

Emil-Fischer-Schule
Bereich
Staatliche Fachschule für Lebensmitteltechnik
zu Berlin

Antibiotikaresistenz von Enterokokken auf
Vancomycin
aus Bio-Lebensmittelprodukten
tierischer Herkunft

Vorgelegt von
Jörg Freudenberg

Berlin 2006

Prüfung durch die Dozenten:

- 1) Frau Dr. Elda Hausmann
- 2) Herr Oberstudienrat Axel Juretko

Tag der Einreichung: 05.05.2006

In Liebe
meinen Eltern
und
Heidi und Achim Stärke
gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	3-4
2. Schrifttum	4
2.1. Vorkommen und Eigenschaften der Enterokokken.....	4-5
2.2. Infektionswege der Enterokokken beim Menschen.....	5-6
2.3. Enterokokken und ihre Chemotherapeutikaresistenz.....	6-8
2.4. Glykopeptide und ihr Wirkungsmechanismus auf Enterokokken.....	9
2.5. Resistenzmechanismen und Resistenztypen bei Enterokokken.....	10
2.6. Molekulare Grundlagen der Resistenzbildung bei Enterokokken.....	11-12
2.7. Enterokokkenresistenz auf Glykopeptiden innerhalb und außerhalb von Spitälern.....	12-13
2.8. Vancomycinresistente Enterokokken außerhalb von Spitälern.....	14-15
2.9. Enterokokkenresistenz gegenüber Vancomycin in Österreich.....	16
2.10. Antibiotikaeinsatz und Resistenzmechanismen bei Enterokokken.....	17-19
2.11. Bedeutung von Milchsäurebakterien in Lebensmitteln die als potentielle Vektoren für Antibiotikaresistenzen.....	20
2.12. Resistenzenentwicklung bei erwünschten Mikroorganismen in Nahrungsmittel.....	21-22
2.13. Antibiotikaresistenzen in der Lebensmittelmikrobiologie.....	23-24
2.14. Molekulare Analysen der Resistenzen.....	25
3. Tabelle über das Vorkommen und Bedeutung von Enterococcus spp. in Lebensmittelgruppen	27
3.1. Stammbaum der Enterokokken.....	28
4. Material	29
4.1. Verwendete Nährmedien und Reagenzien.....	29-32
5. Methode	32
5.1. Fließschema der mikrobiologischen Untersuchung.....	33
5.2. Probennahme.....	34
5.3. Probenaufbereitung und Isolierung der Enterokokkenstämme.....	34
5.4. Aufarbeitung/Anreicherung der Proben.....	35
5.5. Beimpfung der Selektivagarplatten und	

der Selektivanreicherung.....	36
5.6. Überimpfen auf Schafblutagar.....	37
5.7. Überimpfung der Selektivanreicherung.....	37
5.8. Bestätigungs- und Identifizierungsreaktionsmethoden.....	37
5.9. Katalasetest.....	38
5.10. PYRasetest.....	38
5.11. Wachstum in 6,5 %iger NaCl-BHI-Boullion.....	39
5.12. Spezifizierung der Enterokokkenstämme.....	39
5.13. Optische Spezifizierung.....	40
5.14. Wachstumskontrolle auf Selektivagarplatte.....	40
5.15. Der Beweglichkeitstest.....	40-41
5.16. Der Nachweis der Arginindihydrolase.....	41
5.17. Die Verstoffwechslung von α -Methylglycopyranosid.....	41
5.18. Die Verstoffwechslung weiterer Zuckerlösungen.....	42
6. Ergebnisse.....	43
6.1. Ergebnisse der Speziesbestimmung der Enterokokken- isolate nach PCR-Methode.....	44
7. Diskussionen.....	45-47
8. Zusammenfassung.....	47-49
9. Abstract.....	50-51
10. Literatur.....	52-53
11. Anhang - Tabelle.....	54

1. Einleitung

Die Enterokokken sind natürliche obligate Darmbewohner aller Säugetiere und somit auch des Menschen (z. B. wie *Escherichia coli*). Ihre Pathogenität galt in der Regel als gering. In der Humanmedizin war nur in Ausnahmefällen, bei abwehrgeschwächten Menschen (z.B. Intensivpatienten), eine eventuelle Gefahr der Pathogenität durch Enterokokken zu beobachten. Dieses änderte sich jedoch mit zunehmendem Aufkommen des Antibiotika-Einsatzes in der Humanmedizin und der Veterinärmedizin. In der Aufzucht von Masttieren wurden Antibiotika zusammen mit der Tiernahrung als Leistungsförderern verfüttert.

Enterokokken kommen in fermentierter Form in tierischen Lebensmitteln vor (z. B. Rohmilch, Käse, Fleisch und Wurstwaren) und gelangen so in die Nahrungskette des Menschen. Sie sind Weltmeister im Einsammeln und Weitergeben von genetischen Informationen und verfügen über ein breites Spektrum an natürlichen und im Laufe der Zeit erworbenen Resistenzen, so auch gegen zahlreiche Antibiotika. Sie können in diesem Sinne auch mit fast allen anderen Darmbakterien kommunizieren, also mit Entrobakterien, Milchsäurebakterien, Listerien, Clostridien, Staphylokokken, usw. (TEUBER, mündliche Mitteilung).

So avancieren die Enterokokken zur Zeit auf dem zweiten bis dritten Platz unter den Erregern nosokomialer Infektionen, d. h. Krankenhausinfektionen, in der Humanmedizin (PETERS, 2003). Insbesondere ist die Antibiotika-Gruppe der Glykopeptide (Vancomycin und Teicoplanin) von resistenten Infektionsstämmen betroffen. Das schließt eine Behandlungsanwendung im Ernstfall aus. Resistente Bakterien und ihre Resistenzgene können sich horizontal und vertikal ausbreiten.

In der hier vorliegenden Technikerarbeit sollte ein möglicher Nachweis erbracht werden, ob Antibiotikaresistenzen auch in Bioprodukten (Mettwurst, Schinken, Wurstware, Eiersalat, Weichkäse) vorhanden sind. Vancomycinresistente Enterokokken (VRE) treten in konventionell hergestellten Lebensmitteln auf, wie bereits mehrfach publiziert wurde (TEUBER, 2000). Bei der vorliegenden Untersuchung wurde auch eine Speziesbestimmung der Enterokokken durchgeführt. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient als weitere sensitive Nachweisreaktion.

Die Ergebnisse werden mit den Ergebnissen der Untersuchung von konventionellen Lebensmitteln aus anderen Arbeiten (soweit dies möglich ist) verglichen.

Diese Arbeit ist aufgrund der geringen Probenanzahl und der knapp bemessenen Zeit als Feldversuch zu verstehen und beansprucht keinen rein wissenschaftlichen, an jedem Ort reproduzierbaren Charakter. Es sollte die Problematik der Antibiotikaresistenzenwicklung in unseren Lebensmitteln, ihre Art und Herkunft, sowie der Umgang von verschiedenen Antibiotikapräparaten in unterschiedlichen Bereichen der Landwirtschaft und ihr Vorhandensein in zu Lebensmitteln verarbeiteten Produkten aufgezeigt werden.

2. Schrifttum

2.1. Vorkommen und Eigenschaften der Enterokokken

Seit 1984 erst gibt es die Bezeichnung Enterokokken, aus der Gruppe-D-Streptokokken, die sich aufgrund ihres eigenen Erbgutes von den anderen übrigen Streptokokken abgrenzen. Enterokokken gehören zu dem gram-positiven Bakterien. Enterokokken gelten als normale Magen- und Darm-Besiedler. Es sind in der Regel kleine, rundliche Bakterien, die zum Teil als Paare auftreten oder kurze Ketten bilden.

Enterokokken kommen bei Menschen und Tieren vor. Aufgrund der räumlichen Nähe zum Darm können sie auch in der Vaginalflora erscheinen. Dieses sind aber nicht die einzigen Bereiche im menschlichen Körper, in denen sie auftreten können. Da Enterokokken gegen Gallensalze unempfindlich sind, siedeln sie sich auch in den Gallenwegen an. Die häufigsten Besiedlungswege der Enterokokken, auf denen sie in den Blutkreislauf des Menschen gelangen, sind Darm oder Galle. Zudem ist es möglich, dass sie über die Darmflora in den Harntrakt und in die Niere gelangen.

Enterokokken besitzen die Fähigkeiten hohe alkalische pH-Werte, sowie erhöhte Kochsalzkonzentrationen über 6,5% auszuhalten. Sie sind in der Lage selbst erhöhte Temperaturen kurzfristig unbeschadet zu überleben. Die perfekte Anpassung auf Umwelteinflüsse und die Fähigkeit innerhalb der Spezies und mit anderen Bakterien

zu kommunizieren, verleiht ihnen ein Höchstmaß an Anpassung und macht sie daher so gefährlich.

Die häufigsten Enterokokkenspezies, die beim Menschen auftreten können, sind *E. faecalis* und *E. faecium*. Sie sind besonders gut an den Wirt angepasst. Die meisten der weiteren Enterokokken sind ebenfalls gut an den Menschen als Wirt angepasst. *E. faecium* und *E. faecalis* sind durch die unterschiedlichen Ernährungsgewohnheiten, sowie andere Faktoren, weltweit mit erheblichen Unterschieden in der Häufigkeit zu verzeichnen. Während die Spezies *E. faecalis* mit einem Anteil von ca. 80–90 % besetzt liegt der Anteil von *E. faecium* bei nur ca. 5 - max. 20 % in Europa. In den USA, Japan, Indien und Uganda herrscht eher die Spezies *E. faecium* vor, welches gleichzeitig die am häufigsten anzutreffende Spezies weltweit ist.

E. faecium kommt auch bei gesunden Küken und in Schweinen vor. *E. durans* bevölkert außer dem Menschen zwar auch Geflügel als Wirt, nicht aber weitere Nutztiere. *E. gallinarum* und *E. avium* sind häufig in Geflügel anzutreffen. Enterokokken findet man nicht nur bei Säugetieren. Einige ihrer Spezies findet man zudem bei Pflanzen, z.B.: *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. mundtii* oder *E. casseliflavus* (KLARE und WITTE, 1997), da sie fast jede mögliche Oberfläche kontaminieren und auf ihr für längere Perioden (1 Woche) überleben können (Zirakzadeh, A. und Patel, 2006).

2.2. Infektionswege der Enterokokken beim Menschen

Enterokokken befallen unterschiedliche Regionen des Körpers und verursachen folglich unterschiedliche Erkrankungen. Hauptsächlich gefährdet sind Intensivpatienten sowie Patienten mit schwerer Grunderkrankung, wie Polytrauma, Immunschwäche, z.B. Leukämie, Organtransplantation, Multiorganversagen oder bei immunsuppressiver Chemotherapie von Krebspatienten.

Enterokokkeninfektionen sind eine Begleiterscheinung des medizinischen Fortschrittes. Eine Antibiotikabehandlung, die eine Enterokokkeninfektion nicht

eindämmen kann, hat oftmals zur Folge, dass das Risiko einer Ausbreitung im Körper mit zum Teil erheblichen Folgen begünstigt wird. Die flächendeckende und breite Anwendung neu entwickelter oraler Antibiotika (z.B. Cephalosporine, einige Chinolone), die nur auf bestimmte gram-negative Problembakterien zugeschnitten sind, trugen zum massivem Anstieg weltweiter Enterokokkenresistenzen auf Antibiotika bei. Enterokokken sind in der Lage mehrere Resistenzgene parallel zu akkumulieren.

Erworbene Krankenhausinfektionen werden häufig von Enterokokken ausgelöst (hospital- oder nosokomiale Infektion). Hier besteht in größerem Maße die Gefahr der Resistenzentwicklung. 10-12 % der Krankenhausinfektionen sind in Deutschland und in den USA auf Enterokokkenarten zurück zuführen. Bei Harnwegsinfektion liegt die Rate noch höher. Der Anstieg der Septikämien bedingt durch Enterokokken betrug in Deutschland und in den USA 3,4 % in den Jahren 1974 bis 1980 und von 1983 bis 1985 etwa 12,0 % (KLARE und WITTE, 1997).

Die Enterokokkeninfektionsarten umfassen ein breites Spektrum. So sind neben den lebensbedrohlichen Enterokokken-Septikämien (einschließlich der Neugeborenenespesis) vor allem Herzinnenhautentzündungen (Endokarditis), Wundinfektionen im Bauchbereich (z.B. nach der OP), Eiteransammlungen (Abzesse) im Zwischenbauchraum, Beckenabzesse oder Blinddarm- und Gallenblasenentzündungen hervorzuheben. Die zuletzt genannten Infektionen liegen oftmals als Mischflora mit Anaerobiern, gram-negativen Erregern, sowie anderen gram-positiven Kokken vor. Äußerst selten rufen sie Infektionen im Bereich der Haut, der Weichteile und der Hirn- und Rückenmarkshäute (Meningitis) hervor.

2.3. Enterokokken und ihre Chemotherapeutikaresistenz

Einige Enterokokkenarten besitzen eine natürliche Antibiotikaresistenz, im Gegensatz zur erworbenen Resistenz. Dies kann mit dem Ort der Besiedlung durch die Bakterien und einer vorangegangenen Koevolution zusammenhängen. Mikroorganismen können sich Resistenzgene auch von anderen Mikroorganismen aneignen. Die Übertragung solcher Resistenzen kann durch Weitergabe

extrachromosomaler DNA mit Hilfe sogenannter Plasmide oder Genfähren erfolgen. Dieser wirkungsvolle Mechanismus wird heute von Molekularbiologen intensiv genutzt. Es handelt sich hierbei um die erworbene Resistenz.

Gegenüber verschiedenen Penicillinen verfügen Enterokokken über eine höhere Resistenzausprägung als Streptokokken. Hier ist *E. faecium* höher anzusiedeln als *E. faecalis*. Weitere natürliche Resistenzen treten gegenüber allen Cephalosporinen, gegenüber allen Polymixinen, zum größten Teil gegen Lincomycin oder Clindamycin und bei low-level-Resistenz gegen alle Aminoglykosid- Antibiotika auf.

Im Allgemeinen werden die Resistenzen in fünf Typen gliedert:

- 1) Bakterielle Produktion von Resistenzenzymen, um das Antibiotikum zu inaktivieren, wird ausgelöst.
- 2) Eine bakterielle Veränderung der Zellwand ruft eine Reduzierung von Aufnahme proteinen hervor, um so eine Antibiotika-Aufnahme zu vermindern.
- 3) Ein erworbener aktiver Transportmechanismus der Bakterienzelle wird aktiviert, um das Antibiotikum wirkungsvoll wieder auszuschleusen.
- 4) Eine Veränderung des Bakteriums, an dem das Antibiotikum angreift, tritt ein, so dass die Angriffsplattform durch die antimikrobielle Hemmwirkung verfehlt wird.
- 5) Ein neuer Stoffwechselnebenweg wird eingeschlagen, so dass das Antibiotikum den gewünschten Syntheseschritt eines bestimmten Zellproduktes nicht mehr hemmen kann. Das zu synthetisierende Produkt wird trotzdem gebildet.

