

3. Eigene Untersuchungen

Die Isolierung der Enterokokkenstämme wurde in Anlehnung an die Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 Lebensmittel- und Bedarfsgegenstände-gesetz (LMBG), Nr. L 06.00-32: Untersuchung von Lebensmitteln - Bestimmung von *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium* in Fleisch und Fleischerzeugnissen (Referenzverfahren) in der Fassung vom Juni 1992 durchgeführt. Die Speziesbestimmung der Enterokokkenisolate erfolgte nach den in Kapitel 2.2. – „Spezies des Genus *Enterococcus*“ – genannten Kriterien. Die Untersuchung des Resistenzverhaltens beruhte auf den Vorgaben der Hersteller des Sensititre^(R)- und Etest^(R)-Verfahrens.

3.1. Material

Die Nährmedien, Reagenzien, Arbeitsgeräte und Kontrollstämme, die für den Transport der Proben, ihre Anreicherung, die Isolation und Differenzierung der Enterokokkenstämme, Bestimmung deren Resistenzverhaltens und Nachweis von Resistenzgenen eingesetzt wurden, sollen im Folgenden kurz dargestellt werden.

3.1.1. Verwendete Nährmedien und Reagenzien

a. Transport und Anreicherung

Für den Transport der Schlachtkörperoberflächen- und Kottupfer (siehe auch Kapitel 3.2.1. „Probennahme“) in das Laboratorium wurde als Nährmedium 0,1%iges NaCl-Peptonwasser in folgender Zusammensetzung verwendet:

NaCl-Peptonwasser, 0,1 %ig

Permutitwasser	5,0 l
NaCl, Natriumchlorid	
Merck, Art.-Nr. 106400	42,5 g
Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut	
Merck, Art.-Nr. 107216	0,1 %

20 Minuten bei 121 °C autoklavieren, der pH-Wert wird auf 7,4 eingestellt.

Für die selektive Anreicherung von *Enterococcus* spp. aus den Tupferproben wurde Chromocult Enterokokken-Bouillon nach folgender Rezeptur eingesetzt:

Chromocult Enterokokken-Bouillon

Merck, Art.-Nr. 110294

Peptonmischung	8,6 g/l
Natriumazid	0,6 g/l
Natriumchlorid	6,4 g/l
5-Bromo-4-Indolyl- β -D-Glucopyranosid (x-Glu)	0,04 g/l

18 g/l (einfach konzentriert) lösen, abfüllen, autoklavieren (15 Min. bei 121 °C).
Der pH-Wert wird auf 7,5 bei 25 °C eingestellt. Die zubereitete Bouillon ist klar und gelblich.

Als Anreicherungsmedium für die Lebensmittelproben kam 1%iges Peptonwasser zum Einsatz:

Peptonwasser, 1 %ig

Trockensubstanz der Firma Merck, Art. Nr. 107228

Pepton	10,0 g/l
NaCl	5,0 g/l
Natriumhydrogenphosphat	9,0 g/l
Kaliumhydrogenphosphat	1,5 g/l

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

b. Isolierung und Differenzierung

Für die spezifische Isolierung von Enterokokken aus Probenmaterial wurde CATC-Agar verwendet:

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

Trockennährbodenbasis der Firma Merck, Art.-Nr. 110279

Pepton aus Casein	15,0 g/l
Hefeextrakt	5,0 g/l
Kaliumdihydrogenphosphat	5,0 g/l
Natriumcitrat	15,0 g/l
Tween 80	1,0 g/l
Agar-Agar	15,0 g/l

Zusätzlich:

Natriumcarbonat	2,0 g/l
2,3,5 – Triphenyltetrazoliumchlorid	0,1 g/l
Natriumazid	0,4 g/l

56 g/l lösen, autoklavieren. Bei etwa 50 °C 20 ml/l einer 10%igen Lösung von Natriumcarbonat (Merck, Art.-Nr. 6392), 10 ml/l einer 1% igen Lösung von 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (Merck, Art.-Nr. 8380) und 4 ml/l einer 10%igen Lösung von Natriumazid (Merck, Art.-Nr. 6688) einmischen. Platten gießen. pH: 7,0±0,1.

Die Untersuchung der Proben auf das Vorkommen vancomycinresistenter Enterokokken erfolgte mit CATC-Agar, der pro Liter mit 6 mg Vancomycin supplementiert worden war und folgendes Herstellungsschema besaß:

CATC-Agar supplementiert mit 6 mg/l Vancomycin

CATC-Agar, siehe oben

Vancomycin Hydrochlorid, Sigma

CATC wird hergestellt, wie oben beschrieben. Vancomycin wird in Aqua dest. gelöst und sterilfiltriert (Porengröße von 0,2 µm) in den 45-50 °C warmen CATC-Agar eingemischt.

Die weiteren Schritte der Isolierung und Differenzierung erfolgten mit Koloniematerial von Columbia-Schafblut-Agar, auf welchen die von CATC-Agar und CATC-Agar mit Vancomycin gewonnenen Kolonien überimpft worden waren und der folgender Zusammensetzung entsprach:

Columbia Agar (Merck, Art.-Nr. 110455), supplementiert mit 5 % Schafblut

Spezial-Nährsubstrat	23,0 g/l
Stärke	1,0 g/l
Natriumchlorid	5,0 g/l
Agar-Agar	13,0 g/l
Schafblut	5 %

42 g/l lösen, autoklavieren. Auf 50 bis 45 °C abkühlen, in 95 ml sterilen Basisnährboden 5 ml Blut homogen einmischen. pH: 7,3±0,1. Platten gießen.

Für die Beimpfung der Mehrzahl der Zuckerlösungen und des Hochschicht-Nähragars sowie die langfristige Aufbewahrung der Enterokokkenstämme wurde BHI-Bouillon eingesetzt:

BHI – Bouillon (Brain-Heart-Infusion-Bouillon, Hirn-Herz-Bouillon)

Merck, Art.-Nr. 110493

Nährsubstrat (Hirn-, Herzextrakt u. Peptone)	27,5 g/l
D(+)-Glucose	2,0 g/l
Natriumchlorid	5,0 g/l
di-Natriumhydrogenphosphat	2,5 g/l

37 g/l lösen, autoklavieren. pH: $7,4 \pm 0,2$. Für die Aufbewahrung der Enterokokkenstämme bei -80 °C werden der beimpften Bouillon ca. 10% (Volumen) sterilen Glycerins beigemischt.

BHI-Bouillon, die mit 6,5% Kochsalz supplementiert worden war, diente der Kontrolle des Wachstums der Isolate unter dieser Bedingung:

BHI – Bouillon, supplementiert mit 6,5 % NaCl

BHI-Bouillon, Rezept siehe oben

NaCl, Natriumchlorid

Merck, Art.-Nr. 106400 6,5 %

Die Beweglichkeit der Stämme wurde mit Hilfe von SIM-Agar getestet, der folgende Zusammensetzung hatte:

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

Merck, Art.-Nr. 105470

Pepton aus Casein	20,0 g/l
Pepton aus Fleisch	6,6 g/l
Eisen-(III)-ammoniumcitrat	0,2 g/l
Natriumthiosulfat	0,2 g/l
Agar-Agar	3,0 g/l

30 g/l lösen, in Röhren ca. 4 cm hoch abfüllen, autoklavieren. pH: $7,3 \pm 0,1$.

Die Grundlage der Zuckerlösungen war die Barsikow-Stammlösung. Sie wurden nach folgendem Verfahren hergestellt:

Barsikow-Stammlösung für Kohlenhydratspaltungstests

Wasser	2.000 ml
NaCl	10 g
Witte-Pepton	20 g
Indikator (1,5 % Bromthymolblau)	10 ml

45 Minuten bei 110-120 °C autoklavieren, anschließend 90 Minuten auf 100 °C erwärmen. Der Zucker (siehe unter Reagenzien) wird nach dem Autoklavieren zugesetzt, so daß eine 1 %ige Zuckerlösung entsteht, diese wird fraktioniert an 2 Tagen jeweils 20 Minuten auf 100 °C erwärmt.

Die Kontrolle auf das Vorhandensein des Enzymes Arginindihydrolase erfolgte mit Hilfe von L-Argininhydrochlorid-Lösung. Diese besaß folgende Zusammensetzung:

L-Argininhydrochlorid-Lösung

Basismedium:

Pepton, peptisch verdaut	5,0 g
Fleischextrakt	5,0 g
Bromkresolpurpur (0,2%ige Lösung, siehe unten)	5,0 ml
Kresolrot (0,2%ige Lösung, siehe unten)	2,5 ml
Glukose	0,5 g
Pyridoxal	5,0 mg
Aqua dest.	ad 1000,0 ml

Nach Lösung der Substanzen pH 6,5 einstellen, dann erst die Indikatorlösungen zufügen. Basismedium nun in 4 Portionen zu 250 ml in 4 Kölbchen verteilen.

Bromkresolpurpurlösung:

Bromkresolpurpur	1,0 g
M/10 NaOH	25,0ml
Aqua dest.	ad 475,0

Kresolrotlösung:

Kresolrot	1,0 g
Aqua dest.	ad 500,0 ml

Endgültiges Testsubstrat:

Zu 3 Kölbchen das L-Argininhydrochlorid in der Endkonzentration von 1 %, d.h. je 2,5 g, zusetzen; das 4.Kölbchen bleibt ohne Zusatz (Kontrolle), pH überprüfen und ggf. neu auf 6,5 einstellen, abfüllen in Röhrchen zu 3 ml, 10 Minuten bei 121 °C autoklavieren.

Der Pyruvat-Test, der zum Nachweis von *E. faecalis* eingesetzt wurde, entsprach folgender Rezeptur:

Pyruvat-Test

Trypton (Difco)	10 g
Hefeextrakt (Difco)	5 g
Kaliumhydrogenphosphat	5 g
NaCl	5 g
Natriumpyruvat	10 g
Bromthymolblau	0,04 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

Jeweils 2 ml in Röhrchen abfüllen und fraktioniert erhitzen (3 x 100°C). Natriumpyruvat vor dem Erhitzen zugeben. Der pH wird auf 7,2 - 7,4 eingestellt.

Reagenzien

Zur Kontrolle auf das enterokokkentypische Enzym Pyrrolidonylarylamidase wurde der **Pyrrolidonylarylamidase-Test** (O.B.I.S. PYR Test, ID580M, Oxoid) eingesetzt. Der Katalase-Test wurde mit **3%iger Wasserstoffperoxidlösung** durchgeführt. Für die Kohlenhydratspaltungstests wurden **L-Arabinose** (L[+]-Arabinose, Merck, Art.101492), **D-Raffinose** (Raffinose [Pentahydrat], Merck, Art. 107419), **Methyl-alpha-D-Glucopyranosid** (Methyl-alpha-D-Glucopyranoside, Sigma, Art. 9376), **Ribose** (D[-]-Ribose, Merck, Art. 107605), **Melibiose** (Melibiose-Monohydrat, Merck, Art. 112240), **Melezitose** (alpha-D-Melezitose, Serva, Art. 28550) sowie **L-Sorbose** (L[-]-Sorbose, Sigma, Prod.-Nr. S 2001) verwendet. Darüber hinaus wurde der Abbau von **Mannitol** (D[-]-Mannit, Merck, Art. 105982) und **Sorbitol** (D[-]-Sorbit reinst für die Mikrobiologie, Merck, Art. 107758) untersucht.

c. Bestimmung der Minimalen Hemmstoffkonzentration im Mikrodilutionsverfahren

Für die Anzucht der Enterokokkenisolate aus der Stammsammlung wurde **Columbia Agar supplementiert mit 5% Schafblut** (Zusammensetzung siehe unter b. Isolierung und Differenzierung) verwendet. Mit **sterilem Aqua dest.** wurde anschließend eine definierte Keimdichte eingestellt (siehe Kapitel 3.2.4. „Ermittlung der Minimalen Hemmstoffkonzentrationen ausgewählter Isolate gegenüber 16 Antibiotika“). Zur Befüllung der Sensititre-Mikrotitrationsplatten diente eine Suspension der Isolate in Mueller Hinton II Broth:

Mueller Hinton II Broth, Cation Adjusted

Becton Dickinson and Company, Cockeysville (USA)

Rindfleischextrakt	3,0 g/l
säurehydrolysiertes Casein	17,5 g/l
Stärke	1,5 g/l

Kationen sind eingestellt auf:

Kalzium	20 – 25 mg/l
Magnesium	10 – 12,5 mg/l

22 g pro Liter in deionisiertem Wasser lösen und sorgfältig durchmischen. Unter ständigem Rühren erhitzen und bis zur vollständigen Lösung 1 Minute kochen. Autoklavieren bei 116 – 121 °C für 10 Minuten.

Zur Kontrolle der Dichte und der Reinheit des Inokulums wurde anschließend **NaCl-Peptonwasser, 0,1%ig** (Zusammensetzung siehe unter a. Transport und Anreicherung) mit der Mueller Hinton II Broth-Suspension beimpft und auf Schafblutagar ausgebracht:

Schafblutagar, Standard

Oxoid CM 55

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

5 – 10% defibriniertes Schafsblut

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

Die eigentliche Bestimmung der Minimalen Hemmstoffkonzentrationen erfolgte mit Hilfe von Mikrotitrationsplatten im Sensititre^(R)-Verfahren. Es kamen zwei Plattenarten zum Einsatz (DBMBGVE1 und -2), die verschiedene, im folgenden näher beschriebene Belegungen mit Antibiotika aufwiesen (s. Abb. 3a-b):

Sensititre^(R)-Mikrotitrationsplatten

Trek Diagnostic Systems Ltd., Imberhorne Lane, East Grinstead, West Sussex, England.

DBMBGVE1, Lot-Nr.: B1133, Verfallsdatum : 28.03.03

DBMBGVE2, Lot-Nr.: B1182, Verfallsdatum : 01.11.02

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CHL 256	CHL 128	CHL 64	CHL 32	CHL 16	CHL 8	CHL 4	CHL 2	CHL 1	CHL 0,5	CHL 0,25	CHL 0,12
B	AVL 128	AVL 64	AVL 32	AVL 16	AVL 8	AVL 4	AVL 2	AVL 1	AVL 0,5	AVL 0,25	AVL 0,12	AVL 0,06
C	ERY 256	ERY 128	ERY 64	ERY 32	ERY 16	ERY 8	ERY 4	ERY 2	ERY 1	ERY 0,5	ERY 0,25	ERY 0,12
D	TET 256	TET 128	TET 64	TET 32	TET 16	TET 8	TET 4	TET 2	TET 1	TET 0,5	TET 0,25	TET 0,12
E	AMP 128	AMP 64	AMP 32	AMP 16	AMP 8	AMP 4	AMP 2	AMP 1	AMP 0,5	AMP 0,25	AMP 0,12	AMP 0,06
F	VAN 256	VAN 128	VAN 64	VAN 32	VAN 16	VAN 8	VAN 4	VAN 2	VAN 1	VAN 0,5	VAN 0,25	VAN 0,12
G	PEN 128	PEN 64	PEN 32	PEN 16	PEN 8	PEN 4	PEN 2	PEN 1	PEN 0,5	PEN 0,25	PEN 0,12	PEN 0,06
H	SXT 64/ 1216	SXT 32/ 608	SXT 16/ 304	SXT 8/ 152	SXT 4/ 76	SXT 2/ 38	SXT 1/ 19	SXT 0,5/ 9,5	SXT 0,25/ 4,75	SXT 0,12/ 2,38	POS CON	POS CON

Abb. 3a: Belegungsschema DBMBGVE1

Bedeutung der Abkürzungen:

CHL Chloramphenicol

AVL Avilamycin

ERY Erythromycin

TET Tetrazyklin

AMP Ampicillin

VAN Vancomycin

PEN Penicillin G

SXT Trimethoprim + Sulfamethoxazol im Verhältnis 1 : 19

POS CON Positivkontrolle

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	FLV 256	FLV 128	FLV 64	FLV 32	FLV 16	FLV 8	FLV 4	FLV 2	FLV 1	FLV 0,5	FLV 0,25	FLV 0,12
B	SYN 128	SYN 64	SYN 32	SYN 16	SYN 8	SYN 4	SYN 2	SYN 1	SYN 0,5	SYN 0,25	SYN 0,12	SYN 0,06
C	ENR 128	ENR 64	ENR 32	ENR 16	ENR 8	ENR 4	ENR 2	ENR 1	ENR 0,5	ENR 0,25	ENR 0,12	ENR 0,06
D	GEN 256	GEN 128	GEN 64	GEN 32	GEN 16	GEN 8	GEN 4	GEN 2	GEN 1	GEN 0,5	GEN 0,25	GEN 0,12
E	TYL 128	TYL 64	TYL 32	TYL 16	TYL 8	TYL 4	TYL 2	TYL 1	TYL 0,5	TYL 0,25	TYL 0,12	TYL 0,06
F	TEI 256	TEI 128	TEI 64	TEI 32	TEI 16	TEI 8	TEI 4	TEI 2	TEI 1	TEI 0,5	TEI 0,25	TEI 0,12
G	BAC 128	BAC 64	BAC 32	BAC 16	BAC 8	BAC 4	BAC 2	BAC 1	BAC 0,5	BAC 0,25	BAC 0,12	BAC 0,06
H	AMC 64/ 32	AMC 32/ 16	AMC 16/ 8	AMC 8/4	AMC 4/2	AMC 2/1	AMC 1/ 0,5	AMC 0,5/ 0,25	AMC 0,25/ 0,12	AMC 0,12/ 0,06	POS CON	POS CON

Abb. 3b: Belegungsschema DBMBGVE2

Bedeutung der Abkürzungen :

FLV	Flavomycin
SYN	Quinupristin/Dalfopristin
ENR	Enrofloxacin
GEN	Gentamicin
TYL	Tylosintartrat
TEI	Teicoplanin
BAC	Bacitracin
AMC	Amoxicillin + Clavulansäure im Verhältnis 2:1
POS CON	Positivkontrolle

Alle Werte (DBMBGVE1 und 2) in mg/l bei einem Befüllungsvolumen von 50 µl.

d. Bestimmung der Gentamicin-Hochresistenz

Zur Bestimmung der Hochresistenz gegen Gentamicin wurden die entsprechenden Stämme auf **Schafblutagar, Standard** (Zusammensetzung siehe oben) angezüchtet, in **BHI-Bouillon** (Brain-Heart-Infusion-Bouillon, Rezeptur siehe oben) überimpft und bebrütet, in **physiologischer Kochsalzlösung** (0,9%ige NaCl-Lösung, steril) auf eine definierte Keimdichte eingestellt und auf BHI-Agar ausgebracht, der die folgende Zusammensetzung hatte:

BHI-Agar (Brain-Heart-Agar)

Trockennährbodenbasis der Firma Merck, Art.-Nr. 113825

Nährsubstrat (Hirn-, Herzextrakt u. Peptone)	27,5 g/l
D(+)-Glucose	2,0 g/l
Natriumchlorid	5,0 g/l
di-Natriumhydrogenphosphat	2,5 g/l
Agar-Agar	15,0 g/l

52 g/l lösen, autoklavieren. pH: 7,4 \pm 0,2.

Die Bestimmung der Minimalen Hemmstoffkonzentration erfolgte in diesem Fall mit **Etest^(R)**-Streifen (Gentamicin high range, AB BIODISK, Bestell-Nr.: 16VO1278), wie in Kapitel 3.2.4. beschrieben.

e. Nährmedien, Reagenzien und Lösungen zur Bestimmung der Resistenzgene mit der Polymerasekettenreaktion

Detaillierte Angaben zu den Nährmedien, Reagenzien und Lösungen, die für die Durchführung der PCR benötigt wurden, finden sich bei MAC et al. (2002). Kurzgefaßt handelte es sich um folgende Substanzen: *vanA*-, *vanB*-, *vanC1*- und *vanC2*-Primer (TIB Molbiol, Berlin), 10X-PCR-Fertigpuffer (Qbiogene, Heidelberg), 10mM Desoxynucleosid-Triphosphate (Qbiogene, Heidelberg), Taq-DNA Polymerase (Qbiogene, Heidelberg), 25mM MgCl₂-Lösung (Qbiogene, Heidelberg), Agarose Type II Medium EEO (Sigma, Taufkirchen), Tris-Acetat-EDTA-Puffer, Größenmarker VI (Boehringer, Mannheim), Chelex 100 Resin (Bio-Rad), Bromphenolblau (BPB, Merck), Ficoll 400 (Pharmacia), Ethidiumbromid (Boehringer, Mannheim). Einen Überblick über die verwendeten Primer gibt Tabelle 8.

Tab. 8: Für die Bestimmung von Vancomycin-Resistenzgenen verwendete Primer (modifiziert nach MAC et al., 2002)

Primer	Sequenz
<i>vanA</i>	5'-TCT GCA ATA GAG ATA GCC GC-3' 5'-GG AGT AGC TAT CCC AGC ATT-3'
<i>vanB</i>	5'-CAT CGC CGT CCC CGA ATT TCA AA-3' 5'-GAT GCG GAA GAT ACC GTG GCT-3'
<i>vanC1</i>	5'-GAC CCG CTG AAA TAT GAA G-3' 5'-CGG CTT GAT AAA GAT CGG G-3'
<i>vanC2</i>	5'-CTC CTA CGA TTC TCT TG-3' 5'-CGA GCA AGA CCT TTA AG-3'

3.1.2 Arbeitsgeräte

Erforderlich war eine übliche Ausstattung eines mikrobiologischen Labors (Sterilisator, Brutschränke, Glaswaren, Messpipetten, kleine Petrischalen, Spatel, Impfösen, Mikroskop). Für die einzelnen Teilschritte der Untersuchung wurden darüber hinaus folgende Geräte verwendet:

Zur Entnahme der Schlachtkörperoberflächen- und Kotproben wurden **sterile Abstrichbestecke** (nerbe plus, Art.-Nr. 090450) benutzt. Die für die Untersuchung benötigten Mengen der Lebensmittelproben und des Peptonwassers wurden mit Hilfe einer **Sartorius Waage** (Typ LC 480 1P) eingewogen und in einem **Stomacher-Gerät** (lab Blender, Model 4000) homogenisiert. Bei der mikrobiologischen Arbeit im Labor kamen darüber hinaus **Reagenzglasschüttler** (Heidolph, Typ 54111), **Eppendorf-Pipetten** (verschiedene Größen, Eppendorf) sowie Pipettierhelfer (**pipetus-akku**, Hirschmann Laborgeräte) zum Einsatz. Die Bebrütung der Proben erfolgte in einem **Brut-Kühlschrank BK 6160** (Heraeus instruments), die Aufbewahrung der Stammsammlung in einem **Ultra Tiefkühlschrank** (HFU 586, Heraeus instruments). Für die MHK-Bestimmung wurden darüber hinaus ein **Densimat** (bioMerieux sa, Marcy-l'Etoile, Frankreich), ein **Sensititre^(R) –Autoinoculator** sowie ein **Sensitouch-Ablesegerät** (beide Sensititre Ltd., West Sussex, England) eingesetzt. Die PCR wurde in einem **Thermocycler** (GeneAmp 9600, Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt.

3.1.3 Kontrollstämme

Einen Überblick über die für die Qualitätsprüfung der Nährmedien eingesetzten Kontrollstämme gibt Tabelle 9.

Tabelle 10 zeigt die für die Qualitätsprüfung der Sensititre^(R)-Mikrotitrationsplatten verwendeten Kontrollstämme und deren Referenzbereiche.

Tab. 9: Kontrollstämme für die Nährmedien-Qualitätsprüfung

Medium	Positivkontrolle	Negativkontrolle
L-Arabinose	<i>E. avium</i> ATCC 14025	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212
Arginin	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>E. avium</i> ATCC 14025
α-D-Methyl-Glucopyranosid	<i>E. avium</i> ATCC 14025	<i>E. faecium</i> ATCC 6057
L-Sorbose	<i>E. avium</i> ATCC 14025	<i>E. casseliflavus</i> ATCC 25788
Mannitol	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>E. hirae</i> W 733
Melibiose	<i>E. casseliflavus</i> ATCC 25788	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212
Melezitose	<i>E. avium</i> ATCC 14025	<i>E. faecium</i> ATCC 6057
D-Raffinose	<i>E. avium</i> ATCC 14025	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212
Ribose	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>Str. bovis</i> 985 Gent
Sorbitol	<i>E. avium</i> ATCC 14025	<i>E. casseliflavus</i> ATCC 25788
Pyruvat	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>E. faecium</i> ATCC 6057
SIM-Agar	<i>E. gallinarum</i> BM 4174	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212
BHI+6,5% NaCl	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>Str. bovis</i> 985 Gent
CATC-Agar	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>Str. bovis</i> 985 Gent
CATC-Agar+6mg/l Vancomycin	<i>E. faecalis</i> 1528	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212

Tab. 10: MHK-Referenzbereiche der Kontrollstämmen für die Qualitätsprüfung der Mikrotitrationsplatten (alle Werte in mg/l)

Antimikrobieller Wirkstoff	MHK-Referenzbereich von		
	<i>Staph. aureus</i> ATCC 29213	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>E. coli</i> ATCC 25922
Penicillin	0,25 - 2	1 - 4	
Ampicillin	0,25 - 1	0,5 - 2	2 - 8
Amoxicillin/Clavulansäure	0,12 - 0,5*	0,25 - 1*	2 - 8*
Gentamicin	0,12 - 1	4 - 16	0,25 - 1
Tetrazyklin	0,12 - 1	8 - 32	0,5 - 2
Erythromycin	0,25 - 1	1 - 4	
Vancomycin	0,5 - 2	1 - 4	
Teicoplanin	0,25 - 1	0,06 - 0,25	
Enrofloxacin	0,06 - 0,25	0,12 - 1	0,008 - 0,03
Quinupristin/Dalfopristin	0,12 - 0,5	2 - 8	
Chloramphenicol	4 - 16	4 - 16	2 - 8
Trimethoprim/Sulfamethoxazol	≤0,5/9,5	≤0,5/9,5	≤0,5/9,5
Flavomycin	0,06 - 0,25	0,25 - 1	
Avilamycin	2 - 8	0,5 - 4	

*: Die angegebenen Werte beziehen sich auf die Amoxicillinkonzentration.

