

**Aus dem Institut für Geflügelkrankheiten
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

**Untersuchungen zur antimikrobiellen Resistenz und Virulenz von *Enterococcus*
Isolaten aus Wirtschaftsgeflügel**

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

**vorgelegt von
Julia Maasjost
Tierärztin
aus Darmstadt**

Berlin 2017

Journal-Nr.: 3949

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Hafez Mohamed Hafez
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Michael Lierz
Dritter Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus): broilers, hens, turkeys, enterococcus faecalis, enterococcus faecium, enterococcus gallinarum, enterococcus hirae, lincomycin, tetracycline, beta-lactam antibiotics, gentamicin, erythromycin, vancomycin, chloramphenicol, sulfamethoxazole, trimethoprim, antiinfective agents, drug resistance, resistance mechanisms, isolation, polymerase chain reaction

Tag der Promotion: 03.07.2017

1	Einleitung	6
2	Literaturübersicht.....	7
	Teil 1 - Allgemeines	7
2.1	Die Enterokokken	7
2.1.1	Taxonomie	7
2.1.2	Morphologie	7
2.1.3	Eigenschaften	7
2.2	Die Bedeutung der Enterokokken	8
2.2.1	Enterokokken in der Humanmedizin	8
2.2.1.1	Therapie.....	8
2.2.2	Enterokokken beim Wirtschaftsgeflügel	8
	Teil 2 – Resistenzen bei Enterokokken.....	10
	Teil 3 – Die Pathogenität und Virulenz der Enterokokken	13
2.3	Die Definition von Pathogenität und Virulenz	13
2.4	Die Virulenzfaktoren der Enterokokken.....	14
2.4.1	Enzymatische Virulenzfaktoren.....	14
2.4.1.1	Cytolysin (<i>cyiR1</i> , <i>cyiR2</i> , <i>cyiL_L</i> , <i>cyiL_S</i> , <i>cyiM</i> , <i>cyiB</i> , <i>cyiA</i> , <i>cyiI</i>)	14
2.4.1.2	Gelatinase (<i>gelE</i>)	15
2.4.1.3	Hyaluronidase (<i>hyl_{Efm}</i>)	15
2.4.2	Oberflächenproteine als Virulenzfaktor	16
2.4.2.1	Aggregation Substance (<i>asa1</i>)	16
2.4.2.2	Enterococcal Surface Protein (<i>esp</i>).....	16
2.5	Der Embryoletalitätstest.....	16
3	Material und Methoden	18
3.1	Material.....	18
3.1.1	Probenmaterial	18
3.1.2	Referenz- und Kontrollstämmen	19
3.1.3	Medien, Puffer und Geräte.....	19
3.1.3.1	Anzucht- und Testmedien	19
3.1.3.2	Puffer und Gebrauchslösungen.....	21
3.1.3.3	Arbeitsgeräte.....	24
3.1.3.4	Primer	25
3.1.3.5	Verbrauchsmaterialien	28
3.1.4	Bruteier	28

3.2 Methoden	28
Teil 1 – Keimisolierung und -charakterisierung	28
3.2.1 Herkunft der Isolate.....	28
3.2.2 Bestimmung der Enterokokkenspezies mittels genus- und speziesspezifischer Multiplex-PCR.....	28
3.2.3 Bestimmung der Enterokokkenspezies mittels 16S rDNA-Genanalyse	29
Teil 2 – Bestimmung des Resistenzverhaltens in vitro	31
3.2.4 Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) mit der Mikrodilutionsmethode.....	31
3.2.4.1 Bestimmung der Vancomycin-Resistenz	32
Teil 3 - Phäno- und genotypischer Nachweis spezifischer Virulenzfaktoren und ihre Korrelation mit der Embryoletalität ausgewählter Enterokokkenisolate	32
3.2.5 Nachweis der Virulenzfaktoren bei ausgewählten Putenisolaten.....	32
3.2.5.1 Auswahl der Isolate.....	32
3.2.5.2 Auswahl der Virulenzfaktoren.....	32
3.2.5.3 PCR-Nachweis der Virulenzgene	33
3.2.5.3.1 Separater Nachweise des <i>cyiL_S</i> -Gens	33
3.2.5.4 Sequenzierung der nachgewiesenen Virulenzgene.....	35
3.2.5.5 Phänotypische Ausprägung der Virulenzfaktoren.....	35
3.2.6 Bestimmung der Virulenz im Embryoletalitätstest	35
3.2.6.1 Herstellung des Inokulums.....	36
3.2.6.2 Beimpfung der SPF-Bruteier	37
3.2.6.3 Versuchszeitraum	39
4 Ergebnisse	40
Teil 1 – Keimisolierung und –charakterisierung	40
4.1 Ergebnis der Speziesbestimmung	40
Teil 2 – Bestimmung des Resistenzverhaltens in vitro	41
4.2 Das Ergebnis der Mikrodilutionsmethode zur Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK)	41
4.2.1 Multiresistenz von Enterokokken.....	59
Teil 3 - Phäno- und genotypischer Nachweis spezifischer Virulenzfaktoren und ihre Korrelation mit der Embryoletalität ausgewählter Enterokokkenisolate	62
4.3 Ergebnisse des Nachweises der Virulenzfaktoren	62
4.3.1 Ergebnisse des PCR-Nachweises der Virulenzgene.....	62
4.3.2 Ergebnisse der phänotypischen Ausprägung der Virulenzfaktoren	64
4.4 Ergebnisse des Embryoletalitätstests	65
4.4.1 Herstellung des Inokulums.....	65

4.4.2 Ergebnisse des Embryoletalitätstests	68
5 Diskussion.....	72
Teil 1 – Keimisolierung und –charakterisierung	72
Teil 2 – Bestimmung des Resistenzverhaltens in vitro	73
Teil 3 – Phäno- und genotypischer Nachweis spezifischer Virulenzfaktoren und Untersuchungen zur Embryoletalität ausgewählter Enterokokkenisolate	79
Teil 4 – die großen Zusammenhänge	84
6 Schlussfolgerungen.....	87
7 Zusammenfassung.....	88
8 Summary.....	89
9 Literaturverzeichnis	90
Danksagung	102
Selbstständigkeitserklärung.....	103

1 Einleitung

Enterokokken wurden lange Zeit als apathogene Kommensale der Darmflora bei Säugern und Vögeln angesehen. Sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin sind sie jedoch zunehmend als Auslöser klinischer Erkrankungen bekannt. Krankheitsbilder des Wirtschaftsgeflügels sind Dottersackentzündungen, amyloide Arthropathie, Spondylitis und Arthritis oder Encephalomalazie. Häufig werden Enterokokken auch als Begleitflora isoliert.

Enterokokken weisen verschiedene intrinsische Resistenzen gegen antimikrobielle Wirkstoffe auf und sind in der Lage, Resistenzgene von anderen Bakterien aufzunehmen. Ein besonderes Problem stellen multiresistente Isolate dar, die immer häufiger nachgewiesen werden.

Enterokokken besitzen zudem eine Reihe von Virulenzfaktoren, deren geno- und phänotypische Ausprägung nicht immer korreliert und innerhalb der verschiedenen Spezies variiert. Einige von ihnen wurden im Tierversuchsmodell mit der Pathogenität von Enterokokken assoziiert.

In der vorliegenden Arbeit werden klinische Enterokokkenisolate von Broilern, Legehennen und Puten auf ihre antimikrobiellen Resistenzen, vorhandene Virulenzfaktoren und ihre Pathogenität im embryonierten Hühnerei untersucht.

Die Bestimmung der Resistenz gegenüber 24 antimikrobiellen Wirkstoffen erfolgt mittels der Mikrodilutionsmethode, die das Ermitteln der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) ermöglicht. Definierte Grenzwerte des CLSI und NARMS und die MHK_{50} - und MHK_{90} -Konzentrationen werden zur Interpretation der Ergebnisse verwendet und ermöglichen einen Vergleich der Resistenzsituation.

Bei 28 Puten-Isolaten erfolgt der phäno- und genotypische Nachweis der Virulenzfaktoren Cytolysin, Gelatinase, Hyaluronidase, Aggregation Substance und Enterococcal Surface Protein. Anschließend wird im Embryoletalitätstest die abtötende Wirkung der Isolate auf embryonierte Hühnereier festgestellt.

2 Literaturübersicht

Teil 1 - Allgemeines

2.1 Die Enterokokken

2.1.1 Taxonomie

Die erste Beschreibung der Enterokokken erfolgte im Jahr 1903 durch Thiercelin und Jouhaud. Drei Jahre später wurden sie in das Genus *Streptococcus* (S.) eingefügt (Andrews und Horder, 1906), und 1933 erfolgte die Zuordnung zur serologischen Lancefield-Gruppe *Streptococcus*-D (Lancefield, 1933). Zellwand- und Lipid-Analysen sowie DNA-DNA-Hybridisierung und 16S rDNA-Genanalysen von Schleifer und Killper-Bälz führten 1984 zur Reklassifizierung und Einordnung von *S. faecalis* und *S. faecium* in das Genus *Enterococcus* (E.) (Schleifer und Killper-Bälz, 1984). Die Beschreibung der Familie der Enterococcaceae erfolgte 2009 durch Ludwig et al.

Williams et al. (1991) teilten die Enterokokken anhand der 16S rDNA-Sequenz in fünf verschiedene Spezies-Gruppen ein: Die *E. faecalis*-, die *E. faecium*-, die *E. avium*-, die *E. gallinarum* und die *E. cecorum*-Gruppe. Einige Enterokokken, z.B. *E. dispar* (Collins et al., 1991) und *E. sulfureus* (Martinez-Murcia und Collins, 1991), können keiner dieser Gruppen zugeordnet werden (Byappanahalli et al., 2012).

2.1.2 Morphologie

Enterokokken sind kleine, kugelförmige bis elongierte Gram-positive Bakterien, die sich unter ungünstigen Wachstumsbedingungen als Kette zusammenlagern und unter Optimalbedingungen einzeln oder als Diplokokken vorliegen (Kalina, 1970). Die Kolonien sind glatt, rund und grau. Auf Columbia Schafblutagar wachsen einige Spezies, wie z.B. *E. faecium* mit unvollständiger, vergrünender Hämolyse (Devriese et al., 2006).

2.1.3 Eigenschaften

Vertreter der Gattung *Enterococcus* reagieren wie Streptokokken im Katalasetest negativ (Murray, 1990). Durch die Fähigkeit der Enterokokken zur Äskulinspaltung ist eine Unterscheidung zwischen den beiden Gattungen auf Selektivmedien unter Zusatz von Äskulin möglich (Facklam und Moody, 1970). Weitere Toleranzkriterien der Enterokokken können zur Abgrenzung von den Streptokokken genutzt werden: Enterokokken wachsen fakultativ anaerob in einem Temperaturspektrum von 10°C bis 45°C und in Medien mit einer Konzentration von 6,5% NaCl oder einem pH-Wert von 9,6 (Schleifer und Killper-Bälz, 1984). Die meisten Enterokokkenspezies besitzen das Zellwandantigen (Lipoteichonsäure) der Lancefield-Gruppe-D, mit folgenden Ausnahmen: *E. cecorum*, *E. columbae* und *E. dispar* (Hardie und Whiley, 1997).

Enterococcus casseliflavus und *E. gallinarum* gehören zur *E. gallinarum*-Gruppe, deren Vertreter im Gegensatz zu den anderen Spezies-Gruppen der Enterokokken beweglich sind (Murray, 1990).

Facklam und Collins entwickelten 1989 ein biochemisches Testprofil, um die verschiedenen Enterokokkenspezies voneinander zu unterscheiden (Facklam und Collins, 1989). Eine Differenzierung von *E. faecalis* und *E. faecium* ist hiermit möglich, andere Enterokokkenspezies können nicht identifiziert werden (Devriese et al., 2006). Zur besseren und schnelleren Durchführung wurden im Laufe der Jahre kommerzielle Test-Kits wie z.B. der API20STREP (bioMerieux) entwickelt. Er ermöglicht die Differenzierung der Spezies *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium*, *E. durans* und *E. gallinarum* anhand von 20 biochemischen Reaktionen. Das API-Identifikationssystem stammt aus der Humanmedizin und kann für veterinärmedizinische Isolate nur bedingt verwendet werden (Hudson et al., 2003). Daher werden vermehrt molekulargenetische Verfahren zur Speziesbestimmung genutzt (Gomes et al., 2007).

2.2 Die Bedeutung der Enterokokken

Enterokokken sind Bestandteil der kommensalen Flora im Magen-Darm-Trakt von Säugern und Vögeln (Devriese et al., 1987; Kuntz et al., 2004; Murray, 1990) und gelten als opportunistische Pathogene (Fertner et al., 2011). Neben ihrer klinischen Bedeutung werden sie als Indikatorkeim für die Wasserqualität genutzt (Frahm und Obst, 2003; Santo Domingo et al., 2003) und finden in verschiedenen probiotischen Präparaten Verwendung (Franz et al., 2011). In der Lebensmittelproduktion sind Enterokokken unter anderem als Starterkulturen von verschiedenen Käsesorten unabdingbar (Franz et al., 1999).

2.2.1 Enterokokken in der Humanmedizin

Enterokokken waren 2011 nach *Escherichia coli* die zweithäufigsten Erreger von nosokomialen Infektionen in deutschen Krankenhäusern (Anonymus, 2011b). Die zwei bedeutendsten Enterokokkenspezies, die beim Menschen klinische Symptome verursachen, sind *E. faecalis* und *E. faecium* (Anonymus, 2011b; Murray, 1990). Entzündungen des Urogenitaltraktes, die unter anderem durch kontaminierte Gegenstände wie Harnkatheter übertragen werden (Gross et al., 1976), machen einen großen Anteil der Enterokokkeninfektionen aus (Devriese et al., 2006).

Die Enterokokkenspezies *E. faecalis* ist bekannt als Auslöser einer bakteriellen Endokarditis (Megran, 1992). *Enterococcus faecalis* und *E. faecium* können eine Meningitis (Pintado et al., 2003), postoperative Wundinfektionen und eine primäre Sepsis (Anonymus, 2011b) hervorrufen. Seltener werden Enterokokken als Ursache von Infektionen des Zentralen Nervensystems oder des Respirationstraktes bei Neonaten nachgewiesen (Murray, 1990). *Enterococcus gallinarum* und *E. hirae* werden kaum mit Erkrankungen in Verbindung gebracht, können aber wie andere Enterokokkenspezies bei immunkomprimierten oder chronisch-kranken Patienten schwere invasive Infektionen verursachen (Reid et al., 2001).

2.2.1.1 Therapie

Bei Infektionen mit *E. faecalis* und *E. faecium* ist das bakteriostatisch wirkende Beta-Laktam-Antibiotikum Ampicillin das Mittel der Wahl (Arias et al., 2010).

Die Behandlung komplizierter Infektionen, wie z.B. Endokarditiden, erfolgt mit einer Kombination aus einem Aminoglykosid- und einem zellwandaktiven Antibiotikum (z.B. Penicillin) (Geraci und Martin, 1954), die gemeinsam eingesetzt bakterizid gegen Enterokokken wirken (Leclercq et al., 1992a).

Leidet der Patient an einer Penicillin-Allergie oder weisen die Enterokokken eine HL-Resistenz gegen Aminoglykoside auf, müssen andere Antibiotika für die synergistische Aktivität genutzt werden. Die Glykopeptid-Antibiotika Vancomycin und Teicoplanin greifen ebenfalls in die Zellwandsynthese ein und sind wichtige Reserveantibiotika, die in solchen Fällen eingesetzt werden (Peters et al., 2003). Auf Grund der ständigen Zunahme von Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE), wird dieses Antibiotikum in den USA bereits vereinzelt als obsolete Therapieoption angesehen (Arias et al., 2010).

Ergibt die Empfindlichkeitstestung eine HL-Resistenz gegenüber Glykopeptid-Antibiotika, besteht häufig zusätzlich eine Resistenz gegen verschiedene Vertreter anderer Wirkstoffklassen. Zur Therapie multi- und Glykopeptid-resistenter Enterokokken werden Linezolid und Quinupristin-Dalfopristin eingesetzt. Daptomycin, Tigecyclin, Fosfomycin, Chinolone, Tetrazykline und Cephalosporine der fünften Generation in Mono- oder Kombinationstherapie haben in Einzelfällen bereits zu Therapieerfolgen geführt (Hollenbeck und Rice, 2012).

2.2.2 Enterokokken beim Wirtschaftsgeflügel

Allgemeines

Aus dem Magen-Darm-Trakt des Wirtschaftsgeflügels können regelmäßig *E. faecium*, *E. cecorum*, *E. faecalis*, *E. hirae* und *E. durans* isoliert werden. Die ursprünglich aus Hühnervögeln isolierten Spezies *E. gallinarum* und *E. avium* sind nur sporadisch in der intestinalen Flora zu finden (Devriese et al., 1991b). Die Besiedelung des Magen-Darm-

Traktes mit Enterokokken verändert sich beim Geflügel im Laufe der Entwicklung. Bei Eintagsküken setzt sich die Enterokokkenflora aus *E. faecalis* und *E. faecium* zusammen. Ab der dritten und vierten Lebenswoche nimmt zunächst der Anteil von *E. faecalis* im Darm ab und es dominiert die Spezies *E. faecium* (Devriese et al., 1991b). Danach sinkt auch der Anteil von *E. faecium*, während ein Anstieg von *E. gallinarum* zu verzeichnen ist. Ab der 16. Lebenswoche besteht die Enterokokkenflora des Darms hauptsächlich aus *E. cecorum* (Devriese et al., 1991b). *Enterococcus faecalis* und *E. faecium* können jedoch auch im Verdauungstrakt adulter Tiere nachgewiesen werden (Devriese et al., 1991b; Kuntz et al., 2004).

Als primäre Krankheitserreger spielen Enterokokken beim Wirtschaftsgeflügel vermehrt eine Rolle. Seit einigen Jahren nehmen Berichte von klinischen Befunden und spezifischen Krankheitsbildern zu, die durch Enterokokken hervorgerufen werden (Cardona et al., 1993; Devriese et al., 1991a; Houghton et al., 1981; Petersen et al., 2009; Stalker et al., 2010).

Klinik

Landmann et al. berichteten 1998 erstmals über das Auftreten einer **amyloiden Arthropathie** bei braunen Legehennen, die sich in Bewegungsstörungen und einer Wachstumsdepression manifestiert. Ein Jahr später wurde ***Enterococcus faecalis*** bei betroffenen Tieren als verantwortliches Agens nachgewiesen (Landman, 1999). Die amyloide Arthropathie war bis dato hauptsächlich bei Wassergeflügel bekannt (Rigdon, 1961) und zeichnet sich durch orangefarbene Ablagerungen in den Gelenken und den inneren Organen aus (Landman et al., 1998).

Im Oktober 2001 beobachteten Tankson et al. (2009) das Auftreten eines **pulmonären Hypertonie-Syndroms** mit Herz-Kreislaufversagen bei Broilern. Betroffene Tiere leiden an Aszites, da durch Verletzungen der rechten Ventrikelwand vermehrt Plasmaflüssigkeit in die Brustbauchhöhle austreten kann. ***Enterococcus faecalis*** konnte aus erkrankten Tieren isoliert und in Infektionsversuchen als Auslöser des Syndroms identifiziert werden (Tankson et al., 2001, 2002).

Bei Jungtieren stehen Nabel- und Dottersackentzündungen im Vordergrund, die über eine systemische Infektion mit ***E. faecalis*** zu einer erhöhten Kükensterblichkeit („**First-Week-Mortality**“) beitragen (Olsen et al., 2012).

Enterococcus cecorum ist ein dominierender Kommensale im Darm des adulten Geflügels (Borst et al., 2012) und wurde 2002 erstmals im Zusammenhang mit dem Auftreten einer **Spondylitis, Osteomyelitis** und **Arthritis** bei Broilern und Broilerelterntieren beschrieben. Erkrankte Tiere zeigen Bewegungsstörungen, die zu einer Wachstumsdepression, erhöhten Verlusten und einem verminderten Schlachtgewicht führen (Devriese et al., 2002).

Die Enterokokkenspezies ***E. hirae*** ist für verschiedene Krankheitsbilder verantwortlich, wie eine **Wachstumsdepression** bei Küken (Farrow und Collins, 1985) und eine **Enzephalomalazie, Septikämie** und **Endokarditis** bei adulten Tieren (Devriese et al., 1991a; McNamee und King, 1996; Randall et al., 1993; Velkers et al., 2011). Im Vordergrund der Infektionen mit ***E. hirae*** stehen wirtschaftliche Verluste durch erhöhte Mortalitäten, ein vermindertes Wachstum und häufige Beanstandungen bei der Schlachtung (Houghton et al., 1981).

Eine weitere Enterokokkenspezies, die eine **Enzephalomalazie** bei Hühnerküken (Legehennen und Broilern) hervorruft, ist ***E. durans***. Das pathologisch-anatomische Bild ist durch fokale Nekrosen in der Medulla oblongata und im Cerebellum (Cardona et al., 1993) charakterisiert, während bei einer Infektion mit ***E. hirae*** das gesamte Gehirn mit Ausnahme des Cerebellums betroffen ist (Chamanza et al., 1998). Klinische Symptome der Enzephalomalazie sind Depression, Paralysen und Beintremor-, sowie eine Zunahme der Mortalität (Cardona et al., 1993).

Enterococcus faecium wurde für eine erhöhte Kükensterblichkeit bei weißen Pekingenten verantwortlich gemacht (Sandhu, 1988); weitere Berichte von definierten Krankheitsbildern fehlen.

Therapie

Die Therapie bakterieller Infektionen in Wirtschaftsgeflügelbeständen erfolgt mit antimikrobiellen Substanzen anhand eines Antibiogramms. Die Antibiotika-Leitlinien der Bundestierärztekammer (Bundestierärztekammer, 2010) verweisen auf einen verantwortungsbewussten Einsatz von Antibiotika bei lebensmittelliefernden Tieren, wo „das Bestandsmanagement zur Vermeidung von Infektionskrankheiten und damit zur Reduzierung der Menge eingesetzter Antibiotika“ oberste Priorität hat. Dazu gehören die Optimierung der Haltungsbedingungen sowie eine sinnvolle Impfstrategie (Bundestierärztekammer, 2010). Die Impfung gegen Enterokokken ist derzeit nur mit bestandspezifischen Vakzinen möglich und wird vor allem bei wiederholtem Auftreten von klinisch manifesten Enterokokkeninfektionen in einem Bestand durchgeführt (Selbitz, 2008).

Folgende antibiotische Wirkstoffe werden von Thayer und Waltman (2013) zur Therapie von Enterokokkeninfektionen vorgeschlagen: Penicillin, Erythromycin, Novobiocin, Oxytetracyclin, Chlortetracyclin und Tetracyclin. Da Enterokokken häufig resistent gegen Makrolide, Tetracycline, Chloramphenicol, Fosfomycine, Rifampin und Chinolone sind, werden diese Antibiotika selten zur Behandlung von Enterokokkeninfektionen verwendet (Hollenbeck und Rice, 2012).

Teil 2 – Resistenzen bei Enterokokken

Bei Enterokokken sind eine Vielzahl **intrinsischer und erworbener Resistenzen** bekannt, die chromosomal oder Plasmid-assoziiert vorliegen (Moellering, 1991; Peters et al., 2003). Sie können über verschiedene genetische Mechanismen innerhalb der Enterokokkenpopulation und mit anderen Gram-positiven Bakterien ausgetauscht werden (Clewell, 1990).

Die **intrinsische** oder **natürliche** Resistenz beschreibt, dass eine antimikrobielle Substanz unwirksam ist, weil den Enterokokken der Angriffspunkt des Antibiotikums fehlt oder resistente Mutanten aus einer sonst empfindlichen Population selektiert wurden (chromosomal determinierte Resistenz) (Löscher, 2010).

Die **übertragbaren** Resistenzen entstehen bei Enterokokken durch den horizontalen Transfer von fremdem Genmaterial, das über Konjugation oder die Bewegung von Transposonen („springende Gene“) ausgetauscht werden kann (Hollenbeck und Rice, 2012; Löscher, 2010). Seltener spielen Bakteriophagen bei der Übertragung von Antibiotika-Resistenzen eine Rolle (Mazaheri et al., 2011).

Gegenüber **Beta-Laktamen** weisen alle Enterokokkenspezies eine natürliche **intrinsische** Resistenz auf, weil die Affinität ihrer Penicillin-bindenden-Proteine (PBP) gegen Vertreter dieser Wirkstoffklasse variiert. Die intrinsische Resistenz gegen Cephalosporine ist am stärksten ausgeprägt, während Carbapeneme etwas wirksamer sind. Penicilline sind gegen Enterokokken die wirksamsten Beta-Laktam-Antibiotika, und Ampicillin hat die höchste *in vitro* Aktivität (Gilmore et al., 2002).

Infektionen mit der Enterokokkenspezies ***E. faecium*** sind häufig therapieresistent gegen hohe Ampicillin-Konzentrationen. Diese **erworbene** Resistenz kann durch sporadische Mutationen entstehen, die die Produktion von PBP mit einer sehr geringen Affinität zu Beta-Laktamen bewirken (Sifaoui et al., 2001). Auch die Überproduktion von PBP5-Proteinen, die natürlicherweise bereits eine geringe Affinität für Beta-Laktame besitzen, kann für vergleichsweise hohe MHK-Werte von *E. faecium* im Vergleich zu *E. faecalis* verantwortlich sein (Fontana et al., 1996).

Gene für die Produktion von Beta-Laktamasen wurden bisher nur bei *E. faecalis* nachgewiesen und vermutlich auf einem Pheromon-empfindlichen konjugativen Plasmid von den Staphylokokken erworben (Rice et al., 1991). Diese Plasmide stimulieren die bakterielle Konjugation, über die genetische Informationen hocheffizient ausgetauscht werden können (Palmer et al., 2010; Wardal et al., 2010).

Sowohl *E. faecium* als auch *E. faecalis* weisen eine **intrinsische** niedrige Resistenz gegen **Aminoglykosid-Antibiotika** auf (Hollenbeck und Rice, 2012; Leclercq et al., 1992a). Unterschreitet die eingesetzte Konzentration 250µg/ml, wird die bakterizide Wirkung nicht erreicht (Chen, 1986), weil die Wirkstoffe die Zellmembran der Enterokokken nicht durchdringen können (Toala et al., 1969; Zimmermann et al., 1971). Da höhere Konzentrationen die therapeutische Breite verringern würden, können Aminoglykoside nicht monotherapeutisch gegen Enterokokken eingesetzt werden (Johnson, 1994). Bei der Therapie von Infektionen mit Enterokokken nutzt man den synergistischen Effekt von Vertretern der Aminoglykoside und Penicillin. Die Hemmung der Zellwandsynthese durch Beta-Laktam-Antibiotika erleichtert Aminoglykosid-Antibiotika das Eindringen in die Zelle, wo sie bakterizid wirken (Herman und Gerding, 1991).

Eine **hochgradige Aminoglykosid-Resistenz** können Enterokokken über konjugative Plasmide erwerben, auf denen Gene für Aminoglykosid-modifizierende Enzyme liegen (Herman und Gerding, 1991). Die Enzyme verhindern durch Phosphorylierung die Bindung des Antibiotikums an die 30S-Untereinheit der bakteriellen Ribosomen, sodass die Proteinsynthese nicht gestört wird (Ferretti et al., 1986). Das Gen, welches für diesen Resistenzmechanismus codiert, stammt vermutlich von den Staphylokokken (Ounissi et al., 1990; Rice et al., 1991).

Erworbene Resistenzen der Enterokokken gegen Vertreter der **Makrolid-, Lincosamid- und Streptogramin-B-Antibiotika (MLS-Antibiotika)** werden durch das *erm(B)*-Gen (erythromycin ribosome methylation) vermittelt und liegen auf dem Transposon Tn916 (Rice, 1998). Es codiert für eine Methyltransferase, die durch die Methylierung der 23S rRNA (De Leener et al., 2004; Weisblum, 1995) die Bindung aller Antibiotika der MLS-Gruppe verhindert (Roberts et al., 1999). Die Resistenz von *E. faecalis* und *E. faecium* gegen das Lincosamid **Streptogramin B** (Dutta und Devriese, 1982; Tremblay et al., 2011) ist hingegen eine intrinsische Eigenschaft dieser Spezies und wird vermutlich durch eine ABC-Efflux-Pumpe aufrecht erhalten (Singh et al., 2002).

Die **Tetrazyklin-Resistenz** ist bei mehreren Enterokokkenspezies weit verbreitet (Butaye et al., 2001; Cauwerts et al., 2007). Diese **erworbene** Resistenz beruht auf zwei verschiedenen Mechanismen der *tet*-Gene, die für Proteine codieren, die entweder den aktiven Efflux des Tetrazyklins durch die Zellmembran bewirken oder durch Bindung an die Ribosomen deren Konformation ändern, sodass die Antibiotika nicht mehr binden können (Gilmore et al., 2002). Das *tet(M)*-Gen ist die häufigste Determinante einer Tetrazyklin-Resistenz der Enterokokken und liegt entweder chromosomal im Transposon Tn916 oder Plasmid-assoziiert vor (Rice, 1998).

Alle Enterokokkenspezies besitzen die **intrinsische** Fähigkeit exogene Folsäurequellen zu nutzen, wodurch antimikrobielle Substanzen wie **Sulfonamide** und **Trimethoprim** unwirksam sind, die die Folsäuresynthese hemmen (Schwarz et al., 2013). Bei der *in vitro* Empfindlichkeitsprüfung von Sulfamethoxazol-Trimethoprim in einem Medium ohne Folsäurezusatz reagieren Enterokokken scheinbar sensibel, während der therapeutische Einsatz dieser Wirkstoffe unter Praxisbedingungen nicht erfolgreich ist (Grayson et al., 1990).

Obwohl **Chloramphenicol** in der EU seit 1994 nicht mehr bei lebensmittelliefernden Tieren eingesetzt werden dürfen, finden sich weiterhin resistente **Enterokokken** (7% (Peters et al., 2003), 27% (Ellerbroek et al., 2004)). Die Resistenz wird durch das Enzym Chloramphenicol-

Acetyltransferase (CAT) vermittelt, das durch Acetylierung die Bindung von Chloramphenicol an das Ribosom verhindert (Shaw, 1983) und in unmittelbarer Nähe zu den Resistenzgenen der MLS-Gruppe liegt. Werner et al. (2000) vermuteten, dass eine genetische Verbindung zwischen der Resistenz gegen Streptogramin-, Makrolid- und Lincosamid-Antibiotika und der Resistenz gegen Chloramphenicol für die Persistenz der Resistenz verantwortlich ist.

In der Humanmedizin sind Resistenzen gegen das **Glykopeptid**-Antibiotikum Vancomycin und andere Vertreter dieser Wirkstoffklasse von besonderem Interesse (Stobberingh et al., 1999). Die **Vancomycin**-Resistenz wurde zum ersten Mal 1986 in Frankreich bei *E. faecium* beobachtet (Uttley et al., 1988) und tritt am häufigsten bei dieser Spezies auf (Anonymus, 1993). Seltener werden Vancomycin-resistente *E. gallinarum* und *E. faecalis* isoliert (Leclercq et al., 1988).

Die Resistenzgene der VRE befinden sich auf übertragbaren Plasmiden (*vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE* und *vanG*), oder sind nicht übertragbare chromosomale Determinanten (*vanC*) (Leclercq und Courvalin, 1997; Patel et al., 1997). Die *vanC*-Gene sind charakteristisch für die *E. gallinarum*-Gruppe und bewirken eine konstitutive, nicht übertragbare low-level Resistenz (Leclercq et al., 1992b; Moellering, 1991). Das *vanA*-Gen kann durch Konjugation an andere Gram-positive Bakterien weitergegeben werden und ist bei *E. faecium* und *E. faecalis* nachgewiesen worden (Shlaes et al., 1989a; b). Sievert et al. berichteten 2002, dass ein *vanA*-Gen der Enterokokken auf Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) übertragen wurde (Sievert et al., 2002).

Die Expression aller *van*-Gene initiiert die Produktion von Peptidoglykanvorläufern mit geringer Bindungsaffinität für Glykopeptide, sodass die Zellwandbiosynthese der Enterokokken nicht gestört wird (Arthur et al., 1992). Die Resistenz kann nur durch Glykopeptid-Antibiotika induziert werden; das Auftreten von Kreuzresistenzen durch den Einsatz anderer antimikrobieller Wirkstoffklassen ist nicht bekannt (Shlaes et al., 1989a).

Die **Ursachen** für das Auftreten von **VRE** und **multiresistenten** Enterokokken in der Human- und Tiermedizin werden kontrovers diskutiert. Häufig wird der Einsatz antimikrobieller Substanzen in der kommerziellen Tierproduktion für die Entstehung resistenter Bakterien verantwortlich gemacht (Aarestrup, 1999; Bates et al., 1994). Der prophylaktische Einsatz von Antibiotika oder der Einsatz als Wachstumsförderer in Tierbeständen begünstigt die Entstehung resistenter Enterokokken (Butaye et al., 2001). Umgekehrt verringerte sich der Selektionsdruck auf die Enterokokken nach dem Verbot von Avoparcin als Futterzusatzstoff 1995 in Dänemark. Dadurch sank der Anteil Glykopeptid-resistenter *E. faecium* Isolate in Broilern von 72,7% (1995) auf 5,8% (2000) (Aarestrup et al., 2001).

Die Ergebnisse aus Studien zur Übertragung von resistenten Enterokokken vom Wirtschaftsgeflügel auf den Menschen sind widersprüchlich.

Aarestrup et al. (2000) untersuchten das Vorkommen von Resistenzen und beteiligter Resistenzgene bei Enterokokken von Menschen, Schweinen und Geflügel in Dänemark und fanden einheitliche Resistenzmuster und -gene bei allen Enterokokkenisolaten. Van den Bogaard et al. (2002) zeigten, dass die Resistenzmuster von Enterokokkenisolaten aus Broilern mit denen der Landwirte und Schlachthofmitarbeiter korrelierten. Richter (2011) konnte hingegen keine Übertragung von Vancomycin-resistenten Enterokokken aus Umweltstaub aus Geflügelställen auf den Menschen feststellen. Nach Untersuchungen des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR) besteht nur ein geringes Risiko, dass Verbraucher über die Lebensmittelkette Enterokokken aufnehmen, die resistent gegen humanrelevante Antibiotika sind (Ellerbroek et al., 2004).

Verfahren zur Ermittlung des Resistenzverhaltens

Um das Resistenzverhalten von Bakterien zu bestimmen, werden verschiedene Verfahren angewendet.

Beim **Disk Diffusion Test** kann auf einer Nähragarplatte (150 mm) die Wirksamkeit von bis zu 12 verschiedenen Antibiotika untersucht werden, die in definierten Konzentrationen

getestet werden. Anhand der Hemmhöfe wird eine **qualitative** Einteilung der Isolate in sensibel, intermediär-resistent und resistent vorgenommen (Jorgensen und Ferraro, 2009). Eine **quantitative** Aussage über das Resistenzverhalten ist mit dem Agardilutionstest oder dem Mikrodilutionsverfahren möglich (Schwarz et al., 2003). Zweifache Verdünnungen des Antibiotikums werden auf Mueller-Hinton-Agar oder in Mueller-Hinton-Bouillon gegeben, sodass ein Konzentrationsgradient (z.B. 1, 2, 4, 8, 16 µg/ml) entsteht. Die geringste Konzentration des Antibiotikums, die ein sichtbares Wachstum des Bakteriums hemmt, ist die Minimale Hemmkonzentration (MHK) (Jorgensen und Ferraro, 2009). Zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse erfolgt die Durchführung nach einem standardisierten Verfahren gemäß den CLSI-Richtlinien für veterinärmedizinische oder EUCAST-Richtlinien für humanmedizinische Erreger. Zur Qualitätskontrolle werden definierte Referenzstämme mitgeführt.

Die Interpretation der Ergebnisse erfolgt mittels klinischer Breakpoints, die die Wirksamkeit der antimikrobiellen Substanz abhängig von Erreger, Tierart und betroffenen Organsystem beschreiben und die Bewertung der Erreger nach den Empfindlichkeitskategorien sensibel, intermediär-resistent und resistent ermöglichen.

Ein **sensibles** Ergebnis bedeutet, dass das Antibiotikum zur Therapie verwendet werden kann, weil die empfohlene Dosierung ausreicht, um das bakterielle Wachstum zu hemmen. Infektionen mit **resistenten** Bakterien können mit dieser Dosierung nicht behandelt werden, weil die im Wirtsorganismus erreichten Wirkkonzentrationen keinen therapeutischen Effekt haben. Infektionen mit **intermediär-resistenten** Isolaten können in Körperregionen und Geweben therapiert werden, in denen Antibiotika eine ausreichende Konzentration erreichen, oder wenn die Dosierung ohne Abnahme der therapeutischen Breite erhöht werden kann. Ein intermediär-resistentes Ergebnis definiert außerdem eine Pufferzone, die verhindert, dass unkontrollierbare technische Faktoren zu Diskrepanzen in der Interpretation der Ergebnisse führen (CLSI, 2008).

Liegen für das getestete Antibiotikum und den bakteriellen Erreger keine Breakpoints vor, können die Minimale Hemmkonzentration 50 (MHK₅₀) und 90 (MHK₉₀) genutzt werden um die Ergebnisse der Empfindlichkeitstestung zu vergleichen. Die MHK₅₀ und MHK₉₀ sind definiert als die geringste Konzentration des untersuchten Antibiotikums, die 50% bzw. 90% der Bakterien in ihrem Wachstum hemmt (Schwarz et al., 2010).

Zeigen sich Bakterien unempfindlich gegen die Wirkstoffe mehrerer Antibiotikaklassen, spricht man von **multiresistenten** Erregern. Ein Isolat gilt als multiresistent, wenn es sich in der phänotypischen Resistenztestung gegen drei oder mehr Antibiotikaklassen resistent zeigt. Liegen Ergebnisse zur phäno- und genotypischen Resistenz vor, werden die Bakterienisolate unabhängig von der phänotypischen Resistenz als multiresistent bezeichnet, wenn sie drei oder mehr Resistenzgene oder Mutationen aufweisen, die jeweils mit einem anderen Resistenzphänotyp (verschiedene Wirkstoffklassen oder Untergruppen) assoziiert sind (Schwarz et al., 2010).

Multiresistente Enterokokken wurden in den letzten Jahren sowohl in der Humanmedizin (Arias et al., 2010) als auch bei lebensmittelliefernden Tieren, wie dem Wirtschaftsgeflügel (Hayes et al., 2004; Joseph et al., 2001; Khan et al., 2005), vermehrt nachgewiesen.

Teil 3 – Die Pathogenität und Virulenz der Enterokokken

2.3 Die Definition von Pathogenität und Virulenz

Die **Pathogenität** eines Mikroorganismus bezeichnet in der Medizin die grundsätzliche Fähigkeit eines Erregers im empfänglichen Wirtsorganismus eine Krankheit auszulösen. Eine Infektion muss dabei nicht zwangsläufig zum Auftreten klinischer Erscheinungen führen (Pirofski und Casadevall, 2012).

Die **Virulenz** eines pathogenen Erregers beschreibt das Ausmaß seiner Pathogenität, also die relative Fähigkeit den Wirt zu schädigen (Casadevall und Pirofski, 2001).

Virulenzfaktoren wie Toxine oder Oberflächenproteine tragen zur Virulenz eines Erregers bei (Pirofski und Casadevall, 2012), indem sie den Wirt schädigen (Casadevall und Pirofski, 2001). Sie wirken, wenn der Genotyp phänotypisch exprimiert wird (Poulin und Combes, 1999).