Die wichtigsten, als gut wirksam einzustufenden Glykopeptid-Antibiotika in Deutschland sind nach wie vor Vancomycin und Teicoplanin. Es sind große molekulare Antibiotika für gram-positive Bakterien, die aber aufgrund der Zellenbegrenzung nicht in gram-negative Bakterien passieren können. Die Behandlung eines Patienten mit Glykopeptide erfolgt in erster Linie bei Patienten mit Infektionen, die durch mehrfach resistente Staphylokokken (MRSA, einschließlich Methicillin) verursacht wurden, bei Enterokokken mit einer Ampicillinresistenz sowie bei allergischen Reaktionen auf Penicilline.

Bei Patienten mit bedrohlicher Enterokokkeninfektion hat sich bisher die angewandte Kombibehandlung bewährt. Es handelt sich hierbei um die Ausnutzung von

Synergieeffekten bei einer kombinierten Gabe von Ampicillin und dem Aminoglykosid Gentamicin. Eine Gefahr besteht dann, wenn eine Enterokokkenresistenz auf Ampicillin vorliegt, was leider bei *E. faecium* sehr verbreitet ist und/oder wenn eine Hochresistenz gegen Aminoglykoside vorhanden ist. Die synergetische Wirkung der Medikamente kann ausbleiben und sogar ein totales Versagen der Antibiotika ist möglich.

Aufgrund des hohen Stellenwertes von Glykopeptid in der Kombination mit anderen Antibiotika bei Infektionen mit gram-positiven Bakterien, sind sie echte Reserveantibiotika und sollten nicht leichtfertig und breit angewandt werden. Verantwortungsvoller Umgang mit Glykopeptiden verhindert die ungewollte Resistenzausprägung durch Enterokokken (KLARE und WITTE).

2.4. Glykopeptiden und ihre Wirkungsmechanismen auf Enterokokken

Aufgrund der ähnlichen Molekülgröße- und Struktur mit Zellwandkomponenten gram-positiver Bakterien kann das Glykopeptid in die Zellwandbiosynthese der gram-positiven Bakterien eingreifen. Es verhindert die Verknüpfung von im Zytoplasma synthetisierten und an die äußere Oberfläche der Zellmembran transportierten Zellwandbausteine.

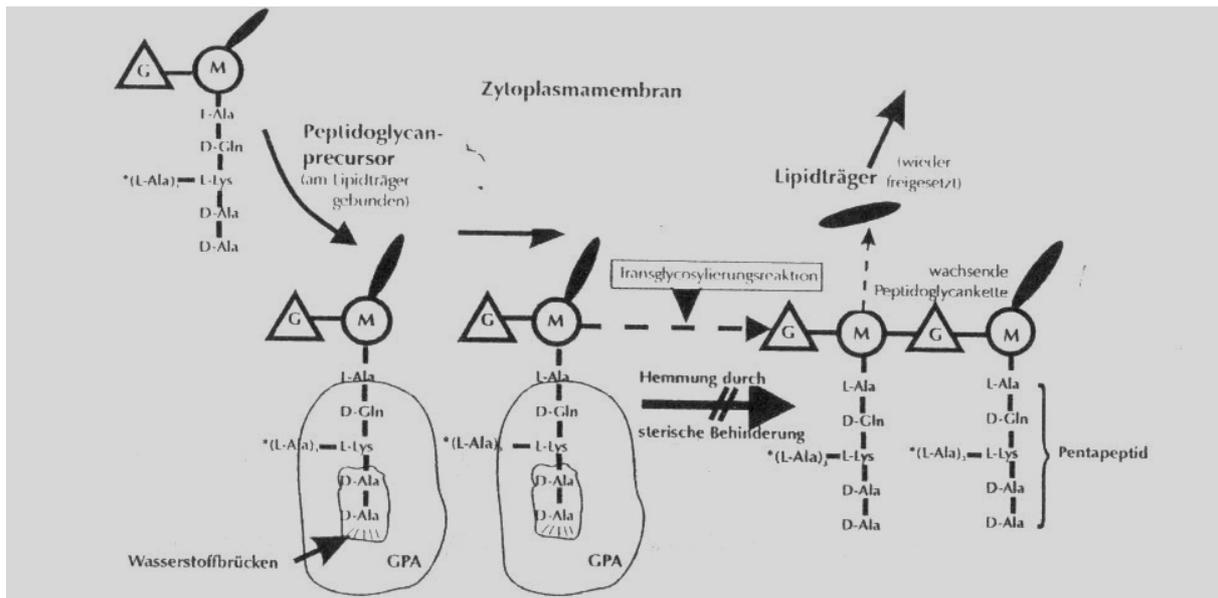


Abb.: 1) Schemadarstellung: Resistenzmechanismus – Robert-Koch-Institut

Legende: **G** = N-Acetylglucosamin,

M = N-Acetylmuraminsäure,

GAP = Glykopeptidantibiotikum,

L-Ala = L-Alanin,

L-Gln = L-Glutamin,

L-Lys = L-Lysin,

D-Ala = D-Alanin

Durch ihre räumliche und chemische Struktur stülpen sich die Glykopeptidantibiotika einfach sackförmig über die für die Zellwandsynthese notwendige Seitenkette des Pentapeptides. Durch das gebundene Pentapeptid an dem Glykopeptidantibiotikum wird eine Synthese der langen Ketten von Zellwandbausteinen, sowie deren Vernetzung verhindert. Die Folge ist das Absterben der Bakterienzellen durch Synthesehemmung (KLARE und WITTE, 1997).

Einige Antibiotika sind nicht in der Lage, aufgrund ihrer Molekülgröße bzw. ihrer chemischen Ladung, in gram-negative Bakterien einzudringen und ihre hemmende oder abtötende Wirkung einzusetzen.

2.5. Resistenzmechanismen und Resistenztypen bei Enterokokken

Enterokokken werden in drei Glykopeptidresistenztypen eingeteilt: VanA und VanB sind erworbene Resistenzen und VanC gilt als intrinsische (natürliche) Resistenz.

Die meist verbreitete Enterokokkenresistenz beruht auf die durch das Gen VanA vermittelte Glykopeptid-Hochresistenz (High-level-Typ). Ihr kommt eine besondere Bedeutung zu, da sie auf verschiedene Enterokokken-Stämme und -Arten übertragbar ist. Es kommt zu Parallel- und Kreuzresistenzen, was sich nicht nur auf Glykopeptidantibiotika beschränkt. Kreuzresistenzen treffen Vancomycin und Teicoplanin mit minimalen Hemmkonzentration (MHK) zu.

In erster Linie tritt der VanA-Typ bei *E. faecium* auf, aber auch die ihm nahe verwandten *E. duran*, *E. mundtii*, *E. hirae*, sowie der nicht verwandte *E. faecalis* zeigt Resistenzen dieses Typus.

Der VanB Typ ist eine übertragbare Low-level-Resistenz. Enterokokkenisolate besitzen auch eine Empfindlichkeit gegenüber Teicoplanin bei gleichzeitiger Vancomycinresistenz, weshalb der VanB- Resistenzmechanismus nur über das Vancomycin induzierbar ist. Betroffen sind in erster Linie nur *E. faecalis* und *E. faecium*.

Bei der intrinsischen Resistenz VanC handelt es sich um die betroffenen Arten der *E. gallinarum*-Gruppe: *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* und *E. flavescens*. Das VanC ist in zwei Subtypen VanC-1 (*E. gallinarum*) und VanC-2 (*E. casseliflavus*, *E. flavescens*) untergliedert. Das VanC-Gen ist auf dem Bakterienchromosom lokalisiert und dadurch nicht auf andere Stämme übertragbar. Es handelt sich hierbei konstitutive Resistenzen auf sehr niedrigem Niveau die nicht induzierbar (KLARE und WITTE, 1997) sind.

2.6. Molekulare Grundlagen der Resistenzbildung bei Enterokokken

Das Grundprinzip der vorhandenen Enterokokkenresistenz ist die Veränderung des Zielortes, des Pentapeptids, an seiner D-Alanyl-D-Alanin-Endstruktur von N-Acetylmuraminsäure/N-Acetylglucosamin-Zellwandbausteinen. Zum Beispiel spaltet die Carboxypeptidase das D-Alanin an seinem Ende und wird mittels eines breitem Substratspektrum einer Ligase, einem Molekül Milchsäure (D-Lactat) oder Hydroxybuttersäure an den VanA-kodierten Resistenzmechanismus angegliedert, so dass ein Depsipeptid entsteht. Da keine Wasserstoffbrückenbindungen am Zielort vorhanden sind, kann das Depsipeptid nicht blockiert werden. Dies ist die Ursache für das Nicht-Anheften der Glykopeptide. Somit ist trotz Glykopeptidgegenwart die Zellenwandsynthese möglich.

Die Glykopeptidresistenzgene, mit ihren Enzymen Ligase (VanA), Carboxypeptidase und Dehydrogenase (zur ausreichenden Bereitstellung der Hydroxysäure), liegen auf einem Transposon, welches ein mobiles genetisches Element ist. Die Resistenz kann nur aktiv werden, wenn Glykopeptid anwesend ist.

Das Transposon, welches durch Konjugation zu einem induzierbaren Resistenzmechanismus werden kann, trägt zwei Regulationsgene. Das Signalpeptid wird in Gegenwart von Glykopeptid aktiviert und es kommt zu einer Phosphorylierungsschritt. Ein anderes Gen aktiviert die vorhandenen, determinierten Regulatorproteine, welche sich positiv auf den Promotor des eigentlichen Resistenzgenes auswirken. Sie werden abgelesen und mit Hilfe entsprechender Enzyme für die Glykopeptidresistenzausprägung produziert.

Enterokokken können bei engem Zellenkontakt genetische Information durch Konjugation austauschen. Das Transposon auf dem das VanA - Gen lokalisiert ist, trägt keine Gene zur Konjunktion bei, es wird lediglich übertragen. Die Resistenzgene liegen oft auf konjugativen Plasmiden, was zu einer hohen Effizienz der VanA-Genotypen unter den verschiedenen Enterokokkenstämmen führt.

In den meisten Untersuchungsstämmen wurde in den Bakterienchromosomen der VanB-Genotyp aufgefunden. Dieser lag sogar im Jahr 1995 bei einigen Stämmen in England auf konjugativen Plasmiden vor.

Der Glykopeptidresistenzmechanismus von VanB- und VanC beruht auf ähnlicher Funktion wie bei dem VanA-Typ. Beim VanB-Typ wird wie beim VanA-Typ das D-Alanin durch das D-Lactat und beim VanC-Typ durch das D-Serin ersetzt (KLARE und WITTE, 1997).

2.7. Enterokokkenresistenz auf Glykopeptide innerhalb und außerhalb von Spitälern

Eine Verbreitung von vancomycinresistenten Enterokokken (VRE) kann zuerst innerhalb einer Klinikeinheit/Station auftreten, in der ein Patient als Wirt liegt. Durch die Verlegung des Patienten in eine andere Station oder in ein anderes Krankenhaus findet eine weitere Ausbreitung statt. Unterstützt wird die rasante Ausbreitung durch den hohen Selektionsdruck, der auf den Enterokokken in der Krankenhausatmosphäre lastet. Die Kette der Übertragungsmöglichkeiten kann von Person zu Person durch Patienten, Pflegepersonal oder Ärzte erfolgen. Eine dritte Übertragungsmöglichkeit ist durch mangelnde Hygiene oder Unkenntnis der Übertragungswege gegeben. Gemeinschaftlich genutzte Räume wie z.B. Toiletten oder medizinische Geräte können zur Ausbreitung resistenter Enterokokken beitragen. Weiter ist zu beachten, dass Enterokokken eine relative hohe Hitze- und Salzresistenz besitzen. Eine Infektionsgefahr besteht folglich auch über unzureichend heiß gereinigte Krankenhausbettwäsche, -kleidung oder direkt durch Patientenbetten. Besonders gefährdet sind Intensivpatienten. Hierzu entwickelten britische Wissenschaftler auf der Basis umfangreicher Untersuchungsreihen spezielle Enterokokken-freie Reinigungsmethoden für Krankenhauswäsche und -betten.

Bei Krankenhausinfektionen in der Epidemiologie ist es wichtig zu unterscheiden, ob es sich um eine exogene oder endogene Infektion handelt. Unter ungünstigen Umständen können Enterokokken zu den endogenen Hospitalinfektionen bei einem Patienten führen, die dann bei unzureichender Krankenhaushygiene zu einer exogenen Infektion auf andere Patienten und so zum Ausbruch einer Epidemie führen kann. Ist ein Patient massiv besiedelt oder mit VRE infiziert, muss das entsprechende Krankenhauspersonal beim Verlegen in ein anderes Krankenhaus informiert werden.

Mit der Herausforderung der täglichen Krankenhaushygiene befasste sich auch das US-amerikanische Institut Centers of Disease Control und gab hierzu zahlreiche Empfehlungen heraus, um die Ausbreitung zu unterbinden. Einer der Vorschläge ist die isolierte Pflege von Patienten mit der VRE-Infektion, ein analoger Maßnahmenkatalog existiert im Falle des Auftretens multiresistenter *Staphylokokkus aureus*-Bakterien (KLARE und WITTE, 1997).

Enterokokken können für etliche Krankheiten verantwortlich sein. Ihre wichtigsten Vertreter sind *E. faecalis* und *E. faecium*. So können sie Endocarditiden, Harnwegsinfektionen und Infektionen im Genitalbereich, sowie Mischinfektionen im Bauchraum und im kleinen Becken auslösen. Sie treten zunehmend als Erreger einer nosokomialen Infektion auf. Auf Intensivstationen (in der EU) sind sie für 11,7 % der Infektionen verantwortlich und für 10 % der nosokomialen Septikämien. Von klinischer Bedeutung ist der Anstieg von multiresistenten Enterokokken (hauptsächlich *E. faecium*) gegenüber Vancomycin und Teicoplanin.

E. faecium besitzt eine erschreckend höhere Resistenzhäufigkeit als *E. faecalis*. So wurde eine Resistenzrate bei Ampicillin, Imipenem und Ciprofloxacin von 48,7 %, 73,6 % und 73,1 % aufgedeckt (KRESKEN, 1995).

Die Typisierung der einzelnen Bakterienstämme von Enterokokken wird mit Hilfe des „genetischen Fingerabdruckes“ auf molekularer Basis durchgeführt. Das Fragmentmuster aus Gesamtzellen-DNA (Chromosom und Plasmide) der Enterokokken kann gut von anderen unterschieden werden.

Die Schnittstellen der DNA sind auf dem Chromosom statistisch verteilt und werden von Restriktionsendonukleasen zerlegt. Als Ergebnis der Gelelektrophorese entstehen unterschiedlich lange Fragmente, die mit Ethidiumbromid gefärbt und somit sichtbar gemacht werden. Bakterienstämme mit gleichem oder ähnlichem DNA-Fragmentmuster sind mit einander verwandt. Je identischer das DNA-Fragmentmuster ist, umso höher der Verwandtschaftsgrad der Bakterienstämme zueinander.

