. VAN BELKUM, J. KLUYTMANS, J. KOELE-MAN, L. SPANJAARD, A. VOSS, A. WEERSINK, C. VANDENBROUCKE-GRAULS, A. BUITING, H. VERBRUGH und H. ENDTZ (2000b)

Prevalence and determinants of fecal colonization with vancomycin-resistant *Enterococcus* in hospitalized patients in The Netherlands.

Infect. Control. Hosp. Epidemiol. 21, 520-524.

VAN DEN BOGAARD, A., L. JENSEN und E. STOBBERINGH (1997)

Vancomycin-resistant enterococci in turkeys and farmers.

N. Engl. J. Med. 337, 1558-1559.

VAN DER AUWERA, P., N. PENSART, V. KORTEN, B. MURRAY und R. LECLERCQ (1996)

Influence of oral glycopeptides on the fecal flora of human volunteers: selection of highly glycopeptide-resistant enterococci.

J. Infect. Dis. 173, 1129-1136.

VAN HORN, K., C. GEDRIS, K. RODNEY und J. MITCHELL (1996)

Evaluation of commercial vancomycin agar screen plates for detection of vancomycin-resistant enterococci.

J. Clin. Microbiol. 34, 2042-2044.

VAUTERIN, L., P. YANG und K. KERSTERS (1991)

Grouping of *Xanthomonas campestris* pathovars by SDS-PAGEof proteins. J. Gen. Microbiol. **137**, 1677-1687.

VAZQUEZ, J., M. PERRI, L. THAL, S. DONABEDIAN und M. ZERVOS (1993)

Sparfloxacin and clinafloxacin alone or in combination with gentamicin for therapy of experimental ampicillin-resistant enterococcal endocarditis in rabbits.

J. Antimicrob. Chemother. 32, 715-721.

WEGENER, H. und K. PEDERSEN (1992)

Variations in antibiograms and plasmid profiles among multiple isolates of *Staphylococcus intermedius* from pyodermia in dogs.

Acta vet. Scand. 33, 391-394.

WEGENER, H., M. MADSEN, N. NIELSEN und F. AARESTRUP (1997)

Isolation of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* from food. Int. J. Food. Microbiol. **35**, 57-66.

WELSH, J. und M. McCLELLAND (1990)

Fingerprinting genomes using PCR with arbitary primers.

Nucl. Ac. Res. 18, 7213-7218.

WENDT, C., H. RÜDEN und M. EDMOND (1998)

Vancomycin-resistente Enterokokken.

Dt. Ärtzebl. **25**, C-1172-C-1179.

WERKENTHIN, C. und S. SCHWARZ (1997)

Resistenzen gegenüber Proteinbiosyntheseinhibitoren bei Staphylokokken: Resistenzgene und ihre Ausbreitung- Übersichtsreferat.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 110, 324-332.

WERNER, G. und W. WITTE (1996)

Kopplung von vanA und ermB auf konjugativen Plasmiden bei E. faecium unterschiedlicher Herkunft.

Abstract-Band der 48. Jahrestagung der Dt. Ges. f. Hyg. u. Mikrobiol. v. 8.-11.10.1996 in Bonn. P 153.

WESSELS, D., P. JOOSTE und J. MOSTERT (1988)

Die voorkoms van *Enterococcus* species in melk en suiwelprodukte. Suid Afrikaans Tydskrif vir Suiwelkunde **20**, 68-72.

WILSON, W., A. KARCHMER, A. DAJANI, K. TAUBERT, A. BAYER, D. KAYE, A. BISNO, P. FERRIERI, S. SHULMAN und D. DURACK (1995)

Antibiotic treatment of adults with infective endocarditis due to streptococci, enterococci, staphylococci and HACEK microorganisms. JAMA. **274**, 1706-1713.

WILLIAMS, J., A. KUBELIK, K. LIVAK, J. RAFALSKI und S. TINGEY (1990)

DNA polymorphisms amplified by arbitary primers are useful as genetic markers. Nucl. Ac. Res. **18**, 6531-6535.

WILLEMS, R., J. TOP, N. VAN DEN BRAAK, A. VAN BELKUM, H. ENDTZ, D. MEVIUS, E. STOBBERINGH, A. VAN DEN BOGAARD und J. VAN EMBDEN (2000)

Host specificity of vancomycin-resistant Enterococcus faecium.

J. Infect. Dis. **182**, 816-823.

WITTE, W. und I. KLARE (1995)

Glycopeptide resistant *Enterococcus faecium* outside hospitals: A commentary. Microb. Drug. Res. **1,** 259-263.

WITTE, W., I. KLARE und R. FOCK (1996)

Chemotherapeutikaresistenz bei bakteriellen Infektionserregern und infektiösem Hospitalismus.

Infektionsepidemiologische Forschung 1-14.

WOODFORD, N., D. MORRISON, B. COOKSON und R. GEORGE (1993)

Comparison of high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from different continents.

Antimicrob. Agents Chemother. 37, 681-684.