Pathogenität und Virulenz eines Mikroorganismus bestimmen das Ausmaß des Schadens, den ein Mikroorganismus seinem Wirt zufügen kann. Voraussetzung ist, dass der Wirt für den spezifischen Mikroorganismus empfänglich ist (Casadevall und Pirofski, 2001; Pirofski und Casadevall, 2012). Ernstzunehmende Einschätzungen der Pathogenität und Virulenz eines Mikroorganismus können im Versuchsmodell vorgenommen werden, wenn die Versuchsdurchführung für den Mikro- und den Wirtsorganismus unter standardisierten Bedingungen erfolgt (Pirofski und Casadevall, 2012).

2.4 Die Virulenzfaktoren der Enterokokken

Enterokokken kommen im Magen-Darm-Trakt des Wirtschaftsgeflügels vor und können als opportunistische Pathogene verschiedene Organsysteme besiedeln (Devriese et al., 1987; Kuntz et al., 2004).

Durch ihre besondere Fähigkeit auf extra-chromosomalen Elementen gelegene Virulenzfaktoren aufzunehmen, zu akkumulieren und auszutauschen gewinnen sie seit beinahe 30 Jahren an Bedeutung (Clewell, 1990).

Untersuchungen haben gezeigt, dass *E. faecium* im Vergleich zu *E. faecalis* schneller und häufiger Resistenzen entwickelt, aber nur selten als Infektionserreger bei klinisch kranken Patienten nachgewiesen wurde. Devriese et al. (2006) vermuteten daher, dass *E. faecalis* mehr Virulenzfaktoren aufweist, die die stärkere Pathogenität im Wirtsorganismus bedingen.

In einer Stellungnahme des Bundesinstituts für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) wurden 2004 die Enzyme Cytolysin, Gelatinase und Hyaluronidase und die Oberflächenproteine Aggregation Substance und Enterococcal Surface Protein als relevante Virulenzfaktoren von *E. faecalis* beschrieben (Anonymus, 2004).

Klinische Studien aus der Humanmedizin zeigen, dass Entzündungen und Gewebeschäden beim Menschen vermehrt durch Enterokokken hervorgerufen werden, die die oben genannten Virulenzfaktoren aufweisen (Giridhara Upadhyaya et al., 2009; Shankar et al., 2002).

In der Veterinärmedizin zeigten Infektionsversuche mit *E. faecalis* in gesunden braunen Legehennen, dass die Besiedlung der synovialen Membran zur amyloiden Arthropathie führt, wenn der Infektionsstamm die Virulenzfaktoren Cytolysin, Aggregation Substance und Gelatinase aufweist (Landman et al., 2003).

2.4.1 Enzymatische Virulenzfaktoren

2.4.1.1 Cytolysin (*cyIR1*, *cyIR2*, *cyIL_L*, *cyIL_S*, *cyIM*, *cyIB*, *cyIA*, *cyII*)

Das Cytolysin ist ein Enzym mit zytotoxischer und hämolytischer Aktivität (Segarra et al., 1991). Die lysierten Erythrozyten setzen Nährstoffe und Eisen frei, die von den Enterokokken als Nährstoffquelle genutzt werden können (Chow et al., 1993). Die bakterizide Wirkung des Cytolysins richtet sich gegen andere Gram-positive Bakterien (Booth et al., 1996; Stark, 1960). Die genetische Information liegt als Cytolysin-Operon auf der Pathogenitätsinsel nahe dem *esp*-Gen (Shankar et al., 2002) und besteht aus acht Genen: *cyIR1*, *cyIR2*, *cyIL_L*, *cyIL_S*, *cyIM*, *cyIB*, *cyIA* und *cyII*. Die Gene *cyIL_L* und *cyIL_S* codieren für zwei Peptid-Untereinheiten, aus denen das Cytolysin zusammensetzt wird, während die Genprodukte von *cyIM*, *cyIB* und *cyIA* für die posttranslationale Modifizierung und die Sekretion des Enzyms verantwortlich sind. Das Gen *cyII* codiert für ein Protein, dass Zellimmunität vermittelt, und *cyIR1* und *cyIR2* regulieren die Expression von Cytolysin (Coburn und Gilmore, 2003). Die Downregulation

von *cylA* führt zum Aussetzen der Hämolyse-Aktivität, da *cyLL* und *cyLS* nicht mehr aktiviert werden können (Eaton und Gasson, 2001).

Neben dem genetischen Nachweis kann die phänotypische Ausprägung des Virulenzfaktors Cytolysin *in vitro* auf Blutagar mit 5% Pferdeblut untersucht werden. Das Hämolyseverhalten wird nach 24- bis 48-stündiger Inkubation in anaerober Atmosphäre bei 37°C beurteilt (Gaspar et al., 2009; Lanyi, 1987).

Hämolisierende Enterokokken führten im Tiermodell bei Mäusen mit einer Peritonitis zu einer erhöhten Mortalität (Ike et al., 1984) und verschlimmerten den Verlauf der Endophthalmitis (Jett et al., 1992; Singh et al., 1998).

Kaninchen, die nach einer experimentellen Infektion an einer Endokarditis erkrankten, zeigten eine kürzere Überlebensdauer, wenn die Enterokokken-Infektionsstämme neben Cytolysin auch das Oberflächenantigen Aggregation Substance aufwiesen (Chow et al., 1993). Als mögliche Erklärung wurde ein synergistischer Effekt der beiden Virulenzfaktoren angenommen (Channaiah et al., 2010; Chow et al., 1993; Poeta et al., 2006b).

In einer klinischen Studie über Enterokokkeninfektionen beim Menschen konnten hingegen keine Zusammenhänge zwischen der Hämolyse-Aktivität der Enterokokken und dem Verlauf der Bakteriämie beobachtet werden (Vergis et al., 2002).

2.4.1.2 Gelatinase (*gelE*)

Der Virulenzfaktor Gelatinase ist eine extrazelluläre Zink-Endoprotease, die Gelatine, Kollagen, Kasein, Hämoglobin und andere Peptide hydrolysieren kann (Makinen et al., 1989). Das Gen *gelE* codiert für die Gelatinase und konnte bei *E. faecalis* sowie in seltenen Fällen auch bei *E. faecium* und anderen *Enterococcus* Spezies nachgewiesen werden (Diarra et al., 2010; Poeta et al., 2006b). Poeta et al. (2006a) berichteten, dass gelatinespaltende Isolate das *gelE*-Gen aufwiesen, während der Nachweis des Gens nicht zwangsläufig bedeutete, dass das Gen exprimiert und die Gelatinase-Aktivität phänotypisch ausgeprägt wurde.

Der phänotypische Nachweis des Virulenzfaktors Gelatinase kann *in vitro* durch das Ausstreichen von Erregermaterial auf Nährgelatine-Platten (Su et al., 1991) oder die Inokulation von Nährgelatine befüllten Reagenzgläsern untersucht werden (dela Cruz und Torres, 2012).

Das *gelE*-Gen wurde in verschiedenen Tiermodellen mit der Pathogenität von Enterokokken assoziiert (Gutschik et al., 1979; Singh et al., 1998). Gutschik et al. (1979) zeigten, dass sich der Verlauf von Endokarditiden beim Kaninchen verschlimmert, wenn die verantwortlichen Enterokokken Gelatine spalten können.

Singh et al. (1998) fanden heraus, dass die mittlere Letale Dosis (LD₅₀) im Maus-Peritonitis-Modell bei Stämmen mit positiver Gelatinase-Aktivität wesentlich geringer war als bei Stämmen ohne Gelatinase-Aktivität.

Hingegen konnte bei humanen Patienten mit einer Bakteriämie kein Zusammenhang zwischen dem Nachweis des *gelE*-Gens oder der enzymatischen Aktivität der Gelatinase und einer erhöhten Mortalität festgestellt werden (Vergis et al., 2002).

2.4.1.3 Hyaluronidase (*hylEfm*)

Das Enzym Hyaluronidase katalysiert den Abbau von Hyaluronsäure (Hynes und Walton, 2000), die in vielen Organen und Körperflüssigkeiten (Laurent und Fraser, 1992) und der extrazellulären Matrix des Bindegewebes zu finden ist (Hart et al., 2009). Die enzymatische Aktivität der Hyaluronidase erleichtert Bakterien die Kolonisation des Wirtsorganismus, weil sie die Viskosität der extrazellulären Matrix herabsetzt und die freiwerdenden Nährstoffe für das bakterielle Wachstum genutzt werden können (Hynes und Walton, 2000).

Ob Isolate den Virulenzfaktor phänotypisch ausprägen, kann in einem *in vitro* Test mit einem schleimigen *Streptococcus equi* Stamm untersucht werden. *Enterococcus* Isolate mit Hyaluronidase-Aktivität hemmen die Ausbildung der Muzinkapsel der Streptokokkenkolonien. Das Verfahren ist für die Testung von Staphylokokken gut etabliert (Devriese und Oeding, 1975).

Das Gen des Virulenzfaktors Hyaluronidase, *hyl_{Em}*, wurde erstmals in den USA bei einem humanen Enterokokkenisolat der Spezies *E. faecium* nachgewiesen (Rice et al., 2003). Rice et al. (2003) wiesen *hyl_{Em}* vorwiegend in klinischen *E. faecium* Isolaten nach und beobachteten, dass sie vermehrt bei Enterokokken vorkamen, die resistent gegen Vancomycin waren. Andere Vancomycin-resistente *E. faecium* Isolate wiesen neben *hyl_{Em}* auch das *esp*-Gen auf (Camargo et al., 2006).

2.4.2 Oberflächenproteine als Virulenzfaktor

2.4.2.1 Aggregation Substance (*asa1*)

Die Aggregation Substance wird codiert durch das Gen *asa1* (Mundy et al., 2000) und ist ein Oberflächenprotein von *E. faecalis*, dessen Expression durch die Exkretion von Pheromonen stimuliert wird. An und in Körperzellen ermöglicht es die Adhäsion und Internalisation der Bakterien (Kreft et al., 1992; Wells et al., 2000) und schafft durch eine effiziente Bindung von Donorzellen an plasmidfreie Rezipientenzellen die Voraussetzung zum Plasmidtransfer im Rahmen der bakteriellen Konjugation (Clewell, 1993; Mundy et al., 2000). So können Resistenz- und Virulenzgene zwischen Enterokokken und anderen Bakterien ausgetauscht werden (Palmer et al., 2010). Aggregation Substance ist auch an der Immunevasion von Enterokokken im Wirtsorganismus beteiligt, indem sie das Eindringen von Enterokokken in Makrophagen vermittelt und die Immunantwort der polymorphnukleären Leukozyten durch das Ausschütten bakterieller Pheromone moduliert (Kreft et al., 1992; Wells et al., 2000). Im Kaninchenmodell wurde beobachtet, dass Aggregation Substance bei experimentellen Infektionen mit *E. faecalis* signifikant zur Ausbildung einer Endokarditis beitrug (Chow et al., 1993; Schlievert et al., 1998).

2.4.2.2 Enterococcal Surface Protein (*esp*)

Das *esp*-Gen codiert für das Enterococcal Surface Protein (Shankar et al., 1999), welches in Anwesenheit von Glucose die Fähigkeit zur Biofilmbildung von *E. faecalis* verbessert (Tendolkar et al., 2004). Die Expression des Gens ist nicht einheitlich und führt zur Produktion von strukturell unterschiedlichen *esp*-Proteinen auf der Zelloberfläche. Das erleichtert den Enterokokken die Immunevasion (Shankar et al., 1999). Shankar et al. (1999) verglichen Enterokokkenisolate von humanen Bakteriämiepatienten mit denen aus Stuhlproben gesunder Menschen und zeigten, dass nur klinische *E. faecalis* Isolate das *esp*-Gen aufwiesen. In einer andere Studie ließ sich bei bakteriämischen Patienten kein Zusammenhang zwischen dem Nachweis des *esp*-Gens und einer erhöhten Mortalität nachweisen (Vergis et al., 2002).

2.5 Der Embryoletalitätstest

In embryonierten Hühnereier werden seit über 70 Jahren die krankmachenden Eigenschaften von Viren, Bakterien und Pilzen untersucht (Goodpasture und Anderson, 1937; Moore, 1941).

Das hinsichtlich seiner Virulenz am besten untersuchte Bakterium ist *E. coli*. Der Zusammenhang zwischen unterschiedlichen Virulenzfaktoren, Antibiotika- oder Komplementresistenz und der abtötenden Wirkung der *E. coli* Isolate wurde in verschiedenen Experimenten bestimmt (Gibbs et al., 2003; Montgomery et al., 2005; Wooley et al., 1992).

Auch bei Enterokokken fand der Embryoletalitätstest zur Bestimmung der Pathogenität Verwendung. Abdul-Aziz und El-Sukhon (1994) bestimmten die Pathogenität eines *E. hirae* Isolats eines Huhns mit zentralnervösen Störungen. Das eingesetzte Inokulum enthielt etwa 6×10^8 KBE/ml in physiologischer Kochsalzlösung. Davon wurden 0,1 ml in die Allantoishöhle 12 Tage alter embryonierter Hühnereier appliziert und vier Tage lang das Absterbeverhalten beobachtet. *Enterococcus hirae* rief keine makroskopischen Veränderungen hervor und tötete die Embryonen nicht ab (Abdul-Aziz und el-Sukhon, 1994). Borst et al. (2014) verglichen die Pathogenität von acht klinischen und neun kommensalen *E. cecorum* Isolaten. Die klinischen Isolate stammten aus der Wirbelsäule von an

Spondylitis erkrankten Broilern, während die kommensalen Isolate aus dem Blinddarminhalt nicht erkrankter Tiere isoliert wurden. Die Inokulationsdosis von 100 KBE wurde 12 Tage alten embryonierten Hühnereiern von Broilern in die Allantoishöhle gegeben und die Überlebensrate in den folgenden vier Tagen notiert. Sie lag bei den klinischen Isolaten durchschnittlich bei neun Prozent, bei den kommensalen Isolaten betrug sie 61%. Die klinischen Isolate verursachten bei den infizierten Embryonen eine Septikämie, die makroskopisch durch multifokale Hämorrhagien und subkutane Ödeme in Erscheinung trat; die kommensalen Isolate verursachten hingegen keine Läsionen (Borst, 2014). Rudolph (2004) untersuchte *E. faecalis* Isolate von Legehennen mit amyloider Arthropathie. Zehn Tage alte Embryonen wurden mit einem Inokulum von etwa 500 KBE in 0,2 ml infiziert und für sieben Tage beobachtet. Zur Beurteilung der Pathogenität wurden der Überlebensindex und die Absterberate im Verlauf von sieben Beobachtungstagen, wie von Wooley et al. (2000) beschrieben, verwendet. Von 27 *E. faecalis* Isolaten zeigten sich 17 hochpathogen, fünf mittelgradig pathogen und drei schwach pathogen. Makroskopische Veränderungen der abgestorbenen Embryonen wurden in der Versuchsauswertung nicht untersucht (Rudolph, 2004).

Die bei den unterschiedlichen Enterokokkenspezies ermittelten Absterberaten der Embryonen sind in guter Übereinstimmung mit der klinischen Relevanz beim Nutzgeflügel.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Probenmaterial

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten 163 Enterokokkenisolate wurden von Frau Dr. Sonia Cortez de Jäckel im mikrobiologischen Labor der Praxis von Dr. Manfred Pöppel, Anreppen, zur Verfügung gestellt. Sie stammten von Tieren aus Geflügelbeständen in Nordrhein-Westfalen und Niedersachsen, die zur Sektion eingesandt und in der Routinediagnostik von 2010 bis 2011 untersucht wurden. Die pathologisch-anatomischen Befunde der Tiere waren eine Septikämie, eine Arthritis oder eine Dottersackentzündung. In der Tabelle 1 sind die Nutzungsrichtungen mit Tierart und Organ dargestellt, aus denen die Isolate gewonnen wurden.

Tab. 1: Herkunft der 163 verwendeten Isolate

Nutzungsrichtung	Alter	Organ
Broiler (66)	Küken (53)	Dottersack (47)
		Herz (4)
		Leber (2)
	Adulte Tiere (13)	Herz (4)
		Knochenmark (1)
		Leber (5)
		Luftsack (1)
		Lunge (1)
Legehennen (35)	Küken (32)	Dottersack (27)
		Gelenk (1)
		Herz (1)
		Leber (3)
	Adulte Tiere (3)	Lunge (1)
		Sinus (1)
		Gelenk (1)
Puten (59)	Küken (27)	Dottersack (23)
		Herz (4)
	Adulte Tiere (32)	Herz (9)
		Leber (2)
		Luftsack (3)
		Lunge (16)
		Milz (1)
		Gelenk (1)
Keine Angabe (3)	Keine Angabe (3)	Keine Angabe (3)
Gesamt		163

Bei Eingang im Institut für Geflügelkrankheiten der Freien Universität Berlin erhielten die Enterokokkenisolate eine Geflügel-Berlin-(GB)-Nummer. Vor Beginn der Versuche wurde zur Übersichtlichkeit jedem Isolat, beginnend mit der ersten Einsendung, eine Nummer von 1 bis 163 zugewiesen.

3.1.2 Referenz- und Kontrollstämme

Referenzstämme

Für die speziesspezifische PCR

ATCC 29212 *Enterococcus faecalis*

ATCC 35667 *Enterococcus faecium*

Für die Bestimmung des Resistenzverhaltens

ATCC 29212 *Enterococcus faecalis*

ATCC 51299 *Enterococcus faecalis*

Für die phänotypische Bestimmung der Virulenzfaktoren

ATCC 25922 *Escherichia coli*

ATCC 25923 *Staphylococcus aureus*

Für den Embryoletalitätstest

ATCC 49573 *Enterococcus gallinarum*

Kontrollstämme

Für die Virulenzgen-PCR

MMH594 *Enterococcus faecalis*

M. Gilmore, Enterococcus II initiative, Broad Institute [broadinstitute.org]

Für den Embryoletalitätstest

K923/96-1 *Enterococcus faecalis* (hoch virulent) (Rudolph, 2004)

K808/97 *Enterococcus faecium* (gering virulent) (Rudolph, 2004)

3.1.3 Medien, Puffer und Geräte

3.1.3.1 Anzucht- und Testmedien

Columbia-Agar mit 7% Schafblut (Fertigplatten von Oxoid GmbH, Wesel, Deutschland) in g/l

- Caseinpepton 14,0
- Pepton 4,5
- Hefeextrakt 4,5
- Natriumchlorid 5,0
- Agar 12,5

Für die Bestimmung des Resistenzverhaltens

VRE Selektivnährböden (Fertigplatten von Oxoid GmbH, Wesel, Deutschland) in g/l

- Caseinpepton 20,0
- Hefeextrakt 5,0
- Natriumchlorid 5,0
- Natriumcitrat 1,0
- Äskulin 1,0
- Eisen(III)ammoniumzitrat 0,5
- Natriumazid 0,15
- Meropenem 0,001
- Vancomycin 0,006
- Agar 10,0

Für die phänotypische Bestimmung der Virulenzfaktoren

Blutagar-Basis Nr. 2 (Oxoid GmbH, Wesel, Deutschland) in g/l

- Proteose-Pepton 15,0
- Leber-Verdauungsprodukt 2,5

- Hefeextrakt 5,0
- Natriumchlorid 5,0
- Agar 12,0

40 g wurden in 1000 ml Aqua dest. suspendiert und 15 Minuten bei 121°C autoklaviert. Nachdem der Agar auf 60°C abgekühlt war, wurden 5% defibriertes Pferdeblut (Oxoid GmbH, Wesel, Deutschland) zugesetzt. Der Agar wurde unter sterilen Bedingungen in Petrischalen gefüllt.

Zusammensetzung des Nährgelatine-Agars in Petrischalen

Nähragar I (sinfon diagnostics GmbH, Berlin, Deutschland) in g/l

- Fleischpepton 5,0
- Gelatinepepton 5,0
- Caseinpepton 3,5
- Caseinhydrolysat 3,5
- Hefeextrakt 3,0
- Natriumchlorid 5,0
- Agar 10,0

Nährgelatine (Oxoid GmbH, Wesel, Deutschland) in g/l

- Fleischextrakt „Lab-Lemco“ 3,0
- Pepton 5,0
- Gelatine 120,0

35 g Nähragar I wurden mit 30 g Nährgelatine in 1000 ml Aqua dest. suspendiert, zur vollständigen Lösung kurz aufgekocht und 15 Minuten bei 121°C autoklaviert. Der Agar wurde unter sterilen Bedingungen in Petrischalen gefüllt.

Zusammensetzung des Nährgelatine-Agars in Reagenzgläsern

Nährbouillon I (sinfon diagnostics GmbH, Berlin, Deutschland) in g/l

- Caseinpepton 7,0
- Fleischpepton 5,0
- Gelatinepepton 5,0
- Hefeextrakt 3,0
- Natriumchlorid 5,0

Nährgelatine (Oxoid GmbH, Wesel, Deutschland) in g/l

- Fleischextrakt „Lab-Lemco“ 3,0
- Pepton 5,0
- Gelatine 120,0

5 g Nährbouillon I wurden mit 30 g Nährgelatine in 1000 ml Aqua dest. suspendiert, zur vollständigen Lösung kurz aufgekocht und 15 Minuten bei 121°C autoklaviert. Jeweils 3 ml des Agars wurden unter sterilen Bedingungen in Reagenzgläser gefüllt.

Für den Embryoletalitätstest

Nährbouillon I (sinfon diagnostics GmbH, Berlin, Deutschland) in g/l

- Caseinpepton 7,0
- Fleischpepton 5,0
- Gelatinepepton 5,0
- Hefeextrakt 3,0
- Natriumchlorid 5,0

25 g wurden in 1000 ml Aqua dest. gelöst und 15 Minuten bei 121°C autoklaviert.

Nähragar I (sinfon diagnostics GmbH, Berlin, Deutschland) in g/l

- Fleischpepton 5,0
- Gelatinepepton 5,0
- Caseinpepton 3,5
- Caseinhydrolysat 3,5
- Hefeextrakt 3,0
- Natriumchlorid 5,0
- Agar 10,0

35 g wurden in 1000 ml Aqua dest. suspendiert und 15 Minuten bei 121°C autoklaviert.

3.1.3.2 Puffer und Gebrauchslösungen

Für die PCR

QIAGEN Multiplex PCR Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland)

- Multiplex PCR Master Mix
 - o HOTStarTaq DNA Polymerase
 - o Multiplex PCR Puffer mit 6 mM MgCl₂
 - o dNTP-Mix
- Q-Solution

PuRe Taq™ Ready-To-Go-PCR-Beads (Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland)

- Stabilisator
- BSA
- dATP
- dCTP
- dGTP
- dTTP
- ~2,5 Einheiten puReTaq DNA-Polymerase
- Reaktionspuffer

Löst man das Ready-To-Go-PCR-Bead zu einem finalen Volumen von 25 µl auf, werden folgende Konzentrationen erreicht:

- Jedes dNTP: 200µM
- 10mM Tris-HCL
- 50 mM KCL
- 1,5 mM MgCl₂

QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland)

- Proteinase K (20 mg/ml)
- Lysispuffer ATL
- Lysispuffer AL
- QIAamp®-Säulen
- Waschpuffer AW 1 und AW 2
- Elutionspuffer AE

Ethidiumbromid 1% (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)

Größenstandard 100bp DNA-Ladder (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland)

- 100bp DNA-Ladder 30 µl (0,5 µg DNA/µl)

- Probenladepuffer 30 µl
- Aqua bidest. 185 µl
- pH 7,5

Probenladepuffer

- Bromphenolblau 0,25%
- Xylencyanol 0,25%
- Glycerin 30%
- In TBE-Puffer (4x)

MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland)

- Lösungs- und Bindepuffer QG
- Isopropanol (100%)
- Waschpuffer PE
- Bindepuffer Puffer PB

Für die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)

11 ml Sensititre Mueller-Hinton-Bouillon (MCS Diagnostics BV, Swalmen, Niederlande)

5 ml sterile NaCl-Lösung (0,85 – 0,90%)

Sensititreplatten NLVE 1, 3 und 4 für Gram-positive Bakterien (Thermo Scientific Microbiology, TREK Diagnostic Systems, Schwerte, Deutschland).
Antimikrobielle Wirkstoffe in Tabelle 2

Tab. 2: Für die MHK-Bestimmung verwendete antimikrobielle Wirkstoffe und Breakpoints für die Beurteilung der Resistenz

Wirkstoffgruppe	Spezielle Einteilung/ Untergruppe	Antimikrobieller Stoff	Verwendete Abkürzung	Testbereich (µg/ml)	Breakpoint ^{1, 2} (µg/ml), resistent
Aminoglykoside		Gentamicin	GEN	0,012 - 256	≥ 16 ¹
Beta-Laktame	Beta-Laktam-Inhibitoren	Amoxicillin-Clavulansäure (2:1)	AUG	0,03/0,015 - 64/32	≥ 32 ¹
	Penicilline	Ampicillin	AMP	0,03 – 64	≥ 16 ¹
		Penicillin	PEN	0,015 - 32	≥ 16 ¹
		Oxacillin	OXA	0,015 - 8	-----
	Cephalosporine	Cefquinom	CEF	0,015 - 32	-----
		Cefazolin	FAZ	0,03 – 64	-----
		Cefoperazon	FOP	0,06 - 32	-----
		Cefotaxim	FOT	0,015 - 32	-----
		Ceftiofur	XNL	0,03 – 64	-----
Amphenicole	Chloramphenicole	Chloramphenicol	CHL	0,5 - 256	≥ 32 ¹
Chinolone	Fluorchinolone	Ciprofloxacin	CIP	0,008 -16	≥ 4 ¹
		Enrofloxacin	ENRO	0,008 - 16	-----
		Marbofloxacin	MARB	0,008 -16	-----
Glykopeptide		Vancomycin	VAN	0,015 - 32	≥ 32 ¹
Lincosamide	MLS-Gruppe	Lincomycin	LIN	0,03 – 64	≥ 8 ²
		Prilimycin	PIRL	0,03 – 64	-----
		Clindamycin	CLI	0,03 – 64	-----
Makrolid-Antibiotika		Erythromycin	ERY	0,015 - 32	≥ 8 ¹
		Tylosintartat	TYL	0,06 - 128	≥ 32 ²
		Tilmicosin	TIL	0,06 - 128	-----
		Spiramycin	SPI	0,06 - 128	-----
Sulfonamid-Kombination	Sulfonamid + Diaminopyrimidin	Sulfamethoxazol-Trimethoprim (19:1)	SXT	0,015/0,3 - 32/608	-----
Tetrazykline		Tetrazyklin	TET	0,012 - 256	≥ 16 ¹

¹ Breakpoints des CLSI (CLSI, 2008, 2013a, b, 2014)

² Breakpoints des NARMS (USDA, 19.12.2014)

Für den Embryoletalitätstest

PBS in g/l

- Natriumchlorid 40,0
- Kaliumchlorid 1,0
- Dinatriumhydrogenphosphat 5,75
- Kaliumhydrogenphosphat 1,0

Die Reagenzien wurden in 1000 ml Aqua dest. suspendiert und 15 Minuten bei 121°C autoklaviert.

3.1.3.3 Arbeitsgeräte

Autoklav (Tuttnauer Europe B.V., Breda, Niederlande)

Brutschrank Heraeus (Thermo SCIENTIFIC, Schwerte, Deutschland)

Feinwaage „Präzisionswaage 2250“ (Sartorius, Göttingen, Deutschland)

Pipetten 1 – 5000 µl (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Für PCR und Sequenzierung

Elektrophoresesystem (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland)

QIACube (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland)

T3000 Thermocycler (biometra, Analytik Jena, Jena, Deutschland)

Thermomixer Comfort (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

UV Transluminator Typ UVT2053, 302 nm, mittelwellig (Herolab, Wiesloch, Deutschland)

Geldokumentation und Software ImageLab V.5.0 (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland)

Für die Bestimmung des Resistenzverhaltens

Densimat (BioMérieux SA, Marcy l'Etoile, Frankreich)

Sensititre AIM™ Automated Inoculation Delivery System (Thermo SCIENTIFIC, TREK Diagnostic Systems, Schwerte, Deutschland)

Sensititre Vizion System® (Thermo SCIENTIFIC, TREK Diagnostic Systems, Schwerte, Deutschland)

Für den Embryoletalitätsstest

Bruteier von Hühnern der Rasse „White Leghorn“ (Lohmann Tierzucht GmbH, Cuxhaven)

Biophotometer (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)

Eierprüflampe Typ ORBAN Tempo 119 (Siepmann GmbH, Witten-Herdecke, Deutschland)

Infektionsbrutschrank (J. Hemel Brutgeräte GmbH & Co KG, Verl-Kaunitz, Deutschland)

Pipettboy (Integra Biosciences, Chur, Schweiz)

Präpariernadel: Metalldorn zum Öffnen der Eierschale

Thermoschüttler (Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland)

Vorbrutschrank Hemel (J. Hemel Brutgeräte GmbH & Co KG, Verl-Kaunitz, Deutschland)

3.1.3.4 Primer

Für die speziesspezifische Multiplex-PCR und Bestimmung der Enterokokkenspezies 16S rDNA-Gen-PCR

Tab. 3: Primersequenzen für die speziesspezifische PCR und 16S rDNA-Genanalyse

PCR-Target	Gen	Name des Primers	Sequenz (5' – 3')	Produkt	Referenz
Genus <i>Enterococcus</i>	16S rDNA	Entero 16S-f	TCA ACC GGG GAG GGT	733 bp	(Deasy et al., 2000)
		Entero 16S-r	ATT ACT AGC GAT TCC GG		
<i>E. faecalis</i>	<i>sodA</i>	FL 1	ACT TAT GTG ACT AAC TTA ACC	360 bp	(Jackson et al., 2004)
		FL 2	TAA TGG TGA ATC TTG GTT TGG		
<i>E. faecium</i>		FM 1	GAA AAA ACA ATA GAA GAA TTA T	215 bp	
		FM 2	TGC TTT TTT GAA TTC TTC TTT A		
16S rDNA	16S rDNA	27F	AGA GTT TGA TCM TGG CTG AG	1,4 kb	(Mühldorfer et al., 2011)
		1492R	TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T		

sodA, Superoxid Dismutase-Gen

Für die Virulenzgen-PCR

Tab. 4A: Primersequenzen für den Multiplex-PCR-Ansatz zum Nachweis von Virulenzgenen

PCR-Target	Gen	Name des Primers	Sequenz (5' – 3')	Produkt	Referenz
Aggregation Substance	<i>asa1</i>	ASA 11	GCA CGC TAT TAC GAA CTA TGA	375 bp	(Vankerckhoven et al., 2004)
		ASA 12	TAA GAA AGA ACA TCA CCA CGA		
Enterococcal Surface Protein	<i>esp</i>	ESP 14F	AGA TTT CAT CTT TGA TTC TTG G	510 bp	(Willems et al., 2001)
		ESP 12R	AAT TGA TTC TTT AGC ATC TGG		
Gelatinase	<i>gelE</i>	GEL 11	TAT GAC AAT GCT TTT TGG GAT	213 bp	(Vankerckhoven et al., 2004)
		GEL 12	AGA TGC ACC CGA AAT AAT ATA		
Hyaluronidase	<i>hyl_{Em}</i>	HYL n1	ACA GAA GAG CTG CAG GAA ATG	276 bp	(Vankerckhoven et al., 2004)
		HYL n2	GAC TGA CGT CCA AGT TTC CAA		
Cytolysin	<i>cylA</i>	CYT_I	ACT CGG GGA TTG ATA GGC	688 bp	(Coque et al., 1995)
		CYT_IIb	GCT GCT AAA GCT GCG CTT		
	<i>cylL_L</i>	CyILL1	GAT GGA GGG TAA GAA TTA TGG	253 bp	(Semedo et al., 2003)
		CyILL2	GCT TCA CCT CAC TAA GTT TTA TAG		
	<i>cylL_S</i>	CyILS1	GAA GCA CAG TGC TAA ATA AGG	240 bp	(Semedo et al., 2003)
		CyILS2	GTA TAA GAG GGC TAG TTT CAC		
	<i>cylB</i>	TE 15	ATT CCT ACC TAT GTT CTG TTA	843 bp	(Eaton und Gasson, 2001)
		TE 16	AAT AAA CTC TTC TTT TCC AAC		
	<i>cylM</i>	TE 13	CTG ATG GAA AGA AGA TAG TAT	742 bp	(Eaton und Gasson, 2001)
		TE 14	TGA GTT GGT CTG ATT ACA TTT		

Tab. 4B: Primersequenzen für den Einzel-PCR-Ansatz zum separaten Nachweis des *cylL_S*-Gens

PCR-Target	Gen	Name des Primers	Sequenz (5' – 3')	Produkt	Referenz
Cytolysin	<i>cylL_S</i>	cylLS-F	AGA ACT TGT TGG TCC TC	134 bp	(Camargo et al., 2006)
		cylLS-R	GCT GAA AAT AAT GCA CCT AC		

Tab. 4C: Primersequenzen für den Einzel-PCR-Ansatz zum Nachweis des gesamten Cytolysin-Operons

PCR-Target	Name des Primers	Sequenz (5' - 3')	Produkt	Referenz
Cytolysin-Operon	cf	GGT TGC CAT TGA AAA ATA TCT TCT AGT GGA GTA TCC AGG	8364 bp	(Gaspar et al., 2009)
	cr	GTG ATT GAT TGG CTT ATT TCA TCA TCA TCA CTT TGG AGC		

Für die Sequenzierung der Virulenzgene

Tab. 5: Primersequenzen für den Einzel-PCR-Ansatz und die partiale Sequenzierung der Virulenzgene

PCR-Target	Gen	Name des Primers	Sequenz (5' – 3')	Produkt	Referenz
Aggregation Substance	<i>asa1</i>	ASA 11	GCA CGC TAT TAC GAA CTA TGA	375 bp	(Vankerckhoven et al., 2004)
		TE 4	AAA CGG CAA GAC AAG TAA ATA		(Eaton und Gasson, 2001)
Enterococcal Surface Protein	<i>esp</i>	ESP 14F	AGA TTT CAT CTT TGA TTC TTG G	510 bp	(Willems et al., 2001)
		ESP 12R	AAT TGA TTC TTT AGC ATC TGG		
Gelatinase	<i>gelE</i>	TE 9	ACC CCG TAT CAT TGG TTT	419 bp	(Eaton und Gasson, 2001)
		GEL 12	AGA TGC ACC CGA AAT AAT ATA		(Vankerckhoven et al., 2004)
Cytolysin	<i>cyLL_L</i>	CyILL1	GAT GGA GGG TAA GAA TTA TGG	253 bp	(Semedo et al., 2003)
		CyILL2	GCT TCA CCT CAC TAA GTT TTA TAG		
	<i>cyLL_S</i>	cyILS-F	AGA ACT TGT TGG TCC TC	134 bp	(Camargo et al., 2006)
		cyILS-R	GCT GAA AAT AAT GCA CCT AC		
	<i>cyIA</i>	TE 17	TGG ATG ATA GTG ATA GGA AGT	517 bp	(Eaton und Gasson, 2001)
		CYT_IIb	GCT GCT AAA GCT GCG CTT		(Coque et al., 1995)
	<i>cyIB</i>	TE 15	ATT CCT ACC TAT GTT CTG TTA	843 bp	(Eaton und Gasson, 2001)
		TE 16	AAT AAA CTC TTC TTT TCC AAC		
	<i>cyIM</i>	TE 13	CTG ATG GAA AGA AGA TAG TAT	742 bp	
		TE 14	TGA GTT GGT CTG ATT ACA TTT		
Hyaluronidase	<i>hylE_{fm}</i>	hylEfm1	GAG TAG AGG AAT ATC TTA GC	661 bp	(Klare et al., 2005)
		hylEfm2	AGG CTC CAA TTC TGT		

3.1.3.5 Verbrauchsmaterialien

Drigalskispatel (Saarstedt AG & Co. Nümbrecht, Deutschland)

Einmalkanülen 0,45 x 12 mm (Henke Sass Wolf, Tuttlingen, Deutschland)

Einmalspritzen 1 ml (Henry Schein, Melville, USA)

Eppendorf Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Eppendorf PCR-Röhrchen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Impfösen (Saarstedt AG & Co. Nümbrecht, Deutschland)

Pipettenspitzen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Wattetupfer, steril (Firma Böttger, Bodenmais, Deutschland)

3.1.4 Bruteier

Zur Bestimmung der Virulenz im Embryoletalitätstest wurden SPF-Bruteier von VALO, BioMedia GmbH, Deutschland verwendet.

3.2 Methoden

Teil 1 – Keimisolierung und -charakterisierung

3.2.1 Herkunft der Isolate

Die Vorselektion der Enterokokkenisolate erfolgte im mikrobiologischen Labor der Praxis von Dr. Manfred Pöppel, Anreppen, durch Frau Dr. Sonia Cortez de Jäckel.

Organ- und Gelenkproben wurden auf Columbia Schafblutagar (7%) angelegt und die Agarplatten für 24 Stunden bei 37°C aerob bebrütet und ausgewertet.

Enterokokken-verdächtige Kolonien wurden mittels Gramfärbung und Katalase-Test differenziert, subkultiviert und durch die Anzucht in Enterokokken-Chromocult-Boullion (Merck) und auf den Selektivmedien Colistin-Nalidixinsäure-Agar (Oxoid) und Kanamycin-Äskulin-Agar (Merck) bestätigt.

Nach dieser Vordifferenzierung wurde eine Subkultur der Isolate auf Columbia Schafblutagar (7%) an das Institut für Geflügelkrankheiten der Freien Universität Berlin verschickt und dort als Gefrierkultur in je 1 ml fetalem Kälberserum bei -80°C eingefroren aufbewahrt.

Phänotypische Differenzierung

Die biochemischen Schnelltestverfahren zur Differenzierung der Enterokokkenspezies, wie der API20STREP von BioMérieux, wurden für die Humanmedizin entwickelt. Mit diesem Teststreifen können derzeit nur fünf der mittlerweile 36 bekannten Enterokokkenspezies identifiziert werden.

Da die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Differenzierungsversuche mit dem API20STREP keine eindeutige Speziesbestimmung der Isolate zuließen, wurde auf die Darstellung der Methode verzichtet.

3.2.2 Bestimmung der Enterokokkenspezies mittels genus- und speziesspezifischer Multiplex-PCR

Die molekulargenetische Bestimmung erfolgte nach dem Protokoll von Jackson et al. (2004). Jeder Multiplex-Ansatz enthielt den von Deasy et al. (2000) entworfenen Genus-Primer und

die speziesspezifischen Primer für *E. faecalis* und *E. faecium* (Jackson et al., 2004) (Tab. 3). Die speziesspezifischen Primer basieren auf den Sequenzen des *sodA*-Gens, welches für die Mangan-abhängige-Superoxid-Dismutase codiert (Poyart et al., 2000).

Für die DNA-Extraktion wurden die Isolate aus den Gefrierkulturen auf Columbia Schafblutagar (7%) angezogen und Koloniematerial in 100 µl RNase-DNase-freiem Wasser aufgelöst. 2,5 µl dieser Bakteriensuspension dienten als DNA-Probe. Dem Ansatz der Negativkontrolle wurden 2,5 µl RNase-DNase-freies Wasser zugesetzt.

Für den PCR-Ansatz wurde der QIAGEN Multiplex PCR Kit benutzt.

Der Ansatz mit 2,5 µl DNA betrug 25 µl und setzte sich wie folgend zusammen:

- 12,5 µl 2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix
- 1 µl Genus (*Enterococcus*)-Primer
- 1 µl *E. faecalis*-Primer
- 1 µl *E. faecium*-Primer
- 2,5 µl Q-Solution
- 4,5 µl Wasser

Tab. 6: Thermozykler-Protokoll der Multiplex-PCR

PCR-Schritt	Dauer	Temperatur
Initiale Denaturierung	15 min	95°C
30 Zyklen:		
Denaturierung	30 sec	95°C
Annealing	90 sec	55°C
Amplifikation	1 min	72°C
Finale Extension	7 min	72°C

Zum Auftrennen der Amplifikate wurde ein 1%iges Agarosegel verwendet, welches mit 2 µl Ethidiumbromid auf 100 ml versetzt wurde. Die Gelelektrophorese lief für 60 Minuten bei einer Spannung von 72 Volt.

