

## Einleitung

### **1.1 Geschichte, Namensgebung und Taxonomie der Enterokokken**

Die Einführung des Genus *Enterococcus* erfolgte 1984 durch Schleifer und Kilpper-Balz<sup>1</sup>. Der Name setzt sich aus den griechischen Wörtern für Darm (enteron) und Kern bzw. Beere (kokkus) zusammen. Bis dahin wurden die Enterokokken den Streptokokken zugeordnet.

Enterokokken sind grampositive Kokken. Man findet sie einzeln, in Paaren und als kurze Ketten. Ihr Wachstum ist fakultativ anaerob. Die optimale Wachstumstemperatur liegt bei 35°C, die meisten können jedoch bei Temperaturen zwischen 10 und 45°C überleben.

Thiercelin<sup>2</sup> beschrieb die "Enterokokken" im Jahr 1899. McCallum und Hastings<sup>3</sup> beobachteten im gleichen Jahr "Enterokokken" bei einem Patienten mit Endokarditis. 1906 wurde das erste Klassifikationsschema der Streptokokken vorgestellt, zu denen auch die Enterokokken gerechnet wurden<sup>4</sup>. Eine weitere Einteilung der Streptokokken erfolgte 1930 durch Lancefield<sup>5</sup>. Den Enterokokken wurde der Name *Streptococcus* der Gruppe D zugeordnet. Als alternative Bezeichnung fanden die Begriffe Fäkalstreptokokken bzw. *Streptococcus faecalis* und *Streptococcus faecium* Verwendung.

Bereits 1970 schlug Kalina<sup>6</sup> vor, den Enterokokken einen eigenen Genus zuzuordnen. Diesem Vorschlag wurde 1984 nach dem Beweis, dass die Enterokokken sich genetisch deutlich von den Streptokokken unterscheiden, Rechnung getragen<sup>1</sup>. Der neu eingeführte Genus erhielt den Namen *Enterococcus* (*E.*).

Zunächst wurden *E. faecalis* und *E. faecium* diesem neuen Genus zugeordnet. Im Laufe der Jahre wurden 15 weitere Spezies den Enterokokken zugeordnet<sup>7-14</sup>. Die heute gültige Einteilung beruht auf genetischen Untersuchungen. *E. casseliflavus* und *E. flavescens* wurden zunächst als zwei getrennte Spezies eingeführt. Durch neuere Studien konnte aber gezeigt werden, dass der Verwandtschaftsgrad so eng ist, dass vorgeschlagen wurde, *E. flavescens* dem *E. casseliflavus* zuzuordnen<sup>15,16</sup>. Zur Zeit wird daher meist von *E. casseliflavus/E. flavescens* gesprochen.

### 1.1.1 Natürliches Vorkommen

Enterokokken können sich unter den verschiedensten Umweltbedingungen vermehren<sup>17</sup>. Enterokokken werden in der Erde, im Wasser, auf Pflanzen, in Tieren und in Lebensmitteln gefunden. Beim Menschen besiedeln die Enterokokken den Verdauungstrakt. Weitere Besiedlungsorte sind Haut und Vagina. Das Vorkommen der verschiedenen Spezies ist unter anderem abhängig von Alter und Diät. *E. faecalis* und *E. faecium* sind mit 85-90% bzw. 5-15% die am häufigsten nachgewiesenen Enterokokken-Spezies beim Menschen<sup>18-20</sup>. Weitere Vertreter sind *E. avium*, *E. casseliflavus*/*E. flavescens*, *E. gallinarum*, *E. mundtii* und *E. durans*<sup>21,22</sup>.

### 1.1.2 Enterokokken als Krankheitserreger

Enterokokken sind nicht sehr virulent und wurden daher erst spät als Krankheitserreger entdeckt. Infektionen mit Enterokokken entstehen, indem die Keime in normalerweise sterile Körperbereiche gelangen, wie das Blutssystem, den Harntrakt oder die Bauchhöhle. Sie sind in der Lage, an Herzklappen und Nierenepithelzellen zu haften. Dadurch können sie Endokarditiden und Harnwegsinfektionen verursachen<sup>23</sup>. Trotz ihrer geringen Virulenz können sie sehr invasive Infektionen verursachen, wie Sepsis, Meningitis oder Endokarditis. Die häufigste durch Enterokokken hervorgerufene Infektion ist die Harnwegsinfektion<sup>24</sup>. Besonders gefährdet für Infektionen mit Enterokokken sind immunsupprimierte Menschen. Die Enterokokkensepsis ist besonders schwerwiegend. Die Mortalität wird mit 28-58% angegeben<sup>24,25</sup>.

