

Angefertigt am Lehrstuhl für Tierhygiene
(Univ.-Prof. Dr. Johann Bauer)
Fakultät Wissenschaftszentrum für Ernährung, Landnutzung und Umwelt
der Technischen Universität München

Vorgelegt über das
Institut für Tierschutz, Verhaltenskunde und Tierhygiene
(Univ.-Prof. Dr. Michael Erhard)
Tierärztliche Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Antibiotikaresistente Bakterien
und
Resistenzgene
in Schweinegülle**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Christina Susanne Hölzel
aus Augsburg

München 2006

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer
Referent: Univ.-Prof. Dr. M. H. Erhard
1. Korreferent: Univ.-Prof. Dr. M. Stangassinger
2. Korreferent: Prof. Dr. W. Rambeck
3. Korreferent: Univ.-Prof. Dr. H. Ammer
4. Korreferent: Univ.-Prof. Dr. K. Heinritzi

Tag der Promotion: 28. Juli 2006

Meinem Großvater

der bis ins hohe Alter großes Interesse am Thema
und Fortgang dieser Arbeit hatte

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----------------|--|---------------|
| <u>A</u> | <u>EINLEITUNG</u> | - 7 - |
| <u>B</u> | <u>LITERATUR</u> | - 8 - |
| 1 | BAKTERIELLE ANTIBIOTIKARESISTENZ | - 8 - |
| 1.1 | MOLEKULARE GRUNDLAGEN | - 8 - |
| 1.1.1 | Protein-Ebene | - 8 - |
| 1.1.2 | Gen-Ebene | - 9 - |
| 1.2 | TETRAZYKLINE: WIRKUNG UND RESISTENZMECHANISMEN | - 11 - |
| 1.2.1 | Efflux am Beispiel Tet(B) | - 12 - |
| 1.2.2 | Ribosomale Schutzproteine am Beispiel Tet(M), Tet(O) | - 13 - |
| 1.3 | EPIDEMIOLOGISCHE GRUNDLAGEN | - 14 - |
| 1.3.1 | Begriffsbestimmungen | - 14 - |
| 1.3.2 | Klinische Resistenz und Relative Resistenzveränderung | - 15 - |
| 1.3.3 | Antibiotika-abhängige Resistenzselektion und -induktion | - 16 - |
| 1.3.4 | Subinhibitorische Antibiotikakonzentrationen | - 17 - |
| 1.3.5 | Verbleib der Antibiotikaresistenz(gene) in Abwesenheit des Ziel-Antibiotikums | - 18 - |
| 1.3.6 | Kreuz- und Coresistenz | - 20 - |
| 2 | EINSATZ VON ANTIBIOTIKA IN DER TIERHALTUNG UND VORKOMMEN VON TETRAZYKLINEN IN GÜLLE | - 22 - |
| 2.1 | EINSATZ VON ANTIBIOTIKA | - 22 - |
| 2.2 | VORKOMMEN VON TETRAZYKLINEN IN SCHWEINEGÜLLE | - 23 - |
| 3 | KEIMFLORA IN SCHWEINEGÜLLE | - 23 - |
| <u>C</u> | <u>MATERIAL UND METHODEN</u> | - 25 - |
| 1 | ÜBERBLICK ÜBER DEN UNTERSUCHUNGSGANG | - 25 - |
| 2 | MIKROBIOLOGISCH-KULTURELLE UNTERSUCHUNGEN | - 26 - |
| 2.1 | MATERIAL | - 26 - |
| 2.1.1 | Labormaterial | - 26 - |
| 2.1.2 | Untersuchungsmaterial | - 29 - |
| 2.2 | METHODEN | - 30 - |
| 2.2.1 | Auswahl der Testparameter | - 30 - |
| 2.2.2 | Probenaufbewahrung | - 35 - |
| 2.2.3 | Keimzahlbestimmung | - 35 - |
| 2.2.4 | Keimisolation und Keimidentifizierung | - 36 - |
| 2.2.5 | Cryokonservierung | - 39 - |
| 2.2.6 | Prüfung der Antibiotikaresistenz | - 39 - |
| 3 | MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN | - 42 - |
| 3.1 | MATERIAL | - 42 - |
| 3.1.1 | Labormaterial | - 42 - |
| 3.1.2 | Untersuchungsmaterial | - 42 - |
| 3.2 | METHODEN | - 44 - |
| 3.2.1 | Auswahl der Testparameter | - 44 - |

| | | |
|----------|--|---------------|
| 3.2.2 | Kobaltbestrahlung | - 45 - |
| 3.2.3 | DNA-Extraktion | - 46 - |
| 3.2.4 | Nachweis von <i>tet(B)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>tet(O)</i> | - 48 - |
| 3.2.5 | Methodenvalidierung | - 50 - |
| 4 | DATENAUSWERTUNG | - 51 - |
| 4.1 | PHÄNOTYPISCHE RESISTENZ | - 51 - |
| 4.2 | VERGLEICH VON HUMAN- UND VETERINÄRMEDIZIN | - 52 - |
| 4.3 | GENGEHALT | - 52 - |

D ERGEBNISSE - 53 -

| | | |
|----------|--|---------------|
| 1 | BAKTERIOLOGISCHER STATUS VON SCHWEINEGÜLLE | - 53 - |
| 1.1 | KEIMGEHALTE | - 53 - |
| 1.2 | KEIMFLORA | - 53 - |
| 2 | PHÄNOTYPISCHE RESISTENZ AUSGEWÄHLTER BAKTERIEN AUS SCHWEINEGÜLLE | - 55 - |
| 2.1 | METHODENVALIDIERUNG | - 55 - |
| 2.2 | <i>SALMONELLA SPP.</i> | - 57 - |
| 2.3 | <i>ESCHERICHIA COLI</i> | - 58 - |
| 2.4 | <i>ENTEROCOCCUS FAECALIS</i> | - 63 - |
| 2.5 | <i>ENTEROCOCCUS FAECIUM</i> | - 67 - |
| 2.6 | <i>ENTEROCOCCUS NONFAECALIS/NONFAECIUM</i> | - 71 - |
| 2.7 | <i>CLOSTRIDIUM SPP.</i> | - 73 - |
| 2.8 | LAKTOBAZILLEN | - 76 - |
| 3 | VERBREITUNG VON TETRAZYKLIN-RESISTENZGENEN | - 79 - |
| 3.1 | METHODENVALIDIERUNG | - 79 - |
| 3.1.1 | Qualitativer Nachweis von <i>tet</i> -Genen aus Bakterienisolaten | - 79 - |
| 3.1.2 | Validierung des Nachweises von <i>tet(M)</i> -Genen in Gülle und Boden | - 79 - |
| 3.2 | AUSSCHIEDUNGSKINETIK VON TETRAZYKLIN-RESISTENZGENEN WÄHREND EINER CHLORTETRAZYKLIN-APPLIKATION BEIM SCHWEIN | - 85 - |
| 3.2.1 | <i>tet(O)</i> 2002 | - 85 - |
| 3.2.2 | <i>tet(M)</i> 2004 | - 86 - |
| 3.3 | TETRAZYKLIN-RESISTENZGENE IN SCHWEINEGÜLLE | - 87 - |
| 3.4 | TETRAZYKLIN-RESISTENZGENE IM BODEN | - 89 - |

E DISKUSSION - 92 -

| | | |
|----------|---|---------------|
| 1 | EINORDNUNG DER PHÄNOTYPISCHEN RESISTENZRATEN | - 92 - |
| 1.1 | <i>E. COLI</i> | - 92 - |
| 1.2 | <i>E. FAECALIS</i> | - 95 - |
| 1.3 | <i>E. FAECIUM</i> | - 98 - |
| 1.4 | DIFFERENZIERUNG DER RESISTENZPARAMETER VON <i>E. COLI</i> , <i>E. FAECALIS</i> UND <i>E. FAECIUM</i> NACH BETRIEBSTYP, -GRÖÖE UND BEPROBUNGSZEITRAUM | - 100 - |
| 1.4.1 | Einordnung der MHK-Mittelwertsvergleiche | - 100 - |
| 1.4.2 | Unterschiede nach Betriebsgröße | - 101 - |
| 1.4.3 | Unterschiede nach Betriebstyp | - 102 - |
| 1.4.4 | Unterschiede nach Beprobungszeitraum | - 103 - |
| 1.5 | EINORDNUNG DER PHÄNOTYPISCHEN RESISTENZ BEI WEITEREN SPEZIES | - 104 - |
| 1.5.1 | <i>E. nonfc.</i> | - 104 - |

| | | |
|-----------------|---|-----------------------|
| 1.5.2 | Clostridien | - 105 - |
| 1.5.3 | Laktobazillen | - 107 - |
| 2 | PHÄNOTYPISCHE RESISTENZPARAMETER IM HINBLICK AUF DIE ANTI-BIOTIKAGEHALTE DER UNTERSUCHTEN GÜLLEPROBEN | - 109 - |
| 2.1 | RESISTENZVERHALTEN DER <i>E. COLI</i> UND <i>E. FAECIUM</i> -POPULATION GEGENÜBER TETRAZYKLIN IN GÜLLE MIT UNTERSCHIEDLICHEM ANTIBIOTIKA-GEHALT | - 110 - |
| 2.2 | EINFLUSS VON ANTIBIOTIKAGEHALTEN IN GÜLLE AUF RESISTENZRATEN UND MEHRFACHRESISTENZEN | - 113 - |
| 2.2.1 | Resistenzraten | - 113 - |
| 2.2.2 | Mehrfachresistenzen | - 116 - |
| 2.2.3 | Charakterisierung der Bakterienpopulation aller einbezogenen Spezies in Gülle mit hochmehrfach-resistenten Isolaten | - 119 - |
| 3 | VERBREITUNG AUSGEWÄHLTER TETRAZYKLIN-RESISTENZGENE IN SCHWEINE-GÜLLE | - 121 - |
| 3.1 | METHODISCHE ASPEKTE | - 121 - |
| 3.2 | AUSSCHIEDUNGSKINETIK VON TETRAZYKLIN-RESISTENZGENEN IN SCHWEINE-FAECES | - 122 - |
| 3.3 | BODENPROBEN | - 123 - |
| 3.4 | VORKOMMEN VON TETRAZYKLIN-RESISTENZGENEN IN PRAXISGÜLLE | - 125 - |
| 4 | EINORDNUNG DER BEFUNDE IM HINBLICK AUF EVENTUELLE RISIKEN | - 134 - |
| <u>F</u> | <u>ZUSAMMENFASSUNG</u> | <u>- 136 -</u> |
| <u>G</u> | <u>SUMMARY</u> | <u>- 138 -</u> |
| <u>H</u> | <u>LITERATURVERZEICHNIS</u> | <u>- 140 -</u> |
| <u>I</u> | <u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u> | <u>- 169 -</u> |
| <u>J</u> | <u>ANHANG</u> | <u>- 173 -</u> |
| <u>K</u> | <u>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</u> | <u>- 183 -</u> |
| <u>L</u> | <u>TABELLENVERZEICHNIS</u> | <u>- 185 -</u> |

A Einleitung

Die Geschichte der Nutzung antimikrobiell wirksamer Stoffe begann als nahezu beispielloser Siegeszug: Schlagartig konnten Krankheiten, die vormals nur symptomatisch zu lindern waren, ursächlich behandelt werden. Als das Penicillin in den frühen 40er Jahren des 20. Jahrhunderts erstmals zur klinischen Anwendung kam, erwiesen sich nahezu alle gegen Penicillin natürlich-empfindlichen Bakterien als sensibel. Doch bereits 1942 gab es erste Berichte über *Staphylococcus-aureus*-Stämme mit erworbener Penicillinresistenz (MURRAY & MOELLERING, 1978). Allgemein zeigten sich die Stämme der so genannten Murray-Collection, einer Stammsammlung aus den Jahren 1917 bis 1954, im Wesentlichen also aus der prä-antibiotischen Ära, bei ihrer Testung im Jahr 1980 gegenüber einer breiten Reihe von Wirkstoffen im höchsten Maße Anti-biotika¹-sensibel (HUGHES & DATTA, 1983).

Nach der Einführung neuer Wirkstoffklassen folgte die Entdeckung resistenter Stämme jedoch meist schon innerhalb weniger Jahre (eine Zusammenstellung siehe z. B. bei DOBLER, 2005). Eine Ausnahme bildete das Vancomycin, das Ende der 50er Jahre eingeführt worden war: übertragbare Resistenzen gegen Vancomycin wurden erst dreißig Jahre später, Ende der 80er Jahre, entdeckt (LECLERCQ et al., 1987). Gerade im Zusammenhang mit der Vancomycin-Resistenz rückte auch die Rolle der antibiotischen Leistungsförderer ins Blickfeld der Experten: gab es doch einen eng verwandten Stoff, das Avoparcin, das in der Landwirtschaft als antibiotischer Leistungsförderer eingesetzt wurde. Eine breite Diskussion war die Folge, die letztlich im EU-weiten Verbot aller antibiotischen Leistungsförderer mündete.

Umstritten blieb aber die Frage, welche Rolle der therapeutische Antibiotika-Einsatz in der landwirtschaftlichen Nutztierhaltung für die Entstehung und Verbreitung humantherapeutisch relevanter Antibiotikaresistenzen spielt; sensibilisiert durch die Verknüpfung zwischen Vancomycin und Avoparcin war es von besonderem Interesse, Kreuzresistenzen gegenüber veterinärmedizinisch nicht eingesetzten Stoffen aufzudecken. Das großangelegte dänische Surveillance-Programm DANMAP bezog in seine Untersuchungen an Isolaten aus Tieren und tierischen Lebensmitteln humanmedizinische Reserve-Antibiotika ein. Neben der Frage nach dem Vorkommen solcher Resistenzen in Bakterien tierischen Ursprungs waren auch ihre möglichen Übertragungswege auf den Menschen von Interesse.

Phänotypisches Resistenzmonitoring erfasst jedoch nur einen Bruchteil des tatsächlich in Umweltbakterien vorhandenen Resistenzpotentials, muss es sich doch zwangsläufig auf kultivierbare Bakterien beschränken; Nicht-Kultivierbarkeit entzieht so den prozentual größten Teil der Bakterienflora, sei es aus Gülle oder anderen komplexen Habitaten, der Resistenzbeobachtung: Schätzungen über den Anteil nicht-kultivierbarer Bakterien in unterschiedlichen Habitaten reichen von 80 bis > 95 % (COTTA et al., 2003; LEBUHN et al., 2005).

Die vorliegende Studie soll untersuchen, in welchem Ausmaß und gegen welche Substanzen Antibiotikaresistenzen in Bakterien aus Gülle auftreten. Zudem soll der quantitative Gehalt an ausgewählten Tetrazyklin-Resistenzgenen beleuchtet werden. Die direkte Extraktion der DNA aus Gülle soll hierbei Aussagen über den „Genpool“ ausgewählter Tetrazyklin-Resistenzgene der Gesamtflora einschließlich der nicht-kultivierbaren Bakterien ermöglichen. Die Ergebnisse werden hinsichtlich ihrer Zusammenhänge mit Antibiotika-Rückständen in den Gülleproben diskutiert.

¹ Aus Gründen der sprachlichen Vereinfachung steht „Antibiotika“ in dieser Arbeit für alle antibakteriell wirksamen Substanzen (analoge Handhabung vgl. BTK/ArgeVET, zitiert nach BUNDESTIERÄRZTEKAMMER, 2006).

B Literatur

1 Bakterielle Antibiotikaresistenz

1.1 Molekulare Grundlagen

1.1.1 Protein-Ebene

Um sich der Schädigung antimikrobieller Wirkstoffe zu entziehen, steht Bakterien ein gewisses Grundrepertoire an Resistenzmechanismen zur Verfügung: Ein wesentlicher Schachzug ist die Verminderung der Antibiotikakonzentration im Bakterium. Dies kann durch verminderte Aufnahme (Permeabilitätsbarrieren) oder erhöhte Ausschleusung erfolgen. So erhöht beispielsweise eine Modifizierung der Lipopolysaccharidmembran die Widerstandskraft gramnegativer Bakterien gegen hydrophobe Antibiotika (NIKAIDO, 1989 & 2003; KUMAR & SCHWEIZER, 2005). Die Ausschleusung verschiedener Wirkstoffe aus der Zelle kann durch spezifische oder generalisierte („multidrug“) Transportsysteme erfolgen und ist energieabhängig (LEVY, 1992; KUMAR & SCHWEIZER, 2005).

Des Weiteren können Bakterien antimikrobielle Wirkstoffe enzymatisch durch deren Spaltung oder Modifikation inaktivieren. Von klinischer Bedeutung ist hierbei insbesondere die enzymatische Hydrolyse der β -Laktame durch bakterielle β -Laktamasen (WRIGHT, 2005).

Darüber hinaus nutzen Bakterien Möglichkeiten, um die Zielorte des Antibiotikums vor dessen Wirkung zu schützen (so genannte „target alteration“). Dies kann durch Überproduktion des Zielmoleküls erfolgen (COLE, 1994) oder aber durch dessen strukturelle Veränderung, wodurch beispielsweise Bindungsstellen für den Wirkstoff verloren gehen oder die Bindungsaffinität vermindert wird (LAMBERT, 2005). Richten sich antibiotische Wirkstoffe gegen bestimmte Synthesewege im Bakterium, so kann Resistenz auch durch die Umgehung dieser Stoffwechselblockade auf alternativen Stoffwechselwegen zustande kommen.

Bei RICE & BONOMO (1996) findet sich eine frühe Zusammenstellung der bekannten Resistenzmechanismen für verschiedene Wirkstoffklassen, vgl. Tabelle 1.

Tabelle 1: Resistenzmechanismen gegen verschiedene antibiotische Wirkstoffe*

| Wirkstoff (-klasse) | Resistenzmechanismus | | | | |
|------------------------|------------------------|------------------------|--------|------------------------|--------|
| | Enzymatischer Abbau | Permeabilitätsbarriere | Efflux | „Target Alteration“ | Andere |
| Aminoglykoside | + | + | (+) | + | |
| β -Laktame | + | + | +; (+) | + | |
| Chloramphenicol | + | + | +; (+) | + | |
| Fluorquinolone | | + | +; (+) | + | |
| Fosfomycin | + | + | (+) | + | |
| Lincosamide | + | + | | + | |
| Makrolide | + | + | +; (+) | + | |

Fortsetzung Tabelle 1: Resistenzmechanismen gegen verschiedene antibiotische Wirkstoffe

| Wirkstoff (-klasse) | Resistenzmechanismus | | | | |
|---------------------------------|----------------------|------------------------|--------|---------------------|-------------------------|
| | Enzymatischer Abbau | Permeabilitätsbarriere | Efflux | „Target Alteration“ | Andere |
| Nitroimidazole | | + | | | + |
| Oxazolidinone | | | | + | |
| Rifampicin | + | | (+) | + | |
| Streptogramin B | + | | | + | |
| Synercid (Streptogramin A+B) | + | | + | + | |
| Sulfonamide/Tri- methoprim | | + | (+) | | alt. Stoffwechselweg |
| Teicoplanin | | | | + | |
| Tetrazykline | + | | +(+) | + | |
| Vancomycin | | + | | + | |

(+) unspezifischer Efflux durch Multidrug Transporter

*Nach RICE & BONOMO, 1996; modifiziert nach NIKAIDO, 1996; NISHINO & YAMAGUCHI, 2001; GOBERNADO, 2003; LEE et al., 2003; AIRES & NIKAIDO, 2005; WOODFORD, 2005

1.1.2 Gen-Ebene

Genetische Strukturen, die Resistenz gegenüber Antibiotika verursachen, entwickeln sich de novo durch die Mutation bestehender Gene oder prägen sich aus infolge des Erwerbs bereits existenter Gene anderer Bakterien (horizontaler Gentransfer).

Mutationen

Resistenz bedingende Mutationen können struktureller oder regulatorischer Natur sein: Austausch, Addition oder Deletion einzelner Nukleotide führen zu einer Änderung der von diesem Gen codierten Proteinstrukturen. Diese ist häufig ohne klinische Bedeutung (RICE & BONOMO, 2005), kann aber auch für die oben erwähnten „target alterations“ verantwortlich sein, also Zielstrukturen im Bakterium so verändern, dass ein Angriffsort für das Antibiotikum nicht länger gegeben ist. Dies kann zum Beispiel Mykobakterien Resistenz gegenüber Streptomycin verleihen (COLE, 1994). Manche Resistenzgene, so das – eine Cephalosporinase codierende – *ampC*-Gen, befinden sich unter der regulatorischen Kontrolle anderer Gene. Mutationen dieser Kontrollgene können zur Überexpression des Genes führen; dies führt zu einer Resistenz nicht nur gegen Penicilline, sondern auch gegen Cephalosporine selbst der neueren Generation (JUAN et al., 2005). Mutationen im regulatorischen *mar*-Lokus können multiple Resistenzen gegenüber Antibiotika, organischen Lösungsmitteln, Haushalts-Desinfektionsmitteln und weiteren antibakteriellen Noxen bedingen (ALEKSHUN & LEVY, 1999).

Horizontaler Gentransfer

Die drei primären Gentransfermechanismen sind Transduktion, Transformation und Konjugation. Im Zusammenhang sind als genetische Strukturen Plasmide, Transposons sowie indirekt auch Integrons und Genkassetten von Interesse.

Transduktion

wird durch Bakteriophagen – Viren, deren Wirtszelle die Bakterienzelle ist – vermittelt. Bakteriophagen schleusen ihr eigenes Genom in die Bakterienzelle ein und benutzen den bakteriellen Replikationsapparat zu ihrer Vermehrung. Im lytischen Zyklus steht am Ende dieses Prozesses die Zerstörung des Bakteriums; im lysogenen Zyklus dagegen integriert sich der Phage temporär in die Wirts-DNA, ohne den Wirt substantiell zu schädigen. Im Zuge dieses Vorgangs ist die Übertragung genetischen Materials aus der alten in die neue Wirtszelle möglich (DAVIS, 1990). Dies ist nicht nur ein potentes Werkzeug der Wissenschaft im „genetic engineering“, sondern hat auch Resistenz-epidemiologische Bedeutung. So sehen SCHMIEGER und SCHICKLMAIER (1999) in der Transduktion die wahrscheinlichste Möglichkeit für Gentransfer unter Salmonellen.

Transformation

steht für die bakterielle Aufnahme frei außerhalb von Bakterienzellen vorliegender DNA aus der Umwelt. Die Fähigkeit zur Transformation ist allerdings einer beschränkten Zahl von Bakterienarten vorbehalten, zu denen z. B. *Streptococcus pneumoniae* oder *Escherichia coli* zählen (DAVIS, 1990). Die Möglichkeit zur Transformation ist nicht nur von der Befähigung der Bakterien, sondern auch in hohem Maß von der Stabilität der DNA in der Umwelt abhängig. So fanden WOEGERBAUER et al. 2002 in Versuchen mit *E. coli*-Feldstämmen zwar transformierte Stämme in der Matrix Trinkwasser, nicht aber in der Matrix Urin. Hingegen gelang der Nachweis der Transformation von *Streptococcus gordonii* im Speichel (MERCER et al., 2001).

Konjugation

ermöglicht Bakterien den Austausch genetischen Materials – häufig Plasmide oder Transposons – über direkten Zell-zu-Zell-Kontakt. Dieser Kontakt wird vermittelt durch Cytoplasma-Brücken und häufig beeinflusst von bakteriellen Pheromonen. *Plasmide* sind zirkuläre, extrachromosomal gelegene DNA-Elemente. Auf *Transposons* werden Gene eingerahmt von Insertionssequenzen, die es ihnen ermöglichen, innerhalb des Chromosoms und von Chromosom zu Plasmid zu springen. Die Befähigung zur Konjugation – der F-Faktor – ist auf dem Plasmid oder Transposon selbst codiert. Nicht jedes Plasmid trägt die Fähigkeit, konjugativen Zell-zu-Zell-Kontakt herzustellen; so genannte nicht-konjugative Plasmide können jedoch mit einem konjugativen Plasmid cotransferiert werden (RICE & BONOMO, 2005).

Neben den für die Konjugation selbst notwendigen Elementen können auf Plasmiden Antibiotika-Resistenzgene, aber auch die genetische Information über Bacteriocine, Toxine und vieles mehr liegen (RICE & BONOMO, 2005). Plasmide können innerhalb einer Zelle in mehrfacher Kopie auftreten; tendenziell existieren kleinere Plasmide in höherer Copy-Zahl als größere und gehen daher weniger leicht verloren (WILLIAMS & THOMAS, 1992). Konjugation kann zwischen eng verwandten Spezies, im Falle der so genannten „broad-host-range-Plasmide“ oder bestimmter Transposons (z. B. der Tn916-Tn1545-Familie) jedoch auch zwischen genetisch sehr

unterschiedlichen Bakterien stattfinden (CLEWELL et al., 1995; THOMAS & NIELSEN, 2005). Einige Bakterien besitzen die Fähigkeit, unterschiedliche Plasmide aufzunehmen, in besonderer Ausprägung. So kann *E. coli* eine Vielzahl von Plasmiden unterschiedlicher Herkunft beherbergen – eine Eigenschaft, die diese Spezies zu einem „Reservoir“ von übertragbaren Antibiotika-Resistenzgenen macht (BRADFORD & SANDERS, 1995).

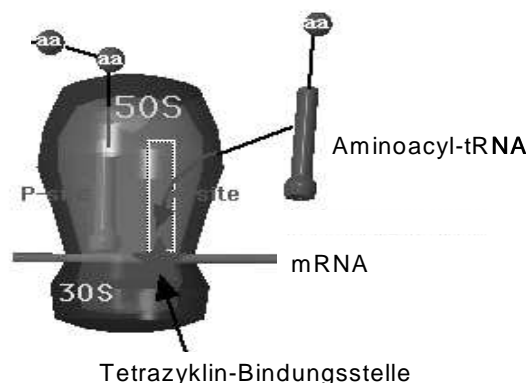
Integrans

und die darauf versammelten *Genkassetten* stellen weitere wichtige Strukturen im Zusammenhang mit genetischer Mobilität dar. Integrans codieren ein Enzym, die Integrase, und besitzen einen Promotor; Genkassetten sind hingegen Gene ohne Promotor, die zirkulär frei im Bakterium vorliegen können, jedoch, da promotorlos, so nicht transkribiert werden. Hierzu müssen sie erst mit Hilfe der Integrase in ein Integron eingebaut werden. Das Integron stellt nun den Promotor, die Transkription kann stattfinden. Ein Integron kann mehrere Genkassetten integrieren; in diesem Fall hängt das Ausmaß der Transkription von der Entfernung des Genes vom Promotor ab: weit entfernte Gene werden schwächer exprimiert. Die Integrase kann jedoch jederzeit das Arrangement der eingebauten Gene (und somit deren Expressionsgrad) verändern (FLUIT & SCHMITZ, 2004). Integrans selbst sind unbeweglich, können aber auf den erwähnten mobilen Elementen – Plasmide, Transposons – gelegen sein.

1.2 Tetrazykline: Wirkung und Resistenzmechanismen

Tetrazykline sind teils natürliche, aus *Streptomyces*-Arten gewonnene, teils halb-synthetische Antibiotika. Gemeinsames Strukturmerkmal ist ein – bei den Derivaten unterschiedlich substituiertes – Naphtacenring-System (DÜRKHEIMER, 1975; GRÄFE, 1992).

Tetrazykline binden an die 30S-Untereinheit des Ribosoms, verhindern so die Bindung der Aminosäure-beladenen tRNA (aatRNA) am Ribosom und verunmöglichen die Verknüpfung einzelner Aminosäuren zu Ketten und letztlich Proteinen (CHOPRA & ROBERTS, 2001; STRATTON, 2005; vgl. Abbildung 1).



aa — aa = Aminosäurekette 30S/ 50S = Untereinheiten des Ribosoms
 A-Site = Akzeptorstelle, initialer Bindungsort für die tRNA am Ribosom
 P-Site = Peptidylstelle, Ort der Peptidverknüpfung der Aminosäuren

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Translationshemmung durch Tetrazyklin

(Bildquelle: <http://pharma1.med.osaka-u.ac.jp/textbook2/Antiinfective2/tetracy.jpg>)

Die wesentlichen Resistenzmechanismen der Bakterien gegenüber Tetrazyklinen bestehen in der Ausschleusung der Substanz oder der Ausbildung ribosomaler Schutzproteine. Hierbei sind Efflux-bedingte Resistenzen unter gramnegativen Bakterien verbreiteter, während ribosomale Schutzproteine sich häufiger in der grampositiven Flora finden. Zunehmend werden die entsprechenden Resistenzgene jedoch auch zwischen den Bakteriengruppen übertragen. So findet sich das Schutzprotein Tet(M), ursprünglich der grampositiven Flora vorbehalten, heute auch in *E. coli* (BRYAN et al., 2004).

Unter den Effluxproteinen sind derzeit die Klassen A bis E, G, H, J bis L, V, Y, Z, 30, 31, 33, 35, 38, 39, TetA(P), OtrB, OtrC und Tcr3 definiert. Als ribosomale Schutzproteine (RPP) sind Tet M, O, Q, S, T, W, 32, 36, OtrA und Tet(B)(P) identifiziert. Daneben existieren drei inaktivierende Enzyme, codiert durch *tet(X)*, *tet(32)* oder *tet(36)*. Die Funktion des Genproduktes von *tet(U)* ist bislang nicht bekannt (ROBERTS, 1996; AMINOV et al., 2001; CHOPRA & ROBERTS, 2001; AMINOV et al., 2001,2002; ROBERTS, 2005).

1.2.1 Efflux am Beispiel Tet(B)

Membran-assoziierte Effluxproteine transportieren die Tetrazykline aus der Zelle und verhindern so deren Akkumulation am Wirkort. Das Tetrazyklin wird hierbei als Kation-Tetrazyklin-Komplex im Austausch gegen ein Proton aus der Zelle geschleust; der Vorgang ist energieabhängig (RICE & BONOMO, 2005; CHOPRA & ROBERTS, 2001).

Das Tet(B)-Protein transportiert – im Gegensatz zu vielen anderen Tetrazyklin-Effluxproteinen – nicht nur die Tetrazykline (inkl. Doxycyclin), sondern auch die chemisch abgewandelten Minocycline aus der Bakterienzelle (ROBERTS, 1997).

Tetrazyklin-Resistenz, die auf Effluxproteinen beruht, ist stets streng reguliert. Dies liegt darin begründet, dass eine ständige Aufrechterhaltung des Effluxprotein-bedingten Protonenaustausches ein Zusammenbrechen des Membranpotentials und so letztlich den Tod des Bakteriums zur Folge hätte (BERENS & HILLEN, 2003). Andererseits muss aber das Repressor-Promotor-System rasch auf anflutende Tetrazyklin-Konzentrationen reagieren, um das entsprechende Effluxprotein vor der Akkumulation des Tetrazyklins zu Transkription-hemmenden Konzentrationen zu exprimieren. Das Regulationssystem nutzt Tetrazykline als Promotoren der gegen sie selbst gerichteten Effluxgene. In Abwesenheit von Tetrazyklin wird die Transkription der Resistenzgene durch ein Repressorprotein gehemmt; die Bindung des Tetrazyklins an diesen Repressor hebt die Hemmung auf und initiiert so die Transkription (vgl. Abbildung 2). Die Bindungsaffinität des Tet-Repressorproteins zu Tetrazyklinen ist dabei enorm (SCHOLZ et al., 2003); nicht umsonst ist eine Vielzahl transgener Organismen zur Regulation mit Tetrazyklin-induzierbaren Repressor-Systemen versehen.

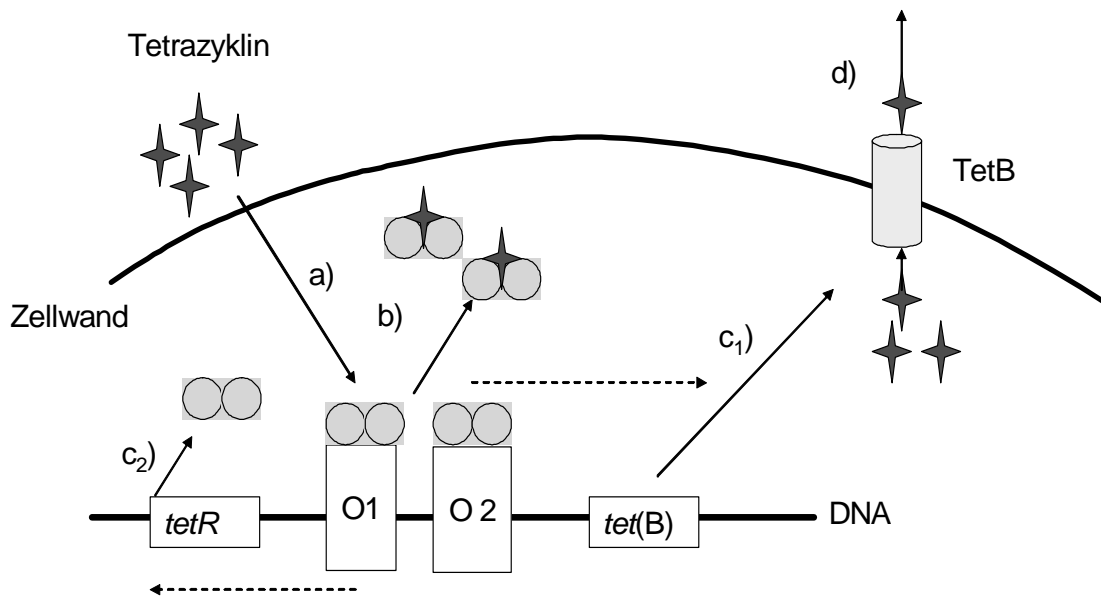


Abbildung 2: Regulation der Tetrazyklin-Efflux codierenden Gene am Beispiel *tet(B)*

a) Das *tet*-Repressor-Dimer ($\circ\circ$) hält beide Operon-Abschnitte *O1* und *O2* besetzt; Tetrazyklin (\uparrow) diffundiert zum *tet*-Repressor-Dimer.

b) Der Tetrazyklin-*tet*-Repressor-Komplex ($\circ\circ\uparrow$) dissoziiert vom Operon und ermöglicht so den Beginn der Transkription in zwei Richtungen (\leftarrow --- \rightarrow).

c) Die Transkription der Struktur- (*tet(B)*, c_1) und Regulatorgene (*tetR*, c_2) führt zur Synthese einerseits des Effluxproteins TetB (\square) und andererseits neuer Repressormoleküle.

d) Das Effluxprotein TetB schleust die Tetrazyklinmoleküle aus der Zelle.

1.2.2 Ribosomale Schutzproteine am Beispiel Tet(M), Tet(O)

Die ribosomalen Schutzproteine ähneln strukturell bakteriellen Elongationsfaktoren. Die Bindung von Tet(M) wie Tet(O) am Ribosom erfolgt räumlich unmittelbar neben der (Haupt-)Bindungsstelle für Tetrazyklin (SPAHN et al., 2001), und überlappend zur Bindungsstelle des Elongationsfaktors EF-G (DANTLEY et al., 1998). Die Bindung der Tet-Schutzproteine verändert das Ribosom in seiner räumlichen Gestalt (Konformität), sodass Tetrazyklin freigesetzt wird. Untersuchungen an Tet(O) zeigten, dass diese Konformitätsänderung auch nach Freisetzung des Tet(O) vom Ribosom bestehen bleibt, sodass das Ribosom bevorzugt durch den Komplex aus aar-RNA und dem Elongationsfaktor EF-Tu anstelle von Tetrazyklin besetzt werden kann (CONNEL et al., 2003). Der Vorgang der Tetrazyklin-Freisetzung durch ribosomale Schutzproteine ist GTP-abhängig (BURDETT, 1996).

1.3 Epidemiologische Grundlagen

1.3.1 Begriffsbestimmungen

Die minimale Hemmkonzentration (MHK, international MIC) bezeichnet die geringste wirksame Konzentration eines bestimmten Antibiotikums gegen ein bestimmtes Bakterienisolat. Das Beurteilungskriterium der Wirksamkeit ist hierbei (auch bei potentiell bakteriziden Wirkstoffen) die Wachstumshemmung, nicht die Abtötung der Keime. Die minimale Hemmkonzentration hat die Einheit mg/l. Sie ist zunächst wertfrei und ermöglicht, für sich genommen, nicht die Klassifizierung der Bakterien als sensibel oder resistent. Hierzu bedarf es der Festlegung von „Breakpoints“: Diese richten sich nach den am therapeutischen Zielort unter Berücksichtigung pharmakokinetischer und toxikologischer Aspekte erreichbaren Wirkstoffkonzentrationen, sowie nach der empirisch ermittelten Antibiotika-Empfindlichkeit der genetisch unveränderten Normalpopulation. Als „Pufferzone“ ist für viele Wirkstoffe ein „Intermediär-bereich“ zwischen die als „sensibel“ bzw. „resistent“ klassifizierenden Breakpoints eingefügt. Minimale Hemmkonzentrationen der Normalpopulation differieren zwischen verschiedenen Spezies, aber auch regional (WIKLER & AMBROSE, 2005). Aus diesem Grund kommen in unterschiedlichen Ländern bzw. Kontinenten unterschiedliche Breakpoints zur Anwendung: Breakpoints sind beispielsweise definiert durch das „National Committee for Clinical Laboratory Standards“ (NCCLS, USA), die „British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC, UK) oder durch das Deutsche Institut für Normung (DIN, GER). Spezies-spezifische Breakpoints sind hingegen nur selten definiert.