2.8. Vancomycinresistente Enterokokken außerhalb von Spitälern

Für uns besonders interessant sind die Quellen von vancomycinresistenten Enterokokken (VRE) außerhalb der Spitäler. 1991/92 hat das Robert-Koch-Institut (RKI) Abwasseruntersuchungen in kommunalen Klärwerken durchgeführt. In ihnen wurden VanA-positive, high-level-Glykopeptid-resistente Enterokokken (*E. faecium*-Stämme) isoliert.

Dass solche Werte nicht nur in großen Städten, sondern auch im ländlichen Bereich auftraten, ist vermutlich auf den großen, flächendeckenden Einsatz von Avopacin, einem Glykopeptid-Antibiotikum, das als Leistungs-/Wachstumsförderer in der kommerziellen Tiermast seit 1976 eingesetzt wird, zurück zu führen. Das ist eine der möglichen Ursachen für den massiven Anstieg der Enterokokkenresistenzen auf Vancomycin und Teicoplanin, da eine chemische Ähnlichkeit in der Struktur vorliegt.

Ein weiterer Grund für die VRE-Verbreitung in deutschen, ländlichen Gebieten ist der Verzehr von rohem Schweinehackfleisch (Mettwurst), welches häufig mit VRE kontaminiert ist. Nach Meinung des RKI liegt der Hauptgrund dafür aber in dem kommerziell hergestellten, kontaminierten VRE-Geflügelfleisch. Durch das Auftauwasser des Geflügels und das Abwaschen des Geflügelkörpers kommen die Bakterien an die Hände des Verbrauchers, in seine Küche, an die Spüle, an Küchenwerkzeuge, Besteck und Geschirr und von dort aus gelangen sie in den Menschen.

Auch pflanzliche Produkte können durch VRE-infizierten Gülleeinsatz (z.B. Salat) kontaminiert werden. Wenn lediglich mit kaltem Wasser abgespült wird, können Enterokokken überleben und sich nach Verzehr der Lebensmittel im menschlichen Darm ausbreiten.

Der vermehrte Einsatz von oral eingenommenen Breitbandantibiotika begünstigt aufgrund ihrer Enterokokken-Lücke das Vordringen der gram-positiven Bakterien insgesamt. Es gelangt von dem eingenommenen Antibiotika zuviel in geschwächter Form als Überschuss in den Darmtrakt, wo sich die obligaten Enterokokken Resistenzen aneignen können. Eine Infusion zur Antibiotikagabe wäre nach KLARE und WITTE (1997) sinnvoller.

Es wurde festgestellt, dass bei nicht-hospitalisierten Patienten über die Nahrungskette auch VanA-positive-VRE-Stämme in der Stuhlprobe vorkommen. Der Prozentsatz betrug 1994 bei 100 untersuchten Personen, außerhalb der Krankenhäuser, in ländlichen Gebieten von Sachsen-Anhalt 12 % von VanA-positiven *E. faecium*-Stämmen. Nahezu alle VanA-positiven Stämme der Spezies *E. faecium* stammen aus unterschiedlichen Standorten (Isolate aus: Kläranlagen, Fäkal- und Fleischproben von AVO-Masttieren, Stuhlproben von nicht-hospitalen und hospitalen Patienten, inklusive Infektionen) und besitzen dem entsprechend eine Polyklonalität im DNA-Makrorestriktionsmuster und im Enzymmuster.

Die Schlussfolgerung daraus ist, dass es sich zum größten Teil nicht um eine Verbreiterung definierter glykopeptid-hochresistenter *E. faecium*-Stämme innerhalb einzelner Biotope handelt. Man kann davon ausgehen, dass es sich um einen häufigen Transfer des VanA-Gens zwischen den unterschiedlichen Enterokokken-Stämmen handelt. Hieraus ergeben sich zwei Wege des Einbringens von Enterokokken mit übertragbaren Glykopeptidresistenzen in die klinischen Bereiche. In Form eines direkten VRE-kontaminierten Fleischproduktes oder über den bereits VRE-besiedelten Patienten konnten festgestellt, dass Nahrung und Umwelt potentielle Reservoirs für extrachromosomale glykopeptidresistente Determinanten sind. Sie schlagen weitergehende epidemiologische Untersuchungen vor (Messi, et al. 2006).

Avoparcin (AVO) als Futtermittelzusatz in der Schweine- und Hühnermast verursacht VRE in Gülleproben und erzeugt einen hohen Selektionsdruck. Eine Übertragung vom Tier auf den Menschen wäre möglich. Aufgrund der Kreuzresistenz zwischen AVO, VAN und TPL beim VanA-bedingten Mechanismus wurde AVO als Futtermittelzusatz im Jahr 1997 EU-weit verboten.

Bei Tierhaltungen in denen auf das Glykopeptidantibiotika AVO (Avopacin) als Leistungsförderer verzichtet wurde, wie bei den strengen Haltungsrichtlinien der Ökobauernhöfe, sowie bei frei lebenden Wildtieren, wurden aus deren Fäkalproben keine Enterokokken mit übertragbarer Glykopeptidresistenz gefunden. Dies bestätigten auch dänische und norwegische Arbeitsgruppen.

2.9. Enterokokkenresistenz gegenüber Vancomycin in Österreich

In Österreich wurden von 1994 bis 1996 an den Universitätskliniken in Wien und Graz mehrere Patienten auf Enterokokken untersucht. Ergebnis dieser Untersuchung war:

Zwei Patienten (P) besaßen vancomycinresistente Enterokokken (VRE); vier Patienten besaßen fünf Enterokokkenisolate von *E. faecium* und drei Patienten mit glykopeptidsensiblen Enterokokken besaßen sechs verschiedene Enterokokken-Isolate.

Der VanA-Typus lag vor, welcher zu den phäno- und genotypischen Analysen der acht glycopeptidhochresistenten *E. faecium*- und *E. faecalis* - Isolaten gehört. Eine charakteristische, ähnlich geprägte low-level-Resistenz gegen Vancomycin und Teicoplanin wies ein *E. casseliflavus*-Stamm mit intrinsischer VanC-1-Resistenz auf. Durch Genotypisierung der *E. faecalis*-Stämme wiesen zwei von drei VRE- Stämmen ein identisches Muster auf, obwohl eine Kreuzübertragung durch die Patienten ausgeschlossen werden konnte.

Die wesentliche Selektionsursache von VRE in Österreich basiert laut Studie auf der oralen Applikation von Vancomycin in der Humanmedizin. Das wären ca. 20 % der Patienten bei 66 kg Vancomycin-Applikationen insgesamt.

Das als Futtermittelzusatz bis zum Jahre 1997 in der EU zugelassene Glykopeptid Avoparcin fand in Österreich nur geringes Aufkommen (ca. 18-20 t, 10 % Ware/Jahr).

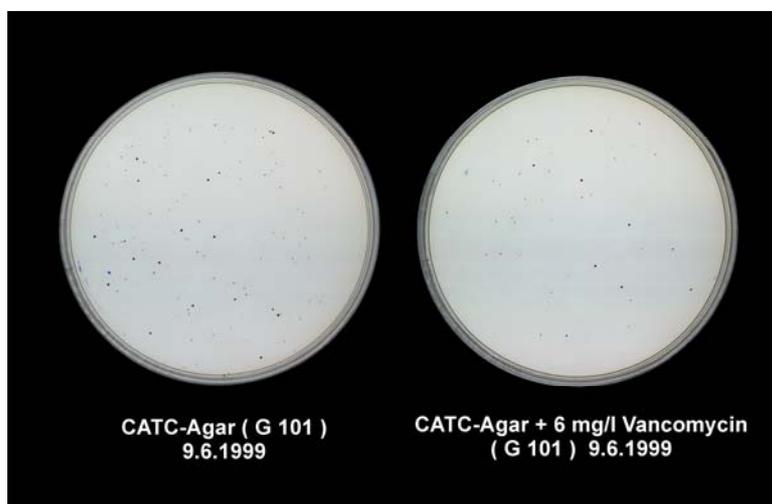


Abb.: 2) vom BfR

2.10. Antibiotikaeinsatz und Resistenzmechanismen bei Enterokokken

Die Resistenz von Enterokokken gegen Glykopeptidantibiotika (Vancomycin, Teicoplanin) ist international von hoher Bedeutung. Besonders ihre Hoch- und Kreuzresistenz durch die Vermittlung der VanA-Gencluster der verschiedenen Spezies der Enterokokkenstämmen ist brisant.

Glykopeptide gelten als wichtigstes Reserveantibiotika und als letztes Mittel, um Infektionen mit ampicillinresistenten Enterokokken und multiresistenten Staphylokokken, sowie im Falle des Vorliegens einer Penicillinallergie vom Patienten, bakterielle Infekte zu behandeln. 1988/89 wurde erstmals aus Frankreich über ein Auftreten von Glykopeptidresistenz bei Enterokokken (LECLERCQ et al., 1989) berichtet. Zuvor besaßen sie kaum eine klinische Relevanz. In zunehmendem Masse stehen heute die Mediziner vor den therapeutischen Problemen der Antibiotikaresistenz (UTTELY et al., 1988).

In den USA stiegen allein in den Jahren 1989-93 aus klinischem Material die Resistenzen aller Enterokokken von 0,3 % auf 7,9 % an. Bei Patienten aus der Intensivmedizin erhöhte sich in kurzer Zeit die Zahl der Enterokokken-Isolate von 0,4 auf 13,6 % (Centers of Disease Control and Prevention 1993). Besonders aus den USA, aber auch aus den EU-Staaten wurden Berichte über intra- und interhospitalen Ausbrüche von Infektionen mit vancomycinresistenten Enterokokken (VRE) bekannt.

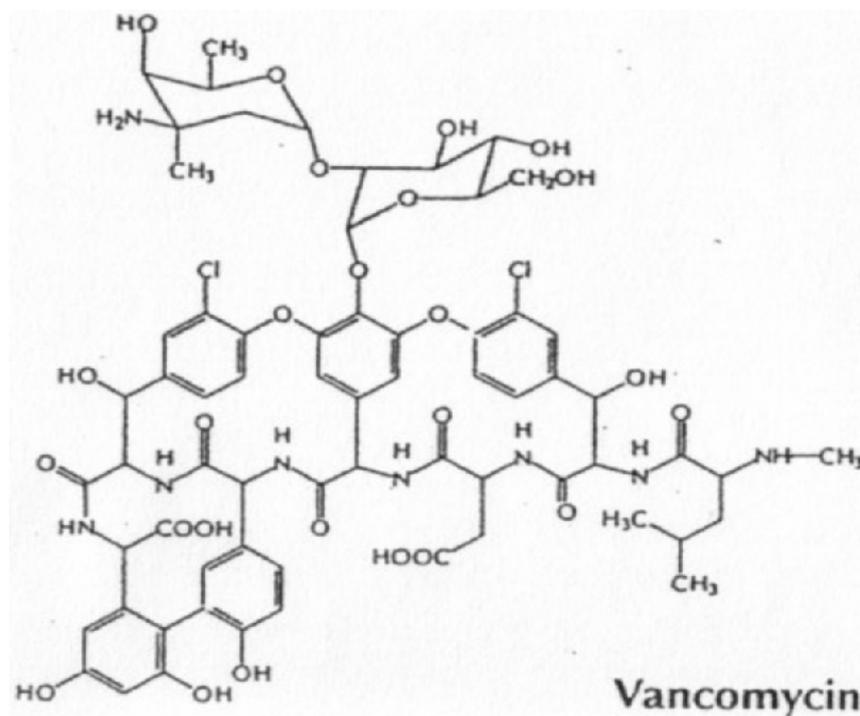


Abb.: 3) chemische Formeldarstellung

Obwohl Vancomycin bereits seit 1958 in den USA in der Humanmedizin eingesetzt wird, ist es umso erstaunlicher, dass die Vancomycinresistenz bei Enterokokken dort erst seit den letzten Jahren auftritt.

Der angestiegene Einsatz moderner Cephalosporine (oftmals oral gegebene Präparate), die eine Lücke im Wirkungsspektrum für Enterokokken aufweisen, tragen zu einer häufigeren Isolierung von Enterokokken im gesamten klinischen Untersuchungsmaterial bei. Ein zusätzlicher Selektionsdruck auf Enterokokken in den USA dürfte die praktizierte Anwendung von Vancomycin zur Behandlung der antibiotikaassoziierten, pseudomembranösen Enterokolitis (*Clostridium difficile*) sein.

Die häufigste Form der Vancomycinresistenz ist in ihren genetischen Determinanten weitgehend aufgeklärt. Das komplexe VanA-Gencluster ist ein System von sieben verschiedenen Genen. Essentiell verantwortlich für die Glykopeptidresistenz sind zwei Gene vanB und vanA (ARTHUR und COURVALIN, 1993). Dieses Gencluster bewirkt die Produktion einer Ligase mit verändertem Substratprofil, die zu einem modifizierten Peptidoglycan-Precursor führt, der nun gegenüber dem Angriff von Glykopeptiden unempfindlich ist.

Die VanA-Resistenzproteinsynthese wird durch Vancomycin (VA), Teicoplanin (TE) und Avoparcin (AVO) induziert und vermittelt eine Kreuzresistenz gegen alle drei Glykopeptide.

Das zweite wichtigste Glykopeptidresistenz-Gencluster VanB ist dem VanA-Gencluster ähnlich, muss jedoch über unterschiedliche Regulatormechanismen verfügen, da seine Expression nur durch VA, nicht jedoch durch TE induziert wird (BILLOT-KLEIN et al., 1994).

Enterokokken, die sich im Gastrointestinaltrakt befinden, stehen unter Selektionsdruck. Eine Vielfalt von Spezies, die den Darm kolonisiert, begünstigt den Austausch von Glykopeptid-Operonen. Eine gute Dokumentation über den Resistenztransfer von Enterokokken-Spezies ist die Arbeit von COURLAIN (1994).

Die Einnahme von oralem Vancomycin hat dazu geführt, dass an verschiedenen Orten, genetisch nicht verwandte Enterokokken-Stämme, unter einander Informationen weiter tragen und es zu vermehrten Vancomycinresistenzen kommt. Die Studie von ALLERBERGER (1997) kommt zum Ergebnis, dass auch Kreuzinfektionen bedeutsam sind.

Manche Autoren begründen den Anstieg von *E. faecium* durch den vermehrten Einsatz von Penicillinderivaten (RICE 1995). Avoparcin als Leistungsförderer zur Masttierzucht wurde erst in Deutschland und Dänemark, aufgrund einer möglichen Übertragung von VRE über die Nahrungskette, als Gefahrenquelle erkannt. Die EU reagierte darauf erst am 1. April 1997. Auch deutsch-belgische Untersuchungen ergaben, dass VRE bei nichthospitalisierten Probanden ein weit verbreiteter Bestandteil in der Darmflora war (KLARE et al., 1995).

Der Antibiotikaeinsatz im Krankenhaus ist entscheidend bei Patienten, die eine gewisse Selektion der Glykopeptidresistenz mit sich bringen. Die therapeutischen Probleme mit Vancomycin-Resistenzen bei Infektion mit Enterokokken, die sich den Medizinern auftun, sind zusehends von Bedeutung, da ein Vancomycin-resistenztransfer auf *Staphylokokkus aureus* vorkommen kann.