Die Auswertung erfolgte mit der Geldokumentation und dem Softwaresystem ImageLab (Bio-Rad).

3.2.3 Bestimmung der Enterokokkenspezies mittels 16S rDNA-Genanalyse

Die Speziesbestimmung von 24 Isolaten erfolgte mittels einer Sequenzierung des 16S rDNA-Gens nach dem Protokoll von Mühldorfer et al. (2011). Neunzehn dieser Isolate zeigten in der Multiplex-PCR nur eine Genus-Bande und konnten weder als *E. faecalis* noch als *E. faecium* identifiziert werden. Ein Isolat zeigte in der Multiplex-PCR überhaupt keine Bande. Die restlichen vier Isolate hatten schwache Banden, sodass ihre Spezieszugehörigkeit mittels einer 16S rDNA-Genanalyse überprüft wurde. Die verwendeten Primersequenzen sind in der Tabelle 3 aufgeführt.

Die DNA-Extraktion erfolgte über eine Hitzelyse. Die Isolate wurden über Nacht auf Columbia Schafblutagar (7%) angezchtet. Von den 24 Stunden alten Kolonien wurde eine Impföse Koloniematerial in 200 µl RNase-DNase-freies Wasser eingerieben. Diese Suspension wurde bei -20°C für zehn Minuten tiefgefroren. Danach erfolgte für zehn Minuten eine Erhitzung im Thermoblock bei 98°C. Zum Abschluss wurden die Isolate mit 140.000

Umdrehungen zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand enthielt die DNA und wurde bei -20°C bis zur weiteren Verwendung tiefgefroren aufbewahrt.

Bei fünf Isolaten konnte mit der Hitzelyse keine DNA gewonnen werden, sodass die DNA-Extraktion mit einem anderen Verfahren durchgeführt wurde.

Die Isolate wurden wie oben beschrieben angezüchtet. Eine Öse Kulturmaterial wurde in 180 µl ATL-Puffer suspendiert und 20 µl Proteinase K hinzugegeben. Der Ansatz wurde 15 Sekunden gut durchmischt und dann für 90 Minuten bei 56°C im Schüttelwasserbad bis zur vollständigen Lyse inkubiert. Anschließend erfolgte die DNA-Extraktion vollautomatisch im QIAcube über das Programm QIA-DNA für Gram-negative Bakterien.

Unabhängig von der angewandten DNA-Extraktionsmethode wurde die 16S rDNA-PCR mit den Ready-To-Go-Beads durchgeführt.

Der Ansatz mit 2,5 µl DNA betrug 25 µl und setzte sich wie folgend zusammen:

- 1 Ready-to-go-Bead
- 1 µl Primermix 27F und 1429R
- 21,5 µl Wasser

Tab. 7: Thermozykler-Protokoll der 16S rDNA-PCR

PCR-Schritt	Dauer	Temperatur
Initiale Denaturierung	3 min	94°C
30 Zyklen:		
Denaturierung	40 sec	94°C
Annealing	61 sec	61°C
Amplifikation	1 min 20 sec	72°C
Finale Extension	7 min	72°C

Zum Auftrennen der Amplifikate wurde ein 1%iges Agarosegel verwendet, welches mit 2 µl Ethidiumbromid auf 100 ml versetzt wurde. Die Gelelektrophorese lief 60 Minuten bei einer Spannung von 70 Volt.

Bei Vorhandensein einer Bande wurde diese unter abgeschwächtem UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und der Gelextraktion (MinElute Gel Extraction Kit, Qiagen GmbH) zugeführt. Dafür wurde das Gelstück zunächst in den QX-Puffer gegeben und für zehn Minuten bei 56°C im Schüttelbad aufgelöst. Die Flüssigkeit wurde auf eine Säule pipettiert und in mehreren Waschschritten mit verschiedenen Puffern aufgereinigt. Abschließend wurde die DNA aus der Säule eluiert. Das Endprodukt der Gelextraktion waren 11 µl reine DNA.

Von diesen 11 µl wurde 1 µl mit 8 µl Wasser und etwas Stoppmix gemischt und erneut auf ein 1%iges Gel aufgetragen, um zu überprüfen, ob die Gelextraktion erfolgreich war. Zeigten sich ausreichend starke Banden, wurden die aufgereinigten PCR-Produkte für die Einzelproben-Sequenzierung (Ready2 Run) bei LGC-Genomics genutzt.

Abweichend wurde auch eine Mikrotiterplatten-(MTP)-Sequenzierung durchgeführt. Dafür wurden 5 µl der 16S rDNA-PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese auf das Vorhandensein von Banden kontrolliert und 10 µl der PCR-Produkte ohne Aufreinigung auf einer 96-Well-Platte zusammen mit einer Primer-Spiegelplatte (Primer: 27F) zur Aufreinigung und Sequenzierung an LGC-Genomics geschickt.

Die Bestätigung der Enterokokkenspezies der Kontrollstämme K923/96-1 (*E. faecalis*) und K808/97 (*E. faecium*) und des Referenzstamms ATCC 49573 (*E. gallinarum*) erfolgte nach oben beschriebenen Versuchsablauf.

Teil 2 – Bestimmung des Resistenzverhaltens in vitro

3.2.4 Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) mit der Mikrodilutionsmethode

Bei der minimalen Hemmkonzentration (MHK) eines Antibiotikums handelt es sich um die geringste Konzentration eines antimikrobiellen Wirkstoffes, bei der makroskopisch kein Bakterienwachstum mehr zu erkennen ist.

Die Durchführung der Mikrodilution erfolgte gemäß den Richtlinien des Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, 2008) am Bundesinstitut für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) in Berlin-Marienfelde. Die verwendeten antimikrobiellen Wirkstoffe, Testbereiche und die klinischen Breakpoints sind in der Tabelle 2 aufgeführt.

Jedes Isolat wurde aus der Gefrierkultur auf Columbia Schafblutagar (7%) ausgestrichen und für 18 – 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde aus einer Bakterienkolonie eine Subkultur (SK) angefertigt, um sicher zu gehen, dass eine Reinkultur vorlag. Mit dieser 24-Stunden-Kultur wurde die Mikrodilution durchgeführt.

Zur Herstellung des Inokulums wurden mit einem Einwegtupfer einzelne Kolonien entnommen und in 5 ml sterile NaCl-Lösung (0,85 – 0,90%) überführt. Die Kolonien wurden in der NaCl-Lösung aufgelöst und die Suspension mit einem Vortex-Mixer kräftig geschüttelt. Die Suspension wurde visuell mit dem DENSIMAT auf 0,5 McFarland-Standard ($\sim 10^6$ – 10^8 KBE/ml) eingestellt und 50 µl dieser Bakteriensuspension zu 10 ml Mueller-Hinton-II-Bouillon pipettiert und mit einem Vortex-Mixer gut gemischt.

In jede Vertiefung der Platte wurden je 50 µl des Inokulums möglichst luftblasenfrei pipettiert. Nach Abschluss des Pipettierens wurden die Mikrotitrationsplatten mit einer Folie zugeklebt und für 16 – 20 Stunden bei 35 – 37°C aerob inkubiert.

Das Ablesen erfolgte mit dem Sensititre Vizion System® (Thermo SCIENTIFIC). Dabei wurde die erste Vertiefung, in der kein Bakterienwachstum als Bodensatz erkennbar war, als MHK gewertet. Auf jeder Mikrotitrationsplatte wurde eine Positivkontrolle als Referenz für das Bakterienwachstum mitgeführt.

Bei jedem Versuchsdurchgang erfolgte eine Reinheitskontrolle des Inokulums. Dazu wurde von dem Inokulum der Test- und Referenzstämme mit einer sterilen Öse Koloniematerial entnommen und als Verdünnungsausstrich auf Columbia Schafblutagar (7%) ausgestrichen. Der Testdurchgang für das entsprechende Isolat wurde als ungültig gewertet und wiederholt, wenn nach einer Inkubation von 18 – 24 Stunden bei 37°C eine Verunreinigung erkennbar war.

Pro Versuchsdurchgang wurde die Keimzahl (Einsaatdichte) der Bakteriensuspension bestimmt. Dazu wurden 10 µl des Inokulums in 10 ml sterile NaCl-Lösung überführt und eine Verdünnung von 1:1000 erreicht. Die Suspension wurde mit einem Vortex-Mixer gut durchmischt und 100 µl auf Columbia Schafblutagar (7%) pipettiert. Die Suspension wurde mit einem sterilen Plastikspatel ausgespatelt und die Agarplatte bei 35 – 37°C aerob inkubiert. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Kolonien auf dem Columbia Schafblutagar (7%) gezählt. Fünfzig Kolonien entsprachen einer Inokulumdichte von 5×10^5 KBE/ml. Der verwertbare Referenzbereich für die MHK liegt zwischen 2×10^5 KBE/ml bis 8×10^5 KBE/ml (20 – 80 Kolonien pro Platte). Bei stärkeren Abweichungen der KBE nach oben oder unten wurde das Ergebnis nicht gewertet und der Test erneut durchgeführt.

Die MHK-Ergebnisse wurden mit Hilfe von klinischen Grenzwerten (Breakpoints) für veterinärmedizinische Pathogene (Gentamicin, Amoxicillin-Clavulansäure, Ampicillin,

Penicillin, Chloramphenicol, Vancomycin, Erythromycin, Tetrazyklin) bzw. humanmedizinische Pathogene (Ciprofloxacin) des CLSI bewertet und zur qualitativen Einteilung der Isolate in „resistent“, „intermediär-resistent“ und „sensibel“ verwendet. Zur Beurteilung von Lincomycin und Tylosintartat dienten Breakpoints aus dem NARMS (National Antimicrobial Resistance Monitoring System) (Tab. 2). Für die anderen dreizehn antimikrobiellen Wirkstoffe liegen derzeit keine Beurteilungskriterien vor. Sie wurden anhand der Minimalen Hemmkonzentrationen MHK_{50} und MHK_{90} beurteilt.

3.2.4.1 Bestimmung der Vancomycin-Resistenz

Zur Bestimmung der Vancomycin-Resistenz müssen die Mikrotiterplatten, abweichend von der 16 – 20 stündigen Inkubationszeit, genau 24 Stunden bebrütet werden (CLSI, 2008). Da dies im Rahmen der MHK-Bestimmung nicht möglich war, wurde nachfolgend für die 163 Isolate ein weiterer Test zur Bestimmung der Vancomycin-Resistenz durchgeführt.

Die Isolate wurden auf Columbia Schafblutagar (7%) ausgestrichen und für 24 Stunden bei 37°C bebrütet. Fünf Einzelkolonien wurden mit einer sterilen Impföse in ein Reagenzglas mit 5 ml Nährbouillon I gegeben und für fünf Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurden 20 µl der Bouillon abgenommen und auf eine VRE-Platte pipettiert. Mit einer sterilen Impföse wurde die Flüssigkeit als Verdünnungsausstrich auf dem Agar verteilt und die Platten für 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Auswertung erfolgte nach 24 und 48 Stunden. Als Positivkontrolle wurde der Stamm ATCC 51299 *E. faecalis* mitgeführt, als Negativkontrolle diente ATCC 29212 *E. faecalis*.

Teil 3 - Phäno- und genotypischer Nachweis spezifischer Virulenzfaktoren und ihre Korrelation mit der Embryoletalität ausgewählter Enterokokkenisolate

3.2.5 Nachweis der Virulenzfaktoren bei ausgewählten Putenisolaten

3.2.5.1 Auswahl der Isolate

Aus den 163 Enterokokkenisolaten wurden 28 Putenisolate ausgewählt, die hinsichtlich des Vorhandenseins spezifischer Virulenzfaktoren und ihrer Virulenz im Embryoletalitätstest näher charakterisiert wurden. Um einen möglichst repräsentativen Querschnitt zu gewährleisten, beinhalteten die 28 Isolate die bei Puten nachgewiesenen Enterokokkenspezies zu vergleichbaren Anteilen: zehn *E. faecalis*, zehn *E. faecium* und acht *E. gallinarum*.

Es wurden einheitlich drei Kontrollstämme mitgeführt:

- K923/96-1 (*E. faecalis*): definiert als hoch virulent (Rudolph, 2004)
- K808/97 (*E. faecium*): definiert als gering virulent (Rudolph, 2004)
- ATCC 49573 (*E. gallinarum*)

3.2.5.2 Auswahl der Virulenzfaktoren

Die folgenden Virulenzgene wurden in die Untersuchung mit einbezogen: Das Cytolysin-Operon, bestehend aus den Genen *cylA*, *cylB*, *cylL_L*, *cylL_S*, *cylM* kodiert für das Enzym Cytolysin. Die Gene *hyl_{Em}* und *gelE* codieren für die Enzyme Hyaluronidase und Gelatinase. Die Gene *asa1* und *esp* codieren für die Oberflächenproteine Aggregation Substance und das Enterococcal Surface Protein.

Die ausgewählten Virulenzgene wurden im Tierversuch mit der Virulenz von humanen Enterokokkenisolaten in Verbindung gebracht (Jett et al., 1992; Singh et al., 1998) und konnten bei Isolaten des Nutzgeflügels nachgewiesen werden (Poeta et al., 2006a, 2006b). Neben dem genetischen Nachweis kann die phänotypische Ausprägung der Virulenzfaktoren

Cytolysin, Hyaluronidase und Gelatinase mittels einfacher *in vitro*-Tests untersucht werden, um einen Vergleich von Geno- und Phänotyp zu ermöglichen.

3.2.5.3 PCR-Nachweis der Virulenzgene

Die Durchführung der Multiplex-PCR erfolgte nach dem Protokoll von Vankerckhoven et al. (2004). Als Positivkontrolle diente genomische DNA vom Stamm *E. faecalis* MMH594, die freundlicherweise von Gilmore et al. [Enterococcus II initiative, Broad Institute (broadinstitute.org)] zur Verfügung gestellt wurde. Dieser Stamm weist alle Virulenzgene des Cytolysin-Operons (*cyIA*, *cyiLL*, *cyiLS*, *cyiB*, *cyiM*) und die Gene *asa1*, *esp* und *gelE* auf.

Für den PCR-Ansatz wurde der QIAGEN Multiplex PCR Kit benutzt. Die verwendeten Primersequenzen wurden aus den Protokollen von Vankerckhoven et al. (2004) und Willems et al. (2001) zusammengestellt und sind in der Tabelle 4 aufgeführt.

Virulenzgene *asa1*, *cyIA*, *esp*, *gelE*, *hylEfm*

Der Multiplex-Ansatz mit 2,5 µl DNA betrug 25 µl und setzte sich wie folgend zusammen:

- 12,5 µl 2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix
- 1 µl Primermix *asa1*, *gelE* und *hylEfm*
- 1 µl Primermix *cyIA* und *esp*
- 2,5 µl Q-Solution
- 5,5 µl Wasser

Cytolysin-Operon *cyiB*, *cyiLL*, *cyiLS*, *cyiM*

Der Multiplex-Ansatz mit 2,5 µl DNA betrug 25 µl und setzte sich wie folgend zusammen:

- 12,5 µl 2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix
- 1 µl Primermix *cyiLS* und *cyiM*
- 1 µl Primermix *cyiLL* und *cyiB*
- 2,5 µl Q-Solution
- 5,5 µl Wasser

Tab. 8: Thermozykler-Protokoll der Multiplex-PCR zum Nachweis der Virulenzgene

PCR-Schritt	Dauer	Temperatur
Initiale Denaturierung	15 min	95°C
30 Zyklen:		
Denaturierung	1 min	94°C
Annealing	1 min	56°C
Amplifikation	1 min	72°C
Finale Extension	10 min	72°C

Zum Auftrennen der Amplifikate wurde ein 2%iges Agarosegel verwendet, welches mit 2 µl Ethidiumbromid auf 100 ml versetzt wurde. Die Gelelektrophorese lief 120 Minuten bei einer Spannung von 60 Volt.

3.2.5.3.1 Separater Nachweise des *cyiLS*-Gens

Da die Positivkontrolle *E. faecalis* MMH594 im Multiplex-Ansatz mit den Primern von Semedo et al. (2003) keine Bande für das *cyiLS*-Gen aufwies, wurde ein separater PCR-Nachweis mit einem anderen Primerpaar (Camargo et al., 2006) (Tab. 4B) durchgeführt. Die PCR wurde als Einzel-PCR mit Ready-To-Go-Beads (siehe 3.2.3 16S rDNA-Genanalyse) durchgeführt.

Tab. 9: Thermozykler-Protokoll der *cy/L_S*-PCR

PCR-Schritt	Dauer	Temperatur
Initiale Denaturierung	15 min	95°C
<u>30 Zyklen:</u>		
Denaturierung	1 min	94°C
Annealing	1 min	52°C
Amplifikation	1 min	72°C
Finale Extension	10 min	72°C

3.2.5.4 Sequenzierung der nachgewiesenen Virulenzgene

Um sicher zu stellen, dass die in der Multiplex-PCR nachgewiesenen Banden den Virulenzgenen entsprechen, wurde die DNA mit spezifischen Primerpaaren (Tab. 5) als Einzel-PCR amplifiziert und das Genfragment sequenziert.

In der Gelelektrophorese wurden zur Kontrolle 5 µl des PCR-Produkts aufgetragen und das restliche Produkt zur Aufreinigung und Sequenzierung auf einer 96-Well-Platte zusammen mit einer Primer-Spiegelplatte an LGC-Genomics geschickt. Abhängig von der Stärke des Amplifikats variierte die eingesetzte DNA-Menge zwischen 2,5 – 7 µl.

3.2.5.5 Phänotypische Ausprägung der Virulenzfaktoren

Die 28 Putenisolate wurden zusammen mit den drei Kontrollstämmen auf eine Aktivität der Enzyme Hyaluronidase, Gelatinase und Cytolysin getestet.

Zum Nachweis des Enzyms Cytolysin wurde jedes Isolat mit einem Verdünnungsausstrich auf einem Blutagar mit 5% defibriniertem Pferdeblut ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte bei 37°C aerob und anaerob. Nach 24 und 48 Stunden wurde das Auftreten von alpha-, beta- oder gamma-Hämolyse beurteilt.

Zur Kontrolle der beta-Hämolyse-Aktivität wurde der Referenzstamm ATCC 25923 *S. aureus* mitgeführt.

Zur Bestimmung der Gelatinase-Aktivität im Reagenzglas wurde eine Impföse mit Koloniematerial des zu testenden Enterokokkenisolates mittig in die starre Masse bis zum Boden hineingestochen und die beimpften Röhrchen bei 37°C inkubiert. Über 40 Tage wurden die Röhrchen täglich auf eine Verflüssigung des Gelatine-Nähragars untersucht. Da sich das Medium bei 37°C verflüssigt, wurden die Röhrchen vor dem Ablesen für zwei Stunden im Kühlschrank aufbewahrt bis der Agar der Negativkontrolle vollständig erstarrt war. Eine positive Reaktion lag vor, wenn die Verflüssigung des Gelatine-Nähragars nach zweistündiger Kühlung erhalten blieb. Bei einer negativen Reaktion verfestigte sich der beimpfte Agar bei der Kühlung. Als Positivkontrolle wurde ATCC 25923 *S. aureus* mitgeführt, als Negativkontrolle diente ein unbeimpftes Röhrchen.

Um die Gelatinase-Aktivität auf Agarplatten zu bestimmen, wurde von jedem Enterokokkenisolat eine Kolonie mit einem Verdünnungsaufstrich auf einer Gelatine-Nähragar-Platte aufgetragen und die Platten für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Vor der Auswertung wurden die Agar-Platten für 12 Stunden bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Eine positive Reaktion zeigte sich auf dem klaren Agar als kreisrunde Trübung um die Bakterienkolonie. Gelatinase-negative Isolate wuchsen ohne Trübungszone auf dem Agar (Su et al., 1991). Als Positivkontrolle wurde ATCC 25923 *S. aureus* mitgeführt. Fragliche Isolate wurden erneut auf einer Agar-Platte ausgestrichen und bewertet.

Zur Bestimmung der Hyaluronidaseaktivität wurde ein *Streptococcus equi* Bakterienstamm S-förmig auf Columbia Schafblutagar (7%) ausgestrichen. Eine Impföse Koloniematerial aus einer 24 Stunden-Kultur der Enterokokkenisolate wurde als gerader Strich durch das Streptokokken-S gezogen und die Agarplatte für 24 Stunden bei 37°C aerob bebrütet. Als Positivkontrolle diente der Referenzstamm ATCC 25923 *S. aureus*. Eine positive Reaktion lag vor, wenn *S. equi* im Bereich des Enterokokken-Impfstriches in der Ausbildung der Schleimkapsel gehemmt wurde.

3.2.6 Bestimmung der Virulenz im Embryoletalitätstest

Der Embryoletalitätstest ist eine relativ einfache Methode, um anhand der Absterberate der Embryonen die Virulenz eines Erregers vorherzusagen (Seo et al., 2013). Die hier verwendete Methodik und Durchführung orientiert sich an den Untersuchungen zur amyloiden Arthropathie bei Legehennen von Rudolph (2004). Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Virulenz verschiedener *E. faecalis* Isolate im Embryoletalitätstest untersucht (Rudolph, 2004).

3.2.6.1 Herstellung des Inokulums

Um für jedes der 28 Isolate und für die drei Kontrollstämme eine möglichst standardisierte Herstellung eines Inokulums mit 500 Koloniebildenden Einheiten zu erreichen, wurden in Vorversuchen exemplarisch Wachstumskurven der Kontrollstämme K923/96-1 (*E. faecalis*), K808/97 (*E. faecium*) und des Referenzstamms ATCC 49573 (*E. gallinarum*) erstellt.

Die Isolate wurden aus der Gefrierkultur auf Columbia Schafblutagar (7%) ausgestrichen und für 24 Stunden bei 37°C aerob bebrütet. Am folgenden Abend wurden drei Kolonien der 24-Stunden-Kultur mit einer Impföse in 5 ml Nährbouillon gelöst. Die Suspension wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Übernachtbouillon durchmischt, 50 µl entnommen und in einen Erlenmeyerkolben mit 50 ml frischer Nährbouillon überführt. Der Kolben wurde im Thermoschüttler bei 37°C und 75 Mot1/min inkubiert.

In dreißigminütigen Abständen wurden fortlaufend mit einer Glaspipette und dem Pipettboy 500 µl Bakteriensuspension steril entnommen, umgehend die optische Dichte (OD) bei 595nm gemessen und die Reagenzgefäße auf Eis gestellt, um das Bakterienwachstum zu stoppen. Aus der entnommenen Suspension wurde mit sterilem PBS eine Verdünnungsreihe bis zu einer Verdünnung von 1:10⁸ hergestellt und je zwei Verdünnungsstufen abhängig von der gemessenen optischen Dichte auf Nähragarplatten ausgestrichen. Die Nähragarplatten wurden für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterienkolonien ausgezählt und unter Berücksichtigung der erfolgten Verdünnungsschritte die Ausgangskeimzahl bestimmt.

Die ermittelten Keimzahlen und optischen Dichten wurden für jeden Kontrollstamm über die Zeit graphisch dargestellt und die einzelnen Phasen der Wachstumskurve für *E. faecalis*, *E. faecium* und *E. gallinarum* bestimmt (Ergebnisteil: Tab. 21, Fig. 2). Die OD-Werte der Log-Phase (exponentielle Wachstumsphase) dienten als Orientierung für die Einstellung des Inokulums der Enterokokkenisolate einer Spezies.

Für den *E. gallinarum* ATCC 49573 Referenzstamm zeigte sich in zwei Wiederholungen eine sehr kurze Log-Phase mit starken Schwankungen in den OD-Werten im Verhältnis zu den ermittelten Keimzahlen, was die standardisierte Einstellung des Inokulums der *E. gallinarum* Isolate erschwerte. Daher wurden diese Isolate wiederholt mit standardisiertem Vorgehen getestet und die ermittelten optischen Dichten und Keimzahlen verglichen. (Ergebnisteil: Tab. 22)

Zur Herstellung des Inokulums wurden die Isolate aus Gefrierkulturen auf Columbia Schafblutagar (7%) ausgestrichen und für 24 Stunden bei 37°C aerob bebrütet. Aus der 24-Stunden-Kultur wurden drei Kolonien entnommen und in ein Reagenzglas mit 5 ml Nährbouillon übertragen. Diese wurde unter gleichen Bedingungen über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Übernachtbouillon durchmischt, 1 ml entnommen und in einen Erlenmeyerkolben mit 49 ml frischer Nährbouillon gegeben, der für 150 Minuten bei 37°C und 75 Mot1/min im Thermoschüttler inkubiert wurde. Nach Ablauf der Zeit wurde die optische Dichte bei 595 nm (OD 600) gemessen.

OD-Werte über 0,3 zeigten, dass sich *E. faecalis* und *E. faecium* in der Log-Phase befanden. Für die Herstellung des Inokulums wurden OD- Werte von 0,5 angestrebt, um eine durchschnittliche Keimzahl von 5x10⁸ KBE/ml in der Ausgangsbouillon zu erreichen. Für *E. gallinarum* konnte unabhängig von der OD-Messung nach einer Inkubation von exakt drei Stunden eine möglichst einheitliche Keimzahl von 5x10⁸ KBE/ml erreicht werden.

Die Ausgangsbouillon wurde in mehreren Verdünnungsschritten (Tab. 10) auf die zur Eibeimpfung erforderliche Keimzahl von 500 KBE in 0,2 ml Inokulum eingestellt.

Tab. 10: Verdünnungsschritte zur Herstellung des Inokulums

Verdünnung	Herstellung	Verdünnungsstufe	KBE/ml
0	Ausgangsbouillon	keine	5×10^8
1	10 μ l Nährbouillon + 990 μ l PBS	1:10 ²	5×10^6
2	10 μ l Verdünnung 1 + 990 μ l PBS	1:10 ⁴	5×10^4
3	300 μ l Verdünnung 2 + 2700 μ l PBS	1:10 ⁵	5×10^3
4	2500 μ l Verdünnung 3 + 2500 μ l PBS	1:2x10 ⁵	$2,5 \times 10^3$
Inokulum	0,2 ml Verdünnung 4	1:2x10 ⁶	$5 \times 10^2 / 0,2$ ml

Nach der Beimpfung der SPF-Eier wurde für jedes Isolat die Keimzahl des Inokulums bestimmt. Dazu wurden 150 μ l Inokulum in ein Eppendorfgefäß mit 150 μ l PBS überführt, was einer Verdünnung von 1:2 entsprach. Von dieser Mischung wurden 100 μ l auf eine Nähragarplatte pipettiert und mit einem Plastikspatel ausplattiert. Die Platten wurden für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte die visuelle Auszählung der vorhandenen Kolonien. Durch Multiplikation der ausgezählten Kolonien mit 4×10^6 wurde die Ausgangskeimzahl vor der Verdünnung bestimmt, aus der sich die tatsächliche Keimzahl des Inokulums ermitteln ließ. Die Beimpfung wurde als erfolgreich bewertet, wenn die Keimzahl des Inokulums innerhalb eines Toleranzbereiches von 100 – 1000 KBE / 0,2 ml lag (Rudolph, 2004).

3.2.6.2 Beimpfung der SPF-Bruteier

Für die Durchführung wurden SPF-Eier der Firma VALO BioMedia GmbH, Deutschland, verwendet. Jedes Enterokokkenisolat wurde in 20 SPF-Eier inokuliert. Als Kontrollstämme dienten der von Rudolph (2004) definierte hoch virulente *E. faecalis*-Stamm K923/96-1 sowie der gering virulente *E. faecium*-Stamm K808/97. Beide Stämme wurden freundlicherweise von der Lohmann Tierzucht GmbH zur Verfügung gestellt und als Positivkontrolle mit zehn oder 20 beimpften SPF-Eiern in den Durchgängen mitgeführt (Tab. 11).

Darüber hinaus wurde der *E. gallinarum* ATCC 49573 Referenzstamm in sechs Durchgängen in jeweils 20 SPF-Eier inokuliert, um die durchschnittliche Absterberate und den Überlebensindex zu ermitteln. Die Negativkontrolle umfasste pro Durchgang zehn SPF-Eier, die mit sterilem PBS beimpft wurden. Bei vier Durchgängen wurden zudem unbeimpfte SPF-Eier im Brutschrank für den gesamten Testdurchlauf mit bebrütet, um mögliche Fehlerquellen unabhängig von der Beimpfung (z.B. Eiqualität, Bedingungen im Brüter) auszuschließen. Eine ausführliche Tabelle, die die einzelnen Durchgänge mit der Aufteilung der Isolate enthält, befindet sich im Ergebnisteil (Tab. 24).

Tab. 11: Versuchsdurchgänge der Kontrollstämmen im Embryoletalitätstest

Durchgang	Positiv/Negativkontrolle	Bemerkung	Eizahl
1	<i>E. faecalis</i> K923/96-1	Hoch virulenter Kontrollstamm	20
	<i>E. faecium</i> K808/97	Gering virulenter Kontrollstamm	20
	Negativkontrolle	PBS	10
2	<i>E. faecalis</i> K923/96-1	Hoch virulenter Kontrollstamm	20
	<i>E. faecalis</i> K923/96-1	Hoch virulenter Kontrollstamm	20
	Negativkontrolle	PBS	10
3	<i>E. faecium</i> K808/97	Gering virulenter Kontrollstamm	20
	<i>E. gallinarum</i> ATCC 49573	Referenzstamm	20
	Negativkontrolle	PBS	10
	Negativkontrolle	unbeimpft	9
4	<i>E. faecalis</i> K923/96-1	Hoch virulenter Kontrollstamm	20
	<i>E. faecium</i> K808/97	Gering virulenter Kontrollstamm	20
	<i>E. gallinarum</i> ATCC 49573	Referenzstamm	20
	Negativkontrolle	PBS	10
	Negativkontrolle	unbeimpft	13
5	<i>E. faecalis</i> K923/96-1	Hoch virulenter Kontrollstamm	10
	<i>E. faecium</i> K808/97	Gering virulenter Kontrollstamm	15
	<i>E. gallinarum</i> ATCC 49573	Referenzstamm	20
	Negativkontrolle	PBS	10
	Negativkontrolle	unbeimpft	4
6	<i>E. faecalis</i> K923/96-1	Hoch virulenter Kontrollstamm	20
	<i>E. faecium</i> K808/97	Gering virulenter Kontrollstamm	20
	<i>E. gallinarum</i> ATCC 49573	Referenzstamm	20
	Negativkontrolle	PBS	10
	Negativkontrolle	unbeimpft	9
7	<i>E. faecium</i> K808/97	Gering virulenter Kontrollstamm	10
	<i>E. gallinarum</i> ATCC 49573	Referenzstamm	20
	Negativkontrolle	PBS	10

Die Eier wurden im Brutschrank für zehn Tage bei 37°C und einer Luftfeuchtigkeit von 60 – 70% bebrütet und regelmäßig gewendet. Am zehnten Bebrütungstag wurden die Eier geschickt und abgestorbene Embryonen aussortiert. Eier mit lebenden Embryonen wurden für die Beimpfung vorbereitet.

Die Luftblase und die Inokulationspunkte wurden mit einem Bleistift auf der Eischale markiert. Drei Millimeter oberhalb des Randes der Luftkammer befand sich das Loch für die Inokulation in die Allantoishöhle, während in der Mitte der Luftblase ein Loch zum Druckausgleich eingezeichnet wurde. Zuletzt erfolgte eine eindeutige Beschriftung der Eier mit Isolatnummer und nachfolgender römischer Ziffer (I – XX).

Die Inokulationspunkte wurden mit Jodlösung desinfiziert. Mit einer Nadel, die in Ethanol getaucht und abgeflammt wurde, wurden die Löcher in die Eischale gebohrt. Eine Einmalspritze mit Einmalkanüle wurde senkrecht in das Inokulationsloch eingeführt und 0,2 ml der Inokulationslösung langsam luftblasenfrei appliziert. Beide Löcher wurden hinterher mit flüssigem Paraffin verschlossen.

3.2.6.3 Versuchszeitraum

Bis zum 17. Tag wurden die Eier bei 37°C und einer Luftfeuchte von 60-74% im Infektionsbrutschrank bebrütet und alle 24 Stunden einmal geschiert, um die abgestorbenen Embryonen auszusortieren. Die Embryonen, die bis zum 17. Lebenstag, also sieben Tage nach Inokulation, noch nicht abgestorben waren, wurden durch eine Lagerung bei -20°C über eine Stunde abgetötet.

Die abgestorbenen und abgetöteten Embryonen wurden stichprobenartig bakteriologisch untersucht, um die erfolgreiche Besiedelung mit Enterokokken durch eine Reisolierung nachzuweisen. Dazu wurden die Eier eröffnet und eine Probe aus dem Dottersack sowie ab dem dritten Versuchstag auch aus der Leber, entnommen. Die Organproben wurden auf Columbia Schafblutagar (7%) ausgestrichen, für 24 Stunden bei 37°C aerob bebrütet und ausgewertet.

4 Ergebnisse

Teil 1 – Keimisolierung und –charakterisierung

4.1 Ergebnis der Speziesbestimmung

Es wurden 163 Enterokokkenisolate mit der **genus- und speziesspezifischen Multiplex-PCR** untersucht, von denen 127 Isolate als *E. faecalis* und 16 Isolate als *E. faecium* identifiziert wurden. Bei 19 Isolaten konnte nur das Genus *Enterococcus* bestimmt werden und bei einem Isolat ließ sich weder die Spezies noch das Genus determinieren (Tab. 12). Vier Isolate zeigten schwache Banden in der Multiplex-PCR.

Die **16S rDNA-Genanalyse** der 19 als *Enterococcus spp.* in der Multiplex-PCR identifizierten Isolate ergab, dass 13 der Enterokokkenspezies *E. gallinarum*, fünf *E. hirae* und eines *E. faecium* angehörten. Das Isolat ohne sichtbare Bande in der Multiplex-PCR wurde mittels der 16S rDNA-Genanalyse als *E. faecium* identifiziert. Die vier Isolate mit schwachen Banden in der Multiplex-PCR wurden in ihrer Spezieszugehörigkeit bestätigt (ein *E. faecalis*, drei *E. faecium*).

In der Tabelle 13 sind die Gesamtergebnisse der Speziesbestimmung aufgeführt.

Enterococcus faecalis machte mit 127 Isolaten (78%) den größten Anteil aus.

Siebenundfünfzig *E. faecalis* Isolate stammten von Broilern, 40 von Puten und 30 von Legehennen. Achtzehn Isolate (11%) wurden als *E. faecium* identifiziert, zwei Drittel (n=12) dieser Isolate stammten von Puten. Dreizehn Isolate (8%) wurden als *E. gallinarum* identifiziert; es handelte sich dabei ausschließlich um Isolate von Broilern (n=5) und Puten (n=8). Der Enterokokkenspezies *E. hirae* gehörten fünf Isolate (3%) an, die nur aus Hühnern (vier Legehennen, ein Broiler) isoliert wurden (Tab. 13).

Tab. 12: Ergebnisse der genus- und speziesspezifischen Multiplex-PCR

PCR-Ergebnis	Nutzungsrichtung			Isolatanzahl
	Broiler	Legehennen	Puten	
<i>E. faecalis</i>	57	30	40	127
<i>E. faecium</i>	4	2	10	16
<i>Enterococcus spp.</i>	6	4	9	19
keine Bande	0	0	1	1
Gesamt	67	36	60	163

Tab. 13: Ergebnisse der Speziesbestimmung unter Berücksichtigung beider Differenzierungsmethoden (Multiplex-PCR und 16S rDNA-Genanalyse)

Enterokokkenspezies	Nutzungsrichtung			Gesamt	
	Broiler	Legehennen	Puten		
<i>E. faecalis</i>	[n]	57	30	40	127
	%	86	83	67	78
<i>E. faecium</i>	[n]	4	2	12	18
	%	6	6	20	11
<i>E. gallinarum</i>	[n]	5	0	8	13
	%	7	0	13	8
<i>E. hirae</i>	[n]	1	4	0	5
	%	1	11	0	3
Gesamt	[n]	67	36	60	163
	%	41	22	37	

Teil 2 – Bestimmung des Resistenzverhaltens in vitro

4.2 Das Ergebnis der Mikrodilutionsmethode zur Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Es wurden insgesamt 24 antimikrobielle Wirkstoffe aus neun verschiedenen Klassen mittels der Mikrodilutionsmethode getestet. Die MHK-Ergebnisse für 11 Antibiotika wurden mit Hilfe von klinischen Grenzwerten (Breakpoints) des CLSI und NARMS bewertet und zur qualitativen Einteilung der Isolate in „resistent“, „intermediär-resistent“ und „sensibel“ verwendet (Tab. 14 – 17 B). Für die anderen 13 antimikrobiellen Wirkstoffe liegen derzeit keine Beurteilungskriterien vor. Sie wurden anhand der Minimalen Hemmkonzentrationen MHK_{50} und MHK_{90} beurteilt (Tab. 2: die Wirkstoffklassen sind durch horizontale Linien voneinander getrennt)

Die absolute Anzahl [n] der getesteten Isolate variierte bei einigen antimikrobiellen Substanzen, da für einzelne Isolate wiederholt nicht-auswertbare Ergebnisse für einige Wirkstoffe notiert wurden. Es handelte sich um sogenannte Springer („skipped wells“), die entlang des Konzentrationsgradienten eines Antibiotikums auf der Sensitivitätsplatte keine kontinuierliche Abnahme des bakteriellen Wachstums zeigten. Es traten in einer Reihe eine oder mehrere Vertiefungen ohne Bakterienwachstum auf, während in der darauffolgenden Konzentration wieder Wachstum zu erkennen war. Lag eine „übersprungene“ Vertiefung vor, wurde die höchste MHK abgelesen, also die erste Vertiefung ohne Wachstum nach einem Springer. Bei zwei oder mehr Springern wurde die Mikrodilution für das Isolat und das Antibiotikum wiederholt. Traten bei der Wiederholung erneut Springer auf, wurde das MHK-Ergebnis des Isolats für den entsprechenden Wirkstoff als ungültig notiert (CLSI, 2008; Miller et al., 2005).

Die Empfindlichkeit gegenüber Vancomycin wurde mit einer zusätzlichen kulturellen Anzucht der Isolate auf VRE-Selektivnährböden bestätigt; ein Bakterienwachstum konnte nach 24 bis 48 stündiger Bebrütung nicht nachgewiesen werden. Als Positivkontrolle wurde der Vancomycin-resistente Referenzstamm *E. faecalis* ATCC 51299 mitgeführt.

Die Ergebnisse der Mikrodilution-Empfindlichkeitstestung verschiedener Enterokokkenspezies sind in den Tabellen 14 A+B (*E. faecalis*), 15 A+B (*E. faecium*), 16 A+B (*E. gallinarum*) und 17 A+B (*E. hirae*) aufgeführt.

Ein Großteil der *Enterococcus* Isolate wies hohe MHK-Werte für die Mehrzahl der **Cephalosporine** (MHK₉₀ ≥ 32 µg/ml bzw. ≥ 64 µg/ml) auf. Für andere **Beta-Laktam-Antibiotika** (Ausnahme Oxacillin) zeigten alle *E. faecalis*, *E. gallinarum* und *E. hirae* Isolate MHK-Werte im unteren Bereich der Testkonzentrationen (1 – 8 µg/ml) und geringe Resistenzraten (0 – 8%). Nur ein *E. gallinarum* Isolat wurde als resistent gegenüber Penicillin bewertet. Im Gegensatz dazu zeigten die *E. faecium* Isolate mit 17% (Amoxicillin-Clavulansäure) bis 44% (Penicillin) eine stärkere Beta-Laktam-Resistenz und MHK₉₀-Werte von ≥ 32 µg/ml.