Die MHK-Werte der genetisch unveränderten Normalpopulation stellen sich als eingipflige Normalverteilung dar (vgl. Abbildung 3). Liegt die minimale Hemmkonzentration eines Wirkstoffes gegenüber der Normalpopulation bereits oberhalb des festgesetzten Breakpoints, so spricht man von natürlicher oder intrinsischer Resistenz des Keimes. Diese ist eine chromosomal codierte Eigenschaft aller Isolate der jeweiligen Spezies (MAROTHI et al., 2005).

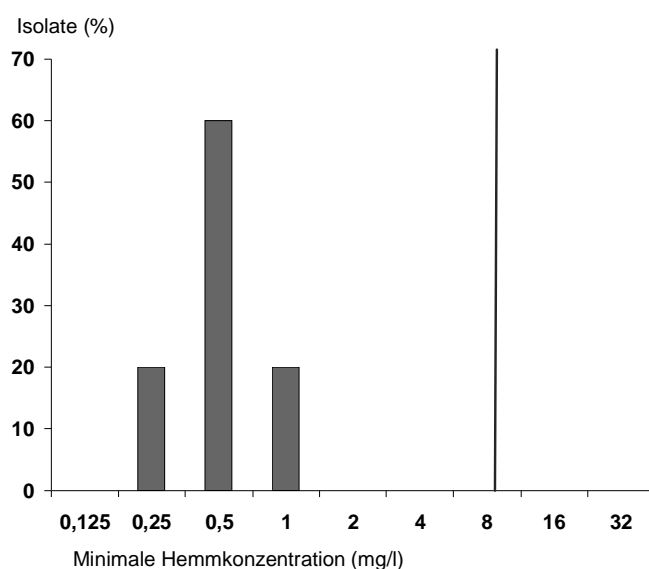
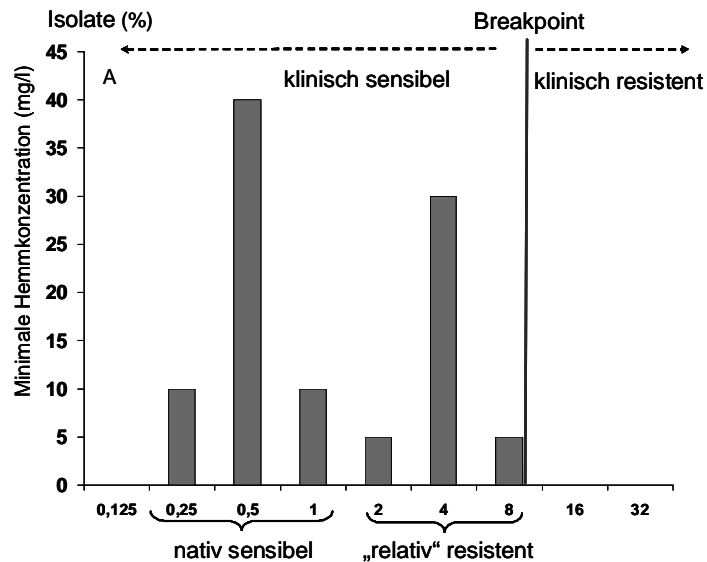


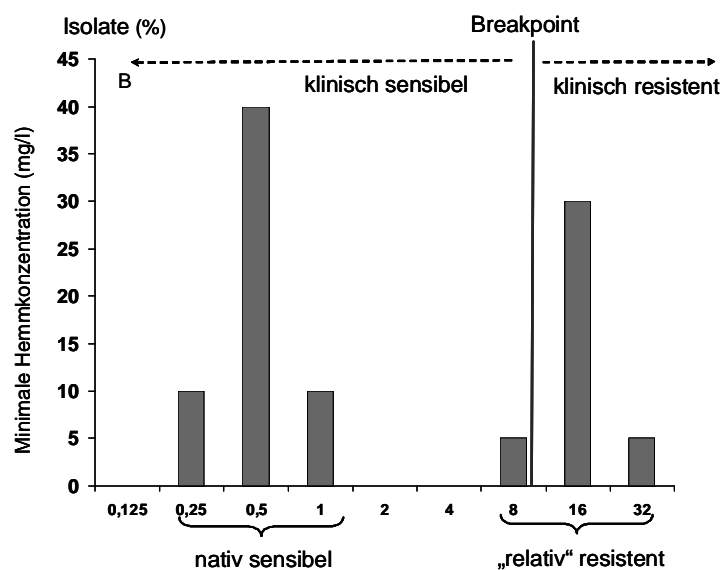
Abbildung 3: Normalverteilung der MHK-Werte Cefotaxim-empfindlicher *E. coli* gegenüber Cefotaxim

1.3.2 Klinische Resistenz und Relative Resistenzveränderung

Sobald Bakterien – sei es durch Mutation oder Gentransfer – Eigenschaften erwerben, die die Empfindlichkeit gegen ein Antibiotikum verringern, verschiebt sich die Minimale Hemmkonzentration nach oben. Diese Abweichung von der Normalpopulation wird auch in der Häufigkeitsverteilung der MHK-Werte sichtbar: es bildet sich ein zweiter Gipfel (eventuell überlappend) rechts des ursprünglichen Peaks. Die erhöhte Minimale Hemmkonzentration kann nach wie vor unterhalb des Breakpoints liegen, der Erwerb solcher Determinanten „relativer Resistenz“ hat dann keine Auswirkung auf therapeutische Aspekte (unveränderte „klinische“ Empfindlichkeit des Keimes), ist jedoch von Resistenz-epidemiologischer Bedeutung (BAQUERO et al., 1998). Überschreitet die erhöhte Minimale Hemmkonzentration den Breakpoint, der sensible (oder intermediäre) von resistenten Keimen trennt, ist hingegen „klinische Resistenz“ – mit den entsprechenden therapeutischen Konsequenzen – gegeben. Abbildung 4 (A/B) verdeutlicht den Sachverhalt grafisch.



A): „relative“ Resistenz bleibt ohne Folgen für die „klinische“ Resistenz



B): die „relativ“ resistente Population zeigt größtenteils „klinische“ Resistenz

Abbildung 4: „Klinische“ und „relative“ Resistenz

Jedoch ist auch eine minimale Hemmkonzentration unterhalb des Breakpoints kein Garant für klinischen Therapieerfolg, da in manchen Fällen die Ergebnisse der Resistenzbestimmung „*in vitro*“ nicht mit den Resultaten „*in vivo*“ gleichgesetzt werden können. Dies gilt für infektiöses Geschehen in schwer zugänglichen Kompartimenten, z. B. bei der Therapie von Gelenkinfektionen durch ein schlecht penetrierendes Antibiotikum, kann aber auch andere Ursachen haben (EMEA, 1999): So zeigen sich Enterokokken bei der *In-Vitro*-Testung gegenüber Sulfonamiden empfindlich, umgehen deren – auf Unterbrechung der Folsäure-Synthese beruhende – Wirkung jedoch *in vivo* durch die Nutzung externer Folsäurequellen (ZERVOS & SCHABERG, 1985).

1.3.3 Antibiotika-abhängige Resistenzselektion und -induktion

Als selektive Antibiotikum-Konzentration gilt eine Konzentration, die den MHK-Wert der nativ sensiblen Population überschreitet, aber unter demjenigen einer genetisch abweichenden Population bleibt. Selektion kann selbst dann eintreten, wenn beide MHK-Werte eng zusammen liegen. Sobald auch der MHK-Wert der genetisch verändert resistenteren Population überschritten wird, wird keine Selektion mehr ausgeübt: bei hohen Antibiotikakonzentrationen wird die Selektion resistenter Mutanten unterdrückt, da bei gleicher Tötungsrate die statistische „Überlebens-Wahrscheinlichkeit“ für die anfangs größere sensible Population höher ist (BAQUERO et al., 1997).

BAQUERO et al. veröffentlichten 1997 Untersuchungen zur Selektion von unterschiedlich resistenten Subpopulationen in Anwesenheit unterschiedlicher Cefotaxim-Konzentrationen: *E. coli* (TEM1) trägt eine β -Laktamase, die Penicilline und einige Cephalosporine hydrolysiert, nicht aber neuere Cephalosporine (z. B. Cefotaxim, Ceftazidim, Cefpodoxim) und Monobactame.

Kommt es in diesem Gen zu einer Punktmutation (TEM1 wird zu TEM12), erhöht sich der MHK-Wert gegenüber Cefotaxim von 0,03 auf 0,06–0,125 mg/l. Eine zweite Punktmutation hebt den MHK-Wert weiter an, auf 1 mg/l. (TEM12 wird zu TEM10). Wird nun, in Nachahmung der natürlichen Konzentrationsverhältnisse, eine Mischkultur aus 90 % TEM1-Trägern und 10 % TEM12-Trägern geschaffen und diese unterschiedlichen Cefotaxim-Konzentrationen ausgesetzt, so ist im Antibiotikum-freien Medium TEM1 dominant. In Konzentrationsbereichen von 0,008 bis 0,06 dominiert hingegen TEM12 (80-100 %), während in höheren Konzentrationsbereichen sowohl TEM1 als auch TEM12 kontraselektiert werden und somit bei absoluter Verminderung beider Populationen TEM1 entsprechend dem ursprünglichen Mischungsverhältnis dominant bleibt. In Mischungen mit 89 % TEM1-, 10 % TEM12- und 1 % TEM10-Trägern dominieren in diesem höheren Konzentrationsbereich entsprechend die TEM10-Träger, bis auch ihr MHK-Wert überschritten wird.

Die bereits in Anwesenheit marginaler Cefotaxim-Konzentrationen stattfindende Selektion von TEM12 gegenüber TEM1 ist auch insofern von Bedeutung, als TEM12 einen Vorgänger für das höhere Resistenzlevel vermittelnde TEM10 darstellt: Die Wahrscheinlichkeit der Entstehung von TEM10 durch eine Einzelmutation in einer TEM12-Population ist ungleich höher als die Wahrscheinlichkeit seiner Entstehung durch Doppelmutationen unter den TEM1-Trägern. Ähnlich wie bei der Entwicklung von TEM1 über TEM12 zu TEM10 wird auch die Fluorquinolon-Resistenz in bestimmten Spezies schrittweise durch Akkumulation mehrerer Mutationen

ausgeprägt (VAN BAMBEKE et al., 2005) und ist daher ähnlichen Selektionsbedingungen unterworfen.

Eine selektive Antibiotikumkonzentration muss nicht zwangsläufig oberhalb des Resistenz-Breakpoints liegen: Häufig bewegt sich auch der MHK-Wert der genetisch abweichenden Population nach wie vor im sensiblen Bereich, dennoch wird angenommen, dass auch deren Selektion ein Ausgangsschritt auf dem Weg zu einer bakteriellen Population mit höherer Resistenz sein kann. GEORGE und LEVY veröffentlichten 1983 – wie schon CAVALLI und MACCARARO 1952 – die erfolgreiche Anzucht hoch-resistenter (Chloramphenicol-r, Tetrazyklin-r) *E. coli* durch Selektion von einfach-mutierten Isolaten und deren schrittweise Adaptation an steigende Antibiotikum-Konzentrationen. BAQUERO et al. (1997) vermuten, dass Bakterien bereits einen ersten Schritt der Resistenzentwicklung vollziehen, wenn sie z. B. durch Punktmutation Resistenzmechanismen erwerben, die nicht sehr effektiv sind, aber ausreichen, um die Tötungsrate herabzusetzen. Dies erhält die Population am Leben und ermöglicht ihr somit weitere Mutationen oder auch die Aufnahme von Resistenzplasmiden durch Donor-Organismen.

1.3.4 Subinhibitorische Antibiotikakonzentrationen

Während, mindestens aber nach einer Therapie mit antibakteriell wirksamen Stoffen, kommt es in einzelnen Kompartimenten des Körpers, aber auch in den Ausscheidungen unweigerlich zum Absinken der Konzentration unter den inhibitorisch wirksamen Level. Diese Konzentrationen bleiben jedoch nicht wirkungslos: Positiv ist die Steigerung des post-antibiotischen Effekts, also die Verlängerung der Hemmung des Bakterienwachstums auch nach Entfernen des Antibiotikums (Post-Antibiotic-Sub-MIC-Effect, PA-SME); Bedingung für sein Zustandekommen ist jedoch die vorherige Einwirkung suprainhibitorischer Konzentrationen (OLDENHOLT-TORNQVIST et al., 2000); diese treten bei der Umweltkontamination durch Antibiotika in Ausscheidungen im Allgemeinen nicht auf, der PA-SME ist daher vernachlässigbar. Stattdessen rückt die Induktion des Resistenzgen-Transfers wie auch der Resistenzgen-Expression in den Vordergrund.

Induktion der Resistenzprotein-Expression

Wie bereits unter Punkt 1.2.1 dargestellt, unterliegt die Expression der Tetrazyklin-Effluxproteine einem äußerst sensitiven Regulationsmechanismus, bei dem Tetrazyklin als Induktor fungiert. HILLEN und BERENS (1994) sprechen von einer Induktion im nanomolaren Konzentrationsbereich. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass Tetrazyklin zum einen als Translationshemmer fungiert, zum anderen aber – gebunden an das Repressorprotein – die Exprimierung des Resistenzproteins erst ermöglicht. Diese Induktion muss also bereits in subinhibitorischen Konzentrationen stattfinden, da, sobald das Tetrazyklin seine Hemmwirkung auf die Translation entfaltet, eine Expression des Resistenzproteins verunmöglicht würde.

Stimulation des Genaustausches

Insbesondere Tetrazyklin ist ein potenter Induktor des Transfers Tetrazyklin-Resistenz vermittelnder Elemente, sowie des Cotransfers weiterer Resistenzplasmide (VALENTINE et al., 1988; STEVENS et al., 1993; SALYIERS et al., 1995). In Anwesenheit von Tetrazyklin (1mg/l Medium) konnten für das Tetrazyklin-Resistenz-transposon Tcr (Resistenzdeterminante: TetQ) der Spezies *Bacteroides* bis zu

1000fach gesteigerte Transferraten und sogar bis 10 000fach gesteigerte Cotransfer-Raten beobachtet werden (STEVENS et al., 1993). Hierfür reichen nach SALYIERS et al. (1995) bereits kurze Expositionszeiten (< 30 min) und vergleichsweise niedrige Konzentrationen (1 mg/l), dies entspricht dem 0,5- bis 4fachen der MHK_{50} der meisten sensiblen Erreger und einem Hundertstel der humantherapeutisch eingesetzten Dosis.

CORPET et al. (1989) ermittelten 6,5 mg Tetrazyklin/l Trinkwasser als Minimale Selektive Dosis im Mausmodell – definiert als die Dosis, die eine Verzehnfachung der Resistenzgen-Träger am Tag fünf nach Inokulation der Donor-Bakterien bewirkt (Donor und Rezipient: *E.coli*; R-Plasmide pyD1, RP4, R270). Während der Tetrazyklin-Supplementierung wurden als durchschnittlicher Gehalt in Faeces ca. 34 % der eingesetzten Konzentration im Trinkwasser gefunden; dies entspricht bei einer eingesetzten Konzentration von 6,5 mg/l einem Gehalt von 2,2 mg/kg Faeces, also zumindest einer grenzwertig inhibitorischen Konzentration (Intermediärbereich für Tetrazyklin-Resistenz nach DIN 58940-4: 1–4 mg/kg). Gemäß den Berechnungen des Autors betrug die Konzentration des freien, also nicht komplexierten Tetrazyklins jedoch lediglich 0,5 mg/kg.

Andere Autoren fanden Induktionswirkung bei noch niedrigeren Konzentrationen: Nach Verabreichung von Tetrazyklin-supplementiertem Trinkwasser (1 mg/l) über 35 Tage hinweg beobachteten DOUCET-POPULAIRE et al. (1991) eine Verzehnfachung der Transkonjugate (Donor: *E.faecalis*; Rezipient: *L.monocytogenes*; Transposon: Tn1545). PERRIN-GUYOMARD et al. unterzogen Mäuse mit humanassoziierter Darmflora einer Trinkwasser-Tetrazyklin-Supplementierung und bestimmte im Anschluss die Tetrazyklin-Gehalte sowie die Rate Tetrazyklin-resistenter Bakterien in Faeces. Bei weiblichen Mäusen zeigte sich bereits bei einer Trinkwasser-Supplementierung von 1mg/l (fäkale Konzentration unter der Nachweisgrenze von 0,6 mg/kg) eine signifikant erhöhte Rate resistenter Enterokokken in Faeces. Hingegen war eine signifikante Erhöhung des Anteils resistenter Enterokokken bei männlichen Mäusen erst bei einer Trinkwasserkonzentration von 10 mg/l (fäkale Konzentration um 1 mg/kg) nachweisbar. (PERRIN-GUYOMARD et al., 2001).

OHLSEN et al. (2003) stellten Untersuchungen zur Übertragung von Resistenzplasmiden aus *Staphylococcus aureus* in der Matrix Klärschlamm an. Hierzu wählte er ein Gentamicin-Resistenzplasmid vom pSK41-Typ (Resistenzdeterminante: *aacA-aphD*), und beobachtete auf Klärschlamm-Agar in Anwesenheit von 0,1 mg/l Gentamicin einen Anstieg der Transkonjugate um den Faktor 1,9 bis 3. In flüssigem Klärschlamm waren die Transferraten jedoch signifikant verringert, d. h. eine Steigerung der Transferraten durch Gentamicin war nicht nachweisbar.

AL MASAUDI et al. (1991) konnten einen Effekt (Steigerung um den Faktor 10) auf das *Staphylococcus-aureus*-Gentamicin-Resistenzplasmid pWG613 erst bei einer Gentamicin-Konzentration von 0,5 mg/l, nicht aber bei 0,25 mg/l nachweisen.

1.3.5 Verbleib der Antibiotikaresistenz(gene) in Abwesenheit des Ziel-Antibiotikums

Die Reversibilität des Selektions-Prozesses ist in großem Maße abhängig von der Repopularisierung durch die ursprüngliche, sensible Flora (LEVY, 1997). Im Selbstversuch stellte LEVY 1986 fest, dass die Rate des Resistenzverlustes nicht derjenigen des Resistenzerwerbs glich: Vielmehr erreichte die Zahl Tetrazyklin-resistenter Bakterien bereits 2 Tage nach Beginn der Tetrazyklin-Behandlung ihren Höhepunkt,

sank jedoch erst 15 Tage nach Absetzen des Tetrazyklins auf den ursprünglichen prä-antibiotischen Level. Hühner in einem geschlossenen Käfigsystem verloren Multi-resistenz-Plasmid tragende *E. coli* trotz regelmäßiger Käfigreinigung über Monate hinweg nicht. Andere Hühner, die antibiotikaresistente Bakterien ausschieden, wurden gemeinsam mit einer Überzahl Nicht-Ausscheider aufgestellt: Die Resistenz ging – wenn auch langsam – verloren (LEVY, 1986).

In gewissem Maße ist die „Haltbarkeit“ der Antibiotikaresistenz im Bakterium abhängig von den mit ihr verbundenen Nachteilen für den Träger-Organismus. Mutationen unterbrechen möglicherweise physiologische Zellprozesse, mit den entsprechenden Schädigungen auf den Keim; Plasmid-tragende Bakterien müssen zusätzliche Nukleinsäuren und Proteine synthetisieren. Diese Prozesse benötigen Energie (BAILEY et al., 1986); neu gebildete Produkte können Auswirkungen auf die Zellphysiologie haben (LENSKI & NGUYEN, 1988). Die Wachstumsrate resistenter Bakterien ist derjenigen der sensiblen Flora somit häufig unterlegen (LENSKI, 1998), die Rekultivierung durch sensible Bakterien den „Kosten“ der Antibiotikaresistenz umgekehrt proportional.

Studien zeigen jedoch, dass dieses Phänomen einem Evolutions-Prozess unterliegt: Bakterien, die nach der Einführung eines Tetrazyklin-Chloramphenicol-Resistenz-plasmides eine Evolution über 500 Generationen durchliefen, waren in Abwesenheit antibiotischer Wirkstoffe nicht nur den naiven, nicht-evolvierten Plasmidträgern überlegen, sondern auch der evolvierten, durch Spontanverlust Plasmid-freien Population (BOUMA & LENSKI, 1988). Spätere Deletionsversuche jeweils einer der beiden Resistenzdeterminanten ergaben, dass die Chloramphenicol-Resistenz sowohl den naiven als auch den evolvierten Träger benachteiligte. Hingegen war der Besitz der Tetrazyklin-Resistenzdeterminanten für den evolvierten (nicht aber für den naiven) Träger selbst in Abwesenheit des Wirkstoffes vorteilhaft (LENSKI, 1998).

NGUYEN et al. (1989) gehen von hohen Aufwendungen der Bakterien für die konstitutive, nicht aber für die induzierbare Expression von Resistenzgenen aus.

Auch JOHNSON und ADAMS (1992) sowie SUNDIN und BENDER (1996) fanden eine verblüffende Persistenz der Tetrazyklin- und Streptomycin-Resistenz und vermuteten eine Evolutions-bedingte „Kostenminimierung“ als deren Ursache. Hingegen ermittelten DAHLBERG und CHAO (2003) hohe Fitness-Beeinträchtigungen durch R1- oder RP4-Plasmide; dennoch sahen die Autoren die genannten Plasmide während 1100 Bakterien-Generationen in Abwesenheit antibiotischer Wirkstoffe stabil.

LUO et al. (2005) beschrieben nicht nur keine Beeinträchtigung, sondern darüber hinaus eine gegenüber dem sensitiven Ursprungstamm gesteigerte *In-Vivo*-Fitness Fluorquinolon-resistenter *Campylobacter jejuni* in Hühnern trotz Abwesenheit antibiotischer Wirkstoffe. Auch DIONISIO et al. sprachen nach der Überführung evolviertes Resistenzplasmide aus *E. coli* in *Salmonella spp.* von dramatisch gesteigerter Fitness der Transformanten (DIONISIO et al., 2005).

Mutationen, die in einem Verlust von Antibiotikaresistenz resultieren, sind im Allgemeinen vergleichsweise selten. Nimmt man eine bakterielle Spontan-Mutations-Rate von 10^{-9} bis 10^{-10} je Basenpaar und Generation an und berücksichtigt, dass nur ein Bruchteil dieser Mutationen tatsächlich zu einem Verlust der Resistenz führen wird, so ist davon auszugehen, dass solche re-sensiblen Keime in einer Population sich nur dann durchsetzen werden, wenn der Verlust der Resistenz einen Fitness-Vorteil mit sich bringt (DE GELDER et al., 2004).

Ein Selektionsvorteil sensibler Keime in antibiotikafreiem Medium ist Bedingung für eine Reversion der Antibiotikaresistenz durch Verzicht auf betroffene Antibiotika (LEVIN et al., 1997). DE GELDER et al. (2004) beobachteten in antibiotikafreiem Medium die graduelle Zunahme einer Tetrazyklin-sensiblen Subpopulation unter Multiresistenz-Plasmid tragenden *E. coli* von 0,1 % zu Beginn der Untersuchung auf 7 % nach 500 Generationen. Die Wiedererlangung der Tetrazyklin-Sensitivität war hierbei nicht auf einen Verlust des Plasmides zurückzuführen, sondern durch ein Rekombinations-Ereignis in unmittelbarer Nähe des *tet*-Operons bedingt, das dessen Funktionsverlust – bei Erhalt des Plasmides – nach sich zieht. Solche Rekombinations-Ereignisse geschehen mit vergleichsweise hoher Häufigkeit (in diesem Fall 10^{-5} je Generation). Ein Verlust des gesamten Plasmides ließ sich hingegen innerhalb der 500 Generationen nur bei einem von 7086 untersuchten Klonen feststellen.

Im kombinierten mathematisch-statistischen Modell fanden die Autoren die Re-Sensibilisierung der Population am besten durch ein Modell erklärt, das zugleich Mutationshäufigkeit und Selektionsprozesse einbezog (DE GELDER et al., 2004). Hierin zeigte sich die entscheidende Bedeutung auch eines geringen Selektionsvorteiles sensibler Keime: Während nach den Berechnungen der Autoren in einem rein Mutations-basierten Modell die Verdrängung von 99,9 % der resistenten Flora trotz der hohen ermittelten Mutationsrate bei einer – niedrig geschätzten – mittleren Generationszeit von 3 Stunden 21 bis 32 Jahre dauern würde, verringert sich diese Zeit unter Berücksichtigung eines geringen Selektionsvorteiles auf 6 bis 10 Monate. Voraussetzung dafür, dass dieser Selektionvorteil zum Tragen kommt, ist hierbei selbstverständlich die Anwesenheit des selektierenden Faktors, in diesem Fall also die Abwesenheit des Antibiotikums.

Selbst bei einem noch geringeren Restanteil der resistenten Population an der Gesamtpopulation (0,001 %) ist jedoch nach der Wiedereinführung des betroffenen Wirkstoffes mit einem schnellen Wiederanstieg zu rechnen, der weitaus rascher vonstatten geht als die ursprüngliche Resistenzentwicklung (LEVIN et al., 1997; AUSTIN et al., 1997; HEINEMANN et al., 2000).

1.3.6 Kreuz- und Coresistenz

Kreuzresistenz ist nach SHAH (2005) definiert als Resistenz gegen strukturell eng verwandte Substanzen, basierend auf einem gemeinsamen Resistenzmechanismus. Hingegen bezeichnet Coresistenz die simultan vermittelte Resistenz gegen nicht-verwandte Substanzen (ACAR & RÖSTEL, 2001; SHAH 2005; jedoch gebrauchen andere Autoren auch hierfür den Begriff „Kreuzresistenz“, vgl. z. B. SANDERS et al., 1984).

Unter Kreuzresistenz fällt demnach die durch *tet*-Gene vermittelte gleichzeitige Resistenz gegen Tetrazyklin und Doxycyclin, wohingegen es sich z. B. bei der kombinierten Gentamicin-Chloramphenicol-Resistenz um eine Coresistenz handelt. Grundlage der Coresistenz sind im Allgemeinen Resistenzgene, die gemeinsam auf ein und demselben mobilen Element gelegen sind (SCHWABER et al., 2005); CHOPRA et al. (2003) vermuten jedoch auch das Auftreten von Mutations-basierter Coresistenz. Konjugative Plasmide werden als das wichtigste bewegliche Vehikel der Coresistenz betrachtet, während Integrons eine entscheidende Rolle in der örtlichen Assoziation der Resistenzgene zukommt (RICE & BONOMO, 2005; vgl. auch Punkt 1.1.2).

Liegen Kreuz- oder Coresistenzen vor, so wirken alle von der Resistenz betroffenen Stoffe auch unabhängig voneinander als Selektoren. Coselektion kann darüber hinaus auch stattfinden, wenn mit den Resistenzdeterminanten strukturell andere Eigenschaften verbunden sind, die Selektionsvorteile mit sich bringen. Dies kann beispielsweise auf Virulenzfaktoren zutreffen (HEINEMANN et al., 2000).

Einen Sonderfall der Coresistenz stellen so genannte „Multidrug-Transporter“ dar. Diese kommen in den unterschiedlichsten Gattungen wie z. B. in Vertretern der Enterobacteriaceae, in Clostridien oder Milchsäurebakterien vor (POOLE, 2004; DRIDI et al., 2004; MAZURKIEWICZ et al., 2005); zu den bekannten Vertretern in *E. coli* gehören beispielsweise die Transporter MdfA oder AcrA-B. Multidrug-Transporter sind fähig, unterschiedlichste Stoffe aus der Zelle zu transportieren: Antibiotika (z. B. Chloramphenicol, Tetrazykline, Fluorquinolone, Trimethoprim, Fosfomycin), Chemotherapeutika und Antiseptika sind ebenso Ziel wie kationische Farbstoffe oder Detergentien (NISHINO & YAMAGUCHI, 2001). Multidrug-Transporter können Plasmid-codiert sein (HANSEN et al., 2004), auch in Integrons wurden Multidrug-Transporter codierende Gene gefunden (CHANG et al., 2004). Chromosomale Multidrug-Transporter können die molekulare Basis intrinsischer Resistenz darstellen (KOHLER et al., 1996). Mutationen im chromosomalen *mar*-Locus erzeugen den namensgebenden Multiple-Antibiotic-Resistance-Phänotyp unter anderem durch die MarA-vermittelte vermehrte Expression entscheidender Komponenten des AcrAB Multidrug-Transporters (RANDALL & WOODWARD, 2002). Tetrazykline und Chloramphenicol können eine Überexpression des Multidrug-Transporters AcrAB induzieren (GHISALBERTI et al., 2005).

Die Kreuzselektion ist von besonderem Interesse im Zusammenhang mit der Zulassung landwirtschaftlich eingesetzter Wirkstoffe. Bereits 1969 erging vom Swann-Committee (einer Beratungs-Institution der britischen Regierung) die Aufforderung, kreuzselektierende Wirkstoffe vom Einsatz als Wachstumsförderer auszuschließen (SWANN, 1969). Wachstums- oder auch Leistungsförderer bezeichnete hierbei antibiotisch wirksame Stoffe, die in subtherapeutischer Dosierung bei Mastschweinen zur Verbesserung der Zunahmen und der Tiergesundheit führen und die nicht der veterinärmedizinischen Verschreibung bedurften. Der Vertrieb erfolgte durch die Futtermittelindustrie. Mitte der 80er Jahre ging die Vermeidung der Kreuzselektion auch als (rechtlich nicht verbindliches) Zulassungskriterium für Leistungsförderer innerhalb der Europäischen Union ein (EWG 87/153) – mit mäßigem Erfolg, wie die Erfahrungen mit den Leistungsförderern Avoparcin (kreuzselektierend für Vancomycin-Resistenz; KLARE et al., 1995) und Virginiamycin (kreuzselektierend für Streptogramin-Resistenz; WERNER et al., 1998) zeigten. Konsequenz war das jüngst (1/2006) in Kraft getretene Verbot aller bis dahin noch zugelassenen antibiotischen Leistungsförderer (EG 1831/2003).

Ein völliger Verzicht auf den therapeutischen Einsatz kreuzselektierender Wirkstoffe ist jedoch unmöglich, bedeutete dies doch, dass der Veterinärmedizin nur die als wirkungslos aufgegebenen Substanzen verblieben oder, im Umkehrschluss, dass wirksame Therapeutika der Humanmedizin vorenthalten würden. Stattdessen wurden der Tierärzteschaft Leitlinien für den Umgang mit Antibiotika an die Hand gegeben, die den Einsatz so genannter Reserve-Antibiotika (Wirkstoffe, deren Einsatz bestimmten, eng gefassten Indikationen innerhalb der Humanmedizin vorbehalten ist) streng begrenzen (BTK/ArgeVET, zitiert nach BUNDESTIERÄRZTEKAMMER, 2006). Eine Reihe von Reservesubstanzen bzw. Wirkstoffklassen ist für die Anwendung beim landwirtschaftlichen Nutztier nicht (mehr) zugelassen; insbesondere

der Verzicht auf ganze Wirkstoffklassen (z. B. Glykopeptide, Oxazolidinon) schützt vor Kreuz-, nicht aber vor Coselektion.

Seit einigen Jahren wird insbesondere der veterinärmedizinische Einsatz von Fluorquinolonen vor dem Hintergrund der Kreuzselektion kontrovers diskutiert (WHO, 1998).

2 Einsatz von Antibiotika in der Tierhaltung und Vorkommen von Tetracyklinen in Gülle

2.1 Einsatz von Antibiotika

Nach dem von LEVY 1997 eingeführten Begriff der „Selektionsdichte“ bedingen die Faktoren „Anwendungsmenge“ eines antibiotischen Wirkstoffes pro „Individuenzahl“ pro „geografisches Anwendungsgebiet“ maßgeblich die Selektion antibiotikaresistenter Keime. Kenntnis über die Anwendungsmenge antibiotisch wirksamer Substanzen ist somit essentiell für die epidemiologische Betrachtung der Antibiotikaresistenz, jedoch nicht einfach zu erlangen, da ein systematisches Verbrauchsmonitoring im Veterinärbereich bislang nicht etabliert ist.

Die Einsatzmengen an Antibiotika hängen vor allem von der Tierart ab: Nach Untersuchungen von RASSOW und SCHAPER (1996) wurden im Weser-Ems-Gebiet 75 % der Herstellungsaufträge für Schweine, 24 % für Geflügel und nur 1 % für Rinder und sonstige Tierarten erteilt. Nach GRAFE (2000) entfielen für dieses Gebiet sogar 90 % aller Herstellungsaufträge auf die Schweinehaltung. Auch Untersuchungen von UNGEMACH (2000) zeigen, dass der größte Anteil der verbrauchten Antibiotika in der Schweine- und Geflügelhaltung eingesetzt wird, nur 1 % werden für weitere Nutztiere verwendet.

Hohe Einsatzmengen zieht der metaphylaktische Einsatz bei Bestandsbehandlungen nach sich. Einfluss auf die Einsatzhäufigkeit und -menge bestimmter Substanzen hat auch deren Eignung zur oralen Applikation. Antiinfektiva können so arbeitstechnisch einfach über das Futter oder Tränkwasser verabreicht werden (UNGEMACH, 2000).

Über die eingesetzten Wirkstoffgruppen gibt es keine detaillierten Daten für das gesamte Bundesgebiet, Erhebungen der FEDESA (1998, vgl. Tabelle 2) und Untersuchungen aus Niedersachsen von WINCKLER und GRAFE (2000) bestätigen aber Ergebnisse von RASSOW und SCHAPER (1996), wonach Tetracykline die am häufigsten eingesetzte Verbindungsklasse darstellen.

Erhebungen von GRAFE (2000) geben detaillierte Angaben zum Antibiotika-Einsatz bei Schweinen, gemessen an den Reinstoffmengen der einzelnen Wirkstoffe in tierärztlichen Herstellungsaufträgen, unterschieden nach Ferkeln, Sauen und Mastschweinen. So wurden bei Mastschweinen die größten Mengen an Tetracyklinen (v. a. Chlortetracyklin und Tetracyklin) eingesetzt. Bei den Sulfonamiden zeigt sich ein ähnliches Bild. Hier wurden Sulfadiazin- und Sulfamethazin-Präparate v. a. für Mastschweine am häufigsten in Auftrag gegeben.

Tabelle 2: Veterinärmedizinischer Einsatz von Antibiotika in Europa *

| | | |
|--------------------------------|---------------|---------------|
| Therapie | 3493 t (1997) | 3902 t (1998) |
| Futterzusatzstoff | 1599 t (1997) | 786 t (1998) |
| Wirkstoffgruppen/Mengen (1997) | [t] | [%] |
| Tetrazykline | 2294 | 66 |
| Makrolide | 424 | 12 |
| β -Laktame | 322 | 10 |
| Aminoglykoside | 154 | 4 |
| Sulfonamide/Trimethoprim | 75 | 2 |
| Fluorquinolone | 43 | 1 |
| Sonstige | 182 | 5 |

* FEDESA (1998)

2.2 Vorkommen von Tetrazyklinen in Schweinegülle

Gülle stellt in der Landwirtschaft eine bedeutende Ressource in der Düngung dar. In Bayern fallen jährlich 42,4 Mio. Tonnen an, davon 7,8 Mio. Tonnen Schweinegülle (SCHWAB & DÖHLER, 2000). Untersuchungen von LANGHAMMER (1989) zum Verbleib antimikrobiell wirksamer Arzneistoffe zeigten, dass diese Verbindungen unverändert oder zum Teil metabolisiert ausgeschieden werden. Ein Güllescreening (n = 181) in Nordrhein-Westfalen von GRAFE (2000) ergab für den Nachweis von Tetrazyklinen 43 positive Befunde in Konzentrationen zwischen 0,6 mg/kg (Bestimmbarkeitsgrenze) und 66 mg/kg.

In Analysen von HAMSCHER et al. (2000 a, b; 2002) konnte Chlortetrazyklin in Gülle mit Konzentrationen bis zu 1 mg/kg bestimmt werden, Tetrazyklin wurde in Konzentrationen bis zu 4 mg/kg detektiert. ENGELS (2004) konnte in Gülleproben aus dem Weser-Ems-Gebiet (n = 168, 1999/2000; n = 176, 2000/2001) in zahlreichen Proben Tetrazykline (Tetrazyklin: ca. 50 % positive Befunde) in Konzentrationen bis zu 46 mg/kg bestimmen. Sulfonamide (Sulfamethazin und Sulfadiazin) konnten in Konzentrationen bis zu 235 mg/kg nachgewiesen werden.