3.2. Methode

Die Untersuchungen wurden mit dem Ziel durchgeführt, landwirtschaftliche Nutztiere (Rind und Schwein) sowie von diesen Tierarten gewonnene Lebensmittel auf das Vorkommen von Enterokokken zu überprüfen, die Spezies und das Resistenzverhalten der dabei isolierten Enterokokkenstämme zu bestimmen und die Resistenzgene (in erster Linie *vanA*, *vanB*, *vanC1* und *vanC2*) bei vancomycinresistenten Stämmen nachzuweisen.

3.2.1. Probennahme

In verschiedenen Bundesländern (Schleswig-Holstein, Niedersachsen, Nordrhein-Westfalen, Baden-Württemberg, Bayern, Sachsen, Brandenburg und Sachsen-Anhalt) wurden auf EG-zugelassenen Schlachthöfen Tupferproben von Kälbern, Jungbullen und Mastschweinen, jeweils von der Schlachtkörperoberfläche und aus dem Rektum, genommen. Die Probe von der Schlachtkörperoberfläche wurde genommen, indem beim Schwein eine etwa handtellergroße Fläche der Haut des Sternums mit einem angefeuchteten Tupfer abgestrichen wurde. Beim Rind wurde gleichermaßen an der Palmarseite der Vorderhese verfahren. Die Probe aus dem Rektum wurde entnommen, indem sowohl beim Schwein als auch beim Rind ein trockener Tupfer in den Enddarm eingeführt wurde. Alle Tupfer wurden anschließend in 1 ml 0,1%igem Peptonwasser bei 4°C zur weiteren Aufarbeitung in das Labor transportiert.

Parallel wurden im Einzelhandel des jeweiligen Bundeslandes Lebensmittel aus der Region gekauft (zusätzlich wurden in Berlin Lebensmittel aus der Region Berlin/Brandenburg gekauft). Der Schwerpunkt lag dabei auf Hackfleisch, Rohwurst, Schinken und Weichkäse, da in diesen Lebensmitteln ein Vorkommen von Enterokokken tierischen Ursprungs theoretisch möglich ist. Auch die Lebensmittel wurden bei 4°C zur weiteren Untersuchung transportiert. Einen Überblick über die Anzahl der aus den einzelnen Bundesländern untersuchten Schlachtierherden und Lebensmittelproben gibt Tabelle 11.

Tab. 11: Anzahl der aus den einzelnen Bundesländern untersuchten Schlacht tierherden und Lebensmittelproben

Region	Anzahl der untersuchten Herden bzw. Proben		
	Rinder	Schweine	Lebensmittel
Berlin/Brandenburg	5	9	96
Sachsen-Anhalt	5	6	24
Niedersachsen	21	6	3
Bayern	11	24	10
Schleswig-Holstein	9	12	11
Nordrhein-Westfalen	4	22	17
Sachsen	5	0	4
Baden-Württemberg	0	18	1
gesamt	60	97	166

3.2.2. Probenaufarbeitung und Isolierung der Enterokokkenstämme

Die Tupfer befanden sich jeweils in 1 ml 0,1%igem NaCl-Peptonwasser. Nach gründlicher Durchmischung wurden je 0,1 ml der Flüssigkeit auf CATC-Agar und auf CATC-Agar mit 6 mg/l Vancomycin mit einem Drigalskispatel verteilt. Weitere 0,1 ml wurden in 3 ml Chromocultanreicherungsbouillon verbracht. Die beimpften Medien wurden anschließend 24 h bei 37°C bebrütet und die CATC- sowie CATC + Vancomycin-Agar-Platten nach der Bebrütung noch 24 h bei Tageslicht nachinkubiert.

Von den Lebensmittelproben wurden 10 g in 90 ml gepuffertem 1%igem Peptonwasser im Stomacher homogenisiert. Im Anschluß wurden sofort je 0,1 ml des Homogenisates auf CATC-Agar und CATC-Agar mit 6 mg/l Vancomycin ausgebracht. Zur Bestimmung der Enterokokken-Keimzahl wurde das Tropfplattenverfahren auf CATC-Agar angewendet. Alle Agarplatten und das Lebensmittel-Peptonwasser-Homogenisat wurden danach für 24 h bei 37°C bebrütet und die Agarplatten anschließend noch für 24 h bei Tageslicht nachinkubiert.

Waren auf einer CATC- bzw. CATC+Vancomycin-Platte weniger als 3 enterokokkenverdächtige Kolonien gewachsen, wurden 0,1 ml der entsprechenden Chromocultanreicherung (aus den Tupferproben von Rind und Schwein) bzw. 0,1 ml der Peptonwasseranreicherung (aus den Lebensmitteln) auf eine neue Platte desselben Typs ausgebracht und verspatelt.

Pro Tupfer- und Lebensmittelprobe wurden anschließend maximal 3 morphologisch möglichst unterschiedliche Kolonien von CATC-Agar sowie ebenfalls maximal 3 morphologisch möglichst unterschiedliche Kolonien von CATC+Vancomycin-Agar auf Columbia-Schafblut-Agar überimpft.

Nach 24-stündiger Bebrütung bei 37 °C wurde eine Einzelkolonie von dem Columbia-Schafblut-Agar auf eine neue Platte Columbia-Schafblut-Agar überimpft und diese mit dem Boden nach oben unter aeroben Bedingungen 20-24 h lang bei 37°C bebrütet, um garantiert eine Reinkultur zu erhalten.

3.2.3. Bestätigungs- und Identifizierungsreaktionen

Ausgehend von diesen Reinkulturen erfolgte durch eine Reihe von Tests zum einen die Bestätigung der Gattung *Enterococcus*, zum anderen die Speziesidentifizierung.

Zur Überprüfung, ob es sich bei den gewonnenen Stämmen tatsächlich um Enterokokken handelt, wurden herangezogen: Katalase-Test, Pyrrolidonylarylamidase (PYRase-)–Test und Kontrolle auf Wachstum in BHI-Bouillon mit Zusatz von 6,5% Natriumchlorid.

Der Katalasetest wurde durchgeführt, indem wenig Koloniematerial des zu prüfenden Stammes mit einer Platinöse auf einen Objektträger aufgebracht und anschließend mit einem Tropfen 3%iger Wasserstoffperoxidlösung überschichtet wurde. Erfolgte keine oder nur eine sehr geringe Gasbildung mit großer zeitlicher Verzögerung, wurde der betreffende Stamm als Katalase-negativ angesehen und weiter untersucht, bei sofortiger intensiver Gasbildung galt der Stamm als Katalase-positiv und wurde von der weiteren Untersuchung ausgeschlossen. Zur Kontrolle der Funktionstüchtigkeit der Wasserstoffperoxidlösung wurde (als Positivkontrolle) immer ein *Staphylococcus aureus*–Stamm mit überprüft.

Der Pyrrolidonylarylamidase-Test erfolgte mit Hilfe eines von Oxoid entwickelten Test-Kits. Hier wurde mit einer Platinöse Koloniematerial des zu untersuchenden Stammes auf das Testfeld aufgetragen, mit einem Tropfen Pufferlösung benetzt, fünf Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert und mit einem Tropfen Reaktionslösung überschichtet. Färbte sich das Reaktionsfeld um das Koloniematerial innerhalb von 20 Sekunden intensiv dunkel-violett, war

der Stamm PYRase-positiv und wurde weiter bearbeitet, erfolgte dieser Farbumschlag nicht, war der Stamm PYRase-negativ und wurde verworfen. Zum Vergleich wurden immer *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (als Positiv-) und *Streptococcus agalactiae* ATCC 27956 (als Negativkontrolle) mitgeführt.

Das Wachstum in Gegenwart von 6,5% NaCl wurde überprüft, indem eine BHI-Bouillon, die mit 6,5% Kochsalz supplementiert worden war, mit Hilfe einer Öse mit etwas Koloniematerial des zu untersuchenden Stammes beimpft wurde. Nach 24stündiger Bebrütung bei 37°C erfolgte die Auswertung. Das Wachstum wurde als positiv beurteilt, wenn die Bouillon deutlich getrübt war beziehungsweise wenn sich ein deutlicher Bodensatz aus Bakterienmaterial gebildet hatte, das nach dem Aufschütteln einen Schleimzopf bildete und die Bouillon dann ebenfalls trübte. Waren Trübung bzw. Bodensatz nur sehr schwach oder gar nicht ausgebildet, wurde das Wachstum als negativ beurteilt. Zur Qualitätssicherung wurde jede Charge BHI+6,5%NaCl-Lösung mit Hilfe von Kontrollstämmen (*E. faecalis* ATCC 29212 als Positiv- und *Streptococcus bovis* 985 Gent als Negativkontrolle) überprüft.

Um die Spezies der gewonnenen Enterokokkenstämme zu bestimmen wurden folgende Untersuchungen durchgeführt: Kontrolle des Hämolyseverhaltens, der Pigmentproduktion, der Beweglichkeit, der Fähigkeit zur Tetrazoliumreduktion; Überprüfung auf das Vorhandensein der Arginindihydrolase und auf die Fähigkeit zur Säurebildung aus einer Reihe von Kohlenhydraten (α -D-Methylglucopyranosid, Ribose, L-Arabinose, D-Raffinose, Mannitol und Melibiose). War aufgrund der Ergebnisse dieser Untersuchungen eine Zuordnung des jeweiligen Stammes zu einer bestimmten Enterokokkenspezies nicht möglich (Kriterien siehe Tabelle 4), wurden eine oder mehrere zusätzliche Untersuchungen durchgeführt: Pyruvatabbau, Verstoffwechselung von Melezitose, Sorbitol und L-Sorbose.

Die Untersuchung auf Pigmentbildung erfolgte durch Aufnahme und Betrachtung von Koloniematerial auf der Impföse oder Abstreichen von Koloniematerial mit einem Wattetupfer. Eine Gelbfärbung war bei den entsprechenden Spezies dann meistens deutlich sichtbar.

Die Kontrolle auf Beweglichkeit erfolgte im SIM (Sulphide-Indole-Motility)-Agar. Dazu wurde etwas Koloniematerial mit der Impfnadel aufgenommen und der Agar senkrecht bis zum Boden mit dieser Nadel durchstoßen. Nach ein- bis

zweitägiger Bebrütung bei 37 °C zeigten unbewegliche Stämme ein Wachstum nur entlang des Stichkanals, bewegliche Stämme hatten sich vom Stichkanal aus in den Agar ausgebreitet, was als deutliche Trübung sichtbar war. Jede Charge SIM-Agar wurde mit einer Positivkontrolle (*E. gallinarum* BM 4174, beweglich) und einer Negativkontrolle (*E. faecalis* ATCC 29212, unbeweglich) getestet.

Zur Überprüfung der Tetrazoliumreduktion (die Fähigkeit, farbloses Triphenyltetrazoliumchlorid [TTC] zu rotem Formazan zu reduzieren) wurde etwas Koloniematerial des zu untersuchenden Stammes von Columbia-Schafblut-Agar auf einen Sektor einer in sechs Sektoren unterteilten CATC-Platte ausgestrichen. Nach einer 24stündigen Bebrütung bei 37°C und anschließender 24stündiger Inkubation unter Tageslicht erfolgte die Auswertung. Ein positives Ergebnis lag vor, wenn das Koloniematerial eine dunkelrote Farbe und einen metallischen Glanz zeigte. Eine hellrote Färbung mit metallischem Glanz wurde als schwach positiv bewertet, eine hellrote oder weiße Farbe ohne metallischen Glanz als negativ.

Die Untersuchung auf das Enzym Arginindihydrolase erfolgte, indem eine argininhaltige Testflüssigkeit mit wenig Koloniematerial beimpft wurde. Schlug die vorher hellviolette Flüssigkeit innerhalb von fünf Tagen bei 37°C erst nach gelb und dann nach violett (intensiver als die Ausgangsfarbe und mit deutlicher Trübung infolge Bakterienwachstums) um, war das Testergebnis positiv. Geschah nur ein Farbumschlag nach gelb, wurde das Ergebnis als negativ gewertet.

Die Fähigkeit, bestimmte Kohlenhydrate zu spalten, wurde jeweils mit 2 ml einer 1%igen Zuckerlösung, die als Indikatorsubstanz Bromthymolblau enthielt, geprüft. Die α -D-Methylglucopyranosid-Lösung wurde mit Koloniematerial beimpft, welches mit einer Platinöse von der Columbia-Schafblut-Agarplatte entnommen wurde, und anschließend 3-7 Tage bei 37°C bebrütet. Die anderen Zuckerlösungen, mit denen alle Enterokokkenstämme getestet wurden, (D[-]-Ribose, L[+]-Arabinose, D-Raffinose, D[-]-Mannitol und Melibiose) wurden auf anderem Wege beimpft. Von der Columbia-Schafblut-Agarplatte wurde mit einer Impföse eine Einzelkolonie entnommen und in 3 ml BHI (Brain-Heart-Infusion)-Bouillon überführt, welche anschließend 24 Stunden bei 37°C bebrütet wurde. Die Beimpfung der Zuckerlösungen geschah mit jeweils zwei Tropfen

der BHI-Bouillon. Die beimpften Zuckerlösungen wurden nach eintägiger (Ribose) bzw. siebentägiger Bebrütung bei 37°C (alle anderen) auf Farbumschlag überprüft. War der entsprechende Stamm in der Lage, den jeweiligen Zucker abzubauen, sank der pH infolge Säurebildung und das Bromthymolblau schlug von blaugrün nach gelb um. War der Stamm dazu nicht in der Lage, blieb die blaugüne Färbung erhalten.

Die isolierten Stämme wurden in zwei verschiedenen Medien aufbewahrt. Zum einen wurde ein Hochschicht-Nähragar mit einigen Tropfen der obengenannten 24 Stunden bebrüteten BHI-Bouillon überschichtet, mit einer Impföse bis zum Grund durchstoßen, 24 Stunden bei 37°C bebrütet und anschließend bei Raumtemperatur gelagert. Zum anderen wurden die verbliebenen ca. 2 ml BHI-Bouillon mit 0,2 ml sterilem Glycerin versetzt, geschüttelt und einige Tropfen davon in ein mit Glasperlen zur Hälfte gefülltes Schraubglas gegeben. Diese Schraubgläser wurden dann bei einer Temperatur von –80 °C eingefroren.

Als weiterführende Untersuchungen wurden bei einigen Stämmen der Abbau von Pyruvat, Melezitose, Sorbitol und L-Sorbose getestet. Dazu wurden 2 ml der jeweiligen Testflüssigkeit mit der Platinöse beimpft. Der Pyruvatabbau (ein Test, der dem Nachweis von *E. faecalis* dient) wurde nach einer Bebrütung bei 37°C über 16-18 Stunden ausgewertet. Die Verstoffwechslung von Pyruvat war anhand des Farbumschlages von dunkelgrün nach gelb zu erkennen. Als Kontrolle wurde jeweils ein unbeimpftes Medium mitgeführt; die Reaktion mußte spätestens nach 24 Stunden abgelesen werden. Die Verstoffwechslung von Melezitose, Sorbitol und L-Sorbose wurde, analog zu den anderen Zuckern, nach siebentägiger Bebrütung bei 37°C ausgewertet, ein Farbumschlag von blaugrün nach gelb bedeutete ein positives Ergebnis.

3.2.4. Ermittlung der Minimalen Hemmstoffkonzentrationen ausgewählter Isolate gegenüber 16 Antibiotika

Pro Tupfer- und Lebensmittelprobe wurde von den 3 von CATC-Agar isolierten Stämmen ein Vertreter jeder Spezies auf sein Antibiotikaresistenzverhalten untersucht. Gehörten alle 3 Stämme derselben Spezies an, gelangte nur ein Stamm zur weiteren Untersuchung, gehörten sie 3 verschiedenen Spezies an,

wurden alle 3 Stämme weiter untersucht. Die von CATC+Vancomycin-Agar isolierten Stämme wurden nach dem selben Prinzip für die weitere Untersuchung ausgewählt, das heißt ein Vertreter jeder Spezies aus einer Probe wurde getestet.

Die Bestimmung der Minimalen Hemmstoffkonzentrationen erfolgte in der Mikrobouillondilutionsmethode nach den aktuellen NCCLS-Standards (NCCLS, 1999; NCCLS, 2000; NCCLS, 2001) mit dem Sensititre-System der Firma MCS Diagnostics. Getestet wurde das Resistenzverhalten gegenüber Chloramphenicol, Avilamycin, Erythromycin, Tetrazyklin, Ampicillin, Vancomycin, Penicillin, Trimethoprim/Sulfamethoxazol, Flavomycin, Quinupristin/Dalfopristin, Enrofloxacin, Gentamicin, Tylosin, Teicoplanin, Bacitracin sowie Amoxicillin/Clavulansäure.

Dazu wurden ca. 10 bis 20 Kolonien einer 24 Stunden auf Columbia-Schafblut-Agar bebrüteten Kultur des zu untersuchenden Stammes in 5 ml steriles Aqua dest. überimpft, geschüttelt und diese Suspension wurde im Densimat auf eine Dichte von 0,5 Mc-Farland eingestellt, was einer Keimzahl von etwa $1,0 \times 10^8$ KbE pro ml entsprach. 0,05 ml der eingestellten Suspension wurden in 11 ml Mueller Hinton II Broth (Cation Adjusted) gegeben und durchmischt.

Anschließend wurden mit dieser Lösung zwei Mikrotiterplatten (mit jeweils 8 Antibiotika) mit 0,05 ml/Well im Sensititre Autoinoculator befüllt, mit der zugehörigen Folie abgedeckt, 24 Stunden bei 37°C bebrütet und danach ausgewertet. Zur Kontrolle der Dichte und der Reinheit des Inokulums wurden 0,1 ml der beimpften Mueller Hinton II Bouillon in 10 ml 0,1%iges NaCl-Peptonwasser gegeben, durchmischt und 0,05 ml davon auf Blutagarplatten ausgespatelt. Nach einer Bebrütung von 24 Stunden bei 37°C wurde die Anzahl der gewachsenen Kolonien bestimmt (erwartet wurden ca. 250 KbE pro Platte) sowie die Reinheit der Kultur geprüft. Bei der Auswertung der MHK-Platten wurden zunächst die auf jeder Platte mitgeführten Positivkontrollen auf Wachstum überprüft, waren die Positivkontrollen unbewachsen, wurde die Platte nicht ausgewertet und verworfen.

Die Minimale Hemmstoffkonzentration für den jeweiligen antimikrobiellen Wirkstoff war die niedrigste Konzentration, bei der kein Bakterienwachstum sichtbar war. Bei den bakteriostatisch wirkenden Substanzen

Sulfamethoxazol/Trimethoprim und Chloramphenicol wurde diejenige Konzentration als MHK angesehen, bei der eine etwa 80%ige Wachstumsreduktion gegenüber der Positivkontrolle sichtbar war.

Isolate, bei denen im Mikrodilutionsverfahren ein MHK-Wert gegenüber Gentamicin von ≥ 256 mg/l festgestellt worden war, wurden im Anschluß mit dem Etest-Verfahren auf Gentamicin-Hochresistenz überprüft. Nach der Anzucht des zu untersuchenden Stammes auf Schafblutagar wurde jener in 3 ml BHI-Bouillon überimpft und 20-24h bei 37°C bebrütet. 0,8 ml dieser bewachsenen Bouillon wurden mit 4 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung in einem sterilen Densimetröhrchen verdünnt und auf eine Dichte von 2,0 McFarland eingestellt. Nach einer nochmaligen 1:10 Verdünnung mit 0,9%iger Kochsalzlösung wurden 2 ml dieser Suspension durch vorsichtiges Kreisen auf BHI-Agar verteilt. Mit einer Eppendorf-Pipette wurde anschließend die überschüssige Flüssigkeit von der Agaroberfläche abgesaugt. Nach einer etwa 20-minütigen Antrocknung der Bakteriensuspension auf dem BHI-Agar wurde mit Hilfe einer sterilen Pinzette ein Etest-Streifen (Gentamicin high range) auf die Oberfläche des Agars gelegt. Die Ablesung des MHK-Wertes erfolgte nach einer 48-stündigen Bebrütung bei 37°C an der Skala des Etest-Streifens. Eine Zusammenfassung der zur Empfindlichkeitsbeurteilung herangezogenen Grenzwerte gibt Tabelle 12.

Tab. 12: Grenzwerte zur Empfindlichkeitsbeurteilung von *Enterococcus* spp.

antimikrobieller Wirkstoff	Grenzwerte (in mg/l)			Referenz
	sensibel	intermediär	resistent	
Ampicillin	≤8		≥16	NCCLS, 2001
Amoxicillin/Clavulans.	≤8*		≥16*	NCCLS, 2001
Avilamycin			≥16	DANMAP, 2001
Bacitracin			≥128	DANMAP, 2001
Chloramphenicol	≤8	16	≥32	NCCLS, 2001
Enrofloxacin	≤0,5	1-2	≥4	NCCLS, 1999
Erythromycin	≤0,5	1-4	≥8	NCCLS, 2001
Flavomycin			≥16	DANMAP, 2001
Gentamicin**			>500	NCCLS, 2001
Penicillin	≤8		≥16	NCCLS, 2001
Quinupristin/Dalfopristin	≤1	2	≥4	NCCLS, 2001
Teicoplanin	≤8	16	≥32	NCCLS, 2001
Tetrazyklin	≤4	8	≥16	NCCLS, 2001
Tylosin			>8	AARESTRUP et al. (2000)
Vancomycin	≤4	8-16	≥32	NCCLS, 2001

*: bezogen auf die Amoxicillinkonzentration, **: Hochresistenz

3.2.5. Nachweis der Resistenzgene *vanA*, *vanB*, *vanC1* und *vanC2* mit der Polymerasekettenreaktion (PCR)

Ausgewählte Stämme wurden auf das Vorhandensein der spezifischen Resistenzgene mit Hilfe der PCR untersucht. Diese Untersuchungen wurden von Herrn Kiem Mac durchgeführt und beschrieben (MAC et al., 2002). Kurz zusammengefaßt handelte es sich um folgendes Vorgehen: DNA-Isolation (Bakterienkulturen auf Blut-Agar-Platten über Nacht bei 37°C anzüchten, Koloniematerial in 5 ml BHI-Bouillon überimpfen und über Nacht im Wasserbad bei 37°C unter Schütteln inkubieren, 1 ml der Übernachtskultur in Eis abkühlen lassen, abzentrifugieren [4 min, 4°C, 13000 rpm], Pellet in 0,5 ml 0,85%iger NaCl-Lösung waschen, zentrifugieren [4 min, 4°C, 13000 rpm], Pellet in 0,4 ml 5%igem Chelex Resin 100 aufnehmen, 60 min bei 56°C unter Schütteln inkubieren, 15 min bei 95°C inkubieren, auf Eis abkühlen, abzentrifugieren der Zelltrümmer/Chelex-Resin-Partikel [2 min, 4°C und 13000 rpm]), PCR (Anfangsdenaturierung bei 94°C für 4 min, 30 Zyklen Denaturierung: 94°C für

30 s/Annealing: 50°C für 30 s/Extension: 72°C für 30 s, abschließender Extensionsschritt bei 72°C für 10 min), Gelelektrophorese in 1,4%igem Agarose-Gel, Färbung mit Ethidiumbromid, Fotografieren unter UV-Licht.

3.2.6. Stammbezeichnung

Die isolierten Enterokokkenstämme aus den Kot- und Oberflächentupferproben wurden folgendermaßen bezeichnet:

R = Rind, S = Schwein – Herdennummer - K = Kotprobe, H = Schlachtkörperoberflächenprobe - C = Chromocultanreicherung - v = von CATC+6 mg/l Vancomycin-Agar isolierte Kolonie - a,b,c...= Reihenfolge der abgeimpften Kolonien

Beispiel: „R15HCvb“ = zweite abgeimpfte Kolonie, welche nach Anreicherung der Schlachtkörperoberflächenprobe von der 15. Rinderherde auf CATC+Vancomycin-Agar gewachsen ist.