Bei nosokomialen Infektionen stehen die Enterokokken-Infektionen in den USA an dritter, in Deutschland sogar an zweiter Stelle der verantwortlichen Keime<sup>26,27</sup>.

Unter den klinischen Enterokokken-Isolaten werden in 80-90% *E. faecalis* und in 5-10% *E. faecium* isoliert. Die weiteren Spezies werden selten in klinischen Isolaten identifiziert<sup>28-33</sup>

Obwohl *E. faecalis* häufiger in klinischen Isolaten isoliert wird, werden nosokomiale Ausbrüche mit Enterokokken meist durch *E. faecium* verursacht<sup>34-47</sup>. Außerdem konnte beobachtet werden, dass Bakteriämien mit *E. faecium* mit einer höheren Mortalität einhergehen als solche mit *E. faecalis*<sup>48</sup>. Auch im Hinblick auf die Entwicklung von Antibiotika-Resistenzen unterscheidet sich *E. faecium* von *E. faecalis*. Während Häufigkeit und Ausmaß der Resistenzen von *E. faecalis* in den letzten Dekaden relativ konstant geblieben sind, wurde eine deutliche Zunahme bei *E. faecium* beobachtet<sup>49</sup>.

## 1.2 Antibiotika-Resistenzen

Der Erfolg einer Antibiotikabehandlung hängt wesentlich vom Überschreiten der minimalen Hemmkonzentration (MHK) eines Erregers am Wirkort ab. Eine Resistenz liegt vor, wenn die MHK des Erregers über der therapeutischen Konzentration des Antibiotikums liegt.

Bakterien können eine intrinsische oder eine extrinsische (erworbene) Resistenz gegen Antibiotika besitzen. Intrinsische Resistenz ist eine stabile genetische Eigenschaft, die chromosomal codiert wird und bei allen Vertretern einer Spezies zu finden ist. Die extrinsische Resistenz dagegen wird durch Veränderung des Genoms erworben.

Einer bakteriellen Antibiotika-Resistenz können mehrere Mechanismen zugrunde liegen:

1. Inaktivierung des Antibiotikums (Beispiel: Beta-Lactamasen bei Penicillin),
2. Das Antibiotikum kann nicht an den Wirkort gelangen (Beispiel: Aminoglycoside können die Zellwand von grampositiven Bakterien nur schlecht durchdringen),
3. Modifizierung der Bindungsstelle des Antibiotikums (Beispiel: Veränderung der Penicillin bindenden Proteine),
4. metabolische Kompensation der Antibiotikawirkung (Beispiel: Folatbildung von Enterokokken bei Behandlung mit Trimethoprim-Sulfamethoxazol) und
5. Toleranzentwicklung (Beispiel: Erhöhung der Anzahl von Penicillin bindenden Proteinen) <sup>50-52</sup>.

### 1.2.1 Entstehung von extrinsischer Resistenz

Extrinsische Resistenz kann durch **Mutation** erfolgen. Ein Beispiel ist die niedrig-gradige Penicillin-Resistenz der Gonokokken <sup>50</sup>.

Chromosomale DNA (Desoxynukleinsäure; eng. desoxynucleic acid) oder Plasmide können durch **Konjugation**, **Transduktion** oder **Transformation** auf andere Bakterien übertragen werden. Dabei können Resistenzgene innerhalb einer Spezies oder auf andere Spezies übertragen werden, so z.B. von Staphylokokken auf Enterokokken <sup>53</sup>.

Bei der **Konjugation** wird ein kopiertes Plasmid durch Zellkontakt weitergegeben. Ein Beispiel für eine solche Resistenzübertragung ist das tetM Gen, das in Enterokokken die Resistenz für Tetracyclin hervorruft und 1986 bei Gonokokken gefunden wurde <sup>50</sup>.