Eine **Vancomycin**-Resistenz (MHK ≥ 32 µg/ml) trat bei keinem der Isolate auf, aber sechs *E. faecalis*, zwei *E. hirae* und acht *E. gallinarum* Isolate wurden als intermediär-resistent beurteilt (MHK₉₀ = 8 µg/ml).

Die Mehrzahl der Enterokokkenisolate wies hohe MHK-Werte für **Makrolide** (MHK₉₀ > 32 µg/ml bzw. > 128 µg/ml, Ausnahme *E. hirae*), **Lincosamide** (MHK₉₀ > 64 µg/ml) und **Tetrazyklin** (MHK₉₀ = 128 µg/ml bzw. 256 µg/ml) auf. Hohe Resistenzraten konnten bei allen Enterokokkenspezies für Lincomycin (71 – 100%) und Tetrazyklin (40 - 100%) beobachtet werden. Ein Großteil der *E. faecalis* und *E. faecium* Isolate war resistent oder intermediär-resistent gegen Erythromycin (70 - 89%) und **Gentamicin** (89 - 98%).

Eine hohe Resistenzrate für Ciprofloxacin mit 56% (n=10) der Isolate zeigte sich nur bei *E. faecium*, während die MHK-Werte der beiden anderen **Fluorchinolone** Enrofloxacin und Marbofloxacin mit 4 µg/ml (MHK₅₀) und 8 µg/ml (MHK₉₀) höher als bei den anderen Enterokokkenspezies waren.

Für **Chloramphenicol** wurden geringe Resistenzraten für *E. faecalis* und *E. faecium* mit 8% (n=10) bzw. 6% (n=1) der Isolate nachgewiesen.

Die MHK₅₀-Werte für **Sulfamethoxazol-Trimethoprim** lagen bei allen vier Enterokokkenspezies im unteren Bereich der Testkonzentrationen (≤ 0,12/2,38 µg/ml).

Vergleicht man die Tabellen 14 – 17 B so wird deutlich, dass *E. faecium* Isolate die höchsten Resistenzraten für den Großteil der Antibiotika zeigten, mit Resistenzphänotypen in allen antimikrobiellen Wirkstoffklassen, außer Vancomycin. Die *E. faecalis*, *E. gallinarum* und *E. hirae* Isolate wiesen vergleichbare Resistenzmuster innerhalb der antimikrobiellen Wirkstoffklassen auf. Alle 13 *E. gallinarum* Isolate waren resistent gegen Tetrazyklin und Lincomycin.

In den Tabellen 14 – 17 C ist der Vollständigkeit halber für jede der vier Enterokokkenspezies das Resistenzverhalten nach Nutzungsrichtung der Geflügelspezies aufgeführt. Aufgrund der geringen Anzahl an *E. gallinarum* (n=13) und *E. hirae* (n=5) Isolaten werden nachfolgend nur Unterschiede für *E. faecalis* (n=127) und *E. faecium* (n=18) näher erläutert.

Enterococcus faecalis Isolate aus Puten zeigten mit Ausnahme von Ciprofloxacin (5%) die höchsten Resistenzraten (13 – 100%) für sechs antimikrobielle Substanzen (Tab. 14 C). Die Mehrzahl der Putenisolate war resistent gegenüber Gentamicin (73%, n=29), Lincomycin (100%, n=39) und Tetrazyklin (85%, n=34). Etwa die Hälfte der *E. faecalis* Isolate von Puten (56%, n=22) und Broilern (44 – 46%, n=24 – 25) zeigte Resistenzen gegen Erythromycin und Tylosintartat, während nur 27% (n=8) der untersuchten *E. faecalis* Isolate von Legehennen resistent gegen diese Makrolid-Antibiotika waren.

Enterococcus faecium Isolate aus Puten zeigten für neun von 11 Wirkstoffen mit 8% (n=1) bis 92% (n=11) die höchsten Resistenzraten im Vergleich zu den Broilerisolaten (Tab. 15 C).

Tab. 14 A: Verteilung der minimalen Hemmkonzentration (MHK), MHK₅₀ und MHK₉₀ der *Enterococcus faecalis* Isolate für 24 antimikrobielle Substanzen

AB [†]	Anzahl je Minimale Hemmkonzentration (µg/ml)																						[n] ^Δ	MHK 50	MHK 90					
	0,008	≤ 0,015	0,015	0,03	0,06	≤ 0,12	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	> 8	16	> 16	32	> 32	64	>64	128	> 128				256	> 256	µg/ml		
GEN											2	1	55		47		2										19	126	16	> 256
AMP								3	14	86	18	1																122	1	2
AUG							3	8	66	45	1																	123	0,5/0,25	1/0,5
PEN										11	45	65	3															124	4	4
OXA											1	2	7	114														124	> 8	> 8
CEFI												11	59	30	10		2	11										123	4	32
FAZ											1	3	14		25		68		10	2							123	32	64	
FOP												1	4		10		71		37								123	32	> 32	
FOT											1	1	4		2		3		110									121	> 32	> 32
XNL											2	4	5		13		22		34	42								122	64	> 64
CHL												24	91		1		1		6	3								126	8	8
CIP							1	1	22	84	11	1	2		1	3												126	1	2
ENRO					1			3	64	44	8		1		2	3												126	0,5	2
MARB									3	53	60	3	3		1	3												126	2	2
VAN									5	71	38	4	6															124	1	2
LIN											1				12		49		6	56								124	64	> 64
PIRL											3	5	18	40	3	4	3		7	41								124	4	> 64
CLI									1					3	47		23		5	45								124	32	> 64
ERY							9	17	12	8	19	5	4		1		2	47										124	2	> 32
TYL										3	46	19	1														55	124	2	> 128
SPI										2	25	38	3	2					2	3							51	126	1	> 128
TIL													3		64		3										56	126	16	> 128
SXT		26		48	37					1	1	3	3		4		2	1										126	0,03/0,6	4/76
TET						1		4	14	2	1				3		12		41	45			2		1		126	64	128	

† AB, Antibiotika; GEN, Gentamicin; AMP, Ampicillin; AUG, Amoxicillin-Clavulansäure (2:1); PEN, Penicillin; OXA, Oxacillin; CHL, Chloramphenicol; CEF, Cefquinom; FAZ, Cefazolin; FOP, Cefoperazon; FOT, Cefotaxime; XNL, Ceftiofur; CIP, Ciprofloxacin; ENRO, Enrofloxacin; MARB, Marbofloxacin; VAN, Vancomycin, LIN, Lincomycin; PIRL, Pirlimycin; CLI, Clindamycin; ERY, Erythromycin; TYL, Tylosintartat; SPI, Spiramycin; TIL, Tilmicosin; SXT, Sulfamethoxazol-Trimethoprim (1:19); TET, Tetrazyklin

△[n] = Anzahl der lesbaren Ergebnisse (siehe 4. 2.)

Die dicken Trennstriche zeigen den Breakpoint (CLSI oder NARMS) für resistente Isolate an (ausführliche Darstellung der Breakpoints siehe Tab. 2).

Der grau schraffierte Bereich zeigt den Testbereich der Sensititreplatten an (ausführliche Darstellung der Testbereiche siehe Tab. 2).

Tab. 14 B: Resistenzmuster der *Enterococcus faecalis* Isolate basierend auf MHK-Grenzwerten für 11 antimikrobielle Substanzen

Antimikrobielle Klasse	Antimikrobielle Substanz	Abkürzung	Breakpoints ¹ µg/ml			[n] ²	Anzahl der Isolate		
			s	i	r		s	i	r
Aminoglykoside	Gentamicin	GEN	≤ 4	8	≥ 16	126 %	3 2	55 44	68 54
Beta-Laktame	Ampicillin	AMP	≤ 8	-	≥ 16	122 %	122 100	0 0	0 0
	Amoxicillin-Clavulansäure (2:1)	AUG	≤ 8/4	16/8	≥ 32/16	123 %	123 100	0 0	0 0
	Penicillin	PEN	≤ 8	-	≥ 16	124 %	124 100	0 0	0 0
Chloramphenicole	Chloramphenicol	CHL	≤ 8	16	≥ 32	126 %	115 91	1 1	10 8
Fluorchinolone	Ciprofloxacin	CIP	≤ 1	2	≥ 4	126 %	108 86	11 9	7 6
Glykopeptide	Vancomycin	VAN	≤ 4	8 - 16	≥ 32	124 %	118 95	6 5	0 0
Lincosamide	Lincomycin	LIN	≤ 2	4	≥ 8	124 %	1 1	0 0	123 99
Makrolide	Erythromycin	ERY	≤ 0,5	1 – 4	≥ 8	124 %	38 30	32 26	54 44
	Tylosintartat	TYL	≤ 8	16	≥ 32	124 %	69 56	0 0	55 44
Tetrazykline	Tetrazyklin	TET	≤ 4	8	≥ 16	126 %	22 18	0 0	104 82

s, sensibel; i, intermediär-resistent; r, resistent

¹ gemäß CLSI (CLSI, 2008, 2013a, b, 2014) und NARMS (USDA, 19.12.2014)

² [n] = Anzahl der lesbaren Ergebnisse (siehe 4. 2.)

Tab. 14 C: Antimikrobielle Resistenz der *Enterococcus faecalis* Isolate von Broilern, Legehennen und Puten

Antimikrobielle Klasse	Antimikrobielle Substanz	Broiler (n=57)		Legehennen (n=30)		Puten (n=40)	
		[n]	%	[n]	%	[n]	%
Aminoglykoside	Gentamicin	29	51	10	35	29	73
Beta-Laktame	Ampicillin	0	0	0	0	0	0
	Amoxicillin-Clavulansäure (2:1)	0	0	0	0	0	0
	Penicillin	0	0	0	0	0	0
Chloramphenicole	Chloramphenicol	3	5	2	7	5	13
Fluorchinolone	Ciprofloxacin	5	9	0	0	2	5
Glykopeptide	Vancomycin	0	0	0	0	0	0
Lincosamide	Lincomycin	55	100	29	97	39	100
Makrolide	Erythromycin	24	44	8	27	22	56
	Tylosintartat	25	46	8	27	22	56
Tetrazykline	Tetrazyklin	45	79	25	86	34	85

Zur Berechnung der prozentualen Häufigkeit diente die Anzahl, der für das entsprechende Antibiotikum erfolgreich getesteten Isolate. Abweichungen von der Gesamtzahl der Isolate der jeweiligen Nutzungsrichtung ergaben sich aufgrund von nicht auswertbaren Ergebnissen einzelner *E. faecalis* Isolate für das getestete Antibiotikum.

Tab. 15 A: Verteilung der minimalen Hemmkonzentration (MHK), MHK₅₀ und MHK₉₀ der *Enterococcus faecium* Isolate für 24 antimikrobielle Substanzen

AB [†]	Anzahl je Minimale Hemmkonzentration (µg/ml)																						[n] ^Δ	MHK 50	MHK 90					
	0,008	≤ 0,015	0,015	≤ 0,03	0,03	≤ 0,06	0,06	≤ 0,12	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	> 8	16	> 16	32	> 32	64	>64				128	> 128	256	> 256	µg/ml
GEN													2	3		10	1										2	18	16	32
AMP												6	5	2				1		3	1							18	2	64
AUG										1	5	5	2			2		2		1								18	1/0,5	32/16
PEN												3	5	2		3				5								18	8	> 32
OXA	1														17													18	> 8	> 8
CEF												1	2	1		2		1		11								18	> 32	> 32
FAZ																				2	16							18	> 64	> 64
FOP																3		3		12								18	> 32	> 32
FOT													1							17								18	> 32	> 32
XNL																				3	15							18	> 64	> 64
CHL												1	2	5		9		1										18	8	16
CIP												5	3	9	1													18	4	4
ENRO												2	3	5	7	1												18	4	8
MARB												1	4	9	4													18	4	8
VAN												11	5	1	1													18	0,5	1
LIN				1								4				1		1			11							18	> 64	> 64
PIRL						1					3	1			1		1		1	1	9							18	64	> 64
CLI				1					2	2					1		2				10							18	> 64	> 64
ERY								1	1		1	2	2			1				10								18	> 32	> 32
TYL						1						2	2	3								1				9		18	128	> 128
SPI									1	2	3	2														10		18	> 128	> 128
TIL												1	1	1		5										10		18	> 128	> 128
SXT	1					7		7								1			2									18	0,12/2,38	16/304
TET							1		2	3						1		1		2		7		1				18	64	128

† AB, Antibiotika; GEN, Gentamicin; AMP, Ampicillin; AUG, Amoxicillin-Clavulansäure (2:1); PEN, Penicillin; OXA, Oxacillin; CHL, Chloramphenicol; CEF, Cefquinom; FAZ, Cefazolin; FOP, Cefoperazon; FOT, Cefotaxime; XNL, Ceftiofur; CIP, Ciprofloxacin; ENRO, Enrofloxacin; MARB, Marbofloxacin; VAN, Vancomycin, LIN, Lincomycin; PIRL, Pirlimycin; CLI, Clindamycin; ERY, Erythromycin; TYL, Tylosintartat; SPI, Spiramycin; TIL, Tilmicosin; SXT, Sulfamethoxazol-Trimethoprim (1:19); TET, Tetrazyklin

△[n] = Anzahl der lesbaren Ergebnisse (siehe 4. 2.)

Die dicken Trennstriche zeigen den Breakpoint (CLSI oder NARMS) für resistente Isolate an (ausführliche Darstellung der Breakpoints siehe Tab. 2).

Der grau schraffierte Bereich zeigt den Testbereich der Sensititreplatten an (ausführliche Darstellung der Testbereiche siehe Tab. 2).

Tab. 15 B: Resistenzmuster der *Enterococcus faecium* Isolate basierend auf MHK-Grenzwerten für 11 antimikrobielle Substanzen

Antimikrobielle Klasse	Antimikrobielle Substanz	Abkürzung	Breakpoints ¹ µg/ml			[n] ²	Anzahl der Isolate		
			s	i	r		s	i	r
Aminoglykoside	Gentamicin	GEN	≤ 4	8	≥ 16	18 %	2 11	3 17	13 72
Beta-Laktame	Ampicillin	AMP	≤ 8	-	≥ 16	18 %	13 72	0 0	5 28
	Amoxicillin-Clavulansäure (2:1)	AUG	≤ 8/4	16/8	≥ 32/16	18 %	13 72	2 11	3 17
	Penicillin	PEN	≤ 8	-	≥ 16	18 %	10 56	0 0	8 44
Chloramphenicole	Chloramphenicol	CHL	≤ 8	16	≥ 32	18 %	8 44	9 50	1 6
Fluorchinolone	Ciprofloxacin	CIP	≤ 1	2	≥ 4	18 %	5 28	3 17	10 56
Glykopeptide	Vancomycin	VAN	≤ 4	8 - 16	≥ 32	18 %	18 100	0 0	0 0
Lincosamide	Lincomycin	LIN	≤ 2	4	≥ 8	18 %	5 28	0 0	13 72
Makrolide	Erythromycin	ERY	≤ 0,5	1 – 4	≥ 8	18 %	2 11	5 28	11 61
	Tylosintartat	TYL	≤ 8	16	≥ 32	18 %	8 44	0 0	10 56
Tetrazykline	Tetrazyklin	TET	≤ 4	8	≥ 16	18 %	6 33	0 0	12 67

s, sensibel; i, intermediär-resistent; r, resistent

¹ gemäß CLSI (CLSI, 2008, 2013a, b, 2014) und NARMS (USDA, 19.12.2014)

² [n] = Anzahl der lesbaren Ergebnisse (siehe 4. 2.)

Tab. 15 C: Antimikrobielle Resistenz der *Enterococcus faecium* Isolate von Broilern, Legehennen und Puten

Antimikrobielle Klasse	Antimikrobielle Substanz	Broiler (n=4)		Legehennen (n=2)		Puten (n=12)	
		[n]	%	[n]	%	[n]	%
Aminoglykoside	Gentamicin	3	75	2	100	8	67
Beta-Laktame	Ampicillin	0	0	0	0	5	42
	Amoxicillin-Clavulansäure (2:1)	0	0	0	0	3	25
	Penicillin	0	0	0	0	8	67
Chloramphenicole	Chloramphenicol	0	0	0	0	1	8
Fluorchinolone	Ciprofloxacin	1	25	0	0	9	75
Glykopeptide	Vancomycin	0	0	0	0	0	0
Lincosamide	Lincomycin	2	50	0	0	11	92
Makrolide	Erythromycin	2	50	0	0	9	75
	Tylosintartat	2	50	0	0	8	67
Tetrazykline	Tetrazyklin	2	50	0	0	10	83

Tab. 16 A: Verteilung der minimalen Hemmkonzentration (MHK), MHK₅₀ und MHK₉₀ der *Enterococcus gallinarum* Isolate für 24 antimikrobielle Substanzen

AB [†]	Anzahl je Minimale Hemmkonzentration (µg/ml)																				[n] ^Δ	MHK 50	MHK 90					
	0,008	≤ 0,015	0,015	0,03	0,06	≤ 0,12	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	> 8	16	> 16	32	> 32	64	>64		128	> 128	256	> 256	µg/ml		
GEN											3	5			1										4	13	4	> 256
AMP													2	7	3	1										13	1	2
AUG								1	4	5	3														13	1/0,5	2/1	
PEN									1	3	6	0	2		1										13	2	8	
OXA														12											12	> 8	> 8	
CEF																		13							13	> 32	> 32	
FAZ													2		6		2					2		12	16	> 64		
FOP													1		5		4		3					13	32	> 32		
FOT																			13					13	> 32	> 32		
XNL																	2		3		8			13	> 64	> 64		
CHL													6	6	1									13	8	8		
CIP							1	2	2	4	2	1	1											13	1	4		
ENRO					1			2	2	3	3	1	1											13	1	4		
MARB									1	4	4	3	1											13	2	4		
VAN												4	8											12	8	8		
LIN														2	2		4		2		2			12	32	> 64		
PIRL											3	4	2	1							2			12	2	> 64		
CLI													4		6						2			12	16	> 64		
ERY								2	6									4						12	0,5	> 32		
TYL											1	8	1									2		12	2	> 128		
SPI									1	5	5											2		13	2	> 128		
TIL													2		8		1					2		13	16	> 128		
SXT		6		5	1		1																	13	0,03/0,6	0,06/1,19		
TET																1		8		4				13	64	128		

† AB, Antibiotika; GEN, Gentamicin; AMP, Ampicillin; AUG, Amoxicillin-Clavulansäure (2:1); PEN, Penicillin; OXA, Oxacillin; CHL, Chloramphenicol; CEF, Cefquinom; FAZ, Cefazolin; FOP, Cefoperazon; FOT, Cefotaxime; XNL, Ceftiofur; CIP, Ciprofloxacin; ENRO, Enrofloxacin; MARB, Marbofloxacin; VAN, Vancomycin, LIN, Lincomycin; PIRL, Pirlimycin; CLI, Clindamycin; ERY, Erythromycin; TYL, Tylosintartat; SPI, Spiramycin; TIL, Tilimicosin; SXT, Sulfamethoxazol-Trimethoprim (1:19); TET, Tetrazyklin

△[n] = Anzahl der lesbaren Ergebnisse (siehe 4. 2.)

Die dicken Trennstriche zeigen den Breakpoint (CLSI oder NARMS) für resistente Isolate an (ausführliche Darstellung der Breakpoints siehe Tab. 2).

Der grau schraffierte Bereich zeigt den Testbereich der Sensititreplatten an (ausführliche Darstellung der Testbereiche siehe Tab. 2).

Tab. 16 B: Resistenzmuster der *Enterococcus gallinarum* Isolate basierend auf MHK-Grenzwerten für 11 antimikrobielle Substanzen

Antimikrobielle Klasse	Antimikrobielle Substanz	Abkürzung	Breakpoints ¹ µg/ml			[n] ²	Anzahl der Isolate		
			s	i	r		s	i	r
Aminoglykoside	Gentamicin	GEN	≤ 4	8	≥ 16	13 %	8 62	0 0	5 38
Beta-Laktame	Ampicillin	AMP	≤ 8	-	≥ 16	13 %	13 100	0 0	0 0
	Amoxicillin-Clavulansäure (2:1)	AUG	≤ 8/4	16/8	≥ 32/16	13 %	13 100	0 0	0 0
	Penicillin	PEN	≤ 8	-	≥ 16	13 %	12 92	0 0	1 8
Chloramphenicole	Chloramphenicol	CHL	≤ 8	16	≥ 32	13 %	12 92	1 8	0 0
Fluorchinolone	Ciprofloxacin	CIP	≤ 1	2	≥ 4	13 %	9 70	2 15	2 15
Glykopeptide	Vancomycin	VAN	≤ 4	8 - 16	≥ 32	12 %	4 33	8 67	0 0
Lincosamide	Lincomycin	LIN	≤ 2	4	≥ 8	12 %	0 0	0 0	12 100
Makrolide	Erythromycin	ERY	≤ 0,5	1 – 4	≥ 8	12 %	8 67	0 0	4 33
	Tylosintartat	TYL	≤ 8	16	≥ 32	12 %	10 83	0 0	2 17
Tetrazykline	Tetrazyklin	TET	≤ 4	8	≥ 16	13 %	0 0	0 0	13 100

s, sensibel; i, intermediär-resistent; r, resistent

¹ gemäß CLSI (CLSI, 2008, 2013a, b, 2014) und NARMS (USDA, 19.12.2014)

² [n] = Anzahl der lesbaren Ergebnisse (siehe 4. 2.)

Tab. 16 C: Antimikrobielle Resistenz der *Enterococcus gallinarum* Isolate von Broilern und Puten

Antimikrobielle Klasse	Antimikrobielle Substanz	Broiler (n=5)		Puten (n=8)	
		[n]	%	[n]	%
Aminoglykoside	Gentamicin	1	20	4	50
Beta-Laktame	Ampicillin	0	0	0	0
	Amoxicillin-Clavulansäure (2:1)	0	0	0	0
	Penicillin	0	0	1	12,5
Chloramphenicole	Chloramphenicol	0	0	0	0
Fluorchinolone	Ciprofloxacin	0	0	2	25
Glykopeptide	Vancomycin	0	0	0	0
Lincosamide	Lincomycin	5	100	7	100
Makrolide	Erythromycin	2	40	3	29
	Tylosintartat	1	20	2	14
Tetrazykline	Tetrazyklin	5	100	8	100

Zur Berechnung der prozentualen Häufigkeit diente die Anzahl, der für das entsprechende Antibiotikum erfolgreich getesteten Isolate. Abweichungen von der Gesamtzahl der Isolate der jeweiligen Nutzungsrichtung ergaben sich aufgrund von nicht auswertbaren Ergebnissen einzelner *E. gallinarum* Isolate für das getestete Antibiotikum.

Tab. 17 A: Verteilung der minimalen Hemmkonzentration (MHK), MHK₅₀ und MHK₉₀ der *Enterococcus hirae* Isolate für 24 antimikrobielle Substanzen

AB [†]	Anzahl je Minimale Hemmkonzentration (µg/ml)																				[n] ^Δ	MHK 50	MHK 90		
	0,008	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	> 8	16	32	> 32	64	>64	128	> 128	256		> 256	µg/ml		
GEN											4		1										5	8	16
AMP					1			2	1	1													5	0,5	2
AUG					1	1		2	1														5	0,5/0,25	1/0,5
PEN								1	2	1	1												5	1	4
OXA										1	1		3										5	> 8	> 8
CEF						1				1						3							5	> 32	> 32
FAZ																3	2						5	64	> 64
FOP										1	3		1										5	8	16
FOT							1						1			3							5	> 32	> 32
XNL											1							4					5	> 64	> 64
CHL										5													5	4	4
CIP						1	2	2															5	0,5	2
ENRO								3	2														5	0,5	2
MARB								1	2	1	1												5	1	4
VAN							2			1	2												5	4	8
LIN													3	1				1					5	16	> 64
PIRL										1	3							1					5	8	> 64
CLI											2		2					1					5	16	> 64
ERY				2	1											2							5	0,12	> 32
TYL									3	1											1		5	1	> 128
SPI									5														5	1	1
TIL											5												5	8	8
SXT			2	1	1								1										5	0,06/1,19	16/304
TET						1	2									1						1	5	3	256

† AB, Antibiotika; GEN, Gentamicin; AMP, Ampicillin; AUG, Amoxicillin-Clavulansäure (2:1); PEN, Penicillin; OXA, Oxacillin; CHL, Chloramphenicol; CEF, Cefquinom; FAZ, Cefazolin; FOP, Cefoperazon; FOT, Cefotaxime; XNL, Ceftiofur; CIP, Ciprofloxacin; ENRO, Enrofloxacin; MARB, Marbofloxacin; VAN, Vancomycin, LIN, Lincomycin; PIRL, Pirlimycin; CLI, Clindamycin; ERY, Erythromycin; TYL, Tylosintartat; SPI, Spiramycin; TIL, Tilmicosin; SXT, Sulfamethoxazol-Trimethoprim (1:19); TET, Tetrazyklin

△[n] = Anzahl der lesbaren Ergebnisse (siehe 4. 2.)

Die dicken Trennstriche zeigen den Breakpoint (CLSI oder NARMS) für resistente Isolate an (ausführliche Darstellung der Breakpoints siehe Tab. 2).

Der grau schraffierte Bereich zeigt den Testbereich der Sensititreplatten an (ausführliche Darstellung der Testbereiche siehe Tab. 2).

Tab. 17 B: Resistenzmuster der *Enterococcus hirae* Isolate basierend auf MHK-Grenzwerten für 11 antimikrobielle Substanzen

Antimikrobielle Klasse	Antimikrobielle Substanz	Abkürzung	Breakpoints ¹ µg/ml			[n] ²	Anzahl der Isolate		
			s	i	r		s	i	r
Aminoglykoside	Gentamicin	GEN	≤ 4	8	≥ 16	5 %	0 0	4 80	1 20
Beta-Laktame	Ampicillin	AMP	≤ 8	-	≥ 16	5 %	5 100	0 0	0 0
	Amoxicillin-Clavulansäure (2:1)	AUG	≤ 8/4	16/8	≥ 32/16	5 %	5 100	0 0	0 0
	Penicillin	PEN	≤ 8	-	≥ 16	5 %	5 100	0 0	0 0
Chloramphenicole	Chloramphenicol	CHL	≤ 8	16	≥ 32	5 %	5 100	0 0	0 0
Fluorchinolone	Ciprofloxacin	CIP	≤ 1	2	≥ 4	5 %	3 60	2 40	0 0
Glykopeptide	Vancomycin	VAN	≤ 4	8 - 16	≥ 32	5 %	3 60	2 40	0 0
Lincosamide	Lincomycin	LIN	≤ 2	4	≥ 8	5 %	0 0	0 0	5 100
Makrolide	Erythromycin	ERY	≤ 0,5	1 – 4	≥ 8	5 %	3 60	0 0	2 40
	Tylosintartat	TYL	≤ 8	16	≥ 32	5 %	4 80	0 0	1 20
Tetrazykline	Tetrazyklin	TET	≤ 4	8	≥ 16	5 %	3 60	0 0	2 40

s, sensibel; i, intermediär-resistent; r, resistent

¹ gemäß CLSI (CLSI, 2008, 2013a, b, 2014) und NARMS (USDA, 19.12.2014)

² [n] = Anzahl der lesbaren Ergebnisse (siehe 4. 2.)

Tab. 17 C: Antimikrobielle Resistenz der *Enterococcus hirae* Isolate von Broilern und Legehennen

Antimikrobielle Klasse	Antimikrobielle Substanz	Broiler (n=1)		Legehennen (n=4)	
		[n]	%	[n]	%
Aminoglykoside	Gentamicin	0	0	1	25
Beta-Laktame	Ampicillin	0	0	0	0
	Amoxicillin-Clavulansäure (2:1)	0	0	0	0
	Penicillin	0	0	0	0
Chloramphenicole	Chloramphenicol	0	0	0	0
Fluorchinolone	Ciprofloxacin	0	0	0	0
Glykopeptide	Vancomycin	0	0	0	0
Lincosamide	Lincomycin	1	100	4	100
Makrolide	Erythromycin	1	100	1	25
	Tylosintartat	1	100	0	0
Tetrazykline	Tetrazyklin	1	100	1	25

4.2.1 Multiresistenz von Enterokokken

In den Tabellen 15 - 17 D sind die phänotypischen Resistenzmuster der verschiedenen Enterokokkenspezies dargestellt.

Von den 163 untersuchten Enterokokkenisolaten waren 99 (61%) gegen drei oder mehr antimikrobielle Wirkstoffklassen resistent. Die meisten multiresistenten Isolate stammten von Puten (49%, n=48), gefolgt von Broilern (37%, n=37) und Legehennen (14%, n=14). Bei Betrachtung der Enterokokkenspezies im Vergleich zeigte *E. faecium* den höchsten Anteil multiresistenter Isolate (72%, n=13). Etwa zwei Drittel der *E. faecalis* (60%, n=76) und *E. gallinarum* Isolate (62%, n=8) sowie zwei von fünf *E. hirae* Isolaten waren gegen mehr als zwei Antibiotikaklassen resistent.

Achtzig Prozent der Putenisolate (n=60), 55% der Broilerisolate (n=67) und 39% der Legehennenisolate (n=36) zeigten eine Multiresistenz. Bei den Puten waren 92% (n=11) der *E. faecium* Isolate, gefolgt von 78% (n=31) *E. faecalis* und 75% (n=6) *E. gallinarum* gegen drei oder mehr Antibiotikaklassen resistent. Bei Broilern und Legehennen zeigte die Enterokokkenspezies *E. faecalis* die höchsten Multiresistenzraten mit 56% (n=32) bzw. 43% (n=13) der Isolate. Die häufigsten Multiresistenzphänotypen von *E. faecalis* aus Puten und Broilern waren Gentamicin, Lincomycin, Tetrazyklin und Erythromycin, Tylosintartat, Gentamicin, Lincomycin, Tetrazyklin (Tab. 14 D). Bei *E. faecalis* Isolaten (n=30) aus Legehennen traten Resistenzen am häufigsten gegen Lincomycin (n=29), Tetrazyklin (n=25), Gentamicin (n=10), Erythromycin (n=8) und Tylosintartat (n=8) auf.

Bei zwei *E. faecium* Isolaten von Puten wurde eine phänotypische Resistenz gegen Vertreter von sechs antimikrobiellen Wirkstoffklassen (Aminoglykoside, Beta-Laktame, Chloramphenicol, Fluorchinolone, Lincosamide, Makrolide, Tetrazykline) notiert. Zwei *E. gallinarum* Isolate von Puten zeigten den Resistenzphänotyp Gentamicin, Lincomycin und Tetrazyklin, weitere phänotypische Resistenzmuster kamen bei *E. gallinarum* und *E. hirae* nur einmal vor (Tab. 16 D + 17 D)

Tab. 14 D: Phänotypische Resistenzmuster von *Enterococcus faecalis* für Broiler, Legehennen und Puten

Antimikrobielle Resistenzmuster	Nutzungsrichtung			
	Broiler [n]	Legehennen [n]	Puten [n]	
Chl, Lin, Tet	-	-	1	
Gen, Lin, Tet	9	4	8	
Ery, Tyl, Gen, Lin	1	-	2	
Ery, Tyl, Lin, Tet	4	4	2	
Cip, Ery, Tyl, Lin	1	-	-	
Cip, Ery, Tyl, Lin, Tet	2	-	-	
Cip, Ery, Tyl, Gen, Lin	-	-	1	
Ery, Tyl, Gen, Lin, Tet	10	3	12	
Tyl, Gen, Lin, Tet	1	1	-	
Chl, Cip, Ery, Tyl, Lin, Tet	1	-	-	
Chl, Ery, Tyl, Gen, Lin, Tet	2	1	4	
Cip, Ery, Tyl, Gen, Lin, Tet	1	-	1	
Gesamt	[n] %	32/57 56	13/30 43	31/40 78

¹Cip, Ciprofloxacin; Chl, Chloramphenicol; Ery, Erythromycin; Gen, Gentamicin; Lin, Lincomycin; Tet, Tetrazyklin; Tyl, Tylosintartat

Tab. 15 D: Phänotypische Resistenzmuster von *Enterococcus faecium* für Broiler, Legehennen und Puten

Antimikrobielle Resistenzmuster	Nutzungsrichtung			
	Broiler [n]	Legehennen [n]	Puten [n]	
Cip, Gen, Tet	-	-	1	
Cip, Ery, Tyl, Lin, Pen	-	-	1	
Ery, Tyl, Gen, Lin, Tet	1	-	1	
Amp, Aug, Pen, Ery, Tyl, Lin, Tet	-	-	1	
Cip, Ery, Lin, Pen, Tet	-	-	1	
Cip, Gen, Lin, Pen, Tet	-	-	1	
Cip, Ery, Tyl, Gen, Lin, Tet	1	-	1	
Amp, Aug, Pen, Ery, Tyl, Gen, Lin, Tet	-	-	1	
Amp, Aug, Pen, Cip, Ery, Tyl, Gen, Lin, Tet	-	-	2	
Amp, Aug, Pen, Chl, Cip, Ery, Tyl, Gen, Lin, Tet	-	-	1	
Gesamt	[n] %	2/4 50	0/2 0	11/12 92

¹Amp, Ampicillin; Aug, Amoxicillin-Clavulansäure (2:1); Cip, Ciprofloxacin; Chl, Chloramphenicol; Ery, Erythromycin; Gen, Gentamicin; Lin, Lincomycin; Pen, Penicillin; Tet, Tetrazyklin; Tyl, Tylosintartat

Tab. 16 D: Phänotypische Resistenzmuster von *Enterococcus gallinarum* für Broiler, Legehennen und Puten

Antimikrobielle Resistenzmuster	Nutzungsrichtung		
	Broiler [n]	Legehennen [n]	Puten [n]
Ery, Lin, Tet	-	-	1
Ery, Tyl, Lin, Tet	1	-	1
Gen, Lin, Tet	-	-	2
Cip, Gen, Lin, Tet	-	-	1
Ery, Gen, Lin, Tet	1	-	-
Pen, Cip, Gen, Lin, Tet	-	-	1
Gesamt	[n] 40	2/5 0	6/8 75
	%		

¹Cip, Ciprofloxacin; Ery, Erythromycin; Gen, Gentamicin; Lin, Lincomycin; Pen, Penicillin; Tet, Tetrazyklin

Tab. 17 D: Phänotypische Resistenzmuster von *Enterococcus hirae* für Broiler, Legehennen und Puten

Antimikrobielle Resistenzmuster	Nutzungsrichtung		
	Broiler [n]	Legehennen [n]	Puten [n]
Ery, Lin, Tet	-	1	-
Ery, Tyl, Lin, Tet	1	-	-
Gesamt	[n] 100	1/1 25	0/0 0
	%		

¹Ery, Erythromycin; Lin, Lincomycin; Tet, Tetrazyklin; Tyl, Tylosintartat

Teil 3 - Phäno- und genotypischer Nachweis spezifischer Virulenzfaktoren und ihre Korrelation mit der Embryoletalität ausgewählter Enterokokkenisolate

4.3 Ergebnisse des Nachweises der Virulenzfaktoren

4.3.1 Ergebnisse des PCR-Nachweises der Virulenzgene

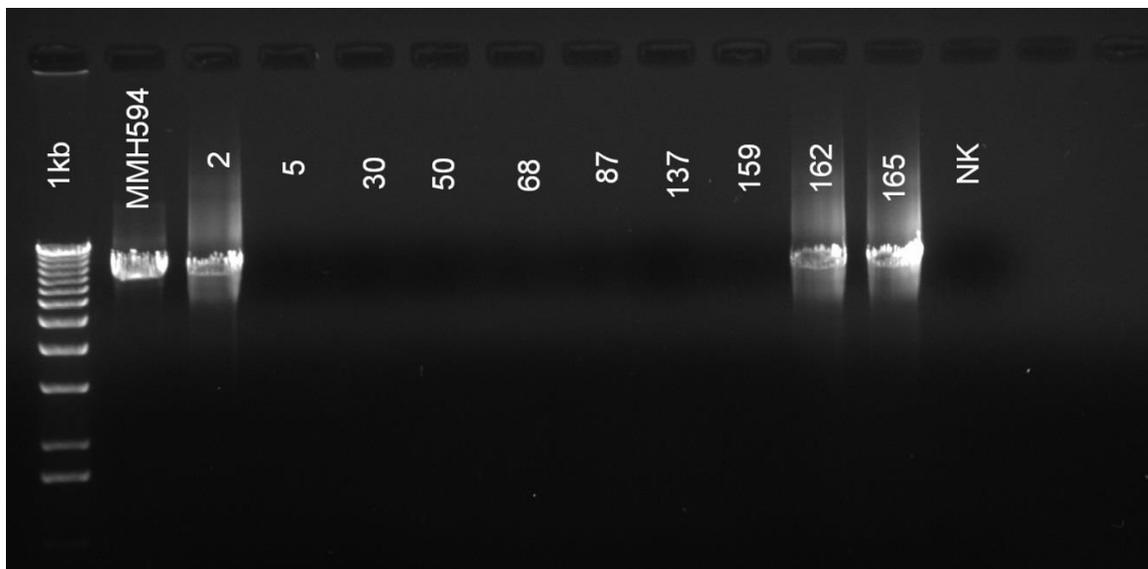
Aus den 163 Enterokokkenisolaten wurden 28 Isolate von Puten ausgewählt, die hinsichtlich des Vorhandenseins spezifischer Virulenzfaktoren näher charakterisiert wurden. Diese beinhalteten zehn *E. faecalis*, zehn *E. faecium* und acht *E. gallinarum* Isolate. Die Gene der folgenden Virulenzfaktoren wurden mittels PCR nachgewiesen: Aggregation Substance (*asa1*), Cytolysin-Operon (in Kombination mit *cylA*, *cylB*, *cylL_L*, *cylL_S*, *cylM*), Enterococcal Surface Protein (*esp*), Gelatinase (*gelE*) und Hyaluronidase (*hyl_{Efm}*).

Die PCR-Produkte der Virulenzgene wurden sequenziert und durch Vergleiche mit Sequenzen in der GenBank bestätigt.

Das Gen der Gelatinase (*gelE*) wurde in allen drei Enterokokkenspezies in insgesamt 15 Isolaten nachgewiesen. Das Gen der Aggregation Substance (*asa1*) wurde in 12 Isolaten der Spezies *E. faecalis* und *E. faecium* und das *esp* Gen nur in einem *E. faecium* Isolat nachgewiesen. Drei *E. faecalis* Isolate und ein *E. faecium* Isolat wiesen das komplette Cytolysin-Operon (Fig. 1 A + B) und alle fünf *cyl*-Gene in der Einzelgen-PCR auf. Bei fünf Isolaten (4 *E. faecalis*, 1 *E. faecium*) wurden nur einzelne Gene des Cytolysin-Operons nachgewiesen (Tab. 18A).