Die Bezeichnung der Enterokokkenstämme aus Lebensmitteln erfolgte nach dem gleichen Prinzip:

L = Lebensmittel – Probennummer - A = nach Anreicherung in 1%igem gepuffertem Peptonwasser - v = auf CATC+Vancomycin-Agar gewachsen - a,b,c...= Bezeichnung der abgeimpften Kolonie

Beispiel: „L15Avb“ = zweite abgeimpfte Kolonie, welche nach Anreicherung der 15.Lebensmittelprobe auf CATC+Vancomycin-Agar gewachsen ist.

In den Abbildungen 4 und 5 ist jeweils das Fließschema des Untersuchungsganges zur Isolierung und Identifizierung von Enterokokken aus Kot- und Tierkörperoberflächenproben bzw. aus Lebensmitteln dargestellt.

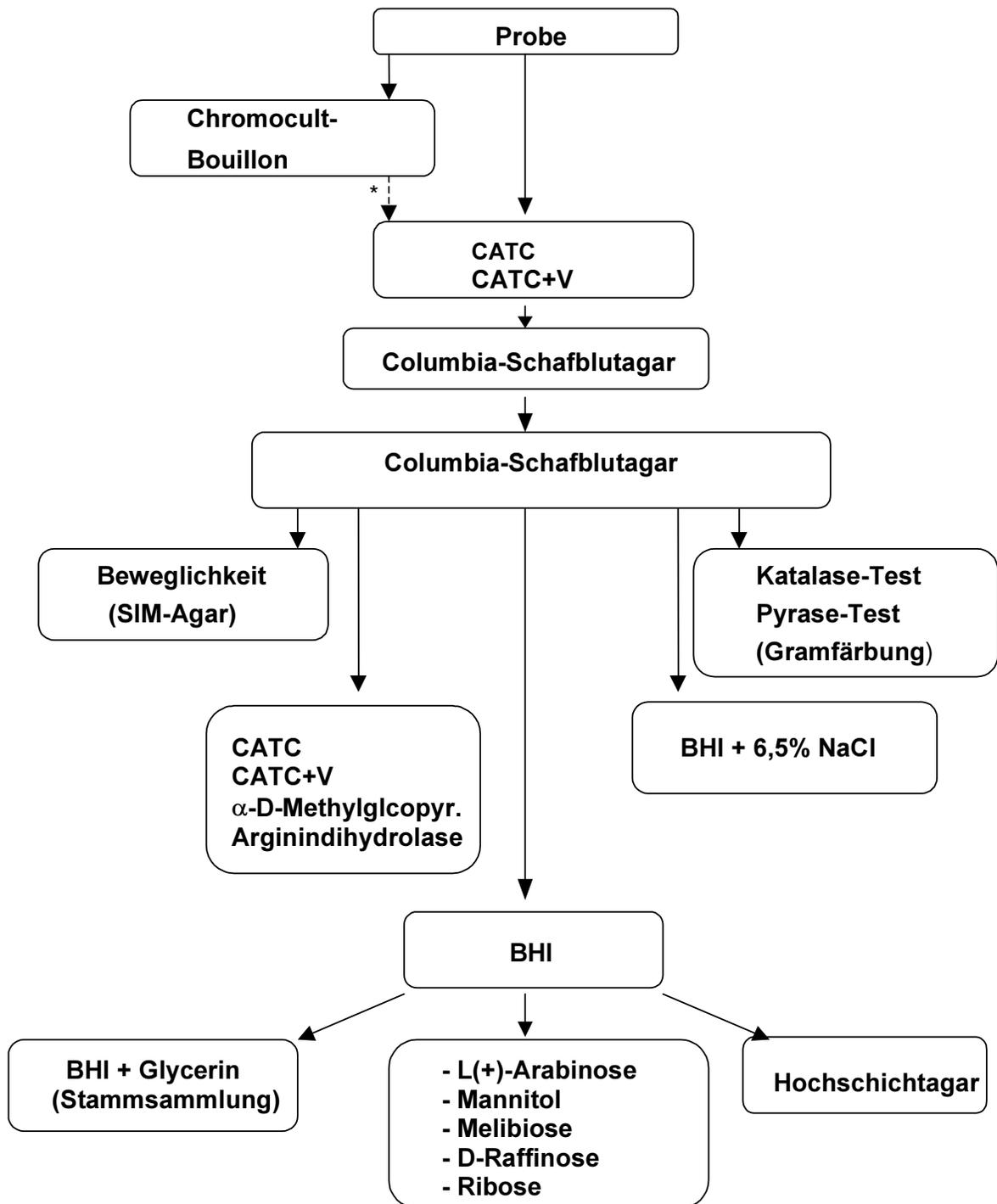


Abbildung 4: Fließschema des Untersuchungsganges zur Isolierung und Identifizierung von Enterokokken aus Kot- und Tierkörperoberflächenproben

*: gestrichelte Linie: Ausstrich nur, wenn im Direktansatz keine verdächtigen Kolonien sichtbar

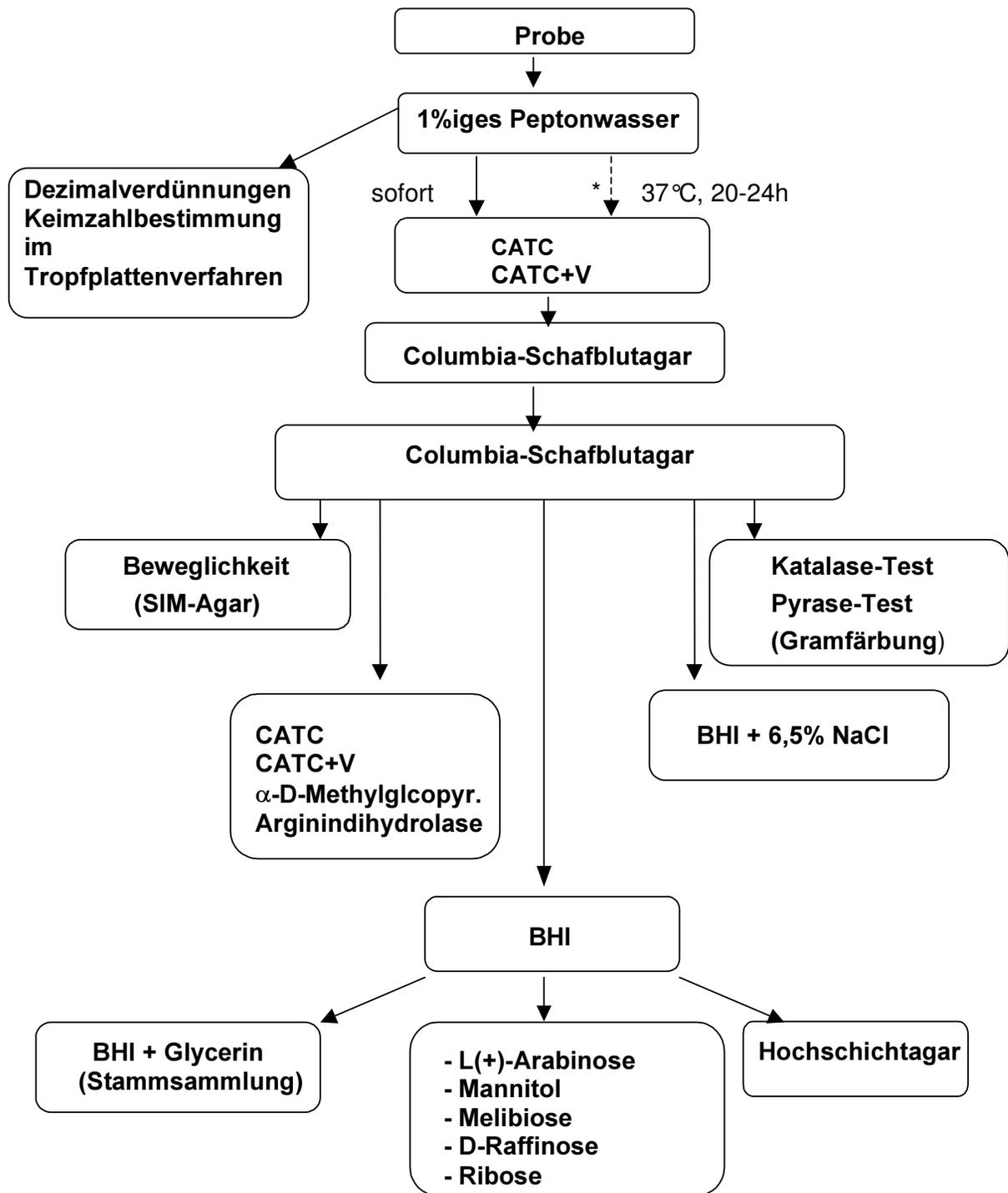


Abbildung 5: Fließschema des Untersuchungsganges zur Isolierung und Identifizierung von Enterokokken aus Lebensmitteln tierischer Herkunft

*: gestrichelte Linie: Ausstrich nur, wenn im Direktansatz keine verdächtigen Kolonien sichtbar

3.3. Ergebnisse

Im Zeitraum von August 2000 bis September 2002 wurden insgesamt 60 Rinderherden (Jungbullen und Kälber), 97 Schweineherden sowie 166 Lebensmittelproben aus verschiedenen Regionen Deutschlands (Berlin, Brandenburg, Sachsen-Anhalt, Niedersachsen, Bayern, Schleswig-Holstein, Nordrhein-Westfalen, Sachsen und Baden-Württemberg) untersucht. Daraus wurden 1257 Enterokokkenstämme isoliert, deren Spezies bestimmt wurde (siehe Tabelle 13) und von denen 569 Stämme (181 vom Rind, 195 vom Schwein und 193 aus Lebensmitteln) ausgewählt (siehe Kap. 3.2. „Methode“) und auf ihr Resistenzverhalten gegen 16 Antibiotika getestet wurden. Da eine sichere Unterscheidung zwischen *E. durans* und *E. hirae* nicht immer möglich war, wurden beide Spezies gemeinsam betrachtet. Die Ergebnisse der Resistenztestung sollen im Folgenden für die einzelnen Antibiotika sowie für *E. faecalis* und *E. faecium* dargestellt werden.

Tab. 13: Ergebnisse der Speziesbestimmung der Enterokokkenisolate

Spezies	Anzahl der Isolate von			Gesamt
	Rind	Schwein	Lebensmittel	
<i>E. faecalis</i>	152	196	242	590
<i>E. faecium</i>	20	70	48	138
<i>E. durans/hirae</i>	44	77	23	144
<i>E. casseliflavus</i>	145	48	18	211
<i>E. gallinarum</i>	47	78	7	132
<i>Enterococcus</i> spp.	6	13	23	42
Gesamt	414	482	361	1257

3.3.1. Resistenzverhalten gegen ausgewählte Antibiotika

3.3.1.1. β -Laktam-Antibiotika

3.3.1.1.1. Penicillin

Die Ergebnisse der Resistenzuntersuchung gegen Penicillin sind für die Spezies *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans/E. hirae*, *E. casseliflavus* und *E. gallinarum* in den Abbildungen 6 bis 8, das Resistenzverhalten der beiden wichtigsten Spezies (*E. faecalis* und *E. faecium*) ist in Tabelle 14 dargestellt.

Bei den vom **Rind** isolierten Stämmen (s. Abb. 6) erwies sich nur ein *E. faecium*-Isolat als penicillinresistent. Die MHK-Werte von *E. faecalis* bewegten sich zwischen 0,25 und 4 mg/l und lagen somit immer mindestens noch zwei Stufen unterhalb des Grenzwertes von 16 mg/l. Auch alle *E. durans/hirae*- und *E. gallinarum*-Isolate waren penicillinsensibel mit maximalen MHK-Werten von 4 mg/l. *E. casseliflavus* zeigte mit Werten zwischen 0,06 und 1 mg/l die höchste Empfindlichkeit gegenüber Penicillin.

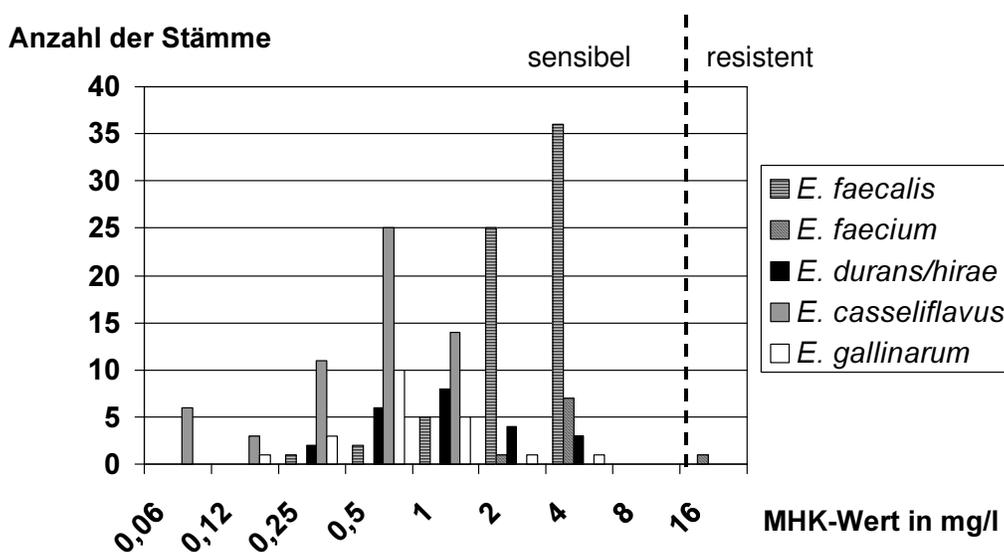


Abbildung 6: Resistenzverhalten von Enterokokken (n=181) aus Schlachtkörperoberflächen- und Kotproben vom Rind gegen Penicillin

Die vom **Schwein** gewonnenen Isolate (s. Abb. 7) waren bis auf 11 *E. faecium*-Stämme durchweg penicillinsensibel. Zehn dieser Stämme lagen im MHK-Bereich von 16 bis 32 mg/l, ein *E. faecium*-Stamm wies einen MHK-Wert von 128 mg/l auf. Auch alle *E. faecalis*-Isolate vom Schwein besaßen MHK-Werte unter 8 mg/l.

Bei den penicillinresistenten Isolaten aus **Lebensmitteln** (s. Abb. 8) handelte es sich um einen Stamm von *E. faecium* mit einem MHK-Wert von 32 mg/l und einen Stamm von *E. durans/E. hirae* mit einem MHK-Wert von 16 mg/l. Wiederum erwiesen sich alle *E. faecalis*-Isolate als sensibel, über 90% von ihnen bewegten sich im MHK-Bereich von 2 bis 4 mg/l. Auch alle *E.*

casseliflavus- und *E. gallinarum*-Isolate waren sensibel, ihre MHK-Werte lagen (mit Ausnahme eines *E. gallinarum*-Stammes) unter 2 mg/l.

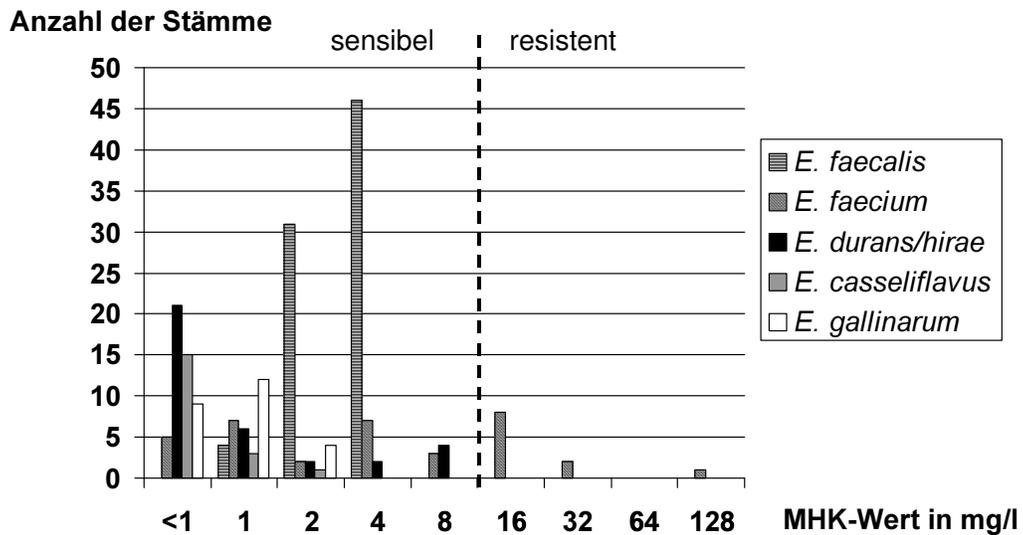


Abbildung 7: Resistenzverhalten von Enterokokken (n=195) aus Schlachtkörperoberflächen- und Kotproben vom Schwein gegen Penicillin

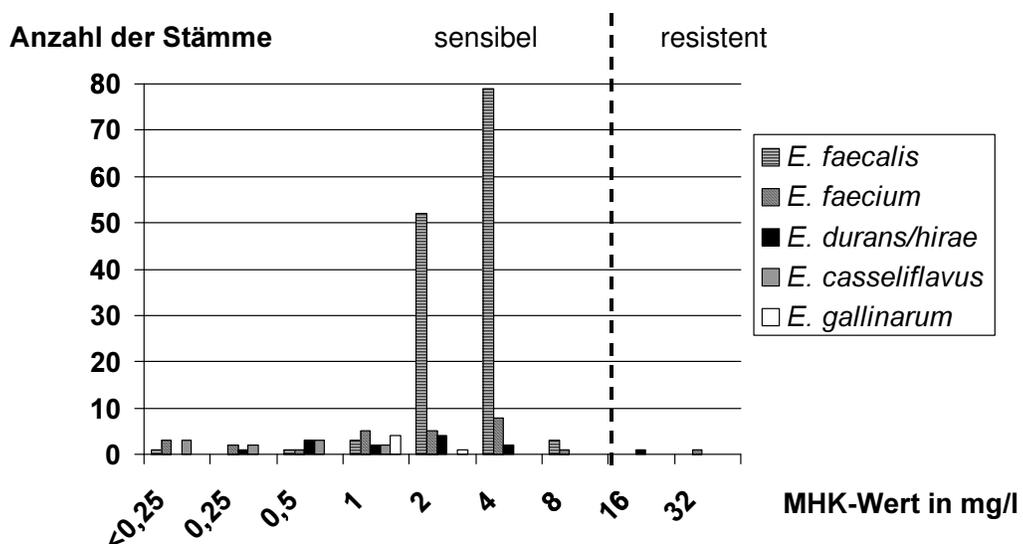


Abbildung 8: Resistenzverhalten von Enterokokken (n=193) aus Lebensmitteln gegen Penicillin

Im Vergleich zeigten die *E. faecium*-Isolate von Rind, Schwein und Lebensmittel höhere Resistenzraten gegen Penicillin, als die *E. faecalis*-Isolate, welche sich

zu 100% penicillinsensibel verhielten (s. Tab. 14). Die *E. faecium*-Isolate vom Schwein wiesen mit 31% den höchsten Grad an Penicillinresistenz (verglichen mit den *E. faecium*-Isolaten von Rind und Lebensmittel) auf.

Tab. 14: Resistenzverhalten von *E. faecalis* und *E. faecium* aus Kot- und Schlachtkörperoberflächenproben von Rind und Schwein sowie aus Lebensmitteln gegen Penicillin

Spezies	Herkunft	Anzahl der Isolate	sensibel		resistent	
			absolut	in %	absolut	in %
<i>E. faecalis</i>	Rind	69	69	100	0	0
	Schwein	81	81	100	0	0
	Lebensmittel	139	139	100	0	0
<i>E. faecium</i>	Rind	9	8	89	1	11
	Schwein	35	24	69	11	31
	Lebensmittel	26	25	96	1	4

3.3.1.1.2. Ampicillin

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 9 bis 11 sowie in Tabelle 15 dargestellt.

Alle Enterokokkenisolate vom **Rind** (s. Abb. 9) verhielten sich gegenüber Ampicillin sensibel. Ein *E. faecium*-Stamm besaß einen MHK-Wert von 8 mg/l, alle anderen Stämme lagen in ihren MHK-Werten unter 4 mg/l. Die MHK der *E. faecalis*-Isolate bewegten sich zwischen 0,25 und 2 mg/l. *E. casseliflavus* war mit MHK zwischen 0,06 und 1 mg/l wiederum die empfindlichste Spezies.

Ein *E. faecium*-Isolat vom **Schwein** (s. Abb. 10) war mit einer MHK von 64 mg/l ampicillinresistent, alle anderen Isolate zeigten sich sensibel gegenüber diesem Wirkstoff. Zwei *E. faecium*-Isolate besaßen MHK von 8 mg/l, die MHK der anderen Isolate lag unter diesem Wert. Die MHK von *E. faecalis* bewegten sich, wie beim Rind, zwischen 0,25 und 2 mg/l. Neben neun *E. faecium*-Isolaten wiesen auch drei *E. durans/hirae*-Isolate eine MHK von 4 mg/l auf.

Wie beim Rind zeigten sich auch beim **Lebensmittel** alle Enterokokkenisolate sensibel gegenüber Ampicillin (s. Abb. 11). Ein *E. faecium*-Isolat wies eine MHK von 8 mg/l auf, ein weiteres *E. faecium*- und ein *E. durans/hirae*-Isolat besaßen MHK von 4 mg/l. Alle anderen Enterokokkenstämme lagen in ihren MHK unter 4

mg/l und damit mindestens drei Stufen unter dem Grenzwert von 16 mg/l. Die MHK der *E. faecalis*-Isolate bewegten sich zwischen 0,5 und 2 mg/l.

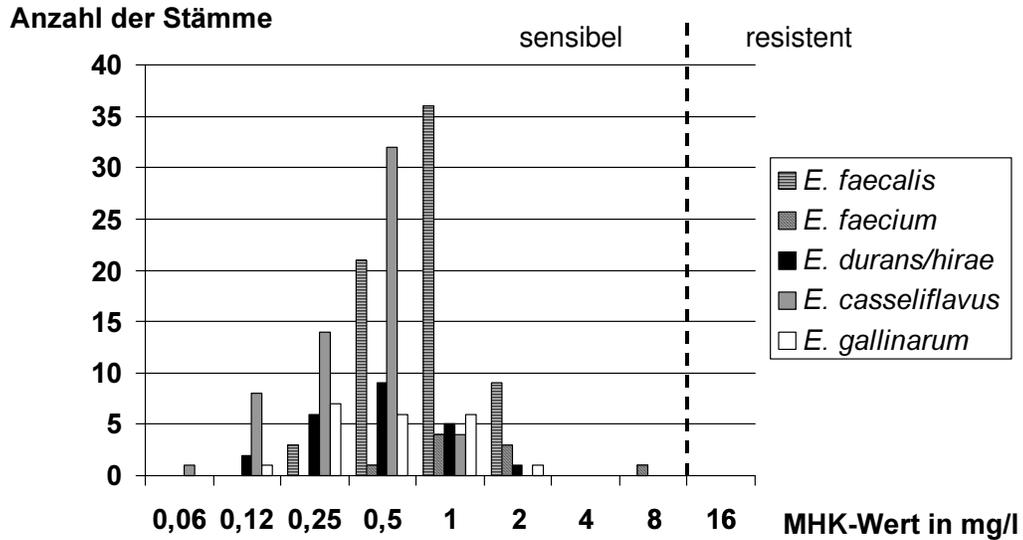


Abbildung 9: Resistenzverhalten von Enterokokken (n=181) aus Schlachtkörperoberflächen- und Kotproben vom Rind gegen Ampicillin

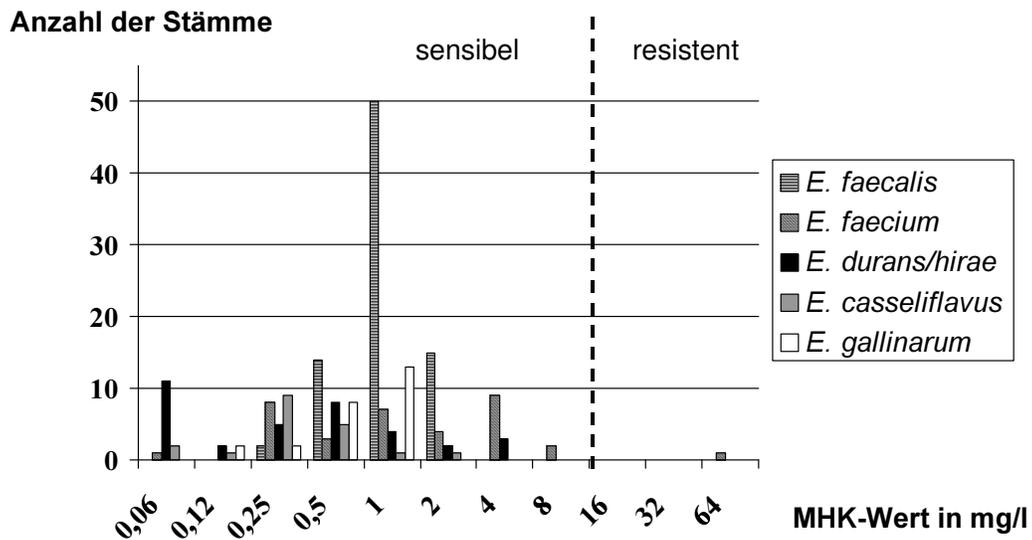


Abbildung 10: Resistenzverhalten von Enterokokken (n=195) aus Schlachtkörperoberflächen- und Kotproben vom Schwein gegen Ampicillin

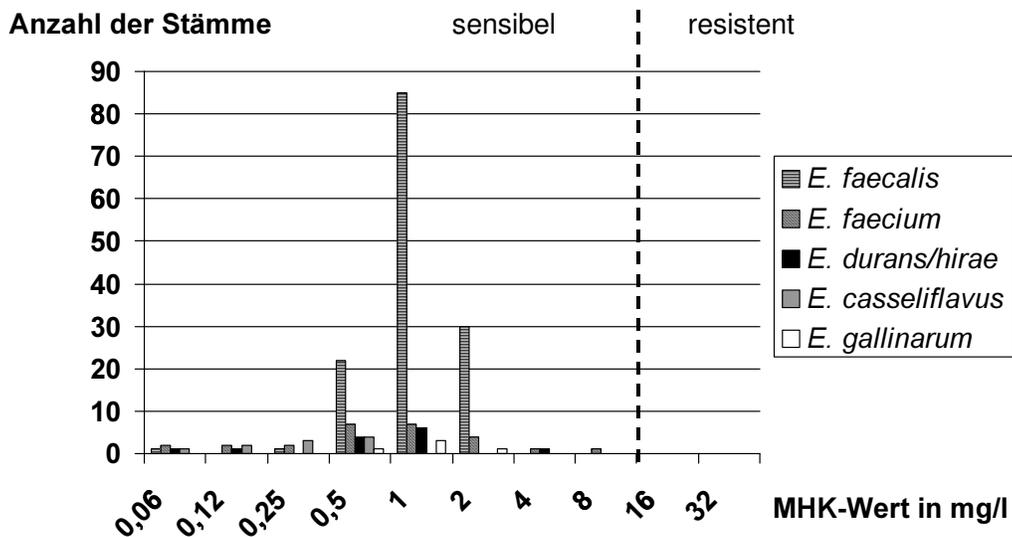


Abbildung 11: Resistenzverhalten von Enterokokken aus Lebensmitteln (n=193) gegen Ampicillin

Insgesamt zeigte sich damit nur ein *E. faecium*-Isolat vom Schwein ampicillinresistent (s. Tab. 15).