Als **Transduktion** wird die Übertragung eines Plasmids oder chromosomalen Resistenzgens durch Bakteriophagen verstanden. Eine derartige Transduktion tritt bei Staphylokokken häufig auf <sup>54</sup>.

Bei dem seltenen Mechanismus der **Transformation** wird vom Bakterium DNA aus der Umgebung aufgenommen, z.B. nach Zelllysis.

Auch die **Transposition** kann zum Erwerb und zur Verbreitung von Resistenzen führen. Dabei wechselt ein besonderer Genbereich, das Transposon, die Lage im Chromosom oder aber es wechselt auf ein Plasmid oder von Plasmid zu Plasmid. Transposone ermöglichen es, dass Gene von einem nicht konjugierbaren auf ein konjugierbares Plasmid wechseln, was die Verbreitung unter Bakterien erleichtert.

### 1.2.2 Antibiotika-Resistenz von Enterokokken

Alle Enterokokken besitzen eine intrinsische Resistenz gegenüber  $\beta$ -Lactam Antibiotika infolge einer geringen Affinität des Penicillin bindenden Proteins. Aminoglycoside können nur schwer durch die Zellwand der Enterokokken penetrieren. Durch Kombination mit einer Zellwand-aktiven Substanz (z.B. Penicillin) kann diese Resistenz jedoch überwunden werden. Obwohl Enterokokken in vitro sensibel auf Trimethoprim-Sulfamethoxazol reagieren, können sie in vivo die Blockade der Folatsynthese umgehen, indem sie ein exogenes Folat benutzen.

Zu diesen oben beschriebenen intrinsischen Resistenzen können Enterokokken eine Vielzahl von extrinsischen Resistenzmechanismen erwerben. Die meisten dieser extrinsischen Resistenzen werden durch Plasmide oder Transposone vermittelt. Diese erworbenen Resistenzgene können an weitere Enterokokken und auch andere Bakterienarten weitergegeben werden. Mittlerweile sind bei den Enterokokken Resistenzen gegen alle bisher bekannten Antibiotika beschrieben worden<sup>55</sup>. Selbst gegen das neueste Antibiotikum Quinupristin/Dalfopristin wurden bereits vor der Zulassung Resistenzen beschrieben<sup>56</sup>. Während sich die Resistenzlage bei *E. faecalis*-Isolaten gegen Antibiotika in den letzten Jahren kaum verändert hat, ist die von *E. faecium*-Isolaten deutlich gestiegen<sup>49,57</sup>.

### 1.3 **Vancomycin-resistente Enterokokken**

Die ersten klinischen Isolate von *E. faecium* mit einer Resistenz gegen Vancomycin und Teicoplanin wurden 1986 in England und Frankreich identifiziert<sup>58,59</sup>. Bis dahin galten Vancomycin und Teicoplanin als Reserveantibiotika bei Infektionen mit ansonsten resistenten

Enterokokken. Resistenz gegen diese Reserveantibiotika bedeutet dann, dass diese Keime gegen alle bisher im Handel erhältlichen Antibiotika unempfindlich sind <sup>60</sup>.

Nur kurz nach ihrer Erst-Beschreibung wurden Ausbrüche mit Vancomycin resistenten Enterokokken (VRE) beobachtet <sup>35,36,39,44,61</sup>. Mittlerweile sind VRE weltweit verbreitet, und die Häufigkeit nimmt deutlich zu <sup>62,63</sup>. Der Anteil an VRE an den nosokomialen Enterokokken-Infektionen stieg in den USA von 1989-1993 von 0,3 auf 7,9%. Bezogen auf die Patienten auf Intensivstationen stieg dieser Anteil im selben Zeitraum von 0,4 auf 13,6% <sup>63</sup>. Dieser Trend hält in den letzten Jahren an, so dass die Zahlen 1999 jeweils auf über 20% angestiegen sind <sup>64</sup>. Infektionen mit VRE zeigen im Vergleich zu Vancomycin sensiblen Enterokokken eine höhere Mortalität <sup>65,66</sup>.