3 Keimflora in Schweinegülle

Die Keimflora der Gülle unterscheidet sich von der Fäkalflora der Tiere: Zum einen fließen neben den ausgeschiedenen Fäkalkeimen auch weitere Bestandteile der so genannten Stallkeimflora (MEHLHORN, 1985) in Form von schwebfähigen und sedimentierenden Keim-Aerosolen ein, zum anderen favorisieren die vom Darm-Milieu lagerungsabhängig abweichenden Umweltbedingungen in der Gülle andere Keime. COTTA et al. (2003) ermittelten ein Verhältnis der kultivierbaren zur nicht-kultivierbaren Flora von 20 : 80 in Gülle und 5 : 95 in Faeces. Die Autoren nehmen in Gülle eine Dominanz anaerober Keime an. In vergleichenden Untersuchungen von Schweine-Faeces und -Gülle derselben Farm unter anaeroben Anzucht-Bedingungen fanden sie in beiden Materialien grampositive (obligate und fakultative) Anaerobe vorherrschend (*Clostridium spp.*, Laktobazillen, *Streptococcus spp.*). Während jedoch in Faecesproben eine breitere Verteilung der identifizierten Isolate auf diverse

Keimspezies gefunden wurde, hatte in der Gülle eine gewisse zahlenmäßige Fokussierung auf Bakterien der phylogenetischen *Clostridium coccooides*-Gruppe sowie *Enterococcus*-Gruppe stattgefunden (COTTA et al., 2003).

LESER et al. (2002) fanden in der Darmflora von 24 Schweinen mittels phylogenetischer Methoden innerhalb eines ungemein breiten Bakterienspektrums eine relative Vorherrschaft verschiedener anderer Bakterien (2 bis 8 % der gefundenen Klone): Darunter waren eng verwandte Arten zu *Streptococcus alactolyticus*, *E. coli*, *Fusobacterium prausnitzii* und mehreren *Lactobacillus*-Arten (*Lb. amylovorus*, *Lb. johnsonii*, *Lb. reuteri*).

Die Entwicklung des Keimmilieus in Gülle während der Lagerzeit ist abhängig von den Lagerungsbedingungen. LEUNG und POPP sahen in einem Lagerzeitraum von 50 Tagen mittels kulturunabhängiger Verfahren keinen Rückgang der Gesamtkeimzahl, wohl aber in belüfteten Gülleproben eine Verschiebung der Spezies: Dominierten zu Beginn des Lagerversuches bei Untersuchungen mittels Denaturierender-Gradient-Gelelektrophorese Clostridien-Arten sowie *Pedobacter* und *Rhodanobacter spp.*, so zeigten sich im weiteren Verlauf unter Belüftung *Bacillus thuringiensis* und Sphingobakterien vorherrschend, während in unbelüfteten Proben keine Verschiebungen festgestellt wurden (LEUNG & POPP, 2001).

Abgesehen vom physiologischen Keimbesatz finden sich gegebenenfalls auch Pathogene, wie *Salmonella spp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter spp.* wieder (ATWILL, 1999). Diese scheinen jedoch in Gülle eine vergleichsweise geringe Tenazität zu besitzen. So beträgt die 90 %-Absterberate von Salmonellen in Gülle nach Untersuchungen von JONES (1980) nur 14 bis 28 Tage.

C Material und Methoden

1 Überblick über den Untersuchungsgang

Die bakteriologische und molekularbiologische Untersuchung der Gülle umfasst folgende Punkte:

- Keimzahlbestimmung
- Salmonellennachweis
- Isolierung ausgewählter Keime und deren Identifizierung auf Gattungs- bzw. Speziesebene
- Resistenztest dieser Isolate mittels Micronaut-System
- DNA-Extraktion aus Feldgülle (und güllebehandelten Bodenproben) und Real-time-PCR zur Detektion relevanter Resistenzgene

Einen Überblick über die verschiedenen Untersuchungsschritte gibt Abbildung 5.

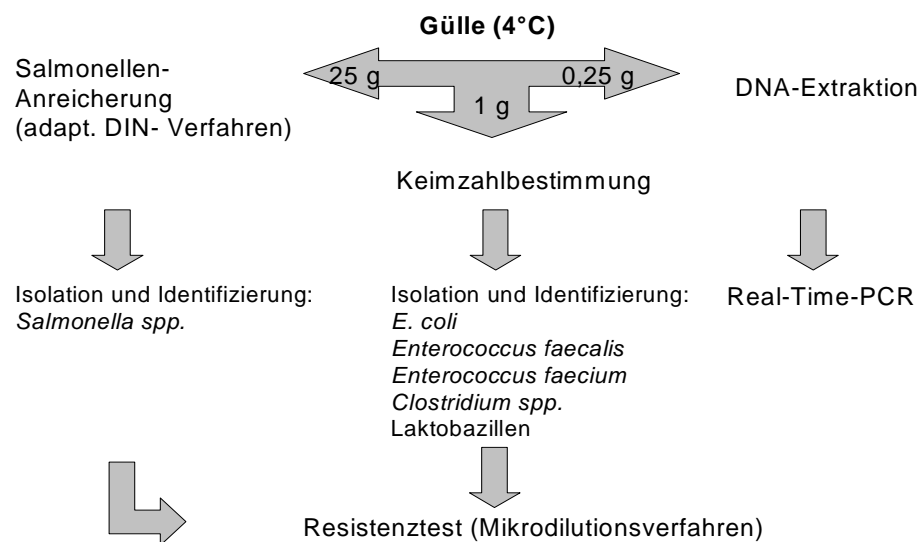


Abbildung 5: Überblick über das Untersuchungsprogramm

2 Mikrobiologisch-kulturelle Untersuchungen

2.1 Material

2.1.1 Labormaterial

Referenzstämme

| | |
|-----------------------------------|------------------------|
| <i>Enterococcus avium</i> | DSM ¹ 20679 |
| <i>Enterococcus casseliflavus</i> | DSM 20680 |
| <i>Enterococcus durans</i> | DSM 20633 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | DSM 2570 |
| <i>Enterococcus faecium</i> | DSM 20477 |
| <i>Enterococcus gallinarum</i> | DSM 20628 |
| <i>Enterococcus hirae</i> | DSM 20160 |
| <i>Enterococcus villorum</i> | DSM 15688 |
| <i>Escherichia coli</i> | DSM 1103 |

Trockennährmedien

| | |
|--|---------------------------|
| Agar Bacteriological | Oxoid LP011B ² |
| Blutagarbasis („Normalagar“) | Oxoid CM271B |
| CATC-Agar | VWR 1.10279 |
| Fluorocult | VWR 1.04038.0500 |
| Gassner-Agar | VWR 101282 |
| Gepuffertes Peptonwasser: | |
| Pepton aus Casein | VWR 102239 (50g/5l) |
| NaCl (25 g/5l) | VWR 106400 |
| Na ₂ PO ₄ (17,85 g/5l) | VWR 1.06586.0520 |
| KH ₂ PO ₄ (7,5 g/5l) | VWR 104873 |
| MRS-Agar | Oxoid CM361B ² |
| MRS-Bouillon | VWR 1.10661 ² |
| Müller-Hinton-II-Bouillon (kationenadjustiert) | BD 212322 |
| Nutrient-Broth | Oxoid CM67 |
| Rappaport-Vassiliadis-Medium | VWR 1.10236 |
| Schädler-Agar | BD 212189 |
| Wilkins-Chalgren-Anaerobe-Broth | Oxoid CM 643B |
| XLT4-Agar | VWR 1.13919 |

¹ Stämme der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ

² Grundbestandteile des LAMVAB-Agars nach HARTEMINK et al. (1997)

Agarzusätze

Zu Blutagar:

| | |
|------------------------|-------------|
| Schafblut (100ml/1,5l) | Fiebig 1100 |
|------------------------|-------------|

Zu CATC:

| | |
|-----------------------------------|-----------------------|
| Na ₂ CO ₃ | Fluka 71350 (2 g/l) |
| 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid | VWR 1.108380 (10 g/l) |
| Natriumazid | VWR 106688 (0,4 g/l) |

Zu LAMVAB:

| | |
|------------------|------------------------|
| Cystein HCl | VWR 102839 0,25 g/l) |
| Bromokresol-Grün | Sigma B 6771 (25 mg/l) |
| Vancomycin Sigma | V 2002 (10 mg/l) |

Zu Schädler:

| | |
|------------------------|-----------------------|
| Vitamin K1 | Fluka 95271 (10 mg/l) |
| Schafblut (100 ml/ 3l) | Fiebig 1100 |
| Ethanol | VWR 100983 (100 ml/l) |

Zu XLT4:

| | |
|------------------|------------------------|
| Supplementlösung | VWR 1.08981 (4,6 ml/l) |
|------------------|------------------------|

Zu Nutrient Broth (Cryokonservierung):

| | |
|--------------------|------------------|
| Glycerin (15 ml/l) | VWR 1.04092.2500 |
|--------------------|------------------|

Zu MRS-Bouillon (Cryokonservierung):

| | |
|--------------------|------------------|
| Glycerin (20 ml/l) | VWR 1.04092.2500 |
|--------------------|------------------|

Chemikalien und biochemische Differenzierung

| | |
|---|------------|
| Katalasereagenz: 30 % H ₂ O ₂ | VWR 108597 |
|---|------------|

Oxidasereagenz:

| | |
|--|--|
| N,N,N',N',Tetramethyl-phenylendiamindihydrochlorid | |
|--|--|

| | |
|------------------------------|-------------------|
| Indolreagenz: Kovacs-Reagenz | VWR 1.0929300.100 |
|------------------------------|-------------------|

| | |
|-----------------|-----------|
| BBL Crystal ANR | BD 245010 |
|-----------------|-----------|

| | |
|-----------------|-----------|
| BBL Crystal ENF | BD 245000 |
|-----------------|-----------|

| | |
|----------------|-----------|
| BBL Crystal GP | BD 245140 |
|----------------|-----------|

| | |
|--------------|-------------------|
| Rapid ID 32A | Biomérieux 32 300 |
|--------------|-------------------|

Verbrauchsmaterialien

| | |
|-------------------------|-------------------|
| Pipettenspitzen 1000 µl | Merlin L3-487-500 |
|-------------------------|-------------------|

| | |
|-------------------------|---------------|
| Pipettenspitzen 1000 µl | Sarsted 70762 |
|-------------------------|---------------|

| | |
|--------------------|----------------|
| 1-Kanal-Reservoirs | Merlin R-4-510 |
|--------------------|----------------|

| | |
|--------------|---------------|
| Cryoröhrchen | Brand 4791203 |
|--------------|---------------|

| | |
|------------------|--------------|
| Kunststoffperlen | Bastelbedarf |
|------------------|--------------|

| | |
|--------------|-----------------|
| Objektträger | Heiland 380-385 |
|--------------|-----------------|

| | |
|--------------------------------|---------------------------------------|
| Kunststoffröhrchen | Greiner |
| 1 ml | 121279 |
| 15 ml | 188271 |
| 50 ml | 227261 |
| Anaerocult | VWR |
| A | 1.16819.0001 |
| IS | 1.13829.0001 |
| Resistenztest-Panels | Merlin/ Virotech |
| GP I und GP II | M/ ES 182-100 und 183-100 |
| GN I und GN II | M/ ES 184-100 und 185-100 |
| Geräte | |
| Brutschränke | Memmert |
| 37 °C | 781704 |
| 30 °C | 850750 |
| 42 °C | 485031 |
| Sterilbank | Antair BSK (Typ BSK/6) |
| Merlin Micronaut [®] | Merlin ST-6-001-001 |
| Micronaut [®] Scan | Thermo Labsystems (Model 352) |
| Pipettus accu-jet [®] | Brand 26300 |
| Vortex Reax 2000 | Heidolph 54119 |
| Photometer | Shimadzu Corporation (Typ UV 1202) |

2.1.2 Untersuchungsmaterial

Untersuchungsmaterial der mikrobiologisch-kulturellen Untersuchungen waren Gülleproben aus bayerischen Schweinehaltungen zum Zeitpunkt des Ausbringens. Die Probennahme der Praxisgülle erfolgte im Rahmen eines bayernweiten Güllemonitorings in schweinehaltenden Betrieben. Hierzu wurde zurückgegriffen auf die InVeKoS-Datei des Institutes für Ländliche Strukturentwicklung, Betriebswirtschaft und Agrarinformatik (ILBA) der Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL). Die Auswahl erfolgte nach Vorgaben des Fachgebietes für Biometrische Methoden in der Tierzucht, TUM.

Berücksichtigt wurden ausschließlich Betriebe, deren Bestand zu mehr als 2/3 der Gesamt-Großvieheinheiten aus Schweinen besteht.

Die Kriterien zur Größeneinordnung innerhalb der einzelnen Betriebstypen zeigt Tabelle 3.

Tabelle 3: Kriterien zur Einordnung der Betriebstypen in zwei Größenklassen

| Betriebstyp | „klein“ | „groß“ |
|--------------------|------------------|-----------------|
| Zuchtbetrieb | 10–45 Zuchtsauen | > 45 Zuchtsauen |
| Mastbetrieb | 30–220 Masttiere | > 220 Masttiere |
| Gemischter Betrieb | 7–30 Zuchtsauen | > 30 Zuchtsauen |

Zuchtbetriebe unter 10 Zuchtsauen, Mastbetriebe mit weniger als 30 Masttieren und gemischte Betriebe unter 7 Zuchtsauen wurden aus dem Datenbestand eliminiert.

Die Zufallsstichprobe wurde separat für jeden Typ jeder Größe in jedem Regierungsbezirk gezogen. In Gesamtbayern sollten letztlich aus jedem Betriebstyp jeder Größenklasse gleich viele Betriebe beprobt werden. Die Regierungsbezirke sollten dabei gemäß ihrer Viehstärke vertreten sein.

Das Güllemonitoring wurde anonym durchgeführt: Die Betriebe waren im Oktober 2002 angeschrieben worden; 170 der 906 Betriebsinhaber machten von der Möglichkeit Gebrauch, der Beprobung – auch ohne Angabe von Gründen – zu widersprechen. Wurden Gründe für eine Absage genannt, handelte es sich insbesondere bei kleinen Betrieben häufig um Festmisthaltung (hierzu waren keine Angaben in der InVeKoS-Datei enthalten gewesen) oder die Betriebsaufgabe seit der letzten InVeKoS-Erhebung. Eine Reihe von Betrieben hatte des Weiteren ihre Gülleausbringung im Herbst bereits abgeschlossen oder gar nicht vorgesehen.

Da die Beprobung (auch aus Gründen der Anonymisierung) durch den Landwirt selbst vorgenommen werden sollte, wurden an 736 Betriebe Probengefäße mit Hinweisen zur Probennahme und Probenbegleitschein-Formulare gesendet. Im Probenbegleitschein waren neben der Einteilung nach Betriebsart und -größe zusätzlich nur die Landkreise erfasst. Die Entnahme der Gülle zum Zeitpunkt des Ausbringens (nach dem Aufrühren) wurde erbeten.

Über 50 % der mit der Probennahme betrauten Landwirte sandten Proben ein (n = 376). In den zahlenmäßig gegenüber den statistischen Vorgaben unterrepräsentierten Bezirken wurde im Frühjahr 2003 ein zweiter Beprobungsdurchgang initiiert, der 109 weitere Proben lieferte. Nach Aussonderung nicht geeigneter Proben (nicht aufgeführte Gülle, Jauche, unvollständige Angaben im Probenbegleitschein) verblieben insgesamt

380 Gülleproben zur Untersuchung. Alle Gülleproben durchliefen eine Untersuchung auf das Vorkommen von *Salmonella spp.* 306 der 380 Proben (198 aus dem Herbst, 105 aus dem Frühjahr) wurden den weiterführenden bakteriologischen Untersuchungen unterzogen. Die Aufteilung dieser Proben auf die verschiedenen Betriebsarten und -größen zeigt Abbildung 6.



Abbildung 6: Aufteilung der Gülleproben aus Schweinehaltungen nach Betriebsart und -größe

Die drei untersuchten Betriebsarten sind annähernd in derselben Zahlenstärke repräsentiert. Hingegen ergibt sich jeweils ein Übergewicht der großen Betriebe (2/3 der Probenmenge bzw. der bakteriologisch untersuchten Gülleproben) aus der höheren Zahl der Absagen kleiner Betriebe (die häufiger Festmisthaltung betreiben).

2.2 Methoden

2.2.1 Auswahl der Testparameter

Auswahl der Bakterien

Entscheidend für die Auswahl der Bakterien war neben der Repräsentanz wichtiger Keimgruppen aus der Gülle die Neigung der Keime zur Entwicklung oder Annahme neuer Resistenzen. Darüber hinaus sollten die Bakterien Bedeutung für die Human-gesundheit haben, sei es aufgrund ihrer Pathogenität oder als Teil der physiologischen Darmflora.

Stellvertretend für das Keimspektrum der Gülle wurden fünf Erregergruppen ausgewählt. Es sind dies *Escherichia coli* und *Salmonella spp.* für die gramnegative Flora

sowie *Enterococcus spp.* (mit besonderer Berücksichtigung von *E. faecalis* und *E. faecium*), Laktobazillen und *Clostridium spp.* für die grampositive Flora.

Aufgrund ihrer Fähigkeit zur raschen Ausbildung neuer Resistenzen gelten *E. coli* und Enterokokken als Indikator- bzw. Reservoirkeime und sind nach den Empfehlungen der Office International des Epizooties (OIE; FRANKLIN et al., 2001) und der World Health Organisation (WHO, 1997) regelmäßig in Resistenzuntersuchungen einzubeziehen. Wie diese sind auch Laktobazillen und einige *Clostridium spp.* in der Lage, den menschlichen Darm zu kolonisieren (HOLZAPFEL et al., 1998). Die OIE empfiehlt neben der Überwachung solcher Kommensalen die Einbeziehung von Zoonoseerregern und tierpathogenen Bakterien. Als Zoonoseerreger wie auch gleichzeitig als tierpathogen werden *Salmonella spp.* und bestimmte *E. coli* (EHEC/ETEC) eingestuft (FRANKLIN et al., 2001).

Auswahl der Antibiotika

Ausgewählt wurden in erster Linie humanrelevante Antibiotika, insbesondere Standard- und Reserve-Antibiotika. Ergänzt wird diese Liste durch ausgewählte veterinärmedizinische Antibiotika. Dies sind in erster Linie oral anwendbare Präparate, wie sie zur Bestandsbehandlung verwendet werden. Die Auswahl der Antibiotika orientiert sich über diese Grundkriterien hinaus, der Vergleichsdaten wegen, an bestehenden Resistenzüberwachungsprogrammen. Richtungweisend war hier, neben der dänischen DANMAP-Studie 2001 (Nutztierbereich; DANMAP 2001), vor allem das deutschlandweite GENARS-Projekt (HUPPERTZ & WIEDEMANN, 2000). Hierbei handelt es sich um eine Kooperation medizinisch-mikrobiologischer Laboratorien, die seit 1998 kontinuierliche Resistenztests an ihrem gesamten humanklinischen Probenmaterial vornehmen und deren Ergebnisse zentral erfassen.

In Abstimmung mit wissenschaftlichen Beratern der Firma Merlin wurden die Resistenztest-Panels gemäß den spezifischen Anforderungen des Projektes belegt. Die ausgewählten Antibiotika, gekennzeichnet nach Anwendungsbereich, sowie die untersuchten Konzentrationsbereiche und angewandten Breakpoints finden sich in Tabelle 4.

Tabelle 4: Untersuchte Antibiotika mit Konzentrationsbereichen und Breakpoints

| Wirkstoffgruppe (Kürzel) | Wirkstoff | Kürzel | Anwendung | Beschränkung empfohlen (Reserve-AB)* | Untersucher Konzentrations- bereich | Panel** | S(≤) | R(>) | Quelle für Breakpoint |
|--------------------------------------|---------------------------|--------|-----------|--|---|----------|-------|------|--------------------------|
| β-Laktame a) Penicilline (PEN) | Amoxicillin/Clavulansäure | AMC | hum + vet | nein | 0,125/2–8/2 1/2–128/2 | GP GN | 2/2 | 8/2 | DIN |
| | Ampicillin | AMP | hum + vet | nein | 0,125–16 1–128 | GP GN | 2 | 8 | DIN |
| | Mezlocillin | MZL | hum | ja | 2–256 | GP | 4 | 16 | DIN |
| | Oxacillin | OXA | hum + vet | nein | 0,25–32 | GP | 1 | 1 | DIN |
| | Penicillin G | PEN | hum + vet | nein | 0,03125–4 | GP | 0,125 | 1 | DIN |
| | Piperacillin | PIP | hum | ja | 1–128 | GN | 4 | 32 | DIN |
| | Piperacillin + Tazobactam | PIT | | | 1/4–128/4 | | | | |
| b) Cephalosporine (CEF) | Cefaclor | CEC | hum | nein | 1–8 | GN | 1 | 4 | DIN |
| | Cefazolin | CEZ | hum + vet | nein | 0,125–16 | GP | 4 | 8 | DIN |
| | Cefepim | CEP | hum | nein | 2–16 | GN | 4 | 16 | DIN |
| | Cefotaxim | CTX | hum | nein | 0,25–32 | GN | 2 | 8 | DIN |
| | Cefotaxim + Clavulansäure | C/C | | | 0,254/4–2/4 | | | | |
| | Cefoxitin | COX | hum | nein | 2–16 | GN | 4 | 8 | DIN |
| | Ceftazidim | CAZ | hum | nein | 0,25–32 | GN | 4 | 16 | DIN |
| Ceftazidim + Clavulansäure | CZC | | | 0,25/4–2/4 | –*** | | | | |

* Quelle: verschiedene Klinikleitfäden und Ärztekammermitteilungen; der Grund der Einstufung einzelner Substanzen als „Reserveantibiotikum“ ist uneinheitlich: teils bezeichnet der Begriff therapeutisch besonders wichtige Substanzen, die in Therapielücken greifen (z.B. Glykopeptide bei multiresistenten Enterokokken), teils aber auch Substanzen, die aufgrund ihrer toxischen Nebenwirkungen nicht mehr routinemäßig eingesetzt werden (z.B. Chloramphenicol)

** GP: für grampositive Keime, GN: für gramnegative Keime

***die Kombinationen der Cephalosporine Cefotaxim und Ceftazidim mit Clavulansäure dienen der Detektion von ESBL- (Extended Spectrum β-Lactamase) Bildnern. Eigene Breakpoints sind daher nicht definiert

Fortsetzung Tabelle 4: Untersuchte Antibiotika mit Konzentrationsbereichen und Breakpoints

| Wirkstoffgruppe (Kürzel) | Wirkstoff | Kürzel | Anwendung | Beschränkung empfohlen (Reserve-AB)* | Untersucher Konzentrations- bereich | Panel** | S(\leq) | R(>) | Quelle für Breakpoint |
|--|-----------------|-----------|-----------|--|---|------------|-------------|-------------|--------------------------|
| Fortsetzung Cephalosporine (CEF) | Ceftiofur | CET | vet | nein | 0,5–8 | GN | 4 | 4 | Danmap 2004 |
| | Cefuroxim | CXM | hum | nein | 0,5–64 1–8 | GN GP | 4 | 8 | DIN |
| c) Carbapeneme (CBP) | Imipenem | IMP | hum | ja | 0,125–16 | GP + GN | 2 | 4 | DIN |
| | Meropenem | MER | hum | ja | 0,125–16 | GN | 2 | 8 | DIN |
| Aminoglykoside (AGL) | Amikacin | AMK | hum | ja | 2–16 | GN | 4 | 16 | DIN |
| | Apramycin | APR | vet | nein | 4–64 | GN | 16 | 16 | Danmap 2004 |
| | Gentamicin | GEN | hum + vet | nein | 0,25–16 | GP | 1 | 4 | DIN |
| | | | | | 0,25–32 | GN | | | |
| | Gentamicin high | GNH | hum + vet | nein | 512 | GP | 512 | 512 | Danmap 2004 |
| | Kanamycin | KAN | hum + vet | nein | 8–64 | GP | 32 | 32 | Danmap 2002 |
| | Neomycin | NEO | hum + vet | nein | 2–32 | GP | 8 | 8 | Danmap 2004 |
| | Spectinomycin | SPE | vet | nein | 16–128 | GN | 64 | 64 | Danmap 2004 |
| | Streptomycin | STR | hum + vet | nein | 4–64 | GN | 16 | 16 | Danmap 2004 |
| Streptomycin high | SNH | hum + vet | nein | 256–2048 | GP | 1024 | 1024 | Danmap 2004 | |
| Tobramycin | TOB | hum | nein | 0,25–32 | GN | 1 | 4 | DIN | |
| Fenicole (FEN) | Chloramphenicol | CMP | hum | ja | 2–64 | GP + GN | 16 | 16 | Danmap 2004 |
| | Florfenicol | FLL | vet | nein | 2–32 2–64 | GP GN | 16 | 16 | Danmap 2004 |

Fortsetzung Tabelle 4: Untersuchte Antibiotika mit Konzentrationsbereichen und Breakpoints

| Wirkstoffgruppe (Kürzel) | Wirkstoff | Kürzel | Anwendung | Beschränkung empfohlen (Reserve-AB)* | Untersucher Konzentration s-bereich | Panel** | S(\leq) | R(>) | Quelle für Breakpoint |
|--|--|-------------------------------|-----------|--|---|----------|-------------|------|--------------------------|
| Fluorquinolone (FQL) | Ciprofloxacin | CIP | hum | ja | 0,25–32 | GP | 1 | 2 | DIN |
| | Enrofloxacin | ENR | vet | (ja) | 0,0625–8 | GP + GN | 0,25 | 2 | NCCLS |
| | Moxifloxacin | MOX | hum | ja | 0,0625–8 | GP | 1 | 2 | DIN |
| Glycopeptide (GPT) | Teicoplanin | TEI | hum | ja | 0,25–32 | GP | 8 | 16 | NCCLS |
| | Vancomycin | VAN | hum | ja | 0,5–64 | GP | 4 | 8 | DIN |
| Makrolide (MLD) | Erythromycin | ERY | hum + vet | nein | 0,0625–8 | GP | 1 | 4 | DIN |
| | Tylosin | TYL | vet | nein | 0,5–4 | GP | 4 | 4 | Danmap 1997 |
| Lincosamide (LCA) | Clindamycin | CLI | hum | nein | 0,0625–8 | GP | 1 | 4 | DIN |
| Oxazolidinone (OZD) | Linezolid | LIZ | hum | ja | 0,125–16 | GP | 2 | 4 | Hersteller |
| Potenzierte Sulfon- amide (SUL/TRI) | Sulfamethoxazol/ Trimethoprim (Cotrimoxazol) | SXT | hum + vet | nein | 8–64 1–128 | GP GN | 16 | 64 | DIN |
| | Streptogramine (STG) | Quinupristin/ Dalfopristin | SYN | hum | ja | 0,125–16 | GP | 1 | 2 |
| Tetrazykline (TET) | Doxycyclin | DOX | hum + vet | nein | 0,125–16 0,5–4 | GP GN | 1 | 4 | DIN |
| Andere | Fosfomycin | FOS | hum | ja | 8–64 | GP | 32 | 32 | SFM |
| Andere | Metronidazol | MTR | hum | nein | 4–32 | GP | 4 | 4 | DIN |
| Andere | Nitrofurantoin | NFT | hum | ja | 32–256 | GP | 64 | 256 | DIN |
| Andere | Rifampicin | RAM | hum | ja | 0,5–4 | GP | 1 | 2 | NCCLS |
| Andere | Colistin | COL | hum + vet | nein | 2–64 | GN | 8 | 8 | Danmap 2004 |
| | | | | | | | 0,5 | 2 | DIN |

2.2.2 Probenaufbewahrung

Aus dem Probengesamtvolumen (1 l) wurden nach mechanischer Durchmischung (Schwenken) 25 ml-Aliquots in industriereine Falcon-Tubes überführt. Der Arbeitsgang wurde so gestaltet, dass eine gegenseitige Kontamination der Gülleproben ausgeschlossen werden kann. Die Gülleproben zur bakteriologischen Untersuchung wurden bis zu ihrer Analyse bei 4–8 °C eingelagert; Aliquots zur PCR-Untersuchung lagerten bei –20 °C.

2.2.3 Keimzahlbestimmung

Der Keimgehalt der Gülle wurde mit dem Oberflächen-Spatel-Verfahren in Anlehnung an GEDEK (1974) bestimmt. Dabei wurden die in Tabelle 5 aufgelisteten Nährmedien eingesetzt.

Zur quantitativen Untersuchung wurde 1 g Gülle in 9 ml physiologischer NaCl-Lösung suspendiert und daraus unter häufiger Durchmischung eine Verdünnungsreihe mit Faktor 1:10 von 10^0 bis 10^{-11} erstellt. 0,1 ml der jeweiligen Verdünnungsstufen (vgl. Tabelle 5) wurden anschließend im Oberflächen-Spatel-Verfahren auf die verschiedenen Nährböden aufgebracht.

Nach 48-stündiger Inkubation bei 37 °C wurden je Gülle und Nährbodenart zwei Platten aufeinander folgender Verdünnungsstufen mit Koloniezahlen zwischen 1 und 200 ausgezählt und, nach Multiplikation mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor, der Mittelwert beider Platten als durchschnittlicher Keimgehalt der Gülle berechnet. Keimzahlen werden angegeben in koloniebildenden Einheiten, abgekürzt KBE.

Tabelle 5: Zur Keimzahlbestimmung verwendete Nährmedien

| Parameter | Verwendeter Agar | Verdünnungsstufen |
|--------------------------|------------------|--------------------------|
| Aerobe Gesamtkeimzahl | Blutagar | 10^{-4} bis 10^{-11} |
| Anaerobe Gesamtkeimzahl | Schaedler-Agar | 10^{-4} bis 10^{-11} |
| Enterobacteriaceae | Gassner-Agar | 10^{-1} bis 10^{-7} |
| <i>Enterococcus spp.</i> | CATC-Agar | 10^{-1} bis 10^{-7} |
| „Laktobazillen“ | LAMVAB-Agar | 10^{-2} bis 10^{-8} |

2.2.4 Keimisolation und Keimidentifizierung

Sämtliche Zielkeime wurden nach der Keimzahlbestimmung von den entsprechenden Platten isoliert, subkultiviert und Differenzierungsreaktionen (siehe Tabelle 6) unterzogen.

Tabelle 6: Prüfschema zur orientierenden Differenzierung in Gülle vorkommender Bakterien

| Keim | Gram | Sporenbildner | Katalase | Oxidase | Indol |
|--------------------------|------|---------------|----------|---------|----------|
| <i>E. coli</i> | – | – | + | – | + |
| <i>Enterococcus spp.</i> | + | – | – | – | n. u. |
| <i>Salmonella spp.</i> | – | – | + | – | – |
| <i>Clostridium spp.</i> | + | + | – | – | + oder – |
| “Lactobazillen” | + | – | – | – | – |

n.u. = nicht untersucht

Anschließend verzweigt sich der Differenzierungsbaum unterschiedlich entsprechend der Keimart:

E. coli

Zur weiteren Differenzierung der *E. coli* dienen die Kriterien: Verstoffwechslung von Laktose (überprüft durch Anzucht auf Gassner-Agar) und – im Regelfall – die Verstoffwechslung von Sorbitol sowie ein positiver β -D-Glucuronidase-Nachweis auf Fluorocult-Agar.

Laktosepositive Stämme, die sich als Glucuronidase- und Sorbitol-negativ erwiesen, wurden im BBL-Crystal-ENF-System getestet, um die pathogene β -D-Glucuronidase- und Sorbitol-negative Variante *E. coli* O157:H7 gegebenenfalls zu erfassen.

Enterococcus spp.

Zur Differenzierung von *E. faecalis* und *E. faecium* wurden die in Tabelle 7 (modifiziert nach BEJUK, 2000) dargelegten biochemischen Leistungen geprüft. Die Tabelle stellt zugleich die Reaktionen weiterer Schweine-relevanter Enterokokken dar und erlaubt, diese in Gruppen zusammenzufassen.

Tabelle 7: Stoffwechselprofile von *Enterococcus faecalis* und *E. faecium* sowie von weiteren *E. spp.*

| Spezies | Xylose | Mannitol | Arabinose | Natrium-Pyruvat | Beim Schwein beobachtet von (beispielhaft) |
|---|--------|----------|-----------|-----------------|---|
| <i>E. faecalis</i> | - | + | - | + | DEVRIESE et al., 1994; DANMAP, 2004 |
| <i>E. faecium</i> | - | + | + | - | DEVRIESE et al., 1994 DANMAP, 2004 |
| <i>E. gallinarum</i> | + | + | + | - | MAC et al., 2003, TORRES et al., 2003 |
| <i>E. casseliflavus</i> (= <i>flavescens</i>) | + | + | + | - | MAC et al., 2003 |
| <i>E. hirae</i> | - | -(+) | - | - | DEVRIESE et al., 1994; KÜHN et al., 2003; CHOU et al., 2004 |
| <i>E. durans</i> | - | - | - | - | JACKSON et al., 2005 |
| <i>E. villorum</i> | + | - | - | - | VANCANNEYT et al., 2001 |
| <i>E. avium</i> | - | + | + | + | JACKSON et al., 2005 |
| <i>E. raffinosus</i> | ± | + | + | ± | nicht beschrieben* |

* Nachweis in einer Schweinefutter-Produktionseinheit: CHAPIN et al., 2005

Des Weiteren wurden alle Enterokokken mit Vancomycin-MHK-Werten ≥ 4 mg/l im BBL-Crystal-GP weiter differenziert, um die intrinsisch Low-Level-resistenten Spezies *E. gallinarum* und *E. casseliflavus* von solchen mit womöglich sekundär erhöhten MHK-Werten gegen Vancomycin abzugrenzen. *E. casseliflavus* kann – bei biochemisch identischen Profilen im BBL-Crystal – aufgrund seiner kräftig gelben Färbung auch von *E. gallinarum* unterschieden werden.

Unter Berücksichtigung der biochemischen Reaktionen aus Tabelle 7 zusammen mit morphologischen Merkmalen (vergleichsweise schwaches Wachstum auf CATC-Agar, hellrosa Färbung) kann zudem eine weitere Bakteriengruppe eingegrenzt werden, die in der weiterführenden Differenzierung mit dem BBL-Crystal – sofern durchgeführt – stets als *E. raffinosus* identifiziert und daher im Weiteren als „*E. raffinosus*-Gruppe“ bezeichnet wurde. Die genaue Identität dieser Gruppe ist unklar: Weder wurde *E. raffinosus* bislang beim Schwein beschrieben, noch wiesen die Isolate eine intrinsische Penicillin-Resistenz auf, wie sie als Unterscheidungsmerkmal zwischen *E. avium* und *E. raffinosus* vorgeschlagen wurde (GRAYSON et al., 1991). Da die biochemische Identifizierung der *Enterococcus spp.* unabhängig vom Testsystem insbesondere bei seltener auftretenden Spezies mit einer vergleichsweise hohen Irrtumswahrscheinlichkeit behaftet ist (HUDSON et al., 2003; HAMILTON-MILLER & SHAH, 1999), verspräche in solch zweifelhaften Fällen nur die Untersuchung mit molekularbiologischen Methoden Gewissheit. Die hier durchgeführte Differenzierung bleibt daher auf die Zuordnung zu einer Merkmalsgruppe beschränkt, ohne dass ein Anspruch auf tatsächliche Identifizierung auf Speziesebene erhoben wird.

Auch auf eine Differenzierung der übrigen *Enterococcus spp.* wurde verzichtet; *E. durans* und *hirae* werden aufgrund ihrer biochemischen Ähnlichkeit wie auch engen phylogenetischen Verwandtschaft zu einer gemeinsamen Gruppe zusammengefasst. *E. cecorum*, nach DEVRIESE (1994) ein häufiger Vertreter des Genus *Enterococcus* in der Intestinalflora des Schweines, wurde nicht erfasst, da diese Spezies einer erhöhten CO₂-Spannung in der Atmosphäre bedarf (BUSTAMANTE, 2003).

Clostridien

Auf Schaedler-Agar unter anaeroben Bedingungen wachsende Bakterien werden nach morphologischen Kriterien ausgewählt und unter aeroben Bedingungen subkultiviert. Als fakultativ aerob erkannte Keime werden ausselektiert (nicht jedoch Stämme der vergleichsweise aerotoleranten Spezies *Clostridium perfringens*), die verbleibenden in Verbindung mit den Resultaten aus Gram-Färbung und den Ergebnissen der Differenzierungsreaktionen (Tabelle 6) auf Gattungsebene als Clostridien identifiziert. Bei ausgewählten Exemplaren wurde diese morphologische Diagnose im BBL-Crystal-ANR-Test bestätigt.

