

Aus dem Bundesinstitut für Risikobewertung
und
dem Institut für Lebensmittelhygiene
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Zum Vorkommen und zur Bedeutung
antibiotikaresistenter Enterokokken
im Bereich
der Fleischgewinnung
bei landwirtschaftlichen Nutztieren**

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

vorgelegt von
Linda Hultqvist
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2003

Journal-Nr. 2756

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

| | |
|--------------------|-----------------------------------|
| Dekan: | Univ.-Prof. Dr. Leo Brunenberg |
| Erster Gutachter: | Univ.-Prof. Dr. Goetz Hildebrandt |
| Zweiter Gutachter: | Priv.-Doz. Dr. Günter Klein |
| Dritter Gutachter: | Univ.-Prof. Dr. Reinhard Fries |

Deskriptoren: enterococcus, enterococcus faecium, drug resistance,
antibiotics, virginiamycin, vancomycin, growth promoters

Tag der Promotion: 24.10.2003

In Liebe
meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis:

| | Seite |
|---|-------|
| Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen und Definitionen | |
| 1. Einleitung | 1 |
| 2. Literaturübersicht | |
| 2.1 Taxonomie der Enterokokken | 3 |
| 2.2 Eigenschaften der Enterokokken | 3 |
| 2.3 Verfahren zur Prüfung der Empfindlichkeit von Antibiotika bei Enterokokken | 9 |
| 2.4 Antibiotikaresistenzen von Enterokokken | 17 |
| 2.5 Glykopeptidresistente Enterokokken | 20 |
| 2.6 Verbreitung der Glykopeptidresistenz bei Enterokokken von Nutztieren | 21 |
| 2.7 Antibiotikaresistenzdaten und Resistenzentwicklung von Enterokokken nach Literaturangaben | 24 |
| 2.8 Pulsfeldgelelektrophorese zur Typisierung von Enterokokken | 34 |
| 3. Material und Methodik | |
| 3.1 Material | 36 |
| 3.2 Methodik | |
| 3.3 Ermittlung des Antibiotikaresistenzverhaltens der isolierten Enterokokken gegenüber 23 ausgewählten Antibiotika | 42 |
| 3.4 Pulsfeldgelelektrophorese | 49 |
| 4. Ergebnisse | |
| 4.1 Erfahrungen zur Methodik | 54 |
| 4.2 Zuordnung der Isolate zur Gattung <i>Enterococcus</i> und den verschiedenen Spezies | 54 |
| 4.3 Glykopeptidresistenz der untersuchten Enterokokken | 55 |
| 4.4 Empfindlichkeitsprüfung gegen verschiedene Antibiotika | 58 |
| 4.5 Antibiotikaresistenzdaten für die Leistungsförderer | 60 |
| 4.6 Antibiotikaresistenzdaten für Therapeutika | 62 |
| 4.7 Verhalten der Enterokokkenpopulationen gegenüber den untersuchten Antibiotika | 70 |
| 4.8 Untersuchung ausgewählter Enterokokkenisolate mittels Pulsfeldgelelektrophorese | 75 |

| | Seite | |
|--------|---|-----|
| 5. | Diskussion | |
| 5.1 | Allgemeiner Versuchsansatz | 78 |
| 5.2 | Zur Speziesverteilung | 78 |
| 5.3 | Resistenz der Enterokokken für die Glykopeptide Vancomycin, Avoparcin und Teicoplanin | 79 |
| 5.4 | Empfindlichkeitsprüfung | 81 |
| 5.4.1 | Avilamycinresistenz | |
| 5.4.2 | Bacitracinresistenz | |
| 5.4.3 | Flavophospholipolresistenz | |
| 5.4.4 | Resistenz für die Ionophore Monensin und Salinomycin | |
| 5.4.5 | Resistenz für die Streptogramine Virginamycin und Synercid (Quinopristin/Dalfopristin) | |
| 5.4.6 | Resistenz für die Makrolide Tylosin, Spiramycin und Erythromycin | |
| 5.4.7 | Resistenz für einige Antibiotika der β -Lactam-Gruppe | |
| 5.4.8 | Chloramphenicolresistenz | |
| 5.4.9 | Tetracyclinresistenz | |
| 5.4.10 | Chinolonresistenz (Enrofloxacinresistenz) | |
| 5.4.11 | Resistenz für die Aminoglykoside Streptomycin und Gentamicin | |
| 5.4.12 | Resistenz für die Sulfonamid-Trimethoprim-Verbindung Cotrimoxazol | |
| 5.4.13 | Tiamulinresistenz | |
| 5.5 | Zusammenfassung der Chemotherapeutikaresistenz der untersuchten Enterokokkenisolate | 89 |
| 5.6 | Zur Verwendung von antimikrobiellen Leistungsförderern in der Tierproduktion | |
| 5.7 | Zur Verwendung von Antibiotika für therapeutische Zwecke für Nutztiere | |
| 5.8 | Zur Verwendung von Enterokokken als Probiotika und Starterkulturen für die Wurst-, Käse- und Joghurtherstellung | |
| 5.9 | Ergebnisse der Untersuchung der Enterokokken mittels PFGE | |
| 6. | Schlußfolgerungen | 96 |
| 7. | Zusammenfassung | 97 |
| 8. | Summary | 99 |
| 9. | Quellenverzeichnis | 101 |