Tab. 15: Resistenzverhalten von *E. faecalis* und *E. faecium* aus Kot- und Schlachtkörperoberflächenproben von Rind und Schwein sowie aus Lebensmitteln gegen Ampicillin

Spezies	Herkunft	Anzahl der Isolate	sensibel		resistent	
			absolut	in %	absolut	in %
<i>E. faecalis</i>	Rind	69	69	100	0	0
	Schwein	81	81	100	0	0
	Lebensmittel	139	139	100	0	0
<i>E. faecium</i>	Rind	9	9	100	0	0
	Schwein	35	34	97	1	3
	Lebensmittel	26	26	100	0	0

3.3.1.1.3. Amoxicillin/Clavulansäure

Das Resistenzverhalten der Enterokokkenisolate gegen Amoxicillin/Clavulansäure ist in den Abbildungen 12 bis 14 und in Tabelle 16 dargestellt.

Die Enterokokkenisolate vom **Rind** (s. Abb. 12) zeigten sich ohne Ausnahme sensibel. Ein *E. faecalis*- und ein *E. faecium*-Isolat besaßen eine MHK von

4 mg/l, alle anderen Isolate lagen unter 2 mg/l und waren damit weit von einer Resistenz entfernt.

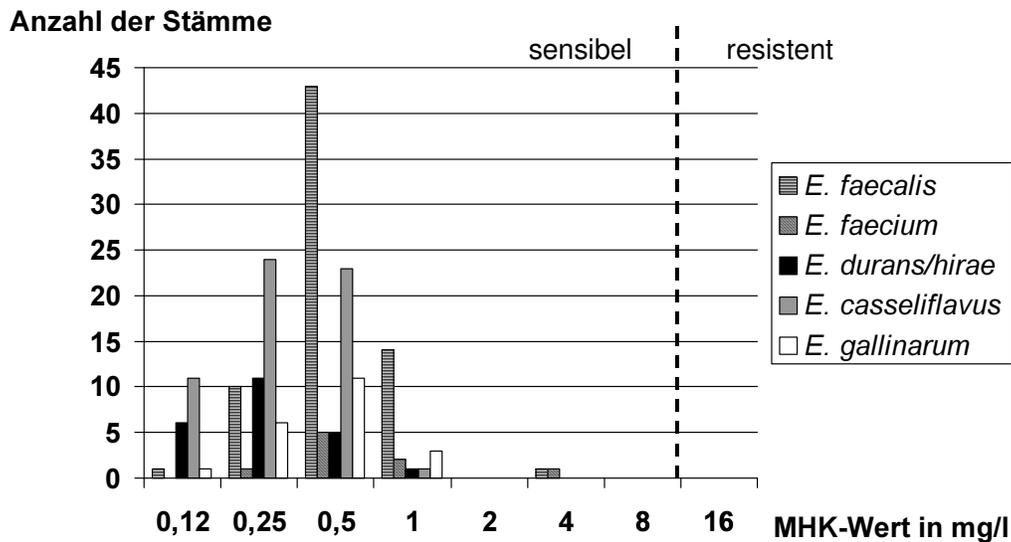


Abbildung 12: Resistenzverhalten von Enterokokken (n=181) aus Schlachtkörperoberflächen- und Kotproben vom Rind gegen Amoxicillin/Clavulansäure

Ein *E. faecium*-Isolat vom **Schwein** wies eine MHK von 64 mg/l gegenüber Amoxicillin/Clavulansäure auf (s. Abb. 13) und war damit resistent. Alle anderen Isolate zeigten sich sensibel. Abgesehen von einem *E. faecium*-Isolat mit einer MHK von 4 mg/l hatten alle Isolate MHK von 2 mg/l oder darunter und lagen somit mindestens drei Stufen unter dem Grenzwert von 16 mg/l. Die MHK von *E. faecalis* bewegten sich zwischen 0,12 und 1 mg/l.

Die Enterokokkenisolate aus **Lebensmitteln** verhielten sich, wie die vom Rind, ausnahmslos Amoxicillin/Clavulansäure-sensibel (s. Abb. 14). Abgesehen von jeweils zwei *E. faecalis*- und *E. faecium*-Isolaten mit MHK von 2 mg/l bewegten sich die MHK der übrigen Isolate unterhalb dieses Wertes und lagen somit sogar mindestens vier Stufen unterhalb des Grenzwertes.

Wie bei Ampicillin zeigte sich auch bei Amoxicillin/Clavulansäure insgesamt nur ein *E. faecium*-Isolat vom Schwein resistent (s. Tab. 16). Es handelte sich dabei um dasselbe Isolat, das darüber hinaus auch Penicillinresistenz aufwies.

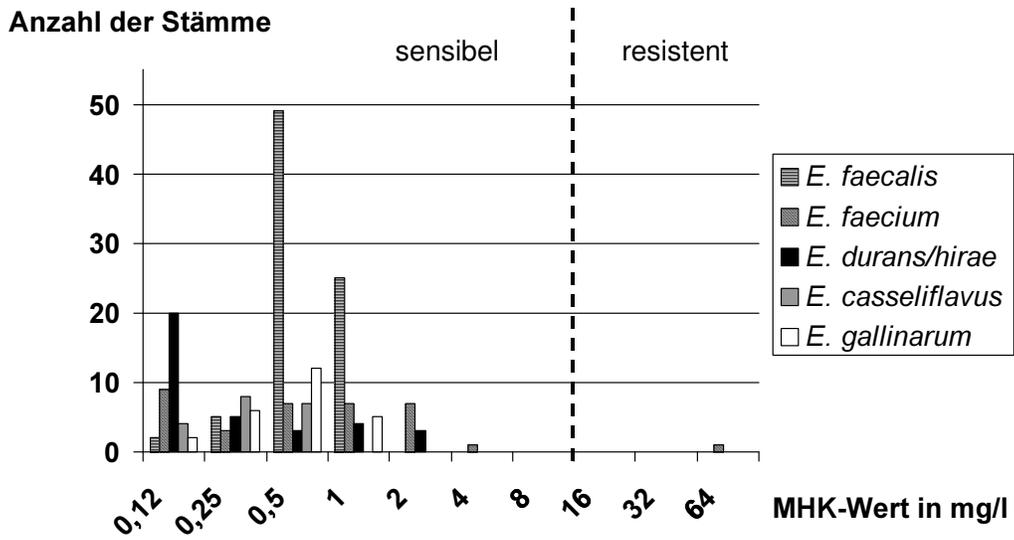


Abbildung 13: Resistenzverhalten von Enterokokken (n=195) aus Schlachtkörperoberflächen- und Kotproben vom Schwein gegen Amoxicillin/Clavulansäure

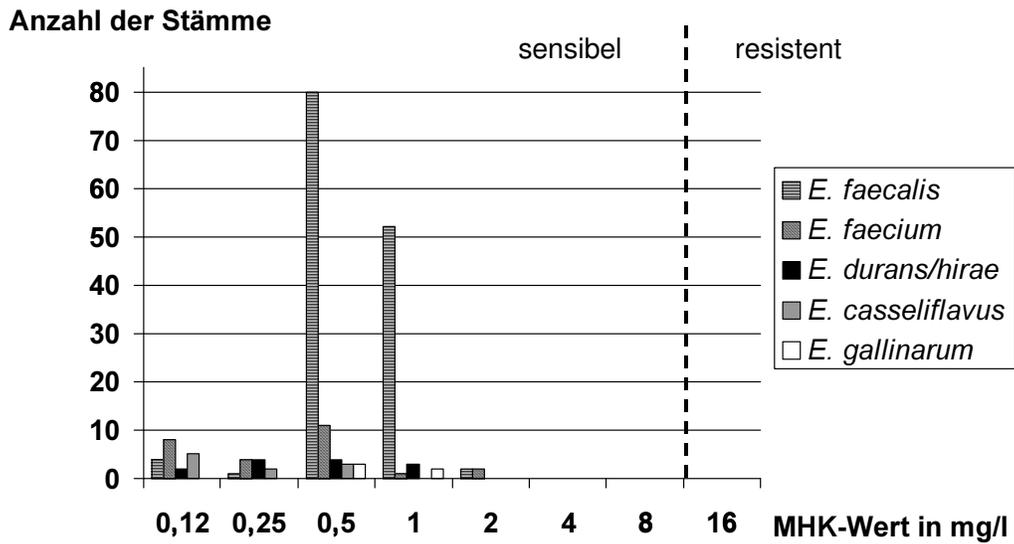


Abbildung 14: Resistenzverhalten von Enterokokken (n=193) aus Lebensmitteln gegen Amoxicillin/Clavulansäure

Tab. 16: Resistenzverhalten von *E. faecalis* und *E. faecium* aus Kot- und Schlachtkörperoberflächenproben von Rind und Schwein sowie aus Lebensmitteln gegen Amoxicillin/Clavulansäure

Spezies	Herkunft	Anzahl der Isolate	sensibel		resistent	
			absolut	in %	absolut	in %
<i>E. faecalis</i>	Rind	69	69	100	0	0
	Schwein	81	81	100	0	0
	Lebensmittel	139	139	100	0	0
<i>E. faecium</i>	Rind	9	9	100	0	0
	Schwein	35	34	97	1	3
	Lebensmittel	26	26	100	0	0

3.3.1.2. Gentamicin

Aufgrund der natürlichen low-level-Resistenz der Enterokokken gegen Aminoglykoside ist nur die Hochresistenz (MHK > 500 mg/l für Gentamicin) von Bedeutung. Derart Gentamicin-hochresistente Stämme kamen beim **Rind** nicht vor. Unter den vom **Schwein** gewonnenen Isolaten waren 2 *E. faecalis*- und 4 *E. gallinarum*- Stämme Gentamicin-hochresistent (siehe Abbildung 15). Die beiden *E. faecalis*-Stämme stammten von zwei verschiedenen Mastschweinen, eines davon war 2000 in Brandenburg, das andere 2002 in Baden-Württemberg geschlachtet worden. Alle anderen Enterokokkenisolate hatten MHK von 128 mg/l oder darunter.

Von den Isolaten aus **Lebensmitteln** erwiesen sich zwei *E. faecalis*-Stämme als Gentamicin-hochresistent (siehe Abbildung 16). Einer dieser beiden wurde aus einer Probe Schweineschinken isoliert, die 2001 in Brandenburg hergestellt worden war. Der andere stammte aus einer 2002 in Berlin gekauften Probe Rinderhackfleisch. Mit Ausnahme zweier *E. faecalis*-Isolate hatten alle anderen Enterokokkenstämme MHK unter 64 mg/l.

Tabelle 17 zeigt die Verteilung Gentamicin-hochresistenter Stämme bei den beiden klinisch wichtigsten Spezies *E. faecalis* und *E. faecium*. Im Gegensatz zu den meisten anderen Antibiotika liegt der Schwerpunkt der Resistenz hier bei *E. faecalis* und nicht bei *E. faecium*. Wiederum wiesen die Isolate vom Schwein, verglichen mit denen vom Rind, den höheren Resistenzgrad auf.

Anzahl der Stämme

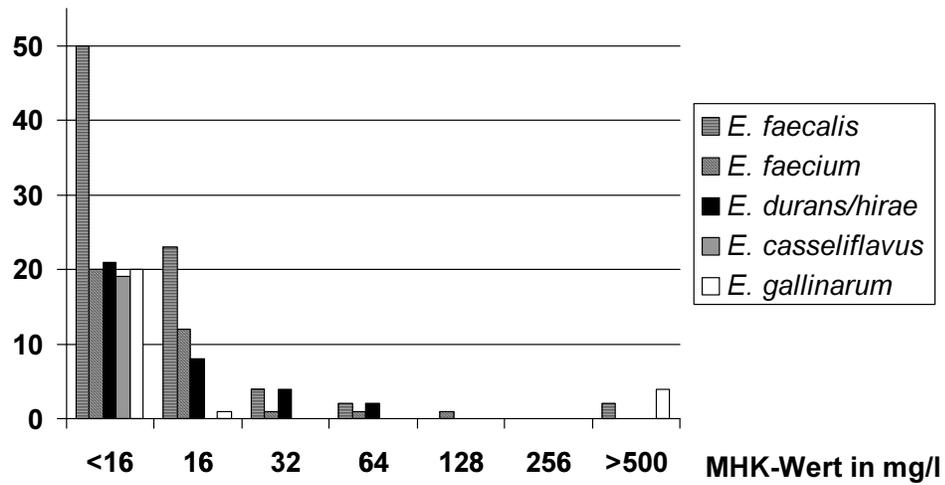


Abbildung 15: Resistenzverhalten von Enterokokken (n=195) aus Schlachtkörperoberflächen- und Kotproben vom Schwein gegen Gentamicin

Anzahl der Stämme

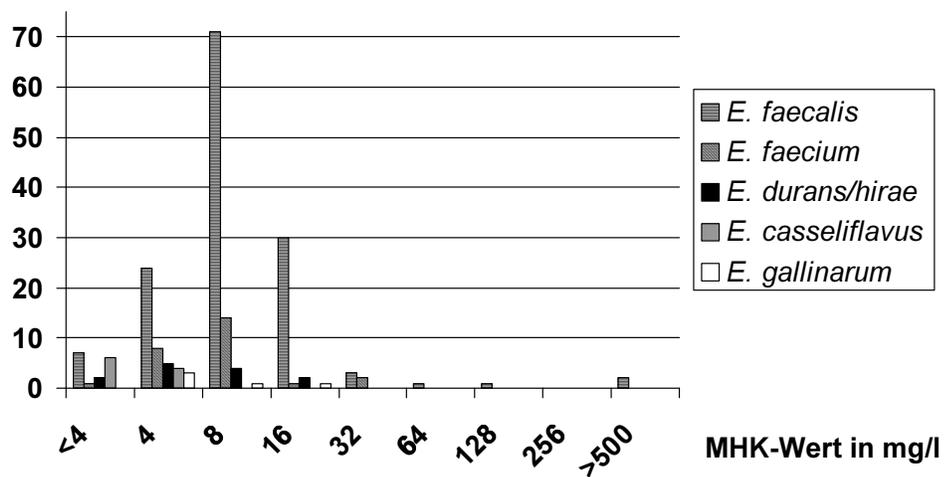


Abbildung 16: Resistenzverhalten von Enterokokken (n=193) aus Lebensmitteln gegen Gentamicin

Tab. 17: Hochresistenz gegen Gentamicin (MHK > 500 mg/l) bei *E. faecalis* und *E. faecium* aus Kot- und Schlachtkörperoberflächenproben von Rind und Schwein sowie aus Lebensmitteln

Spezies	Herkunft	Anzahl der Isolate	Gentamicin-Hochresistenz	
			absolut	in %
<i>E. faecalis</i>	Rind	69	0	0
	Schwein	81	2	2
	Lebensmittel	139	2	1
<i>E. faecium</i>	Rind	9	0	0
	Schwein	35	0	0
	Lebensmittel	26	0	0

3.3.1.3. Tetrazyklin

Die Enterokokkenisolate vom **Rind** zeigten eine deutliche Aufteilung in eine tetrazyklinsensible und in eine tetrazyklinresistente Population (siehe Abbildung 17). Intermediäre Stämme kamen nicht vor. 16% der *E. faecalis*-, 22% der *E. faecium*-, 9% der *E. durans/hirae*-, 15% der *E. casseliflavus*- und 14% der *E. gallinarum*-Isolate erwiesen sich als tetrazyklinresistent. Diese Stämme bewegten sich in einem MHK-Bereich von 64 bis über 256 mg/l.

Auch bei den Enterokokkenisolaten vom **Schwein** war eine Zweiteilung in sensible und resistente Stämme zu beobachten (siehe Abbildung 18). Hier erwiesen sich 37% der *E. faecalis*-, 34% der *E. faecium*-, 71% der *E. durans/hirae*-, 21% der *E. casseliflavus*- und 56% der *E. gallinarum*-Isolate resistant. Stämme mit MHK-Werten im intermediären Bereich (8 mg/l) traten nicht auf.

Bei den Isolaten aus **Lebensmitteln** zeigte sich ein *E. faecalis*-Stamm Tetrazyklin-intermediär. Trotzdem teilte sich die überwiegende Mehrheit der Stämme (wie bei Rind und Schwein) in eine sensible und eine resistente Population (siehe Abbildung 19). 36% der *E. faecalis*-, 27% der *E. faecium*-, 31% der *E. durans/hirae*- und 20% der *E. gallinarum*-Isolate zeigten Tetrazyklinresistenz. Alle *E. casseliflavus*-Isolate waren sensibel.

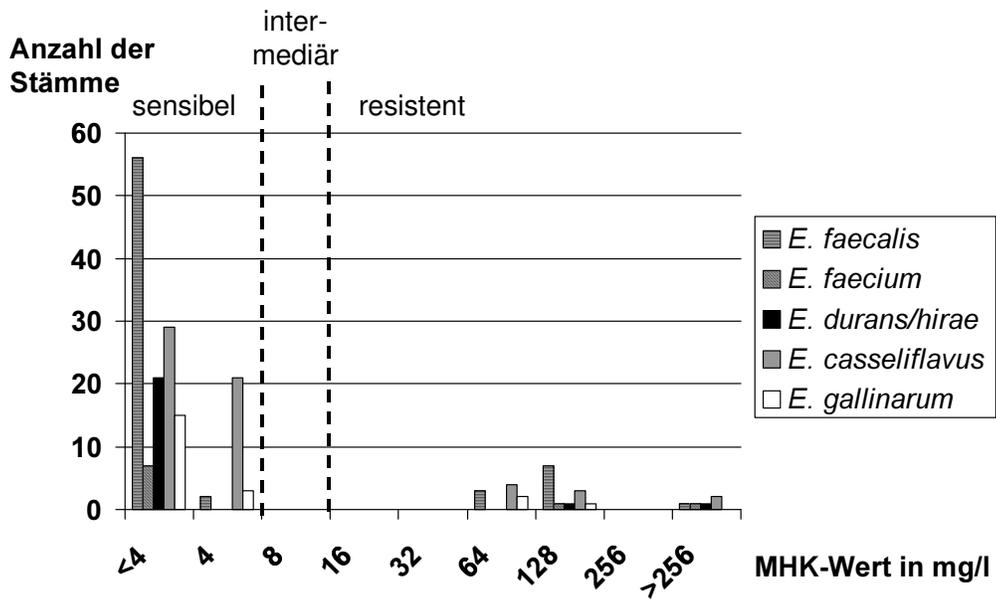


Abbildung 17: Resistenzverhalten von Enterokokken (n=181) aus Schlachtkörperoberflächen- und Kotproben vom Rind gegen Tetracyclin

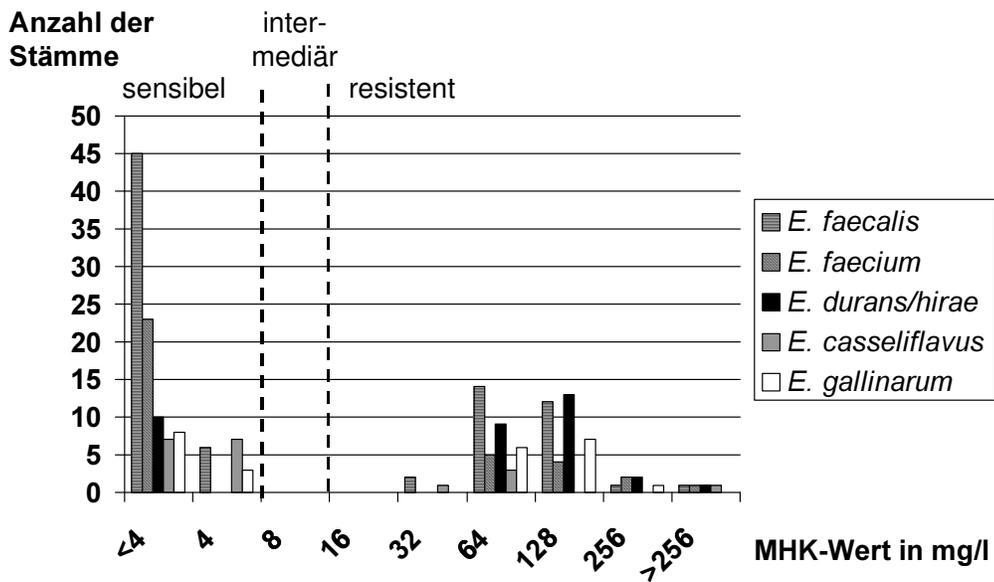


Abbildung 18: Resistenzverhalten von Enterokokken (n=195) aus Schlachtkörperoberflächen- und Kotproben vom Schwein gegen Tetracyclin

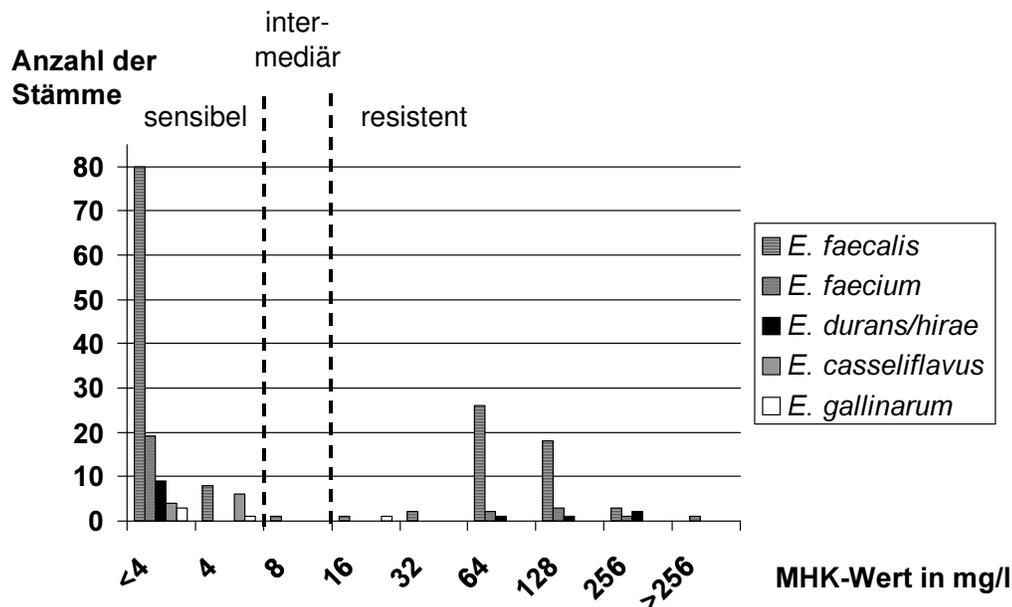


Abbildung 19: Resistenzverhalten von Enterokokken (n=193) aus Lebensmitteln gegen Tetracyclin

Tab. 18: Resistenzverhalten von *E. faecalis* und *E. faecium* aus Kot- und Schlachtkörperoberflächenproben von Rind und Schwein sowie aus Lebensmitteln gegen Tetracyclin

Spezies	Herkunft	Anzahl der Isolate	sensibel		intermediär		resistent	
			absolut	in %	absolut	in %	absolut	in %
<i>E. faecalis</i>	Rind	69	58	84	0	0	11	16
	Schwein	81	51	63	0	0	30	37
	Lebensmittel	139	88	63	1	1	50	36
<i>E. faecium</i>	Rind	9	7	78	0	0	2	22
	Schwein	35	23	66	0	0	12	34
	Lebensmittel	26	19	73	0	0	7	27

In Tabelle 18 sind die prozentualen Verhältnisse des Resistenzverhaltens gegen Tetracyclin für *E. faecalis* und *E. faecium* dargestellt. Im Vergleich der Herkunft wiesen bei beiden Spezies die Isolate vom Schwein die höchsten Resistenzraten auf. Bei den vom Rind isolierten Stämmen war der

Resistenzgrad von *E. faecium* höher als der von *E. faecalis*, bei den Stämmen vom Schwein und aus Lebensmitteln war es genau umgekehrt.