Laktobazillen

Die Isolierung und Identifizierung von Laktobazillen erfolgt auf vancomycinhaltigem LAMVAB-Agar nach HARTEMINK et al. (1997) unter Berücksichtigung morphologischer Kriterien. Entsprechend den Angaben von HARTEMINK und ROMBOUITS (1999) werden alle säuretoleranten, geraden, sporenlösen grampositiven Stäbchen mit exprimierter Vancomycin-Resistenz als *Lactobacillus spp.* betrachtet. Wie für *Clostridium spp.* wurde diese morphologische Diagnose bei ausgewählten Isolaten im BBL-Crystal-ANR-Test bestätigt.

Salmonella spp.

Die Isolierung von Salmonellen erfolgt mittels Anreicherungsverfahren angelehnt an ISO 6579. Abweichend vom ISO-Verfahren wird auf die Verwendung eines zweiten Selektivnährbodens verzichtet. Salmonellen-verdächtige Kolonien wachsen auf XLT4-Agar pink bzw. pink mit schwarzem Zentrum und verursachen eine pinkfarbene Verfärbung des Nährbodens. Sie werden subkultiviert und nach Tabelle 6 getestet. Anschließend erfolgt eine erste Identifizierung mittels Objektträgerschnellagglutination: Eine Kolonie wird auf einem Objektträger jeweils in einen Tropfen polyvalentes Serum I und II eingerieben und unter Schwenken auf flockige Agglutinatbildung untersucht. Positive Isolate werden im biochemischen BBL-Crystal-ENF-Testsystem bestätigt und zur endgültigen Differenzierung an das Nationale Referenzzentrum für Salmonellen gesandt.

2.2.5 Cryokonservierung

Alle ausdifferenzierten Keime wurden der Cryokonservierung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ zugeführt. Alle Isolate mit Ausnahme der Laktobazillen wurden hierzu 24 Stunden bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ subkultiviert. Die Anzucht-Temperatur der Laktobazillen-Subkultur, die zur Cryokonservierung vorgesehen war, wurde auf $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgesenkt; MURGA et al. (2000) publizierten bei dieser Anzucht-Temperatur höhere Stabilität gegen Gefrier- und Tauprozesse. Die Überlebensrate erhöht sich weiter nach Anzucht bei $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Bei dieser Temperatur konnte jedoch in Vorversuchen kein befriedigendes Wachstum nach 48 Stunden erreicht werden. Als Medium wurde für alle Keime mit Ausnahme der Laktobazillen Nutrient Broth mit cryoprotektivem Glycerinzusatz gewählt; Medium für das Einfrieren der Laktobazillen war MRS-Bouillon mit Glycerin-Supplementierung.

2.2.6 Prüfung der Antibiotikaresistenz

Zur Prüfung der Antibiotikaresistenz der Bakterienisolate wurde die Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) mittels Mikrodilutionsverfahren herangezogen. Der Vergleich dieser MHK mit den z. B. vom Deutschen Institut für Normung festgelegten Breakpoints der Keime gegenüber dem jeweiligen Antibiotikum ermöglicht die Einstufung des Bakteriums als sensibel, intermediär oder resistent (DIN 5894-4/1; vgl. auch Punkt B1.3.1).

Zur besseren Standardisierung und um die Vergleichbarkeit der Daten mit solchen aus der Humanmedizin zu gewährleisten, wurde auf das Micronaut[®]-Testsystem zurückgegriffen. Zudem wurde als Nährmedium die zum GENARS-Projekt identische Charge kation-adjustierter Müller-Hinton-Bouillon verwendet. Die Testung erfolgte für *E. coli* sowie *Enterococcus faecalis/faecium* nach Herstellerangaben (entsprechend DIN 58940-81); Modifizierungen waren für die übrigen *Enterococcus spp.*, die Clostridien und die Laktobazillen nötig.

Standardtestverfahren: E.coli und Enterococcus faecalis/faecium

Von Übernachtskulturen auf Blutagar werden 3–5 Kolonien abgenommen und in physiologische NaCl-Lösung mit pH 5,9 bis 6,4 überführt. Die Suspension wird auf einen Trübungsgrad von McFarland 0,5 eingestellt. 50 μl (*E. coli*) bzw. 100 μl (*Enterococcus spp.*) werden zu 12 ml kation-adjustierter Müller-Hinton-Bouillon (CAMHB) der GENARS-Charge gegeben. Dies entspricht annähernd einer Keimkonzentration von 4×10^5 (*E. coli*) bzw. 8×10^5 (*Enterococcus spp.*) KBE/ml. Die visuelle Einschätzung der Trübung wird in regelmäßigen Abständen photometrisch überprüft.

Die derart hergestellte Suspension wird mittels eines Dispensierautomaten in die Kavitäten der vorbeschichteten Mikrotiterplatten überführt. Nach Versiegelung mit industriereinem Klebeband werden die Platten 18–24 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ bebrütet. Die beimpfte CAMHB wird nach dem Pipettiervorgang aus einer der Pipettenspitzen auf Blutagar ausgestrichen; diese Kontrollplatte dient zum einen der Reinheitskontrolle, zum anderen der semiquantitativen Kontrolle der Bakterienkonzentration.

Trübung zeigt Wachstum bei der jeweiligen Antibiotikakonzentration an. Im Falle der Enterokokken muss diese aufgrund des so genannten Trailing-Phänomens (hierunter versteht man ein Wachstum mit einer Intensität von bis zu 20 % der Positiv-Kontrolle in allen Kavitäten) im Bedarfsfall visuell kontrolliert werden. In den vorliegenden

Untersuchungen wurden alle *E. faecalis* und *E. faecium* visuell ausgewertet. Die Auswertung bei *E. coli* erfolgt auf photometrischer Basis mit dem Micronaut-Scan-System.

Adaptiertes Verfahren: *Enterococcus* spp., *Clostridium* spp. und Laktobazillen

Ein Problem stellt das Trailing-Phänomen insbesondere bei der Beurteilung anderer Enterokokkenspezies (sog. *Enterococcus nonfaecalis/nonfaecium*, kurz *E. nonfc.*) dar, da ihr Wachstum von CAMHB in manchen Fällen nur mangelhaft unterstützt wird und eine Abgrenzung zwischen Wachstum und Trailing nach der 20 %-Regel somit schwer möglich ist. Abhilfe konnte geschaffen werden durch die Verwendung von Hämophilus-Test-Medium HTM (CAMHB basiert und für die Resistenztestung von *Hämophilus* spp. empfohlen), das in Mehrfach-Reproduktionen mit dem oben aufgeführten *E. faecalis*-Stamm validiert und anschließend mit den entsprechenden *E. nonfc.*-DSM-Stämmen auf seine Eignung für die verschiedenen *E. nonfc.*-Spezies überprüft wurde. Die Inokulumserhöhung auf 100 μ l (nach Hersteller-Empfehlung für grampositive Organismen) brachte keine Verbesserung der Test-Performance; das errechnete und durch Keimzahlbestimmung überprüfte Inokulum lag oberhalb des DIN-Kontrollbereiches (DIN: $1-5 \times 10^5$; errechnet: 8×10^5).

Die In-vitro-Testung von Enterokokken ist in hohem Maße anfällig für Inokulumseffekte (FERNANDEZ-GUERRERO, 1987). Für die Herstellung der Inokulumkonzentration nach DIN wurden daher wie für gramnegative Organismen 50 μ l der McFarland-0,5-Suspension in die CAMHB überführt. Zur Messung der Inokulumkonzentration wurde mittels Photometer (Messung bei $\lambda = 480$ nm) eine Eichkurve erstellt: Eine Suspension mit visuell eingestellter Trübung entsprechend McFarland 1 wurde in eine Verdünnungsreihe überführt, die der Keimzahlbestimmung sowie der photometrischen Messung unterzogen wurde. Nach Keimzahlbestimmung wurde ein photometrischer Kontrollbereich mit einer Absorption von 0,03 bis 0,07 abgeleitet, innerhalb dessen eine Überschreitung der DIN-Vorgaben weitgehend ausgeschlossen werden konnte. Die Eichkurve, auf der die Festlegung des Kontrollbereiches beruht, zeigt Abbildung 7.

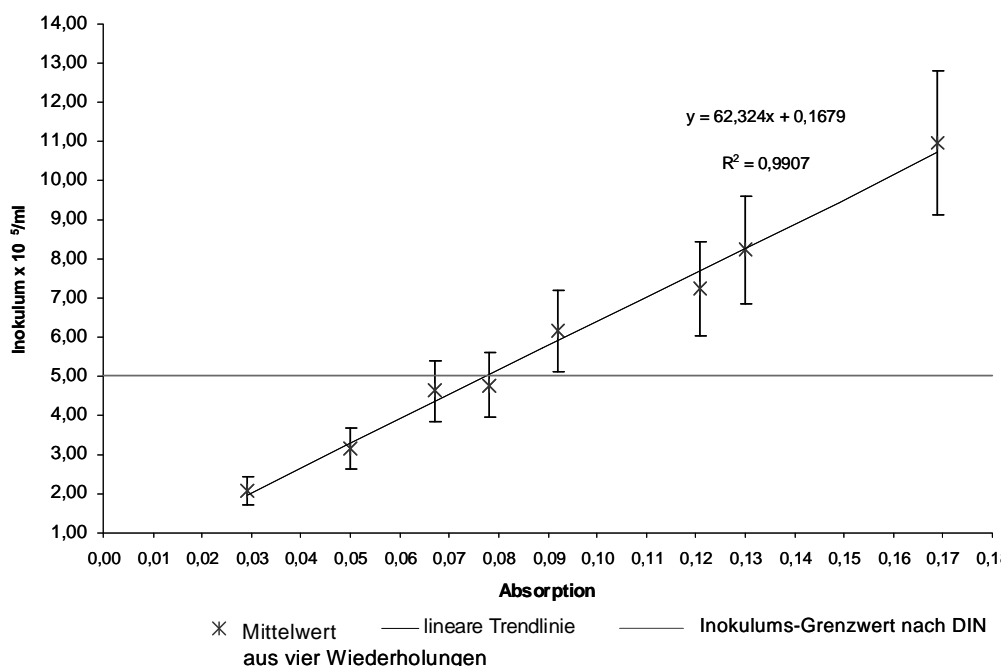


Abbildung 7: Eichkurve zur Bestimmung der Inokulumkonzentration bei *Enterococcus* spp.

Alle auf McFarland 0,5 voreingestellten Suspensionen wurden photometrisch auf das Einhalten der Konzentration innerhalb der DIN-Grenzen überprüft.

Die Auswertung der Test-Panels erfolgte mit dem Micronaut-Scan; im Bedarfsfall sowie stets bei Streptomycin-(High-Level)-Werten > 256 wurde visuell kontrolliert. Der Wirkstoff Streptomycin in High-Level-Konzentration bildet im verwendeten Medium häufig Luftblasen, die bei der Scan-Auswertung der entsprechenden Kavität zu falsch-positiven Ergebnissen führen.

Als Ausgangsmaterial für die Resistenztestung von Clostridien bzw. Laktobazillen dienen anaerob bebrütete Übernachtskulturen auf Schädler- (*Clostridium spp.*) bzw. MRS-Agar (Laktobazillen). Als Testbouillon fungiert jeweils Wilkins-Chalgren-Bouillon. Für *Clostridium spp.* wurde eine Maximalzeit von 30 min ab der Sauerstoff-Aussetzung der Vorkultur bis zur Herstellung des Inokulums nicht überschritten (DIN 58940-83). Die Bebrütung erfolgt stets anaerob mit dem Anaerocult-System der Firma VWR bei 37 °C. Zur Gewährleistung eines streng anaeroben Klimas in der einzelnen Kavität werden die Mikrotiterplatten bei Testung der *Clostridium spp.* nicht abgeklebt. Im Regelfall beträgt die Bebrütungszeit 24 h (Regelwert für *Clostridium spp.* nach DIN 58940-83); etwa 1 % (*Clostridium spp.*) bzw. 5 % (Laktobazillen) der Testkeime benötigten eine Bebrütungszeit von 48 h. Eine Verlängerung der Bebrütungszeit auf 48 h für die bereits nach 24 h auswertbaren Isolate erbrachte keine substantiellen Änderungen der MHK-Werte (im Einzelfall + 1 MHK-Stufe).

Da die Testung der Laktobazillen vor Erwerb des Micronaut-Scan-Systems begann, wurde die visuelle Auswertung für alle Isolate beibehalten. Für Clostridien erfolgte die Auswertung stets mit dem Micronaut-Scan.

3 Molekularbiologische Untersuchungen

3.1 Material

3.1.1 Labormaterial

Standardstämme

| | |
|---|----------------------|
| <i>Bacillus</i> R89 <i>tet</i> (M) | AGERSØ et al., 2004 |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> „Stamm8“ <i>tet</i> (M) | SCHWARZ et al., 1998 |
| <i>E. faecalis</i> efa3952 <i>tet</i> (O) | diese Studie |
| <i>E. coli</i> eco2628 <i>tet</i> (B) | diese Studie |

PCR-Reagenzien und Extraktionsmittel

| | |
|--|----------------|
| UltraClean™ Soil DNA Isolation Kit | MoBio 12800-50 |
| PowerSoil™ DNA Isolation Kit | MoBio 12888-50 |
| DNeasy Tissue Kit | Quiagen 69504 |
| LightCycler® Fast Start DNA Master SYBR® Green I Kit | Roche 2239264 |
| QIAquick® PCR Purification Kit | Quiagen 28106 |
| Primer <i>tet</i> (M), <i>tet</i> (O), <i>tet</i> (B) tibmolbiol (vgl. Tabelle 11) | |

Verbrauchsmaterialien

| | |
|--------------------------|---------------|
| LightCycler® Capillaries | Roche 1909339 |
|--------------------------|---------------|

Geräte

| | |
|-------------------------------------|-------------------------------|
| LightCycler® (Softwareversion 3.01) | Roche 2011468 |
| Fluorometer | Hofer (Typ Dyna Quant 200) |
| Vortex Adapter | MoBio 13000-V1-15 |

3.1.2

3.1.3 Untersuchungsmaterial

Faecesproben zur Bestimmung der Ausscheidungskinetik von Tetrazyklin-Resistenzgenen

Im Rahmen eines auf die Erzeugung Chlortetrazyklin-haltiger und -freier Gülle ausgerichteten Versuches im Institut für Tierernährung und Futterwirtschaft (ITE) der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) in Grub wurden Faecesproben von in Stoffwechsellkäfigen gehaltenen Tieren entnommen. Während der Chlortetrazyklin-Fütterung sowie in der zweiwöchigen Abklingphase im Anschluss wurden von den sechs CTC-gefütterten Versuchstieren täglich Faeces-Proben als 24 h-Sammelproben gewonnen. Die Entnahme erfolgte morgens. Genauere Angaben zur Haltung und Chlortetrazyklin-Fütterung der Tiere finden sich unter dem folgenden Punkt „Standardgülle“. Im Jahr 2005 wurde der Versuch wiederholt; zusätzlich wurden dann auch Proben von Tetrazyklin-frei gehaltenen Tieren gewonnen.

Gülle

„Standardgülle“

Als Ausgangsmaterial für Dotierungsversuche zur Methodvalidierung (vgl. Punkt 3.2.5) wurde eine unter standardisierten Bedingungen erzeugte Gülle gewählt. Diese Gülle wurde bereitgestellt vom Institut für Tierernährung und Futterwirtschaft (ITE) der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) in Grub. Die Gülleerzeugenden Tiere (n = 6; Gewicht zu Versuchsbeginn durchschnittlich 14,4 kg) entstammten einer antibiotikafreien Aufzucht auf dem angeschlossenen Betrieb Osterseeon; sie wurden über die Versuchsdauer von 3 Wochen in Stoffwechselfäfigen gehalten. Ihre Haltung erfolgte als antibiotikafreie Kontrollgruppe räumlich, jedoch nicht baulich getrennt von 6 weiteren Tieren, die parallel einen Chlortetrazyklin-Fütterungsversuch durchliefen. Zur Versorgung der Tiere und Entnahme der Gülle wurden für Versuchs- und Kontrollgruppe getrennte Gerätschaften verwendet. Die erzeugte „Negativ“-Standardgülle hatte eine Trockensubstanz von 13,36 %. Die Chlortetrazyklin-gefütterten Tiere erhielten täglich Chlortetrazyklin (CTC) in einer Dosierung von 20 mg/kg Körpergewicht; dies entspricht der veterinär-therapeutisch eingesetzten CTC-Dosis. Die „Positiv“-Standardgülle enthielt 46,7 mg Chlortetrazyklin/kg und hatte eine Trockensubstanz von 11,59 %.

Praxisgülle

In die molekularbiologischen Untersuchungen wurden 115 Gülleproben aus Praxisbetrieben einbezogen. Auswahlkriterium war neben der Repräsentanz der Proben-gesamtheit der Gehalt unterschiedlicher Mengen an Tetrazyklinen. Für die Einteilung nach Gehalten wurde aus den Gehalten aller nachgewiesenen Tetrazykline (Tetrazyklin, Oxytetrazyklin, Chlortetrazyklin und Doxycyclin) durch Addition der Parameter „Gesamt-TET“ gebildet. Die potentere Hemmwirkung des Doxycyclins wurde hierbei nicht berücksichtigt, da nicht klar ist, ob diese auch mit einer vermehrten Induktion des Gen-Austausches in niedrigen Konzentrationsbereichen einhergeht. Doxycyclin war nur in fünf Gülleproben nachweisbar und lag im Bereich $\leq 0,7$ mg/kg. Die Konzentration des Gesamt-Tetrazyklins reichte von unterhalb der Nachweisgrenze bis maximal 53 mg/l. Dieser Maximalgehalt setzte sich zusammen aus 51 mg/kg Chlortetrazyklin und 2 mg/kg Tetrazyklin (HARMS, 2006).

Die Einteilung der Gülle nach Tetrazyklin-Gehalt orientiert sich an den Breakpoints für Tetrazyklin (vgl. Tabelle 4) und an Veröffentlichungen zur Resistenzinduktion und -selektion bei verschiedenen Antibiotikakonzentrationen (VALENTINE et al., 1988, DOUCET-POPULAIRE et al., 1990, SALYERS et al., 1995; PERRIN-GUYOMARD et al., 2001; WHITTLE et al., 2002). 29 der 115 Proben waren Tetrazyklin-frei (Gesamt-TET unterhalb der Nachweisgrenze), 86 antibiotikahaltig. Die gebildeten Klassen und die Verteilung der untersuchten Proben sind Tabelle 8 zu entnehmen.

Tabelle 8: Aufgliederung der molekularbiologisch untersuchten Gülle-Proben

| Faktor | Klassen | n untersucht | Anteil untersucht je Klasse in % |
|---------------------------------|---------------|--------------|----------------------------------|
| Antibiotikagehalt (in mg/kg) | < 0,1 | 29 | 20 |
| | 0,1–1 | 35 | 31 |
| | 1–4 | 21 | 41 |
| | > 4 | 30 | 79 |
| Betriebstyp | Zucht | 32 | 28 |
| | Mast | 34 | 26 |
| | Gemischt | 49 | 37 |
| Betriebsgröße | klein | 31 | 23 |
| | groß | 84 | 34 |
| Beprobung | Herbst | 61 | 22 |
| | Frühjahr | 54 | 50 |
| Regierungsbezirk | Oberbayern | 18 | 30 |
| | Niederbayern | 34 | 30 |
| | Oberpfalz | 11 | 33 |
| | Schwaben | 20 | 34 |
| | Oberfranken | 9 | 28 |
| | Mittelfranken | 15 | 31 |
| | Unterfranken | 8 | 22 |

Bodenproben

Vor und einige Tage nach Düngung zweier verschiedener Bodentypen (tonreiches Ackerland und sandiges Grünland) mit Chlortetrazyklin-haltiger Gülle (CTC-Gehalt 46,7 mg/kg Gülle in 2003, 9,1 mg/kg Gülle in 2004) sowie in den folgenden Wochen wurden Bodenproben aus einer Tiefe von 0-10 cm entnommen, homogenisiert und bei -20 °C eingelagert. Die Extraktion erfolgte mit dem PowerSoil™ DNA Isolation Kit. Die Quantifizierung in der Real-Time-PCR wurde mit dem Extrakt selbst sowie einer 1:10 Verdünnung vorgenommen, da Letzteres die Inhibition der PCR durch Bodenbestandteile abschwächt (AGERSØ et al., 2004).

3.2 Methoden

3.2.1 Auswahl der Testparameter

Gene

Allgemeine Kriterien, die bestimmte Gene für Resistenzuntersuchungen interessant machen, sind unter anderem deren Lage auf mobilen Elementen wie Plasmiden, Transposons oder Genkassetten (DAVIES, 1997). Im Gegensatz zur Ausrichtung der phänotypischen Resistenzuntersuchungen vorwiegend auf humanrelevante Antibiotika sollten zur genetischen Untersuchung Resistenzgene ausgewählt werden, für die ein Selektionsdruck in der Tierhaltung angenommen wird. Zudem sollten die Ergebnisse der Gen-Quantifizierung mit den Antibiotikagehalten in den Feldproben in Beziehung

gesetzt werden können. Ausgewählt wurden daher Tetrazyklin-Resistenzgene, und zwar *tet(B)* als Vertreter der Effluxgene sowie *tet(M)* und *tet(O)* als Gene, die Ribosomale Schutzproteine codieren. Frühere Untersuchungen hatten in Schweine-assoziierten-Isolaten eine dominierende Prävalenz von *tet(M)* entdeckt (AMINOV et al., 2001; CHEE-SANFORD et al., 2001). *tet(B)* gilt als das Efflux-Gen mit dem weitesten Wirtsspektrum (ROBERTS, 1997).

3.2.2 Kobaltbestrahlung

Für die Methodvalidierung (vgl. Punkt 3.2.5) musste eine *tet(M)*-freie Gülle geschaffen werden. Zur Zerstörung der Gesamt-DNA und somit auch der *tet(M)* Gene wurde aufgrund der Literatur (AGERSØ et al., 2004) die γ -Bestrahlung der Gülle gewählt. Dies geschah in einer ^{60}Co - Bestrahlungsanlage der Fa. Sulzer am Institut für Radiochemie (RCM) der Technischen Universität München in Garching. Überblick über die Bestrahlungsbedingungen gibt Tabelle 9.

γ -Strahlen sind ionisierende, hoch energetische elektromagnetische Strahlen, die keine Ladung aufweisen und schwer abschirmbar sind. Der β -Zerfall des ^{60}Co zum stabilen Tochternuklid ^{60}Ni ist gekennzeichnet durch zwei γ -Kaskadenübergänge; die freiwerdende γ -Energie („Gamma-Quanten“) beträgt 1,3 MeV bzw. 1,17 MeV (1 MeV entspricht $1,6 \times 10^{-13}$ Joule; 1 Gray entspricht 1 J/kg). Die Halbwertszeit ($T_{1/2}$) des Zerfalls von ^{60}Co zu ^{60}Ni beträgt 1925,5 Tage.

Zusätzlich wird ein Elektron (β -Zerfall) mit der Energie 317,9 keV freigesetzt. Da β -Strahlung stark mit der Materie wechselwirkt, wird diese Strahlung schon in der Kobalt-Quelle bzw. deren Umhüllung abgeschirmt.

Tabelle 9: ^{60}Co Bestrahlung von Gülle-Aliquots

| Gülle-Aliquot | Aktivität | Dosisleistung | Dauer | Gesamtdosis |
|---------------|----------------------------|------------------------|-------------|-------------|
| 1 | $3,7 \times 10^{14}$ Bq | 0,7 kGy/h | 48 h | 33,6 kGy |
| 2 | | 0,7 kGy/h | 48 h + 64 h | 78,4 kGy |
| 3 | | 0,7 kGy/h | 48 h + 83 h | 91,7 kGy |
| 4 | | 0,7 kGy/h | 48 h + 93 h | 98,7 kGy |
| 5 | | 0,7 kGy/h + 8 kGy/h | 48 h + 47 h | 409,6 kGy |

Zunächst kamen kumulative Dosen von 33,6 bis 98,7 kGy zum Einsatz. Die endgültige Behandlung erfolgte mit einer Dosisleistung 8 kGy/h und führte zu einer Gesamtdosis von 409 kGy.

Um die γ -Strahlen-unabhängigen Einflüsse während des Bestrahlungsversuches auf den *tet(M)*-Gehalt der Gülle abzuschätzen (v. a. den Einfluss des Auftauprozesses und der mehrtägigen Lagerung bei Raumtemperatur), wurde eine Gülleprobe in allen Schritten abgesehen vom eigentlichen Bestrahlungsprozess als Kontrollprobe mitgeführt.

3.2.3 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion aus Gülle erfolgte anfangs vergleichend mit dem UltraClean™ Soil DNA Isolation Kit und dem PowerSoil™ DNA Isolation Kit; bei der Extraktion aus Praxisgülle kam der PowerSoil™ DNA Isolation Kit zum Einsatz. Der Ablauf ist für beide Kits weitgehend identisch.

250 mg der Probe werden in die bereitgestellten Röhrchen überführt, die bereits mit einer Pufferlösung und den so genannten „beads“ bestückt sind. Nach Zugabe einer lysierenden Lösung unterstützt ein zehnmütiger Vortex-Schritt die mechanische wie chemische Lysis der Bakterienzellen. Die Zusammensetzung des PowerSoil™ DNA Isolation Kits zeigt Tabelle 10.

Tabelle 10: Zusammensetzung des PowerSoil™ DNA Isolation Kits

| Bestandteile | Bestandteile (auszugsweise) | Funktion |
|---------------------------------|------------------------------|--|
| PowerBead Tubes (750 µl) | beads | Mechanische Lysis |
| Solution C1 | SDS und andere Detergentien | Chemische Zell-Lysis |
| Solution C2 | 1. Präzipitations-Reagenz | Präzipitation von nicht-organischem und organischem Material ≠ DNA |
| Solution C3 | 2. Präzipitations-Reagenz | - ' - |
| Solution C4 | hochkonzentrierte Salzlösung | Ermöglichung der DNA-Bindung an Silica |
| Solution C5 | Ethanol-basierte Waschlösung | Entfernung von Salz, Huminsäuren und anderen Kontaminanten |
| Solution C6 | DNA-freier Elutionspuffer | Freisetzung der DNA von der Silica-Membran |
| Spin Filter Units in 2 ml Tubes | Silica Membran | Bindung der DNA |
| Collection Tubes | | Sammelbehältnisse für die extrahierte DNA |

Den Ablauf der DNA-Extraktion mittels PowerSoil™ DNA Isolation Kit zeigt Abbildung 8.

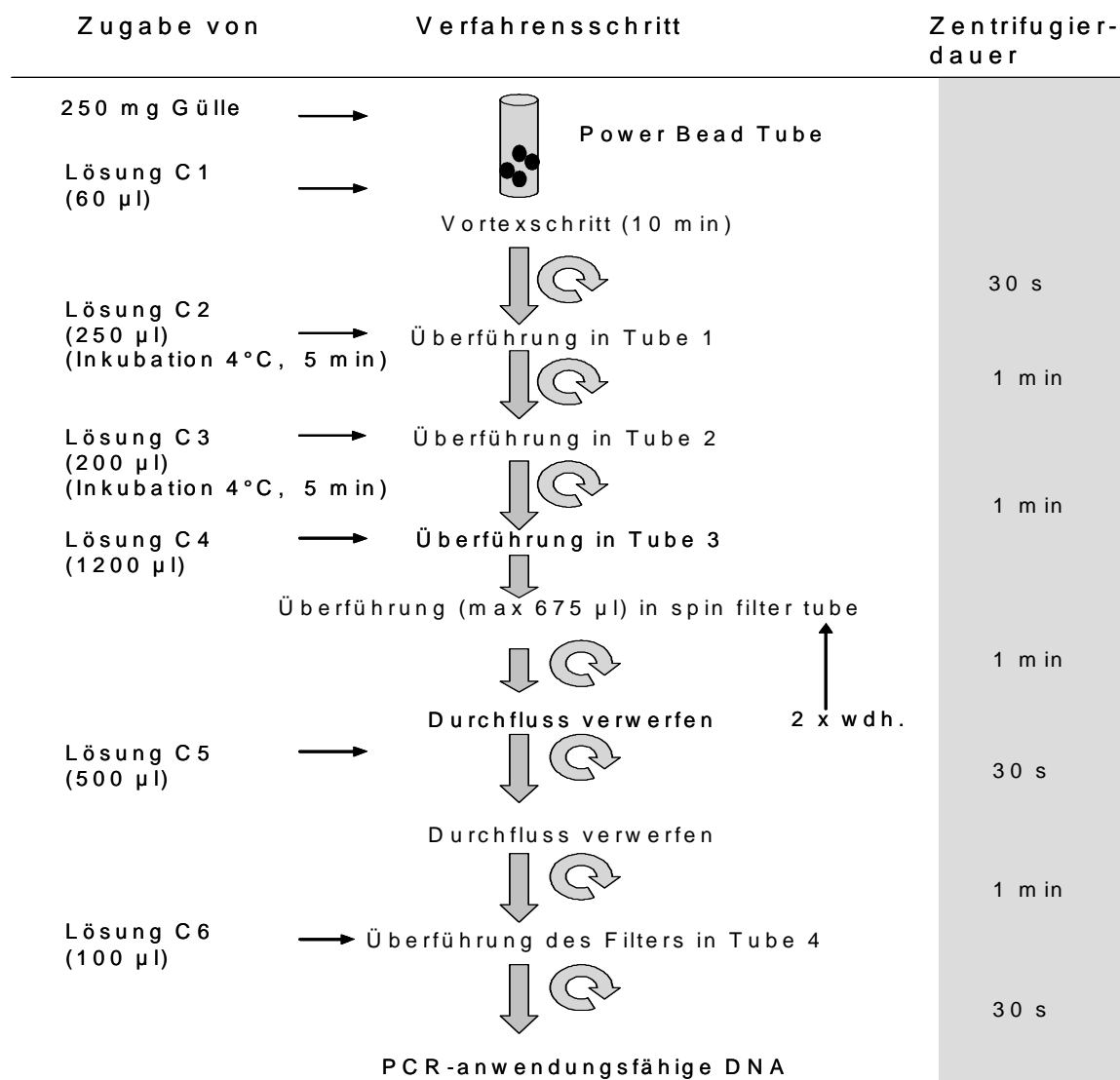



Abbildung 8: Ablauf der DNA-Extraktion mittels PowerSoil™ DNA Isolation Kits

 = Zentrifugationsschritt bei 10 000 g Lösung C1 bis C6 vgl. Tabelle 10

In einem ersten Zentrifugationsschritt wird ein Teil der Güllematrix entfernt; Inhibitor-fällende Reagenzien bewirken die Präzipitation weiterer organischer und nicht-organischer Substanzen, die nun in einem erneuten Zentrifugationsschritt abgetrennt werden können. Nach einem weiteren Präzipitations-/Zentrifugationsschritt wird die weitgehend aufgereinigte DNA mit einer Salzlösung versetzt. In der Extraktion mit dem UltraClean™ Soil DNA Isolation Kit entfällt diese zweite Präzipitation/Zentrifugation. Die DNA bindet in Anwesenheit hoher Salzkonzentration an die Silica-Membran einer Filtersäule, während eventuell verbliebene Kontaminanten passieren. In einem Waschschrift werden diese – ebenso wie Reste der Salzlösung – entfernt; die anschließende Zentrifugation trennt die Ethanol-basierte Waschlösung ab. Zuletzt wird die DNA mit Hilfe eines Elutionspuffers aus der Filtersäule zurück in Lösung überführt und kann der PCR zugeführt oder bei -20 °C zwischengelagert werden. Je nach Kit ist

die DNA in 50 (UltraClean™ Soil DNA Isolation Kit) bzw. 100 µl (PowerSoil™ DNA Isolation Kit) Volumen gelöst; ein 5 µl Aliquot wird in die PCR überführt.

Die DNA-Extraktion aus den zur einleitenden Methodenerprobung verwendeten Bakterienisolaten erfolgte mit dem DNeasy Tissue Kit® nach Herstellerangaben.

3.2.4 Nachweis von *tet(B)*, *tet(M)*, *tet(O)*

Der Nachweis der *tet*-Gene erfolgt mittels Real-Time-PCR unter Verwendung der Primer nach AMINOV et al. (2001); die Primersequenzen und Annealing-Temperaturen sind Tabelle 11 zu entnehmen. Die Methode von AMINOV et al. (2001, 2002) wurde hierbei an das LightCycler®-Gerät der Fa. Roche angepasst.

Tabelle 11: Primer, Annealing-Temperatur und Amplicongrößen: Amplifikation von *tet(B)*, *tet(M)* und *tet(O)*

| Primerpaar | Zielgen | Sequenz | PCR-Annealing-Temperatur (°C) | Amplicongröße (bp) |
|------------|---------------|------------------------|-------------------------------|--------------------|
| tet B-FW | <i>tet(B)</i> | TACGTGAATTTATTGCTTCGG | 61 | 206 |
| tet B-RV | | ATACAGCATCCAAAGCGCAC | | |
| tetM-FW | <i>tet(M)</i> | ACAGAAAGCTTATTATATAAC | 55 | 171 |
| tetM-RV | | TGGCGTGTCTATGATGTTTAC | | |
| tetO-FW | <i>tet(O)</i> | ACGGATAGTTTATTGTATAACC | 60 | 171 |
| tetO-RV | | TGGCGTATCTATAATGTTGAC | | |

FW = Forward; RV = Reverse

Die kommerziell erhältlichen Primer werden mit TE Puffer (10 mM Tris-HCL + 1mM EDTA) zu 10 µM Stocklösung vermischt und in Aliquots á 50 µl bei -20 °C gelagert. Für die Polymerase-Kettenreaktion wird ein so genannter Mastermix erstellt; dieser beinhaltet neben der Mastermix Stocklösung (bestehend aus FastStart Taq DNA Polymerase, Reaktionspuffer und Desoxynukleotidtriphosphat-Mischung) PCR-reines Wasser, Magnesium-Chlorid, die Probe, („Template“), entsprechende Primer und den Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green I. Die Zusammensetzung des Gesamtmastermix zeigt Tabelle 12.

Die Gesamtmischung mit einem Volumen von 20 µl wird in LightCycler® Kapillaren überführt und so in den LightCycler® eingebracht.

Tabelle 12: Zusammensetzung des PCR-Gesamtmastermix

| Bestandteil | Volumen (µl) |
|-----------------------|--------------|
| Mastermix Stocklösung | 2,0 |
| Mg Cl ₂ | 1,6 (3 mM) |
| Primer 1 (Forward) | 1,0 (0,2 µM) |
| Primer 2 (Reverse) | 1,0 (0,2 µM) |
| SYBR® Green I | 2,0 |
| H ₂ O | 7,4 |
| Template | 5,0 |

Die genauen Amplifikationsbedingungen zeigt Tabelle 13.

Tabelle 13: LightCycler[®]-Protokoll

| Denaturation | | | |
|------------------------------------|----------------|--------------|------------|
| Cycles | 1 | | |
| Analysis Mode | None | | |
| Target Temperature (°C) | 95 | | |
| Hold Time (s) | 600 | | |
| Temperature Transition Rate (°C/s) | 20,0 | | |
| Acquisition Mode | None | | |
| Amplification | | | |
| | Denaturation | Annealing | Elongation |
| Cycles | 40 | | |
| Analysis Mode | Quantification | | |
| Target Temperature (°C) | 95 | 61/ 55/ 60 * | 72 |
| Hold Time (s) | 0 | 5 | 4 |
| Temperature Transition Rate (°C/s) | 20 | | |
| Acquisition Mode | None | Single | None |
| Melting Curve | | | |
| | Segment 1 | Segment 2 | Segment 3 |
| Cycles | 1 | | |
| Analysis Mode | Melting Curves | | |
| Target Temperature (°C) | 95 | 60 | 95 |
| Hold Time (s) | 0 | 15 | 0 |
| Temperature Transition Rate (°C/s) | 20 | 20 | 0,1 |
| Acquisition Mode | None | None | Continuous |
| Cooling | | | |
| Cycles | 1 | | |
| Analysis Mode | None | | |
| Target Temperature (°C) | 40 | | |
| Hold Time (s) | 30 | | |
| Temperature Transition Rate (°C/s) | 20 | | |
| Acquisition Mode | None | | |

* primer-abhängig, vgl. Tabelle 11

Als Standard in der Untersuchung der Faecesproben, Standardgülle und Bodenproben dienten die unter Punkt 3.1.1 aufgeführten Bakterienstämme. Abweichend davon diente als Standard in der Untersuchung von Praxisgülle das Extrakt einer mit *Bacillus* R89-dotierten Gülle (Details vgl. Punkt 3.2.5).

Im Falle einer Inhibition der PCR – erkennbar durch flache Kurvenanstiege – wurde die Messung in einer 1:10-Verdünnung wiederholt.

3.2.5 Methodenvalidierung

Qualitativer Nachweis von *tet*-Genen aus Bakterienisolaten

Da die Methode von AMINOV et al. (2001, 2002) an den LightCycler® anzupassen war, erfolgte die DNA-Extraktion zur anschließenden Amplifizierung der Gene *tet(M)*, *tet(O)* und *tet(B)* zunächst aus bakteriellem Kulturmaterial. Damit sollten zur Methoden-Adaptation vorerst die behindernden Matrix-Effekte der Gülle umgangen werden, mit denen nach DNA-Direkt-Extraktion aus Gülle zu rechnen war.