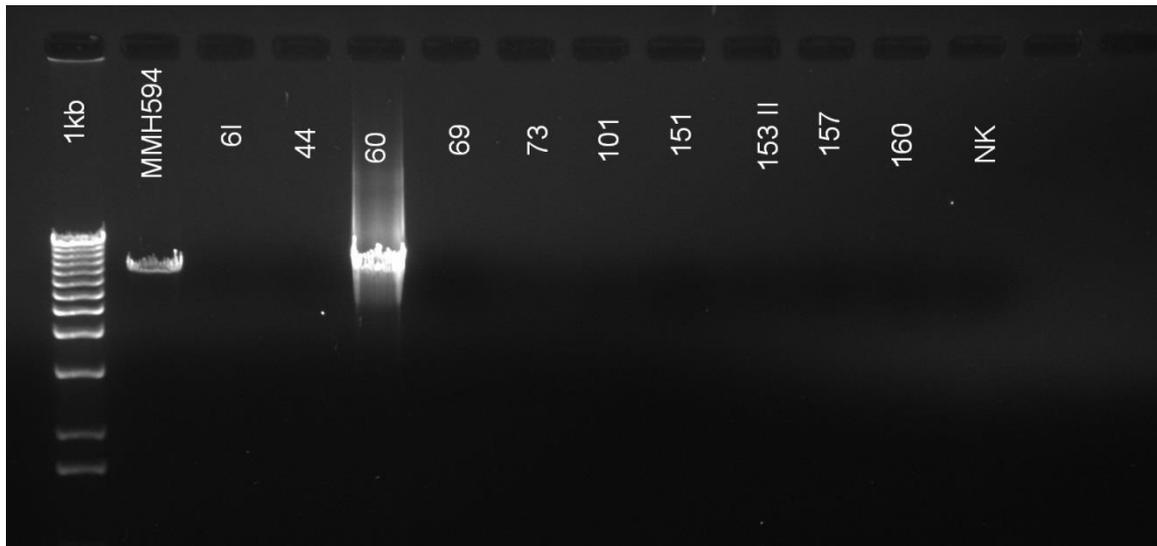
Die häufigste Kombination der Virulenzgene bei ***E. faecalis*** (n=7) war *asa1*, Cytolysin und *gelE*. Acht *E. faecalis* und vier *E. faecium* Isolate zeigten sowohl das *asa1* als auch das *gelE* Gen. Bei sechs *E. faecium* und zwei *E. gallinarum* Isolaten wurden keine Virulenzgene nachgewiesen (Tab. 18A).

Fig. 1 A: Nachweis des Cytolysin-Operons mittels PCR und Gelelektrophorese der *E. faecalis* Isolate



Referenzstamm MMH594 *E. faecalis*, *E. faecalis* Isolate Nr. 2, 162 und 165 positiv

Fig. 1 B: Nachweis des Cytolysin-Operons mittels PCR und Gelelektrophorese der *E. faecium* Isolate



Referenzstamm MMH594 *E. faecalis*, *E. faecium* Isolat Nr. 60 positiv

Das Hyaluronidase-Gen *hylEfm* wurde bei fünf von acht *E. gallinarum* Isolaten nachgewiesen. Ein weiteres *E. gallinarum* Isolat trug das *gelE* Gen, während *asa1* sowie Gene des Cytolysin-Operons bei dieser Enterokokkenspezies nicht vorkamen (Tab. 18A).

Tab. 18 A: Ergebnisse zum PCR-Nachweis der Virulenzgene für 28 Enterokokkenisolate

Enterokokken-spezies	Virulenzgene									Cytolysin-Operon	Anzahl [n]
	<i>asa1</i>	<i>cyIA</i>	<i>cyIB</i>	<i>cyIL_L</i>	<i>cyIL_S</i>	<i>cyIM</i>	<i>esp</i>	<i>gelE</i>	<i>hylEfm</i>		
<i>E. faecalis</i> (n=10)	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	3
	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	2
	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2
	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1
	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1
<i>E. faecium</i> (n=10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6
	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2
	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1
<i>E. gallinarum</i> (n=8)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	5
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1

Der Kontrollstamm K923/96-1 (*E. faecalis*) wies alle Virulenzgene außer das *hyl* und das *esp* Gen auf. Bei dem Kontrollstamm K808/97 (*E. faecium*) und dem Referenzstamm ATCC 49573 (*E. gallinarum*) wurden keine Virulenzgene nachgewiesen.

Tab. 18 B: Ergebnisse zum PCR-Nachweis der Virulenzgene für die Kontroll- und Referenzstämmen

Referenz-/ Kontrollstamm	Virulenzgene									Cytolysin- Operon
	<i>asa1</i>	<i>cyIA</i>	<i>cyIB</i>	<i>cyiL_L</i>	<i>cyiL_S</i>	<i>cyiM</i>	<i>esp</i>	<i>gelE</i>	<i>hylEfm</i>	
K923/96-1 (<i>E. faecalis</i>)	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1
K808/97 (<i>E. faecium</i>)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ATCC 49573 (<i>E. gallinarum</i>)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

4.3.2 Ergebnisse der phänotypischen Ausprägung der Virulenzfaktoren

Die Ergebnisse der Tests zur phänotypischen Ausprägung der Virulenzfaktoren **Cytolysin**, **Gelatinase** und **Hyaluronidase** sind in den Tabellen 20 A u B zusammengefasst.

Die Bestimmung der **Hämolyse-Aktivität** erfolgte unter aeroben und anaeroben Bedingungen auf 5%igem Pferdeblutagar. Die Ergebnisse der beiden Kultivierungsmethoden stimmten für alle Enterokokkenisolate überein. Sechs *E. gallinarum* Isolate und der Referenzstamm ATCC 49573 (*E. gallinarum*) zeigten eine vollständige beta-Hämolyse. Die **Gelatinase-Aktivität** war auf den Nährgelatineplatten schon nach einer Inkubation von 24 Stunden sichtbar, bei den Nährgelatineröhrchen variierte die nötige Inkubationsdauer zwischen 24 Stunden und mehr als zwei Wochen. Eine positive Gelatinase-Reaktion zeigten alle *E. faecalis* Isolate, inklusive dem Kontrollstamm K923/96-1 (*E. faecalis*), während kein Isolat der Enterokokkenspezies *E. faecium* oder *E. gallinarum* Gelatine hydrolysieren konnte. **Hyaluronidase-Aktivität** wurde bei sieben von acht *E. gallinarum* Isolaten und dem Referenzstamm ATCC 49573 (*E. gallinarum*) festgestellt (Tab. 19 A+B).

Tab. 19 A: Phänotypische Ausprägung der Virulenzfaktoren Cytolysin, Gelatinase und Hyaluronidase für 28 Enterokokkenisolate

Enterokokkenspezies	Cytolysin [n]		Gelatinase [n]		Hyaluronidase [n]
	aerob	anaerob	Platten	Röhrchen	
<i>E. faecalis</i> (n=10)	-	-	10	10	-
<i>E. faecium</i> (n=10)	-	-	-	-	-
<i>E. gallinarum</i> (n=10)	6	6	-	-	7
Gesamt	6	6	10	10	7

Tab. 19 B: Phänotypische Ausprägung der Virulenzfaktoren Cytolysin, Gelatinase und Hyaluronidase für die Kontroll- und Referenzstämmen

Referenz-/Kontrollstamm	Cytolysin [n]		Gelatinase [n]		Hyaluronidase [n]
	aerob	anaerob	Platten	Röhrchen	
K923/96-1 (<i>E. faecalis</i>)	-	-	+	+	-
K808/97 (<i>E. faecium</i>)	-	-	-	-	-
ATCC 49573 (<i>E. gallinarum</i>)	+	+	-	-	+

4.4 Ergebnisse des Embryoletalitätstests

4.4.1 Herstellung des Inokulums

In Vorversuchen wurde der Zusammenhang zwischen der optischen Dichte und der Keimzahl anhand von Wachstumskurven der Kontrollstämme K923/96-1 (*E. faecalis*), K808/97 (*E. faecium*) und des Referenzstammes ATCC 49573 (*E. gallinarum*) ermittelt. Exemplarisch ist hier die Wachstumskurve für den Kontrollstamm K923/96-1 (*E. faecalis*) dargestellt (Tab. 20, Fig. 2).

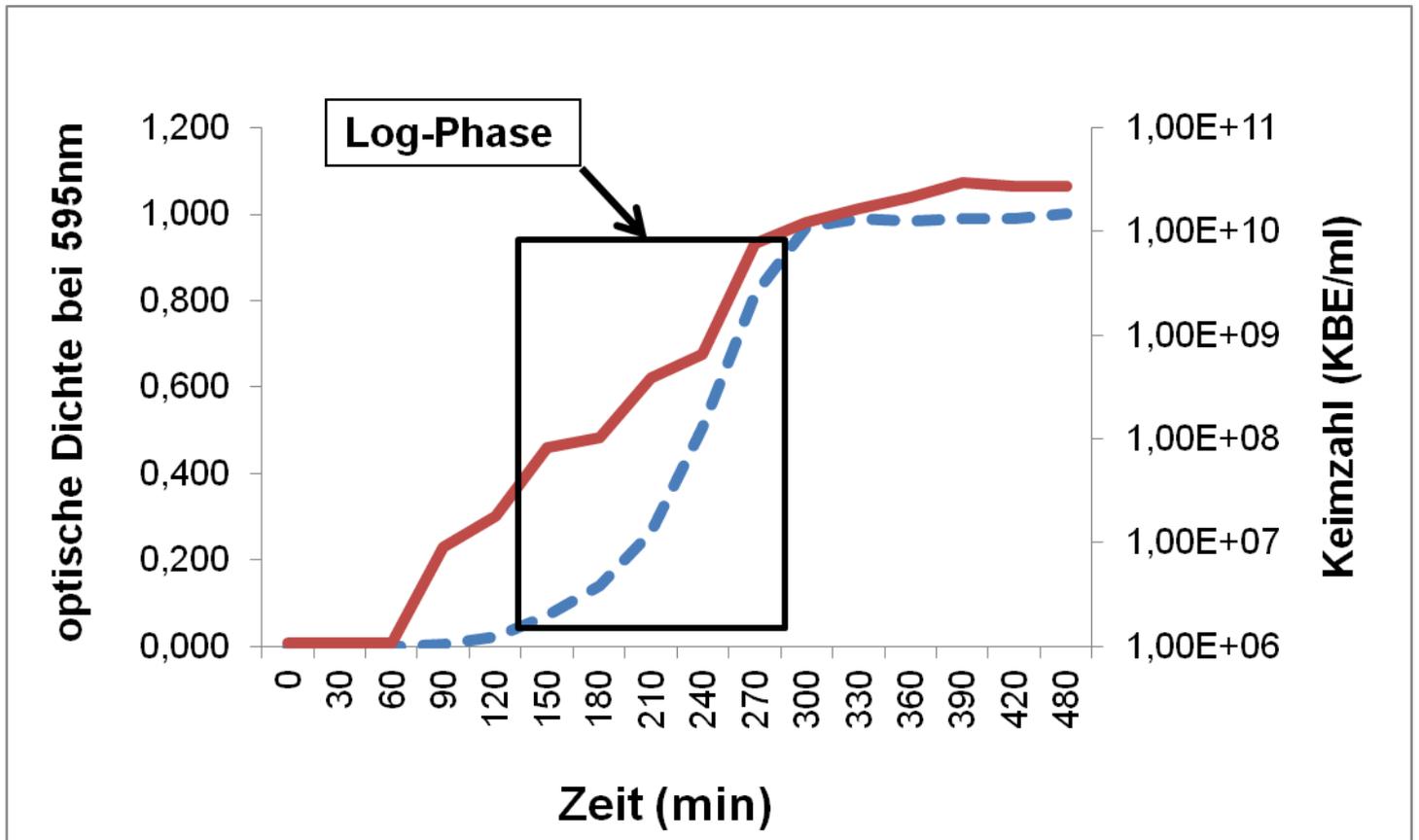
Aus der Keimzahlbestimmung (Tab. 20) ergab sich, dass der *E. faecalis* Kontrollstamm bereits bei einer optische Dichte von $< 0,1$ von der stationären Wachstumsphase in die exponentielle Phase (Log-Phase) überging und die Keimzahlen und OD-Werte exponentiell anstiegen. Nach etwa 330 Minuten wurde die stationäre Phase erreicht und nach etwa 480 Minuten begann die Absterbephase.

Die Log-Phase ist gekennzeichnet durch eine gleichbleibende Generationszeit der Enterokokken. In diesem Zeitraum ist die standardisierte Entnahme eines Inokulums möglich, dessen Keimzahlen nur geringfügigen Schwankungen unterliegen. In der Log-Phase von *E. faecalis* K923/96-1 wurden OD-Werte zwischen 0,072 und 0,971 und Keimzahlen zwischen $8,2 \times 10^7$ und $1,2 \times 10^{10}$ KBE/ml ermittelt. OD-Werte zwischen 0,2 und 0,6 zeigten wiederholt gute Korrelationen mit den ermittelten Keimzahlen und wurden daher als Ausgangswert für die Verdünnung des Inokulums genutzt.

Tab. 20: Ergebnisse der Wachstumskurve exemplarisch für K923/96-1 (*E. faecalis*)

Zeit (min)	Optische Dichte (595nm)	Keimzahl (KBE/ml)
0	0,000	1,07E+06
30	0,000	1,07E+06
60	0,000	1,07E+06
90	0,006	9,10E+06
120	0,024	1,80E+07
150	0,072	8,20E+07
180	0,140	1,04E+08
210	0,265	3,90E+08
240	0,506	6,60E+08
270	0,814	7,70E+09
300	0,971	1,24E+10
330	0,989	1,68E+10
360	0,983	2,15E+10
390	0,991	2,98E+10
420	0,991	2,74E+10
480	1,001	2,72E+10

Fig. 2: Graphische Darstellung der Wachstumskurve exemplarisch für K923/96-1 (*E. faecalis*)



Gestrichelte Linie: optische Dichte bei 595nm
Durchgehende Linie: Keimzahl (KBE/ml)

Der *E. gallinarum* ATCC 49573 Referenzstamm zeigte in zwei Wiederholungen der Wachstumskurve eine sehr kurze Log-Phase mit OD-Werten, die unabhängig von den ermittelten Keimzahlen stark schwankten. Da dies die Einstellung des Inokulums für die *E. gallinarum* Isolate erschwerte, wurden alle acht *E. gallinarum* Isolate wiederholt nach einem anderen standardisierten Versuchsprotokoll getestet und die ermittelten optischen Dichten mit den ausgezählten Keimzahlen verglichen. Ein Zusammenhang zwischen der optischen Dichte und der Keimzahl der *E. gallinarum* Isolate konnte nicht hergestellt werden, aber es zeigte sich, dass die Keimzahlen der Isolate untereinander nach einer Inkubationszeit von exakt drei Stunden den geringsten Schwankungen unterlagen (Tab. 21). Daher wurde der Entnahmezeitpunkt zur Herstellung des Inokulums für die *E. gallinarum* Isolate auf drei Stunden festgesetzt.

Tab. 21: Inkubationsversuche der *Enterococcus gallinarum* Isolaten

vergangene Zeit		2 Std 45 min A		2 Std 45min B		3 Std A		3 Std B		3 Std 15		16 Std	
Isolat	Spezies	OD	KZ	OD	KZ	OD	KZ	OD	KZ	OD	KZ	OD	KZ
58	<i>E. gallinarum</i>	0,3	3,30E+09	0,21	4,00E+08	0,32	7,80E+08	0,32	2,99E+08	n.u.	n.u.	0,54	4,30E+09
77	<i>E. gallinarum</i>	0,22	1,80E+09	0,25	2,00E+08	0,35	4,70E+08	0,34	6,13E+08	0,46	8,96E+08	0,52	5,57E+10
79	<i>E. gallinarum</i>	0,2	3,50E+09	0,18	3,00E+08	0,290	5,70E+08	0,3	5,15E+08	0,43	5,68E+08	0,37	6,00E+10
94	<i>E. gallinarum</i>	0,28	1,05E+10	0,29	4,00E+08	0,43	9,50E+08	0,43	9,51E+08	0,46	1,07E+09	0,45	6,00E+10
118	<i>E. gallinarum</i>	0,2	6,90E+08	0,23	2,60E+08	0,23	8,10E+08	0,33	5,97E+08	0,52	6,08E+08	0,53	1,23E+10
127	<i>E. gallinarum</i>	0,11	6,30E+09	0,11	1,30E+08	0,26	2,10E+08	0,18	2,16E+08	0,26	2,28E+08	0,48	1,30E+09
146	<i>E. gallinarum</i>	0,25	8,70E+08	0,2	5,00E+08	0,3	6,00E+08	0,34	8,80E+08	0,48	2,52E+08	0,54	6,00E+10
156	<i>E. gallinarum</i>	0,22	5,70E+08	0,21	1,40E+08	0,27	4,20E+08	0,3	2,31E+08	n.u.	n.u.	0,52	4,40E+09
ATCC 49573	<i>E. gallinarum</i>	0,16	2,90E+08	n.u.	n.u.	0,210	3,60E+08	0,24	2,98E+08	0,41	9,16E+08	0,41	6,00E+10

OD, Optische Dichte; KZ, Keimzahl; n.u.; nicht untersucht

4.4.2 Ergebnisse des Embryoletalitätstests

Die makroskopische Untersuchung der abgestorbenen Embryonen zeigte petechiale bis ekchymotische Hämorrhagien und subkutane Ödeme als charakteristische Anzeichen einer Sepsis, während bei den getöteten Embryonen keine pathologisch-anatomischen Veränderungen beobachtet wurden.

Die Virulenzenteilung der Isolate erfolgte anhand des Überlebensindex und der Absterberate der Embryonen nach sieben Beobachtungstagen (Wooley et al., 2000). Die embryonale Absterberate beschreibt den Anteil der bis zum Versuchsende abgestorbenen Embryonen (Sturzenhecker, 1995). Zur Berechnung des Überlebensindex werden nach Abschluss der Versuche die überlebenden Embryonen eines Isolats zusammenaddiert. Im Gegensatz zur Absterberate berücksichtigt der Überlebensindex auch den Zeitpunkt des Absterbens; je früher die Embryonen absterben, desto niedriger der Wert des Überlebensindex. Der Maximalwert erreicht 140, wenn über einen Versuchszeitraum von sieben Tagen keine Embryonen sterben (Rudolph, 2004) (Tab. 22).

Tab. 22: Bewertung der Pathogenität

Virulenz	Überlebensindex	Absterberate nach 7 Tagen (%)
+++, hoch virulent	0 - 50	> 81
++, mäßig virulent	50 - 100	41 - 80
+, gering virulent	100 - 140	≤ 40

Es wurden insgesamt 28 *Enterococcus* Isolate von Puten (zehn *E. faecalis*, zehn *E. faecium*, acht *E. gallinarum*), zwei Kontrollstämme [K923/96-1 (*E. faecalis*), K808/97 (*E. faecium*)] und ein Referenzstamm (*E. gallinarum* ATCC 49573) auf ihre Virulenz im Brutei überprüft. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 24 aufgeführt.

Bei der Untersuchung der zehn *E. faecalis* Isolate lagen die Absterberaten innerhalb von sieben Tagen zwischen 10 und 95%. Daraus ergaben sich Überlebensindizes von 50 bis 127. Die Anzahl der KBE pro Brutei lag zwischen 428 und 856. Für die zehn *E. faecium* Isolate wurden Absterberaten von 0 bis 70% registriert. Der Überlebensindex variierte von 48 bis 140, und die Inokulumsdichte betrug 176 bis 476 KBE pro Brutei. Die acht *E. gallinarum* Isolate zeigten Absterberaten von 5 bis 30% mit Indexwerten von 122 bis 140. Pro Brutei wurden Keimzahlen von 224 bis 404 KBE nachgewiesen. Die Schwankungen der Keimzahlen des Inokulums lagen bei allen Enterokokkenisolaten im Toleranzbereich von 100 bis 1000 KBE / 0,2 ml.

Die Absterberaten der Kontrollstämme **K923/96-1 (*E. faecalis*)** und **K808/97 (*E. faecium*)** lagen in sechs Durchgängen zwischen 80 und 100% bzw. 10 und 53%. Der Überlebensindex von K923/96-1 variierte zwischen 15 und 52, und die Keimzahlen bewegten sich zwischen 376 und 1000 KBE pro Brutei. Bei K808/97 ergaben sich Überlebensindizes von 73 bis 130, und die Keimzahlen lagen zwischen 144 und 352 KBE pro Brutei.

Die Untersuchung des Kontrollstammes **ATCC 49573 (*E. gallinarum*)** ergab in sechs Durchgängen Absterberaten von 20 bis 60% und Indexwerte zwischen 72 und 124. Die Anzahl der KBE pro Brutei lag zwischen 136 und 544.

Bei den als Negativkontrollen mitgeführten Bruteiern wurden keine Absterberaten ermittelt, und bei stichprobenartigen bakteriologischen Untersuchungen wurden weder Enterokokken noch Fremdkeime nachgewiesen. Die stichprobenartigen bakteriologischen Untersuchungen

der abgestorbenen oder getöteten Embryonen aus inokulierten Bruteiern führten konstant zu einer Re-Isolierung der Enterokokken in Reinkultur.

Anhand des **Überlebensindex** wurden drei Isolate als hoch virulent eingestuft (zwei *E. faecalis*, ein *E. faecium*). Sieben Isolate (drei *E. faecalis*, vier *E. faecium*) stellten sich als mäßig virulent heraus, und der Großteil der Isolate (fünf *E. faecalis*, fünf *E. faecium*, acht *E. gallinarum*) wurde als gering virulent eingestuft.

Anhand der **Absterberate** wurde ein Isolat als hoch virulent eingestuft (*E. faecalis*). Acht Isolate (vier *E. faecalis*, vier *E. faecium*) waren mäßig virulent und 19 Isolate (fünf *E. faecalis*, sechs *E. faecium*, acht *E. gallinarum*) waren gering virulent (Tab. 23).

Für drei Isolate variierte die Virulenzenteilung zwischen Absterberate und Überlebensindex. Ein *E. faecium* Isolat wurde nach der Absterberate als gering virulent und gemäß Überlebensindex als mäßig virulent eingestuft. Zwei Isolate (*E. faecalis*, *E. faecium*), die gemäß der Absterberate mäßig virulent waren, wurden nach Überlebensindex als hoch virulent eingestuft. Bei den *E. gallinarum* Isolaten stimmten beide Virulenzbeurteilungen überein (Tab. 23).

Der Kontrollstamm K923/96-1 (*E. faecalis*) zeigte sich anhand der Absterberate in vier Durchgängen hoch virulent und in zwei Durchgängen mäßig virulent. Anhand des Überlebensindex war er in vier Durchgängen hoch virulent und in einem Durchgang mäßig virulent. Für einen Durchgang konnte der Überlebensindex nicht berechnet werden, weil eine verminderte Anzahl Eier verfügbar war (Tab. 24).

Der Kontrollstamm K808/97 (*E. faecium*) zeigte sich anhand der Absterberate in vier Durchgängen gering virulent und in zwei Durchgängen mäßig virulent. Anhand des Überlebensindex war er in drei Durchgängen gering virulent und in einem Durchgang mäßig virulent. Für zwei Durchgänge konnte der Überlebensindex nicht berechnet werden, weil eine verminderte Anzahl Eier verfügbar war (Tab. 24).

Der Referenzstamm *E. gallinarum* ATCC 49573 zeigte in sechs Durchgängen kein einheitliches Virulenzmuster. Anhand des Überlebensindex wurde er dreimal und anhand der Absterberate zweimal als mäßig virulent und sonst als gering virulent eingestuft (Tab. 24).

Tab. 23: Phäno- und genotypischer Nachweis spezifischer Virulenzfaktoren in Korrelation mit der Embryoletalität der ausgewählten Enterokokkenisolate

Isolat	Enterokokken- spezies	Inokulum (KBE)	Nachgewiesene Virulenzgene	Phänotyp ¹			Absolute Mortalität	Absterberate nach 7 Tagen (%)	Virulenz Absterberate ²	Überlebens- index	Virulenz Überlebensindex ²
				HÄM	GEL	HYL					
2	<i>E. faecalis</i>	456	<i>asa1, cylA, cylB, cylL_L, cylL_S, cylM, Cytolysin-Operon, gelE</i>	-	+	-	8/20	40	+	103	+
5	<i>E. faecalis</i>	436	<i>asa1, cylL_S, gelE</i>	-	+	-	13/20	65	++	74	++
30	<i>E. faecalis</i>	500	<i>asa1, cylA, cylL_L, cylL_S, cylM, gelE</i>	-	+	-	19/20	95	+++	39	+++
50	<i>E. faecalis</i>	852	<i>asa1, gelE</i>	-	+	-	7/20	35	+	111	+
68	<i>E. faecalis</i>	856	<i>gelE</i>	-	+	-	15/20	75	++	53	++
87	<i>E. faecalis</i>	428	<i>asa1, cylA, cylL_L, cylL_S, cylM, gelE</i>	-	+	-	2/20	10	+	127	+
137	<i>E. faecalis</i>	588	<i>gelE</i>	-	+	-	6/20	30	+	103	+
159	<i>E. faecalis</i>	484	<i>asa1, cylA, gelE</i>	-	+	-	7/20	35	+	108	+
162	<i>E. faecalis</i>	684	<i>asa1, cylA, cylB, cylL_L, cylL_S, cylM, Cytolysin-Operon, gelE</i>	-	+	-	16/20	80	++	50	+++
165	<i>E. faecalis</i>	772	<i>asa1, cylA, cylB, cylL_L, cylL_S, cylM, Cytolysin-Operon, gelE</i>	-	+	-	16/20	80	++	52	++
6 I	<i>E. faecium</i>	340	keine	-	-	-	2/20	10	+	127	+
44	<i>E. faecium</i>	304	keine	-	-	-	0/20	0	+	140	+
60	<i>E. faecium</i>	648	<i>asa1, cylA, cylB, cylL_L, cylL_S, cylM, Cytolysin-Operon, esp, gelE</i>	-	-	-	0/20	0	+	140	+
69	<i>E. faecium</i>	212	<i>asa1, gelE</i>	-	-	-	1/20	5	+	133	+
73	<i>E. faecium</i>	304	<i>asa1, gelE</i>	-	-	-	12/20	60	++	61	++
101	<i>E. faecium</i>	376	<i>asa1, cylA, cylL_S, gelE</i>	-	-	-	10/20	50	++	76	++
151	<i>E. faecium</i>	416	keine	-	-	-	9/20	45	++	82	++
153 II	<i>E. faecium</i>	332	keine	-	-	-	14/20	70	++	48	+++
157 II	<i>E. faecium</i>	476	keine	-	-	-	6/20	30	+	103	+
160	<i>E. faecium</i>	176	keine	-	-	-	7/20	35	+	95	++
58	<i>E. gallinarum</i>	288	<i>hyl_{Efm}</i>	+	-	+	0/20	0	+	140	+
77	<i>E. gallinarum</i>	352	keine	+	-	+	2/20	10	+	135	+
79	<i>E. gallinarum</i>	304	<i>gelE</i>	-	-	+	4/20	20	+	122	+
94	<i>E. gallinarum</i>	288	keine	-	-	-	2/20	10	+	130	+
118	<i>E. gallinarum</i>	280	<i>hyl_{Efm}</i>	+	-	+	6/20	30	+	122	+
127	<i>E. gallinarum</i>	224	<i>hyl_{Efm}</i>	+	-	+	3/20	15	+	134	+
146	<i>E. gallinarum</i>	404	<i>hyl_{Efm}</i>	+	-	+	2/20	10	+	135	+
156	<i>E. gallinarum</i>	296	<i>hyl_{Efm}</i>	+	-	+	4/20	20	+	130	+

¹HÄM, Hämolyse-Aktivität; GEL, Gelatinase-Aktivität; HYL, Hyaluronidase-Aktivität; ² +++, hoch virulent; ++, mäßig virulent; + gering virulent (Tab. 23)

Tab. 24: Phäno- und genotypischer Nachweis spezifischer Virulenzfaktoren in Korrelation mit der Embryoletalität für die Kontrollstämme K923/96-1 (*E. faecalis*) und K808/97 (*E. faecium*) und den Referenzstamm ATCC 49573 (*E. gallinarum*)

Referenz-/Kontrollstamm	Enterokokken-spezies	Inokulum (KBE)	Nachgewiesene Virulenzgene	Phänotyp ¹			Absolute Mortalität	Absterberate nach 7 Tagen (%)	Virulenz Absterberate ²	Überlebensindex	Virulenz Überlebensindex ²
				HÄM	GEL	HYL					
K923/96-1	<i>E. faecalis</i>	760	<i>asa1, cyIA, cyIB, cyLL, cyLLs, cyIM, Cytolysin-Operon, gelE</i>	-	+	-	20/20	100	+++	15	+++
		660					19/20	95	+++	35	+++
		376					18/20	90	+++	45	+++
		1000					18/20	90	+++	40	+++
		384					16/20	80	++	52	++
		548					8/10	80	++	n.b. ³	n.b. ³
K808/97	<i>E. faecium</i>	352	keine	-	-	-	10/20	50	++	73	++
		224					6/20	30	+	104	+
		144					4/20	20	+	120	+
		152					2/20	10	+	130	+
		248					8/15	53	++	n.b. ³	n.b. ³
		168					1/10	10	+	n.b. ³	n.b. ³
ATCC 49573	<i>E. gallinarum</i>	544	keine	+	-	+	12/20	60	++	72	++
		324					11/20	55	++	77	++
		256					7/20	35	+	99	++
		136					6/20	30	+	117	+
		216					4/20	20	+	124	+
		232					3/20	15	+	125	+

¹Abweichende absolute Anzahl der verfügbaren embryonierten SPF-Eier ermöglichte nicht immer die Virulenzeinteilung gemäß dem Überlebensindex.

² +++, hoch virulent; ++, mäßig virulent; + gering virulent (Tab. 3)

³ n.b., nicht bestimmt

5 Diskussion

Teil 1 – Keimisolation und –charakterisierung

Die 163 Enterokokkenisolate der vorliegenden Dissertation wurden in der Routinediagnostik der Geflügelveterinärpraxis Dr. Pöppel in Delbrück aus verschiedenen Organen von Broilern, Legehennen und Puten isoliert und an das Institut für Geflügelkrankheiten der Freien Universität Berlin zur Charakterisierung übersandt. Die untersuchten Tiere stammten aus deutschen Geflügelbetrieben aus Nordrhein-Westfalen und Niedersachsen.

Die anschließende Genus- und Speziesbestimmung der Isolate erfolgte mit der Multiplex-PCR und der partialen 16S rDNA-Genanalyse.

Die Mehrzahl der Isolate gehörte der Enterokokkenspezies *E. faecalis* an (insgesamt 78%, n=127). Andere Enterokokkenspezies waren nur in geringer Anzahl mit fünf bis 18 Isolaten vertreten.

Die Spezieszugehörigkeit und Bedeutung von Enterokokken, die aus Probenmaterial klinisch kranker Broiler, Legehennen oder Puten isoliert wurden, ist in der Literatur kaum beschrieben. Hingegen gibt es zahlreiche Studien zum Vorkommen von Enterokokkenspezies in Geflügelbeständen und der Darmflora gesunder Tiere, die häufig Untersuchungen zur antimikrobiellen Empfindlichkeit beinhalten. Diese Studien zeigen, dass *E. faecalis*, mit Abstand zu *E. faecium*, die häufigste nachgewiesene Enterokokkenspezies bei Legehennen (Ministry of Agriculture, 2013; Schwaiger et al., 2010) und Broilern (Kojima et al., 2010; Obeng et al., 2013; Poeta et al., 2006a) ist.

Zur Abschätzung der Prävalenz verschiedener Enterokokkenspezies bei Puten liegen nur wenige vergleichbare Publikationen vor. In den USA untersuchten Welton et al. (1998) Kloakentupfer von Puten zwischen dem 24. Lebenstag und dem Tag der Schlachtung. Zu jedem der sechs Beprobungszeitpunkte wurden aus den Proben etwa doppelt so viele *E. faecalis* wie *E. faecium* Isolate nachgewiesen (Welton et al., 1998). Ähnliche Verhältnisse wurden auch bei Untersuchungen des Darminhaltes von Puten und Broilern in Kanada ermittelt (Tremblay et al., 2011).

Die Enterokokkenisolate der vorliegenden Untersuchung stammten von klinisch erkrankten Tieren und wurden aus makroskopisch veränderten Geweben oder inneren Organen in Rein- oder Mischkultur isoliert. Das Verhältnis der identifizierten Enterokokkenspezies untereinander lässt daher vermuten, dass *E. faecalis* häufiger als andere Vertreter der Enterokokken als Krankheitserreger in Erscheinung tritt. Diese Annahme wird durch die Vielzahl verschiedener Krankheitsbilder bestätigt, die für *E. faecalis* beschrieben worden sind (Landman, 1999; Olsen et al., 2012; Tankson et al., 2001). *Enterococcus faecium* hingegen wurde bisher nur im Zusammenhang mit einer erhöhten Kükensterblichkeit bei weißen Pekingenten erwähnt (Sandhu, 1988). Im Allgemeinen treten Enterokokken nicht als primäre Krankheitserreger, sondern als Opportunisten in Erscheinung. In der Humanmedizin besitzen sie aber eine besondere Bedeutung als Erreger nosokomialer Infektionen, die ebenfalls häufiger von *E. faecalis* als von *E. faecium* hervorgerufen werden (Anonymus, 2011b; Murray, 1990).

Dreizehn der 163 Enterokokkenisolate gehörten der Spezies *E. gallinarum* an. Acht dieser Isolate stammten von Puten (n=60) und fünf von Broilern (n=67). Die geringe Isolationsrate von *E. gallinarum* beim Wirtschaftsgeflügel entspricht den Ergebnissen anderer Studien, die

diese Enterokokkenspezies in geringer Anzahl (< 7%) in Isolaten aus Broilern, Puten oder deren Umgebung nachgewiesen haben (Obeng et al., 2013; Oliveira et al., 2010; Simjee et al., 2007; Welton et al., 1998). In Portugal wurden 16 Enterokokkenisolate aus dem Darminhalt von Broilern isoliert und ein *E. gallinarum* Isolat bestätigt (Oliveira et al., 2010). Welton et al. (1998) untersuchten Enterokokken (n=352) aus Kloakentupfern von Puten und identifizierten 22 *E. gallinarum* Isolate. In der Darmflora von Legehennen oder Elterntieren wurde *E. gallinarum* nur sehr selten (Obeng et al., 2013) oder gar nicht nachgewiesen (Devriese et al., 1991), was auf Unterschiede in der Fütterung oder der Haltung innerhalb der Nutzungsrichtungen zurückzuführen sein könnte.

Fünf Enterokokkenisolate wurden als *E. hirae* identifiziert, ein Isolat stammte von einem Broiler (n=67) und vier von Legehennen (n=36). Berichte über das Vorkommen von *E. hirae* bei Broilern sind in der Literatur nicht einheitlich. Von 90 Enterokokkenisolaten aus der Einstreu von Broilern in den USA wurde fast die Hälfte (n=41) als *E. hirae* identifiziert (Simjee et al., 2007), während Hayes et al. (2004) in der Einstreu anderer Bestände aus 331 Isolaten nur 13 *E. hirae* bestätigten. Diarra et al. (2010) identifizierten neun *E. hirae* Isolate aus 69 Kotproben von Broilern in Kanada. Hingegen wurde im Kot von Broilern aus China in einer großen Anzahl von Enterokokkenisolaten (n=335) diese Spezies nicht nachgewiesen (Liu et al., 2013). Bei Legehennen wurde *E. hirae* bisher nur in einer Publikation und in vier von 52 Enterokokkenisolaten bestätigt (Obeng et al., 2013).

Der Nachweis von *E. hirae* im Probenmaterial von gesunden oder klinisch erkrankten Puten ist nicht beschrieben. Übereinstimmend wurde *E. hirae* aus Hühnerfleisch (2%), aber nicht aus Putenfleisch isoliert (Aslam et al., 2012). Eine mögliche Erklärung könnte die unterschiedliche Zusammensetzung der bakteriellen Darmflora von Hühnern und Puten sein, falls diese *E. hirae* in ihrem Wachstum beeinflussen. Untersuchungen zur Darmflora von Puten wiesen beispielsweise im Vergleich zu Studien bei Broilern fast 50% *Lactobacillales* und nur einen geringen Anteil (<5%) an Enterobakterien (*Salmonella*, *E. coli*) nach (Amit-Romach et al., 2004; Lu und Domingo, 2008).

Für die Identifizierung der jeweiligen Enterokokkenspezies mittels PCR-Untersuchungen wurde die DNA aus Bakterienreinkulturen per Hitzelyse extrahiert. Diese Methode wird bei der DNA-Extraktion Gram-negativer Bakterien erfolgreich angewendet (Mühldorfer et al., 2011). Interessanterweise erwies sich eine DNA-Hitzelyse als ausreichend für Isolate der Enterokokkenspezies *E. faecalis*, *E. faecium* und *E. gallinarum*, während für *E. hirae* abweichend ein kommerzielles Extraktionskit verwendet werden musste (siehe Material und Methoden 3.2.3). Diese Beobachtung könnte trotz der Zugehörigkeit von *E. hirae* zur *E. faecium* Gruppe (Klein, 2003) darauf hinweisen, dass sich einzelne Enterokokkenspezies in der Zusammensetzung ihrer Zellwand unterscheiden. Bereits Farrow und Collins (1985) grenzten anhand von Genomanalysen *E. hirae* deutlich von phänotypisch nah verwandten Enterokokkenspezies ab.

Teil 2 – Bestimmung des Resistenzverhaltens in vitro

Der Einsatz von antimikrobiellen Wirkstoffen ist zur Behandlung von bakteriellen Infektionskrankheiten unerlässlich, wenn andere Maßnahmen wie Biosicherheit, gute bäuerliche Praxis und prophylaktische Maßnahmen eine Infektion der Tiere nicht verhindern konnten. Durch die Anwendung von Antibiotika können die Gesundheit und das Wohlbefinden der Herde gesichert und die ökonomischen Verluste auf ein Minimum begrenzt werden (Hafez, 2014). Die Behandlung des Wirtschaftsgeflügels gegen Enterokokken kann

laut Thayer und Waltman (2013) mit Penicillin, Erythromycin, Novobiocin, Oxytetracyclin, Chlortetracyclin und Tetracyclin erfolgen. Im Jahr 2012 wurden in Deutschland 1619 t antimikrobiell wirksamer Substanzen an niedergelassene Tierärzte verkauft. 2013 verringerte sich die Abgabemenge auf 1452 t, während die Anteile an sogenannten Reserveantibiotika („critically important antibiotics“) wie Fluorchinolonen und Cephalosporinen der dritten und vierten Generation stiegen. Der größte Anteil an abgegebenen antimikrobiellen Substanzen entfiel in beiden Jahren auf die Wirkstoffklassen Penicilline und Tetracycline, gefolgt von Sulfonamiden, Makroliden und Polypeptiden (Hauck et al., 2014; Wallmann et al., 2014). Eine Zuordnung der Abgabemenge zu einer Tierart war in der allgemeinen Erfassung nicht möglich. Eine Studie in Wirtschaftsgeflügelbeständen aus Niedersachsen zeigte, dass 2011 Beta-Laktam-Antibiotika am häufigsten eingesetzt wurden (Anonymus, 2011a).

Bei der Empfindlichkeitsprüfung von Enterokokken gegen **Beta-Laktam-Antibiotika** ist zu beachten, dass alle Enterokokkenspezies intrinsisch resistent gegen Cephalosporine sind. Vertreter dieser Wirkstoffklasse werden nicht zur Therapie von Enterokokkeninfektionen eingesetzt, und das CLSI rät aufgrund fehlender klinischer Korrelationen von einer Empfindlichkeitsprüfung oder der Bewertung der MHK-Ergebnisse ab (CLSI, 2008). In der vorliegenden Dissertation sind die Ergebnisse aller Beta-Laktam-Antibiotika der Vollständigkeit halber aufgeführt.