10. Anhang 126
- Verwendete Nährmedien und Reagenzien zur Isolation und Differenzierung
 - Verwendete Nährmedien und Reagenzien zur Mikrodilution
 - Reagenzien und Lösungen für die Pulsfeldgelelektrophorese
 - Keimzahlen und Verteilung der Enterokokken in den einzelnen Proben
 - Tabellen zu den Daten der Antibiotikaresistenzprüfung der untersuchten Enterokokken
 - Tabellen zu den biochemischen Eigenschaften der untersuchten Enterokokken

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen und Definitionen

| | |
|-------------------|--|
| A | andere Verbindung aus derselben Antibiotikaklasse |
| Abb. | Abbildung |
| Art.-Nr. | Artikelnummer |
| ADATAB | Antibiotika in Tablettenform zum Auflösen |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| BHI | Brain-Heart-Infusion |
| CATC | Citrate Azide Tween Carbonate Agar Base |
| DANMAP | Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Program |
| dest. | destilliert |
| DIN | Deutsches Institut für Normung |
| DNA | Desoxyribonucleinsäure |
| <i>E.</i> | <i>Enterococcus</i> |
| EDTA | Ethylendinitrotetraessigsäure |
| EU | Europäische Union |
| FEDESA | European federation of animal health industries |
| g | Gramm |
| Grampos. | Grampositiv |
| Gramneg. | Gramnegativ |
| HACCP | Hazard Analysis and Critical Control Point System |
| HHD | Hemmhofdurchmesser |
| I | Intermediär |
| kb | Kilobasen |
| KbE | Kolonie-bildende Einheit |
| KD | Kilodalton |
| LMBG | Lebensmittel und Bedarfsgegenstände-Gesetz |
| l | Liter |
| mg | Milligramm |
| MHK | minimale Hemmkonzentration |
| MHK ₅₀ | MHK-Grenzwert von den unteren 50 % der getesteten Stämme |
| MHK ₉₀ | MHK-Grenzwert von den unteren 90 % der getesteten Stämme |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| Mol | diejenige Menge eines chemisch einheitlichen Stoffes in Gramm, die seiner relativen Molekularmasse in Gramm entspricht |
| N | Anzahl |

| | |
|--------|--|
| NaCl | Natriumchlorid |
| NCCLS | National Committee for Clinical Laboratory Standards |
| NIPED | Nosokomiale Infektionen in Deutschland |
| PFGE | Pulsfeldgelelektrophorese |
| % res. | prozentual resistent |
| rRNA | ribosomale Ribonucleinsäure |
| R | resistent |
| S | sensibel |
| spp. | Subspezies |
| TE | Tris-EDTA-Puffer |
| TN | Transposon |
| TPL | Teicoplanin |
| TTC | Tetrazolium |
| U | Umdrehungen |
| UPGMA | Unweighted Pair Group Method by Arithmetic Averages |
| VAN | Vancomycin |
| VRBG | Violet Red Bile Glucose Agar |
| VRE | vancomycinresistente Enterokokken |
| X | in der Untersuchung enthalten |
| µg | Mikrogramm |
| ./. | keine Angaben |

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Hildebrandt danke ich für seine Bereitschaft das Dissertationsvorhaben am Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität zu betreuen und zu unterstützen.

Bei Herrn Dr. Ellerbroek vom Bundesinstitut für Risikobewertung möchte ich mich ganz herzlich für die wissenschaftliche Anleitung, die vielen Hinweise und Hilfen sowie die Bereitstellung der materiellen Voraussetzungen bedanken.

Für den Einstieg in das Verständnis der Antibiotikaresistenzdaten bedanke ich mich bei Herrn Dr. Trolldenier vom Bundesinstitut für Risikobewertung.

Für den ersten mikrobiologischen Kontakt mit den Enterokokken und die praktischen Laborhinweise bedanke ich mich bei Frau Dittmar und Frau Fester vom Bundesinstitut für Risikobewertung.

Herrn Dr. Devriese, Herrn Dr. Butaye von der Universität Gent und COST danke ich für ein sehr interessantes und lehrreiches Praktikum.

Für die praktische Hilfe beim Einstieg in die Pulsfeldgelelektrophorese danke ich Herrn Roland Lemke und Professor Dr. Bülte von der Universität Giessen.

Ganz herzlich möchte ich mich für die Hilfe mit der Mikrodilution bei Frau Dr. Wagner und Frau Orso vom Benjamin-Franklin-Krankenhaus bedanken.

Den an den Untersuchungen beteiligten Veterinärämtern der Schlachthöfe möchte ich für ihr Entgegenkommen und die freundliche Unterstützung danken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden für die ausdauernde Unterstützung und Anteilnahme.

Lebenslauf

Name: Linda Hultqvist

geboren am: 24.08.1971

Geburtsort: Berlin

Eltern: Gretel Bouchette, geb. Tempel
Jürgen Bouchette

Familienstand: verheiratet

Nationalität: deutsch

Schulbildung: 1978-1981 Paul-Eipper-Grundschule
1981-1991 Canisius-Kolleg

Studium: 1991-1997 Studium der Veterinär-
medizin an der Freien Universität
Berlin

Approbation als Tierärztin: Juli 1997

Promotion: seit März 1998

Beruf: Leiterin der Qualitätssicherung

Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe.

Ich versichere, daß ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 04.08.2003

Linda Hultqvist