### 1.3.1 Epidemiologie der VRE

In der Epidemiologie der VRE gibt es einen deutlichen Unterschied zwischen den USA und Europa <sup>67</sup>. In Europa wurden VRE bei Personen außerhalb des Krankenhauses nachgewiesen <sup>68-70</sup>, in den USA dagegen waren Personen ohne Krankenhauskontakt selten besiedelt <sup>71,72</sup>. Im Gegensatz zu der relativ häufigen Besiedlung mit VRE in der gesunden Bevölkerung werden in Europa eher wenige VRE in klinischen Isolaten nachgewiesen <sup>67</sup>. In den USA dagegen stieg der Anteil der VRE unter den Enterokokken, die nosokomiale Infektionen verursachten, 1999 auf 25,2% <sup>27</sup>.

Für die Ausbreitung der VRE werden zwei Mechanismen verantwortlich gemacht <sup>67</sup>. Zum einen der selektive Antibiotikadruck durch den hohen Gebrauch von Vancomycin, der zur Ausbreitung genetisch oft identischer VRE in und zwischen Krankenhäusern verantwortlich gemacht wird <sup>71,73,74</sup>. Dies wird in den USA als der Hauptmechanismus vermutet <sup>75,76</sup>. Die Beschreibungen von nosokomialen Ausbrüchen und klonaler Ausbreitung der VRE in amerikanischen Krankenhäusern unterstützte diese These <sup>77</sup>. Aber auch in Europa wurden Ausbrüche mit klonaler Ausbreitung von VRE beschrieben <sup>41,78</sup>.

Zum anderen wird die Übertragung durch Tierreservoir, insbesondere Hühner- und Schweinefleisch vermutet <sup>79-86</sup>. Bates et al. identifizierten 1994 VRE außerhalb des Krankenhauses in England. Sie isolierten VRE bei einer Schweineherde und aus der Umgebung der Farm 93. Nur kurze Zeit später isolierten Klare et al. <sup>69</sup> VRE von Schweinen und Hühnern sowie gesunden

Probanden in Deutschland. Diese Entdeckungen führten zu der Überlegung, dass VRE durch den Einsatz von Glycopeptiden als wachstumsförderndes Mittel in der Tierhaltung entstanden sein könnten. Avoparcin und andere antimikrobiell wirkende Mittel wurden in der Tiermast zum Futter gegeben. Diese wirken wachstumsfördernd, dies geschieht zum einen durch die Reduktion der normalen Darmflora, die teilweise eine Resorption der Nahrungsmittel stört und durch Reduktion der schädlichen Flora, die das Tier infizieren könnte<sup>87</sup>. Avoparcin war in Europa in der Tiermast zugelassen und wurde von den meisten europäischen Ländern auch benutzt. In Schweden wurde es nie benutzt, und in den USA war Avoparcin nie zugelassen. Verschiedene Untersuchungen an Tieren in den Ländern zeigten, dass in den Ländern mit Avoparcin-Gebrauch VRE in Tieren nachgewiesen werden konnte<sup>69,80,83,85,88-94</sup>. Menschen scheinen VRE von besiedelten Tieren durch Fleischverzehr zu erwerben. Eine Untersuchung an holländischen Vegetariern zeigte, dass diese im Vergleich zu Fleisch essenden Probanden keine vanA-Gen tragenden VRE aufwiesen<sup>84</sup>. Weiterhin wurde in Schweden, wo Avoparcin nie benutzt wurde, fast keine VRE bei gesunden Probanden isoliert<sup>95</sup>.