Als Probenmaterial dienten hierbei aus Gülle isolierte, Tetrazyklin-resistente Bakterien der Gattungen *Enterococcus faecalis* (n = 15) und *faecium* (n = 6) für *tet(M)* und *tet(O)*, sowie *E. coli* (n = 5) und *Salmonella* (n = 13) für *tet(B)*. Als Standard für die Amplifizierung von *tet(M)* fungierte zunächst *Staphylococcus epidermidis* „Stamm 8“ (SCHWARZ et al., 1998), später dann *Bacillus* R89 (AGERSØ et al., 2004), der dieses Gen in genau einer Kopie chromosomal verankert trägt. Präsumptive Amplifikate der Zielgen-Abschnitte wurden durch externe Sequenzierung (Fa. Sequiserve, Vaterstetten) bestätigt.

Dotierungsversuche

Als *tet(M)*-Dotierungsmaterial und als Standard diente *Bacillus* R89. Hingegen entstammen die Gene für den Standard *tet(B)* und *tet(O)* eigenen Isolaten (bestätigt durch Sequenzierung der PCR-Produkte, Fa. Sequiserve).

Die ⁶⁰Co-bestrahlte Probe wurde mit einer *Bacillus* R89-NaCl-Verdünnungsreihe im Verhältnis 1:5 (Suspension zu Gülle) dotiert; es resultierten *Bacillus* R89-Konzentrationen in der dotierten Gülle von ca. 1×10^4 bis ca. 1×10^8 KBE/g. Der Keimgehalt der Suspension wurde durch Keimzahl-Bestimmung bestätigt, vgl. Punkt 2.2.3. Dies entsprach in etwa *tet(M)*-Gehalten von 1×10^2 bis 1×10^6 copies je 5 µl PCR-Aliquot.

Die DNA wurde aus den dotierten Proben mit Hilfe der unter Punkt 3.2.3 genannten Kits extrahiert und die Zielsequenz in der Real-Time-PCR amplifiziert und quantifiziert. Für den PowerSoil™ DNA Isolation Kit wurde der Versuch mit der 1:10-Verdünnungsreihe einer höher konzentrierten Suspension (bis 1×10^9 KBE/g) im Verhältnis 1:10 (Suspension zu Gülle) wiederholt; die Extrakte aus diesem Versuch wurden anschließend für jede Konzentrationsstufe gepoolt und in den weiteren Untersuchungen von Praxisgülle als probennaher Standard eingesetzt.

Die Untersuchung der Wiederfindungsraten von *tet(M)* in Bodenproben erfolgte im Verhältnis (Suspension zu Boden) 1:8,5. Die Dotierungs-Suspension hatte eine Ausgangskonzentration von etwa 1×10^9 KBE/ml. Zur Dotierung wurden die Konzentrationen 1×10^4 bis 1×10^9 KBE/ml eingesetzt; dies führt in etwa zu einem *tet(M)*-Gehalt im PCR-Aliquot von 1×10^2 bis 1×10^7 (entspricht ca. 1×10^3 bis 1×10^8 /g Boden). Die Proben zur Methodvalidierung ebenso wie die Feldproben wurden mittels PowerSoil™ DNA Isolation Kit extrahiert.

4 Datenauswertung

Die statistischen Untersuchungen wurden ausgeführt in den Programmen SPSS, SigmaStat und Excel, unter Beratung durch das STABLAB-Institut (Institut für Statistik, LMU München).

4.1 Phänotypische Resistenz

Statistische Untersuchungen wurden vorgenommen für die Spezies *E. coli*, *E. faecalis* und *E. faecium*. Bei den anderen – phänotypisch bis zur Speziesebene differenzierten – *Enterococcus*-Isolaten waren die Fallzahlen für aussagekräftige Auswertungen zu gering; für die übrigen *Enterococcus spp.* sowie *Clostridium spp.* und Laktobazillen erschien eine statistische Auswertung ohne die Differenzierung der Isolate auf Speziesebene wenig ergiebig.

Es wurden zum einen die Mittelwerte der – logarithmisch (\log_2) umgewandelten – MHK-Werte, zum anderen die Vorkommenshäufigkeit resistenter Isolate betrachtet. Randwerte am unteren Ende des untersuchten Kontrollbereiches, die Werte gleich oder kleiner dem in der Untersuchung erfassten MHK-Wert repräsentieren können, wurden dabei mit der kleinsten getesteten Konzentration gleichgesetzt; Werte am oberen Ende des untersuchten Konzentrationsbereiches mit dem nächst höheren. Für den Vergleich der MHK-Werte unter Berücksichtigung der Einflussfaktoren Betriebsgröße, Betriebstyp und Beprobungszeitpunkt sowie deren Wechselwirkungen wurde im Statistikprogramm SPSS ein gemischtes Modell angepasst (McCULLOCH & SEARLE, 2000; FAHRMEIR & TUTZ, 2001). Die Anwendung eines gemischten Modells war nötig, um der Tatsache Rechnung zu tragen, dass mehrere Isolate derselben Probe entstammen. Voruntersuchungen ergaben, dass es sich bei diesen Isolate gleicher Herkunft keineswegs regelmäßig um so genannte „copy-Stämme“ handelt, wie sie von humanmedizinischen Untersuchungen ausgeschlossen werden. Vielmehr stellt Gülle eine Sammelprobe dar, sodass die Untersuchung mehrerer Isolate absichert, tatsächlich die reale Bestandssituation zu erfassen. DUNLOP et al. (1999) fanden beträchtliche Gesamtvarianz der Resistenzausprägung innerhalb einer Bucht, die zu 97,5 % auf Schwein-zu-Schwein-Varianz beruhte. Erst recht ist innerhalb einer Gülle, die gegebenenfalls auch Ausscheidungen von Tieren aus baulich getrennter Haltung vereint, mit hoher Varianz zu rechnen.

Der Vergleich der MHK-Mittelwerte zusätzlich zu den bloßen Resistenzraten hat den Vorteil, dass damit nicht nur die „klinisch“-resistenten, sondern auch die „relativ“-resistenten Populationen erfasst und verglichen werden. Relative Resistenz zeigt sich in einer bimodalen Verteilung der MHK-Werte (Ursprungspopulation/„resistente“ Population); nicht immer müssen die MHK-Werte der „resistenten“ Population hierbei die Breakpoints zur klinischen Resistenz überschreiten und eine Erhöhung der Resistenz-rate zur Folge haben (vgl. Punkt B1.3.2).

Unterschiede in der Vorkommenshäufigkeit resistenter Isolate zwischen den verschiedenen Betriebstypen und -größen sowie den Herbst- und Frühjahrsproben wurden im Chi-Quadrat-Test auf ihre Signifikanz überprüft.

4.2 Vergleich von Human- und Veterinärmedizin

Die erhobenen Resistenzdaten wurden, soweit Vergleichsdaten für den Untersuchungszeitraum vorhanden waren, mit den Daten aus dem GENARS-Projekt sowie der DANMAP-Studie (Veterinärmedizin, Dänemark) verglichen:

Hierzu wurden die GENARS-Daten aus dem ersten Halbjahr 2003 herangezogen; im Falle nach Beprobungszeitraum stark unterschiedlicher Resistenzraten der Gülle-Isolate auch das zweite Halbjahr 2002. Die Daten wurden der Homepage der GENARS-Gruppe entnommen (GENARS, <http://www.genars.de/data.htm>).

Vergleiche mit GENARS-Daten konnten für *E. coli* bei 18 Substanzen vorgenommen werden, für *E. faecalis* gab es zu 12 Wirkstoffen Vergleichswerte, für *E. faecium* zu 13. Zu einzelnen Substanzen waren zugleich auch DANMAP-Daten vorhanden. Die Vergleichsdaten der DANMAP-Studie stammen ebenfalls aus 2003.

4.3 Gengehalt

Die Analyse möglicher Effekte der in Tabelle 8 genannten Einflussfaktoren, ergänzt durch die Kovariaten Gesamtkeimzahl und Trockensubstanz, wurde im univariaten allgemeinen linearen Modell vorgenommen (FAHRMEIR & TUTZ, 2001).

D Ergebnisse

1 Bakteriologischer Status von Schweinegülle

1.1 Keimgehalte

Orientierung über die durchschnittlichen Keimzahlen in Gülle gibt Abbildung 9. Die Mittelwerte stellten sich dabei wie folgt dar: Die aerobe Gesamtkeimzahl lag im Mittel bei 7,39 log KBE/g; die entsprechenden unter anaeroben Bedingungen erzielten Werte erreichten 7,09 log KBE/g. Enterobacteriaceae kamen in Größenordnungen um 4,01 log KBE/g vor; in einem ähnlichen Bereich bewegten sich die Enterokokken (4,14 log KBE/g), während Laktobazillen im Mittel um 5,56 log KBE/g auszählbar waren.

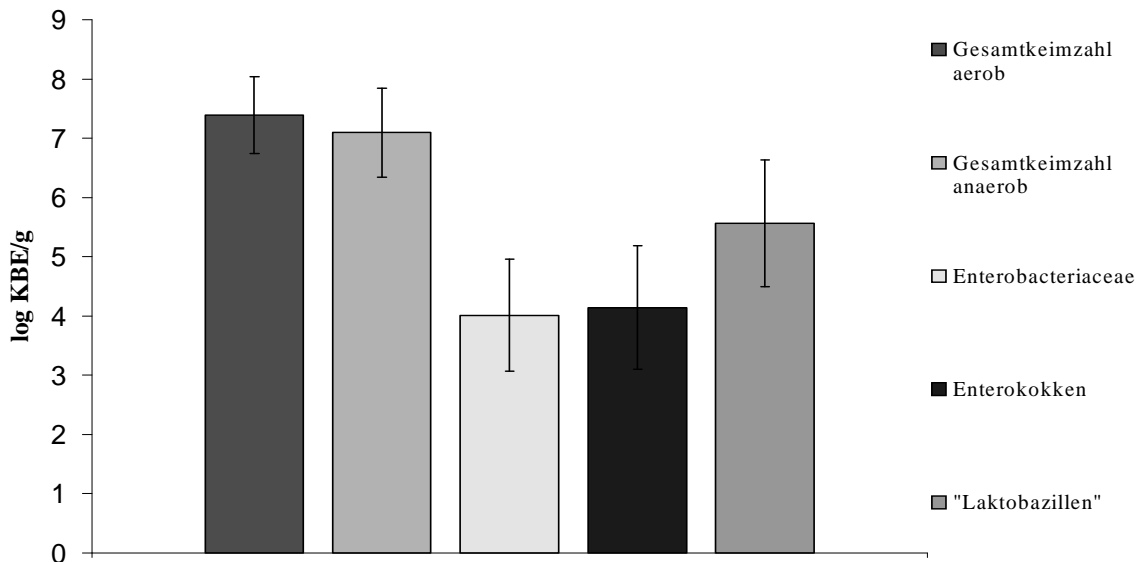


Abbildung 9: Mittelwerte und Standardabweichungen verschiedener Keimgruppen in Gülle aus Schweinehaltungen

1.2 Keimflora

Insgesamt wurden 2777 Isolate identifiziert und der Resistenztestung unterzogen. Ihre systematische Zugehörigkeit stellt Tabelle 14 dar.

Tabelle 14: Systematische Zugehörigkeit von Bakterienisolaten aus Gülle

| Keim | Isolate (n) | Gülle positiv (n) | Gülle untersucht (n) | Gülle positiv (%) |
|--------------------------|-------------|----------------------|-------------------------|----------------------|
| <i>E. coli</i> | 613 | 197 | 306 | 64,4 |
| <i>Enterococcus spp.</i> | 1037 | 291 | 306 | 95,1 |
| davon <i>E. faecalis</i> | 387 | 170 | 306 | 55,6 |
| <i>E. faecium</i> | 183 | 117 | 306 | 38,2 |
| <i>Clostridium spp.</i> | 547 | 272 | 306 | 88,9 |
| Laktobazillen | 552 | 289 | 306 | 94,4 |
| <i>Salmonella spp.</i> | 28 | 6 (+ 1 Jauche) | 380 (+ 1 Jauche) | 1,6 |

Wurden *Salmonella spp.* nachgewiesen, so wurden je drei Isolate an das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) übersandt und dort serotypisiert; für *Salmonella* Typhimurium schloss sich eine Phagotypisierung an. Die Ergebnisse fasst Tabelle 15 zusammen.

Alle „*Salmonella*“-Befunde wurden durch das BfR bestätigt. Mit einer Ausnahme ergaben jeweils alle Isolate aus einer Probe in der Serotypisierung dasselbe Ergebnis. Nur in einer Gülle kamen zugleich *S. Infantis* und andere Salmonellen der Serogruppe C1 vor; möglicherweise handelte es sich bei letzteren jedoch ebenfalls um (nicht eindeutig serotypisierbare) *S. Infantis*.

In vier von sechs positiven Gülleproben sowie in einer Jauche wurde *S. Typhimurium* gefunden; in den verbleibenden Gülleproben je einmal *S. Infantis*, *S. Derby* und Salmonellen der Serogruppe C1. Innerhalb des Serovars Typhimurium konnte dreimal der häufig multiresistente Phagotyp DT104 L isoliert werden. Alle *Salmonella*-positiven Proben entstammten großen Betrieben.

Tabelle 15: Serotyp und Lysotyp aus Schweinegülle isolierter *Salmonella spp.*

| Probe | Betriebsgröße | Betriebstyp | Serotyp | Lysotyp |
|-------------|---------------|---------------|---|---------|
| 80 (Jauche) | nicht bekannt | nicht bekannt | <i>S. Typhimurium</i> | DT195 |
| 166 | groß | Mast | <i>S. Typhimurium</i> | DT049 |
| 182 | groß | gemischt | <i>S. Typhimurium</i> | DT104 L |
| 238 | groß | Mast | <i>S. Typhimurium</i> | DT104 L |
| 286 | groß | gemischt | <i>S. Typhimurium</i> | DT104 L |
| 383 | groß | gemischt | <i>S. Derby</i> | |
| 397 | groß | Zucht | <i>S. Infantis</i> <i>S. Gruppe C1</i> | |

2 Phänotypische Resistenz ausgewählter Bakterien aus Schweinegülle

In die Darstellung der Ergebnisse phänotypischer Resistenzuntersuchungen wurden für alle Spezies nur solche Substanzen aufgenommen, denen gegenüber eine natürliche Empfindlichkeit der untersuchten Gattungen bzw. Spezies vorliegt.

2.1 Methodvalidierung

Zur Kontrolle der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erfolgte eine regelmäßige Validierung der Grampositivtestplatten mit dem DSM-Referenzstamm *E. faecalis* DSM 2570 und der Gramnegativtestplatten mit *E. coli* DSM 1103. Die Ergebnisse wurden mit den entsprechenden Referenzbereichen gemäß DIN abgeglichen (DIN 58940-81). Abweichungen traten lediglich im „minor error“-Bereich (± 1 MHK-Stufe) auf und zeigten keine Systematik.

Für diejenigen Wirkstoffe, zu denen keine DIN-Kontrollbereiche angegeben sind, war die Konstanz der Kontrollstamm-Ergebnisse das Validierungskriterium. Alle Ergebnisse lagen zu über 90–100 % im Bereich des Modalwerts ± 1 MHK-Stufe; auch hier bewegten sich – so vorhanden – Über- oder Unterschreitung des Regelergebnis-Bereiches nur in der Größenordnung einer MHK-Stufe.

Um das Haemophilus-Test-Medium als Testmedium für die Resistenztestung von Enterokokken zu etablieren, wurden alle DSM-Kontrollstämme sowie 55 Feldstämme aller Phänotyp-Gruppen einer parallelen Testung in Müller-Hinton- und Haemophilus-Test-Medium unterzogen. Ergebnisse für *E. faecalis* fasst Abbildung 10 zusammen. Aus der Abbildung geht hervor, dass die Streuung der MHK-Werte bei Erhebung im Haemophilus-Test-Medium allgemein geringer ausfiel als dies im Müller-Hinton-Medium der Fall war. Die in Haemophilus-Test-Medium erhobenen Werte lagen stets im Bereich der Ergebnisse in Müller Hinton Medium und beide gemeinsam stimmten gut mit den DIN-Kontrollbereichen überein. Abweichungen vom DIN-Kontrollbereich traten auf für Erythromycin (max. +1 MHK-Stufe), Imipenem (max. –1 MHK-Stufe) und Ciprofloxacin in Müller-Hinton-Medium (max. –1 MHK-Stufe).

Ergebnisse der übrigen *Enterococcus spp.* finden sich in Tabelle 38, Anhang. Für *E. avium* war eine vergleichende Testung im Müller-Hinton-Medium nicht möglich, da diese Spezies in Müller-Hinton-Medium keinerlei mit sichtbarer Trübung verbundenes Wachstum zeigte. Auch für *E. durans* sind die Ergebnisse im Müller-Hinton-Medium kritisch zu betrachten, da die Auswertung durch den Micronaut-Scan stets die Fehlermeldung „geringes Wachstum“ erbrachte. Dies birgt die Gefahr, die tatsächlichen MHK-Werte zu unterschätzen.

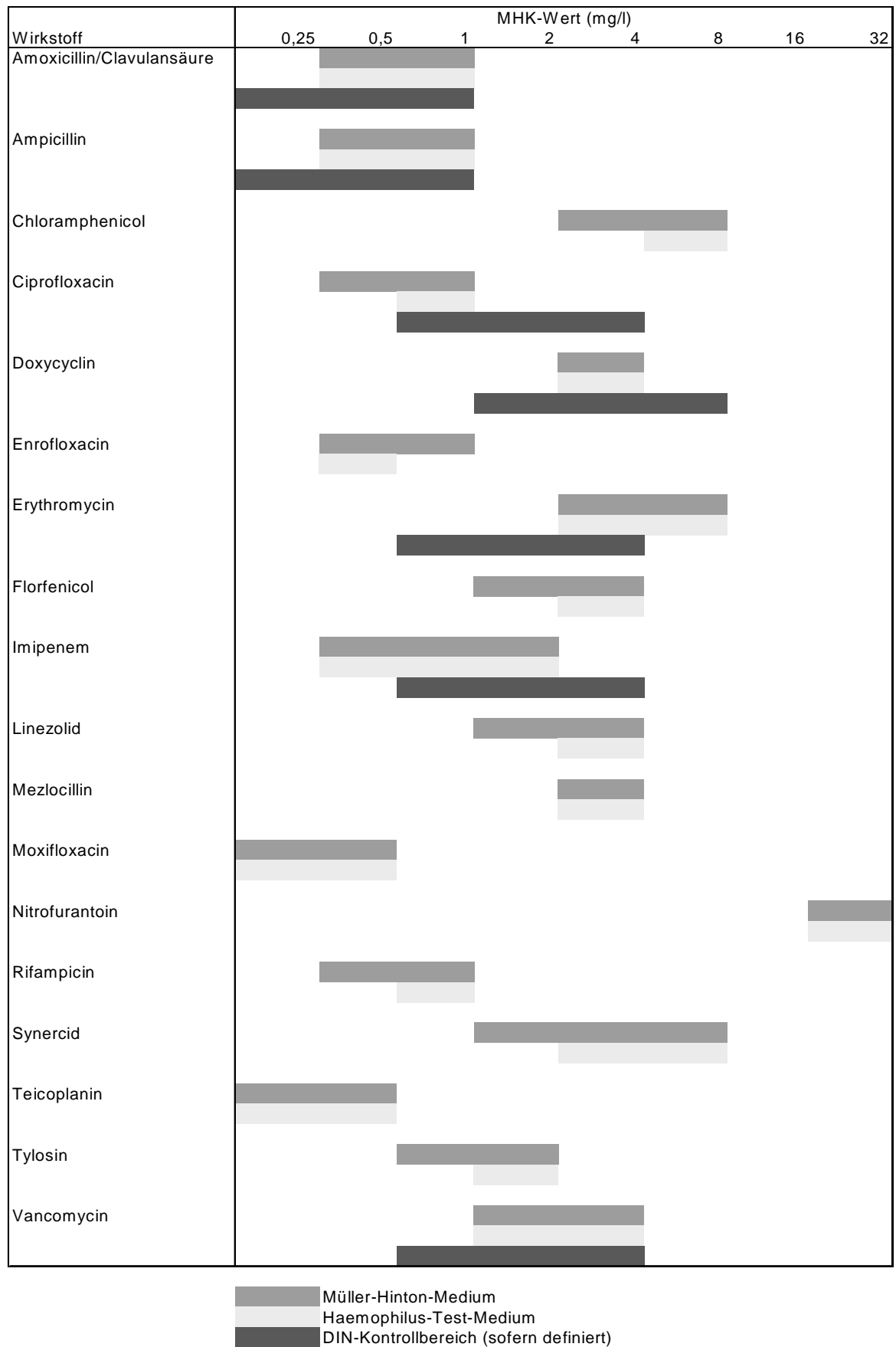


Abbildung 10: *E. faecalis* DSM 2570: Vergleich der MHK-Werte in Müller-Hinton- und Hämophilus-Test-Medium

2.2 *Salmonella* spp.

Aufgrund der geringen Zahl isolierter Salmonellen (n = 21, n Phänotypen = 8) bietet sich eine Darstellung prozentualer Resistenzraten nicht an. Stattdessen sind die Resistenzprofile der Serovare Gegenstand des Interesses. Aus Tabelle 16 ist ersichtlich, dass vier von acht Phänotypen keinerlei Resistenz gegenüber den geprüften Antibiotika aufwiesen. Vier Phänotypen waren durch Mehrfachresistenz gekennzeichnet, wobei zwei Isolate des Phagotyps DT 104 L die für diesen Phagotyp charakteristische Mehrfachresistenz zeigten, mit Resistenz gegen Ampicillin (und weitere Penicilline), Streptomycin-Spectinomycin, Florfenicol, Chloramphenicol und Cotrimoxazol; hier noch ergänzt durch Resistenz gegen Doxycyclin.

Tabelle 16: Resistenzprofile bei *Salmonella* spp. aus Schweinegülle

| Probe | Serovar (Lysotyp) | n Resistenzen bezogen auf | | Resistenzprofil |
|-------------|-------------------------------------|---------------------------|------------------|---|
| | | Wirkstoffe | Wirkstoffklassen | |
| 166 | <i>S. Typhimurium</i> (DT049) | 0 | 0 | - |
| 80 (Jauche) | <i>S. Typhimurium</i> (DT 195) | 6 | 4 | AMP MZL PIP STR DOX SXT |
| 238 | <i>S. Typhimurium</i> (DT 104 L) | 3 | 2 | STR SPE SXT |
| 182 | <i>S. Typhimurium</i> (DT 104 L) | 10 | 5 | AMP MZL PIP AMC STR SPE FLO CHL SXT DOX |
| 286 | <i>S. Typhimurium</i> (DT 104 L) | | | |
| 383 | <i>S. Derby</i> (n=3) | 7 | 2 | AMP MZL PIP AMC STR NEO KAN |
| | <i>S. Derby</i> (n=1) | 0 | 0 | - |
| 397 | <i>S. Infantis</i> | 0 | 0 | - |
| | <i>S. Serogruppe</i> C1 | 0 | 0 | - |

2.3 *Escherichia coli*

Relative Häufigkeitsverteilung der MHK-Werte

Die Ergebnisse der phänotypischen Resistenzuntersuchung fasst Tabelle 17 zusammen. Die Aufstellung gibt die relative Häufigkeitsverteilung der MHK-Werte ebenso wieder wie die Resistenz- bzw. Suszeptibilitätsraten der *E. coli*-Isolate.

Tabelle 17: Prozentuale Verteilung der MHK-Werte von *E. coli*-Isolaten (n = 613) aus Schweinegülle

| Wirkstoff | Antibiotikakonzentration (mg/l) | | | | | | | | | | | | % Sensibel | % Intermed. | % Resistent | | | |
|------------------|---------------------------------|-------|-------|------|-------------------|------|------|------|------|------|------|------|-------------------|-------------|-------------|-------|------|------|
| | 0,0625 | 0,125 | 0,25 | 0,5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | | | | 256 | | |
| AMC ⁺ | | | | | 10,7 ² | 37,1 | 28,5 | 12,5 | 7,3 | 3,1 | 0,7 | | | | | 47,8 | 41,1 | 11,1 |
| AMP | | | | | 7,8 | 41,0 | 25,0 | 7,2 | 0,2 | 0,2 | | 0,5 | 18,1 ³ | | | 48,8 | 32,2 | 19,0 |
| AMK | | | | | | 47,4 | 45,7 | 6,1 | 0,7 | 0,2 | | | | | | 93,1 | 6,8 | 0,2 |
| APR | | | | | | | 73,7 | 21,7 | 3,6 | 0,5 | | | 0,5 | | | 95,4 | - | 4,6 |
| CAZ | | | 95,6 | 3,9 | 0,2 | | 0,3 | | | | | | | | | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| CZC ¹ | | | 99,5 | 0,5 | | | | | | | | | | | | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| CET | | | | 98,5 | 0,8 | 0,2 | | | 0,5 | | | | | | | 99,3 | - | 0,7 |
| CEC | | | | | 39,9 | 37,4 | 17,5 | 4,4 | 0,8 | | | | | | | 39,9 | 54,9 | 5,2 |
| CEP | | | | | | 99,8 | | 0,2 | | | | | | | | 99,8 | 0,2 | 0,0 |
| CIP | | 96,4 | 1,0 | 1,3 | 0,2 | | | 0,0 | 0,5 | 0,2 | 0,5 | | | | | 98,9 | 0,0 | 1,1 |
| CMP | | | | | | 5,5 | 55,0 | 31,6 | 0,5 | 1,5 | 2,1 | 3,8 | | | | 92,7 | - | 7,3 |
| COL | | | | | | 98,4 | 0,5 | 0,2 | 0,2 | | | | 0,8 | | | - | 98,4 | 1,6 |
| COX | | | | | | 20,7 | 61,0 | 17,6 | 0,7 | | | | | | | 81,7 | 17,6 | 0,7 |
| CTX | | | 98,9 | 0,7 | | | | 0,3 | | | | | 0,2 | | | 99,5 | 0,3 | 0,2 |
| C/C ¹ | | | 100,0 | | | | | | | | | | | | | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| CXM | | | | 0,3 | 2,0 | 29,0 | 58,2 | 9,0 | 0,8 | | | | 0,7 | | | 89,6 | 9,0 | 1,5 |
| DOX | | | | 6,4 | 23,2 | 11,9 | 3,8 | 54,7 | | | | | | | | 29,6 | 15,7 | 54,7 |
| ENR | 95,6 | 1,5 | 0,5 | 1,3 | | | 0,3 | 0,3 | 0,5 | | | | | | | 97,5 | 1,3 | 1,1 |
| FLL | | | | | | 1,6 | 30,0 | 61,0 | 6,0 | 0,3 | | | 1,0 | | | 98,7 | - | 1,3 |
| GEN | | | 6,6 | 29,1 | 46,5 | 13,3 | 3,0 | 1,1 | 0,5 | | | | | | | 82,1 | 16,3 | 1,6 |
| IMP | | 66,3 | 25,5 | 7,2 | 0,2 | | | 0,2 | 0,2 | 0,5 | | | | | | 99,2 | 0,2 | 0,7 |
| MER | | | 100,0 | | | | | | | | | | | | | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| NEO | | | | | | 68,7 | 24,9 | 1,5 | 0,5 | 0,7 | 3,8 | | | | | 95,1 | - | 4,9 |
| PIP | | | | | 50,5 | 29,2 | 1,5 | 0,8 | 2,3 | 3,7 | 2,9 | 0,7 | 8,5 | | | 81,1 | 6,9 | 12,1 |
| PIT | | | | | 74,3 | 24,1 | 1,6 | | | | | | | | | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| SXT | | | | | 57,4 | 9,1 | 9,3 | 6,7 | 0,7 | 0,3 | 0,2 | 0,2 | 16,2 | | | 83,2 | 0,5 | 16,3 |
| STR | | | | | | | 31,9 | 6,7 | 4,9 | 12,1 | 18,0 | 26,4 | | | | 43,5 | - | 56,5 |
| SPT | | | | | | | | | 40,5 | 8,5 | 10,6 | 8,8 | 31,6 | | | 59,5 | - | 40,5 |
| TOB | | | 6,7 | 33,8 | 51,1 | 6,7 | 0,7 | 1,0 | | 0,2 | | | | | | 91,5 | 7,3 | 1,1 |

¹ die Antibiotika CZC und C/C entsprechen der Kombination von CAZ bzw. CTX mit Clavulansäure. Sie dienen der Detektion von ESBL (extended-spectrum-β-Lactamase); eigene Breakpoints sind daher nicht definiert

² Zahlen am linken Ende des untersuchten Konzentrationsbereichs stehen für Isolate mit MHK-Werten ≤ der angegebenen Konzentrationsstufe

³ Zahlen am rechten Ende des untersuchten Konzentrationsbereichs stehen für Isolate mit MHK- Werten ≥ der angegebenen Konzentrationsstufe

sensibel
 intermediär
 resistent
 untersuchter Konzentrationsbereich

* Antibiotika-Kürzel vgl. Tabelle 4

Daraus geht hervor, dass sich mehr als die Hälfte der Isolate (56,5 %) resistent gegen Streptomycin zeigte, ähnlich hoch (bei 54,7 %) lag die Resistenzrate gegenüber Doxycyclin und somit auch Tetracyclin. Etwa 40 % der Isolate waren resistent gegenüber dem Spectinomycin, das wie das Streptomycin ein Aminoglykosid ist; erheblich niedriger lag die

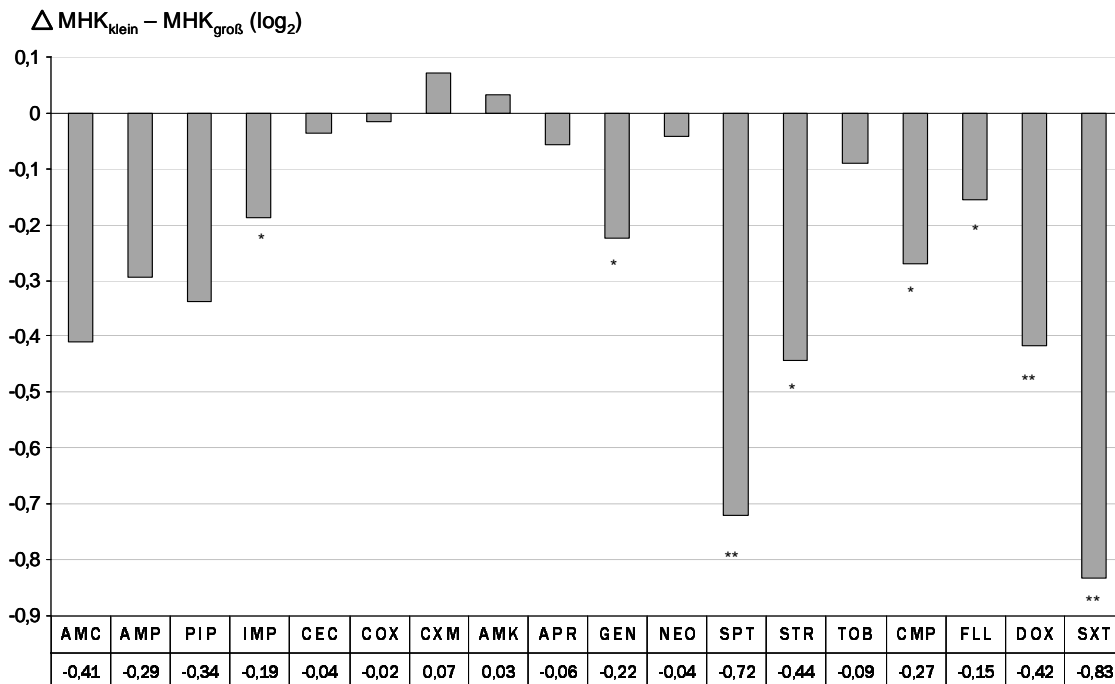
Zahl der unempfindlichen Isolate bei anderen Substanzen aus dieser Wirkstoffklasse (1,1 bis 4,9 %).

Resistenzraten gegen die Aminopenicilline Ampicillin und Amoxycillin (letzteres in Kombination mit Clavulansäure), sowie gegenüber dem Piperacillin lagen zwischen 10 und 20 %; Tazobactam (in Kombination mit Piperacillin) erwies sich hierbei, verglichen mit der Clavulansäure, als der potentere Laktamasehemmer (0 % unempfindliche Isolate bei Piperacillin/Tazobactam, hingegen 11,1 % Resistente bei Amoxycillin/Clavulansäure).

Auch Cotrimoxazol, ein Sulfamethoxazol-Trimethoprim-Kombinationspräparat, war vergleichsweise häufig (16,3 %) von Resistenz betroffen. Die Chloramphenicol-Resistenz ist noch immer in nennenswerten Bereichen (7,3 %); hingegen ist das – neuere und zugelassene – Florfenicol vergleichsweise selten unwirksam (1,3 %). Gut ist die Empfindlichkeit gegen Cephalosporine; einzig beim Cefaclor zeigen sich eine Verschiebung in den Intermediärbereich sowie 5,2 % resistente Isolate. Die Untersuchung aller weiteren Substanzen – einschließlich der Fluorquinolone – ergab Resistenzraten unter 2 %. Keinerlei Resistenzen fanden sich gegen die Cephalosporine Ceftazidim und Cefepim, das Meropenem und, wie erwähnt, gegen die Kombination Piperacillin/Tazobactam.

Einflussfaktor Betriebsgröße

Berücksichtigt man bei der Auswertung der Daten die Herkunft der Proben, so fanden sich zwischen den Betriebsgrößen „groß“ und „klein“ im Chi-Quadrat-Test statistisch signifikante Unterschiede in den Resistenzhäufigkeiten für zahlreiche Substanzen. Stets lagen die Resistenzraten in kleinen Betrieben niedriger als in großen Betrieben (die Kriterien zur Größeneinteilung der Betriebe siehe Tabelle 3). Dies galt für die Aminoglykoside Streptomycin (50 vs. 60 %) und Spectinomycin (33 vs. 44 %), sowie die Penicilline Piperacillin (7 vs. 14 %) und Ampicillin (13 vs. 22 %); außerdem Doxycylin (40 vs. 61 %), Cotrimoxazol (8 vs. 20 %) und Chloramphenicol (3 vs. 9 %). Im gemischten Modell zeigte sich für acht Antibiotika ein signifikanter Einfluss der Betriebsgröße auf die MHK-Mittelwerte. Es betraf dies die schon genannten Aminoglykoside Streptomycin und Spectinomycin, zusätzlich auch Gentamicin; neben Chloramphenicol auch Florfenicol sowie Doxycylin, Cotrimoxazol und Imipenem. In allen Fällen lagen die mittleren MHK-Werte in großen Betrieben höher als in kleinen; die signifikanten Unterschiede reichten von unter 0,2 log₂ Stufen (Florfenicol) bis 0,8 log₂ Stufen (Cotrimoxazol). Piperacillin und Ampicillin unterschieden sich trotz signifikanter Unterschiede in der Resistenzrate im MHK-Mittelwert nicht signifikant. Abbildung 11 zeigt die Mittelwert-Differenzen zwischen kleinen und großen Betrieben nach Wirkstoffklassen (in der Reihenfolge β -Laktame, Aminoglykoside, Fenicole, Tetrazyklin, Sulfonamid) geordnet.



AMC: Antibiotikakürzel vgl. Tabelle 4

* signifikante Differenz (Signifikanzniveau < 0,05)

** signifikante Differenz (Signifikanzniveau < 0,01)

Abbildung 11: Differenz der MHK-Mittelwerte (\log_2) von *E.coli*-Isolaten aus Schweinegütle kleiner und großer Betriebe

Einflussfaktor Betriebstyp

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Resistenzhäufigkeit zwischen den Betriebstypen „Zucht“, „Mast“ und „Gemischt“. Bemerkenswert mag sein, dass alle vier Imipenem-resistenten Isolate (aus drei verschiedenen Proben) in Zuchtbetrieben gefunden wurden. Auch sechs Cefoxitin-resistente Isolate entstammten allesamt (fünf) Zuchtbetrieben. Bei Auswertung der Daten im gemischten Modell fanden sich, sofern signifikante Unterschiede in den MHK-Mittelwerten auftraten, die höheren Mittelwerte in Gemischt-, zum Teil auch in Mastbetrieben: Bei den Aminoglykosiden Amikacin, Neomycin, Spectinomycin, Gentamicin und Tobramycin, sowie den Substanzen Chloramphenicol und Florfenicol lagen Isolate aus Gemischtbetrieben um knapp 0,2 bis 0,45 \log_2 Stufen (jeweils $p < 0,05$) über jenen aus Zuchtbetrieben.