Was bereits in Laborversuchen gelang, das vanA-Genclustern auf Staphylokokken zu übertragen ist, zum Glück, noch nicht klinischer Alltag. Dies käme einer medizinischen Katastrophe gleich, da eine erworbene Resistenz eine weitaus höhere Virulenz dieses Erregers bei Krankenhausinfektionen besitzt. Das Nicht-Auftreten solcher Resistenzen bei klinischen Isolaten gibt Anlass zu hoffen, dass die Gene der Glykopeptid-Resistenzcluster für *S. aureus in vivo* auch einen selektiven Nachteil haben und somit in naher Zeit keine reale medizinische Bedrohung darstellen (ALLBERGER et al., 1997).

2.11. Bedeutung von Milchsäurebakterien in Lebensmitteln als potentielle Vektoren für Antibiotikaresistenzen

Eine Resistenzübertragung durch den Verzehr von Lebensmitteln, die auch nach dem Herstellungsverfahren einen resistenten Anteil originärer Lebensmittelflora in sich birgt, ist denkbar. Die Milchsäurebakterien, besitzen die Fähigkeit zur Weiterübertragung erworbener Resistenzen. Durch genetische Mechanismen können sie als Vektoren auftreten. Sie sind trotzdem nicht die Hauptursache für die menschliche Antibiotikaresistenz. (KLEIN, 1999 und Messi et al., 2006).

Der Nachweis von Enterokokkenstämmen der Arten *E. durans* (in größeren Mengen), *E. faecium* und *E. faecalis* in Milch und Milchprodukten ist ein Indiz für ungenügende Hygiene. Diese Arten sind Fäulniskeime und besitzen hygienische Indikatorfunktion für milchwirtschaftliche Gerätschaften. Es ist zu beachten, dass selbst in pasteurisierter Milch thermostabile Enterokokken auftreten können. Im Allgemeinen gilt, dass Enterokokken sich in Milchprodukten in unterschiedlichem Grad vermehren können.

Die Anreicherung der Enterokokken bei fermentierten Milcherzeugnissen sowie bei Käse, muss bei einer Beurteilung von bakteriologischen Befunden differenziert berücksichtigt werden, da Enterokokken auch Bestandteile einer Reifungsflora bei Käse sein können und somit in diesem Falle nicht als hygienische Indikatoren zu betrachten sind. So fand man in regelmäßigen Abständen eine unterschiedliche Enterokokkenrate bei Lebensmitteln. Die Proben enthielten eine Enterokokkenrate bis zu 99 % bei Rohmilch, 46 % bei pasteurisierter Milch, 34 % bei Sauermilch, Joghurt und Kefir, 53 % bei Butter und, je nach Art, 59 bis 92 % bei Käse. *E. durans* wird im pflanzlichen Bereich als Fäulniskeim angesehen (KIELWEIN, 1978), kommt als solcher aber auch auf Milchprodukten vor.

Von Bedeutung ist, dass Isolate aus Lebensmitteln laut einiger Studien andere Resistenz, sowie ein anderes genotypisches Muster als die klinischen Isolate aufweisen. Sie kamen eher nur sporadisch vor und waren meist quantitativ nicht nachweisbar. Sie besitzen wohl aber eine Teilweise humanklinische, relevante Resistenz. Hieraus könnte man herleiten, dass Lebensmittel als Vektoren nur im Zusammenhang mit Resistenzübertragungen vom Lebensmittelisolat auf pathogene Mikroorganismen zu vermuten sind (KLEIN, 1999).

2.12. Resistenzentwicklung bei erwünschten Mikroorganismen in Nahrungsmitteln

In vielen Bereichen werden Starterkulturen und Probiotika für die Erzeugung der menschlichen sowie der tierischen Ernährung eingesetzt (vgl. hierzu Garriga et al., 2005). Starterkulturen dienen zur Herstellung (Silageherstellung) fermentierter Lebensmittel wie z.B. bei Joghurt, Käse und Rohwurst (Garriga, et al., 2005).

Der Einsatz von bisher als harmlos geglaubten, gesundheitsfördernden oder erhaltenden Probiotika, durch Zugabe von probiotisch wirksamen Mikroorganismen, wie beispielsweise bei einer Vielzahl von Sauer Milchprodukten in der menschlichen Ernährung, dient zur Verbesserung der Darmkultur bei Mensch und Tier. In der Tierernährung dient dies zur Prophylaxe von Darmerkrankungen und zur besseren Futtermittelverwertung, sowie im engeren Sinne als Ersatz für Antibiotika. In Form von Futtermittelbeimischungen dienen die probiotischen Bakterien zur Unterstützung der Mast (Schwein, Geflügel).

Die Gefahr, die sich in ihnen verbirgt, ist die Funktion als Vektor für unerwünschte Eigenschaften, wie Antibiotikaresistenzen. Sie können auch als Erreger klinischer Erkrankungen fungieren. Bei den Probiotikasubstanzen handelt es sich oft um die fakultativ pathogene Gruppen der Enterokokken, Laktobacillen, Bazillen und Clostridien.

Bei der Gefahr einer klinischen Erkrankung spielen die Enterokokken eine weitaus größere Rolle als Laktobacillen. Die Glykopeptidresistenz bei Enterokokken unterteilt KLEIN (1999) nach phänotypischen und genotypischen Eigenschaften (Tabelle 1).

Tabelle 1 nach phänotypischen und genotypischen Eigenschaften

Resistenztyp	Beteiligte Spezies	Resistenzausprägung	Genet. Grundlage
VanA	E. faecium, E. faecalis	„High-level“ Vancomycin und Teicoplaninresistenz	Transposon, übertragbar
VanB	E. faecium, E. faecalis	„Low-level“ Vancomycinresistenz; Teicoplaninsensibel	chromosomal, nicht übertragbar
VanC	E. gallinarum, E. casseliflavus	„Low-level“ Vancomycinresistenz; Teicoplaninsensibel	chromosomal, nicht übertragbar

Würde eine VRE-Verbreitung über Lebensmittel erfolgen, so würde die Übereinstimmung der VRE-Isolate von Lebensmitteln und Klinikproben hinsichtlich des Resistenzmusters erwartet. Eine solche Übereinstimmung ist aber nicht vorhanden (vergleiche Versuchsreihen von KLARE und WITTE ,1997 mit KNUDTSON und HARTMANN, 1993 und KLEIN, 1999). Die untersuchten Proben beziehen sich auf Schweinefleisch. Hierdurch wird gezeigt, dass nach diesen Studien Schweinefleisch an keiner klinischen Infektionen beteiligt ist.

Die Frequenz bei Lebensmittelisolaten ist somit sehr niedrig und *in vivo*, bei den suboptimalen Bedingungen im Darmtrakt, äußerst unwahrscheinlich. Eine Übertragung einer Vancomycinresistenz von Enterokokken auf andere gram-positive Bakterien wurde bisher nur *in vitro* nachgewiesen (KLEIN, 1999).

Im Vergleich zu den Befunden bei Tieren scheint es beim Menschen (auch bei gesunden Individuen) ein gewisses Reservoir an VRE zu geben. Es besteht daher kein direkter Zusammenhang zwischen Fleischkonsum und der Kolonisierung mit VRE im Darmtrakt (KLARE und WITTE, 1997; KLEIN und REUTER, 1998).

Ferner ist nicht auszuschließen, dass von der Fleischgewinnung (Schlachthof) bis zum Einzelhandel (Distribution) eine Fremdkontamination z.B. durch den Menschen (mangelnde Hygiene) erfolgen kann (KLEIN, 1999). Kleine Kokken oder Spiralkeime, die auf der Haut überleben, können z.B. über nicht desinfizierte Hände übertragen werden.

Die Food and Drug Administration (FDA) skizziert eine mögliche Reduzierung des Gefahrenpotentials, durch die Aussetzung von Antibiotika in der Tierproduktion. Die Übertragungsmöglichkeiten von Antibiotikaresistenzen über Lebensmittel und in klinischen Isolaten, die in der Humanmedizin entstehen können, sind in einer Tabelle der FDA (1999) skizziert.

Über ein Verbot einzelner Substanzen allein, verhindert man noch nicht das Auftreten von Resistenzen in Lebensmitteln. Es kann nur durch ein ausgewogenes Monitoring- Programm zur Abschätzung der Resistenzentwicklung unter Einschluss des Antibiotikaeinsatzes in der Tierproduktion zu einer adäquaten Lösung kommen.

2.13. Antibiotikaresistenzen in der Lebensmittelmikrobiologie

Eine umfangreiche Studie belegt, dass Lebensmittel Quellen für die Entstehung von antibiotikaresistenten Keimen sind (PERRETEN, 1995). Die Kontaminationsquellen aus den Lebensmitteln sind im Wesentlichen die Komponenten Darm, Haut Schleimhaut und Mikroflora, die sich dann ihrerseits bei der Gewinnung von rohem Fleisch und von Rohmilch über das Lebensmittel ausbreiten. Das Ergebnis einer 15 jährigen Studie von PERRETEN und TEUBER (1995) zeigt deutlich, dass ein Anstieg von antibiotikaresistenten Enterokokken in fermentierten Lebensmitteln bei bestimmten Spezies real vorhanden ist. Die Resistenz von Vancomycin wurde 1995 zum ersten Mal geprüft. Eine Resistenzübertragung kann erfolgen, wenn Rohstoffe ohne Erhitzung oder ohne effektive chemische Konservierung zu Lebensmitteln weiter verarbeitet werden. Dies geschieht z.B. bei Rohwürsten und Rohmilchkäse.

Werden Rohstoffe (Rohmilch, Rohwurst) als Vorschaltung zum eigentlichen Verarbeitungssystem pasteurisiert, ist eine Verbreitung von antibiotikaresistenten

Keimen (Enterokokken, Staphylokokken) in den Nutztierpool mit Sicherheit auszuschließen. Es handelt sich hierbei um vegetative Keime, die bei ausreichender Erhitzung abgetötet werden.

Während in der häufig eingesetzten Fermentation im Herstellungsverfahren bei ausreichender Säuerung die klassischen Enterobakterien wie *E. coli* und Salmonellen in ihrer Weiterentwicklung unterbunden bzw. abgetötet werden, sind die zwei Keimarten, die Staphylokokken und die in Form von Milchsäurebakterien erscheinenden Enterokokken, von dem Fermentationsprozess unberührt.

Enterokokken sind, neben Staphylokokken ein Indiz für rohe, nicht erhitzte Lebensmittelprodukte oder für unhygienische Verarbeitungszustände, wobei hier auch nach der Erhitzung eine Kontamination erfolgen kann (Betriebshygiene). Neben der Indikatoreigenschaft für gute Betriebshygiene dienen sie auch als Messsystem zum Vorkommen antibiotikaresistenter Keime in Lebensmitteln.

Die notwendige Praxisanwendung von Antibiotika zur Verhinderung von Durchfallerkrankungen und Infektionen der Atemwege in der ganzen Tiermast führt zu Antibiotika Rückständen in der Milch, im Fleisch sowie im Harn von Schlachttieren. Antibiotikaresistente Keime in Lebensmitteln tragen zur Verbreitung von Antibiotikaresistenzen im wörtlichen Sinne bei. Resistenzen treten dort auf, wo Antibiotika appliziert werden (LEVY und NOVICK, 1986). Enterokokken tauschen mit vielen nicht verwandten gram-positiven und gram-negativen Bakterien Informationen aus und tragen so zur Verbreitung von Resistenzen bei (TEUBER, PERRETEN, WIRSCHING, 1996). Dies ist möglich durch vorhandene konjugative Plasmide und Transposons. Es gibt Stämme, die gegen alle natürlichen Antibiotika resistent sind. Eine starke Wasseraktivität in Lebensmitteln bestimmt scheinbar die Höhe der Enterokokken-Zahl. So wurde festgestellt, dass in Rohwürsten der Bereich vornehmlich bei 10^2 bis 10^3 pro Gramm und bei Weichkäse bei 10^7 liegt.

2.14. Molekulare Analyse der Resistenzen

Die Antibiotika-Resistenzkeime in der Humanmedizin liegen sehr häufig in Plasmid- oder Transposon-Kodierungen vor. Die darin liegende Resistenz wird gezielt mit isolierten resistenten Keimen auf antibiotikasensitive Keime übertragen, z.B. durch Konjugation. Ist das resistente transkonjugante Plasmid ermittelt, wird dieses mit einer spezifischen Gensonde gefischt, um den Resistenznachweis zu erbringen. Wenn kein Plasmid gefunden wurde, ist davon auszugehen, dass die Resistenzgene im Chromosom eingebaut sind. Auch diese Resistenzen können durch die passende Gensonde nachgewiesen werden. Beide Phänomene wurden von PERRETEN und TEUBER (1996) beobachtet.

Interessant ist, dass nur ein kleiner Bruchteil des gesamten Plasmids für die genetische Information der Resistenzeigenschaft verantwortlich ist. Der weitaus größere Teil (Hauptteil) ist für die genetische Replikation (Vermehrung des Plasmides) und die Kodierung des konjugativen Transfers verantwortlich. Somit können verkleinerte Plasmide, die eine Resistenz besitzen, aber nicht mehr konjugativ sind, keine Resistenz weitergeben. Dies ermöglicht ein Ausschlussverfahren zur Identifizierung von Plasmiden mit konjugativen Transfermöglichkeiten.

Das Team TEUBER konnte Ähnlichkeiten zwischen Erythromycin- Resistenzgenen in Enterokokken aus Lebensmitteln (Rohwurst, Rohmilchkäse) und Resistenzgenen aus humanpathogenen Enterokokken nachweisen. Bei umfangreichen Versuchen wurden Resistenzdeterminanten aus Rohmilch und Rohwurst (von *E. faecalis*), die nahezu alle identisch mit den klinischen Resistenzdeterminanten waren, gefunden. Die Wahrscheinlichkeit der Resistenzübertragung durch Lebensmittel darf also nicht unterschätzt werden. Der Enterokokkus. sp. RE39 aus Schweinefleisch-Isolat war z.B.: in der Lage, mittels konjugativen Plasmiden sowohl innerhalb als auch außerhalb der Gattung Enterokokkus Erythromycin-Resistenzinformation auszutauschen (2000). TEUBER fasst die Einschätzung der Resistenzübertragung als Risikoquelle für die menschliche Gesundheit Risikoquelle wie folgt zusammen:

„Als Lebensmittelmikrobiologen steht uns eine endgültige medizinische Bewertung sicher nicht zu. Als Verantwortlicher für die Verpflegung kranker Menschen im Spital

würde ich es mir jedoch ernsthaft überlegen, ob ich es verantworten könnte, Patienten mit hohen Keimzahlen antibiotikumresistenter Enterokokken und Staphylokokken oral zu infizieren, zumal wenn diese Organismen effiziente Gentransfermechanismen besitzen, die im Darm von Versuchstieren erwiesenermaßen Resistenzen an andere Mikroorganismen weiterleiten können (Doucet-Populaire et al., 1991; Brockmann et al., 1996).

Der Ruf „zurück zur Natur“ darf nicht zu einem hygienischem Rückschritt führen“ (TEUBER, 2000).