3.3.1.4. Makrolide

3.3.1.4.1. Erythromycin

Die Ergebnisse der Resistenzuntersuchung gegenüber Erythromycin sind in den Abbildungen 20 bis 22 sowie in Tabelle 19 dargestellt.

Von den Isolaten vom **Rind** (s. Abb. 20) erwiesen sich 42% der *E. faecalis*-Stämme als Erythromycin-intermediär und 6% als resistent. Nur 44% der *E. faecium*- und 7% der *E. casseliflavus*-Isolate, aber 96% der *E. durans /hirae* und 81% der *E. gallinarum*-Isolate verhielten sich sensibel.

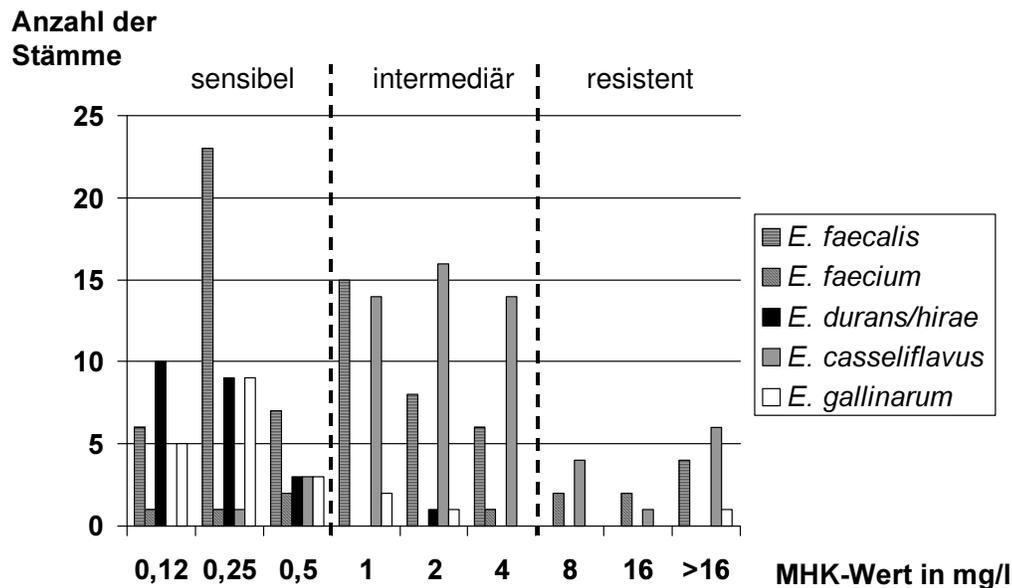


Abbildung 20: Resistenzverhalten von Enterokokken (n=181) aus Schlachtkörperoberflächen- und Kotproben vom Rind gegen Erythromycin

Beim **Schwein** verhielten sich 15% der *E. faecalis*- und 49% der *E. faecium*-Isolate Erythromycin-resistent. Von den *E. durans/hirae*-Stämmen erwiesen sich 89% als sensibel, 3% als intermediär und 9% als resistent gegenüber diesem Wirkstoff, bei *E. casseliflavus* und *E. gallinarum* waren es jeweils 5%, 68% und 26% beziehungsweise 56%, 12% und 32%.

Die *E. faecalis*-Isolate aus **Lebensmitteln** waren nur zu 29% Erythromycin-sensibel, 71% zeigten sich intermediär oder resistent. Bei den *E. faecium*-

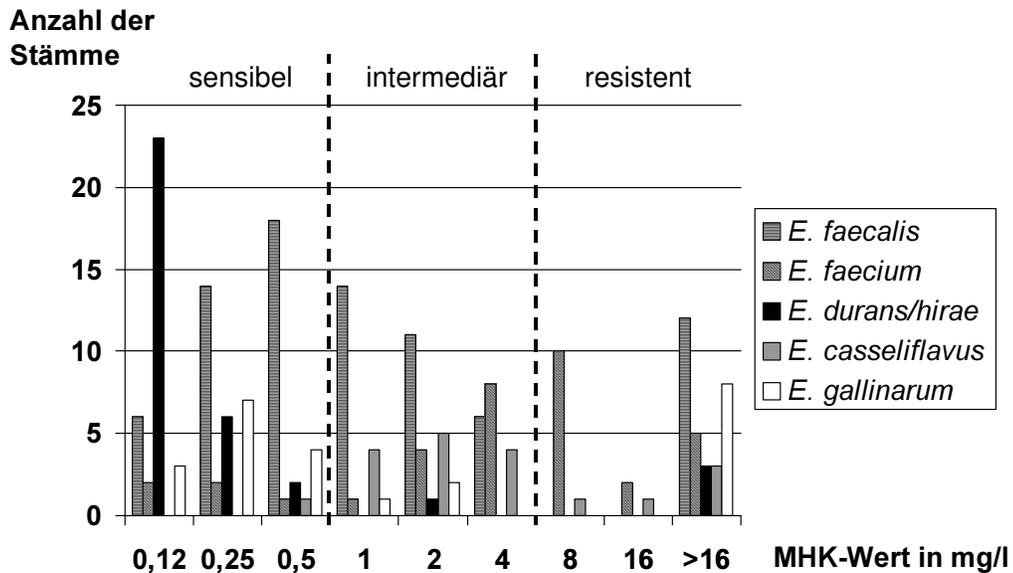


Abbildung 21: Resistenzverhalten von Enterokokken (n=195) aus Schlachtkörperoberflächen- und Kotproben vom Schwein gegen Erythromycin

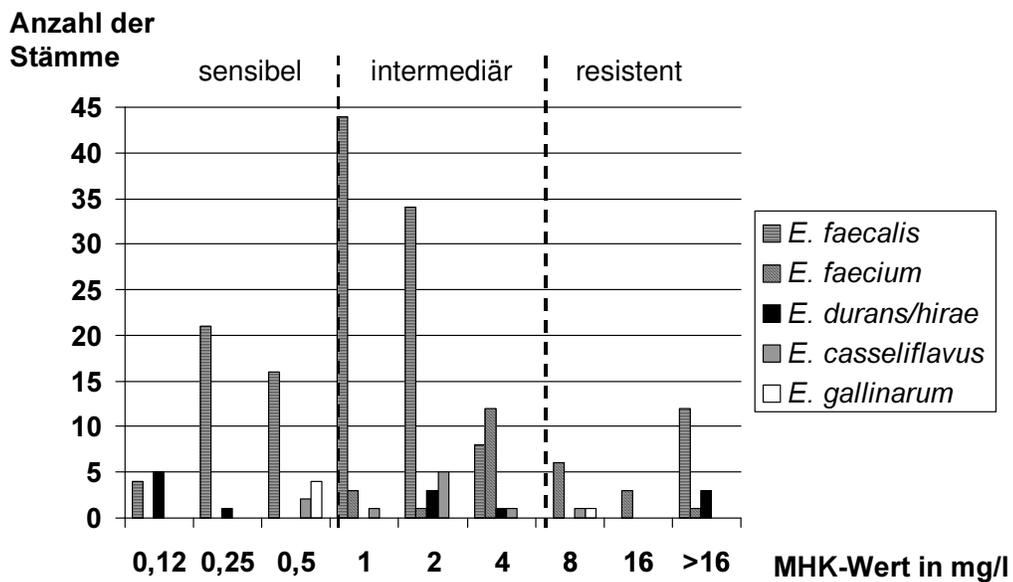


Abbildung 22: Resistenzverhalten von Enterokokken (n=193) aus Lebensmitteln gegen Erythromycin

Isolaten traten sensible Stämme überhaupt nicht auf, 62% der Isolate waren intermediär und 38% resistent. Von den *E. durans/hirae*-Isolaten verhielten sich 46% sensibel, 31% intermediär und 23% resistent, bei *E. casseliflavus* waren es jeweils 20%, 70% und 10%. *E. gallinarum* zeigte zu 80% Erythromycinresistenz, 20% der Isolate waren sensibel, ein intermediäres Verhalten trat bei dieser Spezies nicht auf.

Die Resistenzraten von *E. faecium* gegenüber Erythromycin waren höher als die von *E. faecalis* (s. Tab. 19). Auffallend war bei beiden Spezies ein hoher Anteil an Isolaten mit intermediärem Verhalten. Wie zuvor schon beobachtet zeigten auch hier die Isolate vom Schwein einen höheren Grad der Resistenz als die Isolate vom Rind.

Tab. 19: Resistenzverhalten von *E. faecalis* und *E. faecium* aus Kot- und Schlachtkörperoberflächenproben von Rind und Schwein sowie aus Lebensmitteln gegen Erythromycin

Spezies	Herkunft	Anzahl der Isolate	sensibel		intermediär		resistent	
			absolut	in %	absolut	in %	absolut	in %
<i>E. faecalis</i>	Rind	69	36	52	29	42	4	6
	Schwein	81	38	47	31	38	12	15
	Lebensmittel	139	41	29	86	62	12	9
<i>E. faecium</i>	Rind	9	4	44	1	11	4	44
	Schwein	35	5	14	13	37	17	49
	Lebensmittel	26	0	0	16	62	10	38

3.3.1.4.2. Tylosin

Der Grenzwert für die Empfindlichkeitsbeurteilung von Enterokokken gegen Tylosin (>8 mg/l = resistent) wurde einer Veröffentlichung von AARESTRUP et al. (2000) entnommen.

Sowohl die Isolate von Rind und Schwein, als auch die aus Lebensmitteln unterlagen einer deutlichen bimodalen Häufigkeitsverteilung (siehe Abbildungen

23 bis 25). Das Resistenzverhalten von *E. faecalis* und *E. faecium* gegen Tylosin ist in Tabelle 20 dargestellt.

93% der *E. faecalis*-, 92% der *E. casseliflavus*-, 90% der *E. gallinarum*- und 100% der *E. faecium*- und *E. durans/hirae*-Isolate vom **Rind** verhielten sich tylosinsensibel (s. Abb. 23). Die resistenten Stämme setzten sich aus einem *E. faecalis*-Isolat mit einer MHK von 16 mg/l, einem *E. casseliflavus*-Isolat mit einer MHK von 128 mg/l sowie vier *E. faecalis*-, vier *E. casseliflavus* und zwei *E. gallinarum*-Isolaten mit MHK von jeweils über 128 mg/l zusammen.

Unter den Isolaten vom **Schwein** zeigte sich bei jeder Spezies Tylosinresistenz (s. Abb. 24). So trat diese bei 17% der *E. faecalis*-, 14% der *E. faecium*-, 9% der *E. durans/hirae*-, 16% der *E. casseliflavus*- und 16% der *E. gallinarum*-Stämme auf.

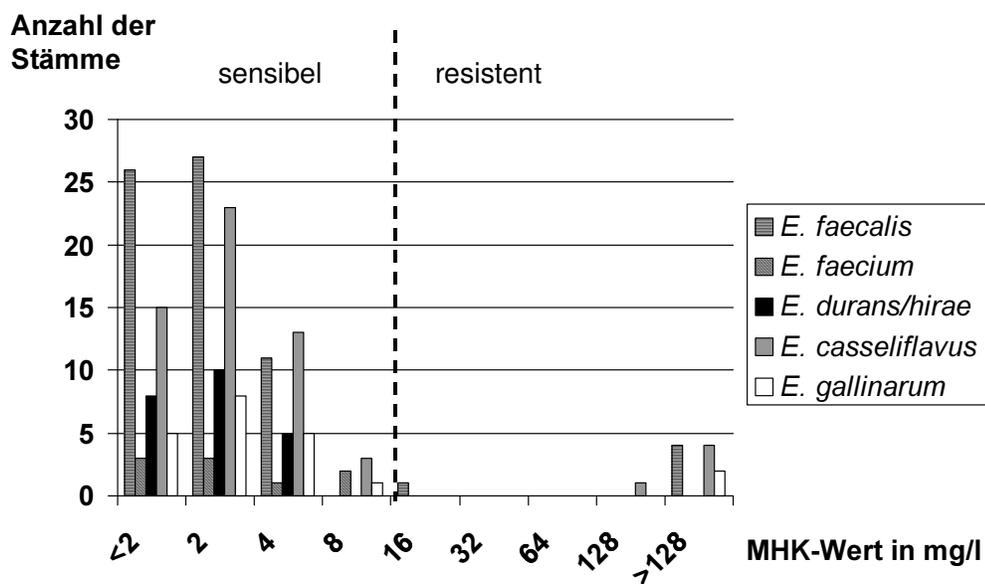


Abbildung 23: Resistenzverhalten von Enterokokkenisolaten (n=181) aus Schlachtkörperoberflächen- und Kotproben vom Rind gegen Tylosin

Alle aus **Lebensmitteln** isolierten *E. casseliflavus*-Stämme verhielten sich tylosinsensibel (s. Abb. 25). Resistent waren nur 13 *E. faecalis*-Isolate mit MHK von 64 mg/l oder darüber, sowie ein *E. faecium*-, zwei *E. durans/hirae*- und ein *E. gallinarum*-Isolat mit MHK von jeweils über 128 mg/l.

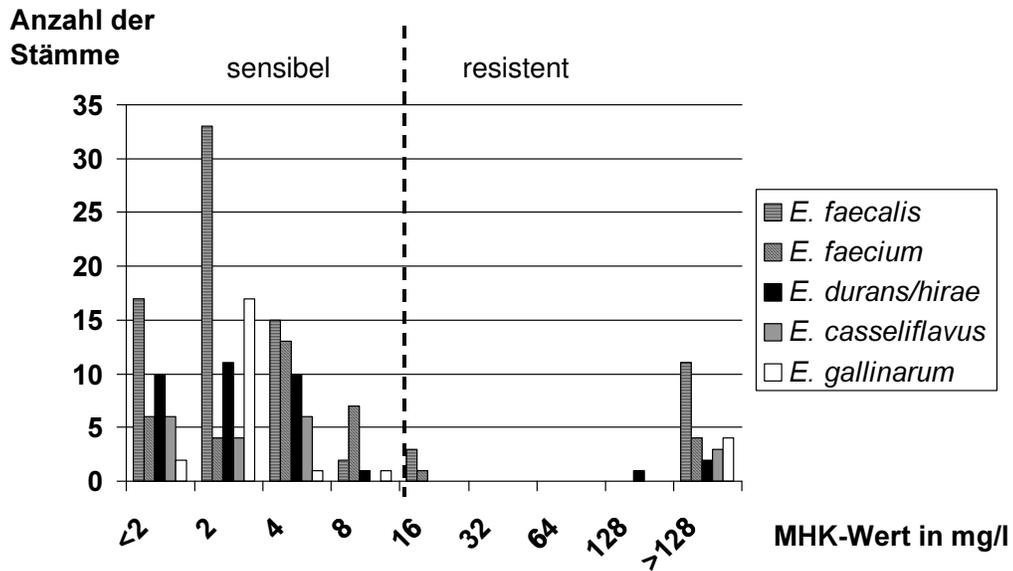


Abbildung 24: Resistenzverhalten von Enterokokkenisolaten (n=195) aus Schlachtkörperoberflächen- und Kotproben vom Schwein gegen Tylosin

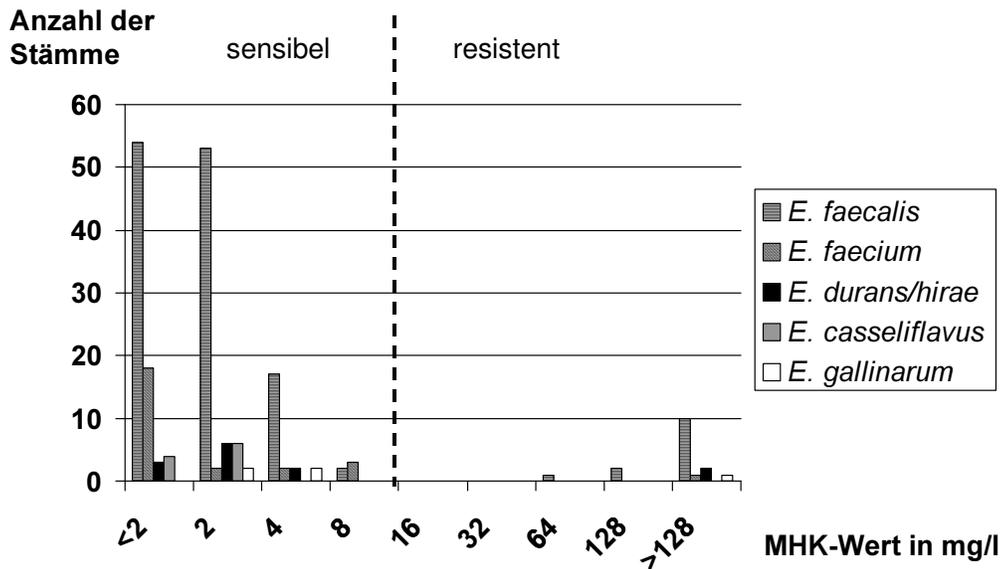


Abbildung 25: Resistenzverhalten von Enterokokkenisolaten (n=193) aus Lebensmitteln gegen Tylosin

Die *E. faecalis*- und *E. faecium*-Isolate vom Schwein zeigten, verglichen mit denen vom Rind, wiederum einen höheren Prozentsatz an Resistenzen (s. Tab. 20).

Tab. 20: Resistenzverhalten von *E. faecalis* und *E. faecium* aus Kot- und Schlachtkörperoberflächenproben von Rind und Schwein sowie aus Lebensmitteln gegen Tylosin

Spezies	Herkunft	Anzahl der Isolate	sensibel		resistent	
			absolut	in %	absolut	in %
<i>E. faecalis</i>	Rind	69	64	93	5	7
	Schwein	81	67	83	14	17
	Lebensmittel	139	126	91	13	9
<i>E. faecium</i>	Rind	9	9	100	0	0
	Schwein	35	30	86	5	14
	Lebensmittel	26	25	96	1	4

3.3.1.5. Glykopeptide

3.3.1.5.1 Vancomycin

Alle *E. faecalis*-, *E. faecium*- sowie *E. durans/hirae*-Isolate vom **Rind** verhielten sich mit MHK von 4 mg/l oder darunter vancomycinsensibel. Ein Teil der Stämme der natürlich low-level-resistenten Spezies *E. casseliflavus* und *E. gallinarum* befand sich mit einer MHK von 8 mg/l in dem nach den NCCLS-Grenzwerten festgelegten intermediären Bereich (s. Abb. 26).

Unter den Isolaten vom **Schwein** befanden sich drei Vancomycin-hochresistente *E. faecium*-Stämme mit MHK von 256 mg/l oder darüber (siehe Abbildung 27). Diese drei Stämme wurden aus Schweinen verschiedener Herden isoliert, die im Jahr 2000 in Schleswig-Holstein geschlachtet worden waren. Neben einigen *E. gallinarum*-Stämmen und einem *E. casseliflavus*-Isolat erwies sich auch ein *E. faecalis*-Stamm mit einer MHK von 8 mg/l als intermediär. Alle anderen *E. faecalis*-, *E. faecium*-, *E. casseliflavus*- und *E. gallinarum*-Stämme sowie alle *E. durans/hirae*-Isolate zeigten sich vancomycinsensibel.

Unter den Enterokokkenisolaten aus **Lebensmitteln** befanden sich keine Vancomycin-resistenten Stämme. Alle *E. gallinarum*-Isolate sowie ein Teil der *E. casseliflavus*-Stämme hatten eine MHK von 8 mg/l und zeigten sich damit intermediär. Alle *E. faecalis*-, *E. faecium*-, *E. durans/hirae*- sowie die verbleibenden *E. casseliflavus*-Stämme erwiesen sich als vancomycinsensibel (s. Abb. 28).

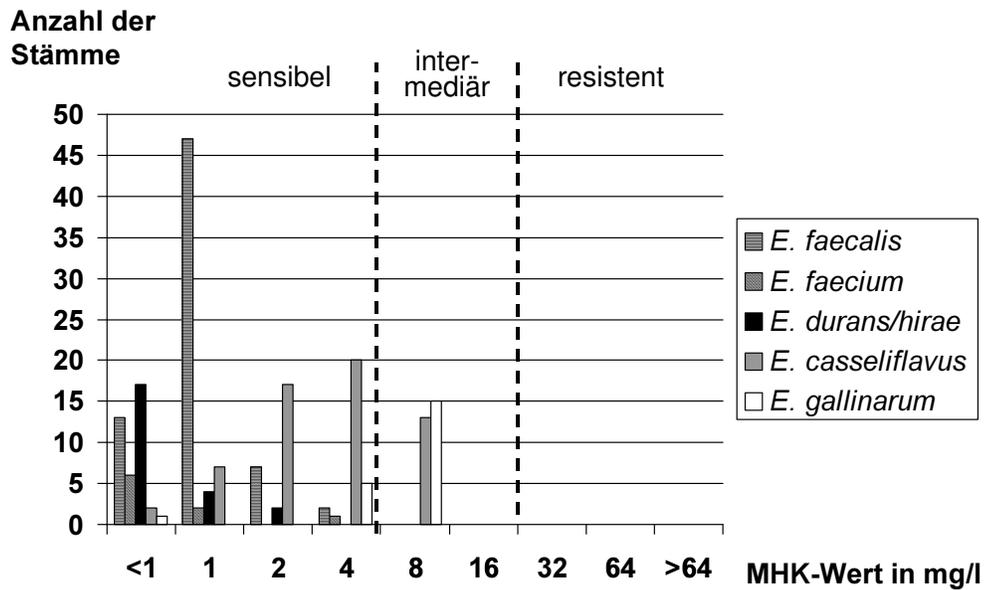


Abbildung 26: Resistenzverhalten von Enterokokken (n=181) aus Schlachtkörperoberflächen- und Kotproben vom Rind gegen Vancomycin

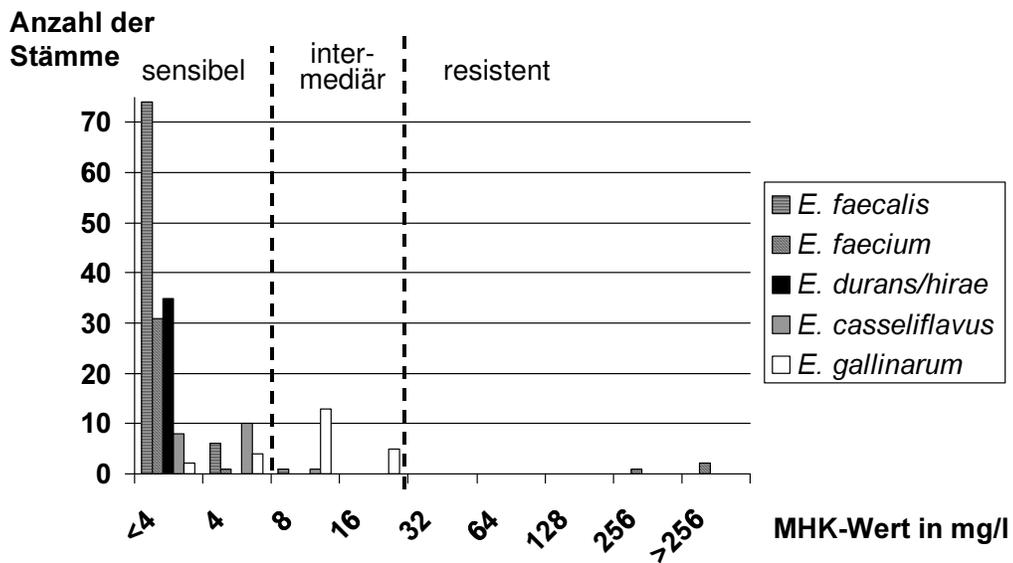


Abbildung 27: Resistenzverhalten von Enterokokken (n=195) aus Schlachtkörperoberflächen- und Kotproben vom Schwein gegen Vancomycin

Tabelle 21 faßt das das Resistenzverhalten von *E. faecalis* und *E. faecium* gegen Vancomycin zusammen. Insgesamt waren 100% der Vertreter dieser

beiden Spezies, die vom Rind und aus Lebensmitteln isoliert worden waren, gegenüber diesem Wirkstoff sensibel. Ein *E. faecalis*-Stamm vom Schwein erwies sich als intermediär und drei *E. faecium*-Stämme von derselben Tierart als resistent.