Einflussfaktor Beprobung

Signifikant nach Beprobung unterschiedliche Resistenzraten wurden ermittelt gegenüber Ampicillin (15 vs. 25 %) und Cotrimoxazol (13 vs. 21 %), mit höheren Resistenzraten im Frühjahr. Dagegen trafen Streptomycin (61 vs. 51 %) und Spectinomycin (48 vs. 31 %) auf höhere Resistenzraten im Herbst. Genauso war der Effekt auf die mittleren MHK-Werte uneinheitlich: Auf die Empfindlichkeit gegen sechs Substanzen ergab sich ein signifikanter Einfluss des Faktors Beprobungszeitpunkt. Während aber die MHK-Werte von Ampicillin und dem Aminoglykosid Tobramycin ebenfalls im Frühjahr – um bis ca. 0,5 \log_2 – höher lagen, verhielt sich dies gegensinnig bei allen anderen getesteten Aminoglykosiden (Streptomycin, Spectinomycin, Amikacin, Gentamicin), für die im Herbst höhere MHK-Werte ermittelt wurden (bis 0,9 \log_2).

Mehrfachresistenzen

Insgesamt betrachtet waren 23% der *E. coli* gegen alle untersuchten Substanzen (vgl. Tabelle 17) empfindlich. Weitere 50 % exprimierten Resistenz gegen Substanzen aus ein oder zwei Wirkstoffklassen. Resistenz gegen Substanzen nur einer Wirkstoffklasse traf am häufigsten Aminoglykoside (15 %¹), gefolgt von Tetrazyklinen. Resistenz gegen Substanzen aus zwei Wirkstoffklassen umfasste überwiegend die Kombination Tetrazykline und Aminoglykoside (22 % der Gesamt-Isolate). In 20 % der Fälle kamen Resistenzen gegen Substanzen aus drei und vier Wirkstoffklassen vor; am häufigsten innerhalb der Tetrazykline, Aminoglykoside, Penicilline und ggf. Sulfonamide. Knapp 4 % der Isolate waren gegen Substanzen aus fünf verschiedenen Wirkstoffklassen resistent; Resistenz gegen Substanzen aus sechs verschiedenen Wirkstoffklassen zeigten knapp ein Prozent; die Resistenzen umfassten stets Stoffe aus der Klasse der Penicilline, Tetrazykline, Aminoglykoside und Fenicole; zusätzlich in drei Fällen Sulfonamide und Fluorquinolone, in einem Fall Fluorquinolone und Colistin und in einem Fall Sulfonamide und Cephalosporine (jedoch nur der älteren Cephalosporin-Generation).

Bezogen auf Einzelwirkstoffe ist die Streuung der phänotypischen Resistenzprofile aufgrund der größeren Zahl der Kombinationsmöglichkeiten entsprechend höher. Die Zahl der simultanen Wirkstoffresistenzen reicht bis zu 12 gleichzeitig exprimierten Resistenzen; zum Teil resultieren diese hohen Zahlen aus Kreuzresistenzen (z. B. Streptomycin | Spectinomycin oder Ampicillin | Piperacillin). Resistenzprofile und prozentuale Häufigkeit der Mehrfachresistenzen unter den *E. coli*-Isolaten zeigt Tabelle 18. Eine detaillierte Aufstellung der hochmehrfachresistenten Isolate (9–12 Resistenzen) gibt im Anschluss Tabelle 19.

Zu beachten ist, dass die verschiedenen Wirkstoffklassen mit unterschiedlich vielen Einzelwirkstoffen vertreten sind, gegen die nicht immer komplette Kreuzresistenz besteht. Dies erklärt, weshalb das Doxycylin zwar als Einzelwirkstoff (und einziger Vertreter der Tetrazykline) prozentual am häufigsten auf Resistenz trifft, jedoch im Vergleich der Wirkstoffklassen die Aminoglykoside (mit insgesamt sieben Vertretern) am häufigsten betroffen sind.

Tabelle 18: Prozentuale Verteilung der Mehrfachresistenz sowie phänotypische Resistenzprofile in *E.coli*-Isolaten (n = 613) aus Schweinegülle

| n Resistenzen | % Isolate | | Häufigstes Resistenzprofil (% der Gesamtisolate) | |
|------------------|-----------------------|--------------------------------|--|-----------------------------------|
| | Wirkstoff (n = 29) | Wirkstoff- klasse* (n = 10) | Wirkstoff | Wirkstoffklasse* |
| 0 | 22,5 | 22,5 | - | - |
| 1 | 15,5 | 24,5 | DOX (7,3) | AGL (15,0) |
| 2 | 21,5 | 26,4 | STR SPT (7,8) oder STR DOX (7,7) | TET AGL (22,2) |
| 3 | 14,8 | 13,1 | STR SPT DOX (9,0) | PEN TET AGL (5,1) |
| 4 | 6,2 | 9,5 | STR SPT DOX SXT (1,8) | PEN TET AGL SUL/TRI (4,6) |
| 5 | 7,7 | 3,3 | AMC AMP PIP STR DOX (1,1) | PEN TET AGL SUL/TRI FEN (1,5) |
| 6 | 5,2 | 0,8 | AMC AMP PIP STR SPT DOX (1,1) | PEN TET AGL SUL/TRI FQL FEN (0,5) |

¹Prozentzahlen stets bezogen auf die Gesamtzahl der *E. coli*-Isolate (n = 613)

Fortsetzung Tabelle 18: Prozentuale Verteilung der Mehrfachresistenz sowie phänotypische Resistenzprofile in *E.coli*-Isolaten (n = 613) aus Schweinegülle

| n Resistenzen | % Isolate | | Häufigstes Resistenzprofil (% der Gesamtisolate) | |
|---------------|--------------------|---------------------------|--|------------------|
| | Wirkstoff (n = 29) | Wirkstoffklasse* (n = 10) | Wirkstoff | Wirkstoffklasse* |
| 7 | 2,9 | - | AMC AMP PIP STR SPT DOX SXT (0,7) | - |
| 8 | 2,3 | - | AMC AMP PIP SXT NEO STR SPT DOX (0,5) | - |
| 9 | 0,8 | - | vgl. Tabelle 19 | - |
| 10 | 0,4 | - | vgl. Tabelle 19 | - |
| 11 | 0,2 | - | vgl. Tabelle 19 | - |
| 12 | 0,2 | - | vgl. Tabelle 19 | - |

* Resistenz gegen einen oder mehrere Wirkstoffe aus der genannten Klasse Antibiotika- und Wirkstoffklassen-Kürzel vgl. Tabelle 4

Tabelle 19 ist zu entnehmen, dass in Hochmehrfach-Resistenz der *E. coli*-Isolate nahezu stets die Resistenz gegen Amino- und Acylaminopenicilline involviert war. Hingegen trat Resistenz gegen Cephalosporine in hochmehrfach-resistenten *E. coli*-Isolaten aus Schweinegülle nur zweimal und nur gegen das Oral-Cephalosporin Cefaclor auf; Hinweise auf die Produktion von Extended-Spektrum- β -Lactamasen sind nicht gegeben. Alle hochmehrfach-resistenten Isolate zeigten Resistenz gegen Doxycylin und (mit einer Ausnahme) Sulfamethoxazol-Trimethoprim sowie ein oder mehrere Aminoglykoside.

Tabelle 19: Resistenzprofile hochmehrfach-resistenter *E. coli* aus Schweinegülle

| Probe | Betriebsgröße | Betriebsart | n Resistenzen | | Profil (% der Gesamtisolate) |
|-------|---------------|-------------|---------------|-------------------|---|
| | | | Wirkstoffe | Wirkstoffklassen* | |
| 40 | groß | gemischt | 9 | 6 | AMP AMC PIP CIP ENR SXT NEO CMP DOX (0,2) |
| 399 | groß | Zucht | 9 | 4 | AMP AMC PIP NEO SPT STR FLL CMP DOX (0,2) |
| 161 | groß | Zucht | 9 | 4 | AMP AMC PIP PIT SXT NEO SPT STR DOX (0,2) |
| 220 | groß | gemischt | 9 | 5 | AMP AMC PIP PIT CEC SXT NEO STR DOX (0,2) |
| 391 | groß | Mast | 10 | 6 | AMP AMC PIP CEC SXT SPT STR FLL CMP DOX (0,2) |
| 434 | groß | gemischt | 10 | 6 | AMP PIP CIP ENR SXT NEO SPT STR CMP DOX (0,2) |
| 184 | groß | Mast | 11 | 5 | AMP AMC APR SXT NEO SPT STR GEN TOB CMP DOX (0,2) |
| 41 | klein | gemischt | 12 | 6 | AMP AMC PIP CIP ENR SXT AMK NEO SPT STR CMP DOX (0,2) |

* Resistenz gegen einen oder mehrere Wirkstoffe aus der genannten Klasse Antibiotika-Kürzel vgl. Tabelle 4

2.4 *Enterococcus faecalis*

Relative Häufigkeitsverteilung der MHK-Werte

Die Ergebnisse der phänotypischen Resistenzuntersuchung an *E. faecalis* sind in Tabelle 20 zusammengefasst:

Tabelle 20: Prozentuale Verteilung der MHK-Werte von *E. faecalis*-Isolaten (n = 387) aus Schweinegülle

| Wirkstoff | Antibiotika-Konzentration (mg/l) | | | | | | | | | | | | | | | | % Sensibel | % Intermed. | % Resistent | |
|-----------|----------------------------------|------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------------------|-----|------|------|------|------|------------|-------------|-------------|------|
| | 0,06 | 0,13 | 0,25 | 0,5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 | 512 | 1024 | 2048 | | | | 4096 |
| AMC* | | 0,3 ¹ | 3,1 | 23,8 | 45,5 | 16,4 | 11,0 | | | | | | | | | | | 89,0 | 11,0 | 0,0 |
| AMP | | 0,5 | 4,3 | 52,7 | 18,9 | 23,3 | 0,3 | | | | | | | | | | | 99,7 | 0,3 | 0,0 |
| CIP | | | 0,3 | 5,9 | 68,5 | 22,8 | 0,8 | | | 1,3 | 0,5 ² | | | | | | 74,7 | 22,8 | 2,6 | |
| CMP | | | | | | 0,8 | 6,1 | 73,1 | 7,7 | 1,3 | 9,7 | 1,3 | | | | | 87,7 | - | 12,3 | |
| DOX | | 0,3 | 10,0 | 2,3 | 1,0 | 0,8 | 6,4 | 43,8 | 32,8 | 2,6 | | | | | | | 13,6 | 7,2 | 79,2 | |
| ENR | | | 1,0 | 17,6 | 74,7 | 4,6 | 0,3 | | 1,8 | | | | | | | | 1,0 | 96,9 | 2,0 | |
| ERY | | | 0,3 | 7,4 | 3,8 | 14,1 | 21,2 | 4,6 | 48,6 | | | | | | | | 11,5 | 35,3 | 53,2 | |
| FLL | | | | | | 3,1 | 95,9 | 1,0 | | | | | | | | | 100,0 | - | 0,0 | |
| FOS | | | | | | | | 2,0 | 74,4 | 15,1 | 7,2 | 1,3 | | | | | 91,6 | - | 8,4 | |
| GNH | | | | | | | | | | | | | | 91,7 | 8,3 | | 91,7 | - | 8,3 | |
| IMP | | 0,8 | 4,9 | 52,9 | 33,5 | 4,6 | 2,6 | 0,3 | 0,5 | | | | | | | | 96,7 | 2,6 | 0,8 | |
| LIZ | | | | | 2,3 | 95,9 | 1,2 | 0,3 | | | | | | | | | 98,1 | 1,2 | 0,3 | |
| MOX | | 1,5 | 16,4 | 74,9 | 5,1 | 0,5 | 0,5 | 1,0 | | | | | | | | | 98,0 | 0,5 | 1,5 | |
| MZL | | | | | | 95,1 | 2,6 | 1,5 | 0,5 | 0,3 | | | | | | | 97,7 | 2,0 | 0,3 | |
| NFT | | | | | | | | | | 90,5 | 3,1 | 4,6 | 1,3 | 0,5 | | | 93,6 | 5,9 | 0,5 | |
| RAM | | | 5,1 | 17,4 | 25,3 | 17,1 | 35,0 | | | | | | | | | | 22,5 | 25,3 | 52,2 | |
| SNH | | | | | | | | | | | | | 60,4 | 1,8 | 4,1 | 33,8 | 62,1 | - | 37,9 | |
| TLS | | | | | 11,0 | 34,8 | 6,6 | 47,6 | | | | | | | | | 52,4 | - | 47,6 | |
| TPL | | 87,7 | 11,5 | 0,5 | 0,3 | | | | | | | | | | | | 100,0 | 0,0 | 0,0 | |
| VAN | | | 3,3 | 40,2 | 46,8 | 9,7 | | | | | | | | | | | 100,0 | 0,0 | 0,0 | |

¹ Zahlen am linken Ende des untersuchten Konzentrationsbereichs stehen für Isolate mit MHK-Werten ≤ der angegebenen Konzentrationsstufe
² Zahlen am rechten Ende des untersuchten Konzentrationsbereichs stehen für Isolate mit MHK- Werten ≥ der angegebenen Konzentrationsstufe

sensibel
 intermediär
 resistent
 untersuchter Konzentrationsbereich

* Antibiotika-Kürzel vgl. Tabelle 4

Wie aus dieser Tabelle hervorgeht, lag der Anteil Doxycyclin-resistenter Isolate bei knapp 80 %. Etwa die Hälfte der Isolate war unempfindlich gegen die Makrolide Erythromycin und Tylosin und gegen Rifampicin. Einen hohen Anteil an der Gesamtpopulation nahmen – mit knapp 40 % – auch die Isolate mit Streptomycin-High-Level-Resistenz ein. 12 % der Isolate zeigten Chloramphenicol-Resistenz, jeweils etwa 8 % Fosfomycin- bzw. Gentamicin-Resistenz. Fluorquinolone blieben je nach Substanz gegen 1,5–3 % der Isolate wirkungslos. Alle weiteren Resistenzen lagen unter 1%; keine resistenten Isolate fanden sich bei der Testung von Ampicillin und Amoxycillin. Ausnahmslos alle getesteten Isolate waren empfindlich gegen Florfenicol und die Glykopeptide Teicoplanin und Vancomycin.

Einflussfaktor Betriebsgröße

Aus den unterschiedlichen Betriebsgrößen resultierten keine Unterschiede in den Resistenzhäufigkeiten, wohl aber Einflüsse auf die mittleren MHK-Werte, und zwar signifikant im Falle von Ampicillin und Amoxycillin, Vancomycin und Gentamicin (High-Level). Stets lagen hierbei, wie schon bei *E. coli*, die mittleren MHK-Werte in den großen Betrieben höher (bis 0,3 log₂).

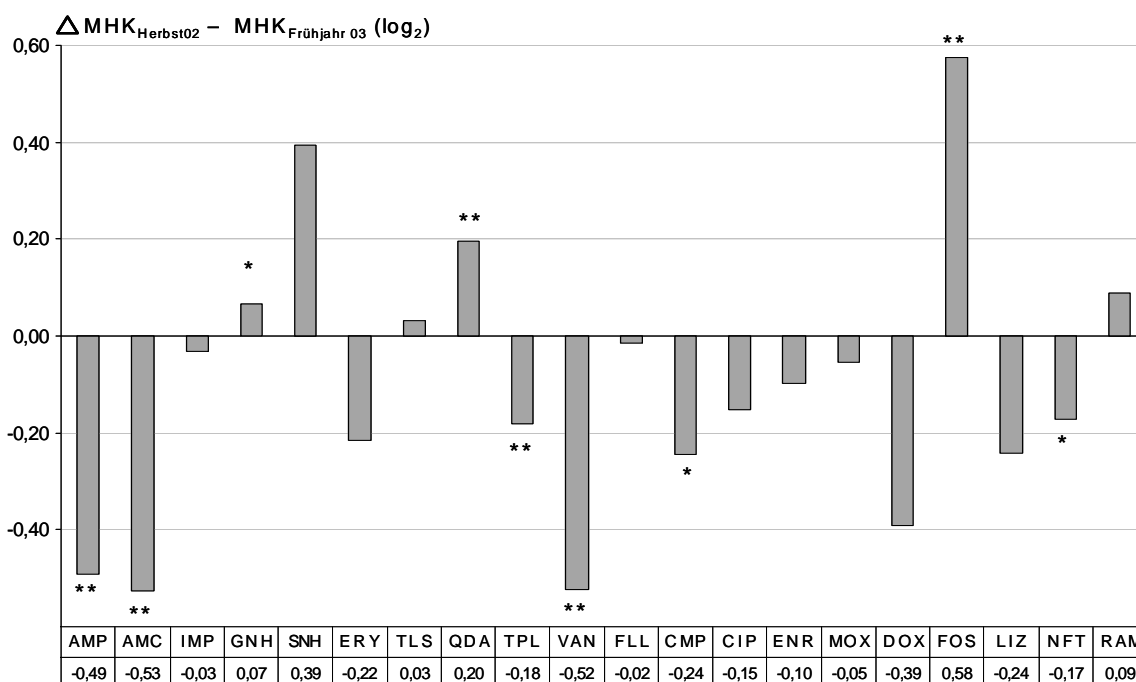
Einflussfaktor Betriebstyp

Signifikant unterschiedliche Resistenzraten fanden sich für Streptomycin und Gentamicin (jeweils High-Level), und zwar, konträr zu *E. coli*, jeweils die höchsten Prozentsätze resistenter Isolate in den Zuchtbetrieben, die niedrigsten in den gemischten Betrieben (Gentamicin: 14 vs. 3 %; Streptomycin: 47 vs. 31 %). Ebenso stellte sich die Situation dar für Chloramphenicol (20 % in Zucht vs. 7 % in Gemischt). Der geringe Anteil Fluorquinolon-resistenter Isolate fand sich ebenfalls bevorzugt in den Zuchtbetrieben: sechs Enrofloxacin-resistente bzw. fünf Moxifloxacin-resistente Isolate in Zuchtbetrieben (aus vier bzw. drei Proben), keines in Mast-, zwei (Enrofloxacin) bzw. eines (Moxifloxacin) in Gemischtbetrieben.

Die mittleren MHK-Werte gegen Gentamicin und Streptomycin (jeweils High-Level) waren signifikant vom Betriebstyp beeinflusst und lagen in Zuchtbetrieben bis zu 0,74 log₂ höher als in Gemischtbetrieben.

Beprobung

Gegen eine Vielzahl von Substanzen zeigten sich Unterschiede in Abhängigkeit vom Beprobungszeitpunkt. So lagen die Resistenzraten – wie auch die mittleren MHK-Werte – gegen Fosfomycin und Streptomycin jeweils im Herbst signifikant höher als im Frühjahr (16 % vs. 9 % bzw. 44 % vs. 34 %); genauso die mittleren MHK-Werte gegenüber dem Synercid (0,2 log₂). Hingegen wiesen Ampicillin, Amoxicillin, Teicoplanin, Vancomycin, Chloramphenicol und Nitrofurantoin die signifikant höheren Minimalen Hemmkonzentrationen in den Frühjahrsproben auf. Die Differenzen waren marginal für Gentamicin, Teicoplanin und Nitrofurantoin ($\leq 0,18$ log₂) und reichten bis 0,57 log₂ beim Fosfomycin, vgl. Abbildung 12.



AMC: Antibiotikakürzel vgl. Tabelle 4

* signifikante Differenz (Signifikanzniveau < 0,05)

** signifikante Differenz (Signifikanzniveau < 0,01)

Abbildung 12: Differenz der MHK-Mittelwerte (log₂) von im Herbst bzw. Frühjahr aus Schweinegülle gewonnenen *E. faecalis*-Isolaten

Mehrfachresistenzen

Nur 7,2 % der aus Schweinegülle isolierten *E. faecalis* verhielten sich gegenüber allen untersuchten Wirkstoffen (vgl. Tabelle 21) sensibel. 45 % wiesen Resistenzen gegen eine oder mehrere Substanzen aus ein bis zwei Wirkstoffklassen auf; betroffen war im Fall der Einzelklassen-Resistenz besonders Rifampicin (7,0 %¹) und Tetrazykline (6,5 %). Resistenz gegen Substanzen aus zwei unterschiedlichen Wirkstoffklassen (14,5 %) traf in etwa der Hälfte der Fälle zugleich Tetrazykline und Rifampicin, in weiteren 7,5 % der Fälle Tetrazykline und Makrolide. 40 % der Isolate zeigten Co-resistenz gegen drei oder vier unterschiedliche Wirkstoffklassen. Nahezu immer lag eine Resistenz gegen Tetrazykline vor.

Waren drei Wirkstoffklassen betroffen, so war die Tetrazyklin-Resistenz kombiniert mit Resistenz gegen Makrolide und am häufigsten High-Level-Aminoglykoside (12,9 %) oder Rifampicin (6,5 %). Betraf die Resistenz vier Wirkstoffklassen, so bestand in der überwiegenden Zahl der Fälle (11,9 %) eine simultane Tetrazyklin | Makrolid | Aminoglykosid-Resistenz, ergänzt durch Resistenz gegen Rifampicin (7,5 %), Fenicole (2,6 %) und andere. 7 % der Isolate waren zugleich gegen fünf Substanzen unterschiedlicher Wirkstoffklassen resistent: In der Mehrzahl der Fälle (5,7 %) handelte es sich um Resistenzen gegenüber Substanzen der Klassen Tetrazykline | Makrolide | Aminoglykoside (High-Level) | Fenicole | Rifampicin.

In den zwei Isolaten mit Resistenz gegen Wirkstoffe sechs verschiedener Klassen war die erwähnte 5fach-Kombination durch Resistenz gegen Fosfomycin bzw. Fluorquinolone ergänzt, während das Isolat mit einer Simultanresistenz gegen Antibiotika aus sieben unterschiedlichen Klassen keine Resistenz gegen Fenicole, jedoch gegen Carbapeneme und Penicilline zeigte.

Eine Zusammenstellung der prozentualen Verteilung mehrfachresistenter *E. faecalis* Isolate innerhalb der Grundgesamtheit zeigt Tabelle 21

¹Prozentzahlen stets bezogen auf die Gesamtzahl der *E. faecalis*-Isolate, n = 387

Tabelle 21: Prozentuale Verteilung der Mehrfachresistenz sowie phänotypische Resistenzprofile von *E. faecalis*-Isolaten (n = 387) aus Schweinegülle

| n Resistenzen | % Isolate | | Häufigstes Resistenzprofil (% der Gesamtisolate) | |
|------------------|-----------------------|-----------------------------------|--|--------------------------------------|
| | Wirkstoff (n = 22) | Wirkstoff- klasse* (n = 10) | Wirkstoff | Wirkstoffklasse* |
| 0 | 7,2 | 7,2 | - | - |
| 1 | 14,7 | 15,2 | RAM (7,0) | RAM (7,0) |
| 2 | 22,2 | 29,7 | RAM DOX (14,5) | RAM TET (14,5) |
| 3 | 16 | 26,1 | DOX ERY TLS (6,7) | AGL TET MLD (12,9) |
| 4 | 19,1 | 13,7 | DOX ERY TLS SNH (11,6) | RAM AGL TET MLD (7,5) |
| 5 | 9,6 | 7,2 | RAM DOX ERY TLS SNH (4,9) | RAM AGL TET MLD FEN (5,7) |
| 6 | 5,9 | 0,5 | RAM DOX ERY TLS SNH GNH (2,3) | RAM AGL TET MLD FEN FQL/FOS (je 0,3) |
| 7 | 3,6 | 0,3 | RAM DOX ERY TLS SNH GNH CMP (2,6) | RAM AGL TET MLD FLQ PEN CBP (0,3) |
| 8 | 1,0 | - | Vgl. Tabelle 22 | - |
| 9 | 0,5 | - | Vgl. Tabelle 22 | - |

* Resistenz gegen einen oder mehrere Wirkstoffe aus der genannten Klasse Antibiotika- und Wirkstoffklassen-Kürzel vgl. Tabelle 4

Die folgende Tabelle 22 fasst Isolate mit Resistenz gegen acht oder neun Wirkstoffe zusammen. Zwei Isolate aus einer Probe repräsentierten denselben Resistenzphänotyp und stellten somit copy-Stämme dar.

Tabelle 22: Resistenzprofile hochmehrfach-resistenter *E. faecalis*-Isolate aus Schweinegülle

| Probe | Betriebsgröße | Betriebsart | n Resistenzen | | Profil (% der Gesamtisolate) |
|--------|---------------|-------------|---------------|-------------|---|
| | | | Wirkstoffe | W.-klassen* | |
| 56/1** | groß | Zucht | 8 | 4 | DOX GNH SNH ERY TLS CIP ENR MOX (0,6) |
| 56/2** | | | 8 | 4 | |
| 427 | groß | Gemischt | 8 | 5 | DOX SNH ERY TLS CIP ENR MOX CMP (0,3) |
| 452 | groß | Zucht | 8 | 6 | DOX GNH SNH ERY TLS CMP LIZ RAM (0,3) |
| 426 | klein | Zucht | 9 | 6 | DOX SNH ERY TLS CIP ENR MOX CMP RAM (0,3) |
| 285 | groß | Gemischt | 9 | 7 | IMP DOX SNH ERY TLS CIP ENR MZL RAM (0,3) |

* Resistenz gegen einen oder mehrere Wirkstoffe aus der genannten Klasse

** Copystamm

Antibiotika-Kürzel vgl. Tabelle 4

Ein hochmehrfach-resistentes Isolat zeigte Resistenz gegen Imipenem und Mezlocillin, jedoch nur intermediäres Resistenzverhalten gegen Ampicillin und Amoxycillin. In allen Isolaten mit ≥ 4 Resistenzen war die Kombination Doxycyclin | Erythromycin | Tylosin | Streptomycin-High-Level am häufigsten Profil beteiligt; insgesamt exprimierte knapp ein Drittel (29,2 %) aller Isolate diese Resistenzkombination, gegebenenfalls ergänzt durch weitere Resistenzen.

2.5 *Enterococcus faecium*

Relative Häufigkeitsverteilung der MHK-Werte

Die Ergebnisse der phänotypischen Resistenzuntersuchung an *E. faecium* zeigt Tabelle 23.

Tabelle 23: Prozentuale Verteilung der MHK-Werte von *E. faecium*-Isolaten (n = 183) aus Schweinegülle

| Wirkstoff | Antibiotika-Konzentration (mg/l) | | | | | | | | | | | | | | | | % Sensibel | % Intermed. | % Resistent | |
|-----------|----------------------------------|------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------------|-------------|-------------|------|
| | 0,06 | 0,13 | 0,25 | 0,50 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 | 512 | 1024 | 2048 | | | | 4096 |
| AMC* | | 5,0 ¹ | 8,9 | 21,2 | 27,4 | 16,8 | 15,6 | 3,9 | 1,1 | | | | | | | | | 79,3 | 19,6 | 1,1 |
| AMP | | 3,9 | 2,2 | 7,8 | 19,0 | 30,2 | 18,4 | 16,2 | 1,1 | 1,1 | | | | | | | | 63,1 | 34,6 | 2,2 |
| CIP | | | 7,8 | 13,4 | 40,2 | 17,3 | 15,6 | 5,0 | 0,6 | | | | | | | | | 61,5 | 17,3 | 21,2 |
| CLI | | 0,0 | 9,7 | 15,9 | 2,3 | 0,6 | 1,1 | 12,5 | 30,1 | 27,8 | | | | | | | | 28,4 | 13,6 | 58,0 |
| CMP | | | | | | 1,7 | 30,7 | 63,1 | 1,7 | 1,1 | 1,7 | 1,7 | | | | | | 97,2 | - | 2,8 |
| DOX | | | 54,2 | 3,9 | 0,6 | 0,6 | 0,6 | 13,4 | 8,4 | 12,3 | 6,1 | | | | | | | 59,2 | 14,0 | 26,8 |
| ENR | | | | 3,9 | 13,4 | 37,4 | 16,2 | 21,2 | 7,8 | 0,0 | | | | | | | | 3,9 | 67,0 | 29,1 |
| ERY | | | | 12,3 | 6,7 | | 3,9 | 11,7 | 46,9 | 18,4 | | | | | | | | 19,0 | 15,6 | 65,4 |
| FLL | | | | | | 6,2 | 92,7 | 1,1 | | | | | | | | | | 100,0 | - | 0,0 |
| FOS | | | | | | | | 1,1 | 0,6 | 15,2 | 60,7 | 22,5 | | | | | | 16,9 | - | 83,1 |
| GNH | | | | | | | | | | | | | | 98,3 | 1,7 | | | 98,3 | - | 1,7 |
| IMP | | | 5,0 | 1,7 | 12,3 | 10,1 | 35,8 | 20,7 | 10,6 | 2,8 | 1,1 | | | | | | | 64,8 | 20,7 | 14,5 |
| LIZ | | | | 0,6 | | 1,7 | 83,6 | 14,0 | | | | | | | | | | 85,5 | 14,0 | 0,0 |
| MOX | | | 5,0 | 22,3 | 32,4 | 11,2 | 16,8 | 12,3 | | | | | | | | | | 70,9 | 16,8 | 12,3 |
| MZL | | | | | | 17,3 | 7,3 | 40,8 | 24,0 | 7,3 | 2,2 | 0,6 | 0,6 | | | | | 24,6 | 64,8 | 10,6 |
| NFT | | | | | | | | | | 6,7 | 5,6 | 57,3 | 29,2 | 1,1 | | | | 12,4 | 86,5 | 1,1 |
| RAM | | | | 24,0 | 2,2 | 0,6 | 7,8 | 65,4 | | | | | | | | | | 26,3 | 0,6 | 73,2 |
| SNH | | | | | | | | | | | | | 82,7 | 1,7 | 3,9 | 2,8 | 8,9 | 88,3 | - | 11,7 |
| SYN | | | 21,2 | 7,3 | 35,2 | 26,8 | 5,0 | 4,5 | | | | | | | | | | 63,7 | 26,8 | 9,5 |
| TLS | | | | 6,7 | 25,1 | 38,5 | 16,2 | 13,4 | | | | | | | | | | 86,6 | - | 13,4 |
| TPL | | | 61,5 | 38,5 | | | | | | | | | | | | | | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| VAN | | | | 51,4 | 37,4 | 7,3 | 3,4 | 0,6 | | | | | | | | | | 99,4 | 0,6 | 0,0 |

¹ Zahlen am linken Ende des untersuchten Konzentrationsbereichs stehen für Isolate mit MHK-Werten < der angegebenen Konzentrationsstufe
² Zahlen am rechten Ende des untersuchten Konzentrationsbereichs stehen für Isolate mit MHK- Werten \geq der angegebenen Konzentrationsstufe

sensibel
 intermediär
 resistent
 untersuchter Konzentrationsbereich

* Antibiotika-Kürzel vgl. Tabelle 4

Danach wurde der größte Anteil resistenter Isolate bei der Prüfung von Fosfomycin (83 %) und Rifampicin (73 %) gefunden. Die hohe Resistenzrate gegenüber Fosfomycin resultiert aus der Tatsache, dass aufgrund der Orientierung an den von GENARS verwendeten DIN-Grenzwerten hier kein Enterokokken-spezifischer Breakpoint zur Anwendung kam; die unimodale Verteilung der MHK-Werte gegenüber Fosfomycin bildet die Normalpopulation ab. Nach dem von anderen Autoren (PERRI et al., 2002) verwendeten Breakpoint (> 128 mg/l) läge die Resistenzrate erheblich niedriger.

Über die Hälfte der Isolate zeigt Resistenz gegen Erythromycin (65 %) bzw. Clindamycin (58 %). Noch vor der Doxycyclin-Resistenz (26 %) der *E. faecium*-Isolate liegt die Resistenz gegen das Enrofloxacin (29 %); auch gegen Ciprofloxacin sind 21 % der Isolate unempfindlich.

Zwischen 10 % und 15 % beträgt der Anteil resistenter Isolate bei der Testung von Imipenem, Tylosin, Moxifloxacin, Mezlocillin, Streptomycin (High-Level) und Synercid. Um 3 % – also erheblich niedriger als bei *E. faecalis* – liegt der Anteil Chloramphenicol-resistenter Enterokokken; um und unter 2 % bewegt sich der Prozentsatz von Enterokokken mit anderen Resistenzen. Wie auch *E. faecalis* war *E. faecium* zu 100 % sensibel gegenüber Florfenicol und Teicoplanin; bezüglich Vancomycin trat lediglich ein als intermediär einzustufender Stamm auf.

Einflussfaktor Betriebsgröße

Berücksichtigt man bei der Daten-Auswertung die Probenherkunft, so ergaben sich signifikante Unterschiede in den Resistenzraten für Imipenem und Mezlocillin. Bei Imipenem standen 6,6 % resistente Isolate (aus 2 positiven Proben) in kleinen Betrieben gegen 20 % resistente (aus 17 Proben) in Großbetrieben. Ebenso stellte sich die Situation dar für das Mezlocillin (5,3 % – in absoluten Zahlen: vier – resistente Isolate aus drei Kleinbetrieben vs. 15 % – in absoluten Zahlen: 15 – resistente Isolate aus 12 Großbetrieben). Die Resistenzrate gegen Rifampicin – ein veterinärmedizinisch nicht eingesetztes Antibiotikum – lag jedoch in kleinen Betrieben signifikant höher (80 vs. 67 %). Für Doxycyclin fanden sich keine signifikant unterschiedlichen Resistenzraten in Klein- oder Großbetrieben (19,7 vs. 31 %, $p = 0,092$). Der Einfluss des Merkmals „großer Betrieb“ auf die mittleren MHK-Werte von Doxycyclin war dagegen signifikant positiv ($\text{Diff. } 1,0 \log_2 = \text{eine MHK-Stufe}$).

Einflussfaktor Betriebstyp

Isolate aus Zuchtbetrieben zeigten signifikant gegenüber Enrofloxacin (und grenzwertig nichtsignifikant gegen Ciprofloxacin) höhere Resistenzraten als solche aus Gemischtbetrieben: 34 % Enrofloxacin-resistenten Isolate in Zucht- standen 19 % resistente in Gemischtbetrieben gegenüber. Zwar zeigten sich auch die Resistenzen gegen Doxycyclin in Zucht- und Mastbetrieben höher (34 % bzw. 30 % vs. 18 % in Gemischtbetrieben), dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant ($p = 0,116$). Chloramphenicol-resistente Isolate kamen nur in Zucht- ($n_{\text{Isolate}} = 4$, $n_{\text{Proben}} = 2$) und Mast- ($n = 1$), nicht aber in Gemischtbetrieben vor. Die unterschiedlichen Resistenzraten gegenüber Enrofloxacin spiegelten sich auch in den MHK-Mittelwerten von Enrofloxacin wider: Die Werte aus Zucht- und Mastbetriebe lagen eng beisammen, um ca. $0,5 \log_2$ höher als jene aus Gemischtbetrieben.

Einflussfaktor Beprobung

Der Vergleich der Resistenzraten ergab lediglich tendentielle Unterschiede für Gentamicin und Chloramphenicol: Beide Proben mit Gentamicin-resistenten Isolate waren im Frühjahr eingegangen. Alle drei Proben, in denen insgesamt fünf Chloramphenicol-resistente Isolate gefunden wurden, entstammten ebenso den Frühjahrs-Proben. Dies spiegelte sich auch signifikant in den mittleren MHK-Werten wider (Gentamicin: $\text{Diff} < 0,1 \log_2$; Chloramphenicol: $\text{Diff } 0,3 \log_2$). Ebenso lagen die mittleren MHK-Werte der Glykopeptide im Frühjahr signifikant höher denn im Herbst ($\text{Diff. } 0,2 \text{ bis } 0,3 \log_2$); die des Enrofloxacins jedoch (um $0,45 \log_2$) signifikant höher im Herbst.

Mehrfachresistenzen

Obwohl alle aus der Literatur bekannten intrinsischen Resistenzen der Spezies *E. faecium* von der Kalkulation der Mehrfachresistenzen ausgeschlossen worden waren (sowie zusätzlich das Fosfomycin, da auch hier der Gipfel der Normalverteilung im resistenten Bereich lag), wiesen weniger als 5 % der Isolate keine fakultativen Resistenzen auf.

Wie Tabelle 24 zeigt, lag auch der Prozentsatz von *E. faecium* Isolate mit Resistenz gegen Substanzen, die nur einer einzigen Wirkstoffklasse angehörten, im Durchschnitt nur bei ca. 10 %. Betroffen waren vornehmlich Lincosamide, aber auch Fluorquinolone (intrinsisches Inter-mediärverhalten!) oder Rifampicin, sowie im Einzelfall Makrolide oder Tetrazykline. Weitere knapp 30% der Isolate zeigten Unempfindlichkeit gegen Substanzen aus zwei Wirkstoffklassen; am häufigsten betroffen war die Kombination Makrolide/Rifampicin (10,9 %).

Betrifft die Resistenz Substanzen aus drei unterschiedlichen Wirkstoffklassen (36 % der Fälle), so handelte es sich überwiegend um simultane Makrolid/Lincosamid-Resistenz, ergänzt durch Rifampicin (21,9 %). Diese Kombination bildete meist auch den Grundstock zur Resistenz gegen Substanzen aus vier bis sechs Wirkstoffklassen (19 % der Isolate), häufig ergänzt durch Tetrazykline, Streptogramine oder Fluorquinolone.