Alle *E. faecalis* (n=122^A, 123^A), *E. gallinarum* (n=13) und *E. hirae* Isolate (n=5) reagierten sensibel auf Ampicillin und Amoxicillin-Clavulansäure. Von den *E. faecium* Isolaten (n=18) waren hingegen 28% resistent gegen Ampicillin und 17% resistent gegen Amoxicillin-Clavulansäure (Tab.14 – 17 B). Unterschiede im Resistenzverhalten der Enterokokkenspezies gegenüber Beta-Laktam-Antibiotika wurden auch in einer Studie von Ellerbroek et al. (2004) beschrieben. Die Autoren fanden 2001 in deutschen Wirtschaftsgeflügelbeständen ausschließlich Ampicillin-resistente *E. faecium* (n=7/31), während alle *E. faecalis* Isolate (n=36) empfindlich auf Ampicillin reagierten. Eine verminderte Empfindlichkeit für Penicillin wurde bei Enterokokkenisolaten von Broilern und Puten aus Europa (Aarestrup et al., 2000; Ellerbroek et al., 2004) und Nordamerika (Simjee et al., 2007; Tremblay et al., 2011) nachgewiesen. Zwei Drittel (n=14/22) der *E. faecium* Isolate aus Geflügelbeständen in Europa zeigten 2002 eine Penicillin-Resistenz (Ellerbroek et al., 2004). In den USA waren 71% der *E. faecium* Isolate (n=17/24) aus Broilereinstreu resistent gegen Penicillin und wiesen MHK-Werte von > 8µg/ml auf (Simjee et al., 2007). Höhere Resistenzraten gegen Beta-Laktam-Antibiotika können bei *E. faecium* auf eine verringerte Affinität ihrer Penicillin-bindenden Proteine (PBPs) zurückgeführt werden (Williamson et al., 1985). Die Überproduktion dieser PBPs ist für eine intrinsische Low-level Resistenz gegen Penicillin verantwortlich (Sifaoui et al., 2001).

Für *E. hirae* wurden keine Resistenz (0 %) und niedrige MHK₅₀- und MHK₉₀-Werte (1 µg/ml bzw. 4 µg/ml) für Penicillin festgestellt, die in der Literatur nicht bestätigt werden. In Kanada waren fünf von neun *E. hirae* Isolaten (56%) aus Broilerkot Penicillin-resistent (Diarra et al., 2010). Bei Enterokokken aus Broilereinstreu in den USA wurden 71% Penicillin-resistente der *E. hirae* Isolate (n=29/41) nachgewiesen (Simjee et al., 2007).

Die gute Wirksamkeit von Beta-Laktamen gegen *E. faecalis* wurde in mehreren europäischen Untersuchungen für Isolate aus Wirtschaftsgeflügelbeständen gezeigt (EFSA, 2010; Ellerbroek et al., 2004; Harisberger et al., 2011; Schwaiger et al., 2010) und konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Die hohe Beta-Laktam-Empfindlichkeit hat besondere Bedeutung für die Humanmedizin, da die meisten durch Enterokokken bedingten

klinischen Erkrankungen durch *E. faecalis* verursacht werden und Penicilline in Kombination mit Aminoglykosiden Mittel der Wahl zur Therapie sind (Peters et al., 2003).

Bei humanen Infektionen mit multiresistenten Enterokokken oder Patienten mit einer Penicillinallergie wird Gentamicin mit einem anderen zellwandaktiven **Glykopeptid-Antibiotikum**, z.B. Vancomycin oder Teicoplanin, kombiniert (Chen, 1986). Seit 1986 werden vermehrt Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) isoliert, was die Therapie von Infektionen beim Menschen zunehmend erschwert (Uttley et al., 1988).

In der vorliegenden Untersuchung wurden unter den 163 untersuchten Isolaten keine Vancomycin-resistenten Enterokokken gefunden. Die minimalen Hemmkonzentrationen für die *E. faecalis* und *E. faecium* Isolate lagen im unteren Bereich der Testkonzentrationen ($\leq 2 \mu\text{g/ml}$). Für die *E. faecium* Isolate war Vancomycin das einzige Antibiotikum mit 100%iger Wirksamkeit. Bei *E. gallinarum* lagen die ermittelten MHK_{50} - und MHK_{90} -Werte für Vancomycin im intermediär-resistenten Bereich ($8 \mu\text{g/ml}$). Die verminderte Wirksamkeit von Vancomycin ist bei dieser Enterokokkenspezies auf eine intrinsische Resistenz zurückzuführen, die chromosomal von *vanC*-Genen codiert (Leclercq et al., 1992) und nicht auf andere Bakterien übertragen wird (Patel et al., 1997).

Die Ergebnisse der Vancomycin-Testung entsprechen denen verschiedener Monitoring-Studien aus Europa, die *E. faecalis* und *E. faecium* Isolate hinsichtlich ihrer Resistenz untersuchten. Enterokokkenisolate ($n > 200$) von Broilern aus der Schweiz wiesen 0,4 – 0,7% VRE auf (Büttner, 2010; Harisberger et al., 2011). Bei einem ähnlichen Stichprobenumfang in Österreich ($n=187$), Dänemark ($n=231$), Frankreich ($n=275$), Schweden ($n=171$) und den Niederlanden ($n=359$) wurden 0 – 2% VRE isoliert (EFSA, 2010). In Legehennenbeständen in Süddeutschland (Bayern) wurden keine VRE gefunden (Schwaiger et al., 2010).

Das Auftreten Vancomycin-resistenter Enterokokken in den achtziger Jahren wurde in Europa mit dem Einsatz von Avoparcin als Wachstumsförderer in Futtermitteln erklärt (Bager et al., 1997). Die Verwendung von Avoparcin in subtherapeutischen Konzentrationen begünstigte eine Resistenzentstehung, unter anderem auch die Kreuzresistenz gegen Vancomycin (Butaye et al., 1999), das als Reserveantibiotikum dem Einsatz in der Humanmedizin vorbehalten ist. In Deutschland wurde die Anwendung bereits 1995 verboten, in der gesamten EU darf Avoparcin seit 1997 nicht mehr eingesetzt werden. Der deutliche Rückgang von Vancomycin-resistenten Isolaten scheint durch eine Verringerung des Selektionsdrucks nach dem Verbot von Avoparcin hervorgerufen worden zu sein (Aarestrup et al., 2001), ein Erfolg, der sich bereits nach wenigen Jahren in europäischen Studien zeigte (Bager et al., 1999; Klare et al., 1999; Pantosti et al., 1999; van den Bogaard et al., 2000). Zu einem anderen Ergebnis kamen Sting et al. (2013) in einer jüngeren Studie. Die Autoren wiesen in insgesamt 15 von 20 untersuchten Putenbeständen (75%) in Südwestdeutschland Vancomycin-resistente Enterokokken nach. Bei zehn positiven Herden wurden die VRE aus Kloakentupfern und Staubproben isoliert. In vier Herden wiesen nur die Umweltproben und in einer Herde nur die Staubproben Vancomycin-resistente Enterokokken auf (Sting et al., 2013). Die Persistenz von VRE in Putenbetrieben 14 Jahre nach dem Avoparcin-Verbot in Deutschland könnte durch einen höheren Einsatz antimikrobieller Wirkstoffe in der Putenmast und dem damit verbundenen Selektionsdruck auf die Darmflora hervorgerufen werden. Eine weitere Annahme ist, dass minimale Rückstände von Avoparcin in der Umwelt durch Reinigung und Desinfektion nicht beseitigt werden können und die Selektion der Vancomycin-Resistenz bei Enterokokken begünstigen (Gullberg et al., 2011).

Die MHK_{90} -Werte für die **Makrolid**-Antibiotika Tilmicosin und Spiramycin lagen bei den *E. faecalis*, *E. faecium* und *E. gallinarum* Isolaten im Bereich der höchsten Testkonzentrationen ($\geq 128 \mu\text{g/ml}$). Gegen Erythromycin und Tylosintartat waren mit 44% fast die Hälfte der *E. faecalis* Isolate ($n=54/124$ und $n=55/124$) und 61% bzw. 56% der *E. faecium* Isolate ($n=11/18$ und $n=10/18$) resistent. Die European Food Safety Authority (EFSA) untersuchte 2010 in sechs Ländern das Resistenzverhalten bestimmter Indikatorbakterien aus Broilerkot. Bei *E. faecalis* und *E. faecium* Isolaten aus den Niederlanden ($n=359$), Österreich ($n=187$) und Frankreich ($n=275$) wurden mit 51 – 82% ähnlich hohe Resistenzraten gegen Erythromycin nachgewiesen. Isolate aus Dänemark ($n=231$) und Schweden ($n=171$) wiesen hingegen Resistenzraten von maximal 31% auf (EFSA, 2010). Eine vergleichbare Erythromycin-Resistenz ($\leq 27,5\%$) zeigte sich auch bei Enterokokken ($n=291$) von Legehennen in der Schweiz (Harisberger et al., 2011). Der Resistenzmechanismus, der eine verminderte Wirksamkeit von Makroliden bedingt, kommt durch Modifizierungen an der 23S rRNA des Ribosoms zustande und betrifft sämtliche Vertreter der Wirkstoffklasse (Portillo et al., 2000). Die Vermutung, dass Unterschiede im Einsatz von Makrolid-Antibiotika in den verschiedenen Ländern eine höhere oder geringere Resistenzrate bedingen, kann mit der momentanen Datenlage nicht bestätigt oder widerlegt werden. Eine realistische Einschätzung könnte durch eine Aufschlüsselung des Antibiotikaeinsatzes in den Nutzungsrichtungen von Wirtschaftsgeflügelbeständen im europäischen Vergleich erreicht werden. Bisher erfolgt nur eine Unterscheidung zwischen Lebensmittel liefernden und nicht Lebensmittel liefernden Tieren (Büttner et al., 2010; ESVAC, 2010). Untersuchungen weisen darauf hin, dass Enterokokken schnell Resistenzen gegen Makrolid-Antibiotika erwerben können (Aarestrup et al., 1998). Das Bundesinstitut für Risikobewertung hält Resistenzen von Enterokokken gegen Makrolide, Glykopeptide und Streptogramin für besonders bedenklich, da sie vom Tier auf den Menschen übertragen und an andere humanpathogene Bakterien weitergegeben werden können (Anonymus, 2003). Der Einsatz dieser drei Wirkstoffklassen im Besonderen, aber auch der Einsatz anderer antimikrobieller Wirkstoffe, sollte daher abhängig vom Krankheitsbild gezielt und in geeigneter Dosierung nur nach einer Empfindlichkeitsprüfung erfolgen, um den allgemeinen Selektionsdruck zu verringern (Anonymus, 2003).

Alle Enterokokkenspezies der vorliegenden Dissertation wiesen hohe Resistenzraten für **Lincomycin** und **Tetrazyklin** auf. Alle *E. gallinarum* Isolate aus Broilern ($n=5$) waren resistent gegen Tetrazyklin, was auch für *E. gallinarum* Isolate aus der Einstreu von Broilern in den USA ($n=11$) und in Kanada ($n=2$) gezeigt wurde (Diarra et al., 2010; Simjee et al., 2007). Europäische Studien über das Resistenzverhalten dieser Enterokokkenspezies sind in der Literatur selten. *Enterococcus faecalis* Isolate aus Legehennen zeigten nach Lincomycin (97%) für Tetrazyklin die höchste Resistenzrate (86%) und einen MHK_{90} -Wert von $128 \mu\text{g/ml}$. Hohe Resistenzraten für Tetrazyklin wurden auch für 138 *E. faecalis* Isolate (56,5% Resistenz) von Legehennen in der Schweiz (Harisberger et al., 2011) und für 792 *E. faecalis* Isolate (68,6% Resistenz) von Legehennen in Belgien, Deutschland, Italien und der Schweiz ermittelt (van Hoorebeke et al., 2011). Der Resistenzmechanismus für eine verminderte Wirksamkeit von Tetrazyklin ist auf verschiedene erworbene *tet*-Gene zurückzuführen (De Leener et al., 2004). Die hohen Resistenzraten mit 72 – 100% für Lincomycin bei allen getesteten Enterokokkenspezies werden hingegen mit der Präsenz des *erm(B)*-Gens erklärt und stellen eine intrinsische Eigenschaft der Enterokokken dar. Das *erm(B)*-Gen codiert neben der Lincosamid-Resistenz auch für Resistenzen gegen Makrolide

und Streptogramin B (MLS_B-Resistenz) (Moellering, 1991) und wurde bereits bei Isolaten des Wirtschaftsgeflügels nachgewiesen (Graham et al., 2009; Jensen et al., 1999).

Die Resistenzraten für **Gentamicin** lagen bei der Enterokokkenspezies *E. faecalis* bei 35% (Legehennenisolate), 51% (Broilerisolate) und 73% (Putenisolate). Auch 72% (n=13/18) der *E. faecium* Isolate waren Gentamicin-resistent. Da Gentamicin in Deutschland für den Einsatz beim Wirtschaftsgeflügel nicht zugelassen ist, könnten hohe Resistenzraten ihren Ursprung in Kreuzresistenzen zu anderen, zugelassenen Aminoglykosiden haben, wie z.B. Spectinomycin und Neomycin. Aminoglykosid-Resistenzen werden jedoch durch „diverse Enzyme mit einem jeweils spezifischen Substratspektrum“ vermittelt, sodass selten echte Kreuzresistenzen bestehen (Werckenthin und Schwarz, 2003). Die hohen Resistenzraten lassen sich vermutlich auf die intrinsische Low-level-Resistenz der Enterokokken gegen Aminoglykoside zurückführen (CLSI, 2008). Aminoglykoside können in therapeutischer Dosierung die Zellmembran der Enterokokken nicht passieren (Zimmermann et al., 1971). Daher empfiehlt das CLSI, die Ergebnisse der Empfindlichkeitsprüfung von Aminoglykosiden nicht zu bewerten, wenn keine separate Bestimmung der High-Level-Resistenz ($\geq 500 \mu\text{g/ml}$ für Gentamicin, $\geq 1000 \mu\text{g/ml}$ für Streptomycin) durchgeführt wurde. Studien zur High-Level-Gentamicin-Resistenz bei Enterokokken aus Legehennen in Bayern (Schwaiger et al., 2010) und bei Isolaten aus Broilern in der Schweiz (Büttner et al., 2010) oder Dänemark (DANMAP, 2010) zeigten nur sehr geringe Resistenzraten (<1,8%). Die High-Level-Resistenz indiziert, dass die fraglichen Enterokokken nicht mit einer Kombination eines Aminoglykosids mit Penicillin oder einem Glykopeptid-Antibiotikum behandelt werden können (Torres et al., 1993). In der vorliegenden Dissertation wurde der Breakpoint für die Low-Level-Resistenz ($16 \mu\text{g/ml}$) zur Bewertung verwendet (CLSI, 2008). Er scheint zur Charakterisierung von Isolaten aus Geflügelbeständen in Deutschland aussagekräftiger, da in der Veterinärmedizin und besonders im Nutztierbereich nach Möglichkeit auf Kombinationspräparate verzichtet werden soll (Bundestierärztekammer, 2010).

Mehr als 50% der *E. faecium* Isolate (n=10/18) waren resistent gegen Ciprofloxacin und zeigten hohe MHK₉₀-Werte ($8 \mu\text{g/ml}$) für Enrofloxacin und Marbofloxacin. Das ist ein beunruhigendes Ergebnis, da **Fluorchinolone** sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin therapeutisch genutzt werden und als Reserveantibiotika für die Therapie beim Menschen gelten (Collignon et al., 2009). Der Einsatz von Ciprofloxacin ist der Humanmedizin vorbehalten, während Enrofloxacin und Marbofloxacin nur zur Therapie von Infektionen bei Tieren verwendet werden (Löscher, 2010). In Deutschland sind die Abgabemengen von Fluorchinolonen an Tierärzte zwischen 2011 und 2013 um fast 50% gestiegen (Wallmann et al., 2014). Resistenzen gegenüber Fluorchinolonen sind als bedenklich einzuschätzen, weil sie in unterschiedlicher Ausprägung auf alle Vertreter dieser Wirkstoffklasse zutreffen (Werckenthin und Schwarz, 2003). Daher empfiehlt das Bundesinstitut für Risikobewertung, den Einsatz von Fluorchinolonen auf Einzeltierbehandlungen und Erreger zu beschränken, die gegen andere Antibiotika resistent sind (Anonymus, 2003).

Bei *E. faecium* können hohe Resistenzraten gegen Fluorchinolone auf eine intrinsische Resistenz zurückzuführen sein. Die Resistenzraten der *E. faecium* Isolate lagen für Ciprofloxacin in mehreren Studien höher (50,3 – 54%) als die der *E. faecalis* Isolate (0 – 6,5%) (Harisberger et al., 2011; Simjee et al., 2007). Der Mechanismus, der dieser intrinsischen Resistenz zugrunde liegt, ist noch nicht vollständig erforscht (Arsene und Leclercq, 2007).

Obwohl in der EU seit 1994 der Einsatz von **Chloramphenicolen** bei lebensmittelliefernden Tieren nicht mehr erlaubt ist (EEC, 1999), zeigten die untersuchten *E. faecalis* und *E. faecium* Isolate aus deutschen Wirtschaftsgeflügelbeständen Resistenzraten von 8% (n=10/127) bzw. 6% (n=1/18). *Enterococcus faecalis* Isolate aus Puten waren sogar zu 13% (n=5/40) resistent gegen Chloramphenicol. Vergleichsweise hohe Resistenzraten von 38,9% bzw. 41,9% wurden 2001 auch in einer anderen Studie für *E. faecalis* (n=36) und *E. faecium* Isolate (n=31) aus Wirtschaftsgeflügelbeständen in Deutschland ermittelt (Ellerbroek et al. 2004). Erworbene Chloramphenicol-Resistenzen wurden für Enterokokken bereits früher beschrieben (George und Uttley, 1989). Darüber hinaus wurden in den letzten Jahren in Asien vermehrt Chloramphenicol-resistente Enterokokken isoliert (Han et al., 2011; Liu et al., 2013; Usui et al., 2014).

Alle *E. gallinarum* Isolate und die Mehrzahl der Isolate der anderen Enterokokkenspezies wiesen niedrige MHK₅₀- und MHK₉₀-Werte für **Sulfamethoxazol-Trimethoprim** auf, obwohl Enterokokken intrinsisch resistent gegen Antagonisten der Folsäuresynthese sind (Schwarz et al., 2013). Die hohe Empfindlichkeit gegenüber Sulfamethoxazol-Trimethoprim resultierte aus der Verwendung folatfreier Mueller-Hinton-Bouillon II für die Mikrodilution, weil den Enterokokken in diesem Testmedium keine exogene Folsäure zur Verfügung stand (Atlas, 2004). Wird die Empfindlichkeit von Enterokokken gegen Sulfonamide *in vitro* ermittelt, ist stets zu beachten, dass der Folatgehalt des Testmediums Einfluss auf die Ergebnisse der Empfindlichkeitsprüfung hat. Daher sind Vertreter dieser Wirkstoffklasse unabhängig vom Testergebnis nicht für die Behandlung von Enterokokkeninfektionen geeignet (Grayson et al., 1990), und das CLSI rät die Ergebnisse der Empfindlichkeitsprüfung von Sulfonamiden bei Enterokokken zu vernachlässigen (CLSI, 2008).

Enterococcus faecalis, *E. faecium* und *E. gallinarum* Isolate von Puten zeigten im Vergleich zu Isolaten von Broilern und Legehennen unter Berücksichtigung der klinischen Grenzwerte von 11 antimikrobiellen Substanzen die höchsten Resistenzraten. Die häufigsten ermittelten Resistenzphänotypen waren Gentamicin, Lincomycin, Tetracyclin, Erythromycin und Tylosintartat. Direkte Vergleiche des Resistenzverhaltens von Enterokokkenisolaten aus unterschiedlichen Wirtschaftsgeflügelarten fehlen bisher in der Literatur. In einer Studie aus den Niederlanden (Stobberingh et al., 1999) wurden für 46 *E. faecalis* Isolate aus Kotproben von Puten ähnliche Resistenzraten für Amoxicillin-Clavulansäure (0%), Chloramphenicol (9%), Erythromycin (37%) und Oxytetracyclin (96%) ermittelt wie in der vorliegenden Untersuchung.

Kojima et al. (2009) untersuchten Unterschiede im Resistenzverhalten von *Enterococcus* Isolaten aus Kotproben von Broilern und Legehennen in Japan. Vergleichbar mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnten die Autoren zeigen, dass die Resistenzrate gegen das Makrolid-Antibiotikum Erythromycin bei *E. faecalis* (58,9%, n=99/168) und *E. faecium* Isolaten (24,7%, n=44/178) von Broilern deutlich höher war als bei *E. faecalis* (36,7%, n=92/251) und *E. faecium* Isolaten (10,7%, n=17/159) von Legehennen. Der Unterschied im Resistenzverhalten von Enterokokken aus Broilern (n=143) und Legehennen (n=58) aus Freilandbetrieben in Australien war mit 59% (n=85) Erythromycin-resistenter *E. faecalis* Isolate von Broilern im Vergleich zu 3% (n=2) Erythromycin-resistenter *E. faecalis* Isolate von Legehennen noch deutlicher (Obeng et al., 2013).

Untersuchungen zu den Resistenzmustern von Enterokokken haben gezeigt, dass ein hoher Prozentsatz **multiresistenter** Isolate in Wirtschaftsgeflügelbeständen und ihrer unmittelbaren Umwelt zirkuliert (Hayes et al., 2004; Sapkota et al., 2011; Schwaiger et al., 2010). In Süddeutschland wurden aus Kloakentupfern von Legehennen abhängig von der Haltungsform 13,4% (n=22) bis 37,1% (n=61) multiresistente *E. faecalis* Isolate und 23% (n=6) bis 48,3% (n=14) multiresistente *E. faecium* Isolate nachgewiesen. Nur zwei *E. faecium* Isolate reagierten empfindlich gegenüber allen 25 getesteten antimikrobiellen Substanzen (Schwaiger et al., 2010). In der vorliegenden Untersuchung waren 61% der Enterokokkenisolate multiresistent. Den höchsten Anteil mit 72% (n=13/18) multiresistenter Isolate wies *E. faecium* auf, gefolgt von *E. faecalis* (61%, n=76/127). Die häufigsten Wirkstoffkombinationen waren Gentamicin, Tetrazyklin und Vertreter der Makrolide. Die höchste Anzahl verschiedener Multiresistenz-Phänotypen (n=12) zeigten die *E. faecalis* Isolate (n=127) mit Resistenzen gegen Wirkstoffe aus drei bis fünf verschiedenen antimikrobiellen Klassen. Hingegen konnte bei 12 von 18 *E. faecium* Isolaten eine Multiresistenz gegen Vertreter von vier bis sieben Wirkstoffklassen festgestellt werden. Unter den Masttieren waren 55% der Enterokokken von Broilern (n=37/67) und 80% der Putenisolate (n=48/60) resistent gegen drei oder mehr antimikrobielle Klassen. Die Mastperiode von Puten ist mit 16 bis 20 Wochen wesentlich länger als die von Broilern und kann das Risiko einer bakteriellen Infektion mit nachfolgender Behandlung erhöhen. Eine Untersuchung des Niedersächsischen Ministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz zeigte, dass pro Mastperiode Wirkstoffe aus bis zu zehn verschiedenen Antibiotikaklassen zur Behandlung von Mastputen genutzt wurden (Anonymus, 2011a). Die Therapiehäufigkeit und der Einsatz von Vertretern verschiedener Wirkstoffklassen in einem Mastdurchgang kann die Entwicklung von Resistenzen fördern. Enterokokken sind als Bestandteil der physiologischen Darmflora des Geflügels gute Indikatorkeime, da sie einem permanenten Selektionsdruck bei antimikrobiellen Behandlungen in Tierbeständen unterliegen.

Teil 3 – Phäno- und genotypischer Nachweis spezifischer Virulenzfaktoren und Untersuchungen zur Embryoletalität ausgewählter Enterokokkenisolate

Korrelation von Phäno- und Genotyp spezifischer Virulenzfaktoren der Enterokokken

In der vorliegenden Dissertation wurden fünf vermeintliche Virulenzfaktoren (Aggregation Substance, Cytolysin, Enterococcal Surface Protein, Gelatinase, Hyaluronidase) untersucht, die in humanmedizinischen Tiermodellen mit der Pathogenität von Enterokokken assoziiert (Ike et al., 1987) oder bei veterinärmedizinischen Isolaten nachgewiesen wurden (Poeta et al., 2006a, 2006b).

Das Enzym **Gelatinase** katalysiert die Hydrolyse verschiedener Proteine der extrazellulären Matrix (Makinen et al., 1989). Aufgrund ihrer Beteiligung an der bakteriellen Besiedlung und bei der Schädigung des Wirtes, wird sie als Virulenzfaktor von Enterokokken diskutiert (Diarra et al., 2010; Thurlow et al., 2010). Bei *E. faecalis* Isolaten aus Kotproben von Broilern wurde das **gelE** Gen häufiger nachgewiesen als die Gene anderer Virulenzfaktoren (Diarra et al., 2010; Hwang et al., 2011; Poeta et al., 2006a). In der koreanischen Studie zeigten 20 (90,9%) der 22 *E. faecalis* Isolate Gelatinase-Aktivität (Hwang et al., 2011). In der vorliegenden Arbeit wurden die phänotypische Ausprägung der Gelatinase (n=10) und das

gelE Gen (n=10) am häufigsten bei *E. faecalis* Isolaten nachgewiesen. Bei allen *E. faecalis* Isolaten stimmten der Geno- und der Phänotyp überein. Im Gegensatz dazu berichteten Camargo et al. (2006) von einem humanen *E. faecium* Isolat, das Gelatinase-Aktivität zeigte, ohne das *gelE* Gen zu besitzen. Die Autoren vermuteten, dass die Gelatinase bei diesem Isolat von einem divergenten Gelatinasegen codiert wird, das die verwendeten Primer nicht erfassten. Ein weiterer Erklärungsansatz war, dass das Isolat durch eine andere Protease zur Gelatinespaltung befähigt wurde (Camargo et al., 2006).

Vier von zehn *E. faecium* Isolaten wiesen das *gelE* Gen auf, ohne eine Gelatinase-Aktivität zu zeigen. Channaiah et al. (2010) isolierten *E. faecium* aus lagerfähigen Lebensmitteln und fanden bei 12 Isolaten das *gelE* Gen, aber nur fünf Isolate zeigten eine positive Gelatinase-Reaktion. Eine mögliche Erklärung für die fehlende phänotypische Ausprägung trotz Gennachweis ist das Vorhandensein „stiller“ *gelE* Gene, die unter *in vivo* Bedingungen exprimiert werden können (Creti et al., 2004). Bestimmte Umwelteinflüsse wie Temperatur, Ionenkonzentration oder Osmolarität des Mediums können über die Herabregulation der Genexpression oder ein inaktives Genprodukt zum Auftreten von stillen Genen führen (Gross, 1993).

Neben dem *gelE* Gen konnte bei acht *E. faecalis* und vier *E. faecium* Isolaten das Gen der **Aggregation Substance** (*asa1*) nachgewiesen werden. Die Aggregation Substance ist ein Oberflächenprotein, welches zuerst für die Enterokokkenspezies *E. faecalis* beschrieben wurde und die Adhäsion und Internalisation der Enterokokken ermöglicht (Kreft et al., 1992; Wells et al., 2000). In einer Studie von Kasimoglu-Dogru et al. (2010) wurde das *asa1* Gen mit den Primern von Vankerckhoven et al. (2004) bei 17 *E. faecium* Isolaten aus Broilerkot nachgewiesen. Andere Autoren konnten das Gen der Aggregation Substance bei *E. faecalis*, jedoch nicht bei *E. faecium* Isolaten nachweisen (Diarra et al., 2010; Poeta et al., 2006; Seputiene et al., 2012). Letztere Autoren verwendeten Primer, die möglicherweise die Genvariante von *E. faecium* nicht erfassten, da sie auf der genetischen Grundlage von *E. faecalis* designiert wurden (Mundy et al., 2000).

Das *esp* Gen codiert für das **Enterococcal Surface Protein** (Shankar et al., 1999), welches in Anwesenheit von Glucose die Fähigkeit zur Biofilmbildung von *E. faecalis* verbessert (Tendolkar et al., 2004). Von 28 Enterokokkenisolaten wies nur ein *E. faecium* Isolat das *esp* Gen auf. Der einzige weitere Nachweis des *esp* Gens bei *E. faecium* erfolgte bei einem Isolat aus Wirtschaftsgeflügel in der Türkei (Kasimoglu-Dogru et al., 2010). Poeta et al. (2006b) konnten das *esp* Gen auch bei einem *E. faecalis* Isolat aus Kot von Broilerhaltungen in Portugal nachweisen. Studien in Wirtschaftsgeflügelbeständen der USA (Khan et al., 2005), Dänemark (Hammerum und Jensen, 2002) und Litauen (Seputiene et al., 2012) erbrachten hingegen keinen Nachweis des *esp* Gens bei *E. faecalis*, *E. faecium* und *E. gallinarum* Isolaten.

Das Bacteriocin **Cytolysin** besitzt zytotoxische und hämolytische Aktivität (Segarra et al., 1991) und gehört bei den Enterokokken zu den am besten untersuchten Virulenzfaktoren (Cox et al., 2005; Gaspar et al., 2009). Die Toxin-Aktivität wird bei Enterokokken durch ein Zusammenwirken von acht verschiedenen Genen (*cyIR1*, *cyIR2*, *cyIL_L*, *cyIL_S*, *cyIM*, *cyIB*, *cyIA*, *cyII*) codiert, die das Cytolysin-Operon bilden (Shankar et al., 2002). In der vorliegenden Untersuchung wurden 28 ausgewählte Enterokokkenisolate auf das Vorhandensein der Einzelgene *cyIL_L*, *cyIL_S*, *cyIM*, *cyIB*, *cyIA*, des Cytolysin-Operons und einer beta-Hämolyse-Aktivität untersucht. Als PCR-Positivkontrolle wurde DNA von

E. faecalis MMH594 genutzt, ein Kontrollstamm, der das komplette Cytolysin-Operon (GenBank, Acc. no. AY032999) korrelierend zu einer beta-Hämolyse-Aktivität aufweist (Laverde Gomez et al., 2011; Macovei und Zurek, 2006). In der vorliegenden Arbeit zeigte kein Isolat der Enterokokkenspezies *E. faecalis* (n=10) oder *E. faecium* (n=10) eine beta-Hämolyse auf 5%igem Pferdeblutagar. In den genetischen Analysen wurden Genäquivalente bei sieben *E. faecalis* und bei zwei *E. faecium* Isolaten identifiziert. Während drei *E. faecalis* und ein *E. faecium* Isolat das gesamte Cytolysin-Operon trugen, wurden bei zwei *E. faecalis* Isolaten nur vier Einzelgene des Cytolysin-Operons (*cyiL_L*, *cyiL*, *cyiM*, *cyiA*) und jeweils bei einem Isolat nur das *cyiL_S* bzw. das *cyiA* Gen bestätigt. Ein *E. faecium* Isolat besaß die Gene *cyiL_S* und *cyiA*. Eine fehlende Übereinstimmung von Phäno- und Genotyp bei der Cytolysin-Aktivität von Enterokokken wurde bereits in früheren Studien beobachtet (Poeta et al., 2006a, 2006b; Creti et al. 2004). Gaspar et al. (2009) schlussfolgerten, dass die erfolgreiche Testung und Korrelation der phäno- und genotypischen Ergebnisse durch das experimentelle Design negativ beeinflusst wird. Obwohl in der vorliegenden Arbeit die Cytolysin-Testung nach den von Gaspar et al. (2009) vorgeschlagenen Kriterien durchgeführt wurde, konnte keine Übereinstimmung im Geno- und Phänotyp erzielt werden.

Bei *E. gallinarum* Isolaten aus Wirtschaftsgeflügelbeständen wurden bisher keine der untersuchten Virulenzgene nachgewiesen (Champagne et al., 2011; Diarra et al., 2010; Khan et al., 2005). Die phänotypische Ausprägung der Virulenzfaktoren Gelatinase und Cytolysin wurde bei vier *E. gallinarum* Isolaten aus Wirtschaftsgeflügel in Nigeria untersucht. Alle vier Isolate verflüssigten Gelatine und zwei Isolate wiesen auch Hämolyse-Aktivität auf, aber es erfolgte kein genotypischer Nachweis der Virulenzfaktoren (David, 2013). Ein *E. gallinarum* Isolat von einem Bussard wies *cyiL_S*, *cyiB* und *cyiA* auf, während die phänotypische Ausprägung des Cytolysins nicht untersucht wurde (Radhouani et al., 2010). Die acht ausgewählten *E. gallinarum* Isolate der vorliegenden Untersuchung stammten von Puten und wurden auf eine mögliche Korrelation zwischen Genotyp und phänotypischer Ausprägung der Virulenzfaktoren untersucht. Die Isolate wiesen weder einzelne Gene noch das gesamte **Cytolysin**-Operon auf, zeigten aber mehrheitlich (n=6) eine **beta-Hämolyse** auf 5%igem Pferdeblutagar. Ähnliches beobachteten Channaiah et al. (2010), die bei keinem der 37 *E. gallinarum* Isolate aus lagerfähigen Lebensmitteln das *cyiA* Gen fanden, aber für 27 Isolate eine beta-Hämolyse verzeichneten. Die Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass bei der Enterokokkenspezies *E. gallinarum* eine andere genetische Grundlage für die Cytolysin-Aktivierung codiert und mit den verwendeten Primern nicht nachgewiesen werden kann.

Das Enzym **Hyaluronidase** katalysiert den Abbau von Hyaluronsäure und erleichtert den Bakterien die Kolonisation des Wirtsorganismus, indem die Viskosität der extrazellulären Matrix herabgesetzt wird (Hynes und Walton, 2000). Das *hyl_{Efm}* Gen wurde in der vorliegenden Untersuchung weder bei *E. faecalis* noch bei *E. faecium*, aber bei fünf der acht *E. gallinarum* Isolate nachgewiesen. Untersuchungen von Goncalves et al. (2010) fanden das *hyl_{Efm}* Gen bei *E. gallinarum* Isolaten aus Kotproben von kommerziell genutzten Straußen, nicht jedoch bei *E. durans* Isolaten aus demselben Probenmaterial. Nachweise dieses Gens bei *E. gallinarum* Isolaten aus Hühnern oder Puten fehlen. Eine Korrelation mit der phänotypischen Ausprägung des Virulenzfaktors Hyaluronidase konnte in der vorliegenden Dissertation bei fünf *E. gallinarum* Isolaten gezeigt werden, die alle das *hyl_{Efm}* Gen besaßen. Interessanterweise wurde eine **Hyaluronidase-Aktivität** bei zwei weiteren *E. gallinarum* Isolaten festgestellt, ohne dass sich der Genotyp bestätigte. Eine mögliche

Erklärung für die fehlende Phänotyp-Genotyp-Korrelation könnte eine Genmutation sein, die durch eine Änderung der Zielsequenz den Nachweis mit den verwendeten Primern nicht ermöglicht (Camargo et al., 2006).

Betrachtet man die Diskrepanz der Ergebnisse, wird deutlich, dass der alleinige Nachweis eines Virulenzgens keine Aussage über die tatsächlichen phänotypischen Eigenschaften des Erregers zulässt. Hingegen unterliegen Analysen zum Phänotyp des Erregers den *in vitro* Testbedingungen und Medien und können nicht zwingend mit den natürlichen Bedingungen im Wirtsorganismus verglichen werden. Auch im Hinblick auf das Vorliegen stiller Gene, die möglicherweise unter natürlichen Bedingungen aktiviert werden können, empfehlen sich kombinierte geno- und phänotypische Testungen (Cosentino et al., 2010). In weiterführenden Versuchen könnte die mRNA-Expression der vorliegenden Virulenzgene der Enterokokkenisolate untersucht werden, um weitere Aussagen über eine mögliche phänotypische Ausprägung zu treffen.

Bestimmung der Virulenz unterschiedlicher Enterokokkenspezies im Embryoletalitätstest

Der Embryoletalitätstest ist eine empfindliche Methode, um die Virulenz von Bakterien zu bestimmen, und hat bei verschiedenen Enterokokkenspezies bereits eine gute Anwendung zur Charakterisierung gefunden (Abdul-Aziz und el-Sukhon, 1994; Borst, 2014; Rudolph, 2004). Die Inokulation erfolgte in den oben aufgeführten Studien in die Allantoishöhle von zehn bis 12 Tage alten SPF-Hühnerembryonen. Diese **Infektionsroute** ermöglichte bei *E. coli*, im Gegensatz zur Inokulation in den Dottersack, eine deutliche Unterscheidung der Virulenzstufen (Wooley et al., 2000). Abhängig von der **Versuchsdauer** wurde der **Inokulationszeitpunkt** auf den zehnten (Borst, 2014; Rudolph, 2004) oder 12. (Abdul-Aziz und el-Sukhon, 1994) Bebrütungstag gelegt. In der vorliegenden Untersuchung wurde das Inokulum in zehn Tage alte Hühnerembryonen appliziert. So konnte die Absterberate sieben Tage beobachtet werden, ohne einen Schlupf der Küken vor Abschluss des Versuchs zu riskieren.

Die in der Literatur beschriebenen **Inokulationsdosen** schwankten pro Ei zwischen 100 KBE bei *E. cecorum* (Borst, 2014) und 6×10^5 KBE bei *E. hirae* Isolaten (Abdul-Aziz und el-Sukhon, 1994). Vergleichbar mit den Untersuchungen von Rudolph (2004) zu *E. faecalis* wurde in der vorliegenden Untersuchung die standardisierte Einstellung des Inokulums auf 500 KBE/Ei angestrebt, um eine gute Korrelation zwischen den Keimzahlen und der Absterberate der Embryonen in den infizierten Eiern zu gewährleisten. Der Toleranzbereich des Inokulums lag in der Untersuchung von Rudolph (2004) zwischen 180 – 760 KBE/Ei. Bei diesen Keimzahlen wurde kein erkennbarer Zusammenhang zwischen einer geringeren oder höheren Inokulumdichte und der Absterberate der Embryonen ermittelt. Im vorliegenden Versuchsansatz wurde der Toleranzbereich geringfügig auf 100 – 1000 KBE/Ei erweitert, weil das unterschiedliche Wachstumsverhalten der drei Enterokokkenspezies die standardisierte Einstellung der Bakteriensuspension erschwerte. Die erzielten Inokulumdichten der Isolate variierten zwischen 176 und 856 KBE/Ei, lediglich bei den Kontroll- und Referenzstämmen wurden in einzelnen Durchgängen geringe Abweichungen innerhalb des gesetzten Toleranzbereichs notiert. In früheren Untersuchungen zur Embryoletalität von *E. coli* (Nabbut und Khatib, 1978; Powell und Finkelstein, 1966), *Staph. aureus* (Polakowska et al., 2012) und *Vibrio cholerae* (Gardner et al., 1963) konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Inokulationsdosis keinen Effekt auf das Tötungspotential der Isolate hatte.

Die 28 untersuchten Enterokokkenisolate ließen sich anhand definierter Virulenz-Bewertungsmaßstäbe nach Überlebensindex (Rudolph, 2004) und Absterberate (Wooley et al., 2000) in drei Kategorien einteilen und konnten so mit den Ergebnissen anderer Studien verglichen werden. Unterschiede in der Virulenzeinteilung zwischen den beiden Bewertungssystemen wurde für drei Isolate erzielt, die anhand der Absterberate weniger virulent eingestuft wurden als nach dem Überlebensindex (Tab. 23). Der Überlebensindex erfasst neben der Absterberate auch die Dauer, bis die Isolate die Embryonen abgetötet haben, und ist deshalb ein sensibler Bewertungsmaßstab zur Bestimmung der Virulenz (Rudolph, 2004). Beispielsweise wurden die *E. faecalis* Isolate 162 und 165 gemäß der Absterberate (beide 80%) als mäßig virulent eingestuft, weil sie am Ende des Versuchs die gleiche Anzahl Embryonen abgetötet hatten (n=16). Nach dem Überlebensindex von 50 war das Isolat 162 hoch virulent, weil es bereits am zweiten Tag 11 der 16 Embryonen abgetötet hatte. Das Isolat 165 (Überlebensindex 52) erzielte ein vergleichbares Ergebnis erst am dritten Tag und wurde deshalb als mäßig virulent eingestuft (Tab. 23). Im Folgenden werden die Ergebnisse des Embryoletalitätstests anhand der Einteilung nach dem Überlebensindex diskutiert.