3. Tabelle über das Vorkommen und Bedeutung von *Enterococcus* spp. in Lebensmittelgruppen (PETERS 2003)

Lebensmittel-Gruppe:	Spezies:	Bedeutung:	Autor:
Fleisch und Fleischwaren			
Frühstücksfleisch	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i>	Verderbniserreger	BELL und GILL (1982)
Schinken-Konserven	<i>E. faecium</i>	Verderbniserreger	HOU BEN (1982)
Frühstücksfleisch	<i>E. faecium</i>	Verderbniserreger	BELL und DELACEY (1984)
Rinderhackfleisch	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. gallinarum</i> , <i>E. duran</i> , <i>E. hirae</i>		KLEIN et al. (1998)
Schweinehackfleisch	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. casseliflavus</i> , <i>E. gallinarum</i> , <i>E. duran</i> , <i>E. avium</i>		KLEIN et al. (1998)
Milch und Milchprodukte			
Rohmilchkäse	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. duran</i>	Reifungsflora, Aromabildung und	TROVATELLI SCHIESSER (1987)
Labneh (ägypt. Joghurtprodukt)	<i>E. faecalis</i>	Starterkultur	EL-SAMRAGY et al. (1988)
Rohmilchkäse	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. duran</i> <i>Enterococcus</i> spp.	Reifungsflora, Aromabildung	CENTENO et al. (1996)
Rohmilchkäse	<i>E. casseliflavus</i> , <i>E. faecalis</i>		GELSOMINO et al. (2002)
Griech. Feta-Käse	<i>E. faecium</i>	Starterkultur	SARANTINO-POULOS et al. (2002)

3.1. Stammbaum der Enterokokken

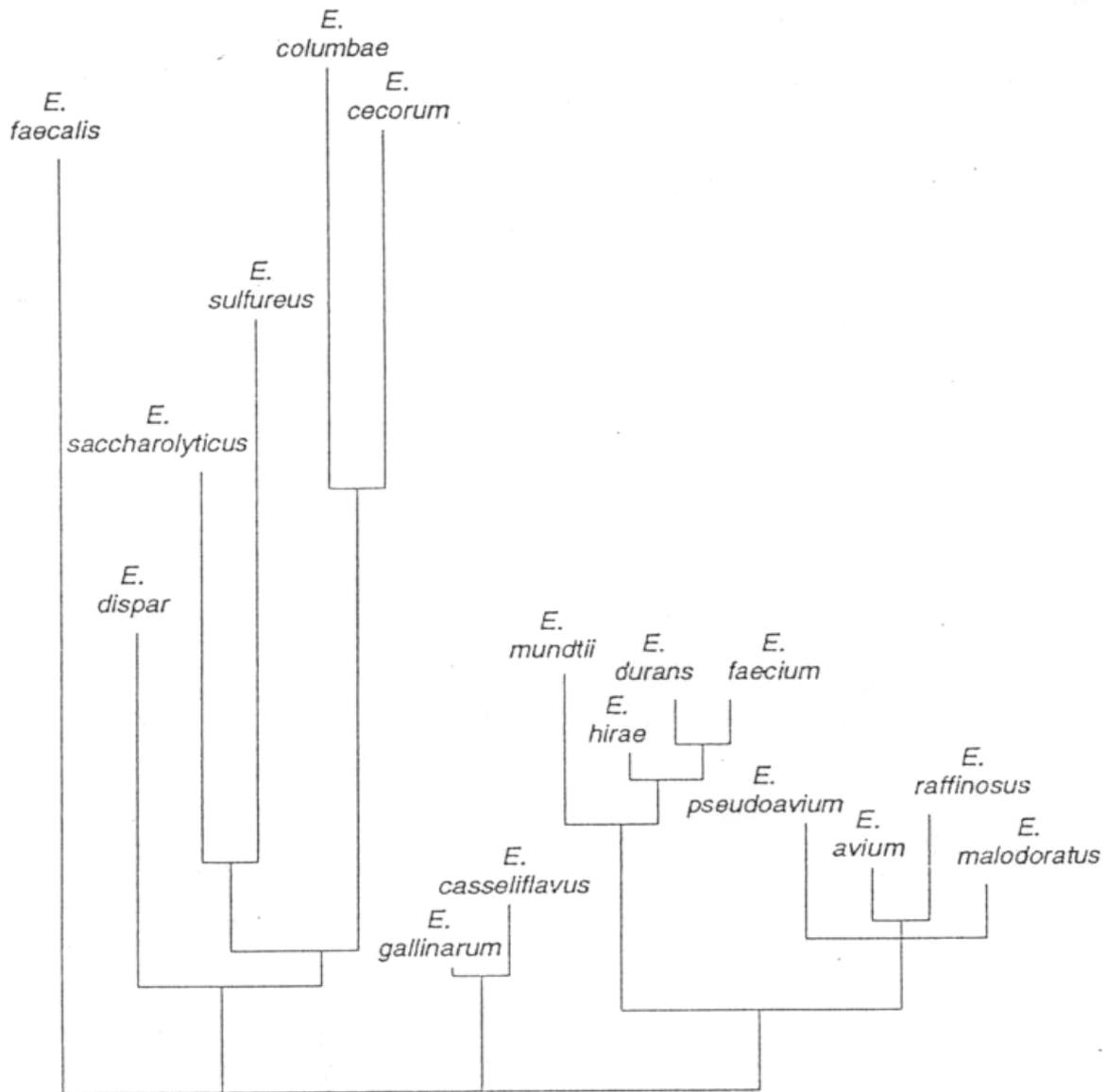


Abb.: 4) Stammbaum vom Robert-Koch-Institut

An dieser Stelle soll der Stammbaum der Enterokokken einen Überblick über den Verwandtschaftsgrad der verschiedenen Spezies geben. Es soll gezeigt werden, dass es sich bei dem Genus *Enterococcus* um eine relativ große heterogene Familie handelt.

4. Material

Der Transport der Proben, die benötigten Arbeitsgeräte, Nährmedien, Reagenzien, Kontrollstämme und ihre Anreicherung sowie die Isolation und Differenzierung der Enterokokken-Stämme sollen im Folgenden kurz dargestellt werden.

4.1. Verwendete Nährmedien und Reagenzien

a) Anreicherung

Die Lebensmittelproben wurden in dem Labor mit einem Nährmedium (Anreicherungsmedium) einer 1 %igen Peptonwasserlösung angereichert.

Peptonwasser, 1 %

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 1 l A. dest. lösen und 20 min. bei 121°C autoklavieren (20 min. bei 121°C). Der pH-Wert wird auf 7,4 einstellen.

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 8,60 g/l

Natriumazid 0,60 g/l

Natriumchlorid 6,40 g/l

5-Bromo-4-Indolyl- β -D-Glucopyranosid (x-Glu) 0,04 g/l

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

b) Isolierung und Differenzierung

CATC-Agar wurde für die spezifische Isolierung von Enterokokken aus den Probenmaterial 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	2,0g/l
2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid	0,1g/l
Natriumazid	0,4g/l

56 g/l der Grundlösung autoklavieren (15 min. bei 121°C) und 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. 8330) und 4 ml/l einer 10 %igen Lösung von Natriumazid (Merck, Art.-Nr. 6688) sterilfiltriert einmischen und Platten gießen. Der pH-Wert 7,0 +/- 0,2 bei 25°C einstellen. Die Nährbodenplatte ist klar und gelblich.

Die Untersuchung der Proben auf das Vorkommen vancomycinresistenter Enterokokken erfolgt mit CATC-Agar, der pro Liter mit 6 mg Vancomycin (VAN) supplementiert worden war.

CATCv-Agar supplementiert mit 6 mg/l VAN

CATC-Agar, siehe oben.

Vancomycin Hydrochlorid, Sigma CATC wird hergestellt, wie oben beschrieben. Vancomycin wird in Aqua dest. gelöst und steril filtriert (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-Schafsblut-Agar, auf welchen die von CATC-Agar und CATCv-Agar (mit Vancomycin) gewonnenen Kolonien überimpft worden waren und der folgender Zusammensetzung entsprach:

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

Spezial-Nährsubstrat	23,0 g/l
Stärke	1,0 g/l

Natriumchlorid	5,0 g/l
Agar-Agar	13,0 g/l
Schafsblut	5,0 %

42 g/l lösen, autoklavieren (15 min. bei 121°C). Auf bis 50°C bis 45°C abkühlen, in 95ml sterilen Basisnährboden

5 % des Schafsbluts homogen einmischen. pH-Wert 7,3 +/- 0,2 bis 25°C einstellen. Platten gießen. Die Platte des Basis-Nährbodens ist klar und gelblich. Mit Blutzusatz sind sie hellrot und ohne Hämolyse.

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

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

Merck, Art.-Nr. 110493

Nährsubstrat (Hirn-, Herzextrakt und 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 (15 min. bei 121°C). Der pH-Wert wird auf 7,4 +/- 0,2 eingestellt. Die Bouillon ist klar und bernsteinfarben.

Für die Aufbewahrung der Enterokokkenstämme bei - 80°C werden der beimpften Bouillon ca. 10 % (Volumen) sterilen Glyzerins beigegeben.

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 %

65 g Natriumchlorid werden in 1 l BHI-Bouillon gelöst und dann 15 min. bei 121°C autoklaviert. Der pH-Wert wird auf 7,3 +/- 0,2 eingestellt. Die Bouillon ist klar und bernsteinfarben.

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 Röhrchen ca. 4 cm hoch abfüllen, autoklavieren (15 min. bei 121°C). Der pH-Wert wird auf 7,3 +/- 0,2 eingestellt.

Reagenzien

Für die Kontrolle auf das enterokokkentypische Enzym Pyrrolidonylarylamidase wurde der Pyrrolidonylarylamidase-Test (O.B.I.S. PYR Test, ID580M, Oxoid) eingesetzt. Der Katalase-Test wurde mit einer 3%igen Wasserstoffperoxidlösung durchgeführt. Für die Kohlenhydratspaltungstests wurden verwendet: L-Arabinose (L[+]-Arabinose, Merck, Art.-Nr. 101492), D-Raffinose (Raffinose [Pentahydrat], Merck, Art.-Nr. 107419), Methyl-alpha-D-Glucopyranosid (Methyl-alpha-D-Glucopyranoside, Sigma, Art.-Nr. 9376), Ribose (D[-]-Ribose, Merck, Art.-Nr. 107605), Melibiose (Melibiose-Monohydrat, Merck, Art.-Nr. 112240), Melezitose (alpha-D-Melezidose, Serva, Art.-Nr. 28550) sowie L-Sorbose (L[-]-Sorbose, Sigma, Art.-Nr. S2001). Darüber hinaus ist der Abbau von Mannitol (D[-]-Mannit, Merck, Art.-Nr. 105982) und Sorbitol (D[-]-Sorbit reinst für die Mikrobiologie, Merck, Art.-Nr. 107758) untersucht worden.

5. Methode

Ziel der durchgeführten Untersuchungen war Bioprodukte auf das Vorkommen von Enterokokken zu überprüfen und die Resistenzgene bei vancomycinresistenten Stämmen nachzuweisen, in sofern sie überhaupt vorhanden sind.

5.1. Fließschema der mikrobiologischen Untersuchung

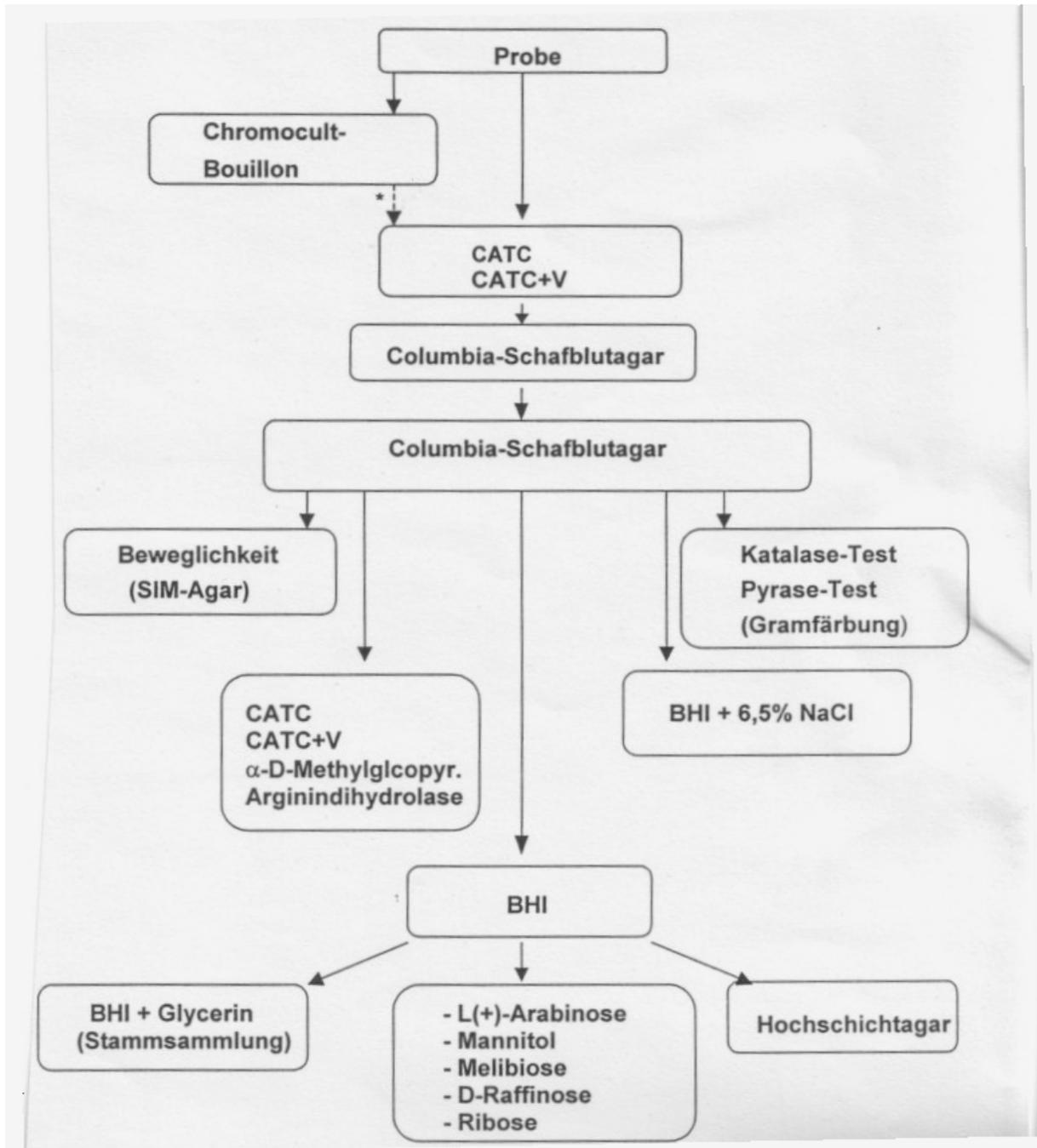


Abb.: 5) vom BfR



Abb.: 6) Probenmaterial

5.2. Probenahme

Alle Bioprodukte wurden von dem Biomarkt Dahlem Dorf von unterschiedlichen Ständen bezogen. Die einzelnen Probenmaterialien wurden fachgerecht extra zugeschweißt und die Kühlkette wurde eingehalten.