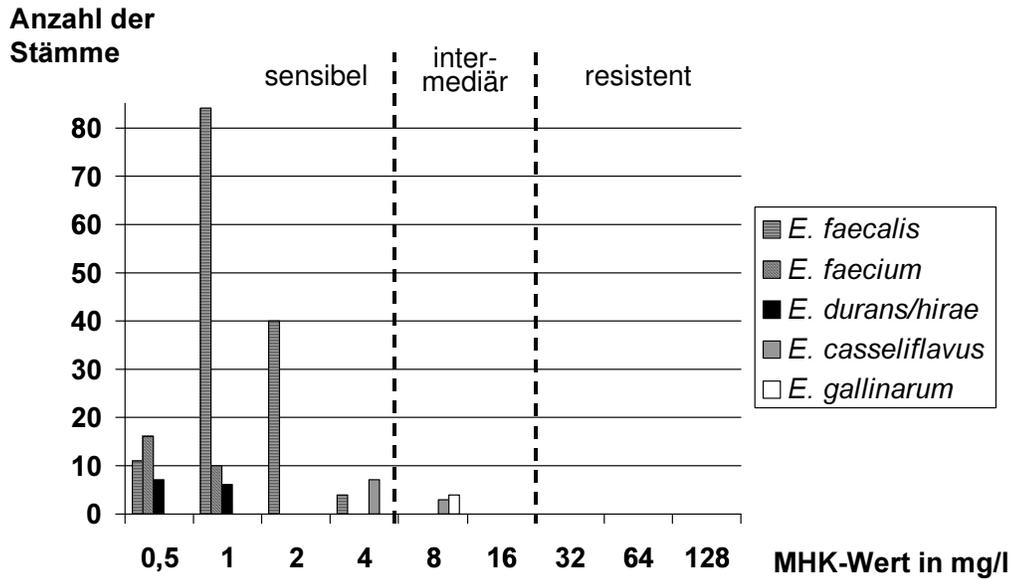


Abbildung 28: Resistenzverhalten von Enterokokken (n=193) aus Lebensmitteln gegen Vancomycin

Tab. 21: Resistenzverhalten von *E. faecalis* und *E. faecium* aus Kot- und Schlachtkörperoberflächenproben von Rind und Schwein sowie aus Lebensmitteln gegen Vancomycin

Spezies	Herkunft	Anzahl der Isolate	sensibel		intermediär		resistent	
			absolut	in %	absolut	in %	absolut	in %
<i>E. faecalis</i>	Rind	69	69	100	0	0	0	0
	Schwein	81	80	99	1	1	0	0
	Lebensmittel	139	139	100	0	0	0	0
<i>E. faecium</i>	Rind	9	9	100	0	0	0	0
	Schwein	35	32	91	0	0	3	9
	Lebensmittel	26	26	100	0	0	0	0

3.3.1.5.2. Teicoplanin

Alle Enterokokkenisolate vom **Rind** verhielten sich teicoplaninsensibel. Die *E. faecium*-Isolate lagen mit einer MHK von 1 mg/l oder darunter mindestens vier Stufen unter dem NCCLS-Grenzwert von 16 mg/l, die *E. faecalis*-Isolate mit einer MHK von 0,5 mg/l oder darunter sogar 5 Stufen unter diesem Grenzwert (s. Abb. 29).

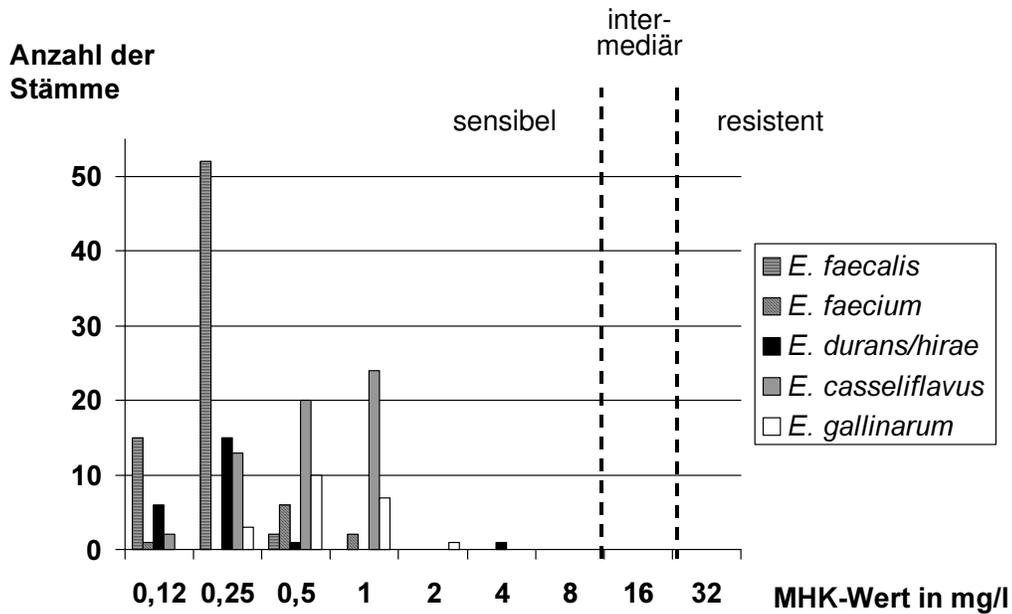


Abbildung 29: Resistenzverhalten von Enterokokken (n=181) aus Schlachtkörperoberflächen- und Kotproben vom Rind gegen Teicoplanin

Beim **Schwein** erwiesen sich drei *E. faecium*-Isolate mit MHK von 64 und 128 mg/l als teicoplaninresistent. Es handelte sich dabei um dieselben drei Stämme, die zuvor schon Vancomycinresistenz gezeigt hatten (s. Kap. 3.3.1.5.1. „Vancomycin“). Die verbleibenden *E. faecium*-Isolate sowie alle anderen Enterokokkenstämme waren mit MHK von 1 mg/l oder darunter teicoplaninsensibel (s. Abb. 30).

Alle Enterokokkenisolate aus **Lebensmitteln** verhielten sich teicoplaninsensibel. Ein *E. faecalis*- sowie ein *E. casseliflavus*-Stamm zeigten eine MHK von 2 mg/l, die übrigen Enterokokkenisolate lagen darunter. Somit

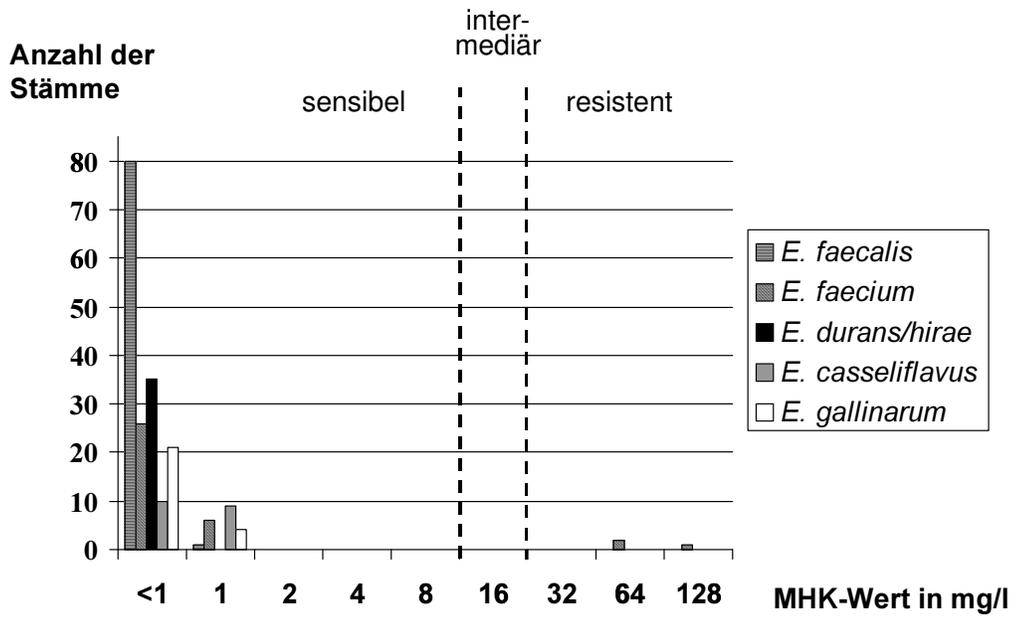


Abbildung 30: Resistenzverhalten von Enterokokken (n=195) aus Schlachtkörperoberflächen- und Kotproben vom Schwein gegen Teicoplanin

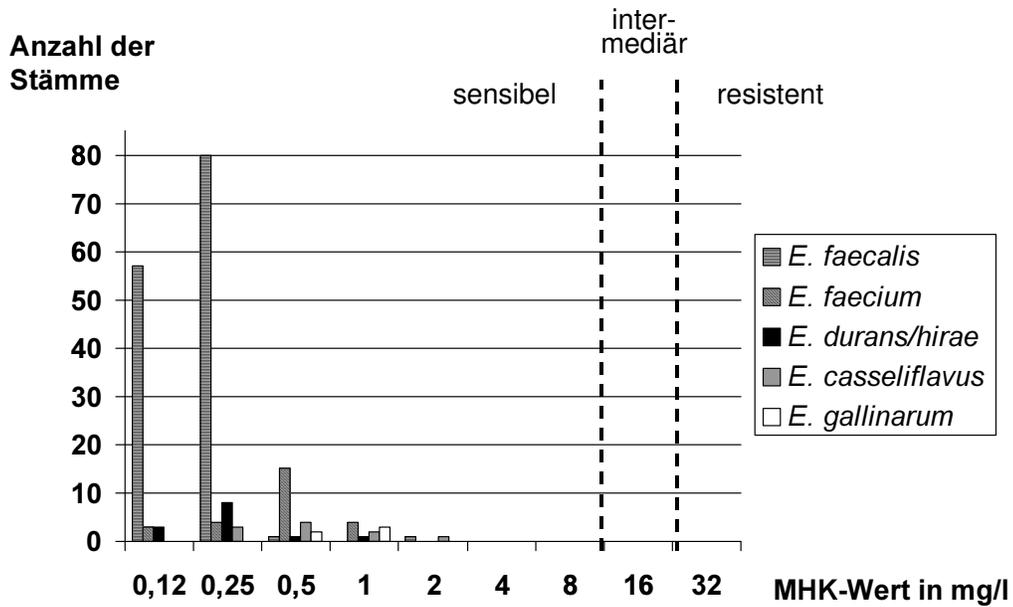


Abbildung 31: Resistenzverhalten von Enterokokken (n=193) aus Lebensmitteln gegen Teicoplanin

waren alle Isolate mindestens zwei Verdünnungsstufen von dem intermediären Grenzwert von 16 mg/l entfernt (s. Abb. 31).

Von den beiden klinisch wichtigsten Enterokokkenspezies erwiesen sich damit alle *E. faecalis*-Stämme sowie alle *E. faecium*-Isolate von Rind und Lebensmittel als teicoplaninsensibel. 9% der *E. faecium*-Isolate vom Schwein zeigten Teicoplaninresistenz (s. Tab. 22).

Tab. 22: Resistenzverhalten von *E. faecalis* und *E. faecium* aus Kot- und Schlachtkörperoberflächenproben von Rind und Schwein sowie aus Lebensmitteln gegen Teicoplanin

Spezies	Herkunft	Anzahl der Isolate	<u>sensibel</u>		<u>intermediär</u>		<u>resistent</u>	
			absolut	in %	absolut	in %	absolut	in %
<i>E. faecalis</i>	Rind	69	69	100	0	0	0	0
	Schwein	81	81	100	0	0	0	0
	Lebensmittel	139	139	100	0	0	0	0
<i>E. faecium</i>	Rind	9	9	100	0	0	0	0
	Schwein	35	32	91	0	0	3	9
	Lebensmittel	26	26	100	0	0	0	0

3.3.1.6. Enrofloxacin

Die Grenzwerte für die Empfindlichkeitsbestimmung gegen Enrofloxacin wurden den „Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals“ unter der Kategorie „Other susceptible organisms“ (NCCLS, 1999) entnommen.

Die geringe Empfindlichkeit von Enterokokken gegen Chinolone zeigte sich auch in dieser Untersuchung. So erwiesen sich der größte Teil der *E. faecalis*-, *E. durans/hirae*-, *E. casseliflavus*- und *E. gallinarum*-Isolate sowie ausnahmslos alle *E. faecium*-Isolate vom **Rind** als intermediär oder resistent gegenüber Enrofloxacin (s. Abb. 32).

Auch beim **Schwein** zeigten nur einige *E. faecalis*-, *E. durans/hirae*- und *E. gallinarum*-Isolate sowie ein *E. faecium*- und ein *E. casseliflavus*-Isolat

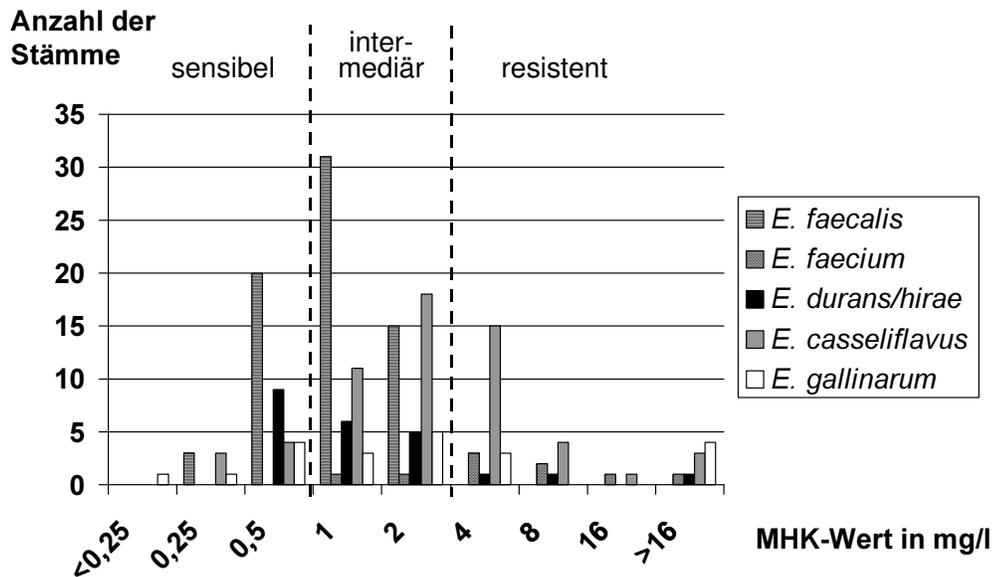


Abbildung 32: Resistenzverhalten von Enterokokken (n=181) aus Schlachtkörperoberflächen- und Kotproben vom Rind gegen Enrofloxacin

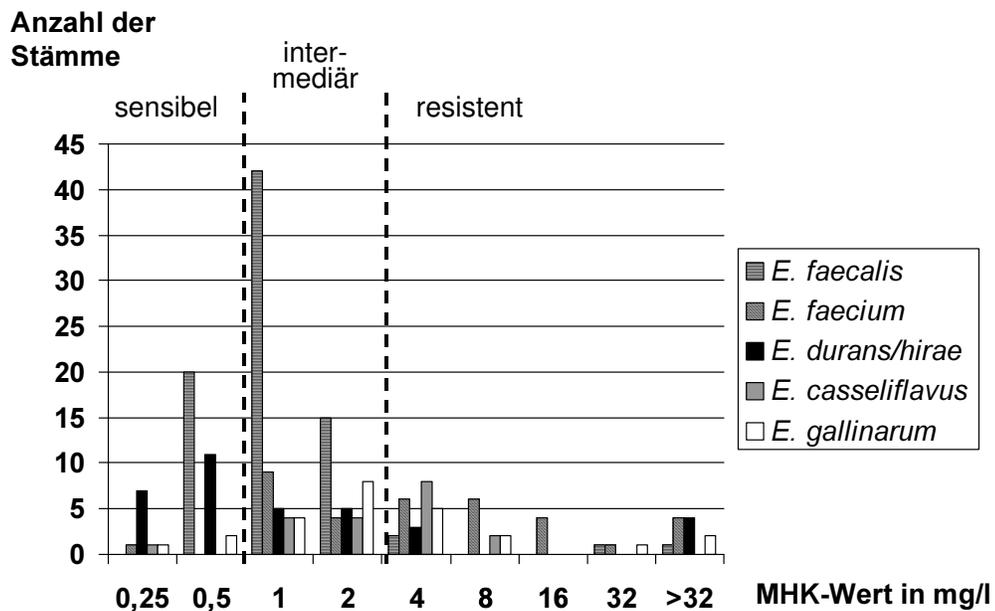


Abbildung 33: Resistenzverhalten von Enterokokken (n=195) aus Schlachtkörperoberflächen- und Kotproben vom Schwein gegen Enrofloxacin

Empfindlichkeit gegenüber Enrofloxacin (s. Abb. 33). Die große Mehrheit der Stämme bewegte sich im intermediären und resistenten Bereich.

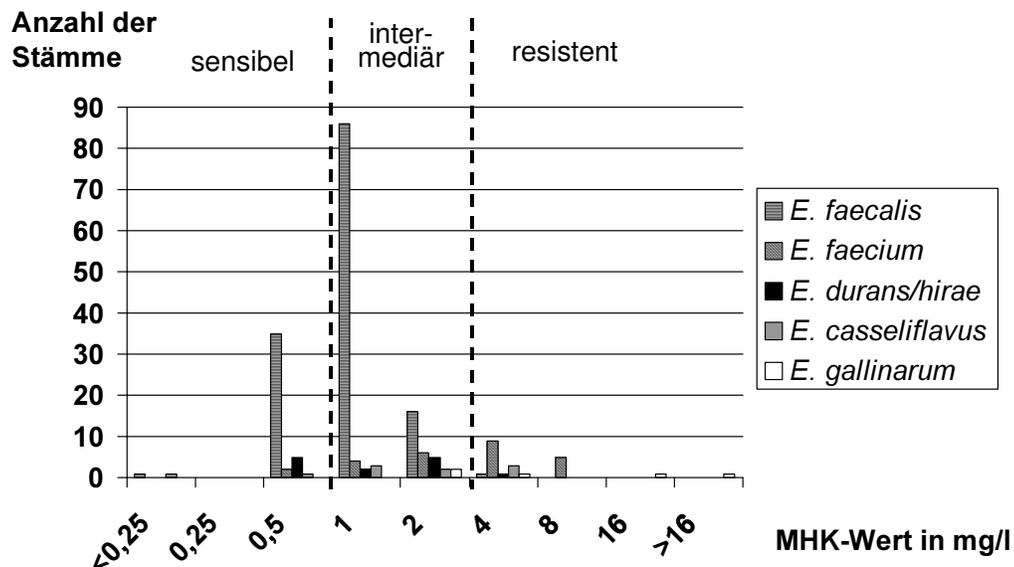


Abbildung 34: Resistenzverhalten von Enterokokken aus Lebensmitteln (n=193) gegen Enrofloxacin

Tab. 23: Resistenzverhalten von *E. faecalis* und *E. faecium* aus Kot- und Schlachtkörperoberflächenproben von Rind und Schwein sowie aus Lebensmitteln gegen Enrofloxacin

Spezies	Herkunft	Anzahl der Isolate	sensibel		intermediär		resistent	
			absolut	in %	absolut	in %	absolut	in %
<i>E. faecalis</i>	Rind	69	23	33	46	67	0	0
	Schwein	81	20	25	57	70	4	5
	Lebensmittel	139	36	26	102	73	1	1
<i>E. faecium</i>	Rind	9	0	0	2	22	7	78
	Schwein	35	1	3	13	37	21	60
	Lebensmittel	26	2	8	10	38	14	54

Auch der größte Teil der Enterokokkenisolate aus **Lebensmitteln** erwies sich als intermediär oder resistent gegenüber Enrofloxacin (s. Abb. 34). So zeigten

sich 73% der *E. faecalis*-Isolate als intermediär und 54% der *E. faecium*-Isolate als resistent. Sensible *E. gallinarum*-Stämme kamen überhaupt nicht vor.

Generell ließ sich im Vergleich zwischen den beiden wichtigsten Spezies beobachten, daß *E. faecalis* empfindlicher als *E. faecium* gegenüber Enrofloxacin war. So bewegten sich die Resistenzraten der *E. faecalis*-Isolate von Rind, Schwein und Lebensmittel im Bereich von 0 bis 5%, wogegen sich 54 bis 78% der *E. faecium*-Isolate derselben Herkunft als enrofloxacinresistent erwiesen. 25-33% der *E. faecalis*-Isolate aber nur 0-8% der *E. faecium*-Isolate waren enrofloxacinsensibel (s. Tab. 23).

3.3.1.7. Quinupristin/Dalfopristin

Die Ergebnisse der MHK-Wert-Bestimmung für Quinupristin/Dalfopristin sind in den Abbildungen 35 bis 37 dargestellt. Die natürliche verminderte Empfindlichkeit von *E. faecalis* gegen diese Wirkstoffkombination zeigte sich auch in dieser Untersuchung.

Unter den *E. faecium*-Isolaten vom **Rind** waren nur jeweils zwei Stämme mit MHK von 0,5 und 1 mg/l sensibel gegenüber Quinupristin/Dalfopristin, die übrigen *E. faecium*-Isolate verhielten sich resistent. Auch die Mehrheit der *E. durans/hirae*-, *E. casseliflavus*- und *E. gallinarum*-Isolate zeigte sich intermediär oder resistent (s. Abb. 35).

Beim **Schwein** zeigten jeweils drei *E. faecium*-Stämme MHK von 0,5 und 1 mg/l und waren damit sensibel. Auch hier war jedoch der größte Teil der *E. faecium*- und auch der *E. durans/hirae*- und *E. gallinarum*-Isolate Quinupristin/Dalfopristin-intermediär oder -resistent. Im Gegensatz zum Rind bewegten sich hier alle *E. casseliflavus*-Stämme im intermediären oder resistenten MHK-Bereich (s. Abb. 36).

Unter den Isolaten aus **Lebensmitteln** befanden sich 14 sensible *E. faecium*- sowie 4 sensible *E. durans/hirae*-Isolate. Alle *E. casseliflavus*- und *E. gallinarum*- sowie die restlichen *E. faecium*- und *E. durans/hirae*-Stämme lagen mit ihren MHK-Werten im intermediären oder resistenten Bereich (s. Abb. 37).