Avoparcin wurde in Dänemark bereits 1995, in Deutschland 1996 und europaweit 1997 verboten. Erste Auswirkungen dieses Verbots wurden bereits beschrieben. In Dänemark sank die VRE-Besiedlung bei geschlachteten Hühnern von 85% 1995 auf 12% 1998<sup>96</sup>. In Italien sank die Besiedlung bei Hühnern 18 Monate nach Einführung des Verbotes von 14,6% auf 8%<sup>97</sup>. Auch in Deutschland zeigte sich eine Verringerung der VRE Prävalenz im Hühnerfleisch. Während 1995 fünf von 13 Hühnerfleischproben VRE aufwiesen, waren es 1998 13 von 31 Proben. Eine Untersuchung aus Spanien 1998 zeigt, dass auch nach dem Avoparcin-Verbot die Kolonisation von Tieren und Nahrungsmitteln mit VRE vorhanden ist (27% des untersuchten Hühnerfleisches und 16% der Hühner)<sup>98</sup>. Es bleibt abzuwarten, ob diese Besiedlungsrate mit der Zeit sinkt. Als weitere Reservoirs für VRE haben sich in Europa neben Fleischprodukten auch Haustiere gefunden, die vermutlich ebenfalls über Fleischprodukte besiedelt werden können<sup>94,99</sup>. Die Wirkung des Avoparcinverbots auf die Besiedlung mit VRE der Menschen wurde in der Untersuchung in Deutschland herausgestellt. Die Prävalenz bei gesunden Probanden sank in Sachsen von 12% 1994 auf 3% 1997<sup>100</sup>.

Die Risikofaktoren einer VRE-Infektion sind identisch mit denen für eine Infektion mit Vancomycin sensiblen Enterokokken. Zur Verhinderung einer weiteren Ausbreitung gehören

insbesondere die Einschränkung des Antibiotikagebrauchs und korrekte Hygienemaßnahmen, um eine Übertragung zwischen Patienten zu verhindern<sup>101</sup>.

### 1.3.2 Mechanismus und Genetik der Vancomycin-Resistenz

Vancomycin und Teicoplanin hemmen den Zellwandaufbau grampositiver Bakterien. Sie wirken an den freien C-terminalen D-Alanin-D-Alanin-Gruppen der Pentapeptidseitenkette vor deren enzymatischen Quervernetzung zum Peptidoglykangerüst (Abbildung 1).

Mittlerweile sind 5 verschiedene Phänotypen von VRE beschrieben worden: vanA, vanB, vanC, vanD und vanE<sup>102-107</sup>. Stämme vom vanA-Phänotyp sind hoch resistent gegen Vancomycin und Teicoplanin. VanB-Typen sind nur resistent gegen Vancomycin, aber nicht gegen Teicoplanin. Die Gene für die vanA- bzw. vanB-Phänotypen befinden sich auf übertragbaren Genabschnitten und können entweder als Plasmid, oder im Chromosom des Bakteriums nachgewiesen werden. Der vanC-Phänotyp wird ausschließlich bei *E. gallinarum* und *E. casseliflavus/E. flavescens* gefunden und ist durch eine niedrige Resistenz gegen Vancomycin charakterisiert. Diese Resistenz ist chromosomal festgelegt. Sie wird bei allen Vertretern dieser Spezies gefunden, sie ist nicht übertragbar. Der vanD-Phänotyp ist mäßig resistent gegen Vancomycin und Teicoplanin<sup>102</sup>. Auch der vanE-Phänotyp hat eine niedrige Resistenz gegen Vancomycin, ist aber sensibel gegenüber Teicoplanin<sup>104</sup>. Ob die vanD- und vanE-Gene übertragbar sind, ist bisher unbekannt.

VanA, vanB und vanD-Resistenzen führen zu einer Synthese von D-Alanin-D-Lactat-Enden in der Zellwand anstatt der üblichen D-Alanin-D-Alanin-Verbindung. Vancomycin und Teicoplanin können so nicht mehr wirken. Sehr ähnlich ist auch der Mechanismus bei der vanC- und vanE-Resistenz, bei denen ein D-Alanin-D-Serin-Ende synthetisiert wird<sup>103,104,108</sup>. Für diese Synthesemechanismen sind weitere Genabschnitte mit verantwortlich. Beispielhaft ist in Abbildung 1 die Blockierung des Zellwandaufbaus durch Vancomycin bei Vancomycin-sensiblen Stämmen und vanA-resistenten Stämmen dargestellt.