Zwei *E. faecalis* und ein *E. faecium* Isolat waren gemäß dem Überlebensindex hoch virulent und töteten innerhalb der ersten zwei Tage über die Hälfte (11 – 14) der 20 Embryonen ab. Auch Wooley et al. (2000) berichteten über hoch virulente *E. coli* Isolate (Mortalität > 29%), die bereits in den ersten beiden Tagen nach der Inokulation eine hohe Absterberate der Embryonen bewirkten. Mögliche Erklärungsansätze können hohe Wachstumsraten mit kürzerer Generationszeit und die Ausprägung verschiedener Virulenzfaktoren sein, die hoch virulenten Bakterienstämmen eine effiziente Besiedelung und Ausbreitung im Hühnerembryo ermöglichen, bevor eine adäquate Immunantwort erfolgen kann. Das spezifische Immunsystem des Hühnerembryos ist bis zum zehnten Lebenstag nicht vollständig entwickelt. Am 11. Bebrütungstag werden erstmals T-Zellen und ab dem 12. Bebrütungstag B-Zellen nachgewiesen (Janse und Jeurissen, 1991). Nach dem 15. Tag beginnen die B-Zellen auszdifferenzieren, und mit dem 18. Tag werden die Hühnerembryonen immunkompetent (Ribatti, 2008). Der Ausprägungsgrad der Virulenz der getesteten Isolate wird im Zusammenhang mit den nachgewiesenen Virulenzfaktoren diskutiert, um eine mögliche Korrelation aufzuzeigen.

Gemäß dem Überlebensindex waren alle acht *E. gallinarum* Isolate und jeweils die Hälfte der zehn *E. faecalis* und der zehn *E. faecium* Isolate gering virulent (n=18). Das Ergebnis erscheint überraschend, da die untersuchten Isolate von klinisch kranken Tieren stammten und gerade die Enterokokkenspezies *E. faecalis* als Krankheitserreger beim Geflügel in Erscheinung tritt (Gregersen et al., 2010). Andere Ergebnisse zeigten sich in der Studie von Rudolph (2004), wo *E. faecalis* Isolate aus braunen Legehennen mit amyloider Arthropathie mehrheitlich als hoch virulent (n=18) eingestuft wurden. *Enterococcus faecalis* ist als kausatives Agens an der Ausbildung der amyloiden Arthropathie bei Legehennen beteiligt (Landman, 1999), und die von Rudolph (2004) untersuchten Isolate wurden direkt aus Gelenktupfern klinisch erkrankter Tiere isoliert. Die Enterokokkenisolate der vorliegenden Arbeit wurden in einer Geflügelpraxis im Rahmen der Routinediagnostik unabhängig von der nachfolgenden Charakterisierung gesammelt. Es bleibt daher unklar, ob die in der Sektion festgestellten pathologisch-anatomischen Veränderungen durch eine Monoinfektion oder in Synergie mit anderen bakteriellen oder viralen Erregern zustande kamen. Die ermittelte Virulenz ist jedoch ausschließlich auf das Potential des jeweiligen Enterokokkenisolats

zurückzuführen, da eine Kontamination mit anderen bakteriellen Erregern durch eine Reinheitskontrolle des Inokulums ausgeschlossen werden konnte.

Die absoluten Absterberaten der drei hoch virulenten Enterokokkenisolate waren vergleichbar mit den Ergebnissen des Kontrollstamms *E. faecalis* K923/96-1, der in der Arbeit von Rudolph (2004) in sieben Durchgängen als hoch virulent identifiziert und für die Testung der Isolate zur Verfügung gestellt wurde. In zwei von sechs Durchgängen wurde der Kontrollstamm K923/96-1 nach den Bewertungskriterien als mäßig virulent eingestuft, die absoluten Absterberaten lagen jedoch am oberen Grenzwert von 80%.

Der als gering virulent definierte Kontrollstamm *E. faecium* K808/97 zeigte im Vergleich zu den Ergebnissen von Rudolph (2004) auch in zwei von sechs Durchgängen eine mäßige Virulenz mit einer Absterberate von 50 – 53% der Embryonen. In beiden Durchgängen war die Keimzahl des Inokulums mit 248 – 352 KBE geringfügig höher, ein Zusammenhang, der sich in der Arbeit von Rudolph (2004) mit Inokulumdichten von 190 – 620 KBE im Brutei nicht zeigte.

Für den Referenzstamm *E. gallinarum* ATCC 49573 konnte in sechs Wiederholungen die Virulenz nicht eindeutig bestimmt werden. Nach der Absterberate war der Referenzstamm in zwei Durchgängen mäßig virulent (55 – 60%) und in vier Durchgängen gering virulent (15 – 35%). Gemäß Überlebensindex wurde der Referenzstamm in drei Durchgängen als mäßig virulent (72 – 99) und in drei Durchgängen als gering virulent (117 – 125) beurteilt.

Interessanterweise konnte auch bei diesem Stamm eine mögliche Korrelation zwischen dem Ausprägungsgrad der Virulenz und der Keimzahl des Inokulums beobachtet werden, obwohl die Mehrheit der Autoren diesen Zusammenhang widerlegen (Gardner et al., 1963; Nabbut und Khatib, 1978; Polakowska et al., 2012; Powell und Finkelstein, 1966).

Abschließend lässt sich anmerken, dass die geringe Anzahl untersuchter Isolate möglicherweise die Interpretation der Ergebnisse des Embryoletalitätstests für die einzelnen Enterokokkenspezies begrenzt. Wiederholungsuntersuchungen können die Aussagekraft stärken, jedoch wie bei den Kontroll- und Referenzstämmen auch zu abweichenden Virulenzgraden führen. Abweichende Ergebnisse in mehreren Durchgängen des Embryoletalitätstest beschrieben auch Gibbs et al. (2003) für *E. coli* Isolate. Die Autoren regten an, dass Wiederholungsuntersuchungen nur gerechtfertigt sind, wenn der Erkenntnisgewinn den Kosten- und Arbeitsaufwand rechtfertigt. In der vorliegenden Untersuchung wurden in sieben Durchgängen die Enterokokkenisolate in einem standardisierten Vorgehen zusammen mit Negativkontrollen und definierten Kontrollstämmen getestet, um Wiederholungsuntersuchungen aus bioethischen Gründen nach Möglichkeit zu vermeiden.

Teil 4 – die großen Zusammenhänge

Mögliche Zusammenhänge zwischen antimikrobiellen Resistenzen und nachgewiesenen Virulenzfaktoren und der Bewertung der Virulenz von Enterokokken

Untersuchungen zur Pathogenität von *E. coli* Isolaten zeigten, dass der Embryoletalitätstest zur Unterscheidung verschiedener Virulenztypen geeignet ist (Wooley et al., 2000). Bei *E. coli*-Infektionsversuchen korrelierte die Mortalität der Hühnerembryonen mit dem Auftreten spezifischer Virulenzfaktoren (Oh et al., 2012). Auch bei verschiedenen

Enterokokkenspezies hat der Embryoletalitätstest die Einteilung in Virulenzkategorien ermöglicht (Abdul-Aziz und el-Sukhon, 1994; Borst, 2014; Rudolph, 2004). Virulenzfaktoren, die für Enterokokken im Zusammenhang mit erhöhter Virulenz beschrieben wurden, sind die Gelatinase, die Aggregation Substance, das Enterococcal Surface Protein und das Cytolysin (Jett et al., 1994). Ein weiterer potentieller Virulenzfaktor, der bisher unzureichend untersucht wurde, ist die Hyaluronidase (Mundy et al., 2000). Es wird erwähnt, dass Enterokokken mit einem erhöhten Virulenzpotential häufig auch eine geringere antimikrobielle Empfindlichkeit aufweisen (Mundy et al., 2000) und dass das gemeinsame Auftreten dieser Eigenschaften vermutlich ein ernstzunehmendes Risiko für die menschliche Gesundheit darstellt (Khan et al., 2005). Huycke et al. (1991) beobachteten zum Beispiel, dass das Risiko, innerhalb von drei Wochen zu versterben, bei Bakteriämie-Patienten fünffach höher ist, wenn das auslösende Agens ein Gentamicin-resistentes *E. faecalis* Isolat mit Hämolyse-Aktivität war.

In der vorliegenden Untersuchung wurden die Enterokokkenisolate mit Hilfe des Embryoletalitätstests in Virulenzkategorien eingeteilt und in Zusammenhang mit ihren Virulenzgenen oder Resistenzmustern gebracht. Sieben *E. gallinarum* Isolate zeigten Hyaluronidase-Aktivität, fünf davon besaßen das *hyl_{Efm}* Gen, und alle Isolate wurden als gering virulent beurteilt. Von zehn *E. faecalis* Isolaten, bei denen das *gelE* Gen und die Gelatinase-Aktivität nachgewiesen wurden, waren nur zwei Isolate hoch virulent. Verschiedene Autoren sprechen beiden Virulenzfaktoren einen Einfluss auf die Pathogenität von Enterokokken zu: Rice et al. (2003) wiesen das Hyaluronidasegen *hyl_{Efm}* in klinischen *E. faecium* Isolaten häufiger nach als bei Enterokokkenisolaten aus Stuhlproben gesunder Menschen. Eaton und Gasson (2001) beobachteten, dass klinische Enterokokkenisolate aus Human- und Veterinärmedizin häufiger das *gelE* Gen aufwiesen als kommensale Enterokokken aus Lebensmitteln.

Enterococcus gallinarum Isolate aus Broilereinstreu wurden auf die Virulenzgene *cylA* und *cylB*, ihre antimikrobiellen Resistenzen und Resistenzgene untersucht (Khan et al., 2005). Im direkten Vergleich mit einem klinischen humanen *E. gallinarum* Isolat zeigten die Isolate aus der Einstreu höhere Resistenzraten für verschiedene antimikrobielle Wirkstoffe, wiesen jedoch keinen der untersuchten Virulenzmarker auf. Die phänotypische Ausprägung der Virulenzfaktoren wurde nicht untersucht. Die Autoren äußerten die Vermutung, dass avirulente *E. gallinarum* Stämme mit hohem Resistenzpotential durch die Aufnahme der *cylA* und *cylB* Gene zu potentiellen Pathogenen werden könnten. In der vorliegenden Untersuchung waren die *E. gallinarum* Isolate intermediär-resistent gegen Vancomycin, und sechs von acht Isolaten zeigten eine vollständige Beta-Hämolyse ohne Nachweis des Cytolysin-Operons. Trotz phänotypischer Ausprägung des Virulenzfaktors Cytolysin wurden die Isolate im Embryoletalitätstest als gering virulent eingestuft.

Shankar et al. (1999) verglichen Enterokokkenisolate von humanen Bakteriämiepatienten mit Isolaten aus Stuhlproben gesunder Menschen und zeigten, dass nur die klinischen *E. faecalis* Isolate das *esp* Gen aufwiesen. Camargo et al. (2006) und Vankerckhoven et al. (2005) fanden das *esp* Gen, welches vermutlich die Fähigkeit zur Biofilmbildung vermittelt, fast ausschließlich in Vancomycin-resistenten *E. faecium* Isolaten. Hingegen konnte in der Untersuchung von Comerlato et al. (2013) kein Zusammenhang zwischen der Vancomycin-Resistenz und dem Nachweis von Resistenzgenen hergestellt werden. In der vorliegenden Untersuchung wurden keine Vancomycin-resistenten *E. faecium* identifiziert. Nur ein *E. faecium* Isolat wies das *esp* Gen auf und wurde als gering virulent beurteilt.

Resistenzen gegen **Ciprofloxacin** und **Penicillin** waren häufiger bei Isolaten ohne Nachweis der untersuchten Virulenzfaktoren und mit einer Einstufung als gering virulent im

Embryoletalitätstest. Dabei handelte es sich um *E. faecium* Isolate, die erfahrungsgemäß im Vergleich zu anderen Enterokokkenspezies resistenter gegen Fluorchinolone (Diarra et al., 2010; Harisberger et al., 2011; Schwaiger und Bauer, 2008; Simjee et al., 2007) und beta-Laktame (Sifaoui et al., 2001; Williamson et al., 1985) sind. Resistenzen gegen drei oder mehr antimikrobielle Wirkstoffklassen traten hauptsächlich bei gering virulenten (n=15) Enterokokkenisolaten auf. Im Gegensatz dazu waren zwei von drei hoch virulenten Isolaten nur gegen zwei antimikrobielle Wirkstoffklassen resistent. Unabhängig von der Virulenzkategorie waren die meisten Isolate (n=26) resistent gegen **Tetrazyklin**.

Interessanterweise konnte im Embryoletalitätstest keine Korrelation zwischen dem Vorhandensein einzelner oder kombinierter Virulenzfaktoren und der Pathogenität der untersuchten Enterokokkenisolate hergestellt werden. Das hoch virulente *E. faecium* Isolat zeigte keinen der untersuchten Virulenzgeno- oder phänotypen. Die beiden hoch virulenten *E. faecalis* Isolate wiesen genotypisch mehrere der Virulenzfaktoren auf, die Kombination vorhandener Virulenzgene konnte aber auch bei gering virulenten Isolaten gezeigt werden.

Resistenzmuster, Virulenzfaktoren und Pathogenität werden bei Enterokokken erfahrungsgemäß häufig aus der Spezieszugehörigkeit abgeleitet. Während *E. faecium* eine höhere Prävalenz resistenter Phänotypen aufweist, besitzen *E. faecalis* Isolate häufig mehr Virulenzdeterminanten (Diarra et al., 2010; Eaton und Gasson, 2001; Giraffa, 2002). In der vorliegenden Untersuchung zeigten Geflügelisolate der Enterokokkenspezies *E. faecium* im Vergleich zu anderen Enterokokken ein größeres Resistenzpotential. *Enterococcus faecalis* Isolate wiesen hingegen im Vergleich mehr Virulenzgene auf und zeigten eine höhere Pathogenität. Der Embryoletalitätstest ermöglichte bei den untersuchten Enterokokken eine Unterscheidung zwischen verschiedenen Virulenztypen, aber die ermittelte Mortalität der Hühnerembryonen korrelierte nicht mit dem Vorhandensein spezifischer Virulenzfaktoren.

6 Schlussfolgerungen

1. Zur exakten Speziesbestimmung von Enterokokken ist eine 16S rDNA-Genanalyse empfehlenswert.
2. Die Spezies *Enterococcus gallinarum* wird vorwiegend bei Mastgeflügel nachgewiesen.
3. Die *in vitro* Empfindlichkeit von Enterokokken gegenüber Beta-Laktamen und Vancomycin ist gut.
4. Die höchsten Resistenzraten und die meisten multiresistenten Isolate gehören zu der Spezies *E. faecium*.
5. Die höchsten Resistenzraten im tierartspezifischen Vergleich weisen die Putenisolate auf.
6. Die meisten Virulenzfaktoren weist *E. faecalis* auf, und das *hyl_{Em}*-Gen wird ausschließlich bei *E. gallinarum* nachgewiesen.
7. Eine Korrelation der geno- und phänotypischen Ausprägung der untersuchten Virulenzfaktoren ist nicht immer gegeben.
8. Werden verschiedene Enterokokkenspezies im Embryoletalitätstest untersucht, empfiehlt es sich, den Toleranzbereich des Inokulums auf 100 – 1000 KBE/Ei festzusetzen.
9. Zur Interpretation des Embryoletalitätstests sollte der Überlebensindex verwendet werden, da er zwei Parameter (Absterberate und –dauer) erfasst.
10. Cytolysin konnte nicht mit erhöhter Pathogenität im Embryoletalitätstest in Verbindung gebracht werden.
11. Isolate mit hohen Resistenzraten wurden im Embryoletalitätstest als geringvirulent eingestuft.
12. Die Spezieszugehörigkeit von Enterokokken ermöglicht eher als die Bestimmung der Resistenzraten oder der Nachweis von Virulenzfaktoren eine Einschätzung ihrer Pathogenität.

7 Zusammenfassung

Untersuchungen zur antimikrobiellen Resistenz und Virulenz von *Enterococcus* Isolaten aus Wirtschaftsgeflügel

In der vorliegenden Arbeit wurden 163 klinische Enterokokkenisolate von Broilern, Legehennen und Puten aus den Jahren 2010 und 2011 bearbeitet. Zur Speziesbestimmung wurden eine genus- und speziesspezifische Multiplex-PCR und eine 16S rDNA-Genanalyse durchgeführt. Die dominierende Spezies war *E. faecalis* (n=127). *Enterococcus faecium* (n=18), *E. gallinarum* (n=13) und *E. hirae* (n=5) wurden ebenfalls nachgewiesen. Das Resistenzverhalten aller Isolate gegenüber 24 antimikrobiellen Wirkstoffen wurde mit der Mikrodilutionsmethode bestimmt. Die Auswertung der ermittelten MHK₅₀ und MHK₉₀ Werte erfolgte mittels CLSI-Grenzwerten. Die Resistenzraten gegenüber Lincomycin (72%-100%) und Tetrazyklin (40-100%) waren für alle Spezies hoch. Außerdem waren die meisten *E. faecalis* und *E. faecium* Isolate resistent gegen Gentamicin (89-98%) und Erythromycin (70-89%). Es wurden keine Vancomycin-resistenten Enterokokken gefunden, und die Empfindlichkeit gegenüber Ampicillin lag für *E. faecalis*, *E. gallinarum* und *E. hirae* bei 100%. Die MHK₅₀ und MHK₉₀ Werte für Beta-Laktame, Chloramphenicol und Sulfamethoxazol-Trimethoprim befanden sich im unteren Testbereich. *Enterococcus faecalis* Isolate von Puten zeigten die höchsten Resistenzraten für alle antimikrobiellen Wirkstoffe außer Ciprofloxacin und Sulfamethoxazol-Trimethoprim. Einundsechzig Prozent der *Enterococcus* Isolate waren gegen drei oder mehr Antibiotikaklassen resistent. Auch hier standen die Putenisolate mit 80% Multi-Resistenz hervor. Der häufigste Resistenzphänotyp bei den *E. faecalis* Isolaten von Broilern, Legehennen und Puten war Gentamicin, Lincomycin und Tetrazyklin. Achtundzwanzig ausgewählte Putenisolate (10 *E. faecalis*, 10 *E. faecium*, 8 *E. gallinarum*) wurden hinsichtlich fünf Virulenzfaktoren (Aggregation Substance, Cytolysin, Enterococcal Surface Protein, Gelatinase, Hyaluronidase) untersucht. Dazu erfolgte ein PCR-Nachweis der Virulenzgene *asa1*, *cylA*, *cylB*, *cylL_L*, *cylL_S*, *cylM*, *esp*, *gelE* und *hyl_{Efm}* und die Sequenzierung der nachgewiesenen Virulenzgene. Die phänotypische Ausprägung von Cytolysin, Gelatinase und Hyaluronidase wurde mit mikrobiologischen Tests untersucht. Das Gelatinase-Gen wurde bei allen drei Enterokokkenspezies, das *asa1* Gen nicht bei *E. gallinarum* und das *esp* Gen nur bei *E. faecium* nachgewiesen. Drei *E. faecalis* und ein *E. faecium* Isolat wiesen das gesamte Cytolysin-Operon auf. Bei sechs *E. faecium* und zwei *E. gallinarum* Isolaten wurden keine Virulenzgene nachgewiesen. Sechs *E. gallinarum* Isolate zeigten Cytolysin-Aktivität, sieben *E. faecalis* Isolate verflüssigten Gelatine und sieben *E. gallinarum* Isolate zeigten Hyaluronidase-Aktivität. Im Embryoletalitätstest wurde anhand des Überlebensindex und der Absterberate die Virulenz der 28 Putenisolate bestimmt. Anhand des Überlebensindex wurden drei Isolate als hoch, sieben Isolate als mäßig und 18 Isolate als gering virulent eingestuft. Anhand der Absterberate wurde ein Isolat als hoch, acht Isolate als mäßig und 19 Isolate als gering virulent eingestuft.

8 Summary

Antimicrobial resistance and virulence of enterococci isolated from poultry

Between 2010 and 2011, 163 *Enterococcus* isolates were collected from broilers, layers and fattening turkeys that showed various clinical signs. Genus and species identification was determined with multiplex-PCR and gene sequencing. Most of the isolates were *E. faecalis* (n=127), while *E. faecium* (n=18), *E. gallinarum* (n=13), and *E. hirae* (n=5) were found in lower numbers. Susceptibility to 24 antimicrobial substances was tested using broth microdilution test to determine minimum inhibitory concentrations (MICs). CLSI established breakpoints as well as MIC₅₀ and MIC₉₀ values were applied for evaluation. Resistance rates for lincomycin (72-100%) and tetracycline (40-100%) were high for all *Enterococcus* species. In addition, most *E. faecalis* and *E. faecium* isolates were resistant to gentamicin (89-98%) and erythromycin (70-89%). No vancomycin resistant enterococci (VRE) were found and sensitivity to ampicillin was 100% for *E. faecalis*, *E. gallinarum*, and *E. hirae*. MIC₅₀ and MIC₉₀ values for beta-lactam antibiotics, chloramphenicol and sulfamethoxazole-trimethoprim were at the lower end of the test range. *Enterococcus faecalis* isolated from turkeys had the highest rates of resistances for all antimicrobial substances except ciprofloxacin and sulfamethoxazole-trimethoprim. Sixty-one percent of *Enterococcus* isolates were resistant to three or more antimicrobial classes. Again, isolates from turkeys stood out with 80% multi-resistance. The most frequent resistance phenotypes of *E. faecalis* isolated from broilers, layers and turkeys were gentamicin, lincomycin, and tetracycline. Five virulence factors (aggregation substance, cytolysin, enterococcal surface protein, gelatinase, hyaluronidase) were determined in 28 isolates from turkeys (10 *E. faecalis*, 10 *E. faecium*, 8 *E. gallinarum*). First, virulence genes *asa1*, *cylA*, *cylB*, *cylL_L*, *cylL_S*, *cylM*, *esp*, *gelE* and *hyl_{ETm}* were determined with multiplex-PCR. Gene-specific amplification products were confirmed by gene sequencing. All 28 *Enterococcus* isolates were tested for hemolytic activity, and gelatinase and hyaluronidase production. The *gelE* gene was found in all *Enterococcus* species, *asa1* was not found in *E. gallinarum* and *esp* was only found in *E. faecium*. Three *E. faecalis* and one *E. faecium* isolate showed the whole cytolysin operon. No virulence genes were found in six *E. faecium* and two *E. gallinarum* isolates. Six *E. gallinarum* isolates displayed cytolysin activity, seven *E. faecalis* broke down gelatine and seven *E. gallinarum* isolates displayed hyaluronidase activity. Virulence of the 28 isolates from turkeys was determined calculating survival index and death rate. According to survival index, three isolates were found highly virulent, seven isolates were moderately virulent and 18 isolates were less virulent. According to death rate, one isolate was found highly virulent, eight isolates were moderately virulent and 19 isolates less virulent.

9 Literaturverzeichnis

- Aarestrup, F.M., Agero, Y., Gerner-Smidt, P., Madsen, M., Jensen, L.B., 2000, Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 37, 127-137.
- Aarestrup, F.M., Bager, F., Jensen, N.E., Madsen, M., Meyling, A., Wegener, H.C., 1998, Surveillance of antimicrobial resistance in bacteria isolated from food animals to antimicrobial growth promoters and related therapeutic agents in Denmark. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica* 106, 606-622.
- Aarestrup, F.M., 1999, Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals. *International Journal of Antimicrobial Agents* 12, 279-285.
- Aarestrup, F.M., Seyfarth, A.M., Emborg, H.D., Pedersen, K., Hendriksen, R.S., Bager, F., 2001, Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45, 2054-2059.
- Abdul-Aziz, T.A., el-Sukhon, S.N., 1994, Pathogenicity of *Enterococcus hirae* for chicken embryos and betamethasone-treated chicks. *Research in Veterinary Science* 56, 397-398.
- Amit-Romach, E., Sklan, D., Uni, Z., 2004, Microflora ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers. *Poultry science* 83, 1093-1098.
- Andrews, F., Horder, T., 1906, A study of streptococcal pathogenic for man. *The Lancet* 2, 708-713.
- Anonymus, 1993, Nosocomial enterococci resistant to vancomycin - United States, 1989-1993. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 42, 597-599.
- Anonymus, 2003, Erste Ergebnisse des Internationalen Symposiums über Risikoanalyse der Antibiotikaresistenz. Bericht des Bundesinstituts für Risikobewertung vom 13.11.2003.
- Anonymus, 2004, Stellungnahme der Zentralen Kommission für die Biologische Sicherheit zur Risikobewertung von *Enterococcus faecalis* Stämme S1/01/00 bis S1/10/00. Az.: 6790-10-86, Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit.
- Anonymus, 2011a, Bericht über den Antibiotikaeinsatz in der landwirtschaftlichen Nutztierhaltung in Niedersachsen. Niedersächsisches Ministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz; Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit.
- Anonymus, 2011b, Deutsche nationale Punkt-Prävalenzstudie zu nosokomialen Infektionen und Antibiotika-Anwendung 2011.
- Arias, C.A., Contreras, G.A., Murray, B.E., 2010, Management of multidrug-resistant enterococcal infections. *Clinical Microbiology and Infection* 16, 555-562.
- Arsene, S., Leclercq, R., 2007, Role of a qnr-like gene in the intrinsic resistance of *Enterococcus faecalis* to fluoroquinolones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51, 3254-3258.
- Arthur, M., Molinas, C., Courvalin, P., 1992, The *VanS-VanR* two-component regulatory system controls synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *Journal of Bacteriology* 174, 2582-2591.
- Aslam, M., Diarra, M.S., Checkley, S., Bohaychuk, V., Masson, L., 2012, Characterization of antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus* spp. isolated from retail meats in Alberta, Canada. *International Journal of Food Microbiology* 156, 222-230.
- Atlas, R.M., 2004, *Handbook of Microbiological Media*, Third Edition, Band 1. CRC-Press, London, 1226.
- Bager, F., Aarestrup, F.M., Madsen, M., Wegener, H.C., 1999, Glycopeptide resistance in *Enterococcus faecium* from broilers and pigs following discontinued use of avoparcin. *Microbial Drug Resistance* 5, 53-56.
- Bager, F., Madsen, M., Christensen, J., Aarestrup, F.M., 1997, Avoparcin used as a growth promoter is associated with the occurrence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* on Danish poultry and pig farms. *Preventive Veterinary Medicine* 31, 95-112.
- Bates, J., Jordens, J.Z., Griffiths, D.T., 1994, Farm animals as a putative reservoir for vancomycin-resistant enterococcal infection in man. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 34, 507-514.
- Booth, M.C., Bogie, C.P., Sahl, H.G., Siezen, R.J., Hatter, K.L., Gilmore, M.S., 1996, Structural analysis and proteolytic activation of *Enterococcus faecalis* cytolysin, a novel lantibiotic. *Molecular Microbiology* 21, 1175-1184.

- Borst, L.B.S., M.M.; Keelara, S.; Dunningan, S. E.; Guy, J. S; Barnes, H. J., 2014, A Chicken Embryo Lethality Assay for Pathogenic *Enterococcus cecorum*. *Avian Diseases* 58, 244-248.
- Borst, L.B., Suyemoto, M.M., Robbins, K.M., Lyman, R.L., Martin, M.P., Barnes, H.J., 2012, Molecular epidemiology of *Enterococcus cecorum* isolates recovered from enterococcal spondylitis outbreaks in the southeastern United States. *Avian Pathology* 41, 479-485.
- Bundestierärztekammer, 2010, Antibiotika-Leitlinien.
- Butaye, P., Devriese, L.A., Haesebrouck, F., 1999, Glycopeptide resistance in *Enterococcus faecium* strains from animals and humans. *Reviews in Medical Microbiology* 10, 235-243.
- Butaye, P., Devriese, L.A., Haesebrouck, F., 2001, Differences in antibiotic resistance patterns of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* strains isolated from farm and pet animals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45, 1374-1378.
- Büttner, S., Flechtner, O., Müntener, C., Overesch, G., 2010, ARCH-Vet 2010, Bericht über den Vertrieb von Antibiotika in der Veterinärmedizin und das Antibiotikaresistenzmonitoring bei Nutztieren in der Schweiz. Bundesamt für Veterinärwesen BVET.
- Byappanahalli, M.N., Nevers, M.B., Korajkic, A., Staley, Z.R., Harwood, V.J., 2012, Enterococci in the environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 76, 685-706.
- Camargo, I.L., Gilmore, M.S., Darini, A.L., 2006, Multilocus sequence typing and analysis of putative virulence factors in vancomycin-resistant and vancomycin-sensitive *Enterococcus faecium* isolates from Brazil. *Clinical Microbiology and Infection* 12, 1123-1130.
- Cardona, C.J., Bickford, A.A., Charlton, B.R., Cooper, G.L., 1993, *Enterococcus durans* infection in young chickens associated with bacteremia and encephalomalacia. *Avian Diseases* 37, 234-239.
- Casadevall, A., Pirofski, L., 2001, Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. *The Journal of Infectious Diseases* 184, 337-344.
- Cauwerts, K., Decostere, A., De Graef, E.M., Haesebrouck, F., Pasmans, F., 2007, High prevalence of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from broilers carrying the *erm(B)* gene. *Avian Pathology* 36, 395-U373.
- Chamanza, R., Fabri, T.H., van Veen, L., Dwars, R.M., 1998, *Enterococcus*-associated encephalomalacia in one-week-old chicks. *Veterinary Records* 143, 450-451.
- Champagne, J., Diarra, M.S., Rempel, H., Topp, E., Greer, C.W., Harel, J., Masson, L., 2011, Development of a DNA microarray for enterococcal species, virulence, and antibiotic resistance gene determinations among isolates from poultry. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 2625-2633.
- Channaiah, L.H., Subramanyam, B., McKinney, L.J., Zurek, L., 2010, Stored-product insects carry antibiotic-resistant and potentially virulent enterococci. *FEMS Microbiol Ecol* 74, 464-471.
- Chen, H.Y., 1986, Resistance of enterococci to antibiotic combinations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 18, 1-4.
- Chow, J.W., Thal, L.A., Perri, M.B., Vazquez, J.A., Donabedian, S.M., Clewell, D.B., Zervos, M.J., 1993, Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37, 2474-2477.
- Clewell, D.B., 1990, Movable genetic elements and antibiotic resistance in enterococci. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease* 9, 90-102.
- Clewell, D.B., 1993, Bacterial sex pheromone-induced plasmid transfer. *Cell* 73, 9-12.
- CLSI, 2008, Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard, M31-A3E.
- CLSI, 2013a, Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Second Informational Supplement. CLSI document Vet01-S2.
- CLSI, 2013b, Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard. CLSI document Vet01-A4.
- CLSI, 2014, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-fourth Informational Supplement.
- Coburn, P.S., Gilmore, M.S., 2003, The *Enterococcus faecalis* cytolysin: a novel toxin active against eukaryotic and prokaryotic cells. *Cellular Microbiology* 5, 661-669.
- Collignon, P., Powers, J.H., Chiller, T.M., Aidara-Kane, A., Aarestrup, F.M., 2009, World Health Organization ranking of antimicrobials according to their importance in human medicine: A critical step for developing risk management strategies for the use of antimicrobials in food production animals. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 49, 132-141.
- Collins, M.D., Rodrigues, U.M., Pigott, N.E., Facklam, R.R., 1991, *Enterococcus dispar* sp. nov. a new *Enterococcus* species from human sources. *Letters in Applied Microbiology* 12, 95-98.

- Comerlato, C. B., Carvalho de Resende, M. C., Caierao, J., d'Azevedo, P. A., 2013, Presence of Virulence Factors in *Enterococcus Faecalis* and *Enterococcus Faecium* Susceptible and Resistant to Vancomycin. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 108.5, 590–595
- Coque, T., Patterson, J. E., Steckelberg, J. M., Murray, B. E., 1995, Incidence of Hemolysin, Gelatinase, and Aggregation Substance among Enterococci Isolated from Patients with Endocarditis and Other Infections and from Feces of Hospitalized and Community-Based Persons. *Journal of Infectious Disease* 171, 1223-1229
- Cosentino, S., Podda, G.S., Corda, A., Fadda, M.E., Deplano, M., Pisano, M.B., 2010, Molecular detection of virulence factors and antibiotic resistance pattern in clinical *Enterococcus faecalis* strains in Sardinia. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene* 51, 31-36.
- Cox, C.R., Coburn, P.S., Gilmore, M.S., 2005, Enterococcal cytolysin: a novel two component peptide system that serves as a bacterial defense against eukaryotic and prokaryotic cells. *Current protein & peptide science* 6, 77-84.
- Creti, R., Imperi, M., Bertuccini, L., Fabretti, F., Orefici, G., Di Rosa, R., Baldassarri, L., 2004, Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different sources. *Journal of Medical Microbiology* 53, 13-20.
- DANMAP, 2010, Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark - DANMAP 2010.
- David, O.M., 2013, Virulence Factors and antibiotic resistance of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus gallinarum* strains isolated from farm animal in Ado-Ekiti, Nigeria. *Wayamba Journal of Animal Science*, 824-831.
- Deasy, B.M., Rea, M.C., Fitzgerald, G.F., Cogan, T.M., Beresford, T.P., 2000, A rapid PCR based method to distinguish between *Lactococcus* and *Enterococcus*. *Systematic and Applied Microbiology* 23, 510-522.
- De Herdt, P., Defoort, P., Van Steelant, J., Swam, H., Tanghe, L., Van Goethem, S., Vanrobaeys, M., 2008, *Enterococcus cecorum* osteomyelitis and arthritis in broiler chickens. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 78, 44-48.
- dela Cruz, T.E.E., Torres, J.M.O. 2012. Gelatin Hydrolysis Test Protocol. In American Society for Microbiology - MicrobeLibrary (<http://www.microbelibrary.org/library/laboratory-test/3776-gelatin-hydrolysis-test-protocol>).
- De Leener, E., Martel, A., Decostere, A., Haesebrouck, F., 2004, Distribution of the *erm(B)* gene, tetracycline resistance genes, and Tn 1545-like transposons in macrolide- and lincosamide-resistant enterococci from pigs and humans. *Microbial Drug Resistance* 10, 341-345.
- Devriese, L., Baele, M., Butaye, P., 2006, The Genus *Enterococcus*, In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.) *The Prokaryotes*. Springer US, pp. 163-174.
- Devriese, L.A., Cauwerts, K., Hermans, K., Wood, A.M., 2002, *Enterococcus cecorum* septicemia as a cause of bone and joint lesions resulting in lameness in broiler chickens. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 71, 219-221.
- Devriese, L.A., Ducatelle, R., Uyttendaele, E., Haesebrouck, F., 1991a, *Enterococcus hirae* infection and focal necrosis of the brain of chicks. *Veterinary Records* 129, 316.
- Devriese, L.A., Hommez, J., Wijfels, R., Haesebrouck, F., 1991b, Composition of the enterococcal and streptococcal intestinal flora of poultry. *Journal of Applied Bacteriology* 71, 46-50.
- Devriese, L.A., Oeding, P., 1975, Coagulase and heat-resistant nuclease producing *Staphylococcus epidermidis* strains from animals. *The Journal of Applied Bacteriology* 39, 197-207.
- Devriese, L.A., Vandekerckhove, A., Kilpper-Bälz, R., Schleifer, K.H., 1987, Characterization and Identification of *Enterococcus* Species Isolated from the Intestines of Animals. *International Journal of Systematic Bacteriology* 37, 257-259.
- Diarra, M.S., Rempel, H., Champagne, J., Masson, L., Pritchard, J., Topp, E., 2010, Distribution of antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus* spp. and characterization of isolates from broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 8033-8043.
- Dutta, G.N., Devriese, L.A., 1982, Susceptibility of fecal streptococci of poultry origin to nine growth-promoting agents. *Applied and Environmental Microbiology* 44, 832-837.
- Eaton, T.J., Gasson, M.J., 2001, Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 1628-1635.
- EEC, 1999, European Community Council regulation (EEC) No. 2377/90. Annex IV. List of pharmacologically active substances for which no maximum levels can be fixed. Office for Official Publications of the European Communities.
- EFSA, 2010, The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2010. *EFSA Journal* 2012:10.

- Ellerbroek, L., Mac, K.N., Peters, J., Hultquist, L., 2004, Hazard potential from antibiotic-resistant commensals like Enterococci. *Journal of Veterinary Medicine Series B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health* 51, 393-399.
- ESVAC, 2010, Sales of veterinary antimicrobial agents in 25 EU,EEA countries in 2010. European Medicines Agency.
- Facklam, R.R., Collins, M.D., 1989, Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. *Journal of Clinical Microbiology* 27, 731-734.
- Facklam, R.R., Moody, M.D., 1970, Presumptive identification of group D streptococci: the bile-esculin test. *Applied Microbiology* 20, 245-250.
- Farrow, J.A.E., Collins, M.D., 1985, *Enterococcus hirae*, a new species that includes amino acid assay strain NCDO 1258 and strains causing growth depression in young chickens. *International Journal of Systematic Bacteriology* 35, 73-75.
- Ferretti, J.J., Gilmore, K.S., Courvalin, P., 1986, Nucleotide sequence analysis of the gene specifying the bifunctional 6'-aminoglycoside acetyltransferase 2"-aminoglycoside phosphotransferase enzyme in *Streptococcus faecalis* and identification and cloning of gene regions specifying the two activities. *Journal of Bacteriology* 167, 631-638.
- Fertner, M.E., Olsen, R.H., Bisgaard, M., Christensen, H., 2011, Transmission and genetic diversity of *Enterococcus faecalis* among layer chickens during hatch. *Acta Veterinaria Scandinavica* 53, 56.
- Fontana, R., Ligozzi, M., Pittaluga, F., Satta, G., 1996, Intrinsic penicillin resistance in enterococci. *Microbial Drug Resistance* 2, 209-213.
- Frahm, E., Obst, U., 2003, Application of the fluorogenic probe technique (TaqMan PCR) to the detection of *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* in water samples. *Journal of Microbiological Methods* 52, 123-131.
- Franz, C.M., Holzapfel, W.H., Stiles, M.E., 1999, Enterococci at the crossroads of food safety? *International Journal of Food Microbiology* 47, 1-24.
- Franz, C.M., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W., Galvez, A., 2011, Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *International Journal of Food Microbiology* 151, 125-140.
- Gardner, E.W., Lyles, S.T., Lankford, C.E., Hagens, S.J., 1963, *Vibrio cholerae* infection in the embryonated egg. *The Journal of Infectious Diseases* 112, 264-272.
- Gaspar, F.B., Crespo, M.T., Lopes, M.F., 2009, Proposal for a reliable enterococcal cytolysin production assay avoiding apparent incongruence between phenotype and genotype. *Journal of medical microbiology* 58, 1122-1124.
- George, R.C., Uttley, A.H., 1989, Susceptibility of enterococci and epidemiology of enterococcal infection in the 1980s. *Epidemiology and Infection* 103, 403-413.
- Geraci, J.E., Martin, W.J., 1954, Antibiotic therapy of bacterial endocarditis. VI. Subacute enterococcal endocarditis; clinical, pathologic and therapeutic consideration of 33 cases. *Circulation* 10, 173-194.
- Gibbs, P.S., Maurer, J.J., Nolan, L.K., Wooley, R.E., 2003, Prediction of chicken embryo lethality with the avian *Escherichia coli* traits complement resistance, colicin V production, and presence of the increased serum survival gene cluster (iss). *Avian Diseases* 47, 370-379.
- Gilmore, M.S., Clewell, D.B., Courvalin, P., Dunny, G.M., Murray, B.E., Rice, L.B., 2002, The Enterococci - Pathogenesis, Molecular Biology and Antibiotic Resistance. ASM Press. Chapter: Enterococcal Infection – Treatment and antibiotic resistance
- Giridhara Upadhyaya, P.M., Ravikumar, K.L., Umopathy, B.L., 2009, Review of virulence factors of *enterococcus*: an emerging nosocomial pathogen. *Indian Journal of Medical Microbiology* 27, 301-305.
- Giraffa, G., 2002, Enterococci from foods. *FEMS microbiology reviews* 26, 163-171.
- Gomes, B.C., Esteves, C.T., Palazzo, I.C.V., Darini, A.L.C., Franco, B.D.G.M., de Martinis, E.C.P., 2007, Correlation between API 20 strep and multiplex PCR for identification of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. *Brazilian Journal of Microbiology* 38, 617-619.
- Goncalves, A., Poeta, P., Silva, N., Araujo, C., Lopez, M., Ruiz, E., Uliyakina, I., Direitinho, J., Igrejas, G., Torres, C., 2010, Characterization of vancomycin-resistant enterococci isolated from fecal samples of ostriches by molecular methods. *Foodborne Pathogens and Disease* 7, 1133-1136.
- Goodpasture, E.W., Anderson, K., 1937, The Problem of Infection as Presented by Bacterial Invasion of the Chorio-Allantoic Membrane of Chick Embryos. *The American Journal of Pathology* 13, 149-174 147.
- Graham, J.P., Price, L.B., Evans, S.L., Graczyk, T.K., Silbergeld, E.K., 2009, Antibiotic resistant enterococci and staphylococci isolated from flies collected near confined poultry feeding operations. *The Science of the total environment* 407, 2701-2710.