WOODFORD, N., A. JOHNSON, D. MORRISON und D. SPELLER (1995a)

Current perspectives on glycopeptide resistance.

Clin. Microbiol. Rev. 8, 585-615.

WOODFORD, N., D. MORRISON, A. JOHNSON, A. BATEMAN, J. HASTINGS, T. ELLIOTT und B. COOKSON (1995b)

Plasmid-mediated *van*B glycopeptide resistance in enterococci. Micob. Drug Res. **3**, 235-240.

WOODFORD, N., C. EGELTON und D. MORRISON (1997)

Comparison of PCR with phenotypic methods for the speciation of enterococci. Adv. Exp. Med. Biol. **418**, 405-408.

YAGI, Y. und D. CLEWELL (1977)

Identification and characterization of a small sequence located at two sites on the amplifiable tetracycline resistance plasmid pAMalpha1 in *Streptococcus faecalis*. J. Bacteriol. **129**, 400-406.

YOUNG, K., E. POWER, M. DRYDEN und I. PHILLIPS (1994)

RAPD typing of clinical isolates of *Staphylococcus haemolyticus*. Lett. Appl. Microbiol. **18**, 86-89.

Rechtsvorschriften, Standards, Normen

ANONYMOUS (1981)

Bekanntmachung der Futtermittelverordnung vom 08.04.1981 (BGBI. I S. 352).

ANONYMOUS (1996a)

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG. Verfahren zur Probennahme und Untersuchung von Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und Bedarfsgegenständen. L 06.00-32: Bestimmung von *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium* in Fleisch und Fleischerzeugnissen; Spatelverfahren (Referenzverfahren nach DIN 10106).

Bundesgesundheitsamt Beuth Verlag GmbH, Berlin u. Köln.

ANONYMOUS (1996b)

Verordnung über die Aufhebung der futtermittelrechtlichen Zulassung von Avoparcin und Ronidazol als Zusatzstoffe vom 11.1.1996. Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten

(Bundesanzeiger Nr. 10/96, S. 397).

ANONYMOUS (1997a)

National Commitee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A4, 4th ed. National Commitee for Clinical Laboratory Standards. Wayne, Pa..

ANONYMOUS (1997b)

Bayrisches Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten. Rundschau für Fleischhygiene und Lebensmittelüberwachung. **8**, 173-174.

ANONYMOUS (1997c)

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Reduced susceptibility of *Staphylococcus aureus* to vancomycin-Japan, 1996.

MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report. 46, 624-626.

ANONYMOUS (1997d)

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Staphylococcus aureus with reduced susceptibility to vancomycin-United States, 1997.

MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report. 46, 765-766.

ANONYMOUS (1997e)

Fünfzehnte Verordnung zur Änderung der Neufassung der Futtermittelverordnung vom 11.11.1992 (BGBI. I S. 1898), zuletzt geändert durch Artikel 1 der Verordnung vom 11.01.1996 (BAnz. S. 397).

ANONYMOUS (1998a)

Erstes Auftreten von MRSA mit verminderter Glycopeptidresistenz in Deutschland nachgewiesen. Robert- Koch- Institut (RKI),

Epidemiologisches Bulletin 17/98. S. 123.

ANONYMOUS (1998b)

Bekanntmachung der Neufassung der Futtermittelverordnung vom 19.11.1997 (BGBI. I S. 2714), zuletzt geändert durch Änderungs- Verordnung vom 03.08.1998 (BGBI. I S. 1995).

ANONYMOUS (2002a)

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Staphylococcus aureus resistant to vancomycin- United States, 2002.

MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report. **51,** 765-766.

ANONYMOUS (2002b)

Erstmalige Isolierung eines S. aureus mit Resistenz gegen Vancomycin in den USA. Robert- Koch- Institut (RKI),

Epidemiologisches Bulletin 30/2002. S. 258.

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich bei der Anfertigung und Fertigstellung dieser Dissertation unterstützt haben:

Mein besonderer Dank gilt meinem Mentor, Herrn Professor Dr. M. Bülte für die Überlassung dieses interessanten Themas sowie seiner kritischen Ratschläge und Anregungen und seiner unermüdlichen Geduld. Ich werde immer gerne an die Zeit in Giessen zurückdenken!

Ganz herzlichen Dank auch an Herrn Dr. K. Failing der AG Biomathematik für die Beratung bei den statistischen Auswertungen der Untersuchungsergebnisse.

Nicht zu vergessen sind selbstverständlich die Kolleginnen und Kollegen des Institutes für tierärztliche Nahrungsmittelkunde, wobei ich mich besonders bei Frau Karin Simon und Herrn Walter Rupp für die umfangreichen Hilfestellungen bedanken möchte.

Ich möchte es auch nicht versäumen, mich bei Frau C. Annemüller, Herrn Dr. A. Abdulmawjood und Herrn Prof. Dr. C. Lämmler für die fachlichen Ratschläge zu bedanken.

"Was lange währt, wird endlich gut"- Ich danke meinen Eltern, meiner Schwester, Uwe, Konrad, Britt und Stephan.