Mit zunehmender Zahl der Resistenzen erschien auch gelegentlich eine Resistenz gegen Penicilline und Carbapeneme. Resistenz gegen Substanzen aus sieben bis neun Wirkstoffklassen exprimierten 6 % der Isolate. Zusätzlich zu Kombinationen der bereits genannten Wirkstoffklassen waren nun auch Fenicole betroffen.

Tabelle 24: Prozentuale Verteilung der Mehrfachresistenz sowie phänotypische Resistenzprofile von *E. faecium*-Isolaten (n = 183) aus Schweinegülle

| n Resistenzen | % Isolate | | Häufigstes Resistenzprofil (% der Gesamtisolate) | |
|------------------|-----------------------|------------------------------|--|---|
| | Wirkstoff (n = 23) | Wirkstoffklasse* (n = 11) | Wirkstoffe | Wirkstoffklassen* |
| 0 | 2,7 | 2,7 | - | - |
| 1 | 7,1 | 9,3 | CLI (2,7) | LCA (2,7) |
| 2 | 22,4 | 27,3 | RAM ERY (10,4) | RAM MLD (10,9) |
| 3 | 33,3 | 35,5 | RAM ERY CLI (21,3) | RAM MLD LCA (21,9) |
| 5 | 6,0 | 6,6 | RAM ERY CIP ENR MOX (2,2) | RAM MLD LCA TET FQL (1,6) |
| 6 | 6,6 | 4,4 | RAM ERY CLI CIP ENR DOX (1,6) | RAM MLD LCA TET FQL AGL (1,1) |
| 7 | 6,0 | 4,9 | IMP MZL RAM ERY CLI DOX SNH (1,1) | RAM MLD LCA STG TET FQL AGL (1,6) |
| 8 | 3,3 | 0,5 | Vgl. Tabelle 25 | RAM PEN CBP MLD LCA TET FQL AGL (0,5) |
| 9 | 0,5 | 0,5 | Vgl. Tabelle 25 | RAM PEN CBP MLD LCA TET FQL AGL STG (0,5) |
| 10 | 0,5 | - | Vgl. Tabelle 25 | |
| 11 | - | - | - | - |
| 12 | 0,5 | - | Vgl. Tabelle 25 | |
| 13 | 0,5 | - | Vgl. Tabelle 25 | |

* Resistenz gegen einen oder mehrere Wirkstoffe aus der genannten Klasse
Antibiotika- und Wirkstoffklassen-Kürzel vgl. Tabelle 4

Tabelle 25 zeigt die Resistenzprofile aus Gülle isolierter hochmehrfach-resistenter *E. faecium*. Hierbei wurden aus einer Probe 3 hochmehrfach-resistente *E. faecium*- Stämme isoliert. Zwei davon repräsentieren copy-Stämme mit identischem Resistenzprofil, einer zeigt sich genetisch abweichend: neben dem geänderten Resistenzmuster gegen Gentamicin/Streptomycin-High-Level zeigte dieser Stamm auch zwei bzw. drei log₂ Stufen Differenz der MHK-Werte gegen Nitrofurantoin und Mezlocillin.

Tabelle 25: Resistenzprofile hochmehrfach-resistenter *E. faecium*-Isolate aus Schweinegülle (n Resistenzen = 8–13)

| Probe | Betriebsgröße | Betriebs-art | n Resistenzen | | Profil (% der Gesamtisolate) |
|----------|---------------|--------------|---------------|------------|---|
| | | | Wirkstoffe | W.-klassen | |
| 268 | groß | Zucht | 8 | 6 | MZL IMP CIP ENR MOX SNH CLI RAM (0,5) |
| 108 | groß | Gemischt | 8 | 7 | MZL IMP SNH DOX CLI ERY TLS SYN (0,5) |
| 250 | klein | Zucht | 8 | 7 | IMP ENR SNH DOX CLI ERY TLS RAM (0,5) |
| 378/1** | klein | Zucht | 8 | 7 | DOX <u>G</u> NH CMP CLI ERY TLS SYN RAM (1,1) |
| 378/2** | | | | | DOX <u>S</u> NH CMP CLI ERY TLS SYN RAM (0,5) |
| 378/3*** | | | | | DOX <u>S</u> NH CMP CLI ERY TLS SYN RAM (0,5) |
| 86 | klein | Mast | 9 | 6 | DOX SNH CIP ENR MOX CLI ERY TLS RAM (0,5) |
| 174 | groß | Gemischt | 10 | 7 | MZL IMP CIP ENR MOX SNH DOX CLI ERY TLS (0,5) |
| 225 | klein | Gemischt | 12 | 8 | AMP AMC MZL IMP CIP ENR SNH DOX CLI ERY TLS RAM (0,5) |
| 89 | groß | Mast | 13 | 9 | AMP AMC MZL IMP CIP ENR SNH DOX CLI ERY TLS SYN RAM (0,5) |

* Resistenz gegen einen oder mehrere Wirkstoffe aus der genannten Klasse

** copy-Stämme

*** abweichender Stamm

Antibiotika-Kürzel vgl. Tabelle 4

2.6 *Enterococcus nonfaecalis/nonfaecium*

Die MHK-Daten der einzelnen *E. nonfc.*-Untergruppen zeigt Tabelle 26. Die Einteilung der Isolate in Merkmalsgruppen beschreibt C2.2.4

Tabelle 26: Prozentuale Verteilung der MHK-Werte von Isolaten aus verschiedenen *E. nonfc.*-Gruppen

| Wirkstoff | Antibiotika-Konzentration (mg/l) | | | | | | | | | | | | | | % S | % I | % R | Spezies | | | |
|-----------|----------------------------------|-------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------------------|-----|-----|-------|------|-----|-------|---------|------|---|--|
| | 0,06 | 0,13 | 0,25 | 0,50 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 | 512 | | | | | 1024 | | |
| AMP* | | 10,0 ¹ | 3,3 | 60,3 | 20,0 | 6,7 | | | | | | | | | | | 100,0 | 0 | 0 | <i>E. cass.</i> (n=30) <i>E. gall.</i> (n=26) raff.-Gruppe (n=45) <i>E. avium</i> (n=15) hiraë/durans und andere; n = 351) | |
| | | 3,8 | 11,5 | 19,2 | 50,0 | 7,7 | 7,7 | | | | | | | | | | 92,3 | 7,7 | 0 | | |
| | | 26,7 | 24,4 | 31,1 | 11,1 | 6,7 | | | | | | | | | | | 100,0 | 0 | 0 | | |
| | | 6,7 | 13,3 | 20,0 | 40,0 | 6,7 | 13,3 | | | | | | | | | | 86,7 | 13,3 | 0 | | |
| AMC | | 6,7 | 20,0 | 53,3 | 13,3 | 6,7 | | | | | | | | | | | 100,0 | 0 | 0 | <i>E. cass.</i> <i>E. gall.</i> raff.-Gruppe <i>E. avium</i> andere (hd) | |
| | | 4,0 | 8,0 | 44,0 | 28,0 | 16,0 | | | | | | | | | | | 100,0 | 0 | 0 | | |
| | | 37,8 | 26,7 | 26,7 | 6,7 | 2,2 | | | | | | | | | | | 100,0 | 0 | 0 | | |
| | | 6,7 | 20,0 | 33,3 | 20,0 | 13,3 | 6,7 | | | | | | | | | | 93,3 | 6,7 | 0 | | |
| CIP | | | 6,7 | 3,3 | 30,0 | 50,0 | 10,0 | | | | | | | | | | 40,0 | 50,0 | 10,0 | <i>E. cass.</i> <i>E. gall.</i> raff.-Gruppe <i>E. avium</i> andere (hd) | |
| | | | | 11,5 | 30,8 | 42,3 | 15,4 | | | | | | | | | | 42,3 | 42,3 | 15,4 | | |
| | | | | 13,3 | 20,0 | 35,6 | 24,4 | 4,4 | 2,2 | | | | | | | | 68,9 | 24,4 | 6,7 | | |
| | | | | 13,3 | 40,0 | 26,7 | 13,3 | | | | 6,7 ² | | | | | | 53,3 | 26,7 | 20,0 | | |
| CLI | | | | | 3,3 | 6,7 | 60,0 | 30,0 | | | | | | | | | 3,3 | 6,7 | 90,0 | <i>E. cass.</i> <i>E. gall.</i> raff.-Gruppe <i>E. avium</i> andere (hd) | |
| | | | | | 3,8 | 3,8 | 26,9 | 65,4 | | | | | | | | | 3,8 | 3,8 | 92,3 | | |
| | 17,8 | 4,4 | | 11,1 | | 4,4 | 4,4 | 11,1 | 46,7 | | | | | | | | 33,3 | 8,9 | 57,8 | | |
| | | | | | 6,7 | 6,7 | 6,7 | 80,0 | | | | | | | | | 6,7 | 6,7 | 86,7 | | |
| CMP | | | | | | 10,0 | 83,3 | 3,3 | | 3,3 | | | | | | | 96,7 | - | 3,3 | <i>E. cass.</i> <i>E. gall.</i> raff.-Gruppe <i>E. avium</i> andere (hd) | |
| | | | | | | 26,9 | 73,1 | | | | | | | | | | 100,0 | - | 0 | | |
| | | | | | | 15,6 | 40,0 | 37,8 | | 2,2 | 4,4 | | | | | | 93,3 | - | 6,7 | | |
| | | | | | | 4,8 | 35,0 | 59,5 | 6,7 | | 13,3 | | | | | | 86,7 | - | 13,3 | | |
| DOX | | 46,7 | 20,0 | | | 6,7 | 16,7 | 3,3 | 6,7 | | | | | | | | 66,7 | 23,3 | 10,0 | <i>E. cass.</i> <i>E. gall.</i> raff.-Gruppe <i>E. avium</i> andere (hd) | |
| | | 19,2 | 7,7 | | | 3,8 | 26,9 | 26,9 | 15,4 | | | | | | | | 26,9 | 30,8 | 42,3 | | |
| | | 20,0 | 4,4 | 2,2 | 11,1 | 26,7 | 22,2 | 4,4 | 4,4 | 4,4 | | | | | | | 37,8 | 48,9 | 13,3 | | |
| | | 13,3 | 13,3 | | | 6,7 | 13,3 | 40,0 | 6,7 | 6,7 | | | | | | | 26,7 | 20,0 | 53,3 | | |
| ENR | | 3,3 | | 10,0 | 43,3 | 43,3 | | | | | | | | | | | 3,3 | 96,7 | 0 | <i>E. cass.</i> <i>E. gall.</i> raff.-Gruppe <i>E. avium</i> andere (hd) | |
| | | | | 26,9 | 50,0 | 19,2 | 3,8 | | | | | | | | | | 0 | 96,2 | 3,8 | | |
| | | | 20,0 | | 35,6 | 24,4 | 17,8 | 2,2 | | | | | | | | | 20,0 | 77,8 | 2,2 | | |
| | | 6,7 | | 13,3 | 40,0 | 26,7 | 6,7 | | 6,7 | | | | | | | | 6,7 | 80,0 | 13,3 | | |
| ERY | | 0,6 | 0,6 | 6,3 | 49,0 | 32,8 | 10,0 | 0,6 | | | | | | | | | 7,4 | 91,7 | 0,9 | <i>E. cass.</i> <i>E. gall.</i> raff.-Gruppe <i>E. avium</i> andere (hd) | |
| | | | | 3,3 | | 6,7 | 33,3 | 33,3 | 23,3 | | | | | | | | 3,3 | 40,0 | 56,7 | | |
| | | 3,8 | 7,7 | 50,0 | 11,5 | | 3,8 | 3,8 | 19,2 | | | | | | | | 73,1 | 3,8 | 23,1 | | |
| | | 2,2 | 31,1 | 13,3 | 2,2 | 4,4 | 4,4 | 11,1 | 31,1 | | | | | | | | 48,9 | 8,9 | 42,2 | | |
| FLL | | | | | | 33,3 | 56,7 | 10,0 | | | | | | | | | 100,0 | - | 0 | <i>E. cass.</i> <i>E. gall.</i> raff.-Gruppe <i>E. avium</i> andere (hd) | |
| | | | | | | 80,8 | 19,2 | | | | | | | | | | 100,0 | - | 0 | | |
| | | | | | | 66,7 | 33,3 | | | | | | | | | | 100,0 | - | 0 | | |
| | | | | | | 20,0 | 80,0 | | | | | | | | | | 100,0 | - | 0 | | |
| FOS | | | | | | | 13,3 | 10,0 | 26,7 | 30,0 | 20,0 | | | | | | 50,0 | - | 50,0 | <i>E. cass.</i> <i>E. gall.</i> raff.-Gruppe <i>E. avium</i> andere (hd) | |
| | | | | | | | | 15,4 | 53,8 | 23,1 | 7,7 | | | | | | 69,2 | - | 30,8 | | |
| | | | | | | | | 17,8 | 17,8 | 40,0 | 20,0 | 4,4 | | | | | 75,6 | - | 24,4 | | |
| | | | | | | | | 6,7 | 20,0 | 20,0 | 53,3 | | | | | | 46,7 | - | 53,3 | | |
| GNH | | | | | | | | | | | | | | 100,0 | | | 100,0 | - | 0 | <i>E. cass.</i> <i>E. gall.</i> raff.-Gruppe <i>E. avium</i> andere (hd) | |
| | | | | | | | | | | | | | | 100,0 | | | 100,0 | - | 0 | | |
| | | | | | | | | | | | | | | 93,3 | 6,7 | | 93,3 | - | 6,7 | | |
| | | | | | | | | | | | | | | 100,0 | | | 100,0 | - | 0 | | |
| IMP | | | | | | | | | | | | | | | | | 99,4 | 0,6 | 0 | <i>E. cass.</i> <i>E. gall.</i> raff.-Gruppe <i>E. avium</i> andere (hd) | |
| | | 23,3 | 20,0 | 10,0 | 16,7 | 26,7 | 3,3 | | | | | | | | | | 96,7 | 3,3 | 0 | | |
| | | 3,8 | 11,5 | 11,5 | 15,4 | 26,9 | 26,9 | | | 3,8 | | | | | | | 69,2 | 26,9 | 3,8 | | |
| | | 46,7 | 15,6 | 6,7 | 8,9 | 6,7 | 8,9 | 4,4 | | 2,2 | | | | | | | 84,4 | 8,9 | 6,7 | | |
| LIZ | | | | | 23,3 | 60,0 | 16,7 | | | | | | | | | | | 83,3 | 16,7 | 0 | <i>E. cass.</i> <i>E. gall.</i> raff.-Gruppe <i>E. avium</i> andere (hd) |
| | | | | | 23,1 | 69,2 | 7,7 | | | | | | | | | | | 92,3 | 7,7 | 0 | |
| | | | | 4,4 | 55,6 | 33,3 | 6,7 | | | | | | | | | | | 93,3 | 6,7 | 0 | |
| | | | | 6,7 | 26,7 | 60,0 | 6,7 | | | | | | | | | | | 93,3 | 6,7 | 0 | |
| | 0,6 | 4,6 | 12,3 | 77,5 | 5,1 | | | | | | | | | | | | 94,9 | 5,1 | 0,0 | | |
| | 0,06 | 0,13 | 0,25 | 0,50 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 | 512 | 1024 | % S | % I | % R | | | |

Fortsetzung Tabelle 26

| Wirkstoff | Antibiotikakonzentration (mg/l) | | | | | | | | | | | | | | | | %S | %I | %R | Spezies | |
|-----------|---------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|------|------|------|------|------|-------|------|---------|---|
| | 0,06 | 0,13 | 0,25 | 0,50 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 | 512 | 1024 | 2048 | | | | | 4096 |
| MOX | | 3,3 | 10,0 | 63,3 | 23,3 | | | | | | | | | | | | | 100,0 | 0 | 0 | <i>E. cass.</i> (n=30) <i>E. gall.</i> (n=26) raff.-Gruppe (n=45) <i>E. avium</i> (n=15) <i>hirae/durans</i> und andere; n = 351) |
| | | | 53,8 | 34,6 | 7,7 | 3,8 | | | | | | | | | | | | 96,2 | 3,8 | 0 | |
| | | 4,4 | 37,8 | 17,8 | 24,4 | 15,6 | | | | | | | | | | | | 100,0 | 0 | 0 | |
| | | 6,7 | 6,7 | 13,3 | 46,7 | 6,7 | 13,3 | 6,7 | | | | | | | | | | 80,0 | 13,3 | 6,7 | |
| | | 2,6 | 9,4 | 56,7 | 24,5 | 6,0 | 0,6 | | | | | | | | | | | 99,1 | 0,6 | 0,3 | |
| MZL | | | | | | 96,7 | 3,3 | 0 | 0 | | | | | | | | | 100,0 | 0 | 0 | <i>E. cass.</i> <i>E. gall.</i> raff.-Gruppe <i>E. avium</i> andere (hd) |
| | | | | | | 88,5 | 11,5 | 0 | 0 | | | | | | | | | 100,0 | 0 | 0 | |
| | | | | | | 91,1 | 4,4 | 4,4 | 0 | | | | | | | | | 95,6 | 4,4 | 0 | |
| | | | | | | 60,0 | 13,3 | 13,3 | 13,3 | | | | | | | | | 73,3 | 26,7 | 0 | |
| | | | | | | 62,7 | 13,4 | 15,1 | 7,1 | 0,6 | 0,6 | 0,6 | | | | | | 76,1 | 22,2 | 1,7 | |
| NFT | | | | | | | | | | 96,7 | 3,3 | 0 | 0 | | | | | 100,0 | 0 | 0 | <i>E. cass.</i> <i>E. gall.</i> raff.-Gruppe <i>E. avium</i> andere (hd) |
| | | | | | | | | | | 88,5 | 7,7 | 3,8 | 0 | | | | | 96,2 | 3,8 | 0 | |
| | | | | | | | | | | 82,2 | 8,9 | 8,9 | 0 | | | | | 91,1 | 8,9 | 0 | |
| | | | | | | | | | | 66,7 | 13,3 | 20,0 | 0 | | | | | 80,0 | 20,0 | 0 | |
| | | | | | | | | | | 20,8 | 39,3 | 28,8 | 8,8 | 2,3 | | | | 60,1 | 37,6 | 2,3 | |
| RAM | | | | 33,3 | 16,7 | 20,0 | 13,3 | 16,7 | | | | | | | | | | 50,0 | 20,0 | 30,0 | <i>E. cass.</i> <i>E. gall.</i> raff.-Gruppe <i>E. avium</i> andere (hd) |
| | | | | 46,2 | | 0 | 7,7 | 46,2 | | | | | | | | | | 46,2 | 0 | 53,8 | |
| | | | | 66,7 | 4,4 | 0 | 8,9 | 20,0 | | | | | | | | | | 71,1 | 0 | 28,9 | |
| | | | | 46,7 | | 13,3 | 6,7 | 33,3 | | | | | | | | | | 46,7 | 13,3 | 40,0 | |
| | | | | 54,3 | 3,7 | 4,0 | 6,3 | 31,7 | | | | | | | | | | 58,0 | 4,0 | 38,0 | |
| SNH | | | | | | | | | | | | 83,3 | 10,0 | 3,3 | 3,3 | | | 93,3 | - | 6,7 | <i>E. cass.</i> <i>E. gall.</i> raff.-Gruppe <i>E. avium</i> andere (hd) |
| | | | | | | | | | | | | 100,0 | | | | | | 100,0 | - | 0 | |
| | | | | | | | | | | | | 77,8 | 6,7 | 6,7 | 8,9 | | | 91,1 | - | 8,9 | |
| | | | | | | | | | | | | 66,7 | 6,7 | 13,3 | 13,3 | | | 86,7 | - | 13,3 | |
| | | | | | | | | | | | | 84,6 | 2,6 | 2,9 | 4,0 | 6,0 | | 90,0 | - | 10,0 | |
| SYN | | | | | 20,0 | 50,0 | 16,7 | 13,3 | | | | | | | | | | 20,0 | 50,0 | 30,0 | <i>E. cass.</i> <i>E. gall.</i> raff.-Gruppe <i>E. avium</i> andere (hd) |
| | | | | | 46,2 | 34,6 | 15,4 | 3,8 | | | | | | | | | | 46,2 | 34,6 | 19,2 | |
| | | 9,7 | 16,1 | 38,7 | 22,6 | 3,2 | 9,7 | | | | | | | | | | | 64,5 | 22,6 | 12,9 | |
| | | | 14,3 | 21,4 | 21,4 | 28,6 | 14,3 | | | | | | | | | | | 35,7 | 21,4 | 42,9 | |
| | | 2,8 | 18,2 | 7,7 | 49,9 | 16,5 | 0,3 | 4,6 | | | | | | | | | | 78,6 | 16,5 | 4,7 | |
| TLS | | | | 10,0 | 3,3 | 36,7 | 23,3 | 26,7 | | | | | | | | | | 73,3 | - | 26,7 | <i>E. cass.</i> <i>E. gall.</i> raff.-Gruppe <i>E. avium</i> andere (hd) |
| | | | | | 11,5 | 42,3 | 26,9 | 19,2 | | | | | | | | | | 80,8 | - | 19,2 | |
| | | | | 2,2 | 4,4 | 24,4 | 33,3 | 35,6 | | | | | | | | | | 64,4 | - | 35,6 | |
| | | | | | 6,7 | 20,0 | 26,7 | 46,7 | | | | | | | | | | 53,3 | - | 46,7 | |
| | | | | 3,7 | 5,7 | 33,0 | 25,9 | 31,6 | | | | | | | | | | 68,4 | - | 31,6 | |
| TPL | | | 46,7 | 46,7 | 6,7 | | | | | | | | | | | | | 100,0 | 0 | 0 | <i>E. cass.</i> <i>E. gall.</i> raff.-Gruppe <i>E. avium</i> andere (hd) |
| | | | 84,6 | 15,4 | | | | | | | | | | | | | | 100,0 | 0 | 0 | |
| | | | 82,2 | 13,3 | 2,2 | | | | | | | | | | | | | 100,0 | 0 | 0 | |
| | | | 93,3 | 6,7 | | | | | | | | | | | | | | 100,0 | 0 | 0 | |
| | | | 97,2 | 2,3 | | 0,3 | 0,3 | | | | | | | | | | | 100,0 | 0 | 0 | |
| VAN | | | | 6,7 | 3,3 | 16,7 | 53,3 | 20,0 | | | | | | | | | | 80,0 | 20,0 | 0 | <i>E. cass.</i> <i>E. gall.</i> raff.-Gruppe <i>E. avium</i> andere (hd) |
| | | | | 3,8 | 3,8 | 3,8 | 57,7 | 30,8 | | | | | | | | | | 69,2 | 30,8 | 0 | |
| | | | | 68,9 | 6,7 | 8,9 | 15,6 | 0 | | | | | | | | | | 100,0 | 0 | 0 | |
| | | | | 40,0 | 33,3 | 13,3 | 6,7 | 6,7 | | | | | | | | | | 93,3 | 6,7 | 0 | |
| | | | | 75,9 | 20,5 | 2,6 | 0,9 | 0 | | | | | | | | | | 100,0 | 0 | 0,0 | |
| | 0,06 | 0,13 | 0,25 | 0,50 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 | 512 | 1024 | 2048 | 4096 | %S | %I | %R | |

¹ Zahlen am linken Ende des untersuchten Konzentrationsbereichs stehen für Isolate mit MHK-Werten ≤ der angegebenen Konzentrationsstufe
² Zahlen am rechten Ende des untersuchten Konzentrationsbereichs stehen für Isolate mit MHK- Werten ≥ der angegebenen Konzentrationsstufe

sensibel
 intermediär
 resistent
 untersuchter Konzentrationsbereich

* Antibiotika-Kürzel vgl. Tabelle 4

Aus den MHK-Daten der *Enterococcus spp.*-Feld-Isolate ergibt sich unter Berücksichtigung des speziesspezifischen Intermediär- und Resistenzverhaltens folgendes Bild:

Hohe Resistenzraten finden sich – mit Spezies-Variationen – gegenüber Erythromycin (23–57 %), Fosfomycin (20–53 %), Rifampicin (30–53 %), Tylosin (19–47 %) und Doxycylin (10–53 %). Als natürlich sensibel gegen Clindamycin sind (gemäß der MHK-Werte der DSM-Referenzstämme) nur Spezies aus der *hirae/durans*-Gruppe einzustufen; des Weiteren kamen Clindamycin-sensible Isolate in der *E. raffinosus*-Gruppe vor; alle anderen untersuchten Spezies sind als intrinsisch resistent zu betrachten. Die erworbene Clindamycin-Resistenz von Isolaten aus der *E. raffinosus*-Gruppe lag bei 58 %; in der *hirae/durans*-Gruppe erwiesen sich 72 % der Isolate als Clindamycin-resistent.

Die Resistenzraten gegenüber den Fluorquinolonen streuten von ca. 1–2 % (Moxifloxacin: 0,3 %) bei der *hirae/durans*-Gruppe bis hin zu 13 % (Enrofloxacin) bzw. 20 % (Ciprofloxacin) bei der Spezies *E. avium* (Moxifloxacin: 6,7 %); ähnlich verhält es sich bezüglich Chloramphenicol. Gentamicin-hochresistente Isolate gehörten der *E. raffinosus*-Gruppe (drei Isolate aus einer Probe), sowie der *hirae/durans*-Gruppe an (zwei Proben). Nur innerhalb der Spezies *E. gallinarum* traten keine Streptomycin-High-Level-resistenten Bakterien auf.

Gegen Imipenem fanden sich 0 bis 11 % resistente Isolate. Mezlocillin-resistente Isolate gehörten zur Speziesgruppe *hirae/durans* (vier Isolate aus vier Proben). Auch Nitrofurantoin-resistente Isolate traten ausschließlich innerhalb dieser Speziesgruppe auf; letztere Ergebnisse sind aufgrund der intermediären Resultate des *E. durans*-DSM-Stammes gegenüber Nitrofurantoin sowie wegen der absolut höchsten Fallzahlen in dieser Gruppe vorsichtig zu interpretieren.

2.7 Clostridium spp.

Relative Häufigkeitsverteilung der MHK-Werte

Tabelle 27 stellt die MHK-Daten der Gattung *Clostridium* dar. Daraus geht für diese Gattung im intergenerischen Vergleich mit *E. coli*, *Enterococcus spp* sowie *Lactobacillus spp.* eine vergleichsweise günstige Resistenzsituation hervor.

Tabelle 27: Prozentuale Verteilung der MHK-Werte von Clostridien-Isolaten (n = 536) aus Schweinegülle

| Wirkstoff | Antibiotikakonzentration (mg/l) | | | | | | | | | | | | | | % S | % I | % R | |
|-----------|---------------------------------|------|-------------------|------|------|------|------|------|------|------|------------------|------|-----|-----|-----|-------|------|------|
| | 0,03 | 0,06 | 0,13 | 0,25 | 0,5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 | | | | 512 |
| AMP* | | | 50,2 ¹ | 32,1 | 12,5 | 3,7 | 0,6 | 0,4 | 0,4 | | 0,2 ² | | | | | 99,1 | 0,7 | 0,2 |
| AMC | | | 74,3 | 18,7 | 5,2 | 0,7 | 0,4 | 0,4 | 0,2 | 0,2 | | | | | | 99,3 | 0,6 | 0,2 |
| CEZ | | | 40,4 | 13,7 | 8,1 | 14,0 | 20,0 | 2,8 | 0,4 | | 0,6 | | | | | 76,2 | 22,8 | 0,9 |
| CIP | | | | 44,6 | 32,6 | 5,2 | 10,8 | 5,8 | 0,7 | 0,2 | | | | | | 82,5 | 10,8 | 6,7 |
| CLI | | 33,8 | 11,2 | 9,1 | 10,3 | 9,5 | 6,7 | 5,2 | 2,8 | 11,4 | | | | | | 73,9 | 11,9 | 14,2 |
| CMP | | | | | | | 85,3 | 13,6 | 0,6 | | 0,4 | 0,2 | | | | 99,4 | - | 0,6 |
| CXM | | | | | | 62,1 | 19,3 | 13,6 | 2,8 | 2,2 | | | | | | 95,0 | 2,8 | 2,2 |
| DOX | | | 32,5 | 23,2 | 21,3 | 7,5 | 5,6 | 8,4 | 1,5 | | | | | | | 84,5 | 14,0 | 1,5 |
| ENR | | 9,5 | 12,5 | 42,4 | 14,8 | 3,7 | 10,3 | 6,4 | 0,4 | | | | | | | 64,5 | 28,8 | 6,7 |
| ERY | | 0,9 | 2,8 | 13,9 | 10,7 | 15,5 | 14,2 | 27,5 | 4,7 | 9,7 | | | | | | 43,8 | 41,8 | 14,4 |
| FLL | | | | | | | 98,1 | 1,9 | | | 0,2 | 0,2 | | | | 99,6 | - | 0,4 |
| FOS | | | | | | | | | 22,8 | 28,4 | 29,9 | 14,4 | 4,7 | | | 81,0 | - | 19,0 |
| IMP | | | 89,7 | 6,5 | 0,9 | 1,7 | 0,7 | 0,4 | | | | | | | | 99,6 | 0,4 | 0,0 |
| LIZ | | | 10,3 | 5,3 | 17,5 | 43,4 | 20,3 | 3,0 | | 0,2 | | | | | | 96,8 | 3,0 | 0,2 |
| MOX | | 9,0 | 15,3 | 15,1 | 55,4 | 4,1 | 0,9 | 0,2 | | | | | | | | 98,9 | 0,9 | 0,2 |
| MTR | | | | | | | | 93,1 | 0,7 | 0,9 | 0,4 | 4,9 | | | | 93,1 | - | 6,9 |
| MZL | | | | | | | 98,7 | 0,9 | 0,2 | 0,2 | | | | | | 99,6 | 0,4 | 0,0 |
| NFT | | | | | | | | | | | 99,8 | | 0,2 | | | 99,8 | 0,2 | 0,0 |
| OXA | | | | 64,2 | 21,1 | 9,5 | 3,4 | 1,5 | 0,2 | 0,2 | | | | | | 94,8 | - | 5,2 |
| PEN | 22,1 | 33,3 | 19,8 | 11,4 | 10,7 | 1,1 | 0,4 | 0,6 | 0,7 | | | | | | | 75,1 | 23,2 | 1,7 |
| RAM | | | | | 96,5 | 2,6 | 0,9 | | | | | | | | | 99,1 | 0,9 | 0,0 |
| SYN | | | 92,4 | 4,5 | 1,7 | 0,7 | 0,2 | 0,6 | | | | | | | | 99,3 | 0,2 | 0,6 |
| TLS | | | | | 71,3 | 10,1 | 2,8 | 8,2 | 7,6 | | | | | | | 92,4 | - | 7,6 |
| TPL | | | | 96,8 | 1,7 | 1,1 | 0,2 | 0,2 | | | | | | | | 100,0 | - | 0,0 |
| VAN | | | | | 36,8 | 35,1 | 11,0 | 16,0 | 1,1 | | | | | | | 98,9 | 1,1 | 0,0 |

¹ Zahlen am linken Ende des untersuchten Konzentrationsbereichs stehen für Isolate mit MHK-Werten < der angegebenen Konzentrationsstufe
² Zahlen am rechten Ende des untersuchten Konzentrationsbereichs stehen für Isolate mit MHK- Werten ≥ der angegebenen Konzentrationsstufe

sensibel
 intermediär
 resistent
 untersuchter Konzentrationsbereich

* Antibiotika-Kürzel vgl. Tabelle 4

Die häufigste Resistenz unter den Clostridien betraf das Fosfomycin (19 %) sowie die Makrolide Erythromycin und Tylosin (14,4 und 7,6 %) und das Lincosamid Clindamycin (14,2 %). Nennenswert war zudem die Resistenz gegen die Fluorquinolone Enrofloxacin und Ciprofloxacin (6,7 %); marginal hingegen die Resistenz gegen Moxifloxacin (0,2 %). Oxacillin war in 5,2 % der Fälle von Resistenz betroffen. Gut war die Empfindlichkeit gegen Penicillin (1,7 % resistente Isolate) und Doxycyclin (1,5 % resistente Isolate), Synercid, Linezolid, Chloramphenicol, Florfenicol, Cefazolin und die Aminopenicilline (jeweils Resistenzraten unter 1 %). Keine resistenten, aber einige wenige intermediäre Isolate gab es gegenüber Mezlocillin, Imipenem, Rifampicin, Vancomycin (Spezies: *Clostridium sporogenes*) und Nitrofurantoin. Ausschließlich empfindliche Isolate fanden sich bei der Testung von Teicoplanin.

Mehrfachresistenzen

Über die Hälfte der Isolate zeigte sich allen untersuchten Wirkstoffen gegenüber vollständig empfindlich. Bei weiteren ca. 30 % der Isolate blieb die Resistenz auf Substanzen nur einer Wirkstoffklasse beschränkt. Am häufigsten war das Fosfomycin betroffen (n = 51), aber auch Fluorquinolone (n = 28) und Makrolide (n = 20). Etwa 12 % der Isolate exprimierten gleichzeitig Resistenz gegen Substanzen zweier Wirkstoffklassen; diese erstreckte sich häufig auf Makrolide und Clindamycin (n = 20), auch die Kombination Fosfomycin | Metronidazol war mehrfach vertreten (n = 9). In 5 % der Fälle dehnte sich die Resistenz auf Substanzen aus drei unterschiedlichen Wirkstoffgruppen aus; die Makrolid | Lincosamid-Resistenz wurde hier wiederholt ergänzt durch Fosfomycin-Resistenz (n = 9). Nur ein geringer Prozentsatz (um 2 %) der Isolate zeigte Resistenz gegen Substanzen aus 4 bis 5 Wirkstoffklassen; meist war eine Fosfomycin-Resistenz vorhanden, ergänzt durch beispielsweise Makrolid | Lincosamid | Penicillin bzw. Doxycyclin; aber auch Makrolid | Lincosamid | Fenicol | Metronidazol-Resistenz trat kombiniert auf.

Tabelle 28: Prozentuale Verteilung der Mehrfachresistenz sowie phänotypische Resistenzprofile von *Clostridium spp.*-Isolaten (n = 536) aus Schweinegülle

| n Resistenzen | % Isolate | | Häufigstes Resistenzprofil (% der Gesamtisolate) | |
|------------------|-----------------------|-----------------------------------|---|-----------------------|
| | Wirkstoff (n = 25) | Wirkstoff- klasse* (n = 15) | Wirkstoff | Wirkstoffklasse* |
| 0 | 52,3 | 52,3 | - | - |
| 1 | 24,8 | 28,5 | FOS (9,5) | FOS (9,5) |
| 2 | 12,1 | 12,1 | CIP ENR (3,2) | MLD LCA (3,7) |
| 3 | 5,0 | 5,2 | ERY TLS CLI (2,6) | FOS MLD LCA (1,9) |
| 4 | 4,3 | 1,7 | ERY TLS CLI FOS (1,1) | PEN FOS MLD LCA (0,6) |
| 5 | 1,1 | 0,2 | Vgl. Tabelle 29 | PEN CEF FOS MLD FEN |
| 6 | 0,2 | - | Vgl. Tabelle 29 | - |
| 7 | 0,2 | - | Vgl. Tabelle 29 | - |

* Resistenz gegen einen oder mehrere Wirkstoffe aus der genannten Klasse
Antibiotika- und Wirkstoffklassen-Kürzel vgl. Tabelle 4

Tabelle 29: Resistenzprofile hochmehrfach-resistenter *Clostridium spp.*-Isolate aus Schweinegülle

| Probe | Spezies (so differenziert) | Betriebsgröße | Betriebsart | n Resistenzen | | Profil |
|-------|---|---------------|-------------|---------------|-------------------|--------------------------------------|
| | | | | Wirkstoffe | Wirkstoffklassen* | |
| 399 | <i>Clostridium perfringens</i> | groß | Zucht | 5 | 4 | CLI ERY FLL CMP LIZ |
| 444 | | klein | Mast | 5 | 4 | DOX CLI ERY TLS FOS |
| 404 | | groß | Zucht | 5 | 4 | OXA CLI ERY TLS FOS (0,6) |
| 178 | | groß | Mast | 5 | 4 | |
| 222 | <i>Clostridium perfringens</i> | klein | Zucht | 5 | 4 | |
| 59 | | klein | Gemischt | 5 | 4 | CLI ERY TLS FOS SYN |
| 417 | <i>Clostridium fallax</i> | groß | Mast | 6 | 5 | OXA PEN CXM TLS FOS CMP |
| 413 | <i>Clostridium spp.?</i> <i>Capnocytophaga spp.?</i> | klein | Mast | 7 | 3 | AMP AMC OXA PEN CEZ CXM MTR |

* Resistenz gegen einen oder mehrere Wirkstoffe aus der genannten Klasse Antibiotika-Kürzel vgl. Tabelle 4

Traten im Genus *Clostridium* fünf oder mehr Resistenzen zugleich auf, so war, wie aus Tabelle 29 ersichtlich, in den meisten Fällen eine Makrolid | Lincosamid-Resistenz beteiligt. Zwei Isolate zeigten Resistenz gegen Chloramphenicol, ein Isolat der Spezies *Clostridium perfringens* zusätzlich Resistenz gegen Florfenicol und Linezolid. Resistenz gegen Oxacillin trat unter drei hochmehrfach-resistenten Isolaten auf, es handelte sich je einmal um *Clostridium fallax* und *Clostridium perfringens*; das dritte Isolat zeigte zusätzlich Resistenz gegen Aminopenicilline (auch in Kombination mit Clavulansäure) sowie beide untersuchte Cephalosporine und Metronidazol. Die Identifizierung dieses Isolates führte jedoch mittels des Rapid ANR-Testsystemes zu keinem eindeutigen Ergebnis; eine Abgrenzung zwischen *Clostridium* und *Capnocytophaga spp.* war nicht möglich.