- Grayson, M.L., Thauvin-Eliopoulos, C., Eliopoulos, G.M., Yao, J.D., DeAngelis, D.V., Walton, L., Woolley, J.L., Moellering, R.C., Jr., 1990, Failure of trimethoprim-sulfamethoxazole therapy in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 34, 1792-1794.
- Gregersen, R.H., Petersen, A., Christensen, H., Bisgaard, M., 2010, Multilocus sequence typing of *Enterococcus faecalis* isolates demonstrating different lesion types in broiler breeders. *Avian Pathology* 39, 435-440.
- Gross, P.A., Harkavy, L.M., Barden, G.E., Flower, M.F., 1976, The epidemiology of nosocomial enterococcal urinary tract infection. *American Journal of the Medical Sciences* 272, 75-81.
- Gross, R., 1993, Signal transduction and virulence regulation in human and animal pathogens. *Microbiology Reviews* 10, 301-326.
- Gullberg, E., Cao, S., Berg, O.G., Ilback, C., Sandegren, L., Hughes, D., Andersson, D.I., 2011, Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS pathogens* 7, e1002158.
- Gutschik, E., Moller, S., Christensen, N., 1979, Experimental endocarditis in rabbits. 3. Significance of the proteolytic capacity of the infecting strains of *Streptococcus faecalis*. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica. Section B, Microbiology* 87, 353-362.
- Hafez, H.M., 2014, Turkey Diseases and syndromes requiring antimicrobial control. *World Poultry* 30 (5), 10-12.
- Hammerum, A.M., Jensen, L.B., 2002, Prevalence of *esp*, encoding the enterococcal surface protein, in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from hospital patients, poultry, and pigs in Denmark. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 4396.
- Han, D., Unno, T., Jang, J., Lim, K., Lee, S.N., Ko, G., Sadowsky, M.J., Hur, H.G., 2011, The occurrence of virulence traits among high-level aminoglycosides resistant *Enterococcus* isolates obtained from feces of humans, animals, and birds in South Korea. *International Journal of Food Microbiology* 144, 387-392.
- Hardie, J.M., Whiley, R.A., 1997, Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Society for Applied Bacteriology Symposium Series* 26, 1S-11S.
- Harisberger, M., Gobeli, S., Hoop, R., Dewulf, J., Perreten, V., Regula, G., 2011, Antimicrobial resistance in Swiss laying hens, prevalence and risk factors. *Zoonoses and Public Health* 58, 377-387.
- Hart, M.E., Hart, M.J., Roop, A.J., 2009, Genotypic and Phenotypic Assessment of Hyaluronidase among Type Strains of a Select Group of Staphylococcal Species. *International Journal of Microbiology* 2009, 614371.
- Hauck, R., Römer, A., Reimer, I., Bender, A., Haas, C., Heberer, T., Wallmann, J., 2014, Analysis of the distribution of veterinary antimicrobial products to veterinarians in Germany in 2011 and 2012. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift* 127, 10 - 16.
- Hayes, J.R., English, L.L., Carr, L.E., Wagner, D.D., Joseph, S.W., 2004, Multiple-antibiotic resistance of *Enterococcus* spp. isolated from commercial poultry production environments. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 6005-6011.
- Herman, D.J., Gerding, D.N., 1991, Antimicrobial resistance among enterococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 35, 1-4.
- Hollenbeck, B.L., Rice, L.B., 2012, Intrinsic and acquired resistance mechanisms in *enterococcus*. *Virulence* 3, 421-433.
- Houghton, S.B., Fuller, R., Coates, M.E., 1981, Correlation of growth depression of chicks with the presence of *Streptococcus faecium* in the gut. *Journal of Applied Bacteriology* 51, 113-120.
- Hudson, C.R., Fedorka-Cray, P.J., Jackson-Hall, M.C., Hiott, L.M., 2003, Anomalies in species identification of enterococci from veterinary sources using a commercial biochemical identification system. *Letters in Applied Microbiology* 36, 245-250.
- Huycke, M.M., Spiegel, C.A., Gilmore, M.S., 1991, Bacteremia caused by hemolytic, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 35, 1626-1634.
- Hwang, I.Y., Lim, S.K., Ku, H.O., Park, C.K., Jung, S.C., Park, Y.H., Nam, H.M., 2011, Occurrence of virulence determinants in fecal *Enterococcus faecalis* isolated from pigs and chickens in Korea. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 21, 1352-1355.
- Hynes, W.L., Walton, S.L., 2000, Hyaluronidases of Gram-positive bacteria. *Microbiology Letters* 183, 201-207.
- Ike, Y., Hashimoto, H., Clewell, D.B., 1984, Hemolysin of *Streptococcus faecalis* subspecies *zymogenes* contributes to virulence in mice. *Infection and Immunity* 45, 528-530.

- Ike, Y., Hashimoto, H., Clewell, D.B., 1987, High incidence of hemolysin production by *Enterococcus* (*Streptococcus*) *faecalis* strains associated with human parenteral infections. *Journal of Clinical Microbiology* 25, 1524-1528.
- Jackson, C.R., Fedorka-Cray, P.J., Barrett, J.B., 2004, Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 3558-3565.
- Janse, E.M., Jeurissen, S.H., 1991, Ontogeny and function of two non-lymphoid cell populations in the chicken embryo. *Immunobiology* 182, 472-481.
- Jensen, L.B., Frimodt-Moeller, N., Aarestrup, F.M., 1999, Presence of *erm* gene classes in gram-positive bacteria of animal and human origin in Denmark. *Microbiology Letters* 170, 151 - 158.
- Jett, B.D., Huycke, M.M., Gilmore, M.S., 1994, Virulence of enterococci. *Clinical Microbiology Reviews* 7, 462-478.
- Jett, B.D., Jensen, H.G., Nordquist, R.E., Gilmore, M.S., 1992, Contribution of the pAD1-encoded cytolysin to the severity of experimental *Enterococcus faecalis* endophthalmitis. *Infection and Immunity* 60, 2445-2452.
- Johnson, A.P., 1994, The pathogenicity of enterococci. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 33, 1083-1089.
- Jorgensen, J.H., Ferraro, M.J., 2009, Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical Infectious Diseases* 49, 1749-1755.
- Joseph, S.W., Hayes, J.R., English, L.L., Carr, L.E., Wagner, D.D., 2001, Implications of multiple antimicrobial-resistant enterococci associated with the poultry environment. *Food Additives and Contaminants* 18, 1118-1123.
- Kalina, A.P., 1970, The taxonomy and nomenclature of enterococci. *International Journal of Systematic Bacteriology* 20, 185-189.
- Kasimoglu-Dogru, A., Gencay, Y.E., Ayaz, N.D., 2010, Comparison of virulence gene profiles of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* chicken neck skin and faeces isolates. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 129 - S133.
- Khan, S.A., Nawaz, M.S., Khan, A.A., Hopper, S.L., Jones, R.A., Cerniglia, C.E., 2005, Molecular characterization of multidrug-resistant *Enterococcus* spp. from poultry and dairy farms: detection of virulence and vancomycin resistance gene markers by PCR. *Molecular and Cellular Probes* 19, 27-34.
- Klare, I., Badstubner, D., Konstabel, C., Bohme, G., Claus, H., Witte, W., 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. *Microbial Drug Resistance* 5, 45-52.
- Klare, I., Konstabel, C., Mueller-Bertling, S., Werner, G., Strommenger, B., Kettlitz, C., Borgmann, S., Schulte, B., Jonas, D., Serr, A., Fahr, A.M., Eigner, U., Witte, W., 2005, Spread of ampicillin/vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* of the epidemic-virulent clonal complex-17 carrying the genes *esp* and *hyl* in German hospitals. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease* 24, 815-825.
- Klein, G., 2003, Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastrointestinal tract. *International Journal of Food Microbiology* 88, 123-131.
- Kojima, A., Morioka, A., Kijima, M., Ishihara, K., Asai, T., Fujisawa, T., Tamura, Y., Takahashi, T., 2010, Classification and antimicrobial susceptibilities of *enterococcus* species isolated from apparently healthy food-producing animals in Japan. *Zoonoses and Public Health* 57, 137-141.
- Kreft, B., Marre, R., Schramm, U., Wirth, R., 1992, Aggregation substance of *Enterococcus faecalis* mediates adhesion to cultured renal tubular cells. *Infection and Immunity* 60, 25-30.
- Kuntz, R.L., Hartel, P.G., Rodgers, K., Segars, W.I., 2004, Presence of *Enterococcus faecalis* in broiler litter and wild bird feces for bacterial source tracking. *Water Research* 38, 3551-3557.
- Lancefield, R.C., 1933, A Serological Differentiation of Human and Other Groups of Hemolytic Streptococci. *The Journal of Experimental Medicine* 57, 571-595.
- Landman, W.J.M., van der Boogard, A.E.J.M., Doornenbal, P., Tooten, P.C.J., Elbers, A.R.W., Gruys, E., 1998, The role of various agents in chicken amyloid arthropathy. *International Journal of Experimental and Clinical Investigation* 5, 266-278.
- Landman, W.J.M., Veldman, K.T., Mevius, D.J., van Eck, J.H.H., 2003, Investigations of *Enterococcus faecalis*-induced bacteraemia in brown layer pullets through different inoculation routes in relation to the production of arthritis. *Avian Pathology* 32, 463-471.
- Landman, W.J., 1999, Amyloid arthropathy in chickens. *The Veterinary Quarterly* 21, 78-82.
- Lanyi, B., 1987, Classical and Rapid Identification Methods for Medically Important Bacteria. *Methods in Microbiology* 19, 1-67.

- Laurent, T.C., Fraser, J.R., 1992, Hyaluronan. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* 6, 2397-2404.
- Laverde Gomez, J.A., Hendrickx, A.P., Willems, R.J., Top, J., Sava, I., Huebner, J., Witte, W., Werner, G., 2011, Intra- and interspecies genomic transfer of the *Enterococcus faecalis* pathogenicity island. *PLoS One* 6, e16720.
- Leclercq, R., Courvalin, P., 1997, Resistance to glycopeptides in enterococci. *Clinical Infectious Diseases* 24, 545-554; quiz 555-546.
- Leclercq, R., Derlot, E., Duval, J., Courvalin, P., 1988, Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *The New England Journal of Medicine* 319, 157-161.
- Leclercq, R., Dutka-Malen, S., Brisson-Noel, A., Molinas, C., Derlot, E., Arthur, M., Duval, J., Courvalin, P., 1992a, Resistance of enterococci to aminoglycosides and glycopeptides. *Clinical Infectious Diseases* 15, 495-501.
- Leclercq, R., Dutka-Malen, S., Duval, J., Courvalin, P., 1992b, Vancomycin resistance gene *vanC* is specific to *Enterococcus gallinarum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 36, 2005-2008.
- Liu, Y., Liu, K., Lai, J., Wu, C., Shen, J., Wang, Y., 2013, Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus* species of food animal origin from Beijing and Shandong Province, China. *Journal of Applied Microbiology* 114, 555-563.
- Löscher, W.U., Fritz Rupert; Kroker, Reinhard 2010, *Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren*. Enke-Verlag 8., überarbeitete Auflage.
- Lu, J., Domingo, J.S., 2008, Turkey fecal microbial community structure and functional gene diversity revealed by 16S rRNA gene and metagenomic sequences. *Journal of microbiology* 46, 469-477.
- Ludwig, W., Schleifer, K.H., Whitman, W., 2009, Family IV. Enterococcaceae fam. nov. . *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 3: The Firmicutes*, 594-606.
- Macovei, L., Zurek, L., 2006, Ecology of antibiotic resistance genes: characterization of enterococci from houseflies collected in food settings. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 4028-4035.
- Makinen, P.L., Clewell, D.B., An, F., Makinen, K.K., 1989, Purification and substrate specificity of a strongly hydrophobic extracellular metalloendopeptidase ("gelatinase") from *Streptococcus faecalis* (strain 0G1-10). *The Journal of Biological Chemistry* 264, 3325-3334.
- Martin, L.T., Martin, M.P., Barnes, H.J., 2011, Experimental reproduction of enterococcal spondylitis in male broiler breeder chickens. *Avian Diseases* 55, 273-278.
- Martinez-Murcia, A.J., Collins, M.D., 1991, *Enterococcus sulfureus*, a new yellow-pigmented *Enterococcus* species. *Microbiology Letters* 64, 69-74.
- Mazaheri, R., Barton, M.D., Heuzenroeder, M.W., 2011, Bacteriophage-mediated transduction of antibiotic resistance in enterococci. *Letters in Applied Microbiology* 52, 559-564.
- McNamee, P.T., King, D.C., 1996, Endocarditis in broiler breeder rearers due to *Enterococcus hirae*. *Veterinary Records* 138, 240.
- Megran, D.W., 1992, Enterococcal endocarditis. *Clinical Infectious Diseases* 15, 63-71.
- Miller, R.A., Walker, R.D., Carson, J., Coles, M., Coyne, R., Dalsgaard, I., Gieseke, C., Hsu, H.M., Mathers, J.J., Papapetropoulou, M., Petty, B., Teitzel, C., Reimschuessel, R., 2005, Standardization of a broth microdilution susceptibility testing method to determine minimum inhibitory concentrations of aquatic bacteria. *Diseases of Aquatic Organisms* 64, 211-222.
- Ministry of Agriculture, F.a.F., 2013, A report on the Japanese veterinary antimicrobial resistance monitoring system 2008 - 2011. National Veterinary Assay Laboratory; Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries.
- Moellering, R.C., Jr., 1991, The Garrod Lecture. The *enterococcus*: a classic example of the impact of antimicrobial resistance on therapeutic options. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 28, 1-12.
- Montgomery, R.D., Jones, L.S., Boyle, C.R., Luo, Y., Boyle, J.A., 2005, The embryo lethality of *Escherichia coli* isolates and its relationship to various in vitro attributes. *Avian Diseases* 49, 63-69.
- Moore, M., 1941, The chorio-allantoic membrane of the developing chick as a medium for the cultivation and histopathologic study of pathogenic fungi. *The American Journal of Pathology* 17, 103-120 105.
- Mühldorfer, K., Schwarz, S., Fickel, J., Wibbelt, G., Speck, S., 2011, Genetic diversity of *Pasteurella* species isolated from European vespertilionid bats. *Veterinary Microbiology* 149, 163-171.
- Mundy, L.M., Sahm, D.F., Gilmore, M., 2000, Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 13, 513-522.
- Murray, B.E., 1990, The life and times of the *Enterococcus*. *Clinical Microbiology Reviews* 3, 46-65.

- Nabbut, N.H., Khatib, I.H., 1978, Virulence of *Escherichia coli* strains for chicken embryos. *Avian Diseases* 22, 10-15.
- Obeng, A.S., Rickard, H., Ndi, O., Sexton, M., Barton, M., 2013, Comparison of antimicrobial resistance patterns in enterococci from intensive and free range chickens in Australia. *Avian Pathology* 42, 45-54.
- Oh, J.Y., Kang, M.S., Yoon, H., Choi, H.W., An, B.K., Shin, E.G., Kim, Y.J., Kim, M.J., Kwon, J.H., Kwon, Y.K., 2012, The embryo lethality of *Escherichia coli* isolates and its relationship to the presence of virulence-associated genes. *Poultry Science* 91, 370-375.
- Oliveira, M., Santos, V., Fernandes, A., Bernardo, F., Vilela, C.L., 2010, Antimicrobial resistance and in vitro biofilm-forming ability of enterococci from intensive and extensive farming broilers. *Poultry Science* 89, 1065-1069.
- Olsen, R.H., Frantzen, C., Christensen, H., Bisgaard, M., 2012, An investigation on first-week mortality in layers. *Avian Diseases* 56, 51-57.
- Ounissi, H., Derlot, E., Carlier, C., Courvalin, P., 1990, Gene homogeneity for aminoglycoside-modifying enzymes in gram-positive cocci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 34, 2164-2168.
- Palmer, K.L., Kos, V.N., Gilmore, M.S., 2010, Horizontal gene transfer and the genomics of enterococcal antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology* 13, 632-639.
- Pantosti, A., Del Grosso, M., Tagliabue, S., Macri, A., Caprioli, A., 1999, Decrease of vancomycin-resistant enterococci in poultry meat after avoparcin ban. *The Lancet* 354, 741-742.
- Patel, R., Uhl, J.R., Kohner, P., Hopkins, M.K., Cockerill, F.R., 3rd, 1997, Multiplex PCR detection of *vanA*, *vanB*, *vanC-1*, and *vanC-2/3* genes in enterococci. *Journal of Clinical Microbiology* 35, 703-707.
- Peters, J., Mac, K., Wichmann-Schauer, H., Klein, G., Ellerbroek, L., 2003, Species distribution and antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from food of animal origin in Germany. *International Journal of Food Microbiology* 88, 311-314.
- Petersen, A., Christensen, H., Philipp, H.C., Bisgaard, M., 2009, Clonality of *Enterococcus faecalis* associated with amyloid arthropathy in chickens evaluated by multilocus sequence typing (MLST). *Veterinary Microbiology* 134, 392-395.
- Pintado, V., Cabellos, C., Moreno, S., Meseguer, M.A., Ayats, J., Viladrich, P.F., 2003, Enterococcal meningitis: a clinical study of 39 cases and review of the literature. *Medicine* 82, 346-364.
- Pirofski, L.A., Casadevall, A., 2012, Q and A: What is a pathogen? A question that begs the point. *BMC biology* 10, 6.
- Poeta, P., Costa, D., Klibi, N., Rodrigues, J., Torres, C., 2006a, Phenotypic and genotypic study of gelatinase and beta-haemolysis activities in faecal enterococci of poultry in Portugal. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 53, 203-208.
- Poeta, P., Costa, D., Rodrigues, J., Torres, C., 2006b, Detection of genes encoding virulence factors and bacteriocins in fecal enterococci of poultry in Portugal. *Avian Diseases* 50, 64-68.
- Polakowska, K., Lis, M.W., Helbin, W.M., Dubin, G., Dubin, A., Niedziolka, J.W., Miedzobrodzki, J., Wladyka, B., 2012, The virulence of *Staphylococcus aureus* correlates with strain genotype in a chicken embryo model but not a nematode model. *Microbes and Infection / Institut Pasteur* 14, 1352-1362.
- Portillo, A., Ruiz-Larrea, F., Zarazaga, M., Alonso, A., Martinez, J.L., Torres, C., 2000, Macrolide resistance genes in *Enterococcus* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44, 967-971.
- Poulin, R., Combes, C., 1999, The concept of virulence: interpretations and implications. *Parasitology Today* 15, 474-475.
- Powell, C.J., Jr., Finkelstein, R.A., 1966, Virulence of *Escherichia coli* strains for chick embryos. *Journal of Bacteriology* 91, 1410-1417.
- Poyart, C., Quesnes, G., Trieu-Cuot, P., 2000, Sequencing the gene encoding manganese-dependent superoxide dismutase for rapid species identification of enterococci. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 415-418.
- Radhouani, H., Pinto, L., Coelho, C., Sargo, R., Araujo, C., Lopez, M., Torres, C., Igrejas, G., Poeta, P., 2010, MLST and a genetic study of antibiotic resistance and virulence factors in *vanA*-containing *Enterococcus* from buzzards (*Buteo buteo*). *Letters in Applied Microbiology* 50, 537-541.
- Randall, C.J., Wood, A.M., MacKenzie, G., 1993, Encephalomalacia in first-week chicks. *Veterinary Records* 132, 419.
- Reid, K.C., Cockerill, I.F., Patel, R., 2001, Clinical and epidemiological features of *Enterococcus casseliflavus/flavescens* and *Enterococcus gallinarum* bacteremia: a report of 20 cases. *Clinical Infectious Diseases* 32, 1540-1546.

- Ribatti, D., 2008, The chick embryo chorioallantoic membrane in the study of tumor angiogenesis. Romanian Journal of Morphology and Embryology = Revue Roumaine de Morphologie et Embryologie 49, 131-135.
- Rice, L.B., 1998, Tn916 family conjugative transposons and dissemination of antimicrobial resistance determinants. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 42, 1871-1877.
- Rice, L.B., Carias, L., Rudin, S., Vael, C., Goossens, H., Konstabel, C., Klare, I., Nallapareddy, S.R., Huang, W., Murray, B.E., 2003, A potential virulence gene, *hylEfm*, predominates in *Enterococcus faecium* of clinical origin. The Journal of Infectious Diseases 187, 508-512.
- Rice, L.B., Eliopoulos, G.M., Wennersten, C., Goldmann, D., Jacoby, G.A., Moellering, R.C., Jr., 1991, Chromosomally mediated beta-lactamase production and gentamicin resistance in *Enterococcus faecalis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 35, 272-276.
- Richter, A., 2011, Untersuchungen zum Vorkommen von Methicillin-resistenten Staphylokokken (MRS) und Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) in Putenmastbetrieben. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin.
- Rigdon, R.H., 1961, Amyloidosis: spontaneous occurrence in white Pekin ducks. The American Journal of Pathology 39, 369-378.
- Roberts, M.C., Sutcliffe, J., Courvalin, P., Jensen, L.B., Rood, J., Seppala, H., 1999, Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 43, 2823-2830.
- Rudolph, B., 2004, Untersuchungen zu *Enterococcus faecalis* als möglicher Faktor zur Entstehung der amyloiden Arthropathie der braunen Legehennen. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin.
- Sandhu, T.S., 1988, Fecal streptococcal infection of commercial white pekin ducklings. Avian Diseases 32, 570-573.
- Santo Domingo, J.W., Siefring, S.C., Haugland, R.A., 2003, Real-time PCR method to detect *Enterococcus faecalis* in water. Biotechnology Letters 25, 261-265.
- Sapkota, A.R., Hulet, R.M., Zhang, G., McDermott, P., Kinney, E.L., Schwab, K.J., Joseph, S.W., 2011, Lower prevalence of antibiotic-resistant Enterococci on U.S. conventional poultry farms that transitioned to organic practices. Environmental Health Perspectives 119, 1622-1628.
- Schleifer, K.H., Killper-Bälz, R., 1984, Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the Genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. International Journal of Systematic Bacteriology 34, 31-34.
- Schlievert, P.M., Gahr, P.J., Assimakopoulos, A.P., Dinges, M.M., Stoehr, J.A., Harmala, J.W., Hirt, H., Dunne, G.M., 1998, Aggregation and binding substances enhance pathogenicity in rabbit models of *Enterococcus faecalis* endocarditis. Infection and Immunity 66, 218-223.
- Schwaiger, K., Bauer, J., 2008, Detection of the erythromycin rRNA methylase gene *erm(A)* in *Enterococcus faecalis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 52, 2994-2995.
- Schwaiger, K., Schmied, E.M., Bauer, J., 2010, Comparative analysis on antibiotic resistance characteristics of *Listeria* spp. and *Enterococcus* spp. isolated from laying hens and eggs in conventional and organic keeping systems in Bavaria, Germany. Zoonoses and Public Health 57, 171-180.
- Schwarz, S., Kadlec, K., Silley, P., 2013, Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin. ZETT-Verlag, Seite 8.
- Schwarz, S., Böttner, A., Hafez, H.M., Kehrenberg, C., Kietzmann, M., Klarmann, D., Klein, G., Krabisch, P., Kühn, T., Luhofer, G., Richter, A., Traeder, W., Waldmann, K.H., Wallmann, J., Werckenthin, C., 2003, Empfindlichkeitsprüfung bakterieller Infektionserreger von Tieren: Methoden zur in-vitro Empfindlichkeitsprüfung und deren Eignung in Hinblick auf die Erarbeitung therapeutisch nutzbarer Ergebnisse (2003). Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift 116, 353-361.
- Schwarz, S., Silley, P., Simjee, S., Woodford, N., van Duijkeren, E., Johnson, A.P., Gaastra, W., 2010, Editorial: assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 65, 601-604.
- Segarra, R.A., Booth, M.C., Morales, D.A., Huycke, M.M., Gilmore, M.S., 1991, Molecular characterization of the *Enterococcus faecalis* cytolysin activator. Infection and Immunity 59, 1239-1246.
- Selbitz, H.J., 2008, Stallspezifische Vakzine - Alternative oder Ergänzung. Vortrag auf dem 4. Leipziger Tierärztekongress vom 17. - 19. Januar 2008.
- Semedo, T., Santos, M.A., Lopes, M.F., Figueiredo Marques, J.J., Barreto Crespo, M.T., Tenreiro, R., 2003, Virulence factors in food, clinical and reference Enterococci: A common trait in the genus? Systematic and Applied Microbiology 26, 13-22.

- Seo, H.S., Cha, S.Y., Kang, M., Jang, H.K., 2013, Chicken embryo lethality assay for determining the virulence of *Riemerella anatipestifer* isolates. *Avian Pathology* 42, 387-392.
- Seputiene, V., Bogdaite, A., Ruzauskas, M., Suziedeliene, E., 2012, Antibiotic resistance genes and virulence factors in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from diseased farm animals: pigs, cattle and poultry. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 15, 431-438.
- Shankar, N., Baghdayan, A.S., Gilmore, M.S., 2002, Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Nature* 417, 746-750.
- Shankar, V., Baghdayan, A.S., Huycke, M.M., Lindahl, G., Gilmore, M.S., 1999, Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. *Infectious and Immunology* 67, 193-200.
- Shaw, W.V., 1983, Chloramphenicol acetyltransferase: enzymology and molecular biology. *Critical Reviews in Biochemistry* 14, 1-46.
- Shlaes, D.M., Al-Obeid, S., Shlaes, J.H., Boisivon, A., Williamson, R., 1989a, Inducible, transferable resistance to vancomycin in *Enterococcus faecium*, D399. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 23, 503-508.
- Shlaes, D.M., Bouvet, A., Devine, C., Shlaes, J.H., al-Obeid, S., Williamson, R., 1989b, Inducible, transferable resistance to vancomycin in *Enterococcus faecalis* A256. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 33, 198-203.
- Sievert, D.M., Boulton, M.L., Stoltman, G., Johnson, D., Stobierski, M.G., Downes, F.P., Somsel, P.A., Rudrik, J.T., Brown, W., Hafeez, W., Lundstrom, T., Flanagan, E., Johnson, R., Mitchell, J., Chang, S., 2002, *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin - United States, 2002. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 51, 565-567.
- Sifaoui, F., Arthur, M., Rice, L., Gutmann, L., 2001, Role of penicillin-binding protein 5 in expression of ampicillin resistance and peptidoglycan structure in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45, 2594-2597.
- Simjee, S., McDermott, P.F., White, D.G., Hofacre, C., Berghaus, R.D., Carter, P.J., Stewart, L., Liu, T., Maier, M., Maurer, J.J., 2007, Antimicrobial susceptibility and distribution of antimicrobial-resistance genes among *Enterococcus* and coagulase-negative *Staphylococcus* isolates recovered from poultry litter. *Avian Diseases* 51, 884-892.
- Singh, K.V., Weinstock, G.M., Murray, B.E., 2002, An *Enterococcus faecalis* ABC homologue (Lsa) is required for the resistance of this species to clindamycin and quinupristin-dalfopristin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46, 1845-1850.
- Singh, K.V., Qin, X., Weinstock, G.M., Murray, B.E., 1998, Generation and testing of mutants of *Enterococcus faecalis* in a mouse peritonitis model. *The Journal of Infectious Diseases* 178, 1416-1420.
- Stalker, M.J., Brash, M.L., Weisz, A., Ouckama, R.M., Slavic, D., 2010, Arthritis and osteomyelitis associated with *Enterococcus cecorum* infection in broiler and broiler breeder chickens in Ontario, Canada. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 22, 643-645.
- Stark, J.M., 1960, Antibiotic activity of haemolytic enterococci. *The Lancet* 1, 733-734.
- Sting, R., Richter, A., Popp, C., Hafez, H.M., 2013, Occurrence of vancomycin-resistant enterococci in turkey flocks. *Poultry Science* 92, 346-351.
- Stobberingh, E., van den Bogaard, A., London, N., Driessen, C., Top, J., Willems, R., 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? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43, 2215-2221.
- Sturzenhecker, K., 1995, Untersuchungen zur Virulenz von *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* am standardisierten Infektionsmodell "bebrütetes Hühnerei". Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin
- Su, Y.A., Sulavik, M.C., He, P., Makinen, K.K., Makinen, P.L., Fiedler, S., Wirth, R., Clewell, D.B., 1991, Nucleotide sequence of the gelatinase gene (*gelE*) from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*. *Infection and Immunity* 59, 415-420.
- Tankson, J.D., Thaxton, J.P., Vizzier-Thaxton, Y., 2001, Pulmonary hypertension syndrome in broilers caused by *Enterococcus faecalis*. *Infection and Immunity* 69, 6318-6322.
- Tankson, J.D., Thaxton, J.P., Vizzier-Thaxton, Y., 2002, Morphological changes in heart and lungs of broilers experiencing pulmonary hypertension syndrome caused by *Enterococcus faecalis*. *Poultry Science* 81, 365-370.
- Tendolkar, P.M., Baghdayan, A.S., Gilmore, M.S., Shankar, N., 2004, Enterococcal surface protein, *Esp*, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infection and Immunity* 72, 6032-6039.

- Thayer, S.G., Waltman, W.D., 2013, *Enterococcus*. Swayne, D. E. et al (Ed). Diseases of Poultry. 13th edition John Wiley & Sons, Inc., USA, ISBN: 978-0-470-95899-5, 981-983 and 1033-1035.
- Thiercelin, M.E., Jouhaud, L., 1903, Reproduction de l'entérocoque; taches centrales; granulations périphériques et microblastes. C.R. Séances Société Biologie 55, 686-688.
- Thurlow, L.R., Thomas, V.C., Narayanan, S., Olson, S., Fleming, S.D., Hancock, L.E., 2010, Gelatinase contributes to the pathogenesis of endocarditis caused by *Enterococcus faecalis*. *Infection and Immunity* 78, 4936-4943.
- Toala, P., McDonald, A., Wilcox, C., Finland, M., 1969, Susceptibility of group D *streptococcus* (*enterococcus*) to 21 antibiotics in vitro, with special reference to species differences. *The American Journal of the Medical Sciences* 258, 416-430.
- Torres, C., Tenorio, C., Lantero, M., Gastanares, M.J., Baquero, F., 1993, High-level penicillin resistance and penicillin-gentamicin synergy in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37, 2427-2431.
- Tremblay, C.L., Letellier, A., Quessy, S., Boulianne, M., Daignault, D., Archambault, M., 2011, Multiple-antibiotic resistance of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from cecal contents in broiler chicken and turkey flocks slaughtered in Canada and plasmid colocalization of *tetO* and *ermB* genes. *Journal of Food Protection* 74, 1639-1648.
- USDA, 19.12.2014, United States Department of Agriculture; National Antimicrobial Resistance Monitoring System. <http://www.ars.usda.gov/News/docs.htm?docid=6750&page=3>.
- Usui, M., Ozawa, S., Onozato, H., Kuge, R., Obata, Y., Uemae, T., Ngoc, P.T., Heriyanto, A., Chalemchaikit, T., Makita, K., Muramatsu, Y., Tamura, Y., 2014, Antimicrobial susceptibility of indicator bacteria isolated from chickens in Southeast Asian countries (Vietnam, Indonesia and Thailand). *Journal of Veterinary Medicine and Science* 76, 685-692.
- Uttley, A.H., Collins, C.H., Naidoo, J., George, R.C., 1988, Vancomycin-resistant enterococci. *The Lancet* 1, 57-58.
- van den Bogaard, A.E., Bruinsma, N., Stobberingh, E.E., 2000, The effect of banning avoparcin on VRE carriage in The Netherlands. *J Antimicrob Chemother* 46, 146-148.
- van Hoorebeke, S., van Immerseel, F., Berge, A.C., Persoons, D., Schulz, J., Hartung, J., Harisberger, M., Regula, G., Barco, L., Ricci, A., de Vylder, J., Ducatelle, R., Haesebrouck, F., Dewulf, J., 2011, Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* in housed laying-hen flocks in Europe. *Epidemiology and Infection* 139, 1610-1620.
- Vankerckhoven, V., Van Autgaerden, T., Vael, C., Lammens, C., Chapelle, S., Rossi, R., Jabes, D., Goossens, H., 2004, Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 4473-4479.
- van den Bogaard, A.E., Willems, R., London, N., Top, J., Stobberingh, E.E., 2002, Antibiotic resistance of faecal enterococci in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 49, 497-505.
- Velkers, F.C., van de Graaf-Bloois, L., Wagenaar, J.A., Westendorp, S.T., van Bergen, M.A., Dwars, R.M., Landman, W.J., 2011, *Enterococcus hirae*-associated endocarditis outbreaks in broiler flocks: clinical and pathological characteristics and molecular epidemiology. *The Veterinary Quarterly* 31, 3-17.
- Vergis, E.N., Shankar, N., Chow, J.W., Hayden, M.K., Snyderman, D.R., Zervos, M.J., Linden, P.K., Wagener, M.M., Muder, R.R., 2002, Association between the presence of enterococcal virulence factors gelatinase, hemolysin, and enterococcal surface protein and mortality among patients with bacteremia due to *Enterococcus faecalis*. *Clinical Infectious Diseases* 35, 570-575.
- Wallmann, J., Bender, A., Hauck, R., Reimer, I., Heberer, T., 2014, Abgabemengenerfassung antimikrobiell wirksamer Stoff in Deutschland 2013 - Auswertung er nach DIMDI-AMV eingereichten Daten 2013 und Vergleich mit den Vorjahren. *Deutsches Tierärzteblatt* 62. Jahrgang, 1234-1239.
- Wardal, E., Sadowy, E., Hryniewicz, W., 2010, Complex nature of enterococcal pheromone-responsive plasmids. *Polish Journal of Microbiology* 59, 79-87.
- Wells, C.L., Moore, E.A., Hoag, J.A., Hirt, H., Dunny, G.M., Erlandsen, S.L., 2000, Inducible expression of *Enterococcus faecalis* aggregation substance surface protein facilitates bacterial internalization by cultured enterocytes. *Infection and Immunity* 68, 7190-7194.
- Welton, L.A., Thal, L.A., Perri, M.B., Donabedian, S., McMahon, J., Chow, J.W., Zervos, M.J., 1998, Antimicrobial resistance in enterococci isolated from turkey flocks fed virginiamycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42, 705-708.
- Werckenthin, C., Schwarz, S., 2003, Kreuzresistenzen: Beurteilung von Antibiogrammen, Auswahl von antimikrobiellen Wirkstoffen für die in-vitro Empfindlichkeitsprüfung und molekulare

- Grundlagen. 22. Arbeits- und Fortbildungstagung des Arbeitskreises Veterinärmedizinischer Infektionsdiagnostik, Staffelstein, 17.-19.9.2003.
- Weisblum, B., 1995, Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39, 577-585.
- Werner, G., Hildebrandt, B., Klare, I., Witte, W., 2000, Linkage of determinants for streptogramin A, macrolide-lincosamide-streptogramin B, and chloramphenicol resistance on a conjugative plasmid in *Enterococcus faecium* and dissemination of this cluster among streptogramin-resistant enterococci. *International Journal of Medical Microbiology* 290, 543-548.
- Willems, R.J., Homan, W., Top, J., van Santen-Verheuevel, M., Tribe, D., Manziros, X., Gaillard, C., Vandembroucke-Grauls, C.M., Mascini, E.M., van Kregten, E., van Embden, J.D., Bonten, M.J., 2001, Variant *esp* gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals. *The Lancet* 357, 853-855.
- Williams, A.M., Rodrigues, U.M., Collins, M.D., 1991, Intrageneric Relationships of Enterococci as Determined by Reverse-Transcriptase Sequencing of Small-Subunit Ribosomal-Rna. *Research in Microbiology* 142, 67-74.
- Williamson, R., le Bouguenec, C., Gutmann, L., Horaud, T., 1985, One or two low affinity penicillin-binding proteins may be responsible for the range of susceptibility of *Enterococcus faecium* to benzylpenicillin. *Journal of General Microbiology* 131, 1933-1940.
- Wooley, R.E., Gibbs, P.S., Brown, T.P., Maurer, J.J., 2000, Chicken embryo lethality assay for determining the virulence of avian *Escherichia coli* isolates. *Avian Diseases* 44, 318-324.
- Wooley, R.E., Spears, K.R., Brown, J., Nolan, L.K., Fletcher, O.J., 1992, Relationship of complement resistance and selected virulence factors in pathogenic avian *Escherichia coli*. *Avian Diseases* 36, 679-684.
- Zimmermann, R.A., Moellering, R.C., Jr., Weinberg, A.N., 1971, Mechanism of resistance to antibiotic synergism in enterococci. *Journal of Bacteriology* 105, 873-879.

Danksagung

Herrn Professor Dr. Hafez danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas, die fachliche, persönliche und finanzielle Unterstützung und für die Erfahrung der Turkey Symposien.

Frau Dr. Kristin Mühldorfer danke ich für die fachliche Unterstützung und den unermüdlichen Beistand beim Anfertigen dieser Arbeit.

Mein Dank gilt auch dem Bundesinstitut für Lebensmittel und Verbraucherschutz für die Überlassung des Arbeitsplatzes, um den Mikrodilutionstest durchzuführen.

Ich danke allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Geflügelkrankheiten Berlin für ihre Hilfsbereitschaft.

Für das Mittragen der Doktorandenaufgaben und die Unterstützung in guten wie in schlechten Tagen danke ich Anne, Lara und Steffi. Mein besonderer Dank gilt Susann, ohne die alle meine Tage traurige Eule gewesen wären.

Ein großer Dank gilt Martin für alles und mehr und das Inhaltsverzeichnis.

Der wichtigste Dank zum Schluss: Danke Mama und Papa, dass ihr mir immer alles möglich gemacht und mich dabei bedingungslos unterstützt habt!

Publikationsverzeichnis

„Antimicrobial Susceptibility Patterns of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Isolated from Poultry Flocks in Germany“; Maasjost J, Mühldorfer K, Cortez de Jäckel S, Hafez HM; März 2015; Avian Diseases, 59(1):143-8

„Resistance patterns and virulence traits of enterococci isolated from turkey flocks in Germany“; Maasjost, J., Mühldorfer K., Cortez de Jäckel, S., Hafez, H.M.; 5. – 7. Juni 2014, 10. Hafez International Symposium on Turkey Diseases; 76

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt zu haben.

Zur Verwendung kamen ausschließlich die angegebenen Materialien und Methoden.

Visbek, den 03.07.2017

Julia Maasjost