5.3. Probenaufarbeitung und Isolierung der Enterokokkenstämme

Geräte und Verbrauchsmaterialien

Die übliche Ausstattung eines mikrobiologischen Labors ist erforderlich (Sterilisator, Brutschränke, Glaswaren, Messpipetten, kleine Petrischalen, Spatel, Impfösen, Mikroskope). Darüber hinaus werden Glasröhrchen mit Verschlusskappen aus Aluminium und Glasperlen benötigt.

Bevor die eigentliche Probeentnahme stattfindet muss gewährleistet werden, dass alle Glas- und Metallgeräte (Schere, Skapelle, Löffel, ect.) vor der Verwendung sorgfältig gereinigt und sterilisiert wurden. Ein kontinuierliches steriles Arbeiten ist unablässig.

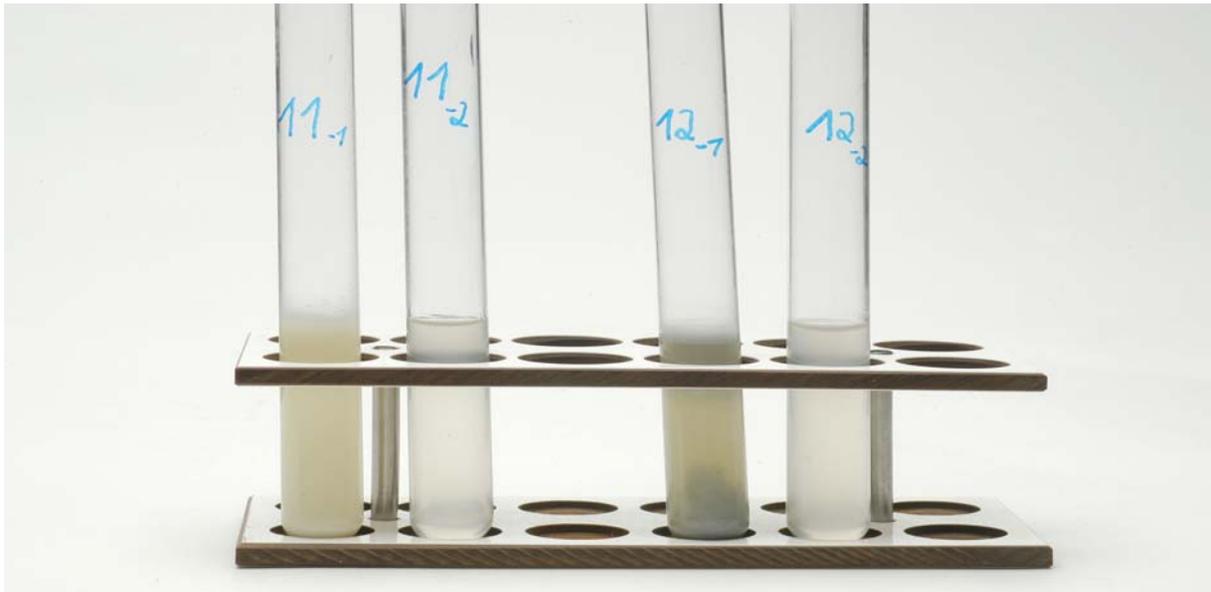


Abb.: 7) Probenverdünnungsreihe

5.4. Aufarbeitung/Anreicherung der Proben

Für die Erstverdünnung wird in einer Stomachertüte je 10 g einer Probe mit 90 ml gepuffertem 1 %igem Peptonwasser zugefügt und in einem Beutel-Walkmischgerät homogenisiert. Eine weitere Verdünnungsreihe (-2) wird durch weiteres dezimales Verdünnen hergestellt, die zur Beimpfung der Nährböden geeignet ist.

Die Temperatur der Verdünnungslösung soll bei Zugabe nicht unter 10°C und nicht über 20°C liegen. Bei Proben die einen hohen Faseranteil aufweisen, wurde eine Tüte mit einer integrierten Trennmembran benutzt, so dass die Feststoffe bei dem anstehenden abpipeptieren aufgefangen und von der Lösung getrennt wurden. Die Proben sollten auch zuvor so klein geschnitten wie möglich sein. Die jeweils erstellte Lösung darf, wenn erforderlich max. 2 h bei 0-5°C aufbewahrt wird.

Sollte mal eine Probemenge kleiner als 10 g sein so ist dies im Untersuchungsbericht zu vermerken.

Der Zeitraum von beginn der Erstelltenlösung bis zur Beimpfung des jeweiligen Nährmediums darf 30 min. nicht überschreiten.

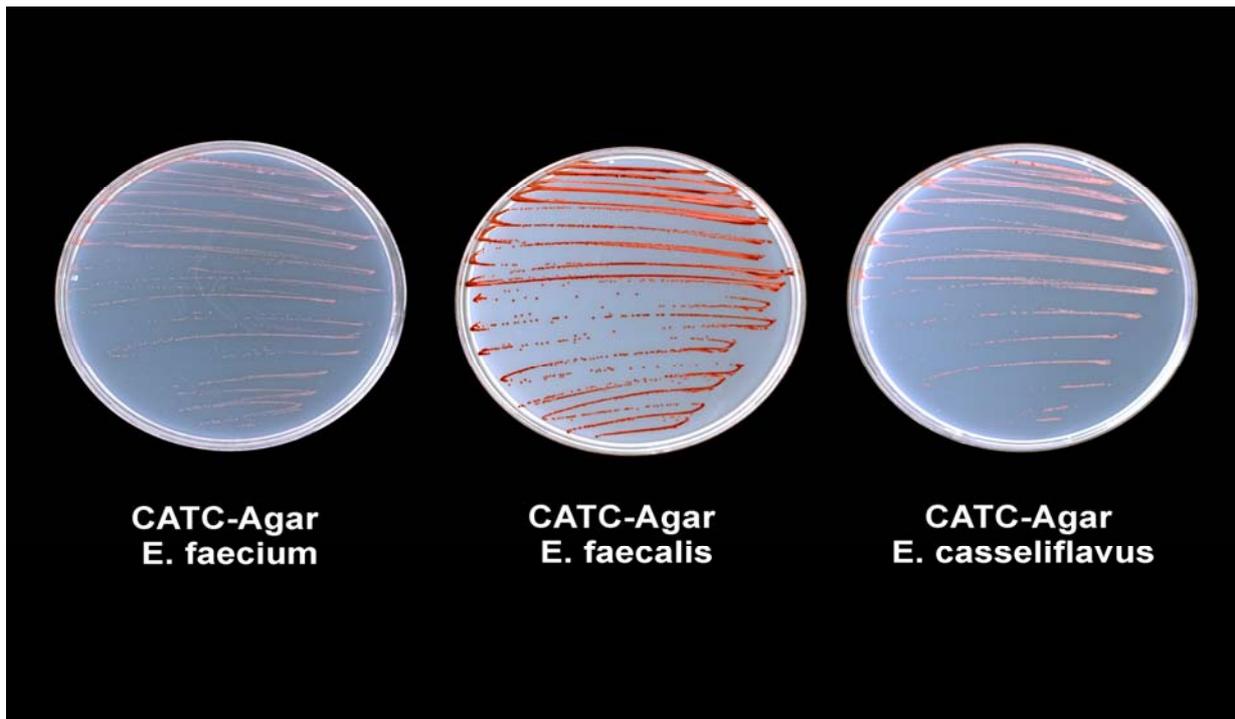


Abb.: 8) BfR

5.5. Beimpfen der Selektivagarplatten und der Selektivanreicherung

Die fertig gestellten Agarplatten mit den selektiven Nährböden (CATC-Agar und CATCv-Agar supplementiert mit 6 mg/l Vancomycin/ Selektivagarplatten) werden mit einer sterilen Pipette pro Probe mit 0,1 ml Erstverdünnung und der weiteren Zweitverdünnung versehen. Die aufgetragene Probe wird jeweils mit einem eigenen Glasspatel in kreiselnder Bewegung gleichmäßig aufgetragen. Die Petrieschale mit dem Deckel verschließen und fachgerecht beschriften (Art, Datum, Seriennr, Eingangsnr.).

Weiter werden 0,1 ml der Erstverdünnung in Chromocult Enterokokken-Bouillon (Selektivanreicherung) überführt.

Bei einer Temperatur von 37°C werden die beimpften Nährböden und die Anreicherungsbouillon unter anaeroben Bedingungen 20-24h bebrühtet und weitere 18-24 h bei Raumtemperatur und Tageslicht nachinkubiert.

Waren auf der CATC- bzw. CATCv-Agarplatte weniger als drei Enterokokken verdächtige Kolonien gewachsen, wurde 0,1 ml der entsprechenden Chromocultanreicherung bzw. 0,1 ml der Peptonwasseranreicherung auf eine neue Platte desselben Typs aufgebracht und aufgespatelt.

5.6. Überimpfen auf Schafblutagar

Nun wird eine optische Selektion und Bewertung vorgenommen. Mit einer Impföse werden bis zu drei möglichst unterschiedliche, morphologische Kolonien von der jeweiligen Agarplatte auf die entsprechende Schafblutagarplatte (mit Vancomycin und ohne) überimpft und bestätigt. Die beimpften Schafblutagarplatten werden mit dem Boden nach oben unter aeroben Bedingungen 20-24 h lang bei 37°C bebrütet. Anschließend wird von jeder entstandenen Schafblutkultur eine Einzelkolonie erneut auf eine weitere Schafblutagarplatte überimpft und wieder bei 20-24 h lang bei 37°C bebrütet, um so eine garantierte Reinkultur zu erlangen.

5.7. Überimpfung der Selektivanreicherung

Nur bei Proben ohne sichtbares Koloniewachstum auf einer der beiden bzw. beiden Agarplatten werden jeweils 0,1 ml der betreffenden Selektivanreicherung erneut auf die eine bzw. beiden Agarplatten gegeben und das Impfverfahren wiederholt (20-24 h lang bei 37°C bebrütet mit anschließender Nachinkubation 18-24 h lang bei Tageslicht und Raumtemperatur).

Das Medium wird nach der Bebrütung auf Bakterienwachstum geprüft und zu dem Vorhandenen Ergebnisse im Anhang 3 notiert. Diese sind: Trübung, Schleimzopf, positives, negatives Wachstum der Kulturen.

5.8. Bestätigungs- und Identifizierungsreaktionsmethoden

Für eine Bestätigung sowie einer genauen Spezifizierung der Gattung Enterococcus ist eine Reihe von Test die vom Ausgang der Reinkultur abgeleitet werden erforderlich.

Ob es sich wirklich tatsächlich um gewonnene Enterokokkenstämme handelt wurden eine Reihe von Tests zur Überprüfung (Bestätigung) wie folgt durchgeführt: Begonnen mit dem Katalasetest, dem Pyrrolidonylamidase (PYRase-) Test und der BHI–Bouillon mit 6,5 % Natriumchloridzusatz zur Kontrolle auf Wachstum.

5.9. Katalasetest

Mit Hilfe einer Platinöse wird vorsichtig Koloniematerial von der jeweiligen bebrüteten frischen Schafblutagarplatte entnommen und auf einem sauberen Objektträger oder einer sterilen Kunststoffpetrischale aufgetragen. Vor jeder erneuten Koloniematerialabnahme erfolgt ein Abflämmen der Platinöse zur Sterilisation. Bei einer Abnahme von Blutbestandteilen des Nährbodens kann es zu einem verfälschten positiven Reaktionsergebnis kommen. Das Koloniematerial wird mit einem Tropfen 3 %iger Wasserstoffperoxid-Lösung bedeckt. Erfolgt als Reaktion eine unmittelbare Bildung kleiner Luftbläschen, so ist diese positiv und ein Enterokokkenbefund ist nicht gegeben, da diese negativ bei Katalase reagieren. Auch bei sehr geringer mit großer Zeitverzögerung entstandenen Luftbläschen wurde dies als negativ betrachtet und für die weiteren Versuchsreihen einbezogen. Sollte eine zweifelhafte Reaktion auftreten, so ist die Kolonie auf Plate-Count-Agar zu überimpfen und die Katalasereaktion nach einer Bebrütung von 18-24 h bei 37°C erneut zu testen. Zur Positivkontrolle dient *Staph. aureus* ATCC 29213. Bei einem positiven Befund wurde der betroffene Stamm von dem weiteren Untersuchungsverfahren ausgeschlossen. Die gesamten Befundergebnisse befinden sich im Anhang 4.

5.10. PYRasetest (Pyrrolionylarylamiadasetest)

Wie zuvor bei dem Katalasetest wird das Koloniematerial abgeimpft und auf das Reaktionsfeld einer PYRasetestkarte aufgetragen. Diesem wird dann zwei Tropfen der mitgelieferten Pufferlösung aufgetropft und die Testkarte bei Raumtemperatur inkubiert. Es wird ein Tropfen des Farbewicklers/ Reaktionslösung aufgetragen. Erfolgt nach ca. 20 sec. eine intensiv dunkel-violette Verfärbung auf dem Reaktionsfeld des Teststreifens um das Koloniematerial, war der Stamm PYRase-positiv und wurde zu weiteren Versuchsreihen unterzogen. Blieb ein Farbumschlag aus, so war dieser PYRase-negativ und wurde verworfen.

Die Enterokokken reagieren PYRase-positiv mit Ausnahme der Spezies *E. cecorum*, *E. columbae* und *E. saccharolyticus*. Als Positivkontrolle dient *E. faecalis* ATCC 29212 und als Negativkontrolle ein *Streptococcus agalactiae*-Stamm. Das Ergebnis wird im Befundbogen (Anhang 4) dokumentiert.

5.11. Wachstum in 6,5 %iger NaCl-BHI-Bouillion

Wie zuvor wird auch hier von der bebrüteten Schafblutagarplatte mit Hilfe einer Impföse 1 Kolonie in die BHI-Bouillion mit Zusatz von 6,5% NaCl überführt und für 24-48 h bei 37°C bebrühtet. In einer 6,5 %iger NaCl-BHI-Bouillion findet ein typischer Enterokokkenwachstum statt, mit Ausnahme von *E. cecorum*, *E. columbae* und einigen Mitglieder der *E. avium-Gruppe*. Das Wachstum ist spätestens nach 48h auszuwerten und als positiv zu beurteilen, wenn sich aus dem vorhandenen Bakterienmaterial ein eindeutiger Bodensatz in Form einer getrühten Bouillion und oder beim Aufschwenken sich ein Schleimzopf bildet. Ist die Bouillion in den Reagenzgläschen nur schwach oder gar nicht getrüht bzw. kein Bodensatz vorhanden gilt das Wachstum als negativ. Die Stämme werden von der weiteren Untersuchungsreihe ausgeschlossen. Zur Qualitätssicherung stehen zwei Streptococccen-Stämme (bovis und agalactiae) für die Negativkontrolle dar und für die Positivkontrolle *E. faecalis* ATCC 29212 für jede Charge der 6,5 %igen NaCl-BHI-Bouillion zur Verfügung.