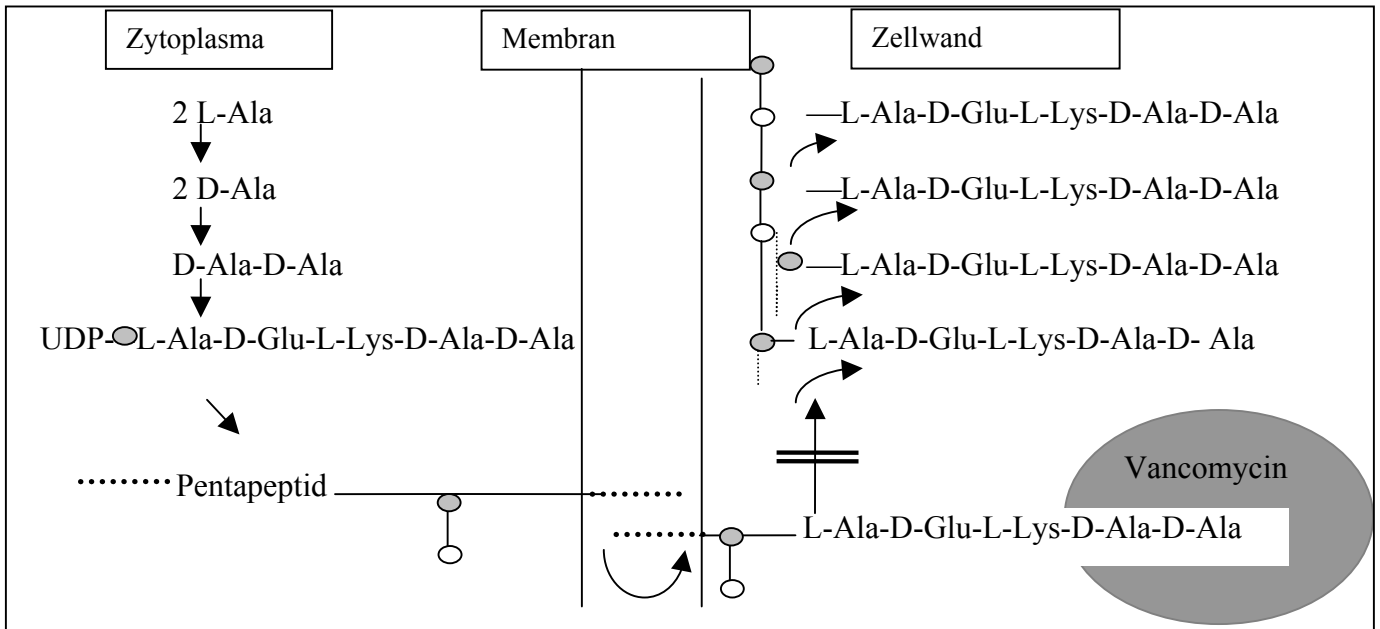
Während das vanA-Gen die D-Ala-D-Lac-Ligase codiert, beeinflusst das vanH-Gen die Synthese von D-Lactat aus Pyruvat. Das VanX-Gen reduziert die sonst übliche Bindung von D-Ala-D-Ala zurück zu D-Ala, so dass diese Verbindung zum Wandaufbau nicht zur Verfügung steht. Das vanY-Gen ist notwendig für die Carboxypeptidase, um den Zellwandaufbau mit D-Ala-D-Lac zu ermöglichen<sup>103,105</sup>.

Ob Resistenzgene immer exprimiert werden, ist nicht abschließend geklärt. So wurden auch phänotypisch Vancomycin sensible Enterokokken mit vanA-Genprodukten gefunden <sup>109</sup>.