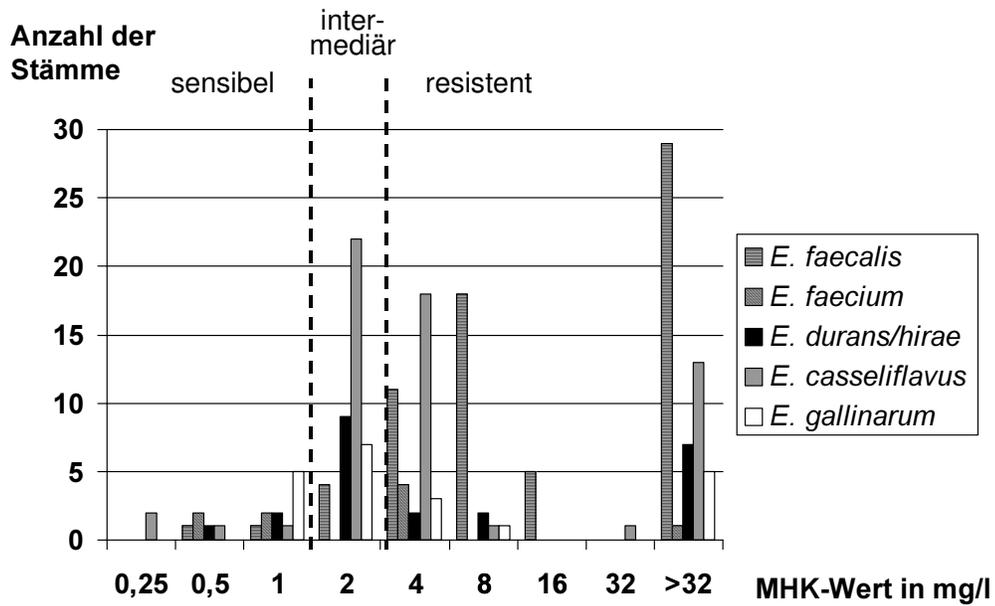


Abbildung 35: Resistenzverhalten von Enterokokken (n=181) aus Schlachtkörperoberflächen- und Kotproben vom Rind gegen Quinupristin/Dalfopristin

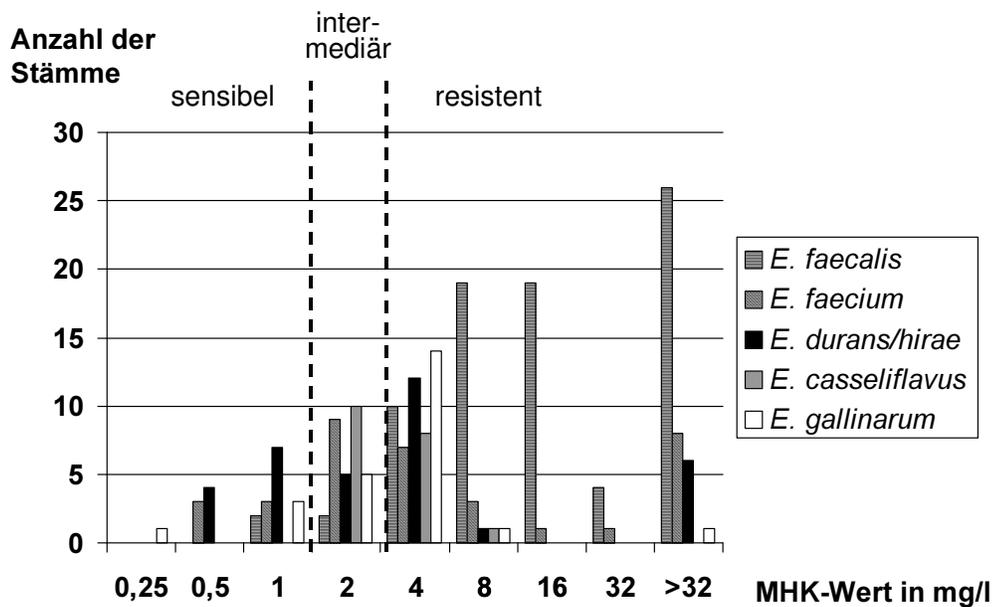


Abbildung 36: Resistenzverhalten von Enterokokken (n=195) aus Schlachtkörperoberflächen- und Kotproben vom Schwein gegen Quinupristin/Dalfopristin

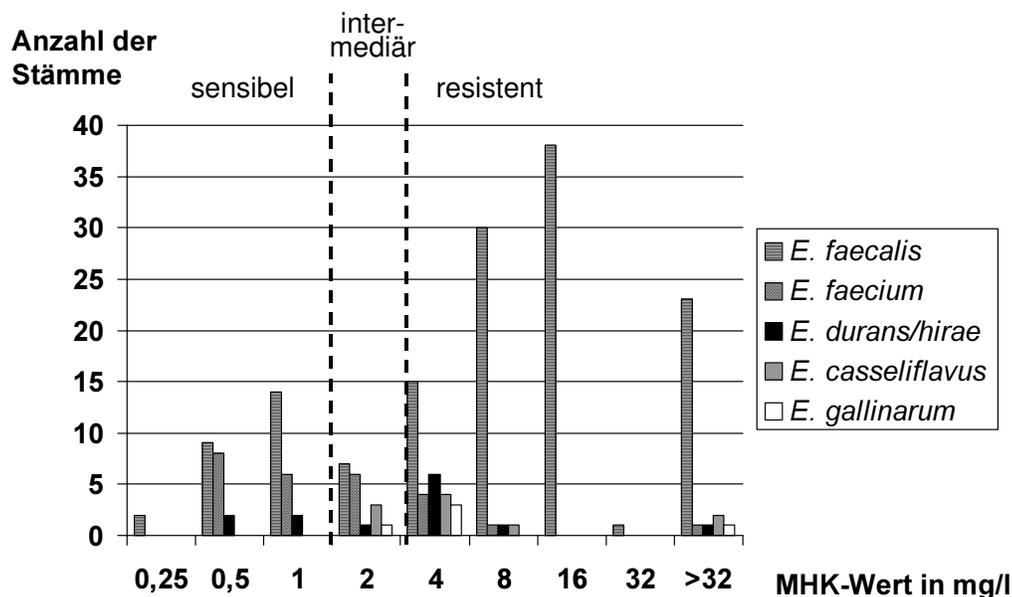


Abbildung 37: Resistenzverhalten von Enterokokken (n=193) aus Lebensmitteln gegen Quinupristin/Dalfopristin

Tab. 24: Resistenzverhalten von *E. faecium* aus Kot- und Schlachtkörperoberflächenproben von Rind und Schwein sowie aus Lebensmitteln gegen Quinupristin/Dalfopristin*

Spezies	Herkunft	Anzahl der Isolate	sensibel		intermediär		resistent	
			absolut	in %	absolut	in %	absolut	in %
<i>E. faecium</i>	Rind	9	4	44	0	0	5	56
	Schwein	35	6	17	9	26	20	57
	Lebensmittel	26	14	54	6	23	6	23

*: *E. faecalis* ist gegen diesen Wirkstoff natürlich resistent.

56% der *E. faecium*-Isolate vom Rind, 57% vom Schwein und 23% aus Lebensmitteln wiesen eine Resistenz gegen Quinupristin/Dalfopristin auf, nur jeweils 44%, 17% und 54% zeigten sich sensibel (s. Tab. 24).

3.3.1.8. Chloramphenicol

Die Ergebnisse der Empfindlichkeitsbestimmung gegen Chloramphenicol sind in den Abbildungen 38 bis 40 sowie in Tabelle 25 zusammengestellt.

Resistenz gegen Chloramphenicol trat beim **Rind** bei allen untersuchten Enterokokkenspezies auf. So wiesen vier *E. faecalis*-, ein *E. faecium*-, ein *E. durans/hirae*-, dreizehn *E. casseliflavus*- und sieben *E. gallinarum*-Isolate eine MHK von 32 mg/l und fünf *E. faecalis*- sowie ein *E. faecium*-Isolat eine MHK von 64 mg/l auf. Darüber hinaus bewegte sich eine Vielzahl von Stämmen im intermediären Bereich (s. Abb. 38).

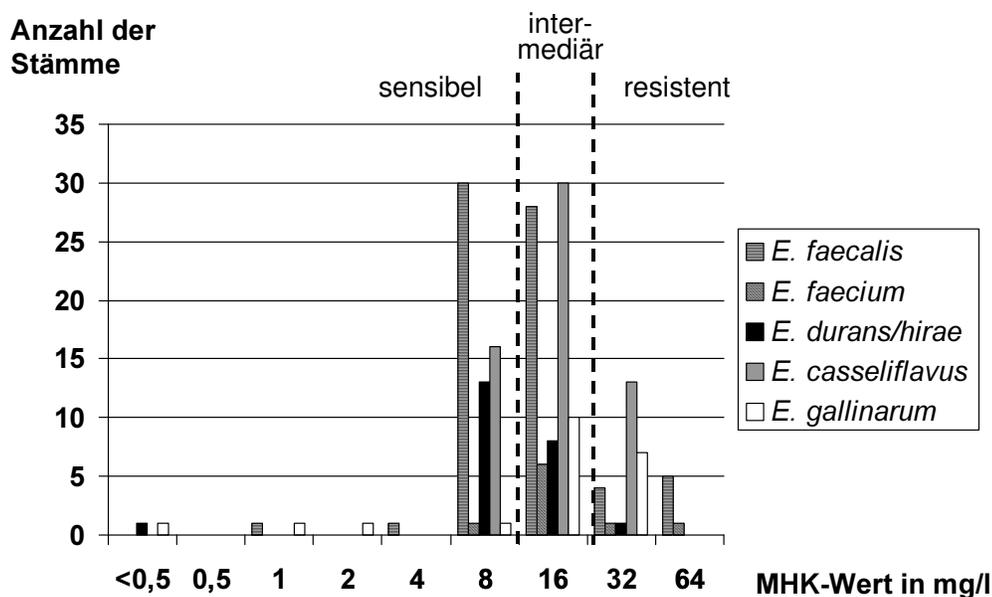


Abbildung 38: Resistenzverhalten von Enterokokken (n=181) aus Schlachtkörperoberflächen- und Kotproben vom Rind gegen Chloramphenicol

Auch unter den Isolaten vom **Schwein** verhielten sich viele Chloramphenicol-intermediär oder –resistent. Nur 44% der *E. faecalis*-, 51% der *E. faecium*-, 46% der *E. durans/hirae*-, 16% der *E. casseliflavus*- und 24% der *E. gallinarum*-Isolate waren sensibel (s. Abb. 39).

Innerhalb der **Lebensmittel**-Isolate waren 53% der *E. faecalis*-, 77% der *E. faecium*-, 31% der *E. durans/hirae*- sowie jeweils 20% der *E. casseliflavus*- und *E. gallinarum*-Stämme chloramphenicolsensibel. Damit lag auch hier ein großer Teil der Isolate im intermediären und resistenten Bereich (s. Abb. 40).

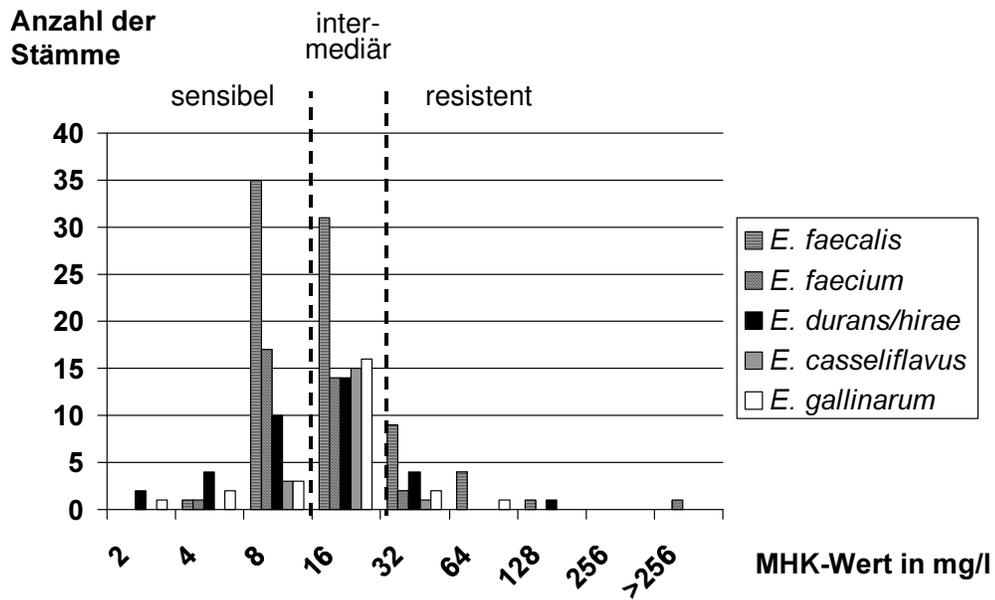


Abbildung 39: Resistenzverhalten von Enterokokken (n=195) aus Schlachtkörperoberflächen- und Kotproben vom Schwein gegen Chloramphenicol

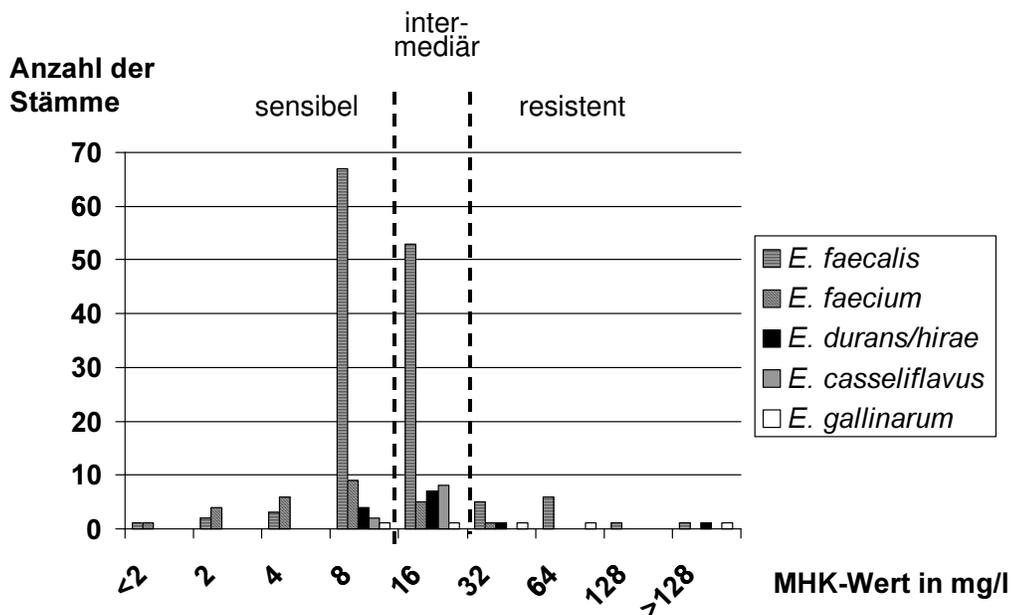


Abbildung 40: Resistenzverhalten von Enterokokken (n=193) aus Lebensmitteln gegen Chloramphenicol

Tabelle 25 faßt das Resistenzverhalten von *E. faecalis* und *E. faecium* gegen Chloramphenicol zusammen.

Tab. 25: Resistenzverhalten von *E. faecalis* und *E. faecium* aus Kot- und Schlachtkörperoberflächenproben von Rind und Schwein sowie aus Lebensmitteln gegen Chloramphenicol

Spezies	Herkunft	Anzahl der Isolate	sensibel		intermediär		resistent	
			absolut	in %	absolut	in %	absolut	in %
<i>E. faecalis</i>	Rind	69	32	46	28	41	9	13
	Schwein	81	36	44	31	38	14	17
	Lebensmittel	139	73	53	53	38	13	9
<i>E. faecium</i>	Rind	9	1	11	6	67	2	22
	Schwein	35	18	51	14	40	3	9
	Lebensmittel	26	20	77	5	19	1	4

3.3.1.9. Bacitracin

Die Ergebnisse der MHK-Bestimmung sind in den Abbildungen 41 bis 43 sowie in Tabelle 26 dargestellt.

Beim **Rind** traten Enterokokkenisolate mit MHK aller Verdünnungsstufen zwischen <2 mg/l bis >128 mg/l auf (s. Abb. 41). Während sich die Mehrzahl der *E. faecalis*-, *E. durans/hirae*- und *E. casseliflavus*-Isolate bacitracinsensibel verhielten, war die Mehrheit der *E. faecium*- und *E. gallinarum*-Stämme bacitracinresistent.

Auch beim **Schwein** waren Enterokokkenstämme mit MHK aller Verdünnungsstufen zwischen <2 mg/l und >128 mg/l vertreten (s. Abb. 42). Hier zeigten sich allerdings die Mehrzahl der *E. faecalis*-, *E. faecium*- und *E. durans/hirae*-Isolate bacitracinsensibel, wogegen sich der überwiegende Anteil der *E. casseliflavus*- und *E. gallinarum*-Isolate bacitracinresistent verhielt.

Unter den Enterokokkenisolaten aus **Lebensmitteln** befanden sich vier *E. faecalis*- und ein *E. durans/hirae*-Stamm mit MHK von >128 mg/l sowie 8 *E. faecium*-, 5 *E. casseliflavus*- und 4 *E. gallinarum*-Stämme mit MHK von 128 mg/l oder darüber (s. Abb. 43). Damit war hier die Mehrzahl der *E. faecalis*-, *E. faecium*- und *E. durans/hirae*-Isolate bacitracinsensibel. 50% der *E.*

casseliflavus- und 80% der *E. gallinarum*-Stämme zeigten sich bacitracinresistent.

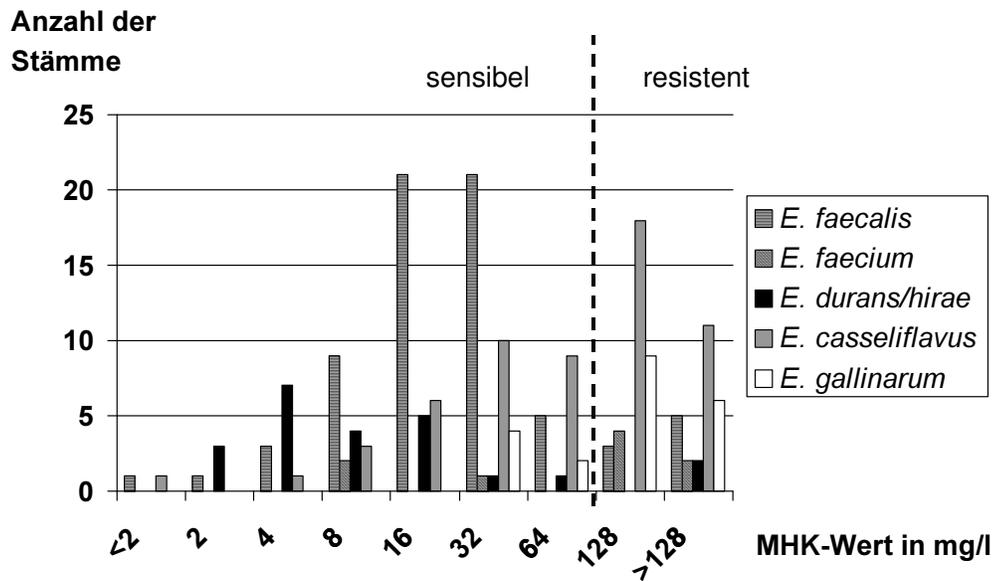


Abbildung 41: Resistenzverhalten von Enterokokken (n=181) aus Schlachtkörperoberflächen- und Kotproben vom Rind gegen Bacitracin

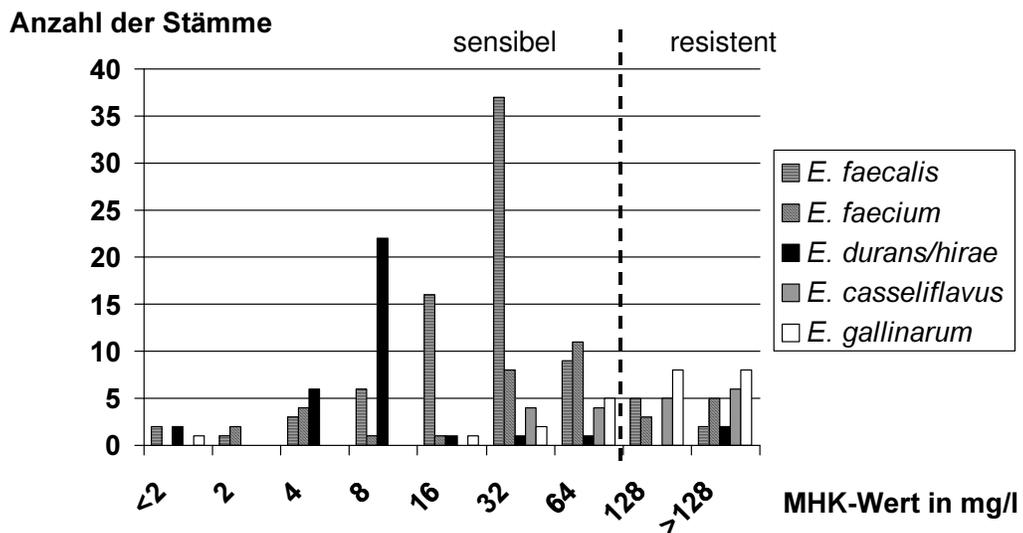


Abbildung 42: Resistenzverhalten von Enterokokken (n=195) aus Schlachtkörperoberflächen- und Kotproben vom Schwein gegen Bacitracin

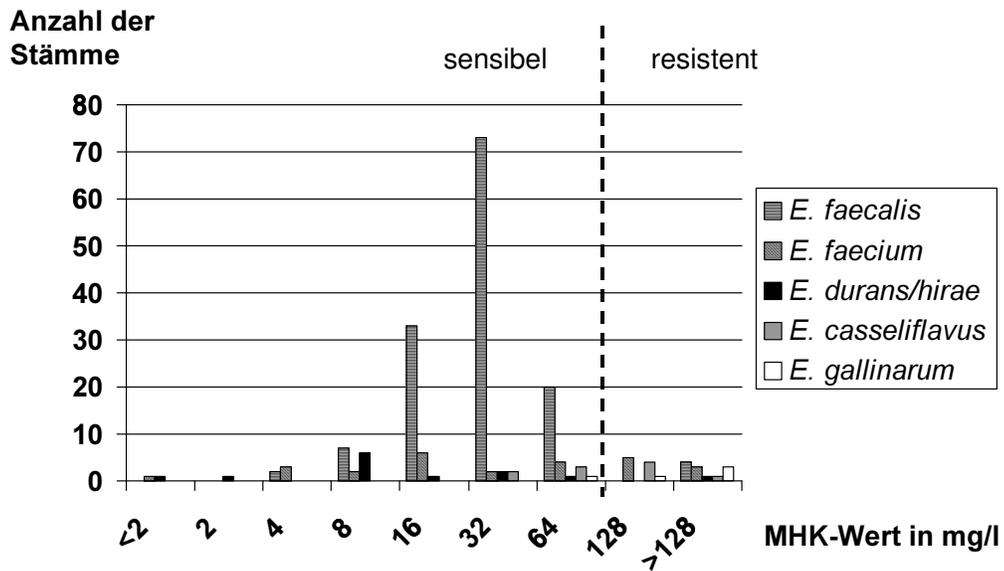


Abbildung 43: Resistenzverhalten von Enterokokken (n=193) aus Lebensmitteln gegen Bacitracin

Mit 67%, 23% und 31% resistenten Isolaten bei *E. faecium* gegenüber 12%, 9% und 3% bei *E. faecalis* wies *E. faecium* eine deutlich höhere Resistenzrate gegen Bacitracin auf (s. Tab. 26).

Tab. 26: Resistenzverhalten von *E. faecalis* und *E. faecium* aus Kot- und Schlachtkörperoberflächenproben von Rind und Schwein sowie aus Lebensmitteln gegen Bacitracin

Spezies	Herkunft	Anzahl der Isolate	sensibel		resistent	
			absolut	in %	absolut	in %
<i>E. faecalis</i>	Rind	69	61	88	8	12
	Schwein	81	74	91	7	9
	Lebensmittel	139	135	97	4	3
<i>E. faecium</i>	Rind	9	3	33	6	67
	Schwein	35	27	77	8	23
	Lebensmittel	26	18	69	8	31

3.3.1.10. Flavomycin

Die Ergebnisse der Resistenztestung gegen Flavomycin sind in den Abbildungen 44 bis 46 sowie in Tabelle 27 dargestellt.

Beim **Rind** wiesen drei *E. faecalis*-Isolate eine MHK von über 256 mg/l auf, ein Isolat besaß eine MHK von 32 mg/l und zwei weitere eine MHK von 16 mg/l. Alle anderen 63 *E. faecalis*-Isolate waren flavomycinsensibel (s. Abb. 44). 88,9% der *E. faecium*-, 83% der *E. durans/hirae*, 98% der *E. casseliflavus*- sowie 100% der *E. gallinarum*-Isolate verhielten sich flavomycinresistent.

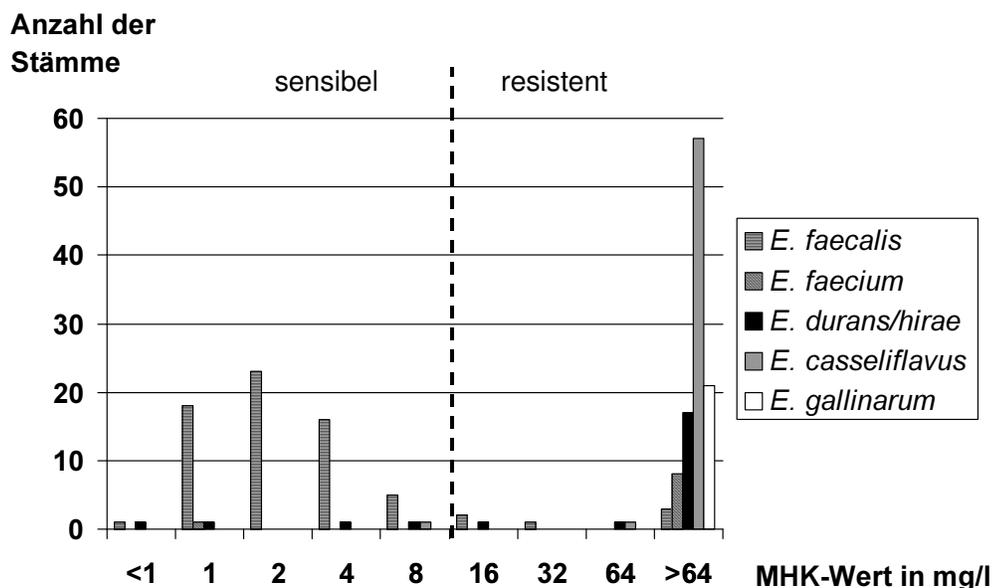


Abbildung 44: Resistenzverhalten von Enterokokken (n=181) aus Schlachtkörperoberflächen- und Kotproben vom Rind gegen Flavomycin

Unter den *E. faecalis*-Isolaten vom **Schwein** befanden sich vier flavomycinresistente Stämme mit MHK von 16 mg/l und >64 mg/l (s. Abb. 45). Die übrigen 77 und damit 95% der *E. faecalis*-Stämme verhielten sich flavomycinsensibel. Dagegen zeigten sich 97% der *E. faecium*- und *E. durans/hirae*-, 89% der *E. casseliflavus*- sowie 96% der *E. gallinarum*-Stämme flavomycinresistent.