5.12. Spezifizierung der Enterokokkenstämme

Es wurden zur Spezifizierung der gewonnenen Enterokokkenstämme folgende Untersuchungsreihen durchgeführt: Kontrolle der Pigmentproduktion, des Hämolyseverhaltens, der Bewegung, der Fähigkeit zur Tetrazoliumreduktion. Eine weitere Untersuchungsreihe ist die „bunte Reihe“, die Aufschluss auf das Vorhandensein der Arginindihydrolase und aus einer Reihe von Kohlenhydraten (α -D-Methylglucopyranosid, Ribose, L-Arabinose, D-Raffinose, Mannitol und Melibiose) die Fähigkeit zur Versäuerung, was unterschiedliche Abbauprodukte hervorruft.

Sollte eine Zuordnung der Enterokokkenstämme aufgrund der ausbleibenden Ergebnisse nicht möglich sein so wurden zusätzliche Untersuchungen ausgeführt (Pyruvatabbau, Verstoffwechslung, von Melezitose, Sorbitol und L-Sorbose). All diese Ergebnisse wurden im Anhang 4 notiert.

5.13. Optische Spezifizierung

Das Hämolyseverhalten nach der Ablaufzeit der Zwischenlagerung der Reinkultur (4-7°C bei 3-4Tage) werden diese und ihre Bildung von unterschiedlichen gelbe Pigmenten (Verreibung von Koloniematerial auf weißem Papier) beurteilt und die Ergebnisse im Befundbogen (Anhang 4) eingetragen. Die *avium*-Gruppe zeichnet sich durch eine verdächtige starke, vergrünende Hämolyse aus.



Abb.: 9) Blutagar mit *E. spp.* und grüner Hämolyse

5.14. Wachstumskontrolle auf Selektivagarplatten

Von der bebrüteten Columbia-Schafsblutagarplatte wird mit Hilfe einer Impföse je eine Einzelkolonie auf die beiden Selektivplatten (CATC, CATCv), die in sechs Felder eingeteilt sind in ein Feld überimpft. Die Petriplatten werden 20-24 h lang bei 37°C bebrütet und bei einer anschließenden Nachinkubation für weitere 18-24 h bei Raumtemperatur

und Tageslicht die Koloniemorphologie und die Formazanbildung, die eine Fähigkeit farbloses Triphenyltetra-zoliumchlorid (TTC) zu rötlichen Kolonien mit metallischem Glanz (Formazan) zu reduzieren beurteilt. Diese Rotfärbung ist besonders bei *E. gallinarum* und *E. casseliflavus* anzutreffen.

5.15. Der Beweglichkeitstest

Dieser erfolgt im SIM-Agar (Sulphide-Indole-Motility-Agar) welches im Reagensglas abgefüllt wurde. Mit einer Impfnadel wird etwas vom Koloniematerial aufgenommen und durch das Agar senkrecht bis auf dem Reagensglasboden durchgestochen. Die Schwierigkeit besteht darin das der Ein-Ausstechweg derselbe sein soll und bis zum Boden aufkommen muss. Die Bebrütungszeit beträgt 24-48 h bei 37°C. Die wolkige Agartrübung um den Impfkanaal widerspiegelt die jeweilige Beweglichkeit der

Enterokokkenstämme (Beweglichkeit bei *E. gallinarum* und *E. casseliflavus* möglich). Es kann bei einzelnen Enterokokken-Stämmen zur Schwärzung des SIM-Agars kommen. Das ist nicht ungewöhnlich, es beruht auf H₂S-Bindung und einen Verdacht auf die avium-Gruppe.

Jede SIM-Agarcharge wurde mit einer Positivkontrolle (*E. gallinarum* BM 4174 bei beweglich) und einer Negativkontrolle (*E. faecalis* ATCC 29212 bei unbeweglich) getestet.

5.16. Der Nachweis der Arginindihydrolase

Von der bebrüteten Schafsblutagarplatte wird eine Impföse mit Koloniematerial in Arginindihydrolase-Testbouillon überführt und bei 37°C bebrütet. Die bakterielle Vermehrung verursacht ein Farbumschlag von hellviolett nach gelb und durch Argininabbau schlägt der Indikator jedoch nach blauviolett bzw. violett um (Arginindihydrolase-positiv). Bleibt die Gelbfärbung der Probe vorhanden so ist der Stamm der Testbouillon Arginindihydrolase-negativ. Nach 24 h erfolgt die Reaktionsauswertung und bei einer negativen Reaktion erfolgt die Bebrütung 5 Tage bei 37°C. Ist ein negatives Ergebnis vorhanden, so fand nur ein Farbumschlag von hellviolett nach gelb hin statt.

5.17. Die Verstoffwechselung von α-D-Methylglycopyranosid

Von der bebrüteten Columbia-Schafsblutagarplatte wird mit Hilfe einer Impföse Koloniematerial in α-D-Methylglucopyranosid-Lösung überimpft und für 3-7 Tage bei 37°C bebrütet. Sie beinhaltet 2 ml einer 1 %igen Zuckerlösung mit Bromthymolblau als Indikatorsubstanz. Aufgrund des eingetretenen Farbumschlages von blaugrün nach gelb beim Grundmedium Barsikow ist eine Zuckerverstoffwechselung erkennbar.



Abb.: Buntereihe

5.18. Die Verstoffwechslung weiterer Zuckerlösungen

Von der bewachsenen BHI-Bouillion werden jeweils ca. 0,1 ml (zwei Tropfen) in die Ribose-, L-Arabinose-, D-Raffinose-, Mannitol- und Melibiose-Lösung ein pipettiert. Eine unbeimpfte Zuckerlösung wird als Kontrolle mitgeführt. Die Bebrütung erfolgt bei 37°C über 6-7 Tage, mit Ausnahme der Riboselösung. Ihre Auswertung erfolgt schon nach 20-24 h, da auch bei Ribose-negative Stämme und unbeimpfte Lösungen sich bei längerer Bebrütungszeit ein Farbumschlag einstellt. Auch hier ist die Verstoffwechslung der Zuckers durch den Farbumschlag von blaugrün nach gelb beim Grundmedium Barsikow zu erkennen. Eine vorläufige Spezieserkennung wird aufgrund der Ergebnisse vorgenommen. Bei Ribose-negativen Stämmen werden keine weiteren Untersuchungen praktiziert. Eine weitere Beimpfung der Medien erfolgt nur bei unklarer Reaktion und wenn sie keine eindeutige Spezieszuordnung besitzen.

6. Ergebnisse

Alle 21 Proben (aus Käse-, Wurstwaren und Eiersalat) stammen vom Zeitraum von September/ Oktober 2005 von dem Biomarkt Domäne Dahlem-Berlin, aus denen zur mikrobiologischen Untersuchung 68 Isolate erstellt wurden. Bei 30 Isolaten wurden Enterokokken nachgewiesen und 11 dieser Isolate stammen aus Abimpfungen einer CATC-Agar-Platte mit Vancomycin. Die restlichen 18 Isolate stammen aus einfachen CATC-Agar-Platten und 1 aus CC-Agar-Platte. Sie wiesen folgende Enterokokkenarten auf: *E. casseliflavus*, *E. duran*, *E. gallinarum*, *E. hirae*, *E. faecium* und *E. faecalis*.

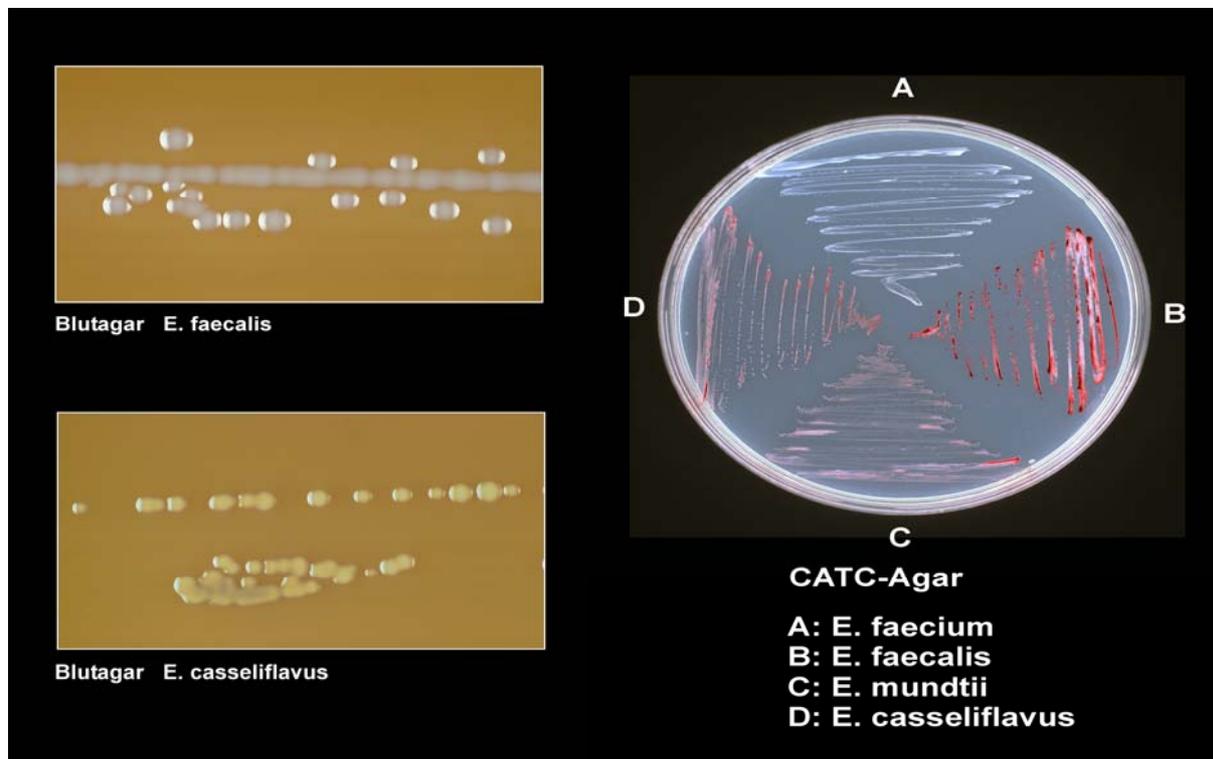


Abb.. 8) BfR

6.1. Ergebnisse der Speziesbestimmung der Enterokokkenisolate nach PCR-Methode

Spezies	Anzahl aus Isolate von CATCv	Gesamt
E. casseliflavus:	5 x Eiersalat 1 x Mettwurst als Brotaufstrich 1 x Ziegenweichkäse 3 x Mittelharter Käse 2 x Ziegenweichkäse mit Asche	14
E. duran:	1 x Eiersalat	1
E. gallinarum:	1 x Ziegenweichkäse 1 x Ziegenweichkäse mit Asche	2
Enterokokken- Isolate gesamt aus CATCv		17

Spezies	Anzahl aus Isolate von CATC	Gesamt
E. casseliflavus:	1 x Pferdewurst 1 x Mittelharter Käse	2
E. hirae:	1 x Käsebrot	1
E. faecalis:	2 x Ziegenweichkäse 1 x Ziegenweichkäse 2 x Camember	5
E. faecium:	3 x Kaaswinkel 1 x Ziegenweichkäse	4
Enterokokken- Isolate gesamt aus CATC		12

Spezies	Anzahl aus Isolate von CC	Gesamt
E. faecium:	1 x Bio- Eierschale	1
Enterokokken- Isolate gesamt aus CC		1

Aus dem Untersuchungsergebnis ist ab zu lesen, dass keine Proben aus dem gewonnenen Isolate eine Enterokokkenresistenz auf Vancomycin aufweisen. Somit sind die getesteten Bioprodukte frei von antibiotikumresistenten Enterokokken. So ist aber der hohe Anteil an *E. faecalis*, *E. faecium* und *E. duran* ein Indiz für mangelhafte Hygiene, da diese drei Arten zu den Fäkalkeimen gehören. Bei einer zu hohen Anzahl dieser Arten kann man nicht mehr von einer reinen Starterkultur Herkunft ausgehen.



Abb.: 9) CATC E. spp.

7. Diskussion

Enterokokken sind obligate, zum Teil in Ketten vorkommende, kugelförmige oder seltener spiralförmige Darmbakterien, die bei allen Säugetieren und damit auch beim Menschen vorkommen. Da sie auf der Haut überleben, können sie effizient durch nicht gewaschene oder desinfizierte Hände übertragen werden. Dadurch ist auch ihre Übertragung auf Lebensmittel jederzeit möglich. Gute hygienische Verhältnisse wirken der Kontamination von Lebensmitteln effizient entgegen. Bei Fleisch- und Wurstwaren und in der Käseherstellung können sich die Enterokokken und auch andere antibiotikaresistente Keime (Staphylokokken) gut vermehren. Mangelnde Hygiene beim Schlachten oder im Verarbeitungsprozess sorgen weiter für die Verbreitung der Enterokokken. Wurden die Tiere mit antibiotikahaltigen Leistungsförderern gefüttert, treten, wie von vielen Arbeitsgruppen nachgewiesen, (TEUBER, 2000) Antibiotikaresistenzen auf.

Der Leichtsinnige und maßlose Umgang mit Antibiotikum als Beimischung für die Leistungsförderer hat weltweit zu einem starken Anstieg von Antibiotikaresistenzen geführt. Die präventive Verabreichung von Antibiotika bei Massentierhaltungen und die unsachgemäße Dosierung sowie Fehler bei der Einnahmedauer fördern geradezu die Resistenzbildung bei Enterokokken-Stämmen. Ihre Eigenschaft genetische Information zusammenfassen und diese auch weitergeben zu können, macht

sie als so genannte Vektoren oder Genföhren geföhrlieh. Ein hohes Maöh an Vernetzung in der Biosphöhre ermöhglicht (z.B. durch Trinkwasser) die Weitergabe von Resistenzgenen. Die Vernetzung der Biosphöhre und der darin lebenden Makroorganismen (Pflanze, Tier, Mensch) macht deutlich, dass es für das Resistenzproblem keine Isolierung im geographischem oder im biologischem Sinne geben kann. So auch nicht für Bioprodukte, denen zunöhchst unser Interesse galt. Im eingeschröhnten Rahmen dieser Technikerarbeit galt es herauszufinden, ob auch Bioprodukte zum Gegenstand des Bereiches der Antibiotika-Resistenz durch Enterokokken zöhlen, oder ob diese durch ihre besonderen Herstellungsbestimmungen in der biologischen Landwirtschaft möhglicherweise keine Antibiotikaresistenzen beherbergen.

Mikroorganismen besitzen ausgezeichnete Föhigkeiten in der Kommunikation. Besonders bei der Übermittlung genetischer Informationen von einem Darmbakterium zum anderen, haben sich Entrobakterien, Milchsäurebakterien, Listerien, Clostridien, Staphylokokken, usw. bewöhrt. Im Einsammeln und Weitergeben von genetischen Informationen zur Resistenzwerbung sind Enterokokken in Fachkreisen als genetische Drehscheibe geföhchtet (TEUBER, 1996).

Enterokokken kommen aus fermentierten tierischen Lebensmitteln z.B. auf Rohmilch, in Käse, auf rohem Fleisch und in Wurstwaren. Einige Arten besitzen bereits schon leichte, natöhrliehe Resistenzen, bevor sie weitere neue Resistenzdeterminanten gegenüber Antibiotika erwerben. Die Einteilung der vankomycinresistenten Enterokokken erfolgt in drei Resistenztypen (VanA, VanB, VanC). Oft fungieren sie als Indikatororganismen bei Hospitalerkrankungen, wo sie die Plätze zwei und drei stellen hinter den Staphylokokken besetzen. Bis jetzt sind sie nur in Ausnahmefällen als pathogen zu betrachten (potentiell aber pathogen für abwehrgeschwöhchte Personen).