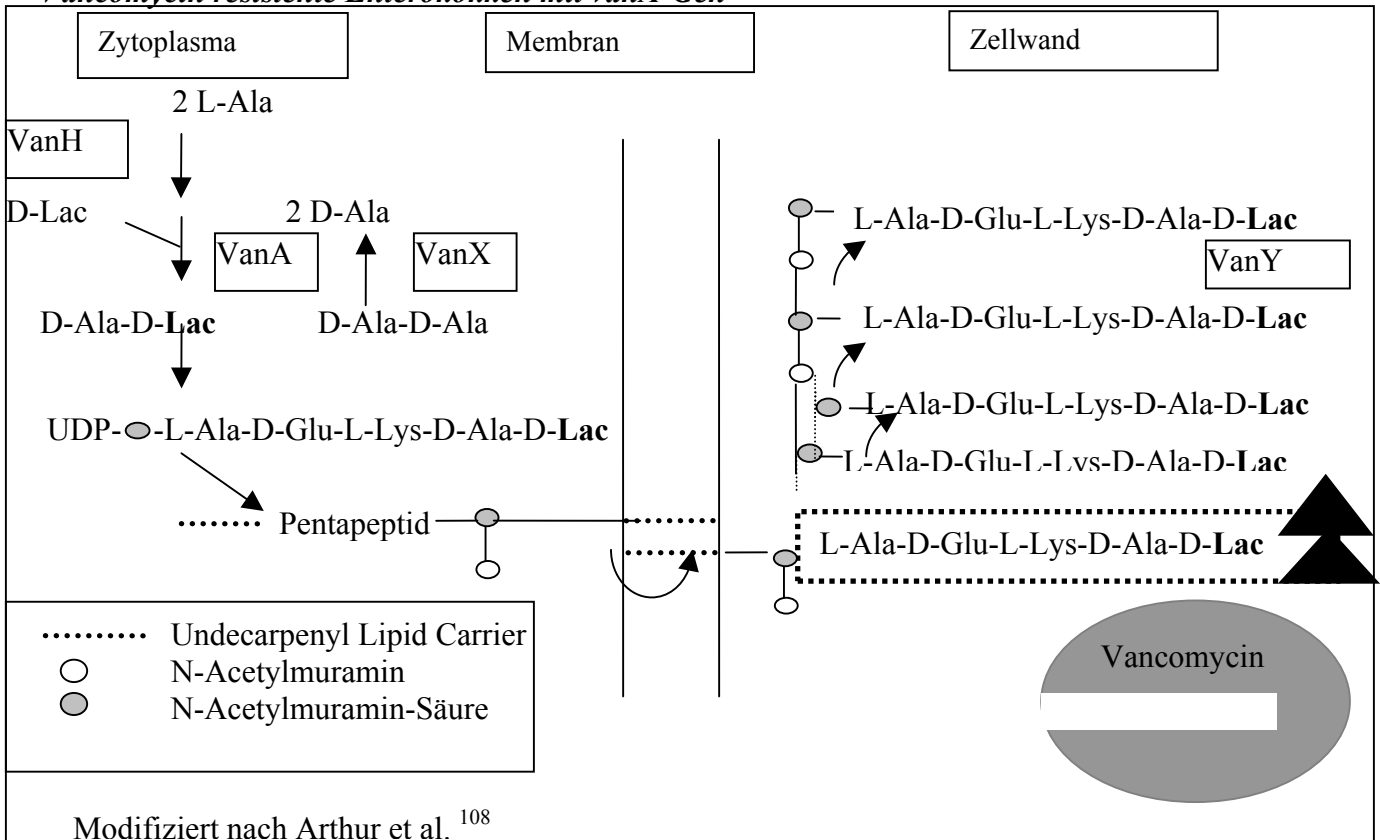


**Abbildung 1: Wirkung von Vancomycin auf sensible und resistente Enterokokken**

**Vancomycin sensible Enterokokken**



**Vancomycin resistente Enterokokken mit vanA-Gen**



Modifiziert nach Arthur et al. <sup>108</sup>

### 1.3.3 Besiedlungsdauer

Patienten können mit einem Vancomycin resistenten *E. faecium* (VREF)-Stamm über sehr lange Zeiträume besiedelt sein <sup>71,110</sup>. Andererseits können Patienten zum selben Zeitraum mit mehreren VREF-Stämmen besiedelt sein <sup>111-113</sup>. Daten zur Besiedlungsdauer mit sensiblen *E. faecium*-Stämmen sind nicht vorhanden.

Um das Risiko einer Besiedlung mit VREF abzuschätzen, ist die Kenntnis des Besiedlungsverhaltens von sensiblen *E. faecium* und resistenten *E. faecium* bei Gesunden von Bedeutung. Die Besiedlung mit einem VREF ist für einen Gesunden primär nicht gefährlich. Im Rahmen einer Immunsuppression kann jedoch aus einer Kolonisation eine Infektion erwachsen. Zusätzlich können besiedelte Personen ein Reservoir für die Ausbreitung sein.