Unter den *E. faecalis*-Isolaten aus **Lebensmitteln** verhielten sich fünf mit MHK von 16 mg/l bzw. >128 mg/l flavomycinresistent (s. Abb. 46). 134 *E. faecalis*-Isolate und damit 96% dieser Spezies zeigten sich mit MHK von 8 mg/l und darunter flavomycinsensibel. Im Gegensatz dazu verhielten sich 77% der *E. durans/hirae* sowie 100% der *E. faecium*, *E. casseliflavus* und *E. gallinarum*-Isolate resistent.

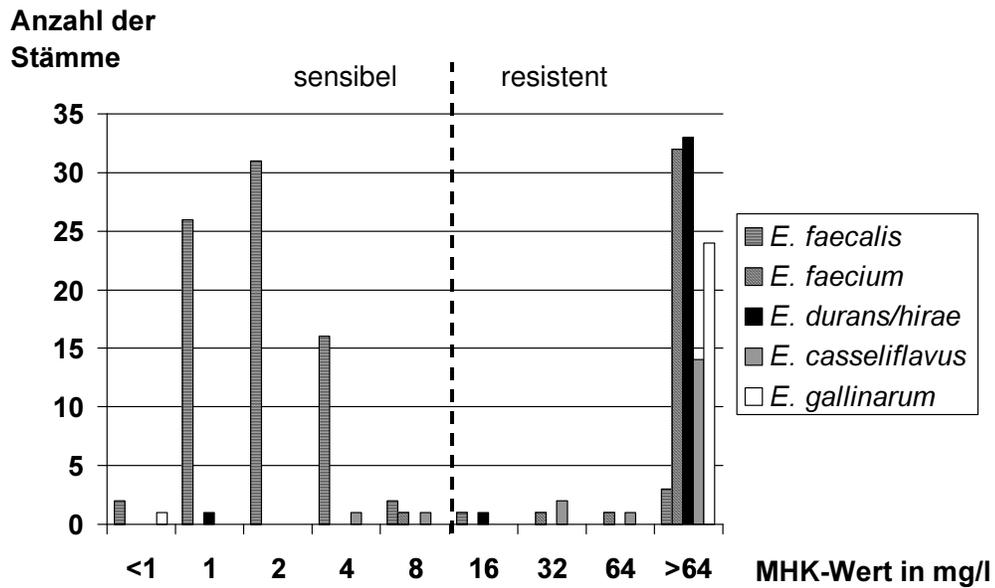


Abbildung 45: Resistenzverhalten von Enterokokken (n=195) aus Schlachtkörperoberflächen- und Kotproben vom Schwein gegen Flavomycin

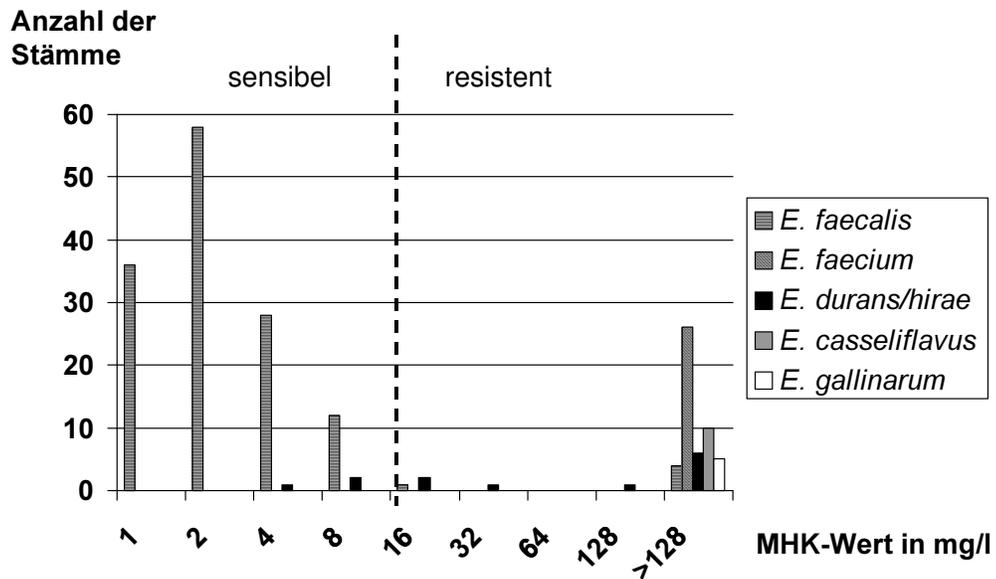


Abbildung 46: Resistenzverhalten von Enterokokken (n=193) aus Lebensmitteln gegen Flavomycin

Tabelle 27 zeigt das Resistenzverhalten von *E. faecalis* und *E. faecium* gegen Flavomycin.

Tab. 27: Resistenzverhalten von *E. faecalis* und *E. faecium* aus Kot- und Schlachtkörperoberflächenproben von Rind und Schwein sowie aus Lebensmitteln gegen Flavomycin

Spezies	Herkunft	Anzahl der Isolate	sensibel		resistent	
			absolut	in %	absolut	in %
<i>E. faecalis</i>	Rind	69	63	91	6	9
	Schwein	81	77	95	4	5
	Lebensmittel	139	134	96	5	4
<i>E. faecium</i>	Rind	9	1	11	8	89
	Schwein	35	1	3	34	97
	Lebensmittel	26	0	0	26	100

3.3.1.11. Avilamycin

Die Ergebnisse der Empfindlichkeitstestung gegen Avilamycin sind in den Abbildungen 47 bis 49 sowie in Tabelle 28 dargestellt.

Die Isolate vom **Rind** zeigten innerhalb jeder Spezies sowohl avilamycinsensibel als auch –resistente Stämme (s. Abb. 47). So trat Avilamycinresistenz bei 9% der *E. faecalis*-, 67% der *E. faecium*-, 22% der *E. durans/hirae*-, 49% der *E. casseliflavus*- und 48% der *E. gallinarum*-Stämme auf.

Beim **Schwein** erwiesen sich 10% der *E. faecalis*-, 51% der *E. faecium*-, 66% der *E. durans/hirae*-, 47% der *E. casseliflavus*- und 44% der *E. gallinarum*-Isolate als avilamycinresistent (s. Abb. 48).

Unter den *E. faecalis*-, *E. faecium*- und *E. durans/hirae*-Isolaten aus **Lebensmitteln** überwogen die avilamycinsensiblen Stämme mit jeweils 97%, 77% und 62% (s. Abb. 49). Die *E. casseliflavus*-Isolate waren zu 50% und die *E. gallinarum*-Stämme zu 40% avilamycinsensibel.

Insgesamt zeigten sich die *E. faecalis*-Isolate jeder Herkunft empfindlicher gegenüber Avilamycin als die *E. faecium*-Isolate (s. Tab. 28).

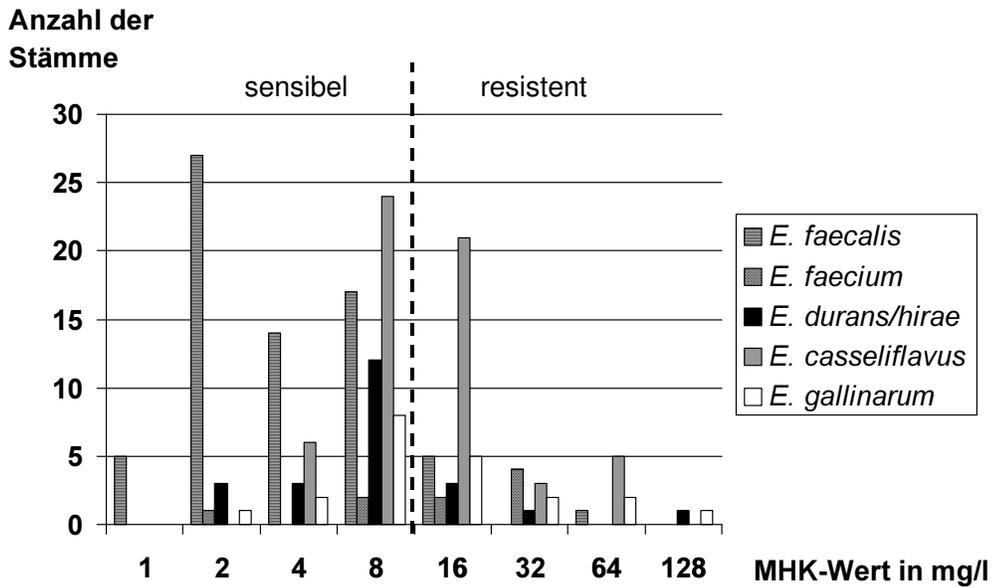


Abbildung 47: Resistenzverhalten von Enterokokken (n=181) aus Schlachtkörperoberflächen- und Kotproben vom Rind gegen Avilamycin

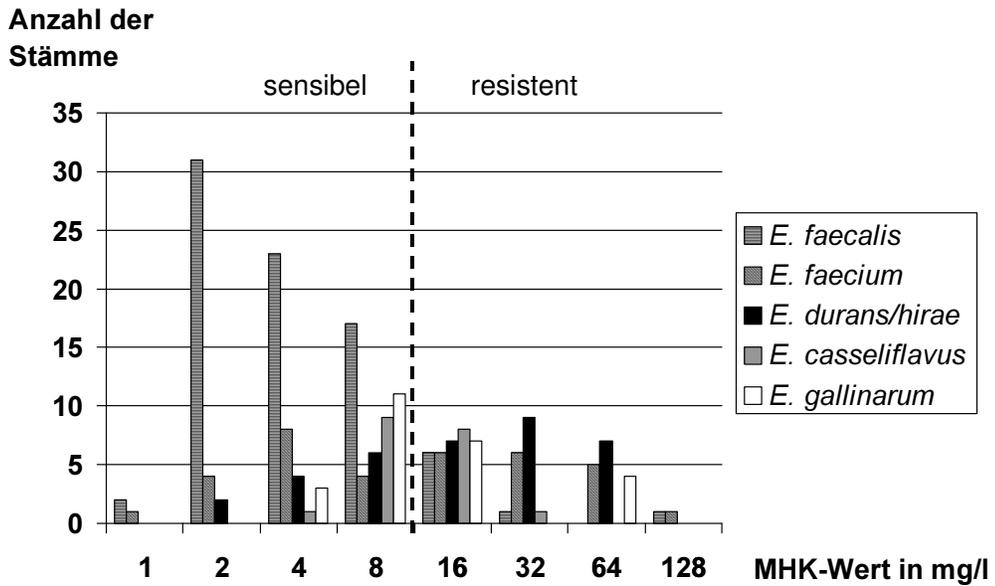


Abbildung 48: Resistenzverhalten von Enterokokken (n=195) aus Schlachtkörperoberflächen- und Kotproben vom Schwein gegen Avilamycin

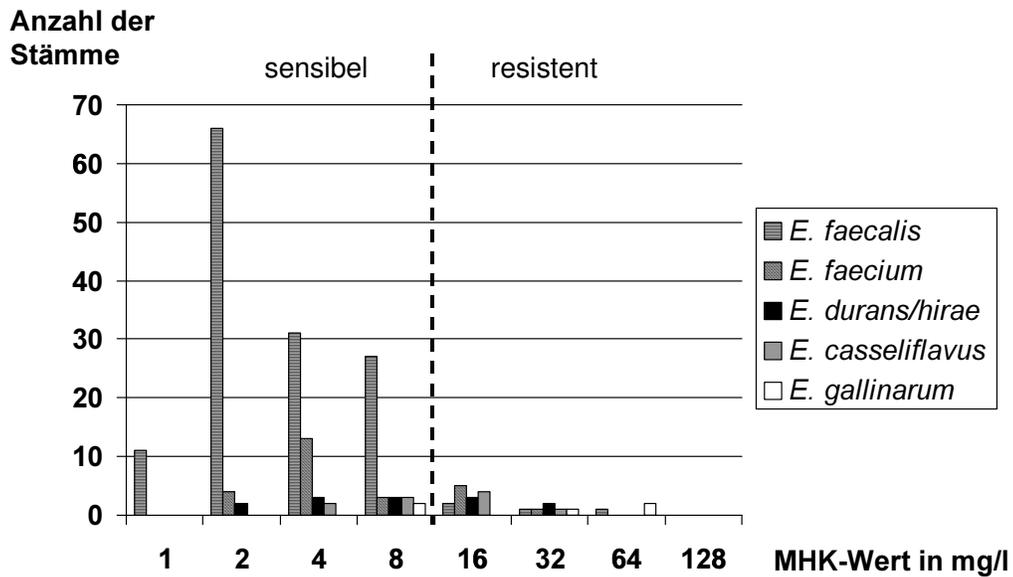


Abbildung 49: Resistenzverhalten von Enterokokken (n=193) aus Lebensmitteln gegen Avilamycin

Tab. 28: Resistenzverhalten von *E. faecalis* und *E. faecium* aus Kot- und Schlachtkörperoberflächenproben von Rind und Schwein sowie aus Lebensmitteln gegen Avilamycin

Spezies	Herkunft	Anzahl der Isolate	sensibel		resistent	
			absolut	in %	absolut	in %
<i>E. faecalis</i>	Rind	69	63	91	6	9
	Schwein	81	73	90	8	10
	Lebensmittel	139	135	97	4	3
<i>E. faecium</i>	Rind	9	3	33	6	67
	Schwein	35	17	49	18	51
	Lebensmittel	26	20	77	6	23

3.3.2. Resistenzmuster von *E. faecalis* und *E. faecium*

3.3.2.1. *E. faecalis*

Die Resistenzmuster der *E. faecalis*-Isolate vom **Rind** sind in Anhangstabelle 1 dargestellt. Von den 69 Isolaten zeigte ein Teil Mehrfachresistenz gegen

mehrere Antibiotika (s. Tab. 29 und 30). Eine alleinige Resistenz gegen Tetrazyklin kam bei einem Stamm vor. Resistenz gegen Tetrazyklin kombiniert mit einer Resistenz gegen Erythromycin und Tylosin trat bei drei Stämmen auf. Diese drei Isolate wiesen gleichzeitig eine Resistenz gegen Chloramphenicol und Bacitracin auf. Alleinige Resistenz bzw. intermediäres Verhalten gegen Chloramphenicol trat bei fünf Isolaten auf. Gegen Quinupristin/Dalfopristin zeigte *E. faecalis* eine natürliche Resistenz.

Tab. 29: Häufigkeiten* von Ein- und Mehrfachresistenzen von *E. faecalis* aus Kot- und Schlachtkörperoberflächenproben von Rind und Schwein sowie aus Lebensmitteln

<i>E. faecalis</i> - Isolate (n=289) von	Anzahl und Häufigkeit (%) von <i>E. faecalis</i> - Stämmen mit Resistenzen gegen 1 bis 7 Antibiotika						
	1	2	3	4	5	6	7
Rind (n=69)	15 (21,7)	6 (8,7)	2 (2,9)	0 (0,0)	2 (2,9)	1 (1,4)	0 (0,0)
Schwein (n=81)	16 (19,8)	10 (12,3)	1 (1,2)	9 (11,1)	4 (4,9)	0 (0,0)	0 (0,0)
Lebensmittel (n=139)	37 (26,6)	7 (5,0)	5 (3,6)	4 (2,9)	3 (2,2)	1 (0,7)	0 (0,0)

*: intermediäres Verhalten und die natürliche Resistenz gegen Quinupristin/Dalfopristin wurden nicht berücksichtigt

Von den 81 *E. faecalis*-Isolaten vom **Schwein** zeigten die zwei gentamicinresistenten Stämme zugleich Resistenz gegen Tetrazyklin, Erythromycin und Tylosin (s. Tab. 30 sowie Anhangstabelle 2). Einer davon wies darüber hinaus Resistenz gegen Chloramphenicol, der andere Resistenz gegen Bacitracin auf. Die Häufigkeit des Vorkommens von Ein- und Mehrfachresistenzen bei *E. faecalis*-Isolaten ist in Tabelle 29 dargestellt.

Von den 139 *E. faecalis*-Isolaten aus **Lebensmitteln** wiesen die beiden gentamicinresistenten Stämme, genau wie die vom Schwein, zugleich eine Resistenz gegen Tetrazyklin, Erythromycin und Tylosin auf. Einer dieser beiden zeigte darüber hinaus Resistenz gegen Chloramphenicol (s. Tab. 30 sowie Anhangstabelle 3). Fünf Isolate waren (mit Ausnahme von Quinupristin/Dalfopristin) sensibel gegen alle untersuchten Antibiotika.

Tab. 30: *E. faecalis*-Isolate mit Resistenzen gegen drei oder mehr Antibiotika*

Herkunft	Anzahl der Isolate	Resistenzmuster**
Rind	1	TYL/CHL/AVI
	1	ERY/TYL/CHL
	2	TET/ERY/TYL/CHL/BAC
	1	TET/ERY/TYL/CHL/BAC/FLA
Schwein	1	TET/ERY/TYL
	1	TYL/CHL/BAC/AVI
	1	TET/ERY/TYL/FLA
	1	TET/ENR/CHL/AVI
	1	TET/ENR/FLA/AVI
	5	TET/ERY/TYL/CHL
	1	GEN/TET/ERY/TYL/BAC
	1	TET/TYL/ENR/CHL/AVI
	1	TYL/ENR/CHL/FLA/AVI
	1	GEN/TET/ERY/TYL/CHL
	Lebensmittel	1
4		TET/ERY/TYL
1		GEN/TET/ERY/TYL
3		TET/ERY/TYL/CHL
1		GEN/TET/ERY/TYL/CHL
1		TET/ENR/CHL/FLA/AVI
1		TET/ERY/TYL/CHL/BAC
1		TET/ERY/TYL/CHL/BAC/AVI

*: intermediäres Verhalten und die natürliche Resistenz gegen Quinupristin/Dalfopristin wurden nicht berücksichtigt; **: GEN=Gentamicin, TET=Tetrazyklin, ERY=Erythromycin, TYL=Tylosin, ENR=Enrofloxacin, CHL=Chloramphenicol, BAC=Bacitracin, FLA=Flavomycin, AVI=Avilamycin

3.3.2.2. *E. faecium*

Unter den neun *E. faecium*-Isolaten vom **Rind** wies eines Resistenzen gegen Penicillin, Tetrazyklin, Erythromycin, Enrofloxacin, Quinupristin/Dalfopristin, Chloramphenicol, Bacitracin, Flavomycin und Avilamycin auf (s. Tab. 32 und

Anhangstabelle 4). Tetrazyklinresistenz kam noch bei einem weiteren Isolat vor, dieses zeigte darüber hinaus Resistenzen gegen Enrofloxacin, Bacitracin, Flavomycin und Avilamycin.

Tab. 31: Häufigkeiten* von Ein- und Mehrfachresistenzen von *E. faecium* aus Kot- und Schlachtkörperoberflächenproben von Rind und Schwein sowie aus Lebensmitteln

<i>E. faecium</i> - Isolate (n=70) von	Anzahl und Häufigkeit (%) von <i>E. faecium</i> -Stämmen mit Resistenzen gegen 1 bis 11 Antibiotika										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Rind (n=9)	1 (11)	0	1 (11)	2 (22)	4 (44)	0	0	0	1 (11)	0	0
Schwein (n=35)	3 (9)	6 (17)	6 (17)	4 (11)	7 (20)	0	4 (11)	2 (6)	2 (6)	0	1 (3)
Lebens- mittel (n=26)	1 (4)	11 (42)	6 (23)	2 (8)	5 (19)	1 (4)	0	0	0	0	0

*: intermediäres Verhalten wurde nicht berücksichtigt

Unter den 35 *E. faecium*-Isolaten vom **Schwein** befanden sich drei gegen beide Glykopeptide (Vancomycin und Teicoplanin) resistente Stämme. Diese waren darüber hinaus resistent gegen Penicillin, Tetrazyklin, Erythromycin, Quinupristin/Dalfopristin und Flavomycin sowie intermediär oder resistent gegen Enrofloxacin (s. Tab. 32 und Anhangstabelle 5). Eines dieser Isolate zeigte zusätzlich Resistenz gegen Tylosin, eines gegen Avilamycin und eines gegen Tylosin und Avilamycin. Ein penicillinresistenter Stamm war gleichzeitig resistent gegen Ampicillin, Amoxicillin/Clavulansäure, Tetrazyklin, beide Makrolide, Enrofloxacin, Quinupristin/Dalfopristin, Bacitracin, Flavomycin und Avilamycin. Zehn der elf penicillinresistenten Isolate zeigten zugleich Resistenz gegen Tetrazyklin, sieben davon waren zudem noch resistent gegen Erythromycin.

Von den 26 *E. faecium*-Isolaten aus **Lebensmitteln** war ein penicillinresistenter Stamm zugleich resistent oder intermediär gegen Tetrazyklin, Erythromycin, Enrofloxacin, Quinupristin/Dalfopristin, Chloramphenicol und Flavomycin.

Tab. 32: *E. faecium*-Isolate mit Resistenzen gegen fünf oder mehr Antibiotika*

Herkunft	Anzahl der Isolate	Resistenzmuster**
Rind	1	ENR/Q-D/BAC/FLA/AVI
	1	ERY/ENR/Q-D/BAC/FLA
	1	ERY/ENR/BAC/FLA/AVI
	1	TET/ENR/BAC/FLA/AVI
	1	PEN/TET/ERY/ENR/Q-D/CHL/BAC/FLA/AVI
Schwein	1	TET/ERY/ENR/FLA/AVI
	1	ERY/ENR/BAC/FLA/AVI
	1	ENR/CHL/BAC/FLA/AVI
	1	ENR/Q-D/BAC/FLA/AVI
	1	ERY/Q-D/BAC/FLA/AVI
	1	PEN/TET/ENR/Q-D/FLA
	1	ERY/ENR/Q-D/BAC/FLA
	1	PEN/TET/ENR/Q-D/CHL/FLA/AVI
	1	PEN/TET/ERY/ENR/Q-D/FLA/AVI
	1	TET/ERY/ENR/Q-D/CHL/FLA/AVI
	1	PEN/TET/ERY/TYL/Q-D/BAC/FLA
	1	PEN/TET/ERY/TYL/VAN/TEI/Q-D/FLA
	1	PEN/TET/ERY/TYL/ENR/Q-D/FLA/AVI
	1	PEN/TET/ERY/TYL/VAN/TEI/Q-D/FLA/AVI
	1	PEN/TET/ERY/VAN/TEI/ENR/Q-D/FLA/AVI
1	PEN/AMP/AMC/TET/ERY/TYL/ENR/Q-D/BAC/FLA/AVI	
Lebensmittel	1	TET/ERY/ENR/BAC/FLA
	1	TET/ERY/TYL/BAC/FLA
	1	ENR/Q-D/BAC/FLA/AVI
	2	ERY/ENR/Q-D/FLA/AVI
	1	ERY/ENR/CHL/BAC/FLA/AVI

*: intermediäres Verhalten wurde nicht berücksichtigt; **: PEN=Penicillin, AMP=Ampicillin, AMC=Amoxicillin/Clavulansäure, TET=Tetracyclin, ERY=Erythromycin, TYL=Tylosin, VAN=Vancomycin, TEI=Teicoplanin, ENR=Enrofloxacin, Q-D=Quinupristin/Dalfopristin, CHL=Chloramphenicol, BAC=Bacitracin, FLA=Flavomycin, AVI=Avilamycin

Alle Isolate zeigten sich resistent oder intermediär gegen Erythromycin, sieben von ihnen wiesen außerdem Tetrazyklinresistenz auf (s. Anhangstabelle 6).

Die Häufigkeit des Auftretens von Ein- und Mehrfachresistenzen bei *E. faecium* ist in Tabelle 31, die Resistenzmuster der *E. faecium*-Isolate mit Resistenz gegen fünf oder mehr Antibiotika sind in Tabelle 32 dargestellt.

3.3.3. Ergebnisse der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die drei *E. faecium*-Isolate vom Schwein mit Vancomycin- und Teicoplaninresistenz waren Träger des *vanA*-Genes.

Da sich *E. gallinarum* von nicht pigmentbildenden *E. casseliflavus*-Isolaten allein auf biochemischer Grundlage nicht sicher unterscheiden läßt, wurde die Speziesdiagnose bei beweglichen, unpigmentierten Isolaten erst gestellt, nachdem der betreffende Stamm auf das Vorkommen des *vanC1*- und *vanC2*-Genes untersucht worden war. Somit ist bei allen *E. gallinarum*-Isolaten das *vanC1*-Gen bestätigt.

Bei vielen *E. casseliflavus*-Isolaten, die in den biochemischen Reaktionen, der Pigmentbildung und der Beweglichkeit eindeutige Ergebnisse zeigten, wurde auf den Nachweis des *vanC2*-Genes verzichtet. Bei 108 von insgesamt 211 *E. casseliflavus*-Isolaten wurde jedoch das *vanC2*-Gen nachgewiesen.

Der *vanB*-Genotyp trat bei keinem der untersuchten Enterokokkenisolate auf.