Aus allen 21 Proben, von denen 68 Isolate erstellt wurden, gingen nur 30 Isolate mit Enterokokkenbefund hervor. Aus diesen 30 Isolaten stammen 11 von vancomycinhaltigen Agarplatten. Die gewachsenen Keime waren aber aufgrund ihrer Spezies harmlos, da es sich um *E. casseliflavus* und *E. gallinarum* handelt. Sie

besitzen ein intrinsisches low-level Vermögen der Wirkung einiger Antibiotika auszuweichen. Bei den restlichen 19 Isolaten handelt es sich um Abimpfungen aus nicht vancomycinhaltige Agarplatten. Auf diesen wuchsen die Arten *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. hirae*, *E. faecalis* und *E. faecium*. Auch ihr Vorkommen hat keine nachteiligen Folgen für die menschliche Gesundheit, obwohl sie einen leichten Vancomycinresisten -Hintergrund besitzen.

Ein hoher Anteil von den Enterokokkenarten *durans*, *faecium* und *faecalis* sind aufgrund ihrer Zugehörigkeit zu den Fäkalkeimen ein Beweis für mangelnde Betriebs- oder Personenhigiene. Sie sind zwar in geringen Mengen zu tolerieren, da sie auch als Startkulturen bei der Käse- und Wurstwarenherstellung dienen. Höhere Dosen dieser Keime gelten als fakultativ pathogen.

8. Zusammenfassung

HINTERGRUND: Der Genus Enterokokkus (E.) ist ubiquitär verbreitet und tritt beispielsweise in Eiern, Rohwurst- oder Rohmilchprodukten auf. Die verschiedenen Spezies von Enterokokkus sind dafür bekannt, dass sie Antibiotika-Resistenzgene akkumulieren können und Resistenzgene auf andere Spezies und andere Genera übertragen. In den letzten zwei Jahrzehnten wurde ein weltweiter Anstieg von Antibiotika-Resistenzen bei Enterokokken-Isolaten beobachtet. Vor allem die Resistenz gegenüber den in der Humanmedizin als Reserveantibiotika eingesetzten Glykopeptide Teicoplanin und Vancomycin wurden in zahlreichen Studien dokumentiert. Die Ausbreitung dieser Resistenzen kann eine Gefahr vor allem für immungeschwächte und ältere Menschen darstellen. Seit 2001 befasste sich das Scientific Committee on Animal Nutrition (SCAN) EU- weit mit dem Thema der Antibiotika als so genannte Leistungsförderer in der Tiermast. Die Initiativen führten im Jahre 2006 zum generellen Verbot von antimikrobiellen Leistungsförderern.

FRAGESTELLUNG: Es sollte im Rahmen der Technikerarbeit geklärt werden, in wie weit biologische Lebensmittel, wenn überhaupt, von Antibiotikaresistenzen betroffen sind. Ein Zusammenhang mit dem Vorkommen von Enterokokken sollte gegebenenfalls belegt werden. Weiterhin sollte nachgewiesen werden, um welche Enterokokkenstämme es sich handelt.

DESIGN: Um vancomycinresistente Enterokokken (VRE) aus 68 verschiedenen Nahrungsmitteln zu ermitteln, wurden Standardkulturstudien durchgeführt. Einzelne Nahrungsmittelproben wurden von den unterschiedlichen Ständen eines Biomarktes in Berlin gesammelt. Molekulare Techniken wie Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden etabliert. Der Hauptfokus dieser Arbeit war der bakteriologische Teil dieser Studie. Lysate wurden für eine ausgedehnte PCR-Prüfung an die "Jugend forscht" - Arbeitsgruppe an der Emil-Fischer-Schule, Berlin, zur Untersuchung weitergegeben. Die Daten beider Projekte wurden zusammen bei einem wissenschaftlichen Kongress, „*BioPerspectives im Fokus: Nahrung für die Zukunft*“, vorgestellt.

ERGEBNIS: Es wurden keine vancomycinresistenten Enterokokken detektiert. Es gab im Allgemeinen auch keine Ampicillin-, Erythromycin- oder Tetracyclin-Resistenz, wie durch die "Jugend forscht" - Arbeitsgruppe mittels PCR auf Basis der zur Verfügung gestellten Lysate ermittelt wurde.

Da Enterokokken fast jede mögliche Oberfläche kontaminieren können, und auf ihr für längere Perioden (eine Woche) überleben können, wurden sie auf Ei, Fleisch sowie Milchprodukten gefunden. Unterschiedliche Spezies wurden identifiziert. Einige dieser Spezies könnten von den Starterkulturen für die Nahrungsmittelverarbeitung her stammen. Die Spezies *Enterokokkus faecium*, *Enterokokkus faecalis* und *Enterokokkus durans*, die von einigen der geprüften Nahrungsmittelproben stammen, sind normalerweise Indikatoren für schlechte Hygiene und gelten als durch Lebensmittel übertragbare Krankheitserreger.

FAZIT: Da Nahrung eine mögliche Rolle als Reservoir für Antibiotikaresistenzen spielt, kann besonders das Vorkommen von Enterokokken auf Nahrungsmitteln problematisch sein. Diese Organismen sind dafür bekannt, dass sie Resistenzgene akkumulieren und weiter geben können. Sie können Antibiotikaresistenzgene extrachromosomal, d.h. auf Plasmiden beherbergen. Die Einrichtung eines höheren

Hygienestandards für Angestellte und am Arbeitsplatz, kann eine Konsequenz aus dieser Arbeit sein. Seit dem Januar 2006 verbietet die Europäische Union Antibiotika als Leistungsförderer in Tiernahrung. Das wird ein erster wichtiger Schritt zur Vermeidung von Antibiotikaresistenzen in der Viehwirtschaft- und Nahrungsmittelproduktion sein, wie uns die Bio-Betriebe, die nach ökologischen Richtlinien unter Verzicht auf antibiotikahaltige Leistungsförderer arbeiten, zeigen konnten.

9. Abstract

BACKGROUND: The distribution of the genus *Enterococcus* (E.) is ubiquitous. Contamination is commonly found for example in eggs, raw sausage, or raw milk products. The different species of enterococcus are well known for the fact that they can accumulate antibiotic resistance genes and transfer these genes to other bacterial species and even genera. During the last two decades, a world-wide increase in the frequency of antibiotic resistance in enterococcus isolates was observed. Especially the antibiotic resistance towards the glycopeptides teicoplanin and vancomycin plays a potential role as reservoirs of resistance determinants for human medicine as documented in numerous studies. The propagation of these resistances can represent potential danger particularly for immune suppressed hosts and elderly humans. Since 2001, the Scientific Committee on Animal Nutrition (SCAN) of the European Union has been concerned with the topic of antibiotics as additives and growth promoters in the animal feed. These initiatives led to the general prohibition of antimicrobial growth promoters in the year 2006.

OBJECTIVE: It was proposed to determine to what extent are biological foodstuffs affected by the problem of enterococcal resistance to antibiotics and, if detected, to what extent and which enterococcus strains are involved.

DESIGN: Standard culture studies were used to detect vancomycin-resistant enterococci (VRE) colonization from 68 food samples. Individual food samples were collected from different vendors at a local bio market in Berlin. Molecular biological techniques such as polymerase chain reaction (PCR) were established. The main focus of this work was the bacteriological part of this study. Lysates were supplied for a detailed PCR examination by the "Jugend forscht"- study group at the Emil-Fischer-Schule, Berlin. Data from both projects were presented together at the scientific meeting *BioPerspectives im Fokus: Nahrung für die Zukunft*.

RESULTS: No vancomycin resistance was detected. There was basically no resistance for ampicillin, erythromycin, or tetracycline detected by PCR in the lysates given to the "Jugend forscht"- study group. Enterococci can contaminate almost any surface and survive in the environment for prolonged periods (1 week), and were found in egg, meat, as well as milk products. Different species were identified. While some of these species might come from starter cultures for food processing, the

species Enterococcus faecium, Enterococcus faecalis, and Enterococcus durans, which were recovered from some of the tested food samples, are usually considered to be markers of poor hygiene and therefore to be food-borne pathogens.

CONCLUSION: Since food plays a potential role as a reservoir of antibiotic resistance determinants, particularly enterococci may be problematic since they are known to accumulate various resistance genes. They may harbour transmissible antibiotic resistance genes on extrachromosomal locations (plasmids). The establishment of high standards of hygiene for workers and at the workplace may be positive consequences of this study. Since January 2006, the European Union prohibits antibiotics as feed additives, representing a major step in eliminating food-borne antibiotic resistance caused by animal husbandry and food production.

10. Literatur:

- 1) Antibiotikumresistente Bakterien: eine neue Dimension in der Lebensmittelmikrobiologie
M. Teuber; V. Perrete und F. Wirsching
Institut für Lebensmittelwissenschaft, 2000
- 2) Antibiotikaresistenz von Enterokokken aus landwirtschaftlichen Nutztieren und Lebensmitteln tierischer Herkunft
J. Peters, 2003
- 3) Resistenz gegen Glykopeptid-Antibiotika bei Enterokokken
I. Klare, W. Witte
Robert Koch Institut, 1995
- 4) Wiener klinische Wochenschrift 1997
Glykopeptidresistente Enterokokken Auftreten, Verarbeitung, Resistenzübertragung, Bedeutung
I. Klare, W. Witte, 1997
- 5) Prävalenz der Antibiotika-Resistenz in Milchviehherden bei Infektionserregern
P. Krabisch, A. Gangl, G. Wittkowski, K. Fehlings, Poing, 1999
- 6) Lebensmittel als potentielle Vektoren für Antibiotikaresistenzen
2. Mitteilung: Bedeutung von Milchsäurebakterien
G. Klein, 2000
- 7) Zeitliche Entwicklung der Antibiotikaresistenz bei klinisch wichtigen Bakterienspezies in Mitteleuropa:
Ergebnisse der Longitudinalstudie der Arbeitsgemeinschaft „Bakterielle Resistenz“ der Pauerl-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. aus den Jahren 1975-1995
M. Kresken, D. Hafner, N. von Rosenstiel
- 8) Vancomycinresistente Enterokokken in Österreich
Springer-Verlag 1997
F. Allerberger, C. Lass-Flörl, M. P. Dierich, A. M. Hirschl, E. Presterl, G. Haas, I. Klare, W. Witte, 1997
- 9) Einsatz von Antibiotika als Leistungsförderer in der Tiermast und Antibiotikaresistenz bei bakteriellen Infektionserregern des Menschen 1999
W. Witte, I. Klare, G. Werner, 2000

- 10) Verhalten eines vancomycinresistenten *E. faecium*-Stammes in Rohwurst 2005
E. Deleg, J. Peters, U. Höpke, L. Ellerbroek, 2005
- 11) Archiv für Lebensmittelhygiene
G. Kielwein, 1978
- 12) (Zirakzadeh, A. und Patel, 2006). Vancomycin-resistant enterococci:
colonization, infection detection, and treatment. *Aayo. Clin. Proc.* 81, 529–536)
- 13) Messi, P., Guerrieri, E., de Niederhausen, S., Sabia, C. und Bondi, M. (2006).
Vancomycin-resistant enterococci (VRE) in meat and environmental samples.
Int. J. Food Microbiol. 107, 218-222
- 14) Garriga, M., Marcos, B., Martin, B., Veciana-Nogues, M.T., Bover-Cid, S.,
Hugas, M., and Aymerich T. (2005). Starter cultures and high-pressure
processing to improve the hygiene and safety of slightly fermented sausages.
J. Food Prot., 68, 2341-2348
- 15) Anhang - Tabellen

11. Anhang - Tabellen

Anhang 1: Tabelle der zu untersuchenden Bioprodukte

Anhang 2: Liste der CATC/CATAv-Platten

Anhang 3: Befundprotokoll/Enterokokken-Isolierungen

Anhang 4: Befundprotokoll/Enterokokken-Differenzierung

Persönlicher Werdegang

Name: Jörg Freudenberg
Geburtsort/ -datum: Berlin, 10.06.1976
Oberschule: Max-Beckmann-Oberschule mit gymnasialer Oberstufe
-Gesamtschule-
Schulabschluss: Mittlere Reife
Ausbildung: von 1994-1997, Konditor,
von 2002-2003, Konditormeister,
von 2004-2006, Lebensmitteltechniker.



„ Der Beginn aller Wissenschaften ist das Erstaunen, dass die Dinge sind, wie sie sind.“ (Aristoteles)

Selbstständigkeitserklärung:

Hiermit versichere ich, Jörg Freudenberg, die vorliegende Arbeit selbstständig und nur auf Grund der angegebenen Hilfsmittel und Literaturstellen verfasst zu haben.

Berlin, den 01.05.2006

Danksagung

Frau Dr. E. Hausmann, Leiterin des Gen-Labors der Emil-Fischer-Schule, Berlin möchte ich mich besonders herzlich Bedanken für Ihren unermüdlichen Einsatz mich in diesem Bereich der Mikrobiologie und in der Thematik der allgemeinen Gentechnik zu fördern und somit mir ganz neue „Türen“ öffnete.

Herrn A. Juretko, unserem Klassenlehrer Ihnen möchte ich Danken für zwei gute Jahre in denen Sie mir die Wissenschaft spannend vermittelten und so dass wissenschaftliche Interesse in mir weckten. Auch nicht zu vergessen ist die ganze Organisation der Exkursionen.

Herrn K. Mac vom Bundes Institut für Risikobewertung habe ich nicht nur zu verdanken, dass ich die hiesige Bibliothek mit all den wissenschaftlichen Studien, die für meine Technikerarbeit interessant waren nutzen durfte, sondern auch seine Unterstützung und die Durchführung der PCR, die er übernahm. Nicht zu vergessen, sein Wissen war für mich von großer Hilfe. An dieser Stelle sei erinnert für die schnellen Unterstützung, um an die Posterteilnahme der wissenschaftlichen Fachtagung der DECHEMA in der IHK-Potsdam Bio Perspectives im Fokus: Nahrung für die Zukunft mit zu ermöglichen.

Dank sagen möchte ich insbesondere Frau C. Dittmar-Gabor, die mich in der Mikrobiologie tatkräftig unterstützte und viele Fragen mir beantwortete.

Ebenfalls ein Dankeschön geht an Frau Ute Kiehn für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern Elke und Eckhard Freudenberg ohne Sie wäre die Ausbildung nicht möglich gewesen, sowie meinem Bruder Jens Freudenberg, obwohl er selber viel mit seinem Studium zeitlich eng gebunden ist hatte er keine Mühen gescheut mich zu unterstützen, wenn ich seinen Rat brauchte.

Ein riesiges Dankschön gilt meinen Freunden, die mir in den zwei Jahren der Schule treu zur Seite standen und mich das Leben nicht vergessen ließen.

Zum Schluss sei auch den Schäflein Dank für ihr Blut.