2.8 Laktobazillen

Relative Häufigkeitsverteilung der MHK-Werte

Laktobazillen können speziesabhängig eine beträchtliche Zahl intrinsischer Resistenzen aufweisen (DANIELSEN et al., 2003). Da keine Speziesdifferenzierung durchgeführt wurde, sind in die Auswertung (vgl. Tabelle 30) nur solche Wirkstoffe aufgenommen, denen gegenüber keine natürliche Resistenz einzelner *Lactobacillus spp.* bekannt ist.

Tabelle 30: Prozentuale Verteilung der MHK-Werte von Laktobazillen (n = 552) isoliert aus Schweinegülle

| Wirkstoff | Antibiotika-Konzentration (mg/l) | | | | | | | | | | | | | % Sensibel | % Intermed. | % Resistent | | | |
|-----------|----------------------------------|------------------|------|------|------|------|------|------|------|------------------|-----|-----|-----|------------|-------------|-------------|-------|------|------|
| | 0,06 | 0,13 | 0,25 | 0,5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 | | | | 512 | | |
| AMP* | | 0,5 ¹ | 3,5 | 32,5 | 38,7 | 16,4 | 4,9 | 2,9 | 0,2 | 0,4 ² | | | | | | | 91,6 | 7,8 | 0,5 |
| AMC | | 1,3 | 10,3 | 39,3 | 33,2 | 10,9 | 3,8 | 0,9 | 0,4 | | | | | | | | 94,9 | 4,7 | 0,4 |
| CLI | | 73,5 | 9,4 | 4,9 | 2,0 | 0,4 | 0,7 | 0,2 | 1,5 | 7,4 | | | | | | | 90,2 | 0,9 | 8,9 |
| CMP | | | | | | 25,4 | 56,1 | 17,1 | 0,5 | 0,2 | 0,4 | 0,4 | | | | | 99,1 | 0,0 | 0,9 |
| DOX | | 1,1 | 1,5 | 3,5 | 7,6 | 21,8 | 20,7 | 10,7 | 22,0 | 11,1 | | | | | | | 13,6 | 42,5 | 43,8 |
| ERY | | 1,1 | 5,3 | 35,1 | 40,4 | 7,6 | | 0,4 | 0,2 | 10,0 | | | | | | | 89,5 | 0,4 | 10,2 |
| FLL | | | | | | 29,8 | 57,5 | 12,7 | | | | | | | | | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| IMP | | 96,2 | 0,4 | 1,3 | 0,5 | 0,7 | 0,2 | 0,2 | 0,5 | | | | | | | | 99,1 | 0,2 | 0,7 |
| LIZ | | 0,4 | 1,5 | 4,8 | 17,2 | 49,6 | 26,0 | 0,4 | | 0,2 | | | | | | | 73,4 | 26,0 | 0,5 |
| MZL | | | | | | 96,5 | 1,6 | 1,3 | 0,5 | | | | | | | | 98,2 | 1,8 | 0,0 |
| NFT | | | | | | | | | | 76,9 | 8,6 | 6,6 | 3,5 | 4,6 | | | 85,4 | 10,0 | 4,6 |
| RAM | | | | 97,6 | 1,6 | 0,4 | 0,2 | 0,2 | | | | | | | | | 99,3 | 0,4 | 0,4 |
| SYN | | 43,0 | 41,2 | 10,9 | 3,4 | 0,9 | 0,4 | 0,2 | | | | | | | | | 98,5 | 0,9 | 0,5 |
| TLS | | | | 79,9 | 6,4 | 2,9 | 0,5 | 10,2 | | | | | | | | | 89,8 | 0,0 | 10,2 |

¹ Zahlen am linken Ende des untersuchten Konzentrationsbereichs stehen für Isolate mit MHK-Werten ≤ der angegebenen Konzentrationsstufe
² Zahlen am rechten Ende des untersuchten Konzentrationsbereichs stehen für Isolate mit MHK- Werten ≥ der angegebenen Konzentrationsstufe

sensibel
 intermediär
 resistent
 untersuchter Konzentrationsbereich

* Antibiotika-Kürzel vgl. Tabelle 4

Im Gegensatz zu den Clostridien war ein großer Prozentsatz der Laktobazillen Tetracyclin-resistent (43,8 %). In der Häufigkeit folgte dann die Makrolid | Lincosamid-Resistenz (10,2 % Resistenz gegen Erythromycin und Tylosin, 8,9 % gegen Clindamycin). Resistenzen traten weiterhin auf gegen Nitrofurantoin (4,6 %) und die Aminopenicilline, Imipenem, Rifampicin, Synercid und Chloramphenicol (alle unter 1 %). Keines der Isolate war Mezlocillin-resistent. Ausschließlich empfindliche Isolate gab es nur für Florfenicol.

Mehrfachresistenzen

Wie bereits bei der Besprechung der relativen Resistenzhäufigkeit erwähnt, wurde die Analyse der phänotypischen Resistenzen bei Laktobazillen aufgrund der fehlenden Spezies-Differenzierung konservativ gehandhabt, so dass auch in die Analyse der Mehrfachresistenz nur vergleichsweise wenige Substanzen eingingen.

Die Hälfte der gesamten untersuchten Laktobazillen war gegen alle einbezogenen Wirkstoffe empfindlich. Trat Resistenz gegen Substanzen nur einer Wirkstoffklasse auf (38 % der Stämme) betraf diese nahezu stets die Tetrazykline (33 %), nur vereinzelt auch Makrolide, Nitrofurantoin oder Carbapeneme. Waren zwei Wirkstoffklassen einbezogen (6 % der Isolate), so häufig Tetrazykline und Makrolide (3 %), gefolgt von Tetrazyklinen und Nitrofurantoinen. Aber auch Kombinationen von Tetrazyklinen und Makroliden, Fenicolen, Penicillinen oder Carbapenemen kamen vor.

Trat Resistenz gegen Substanzen aus drei Wirkstoffklassen auf (6 % der Laktobazillen), so handelte es sich häufig um eine kombinierte Tetrazyklin | Makrolid | Lincosamid-Resistenz (4 %). Verteilten sich die unwirksamen Substanzen auf vier Wirkstoffklassen (2 % der Fälle), war stets eine Tetrazyklin | Makrolid | Lincosamid-Resistenz beteiligt, ergänzt durch Resistenz gegen Streptogramine, Chloramphenicol, Aminopenicilline, Carbapeneme oder Nitrofurantoin.

Tabelle 31: Prozentuale Verteilung der Mehrfachresistenz sowie phänotypische Resistenzprofile von Laktobazillen (n = 552) aus Schweinegülle

| n Resistenzen | % Isolate | | Häufigstes Resistenzprofil (% der Gesamtisolate) | |
|------------------|-----------------------|-----------------------------------|--|-----------------------|
| | Wirkstoff (n = 14) | Wirkstoff- klasse* (n = 10) | Wirkstoff | Wirkstoffklasse* |
| 0 | 50,54 | 50,54 | - | - |
| 1 | 35,33 | 35,87 | DOX (33,2) | TET (33,2) |
| 2 | 4,2 | 6,3 | DOX NFT (2,0) | TET MLD (3,3) |
| 3 | 3,8 | 5,8 | CLI ERY TLS (2,2) | TET MLD LCA (4,4) |
| 4 | 4,7 | 1,5 | DOX CLI ERY TLS (4,2) | TET MLD LCA STG (0,5) |
| 5 | 1,3 | - | Vgl. Tabelle 32 | - |
| 6 | 0,2 | - | Vgl. Tabelle 32 | - |

* Resistenz gegen einen oder mehrere Wirkstoffe aus der genannten Klasse
Antibiotika- und Wirkstoffklassen-Kürzel vgl. Tabelle 4

An der Hochmehrfach-Resistenz bei *Lactobacillus spp.* (vgl. Tabelle 32) war stets die Makrolid/Lincosamid-Kreuzresistenz sowie Resistenz gegen Doxycyclin beteiligt. Daneben bestand im Einzelfall Unempfindlichkeit gegen Synercid, Chloramphenicol Nitrofurantoin oder Aminopenicilline

Tabelle 32: Resistenzprofile hochmehrfach-resistenter Laktobazillen aus Schweinegülle

| Probe | Betriebsgröße | Betriebsart | n Resistenzen | | Profil (% der Gesamtisolate) |
|-------|---------------|-------------|---------------|-------------------|----------------------------------|
| | | | Wirkstoffe | Wirkstoffklassen* | |
| 285 | groß | Gemischt | 5 | 4 | DOX CLI ERY TLS SYN (0,6) |
| 372 | klein | Gemischt | 5 | 4 | |
| 391 | groß | Mast | 5 | 4 | |
| 396 | klein | Zucht | 5 | 4 | DOX CLI ERY CMP TLS (0,4) |
| 420 | groß | Zucht | 5 | 4 | |
| 426 | klein | Zucht | 5 | 4 | IMP DOX CLI ERY TLS (0,2) |
| 481 | groß | Zucht | 5 | 4 | DOX CLI ERY NFT TLS (0,2) |
| 117 | groß | Gemischt | 6 | 4 | AMP AMC DOX CLI ERY TLS (0,2) |

* Resistenz gegen einen oder mehrere Wirkstoffe aus der genannten Klasse
Antibiotika-Kürzel vgl. Tabelle 4

3 Verbreitung von Tetrazyklin-Resistenzgenen

3.1 Methodvalidierung

3.1.1 Qualitativer Nachweis von *tet*-Genen aus Bakterienisolaten

Da die Methode von AMINOV et al. (2001 und 2002) an den LightCycler® anzupassen war, erfolgte als Methodenkontrolle zunächst – unter Ausschluss der störenden Matrix-Effekte aus Gülle – die DNA-Extraktion aus bakteriellem Kulturmateriale und daran anschließend die Quantifizierung im LightCycler®. Als Probenmaterial dienten hierbei aus Gülle isolierte Bakterien der Gattungen *Enterococcus faecalis* und *faecium* für *tet*(M) und *tet*(O), sowie *E. coli* und *Salmonella* für *tet*(B).

tet(M)

Bei allen 21 Tetrazyklin-resistenten *Enterococcus spp.*-Isolaten führte die LightCycler®-Amplifizierung mittels der Primer für *tet*(M) zu einem einheitlichen und in der Schmelzkurven-Analyse zum Referenzstamm *Bacillus* R 89 identischen Amplifikat.

tet(O)

Aus fünf der sechs *E. faecium*- und neun der 15 *E. faecalis*-Isolate wurde zusätzlich zu *tet*(M) in der RealTime PCR mittels der Primer für *tet*(O) ein Amplifikat mit einheitlicher Schmelzkurve und einer der Zielgröße von 171 bp entsprechenden Größe gewonnen. Die Sequenzierung dieses Produktes ergab 100 % Identität (BLAST-Query) zu mehreren in der GenBank gespeicherten *tet*(O)-Gen-Sequenzen, zuvorderst zum *tet*(O)-Gen aus *Streptococcus pneumoniae*, GenBank-Nummer Y07780.1.

tet(B)

Drei der fünf *E. coli*-Isolate und alle 13 *Salmonella*-Isolate (die zwei unterschiedliche Phänotypen aus zwei Gülleproben repräsentierten) zeigten in der RealTimePCR (Primer_{*tet*B}) ein Amplifikat mit identischer Schmelzkurve und gleicher Länge in der Gelelektrophorese. Die Sequenzierung ergab 100 % Identität (BLAST-Query) zu Abschnitten mehrerer komplexer genetischer Elemente wie des Transposons Tn10 aus *Shigella flexneri* (GenBank-Nummer AF162223.1, Lokalisation 5517–5700) oder *Salmonella* Typhimurium-Plasmid R64 (AP05147.1, Lokalisation 12605–12425), aber auch zu umschriebenen *tet*(B)-Genen, beispielsweise des gramnegativen Bakteriums Tc71 (AB089595.1, Lokalisation 111–294).

3.1.2 Validierung des Nachweises von *tet*(M)-Genen in Gülle und Boden

Orientierende Quantifizierung von *tet*(M), *tet*(O) und *tet*(B) in Standardgülle mittels LightCycler®-PCR

Nachdem das LightCycler®-Protokoll an Bakterienisolaten erfolgreich erprobt worden war, folgte eine erste Untersuchung der unter Punkt C3.1.3 beschriebenen Standardgülle aus 2002. Als Standard fungierten *Bacillus* R89 für *tet*(M), *Enterococcus faecalis* 3952 für *tet*(O) und *E. coli* 2628 für *tet*(B). Die ermittelten Gehalte an Resistenzgen-Kopien in Gülle Chlortetrazyklin-gefütterter bzw. Chlortetrazyklin-frei gehaltener Schweine stellt Tabelle 33 gegenüber. Der Übersichtlichkeit halber sind in dieser Tabelle auch bereits die später ermittelten Gehalte der Standardgülle aus 2003 und 2004 aufgeführt.

Tabelle 33: Gehalt ausgewählter Tetrazyklin-Resistenzgene in Schweinegülle von Chlortetrazyklin-gefütterten Schweinen und Kontrolltieren

| Gülle | Gen-Gehalt (log copies/g) | | |
|-----------------|---------------------------|---------------|---------------|
| | <i>tet(M)**</i> | <i>tet(O)</i> | <i>tet(B)</i> |
| CTC* 2002 | 7,62 | 7,13 | 5,53 |
| „ohne CTC“ 2002 | 7,17 | 6,25 | 3,84 |
| CTC* 2003 | 7,97 | 6,65 | 5,93 |
| „ohne CTC“ 2003 | 7,39 | 6,35 | 5,43 |
| CTC* 2004 | 8,16 | 6,90 | 5,95 |
| „ohne CTC“ 2004 | 7,71 | 6,07 | 5,29 |

* Chlortetrazyklin; einheitliche Dosierung vgl. Punkt C 3.1.2

** der *tet(M)*-Gehalt der Gülle ist zu den später ermittelten Gehalten der Praxisgülle nicht unmittelbar vergleichbar, da hier ein purer *Bacillus* R89-Standard angewendet wurde, während für Praxisgülle durch die Verwendung eines R89-Extraktes aus Gülle eine indirekte Korrektur um die Wiederfindungsrate (von ca. 25 %) erfolgte.

Externe Sequenzierung der *tet(M)*-Amplifikate aus Gülle

Zur Identifizierung der mittels der verwendeten *tet(M)*-Primer erzeugten Amplifikate aus *Bacillus* R89 einerseits und Praxisgülle andererseits wurden ausgewählte Proben zur externen Sequenzierung an die Firma Sequiserve (Vaterstetten) gesandt. Die Sequenzierung ergab für alle eingesandten Amplifikate dieselbe, zu Abschnitten des *tet(M)*-Genes identische Basen-Zusammensetzung, abgesehen von einer Praxisgülle, die Übereinstimmung in 163 von 171 Basen zeigte, jedoch an acht Stellen Mischbasen aufwies. Ergebnisse der externen Gensequenzierung und deren Abgleich in NCBI nBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>; ALTSCHUL et al., 1997) über eine Länge von 150 Basen zeigt Tabelle 34.

Tabelle 34: Abgleich der extern ermittelten Gensequenzen präsumptiver *tet(M)*-Amplifikate aus Schweinegülle mit der Gendatenbank „NCBI-Nucleotide“ (nBLAST)

| Query | Base-Alignement |
|---|--|
| PCR-Amplifikate (1-50) <i>tet(M)</i> aus R89* (219-170) | CTTCGTATTTTCCCAGTAAAAGAGGTTATTCCTGTCTGAATTGTAATTC CTTCGTATTTTCCCAGTAAAAGAGGTTATTCCTGTCTGAATTGTAATTC |
| PCR-Amplifikate (51-100) <i>tet(M)</i> aus R89 (169-120) | CTCTCTGACGTTCTAAAAGCGTATTATCCGTCCTCGTTGTACCTTTGTCC CTCTCTGACGTTCTAAAAGCGTATTATCCGTCCTCGTTGTACCTTTGTCC |
| PCR-Amplifikate (101-150) <i>tet(M)</i> aus R89 (119-70) | ACGCTTCCTAATTCTGTAATCGCTCCACTGTTATATAATAAGCTTTCTGT ACGCTTCCTAATTCTGTAATCGCTCCACTGTTATATAATAAGCTTTCTGT |

| | Basen-Übereinstimmungen (gesamt: 100 %)

* *Bacillus* R89, Gen-Bank-Identität: AF491293.1 – GI: 20334956

Erzeugung einer *tet(M)* freien Standardgülle

Die γ -Bestrahlungs-unabhängigen Effekte (Auftauprozess und mehrtägige Lagerung bei Raumtemperatur) verringerten den Ausgangsgehalt der zu bestrahlenden Gülle von 10^7 auf 10^6 Kopien pro Gramm. Die anschließende γ -Bestrahlung reduzierte den *tet(M)*-Gehalt der Gülle weiter um ca. eine Zehnerpotenz je 54 kGy (vgl. Abbildung 13).

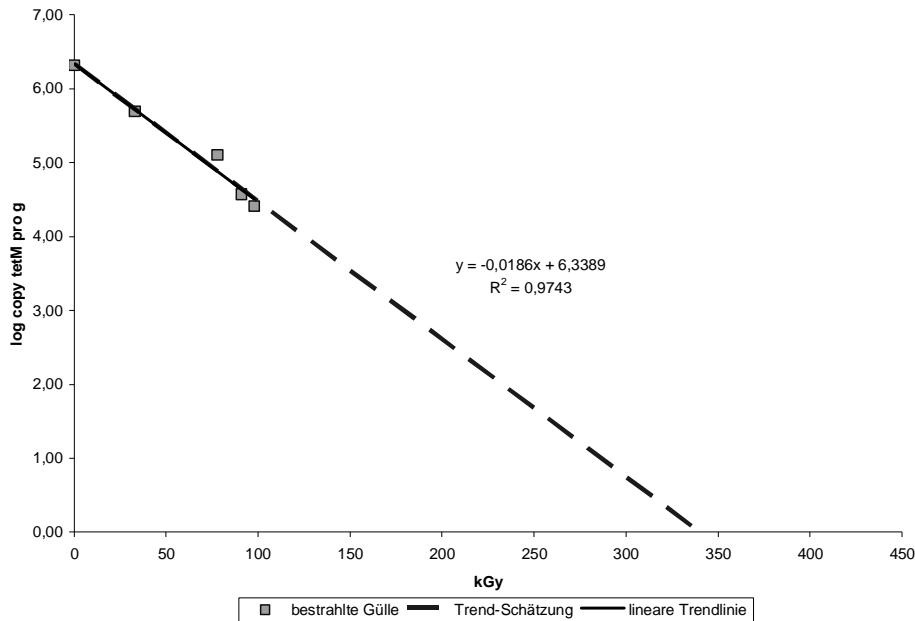


Abbildung 13: Einfluss der Bestrahlungsdosis auf die Anzahl amplifizierbarer *tet(M)*-Kopien in Gülle

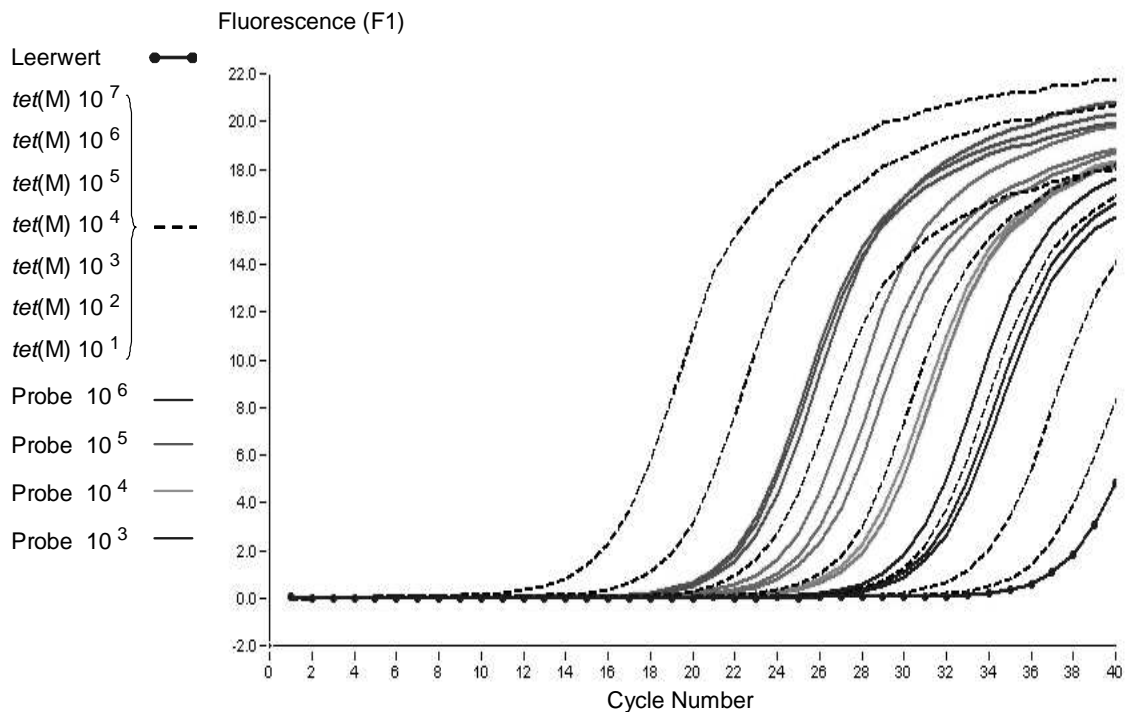
Aufgrund dieser Resultate wurde die Gülle mit 409 kGy bestrahlt. Danach war in dem mittels UltraClean™ Soil DNA Isolation Kit gewonnenen Extrakt zunächst kein *tet(M)*-Gen mehr nachweisbar. Die Amplifikation des mittels PowerSoil™ DNA Isolation Kit gewonnenen Extraktes ergab allerdings ein *tet(M)*-PCR-Produkt in Höhe von 2,4 \log_{10} im PCR-Aliquot (dies entspricht ca. 4,3 \log_{10} pro Gramm).

Es konnte nicht abschließend geklärt werden, ob es sich bei diesem *tet(M)*-Produkt um Restgehalt der bestrahlten Gülle oder eine eventuelle Kontamination während des Extraktionsprozesses handelte (PCR-Leerwert negativ; Extraktions-Leerwerte beider Kits teils niedrig-positiv bis 3 \log_{10} /PCR). Die Höhe dieses *tet(M)*-(Rest?)-Gehaltes betrug jedoch nur 0,008 bis maximal 0,3 % der tatsächlichen Konzentrationen in Gülle.

Um Konflikte mit eventueller Kontamination zu vermeiden, wurde für die Untersuchung der Feldproben ein „Cut off“ bei 3,5 \log_{10} gesetzt.

Wiederfindungsraten

Abbildung 14 stellt die PCR-Kurve zur Amplifizierung der mittels Power Kit extrahierten dotierten Gülle im Konzentrationsbereich 10^6 bis 10^3 dar.



Probe = Standardgülle nach Kobaltbestrahlung, dotiert mit *Bacillus* R89, Power Kit Extraktion (je n = 3)

tet(M) = *Bacillus* R 89- Reinkultur

$10^7 \dots 10^1$ = n copies tet(M) je PCR-Ansatz

Abbildung 14: PCR-Amplifikation von tet(M): Standard und dotierte Gülle

Den Fluoreszenz-Anstieg des Leerwertes nach PCR-Zyklus 34 identifiziert die Schmelzkurven-Analyse (vgl. Abbildung 15) als Artefakt, verursacht durch die Zusammenlagerung der Primer zu so genannten „Primer-Dimeren“: Da sich der Fluoreszenz-Farbstoff SYBR-Green[®] unspezifisch an jede doppelsträngige DNA anlagert, erzeugen diese Fehlprodukte ebenfalls ein Fluoreszenzsignal. Die Schmelzkurvenanalyse jedoch signalisiert die von der Basenzusammensetzung abhängige und insofern produkt-spezifische Temperatur, bei der die Separierung der Doppelstränge ihre maximale Geschwindigkeit erreicht; Primer-Dimere oder andere Fehlamplifikate sind, wie Abbildung 15 zeigt, klar unterscheidbar.

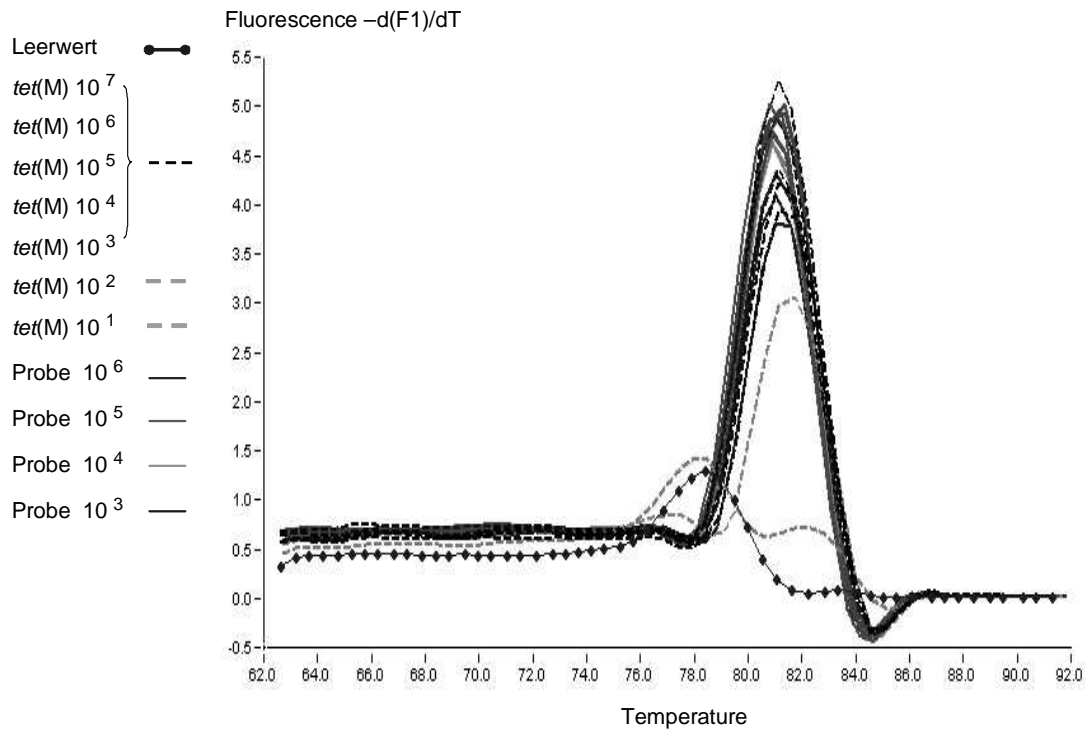


Abbildung 15: Schmelzkurven-Analyse der Amplifikate aus Abbildung 14, Legende vgl. dort

Die im Dotierungsversuch (Punkt C3.2.5) ermittelten Wiederfindungsraten in den jeweiligen Konzentrationsbereichen aus Gülle- und Bodenproben zeigt Tabelle 35. Daraus geht hervor, dass bei der Untersuchung von Gülle die besten Resultate mittels PowerSoil™ DNA Isolation Kit erzielt worden sind. Allerdings wird die Qualität der Ergebnisse durch die Konzentrations-abhängige Variation der Wiederfindungs-raten eingeschränkt.

Die mittlere Wiederfindungsrate aus Bodenproben (Grünland, Kempten) lag erheblich unter der Wiederfindungsrate desselben Kits in Gülleproben (24,04 % in Gülle vs. 1,75 % in Bodenproben). Dies war jedoch nicht in erster Linie auf mangelnde Extraktion der DNA, sondern primär auf Inhibition der PCR zurückzuführen: Eine 1:10 Verdünnung der Extrakte (und damit die Verdünnung auch der Inhibitoren) erhöhte die errechnete Wiederfindungsrate um das 5- bis 380fache auf 20 bis 78 %.

Tabelle 35: Wiederfindungsraten [% (\pm s)] für *tet(M)*-Gene aus *Bacillus* R89 in Gülle- und Bodenproben (3 Wiederholungen)

| Untersuchungs- material | Extraktions- Kit | Verhältnis Keimsuspension zu Probe (v:v) | <i>tet(M)</i> -Gene je PCR-Ansatz | | | | | |
|----------------------------|---|--|-----------------------------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|--------------------|
| | | | 10^7 | 10^6 | 10^5 | 10^4 | 10^3 | 10^2 |
| Gülle | PowerSoil™ DNA - Isolation Kit | 1:5 | n.d. | 16,39 (3,16) | 29,94 (11,95) | 49,03 (5,01) | 91,45 (36,02) | 136,09 (119,39) |
| | PowerSoil™ DNA - Isolation Kit | 1:10 | 22,33 (14,34) | 26,66 (0,40) | 20,10 (8,71) | 21,91 (2,95) | 15,82 (6,71) | 37,44 (17,26) |
| | UltraClean™ Soil DNA- Isolation Kit | 1:5 | n.d. | 7,89 (1,17) | 7,52 (2,86) | 6,82 (0,43) | 6,97 (2,47) | 20,85 (20,85) |
| Boden | PowerSoil™ DNA - Isolation Kit | 1:10 | 3,83 (2,59) | 2,18 (1,00) | 0,50 (0,54) | 3,45 (4,47) | 0,21 (0,27) | 0,32 (0,20) |

n.d.: nicht durchgeführt

3.2 Ausscheidungskinetik von Tetrazyklin-Resistenzgenen während einer Chlortetrazyklin-Applikation beim Schwein

Um einzuschätzen, inwieweit sich die orale Anwendung von Tetrazyklinen beim Schwein tatsächlich nachvollziehbar auf die Gehalte der Tetrazyklin-Resistenzgene in Faeces beim Schwein auswirkt, wurden Proben der zur Erzeugung der Chlortetrazyklin-haltigen Standardgülle herangezogenen Schweine untersucht.

3.2.1 *tet(O)* 2002

Mittels der direkten DNA-Extraktion aus Faeces und der anschließenden Amplifizierung des (*tet*)O-Genes in der Real-Time PCR ließen sich deutliche Veränderungen im *tet(O)*-Gehalt während und nach CTC-Fütterung erkennen.

Von Tag 1 bis zum Ende der Chlortetrazyklin (CTC)-Fütterung stieg der mittlere *tet(O)*-Gehalt – mit Tag zu Tag und Tier zu Tier-Schwankungen – insgesamt kontinuierlich an. Der minimale *tet(O)*-Wert (Einzeltier T7: 5,96; Mittelwert: 6,92 log₁₀) wurde gemessen an Tag 1. Das Maximum (Einzeltier T8: 9,05; Mittelwert: 8,45) wurde erst an Tag 6 der Abklingphase (nach Absetzen des CTC) erreicht (vgl. Abbildung 16).

Noch zwei Wochen nach Absetzen des Chlortetrazyklins lagen der Mittelwert wie auch die Einzelwerte von fünf der sechs Tiere über den Ausgangswerten an Tag 1.

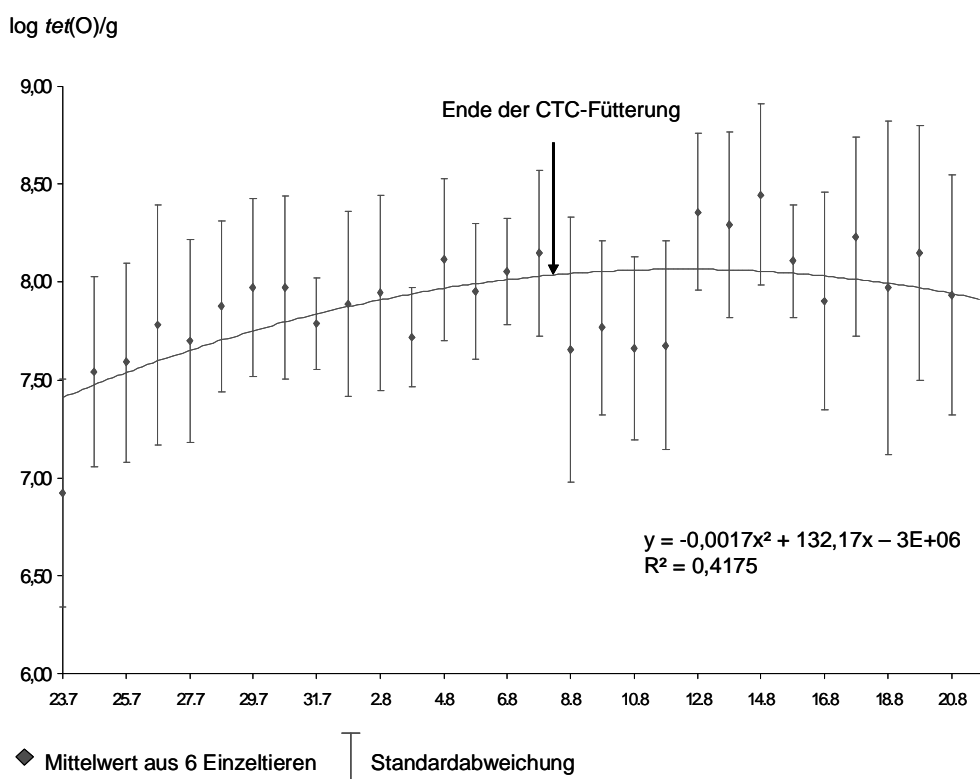


Abbildung 16: *tet(O)*-Gehalte in Schweine-Faeces während und nach Chlortetrazyklin-Fütterung

Statistisch unterschied sich im One-Way-ANOVA Verfahren (Holm-Sidak-post-hoc-Test, SigmaStat 3.10) der Mittelwert aller Einzeltiere zu Fütterungsbeginn signifikant von den zusammengefassten Werten aller Tage und Tiere während der CTC-Fütterung ($p \leq 0,001$, Differenz der Mittelwerte 1,07) und in der Abklingphase ($p \leq 0,001$, Differenz der Mittelwerte 1,25), jeweils mit niedrigeren Werten zu Fütterungsbeginn.

Auch die Werte der CTC-Fütterung und der Abklingphase untereinander unterschieden sich signifikant ($p = 0,02$, Differenz der Mittelwerte 0,18); die höheren Werte wurden hierbei in der Abklingphase erreicht; Tag zu Tag und Tier zu Tier-Schwankungen waren in der Abklingphase ausgeprägter als unter CTC-Fütterung.

Dies zeigt, dass die *tet(O)*-Gehalte nicht nur über das Therapie-Ende hinaus erhöht blieben, sondern sogar mit Absinken der Tetracyclin-Konzentrationen zunächst signifikant weiter anstiegen, ehe 4 bis 6 Tage nach Absetzen des Wirkstoffes die *tet(O)*-Ausscheidungskurve einen Wendepunkt erreichte.

Der Mittelwert des *tet(O)*-Gehaltes der Faeces aller CTC-gefütterten Tiere während der CTC-Fütterung (= dem Zeitraum der „Positiv“-Standardgülle-Gewinnung) lag mit 7,87 log copies/g bei gleichem Quantifizierungsstandard etwas höher als der *tet(O)*-Gehalt der „Positiv“- (CTC) Gülle (7,13 log copies/g); dies erklärt sich zum Teil dadurch, dass in der Gülle eine Verdünnung der Gehalte in Faeces durch den Harn von rund 1:1 erfolgt war.

3.2.2 *tet(M)* 2004

Während einer weiteren CTC-Fütterung im Jahr 2004 konnten zusätzlich zu den Proben der CTC-gefütterten Versuchstiere auch Proben der durch die Haltung im Stoffwechsellkäfig räumlich separierten, jedoch nicht baulich getrennt gehaltenen Kontrolltiere (keine CTC-Behandlung) untersucht werden. Aus betrieblichen Gründen war die Gewinnung von Vergleichsproben vor und zu Beginn der CTC-Fütterung nicht möglich; der Kurvenverlauf ist daher zu dem unter Punkt 3.2.1 gezeigten nicht vergleichbar. Ergebnisse der Untersuchung zum *tet(M)*-Gehalt in Faeces von Versuchs- und Kontrolltieren zeigt Abbildung 17.

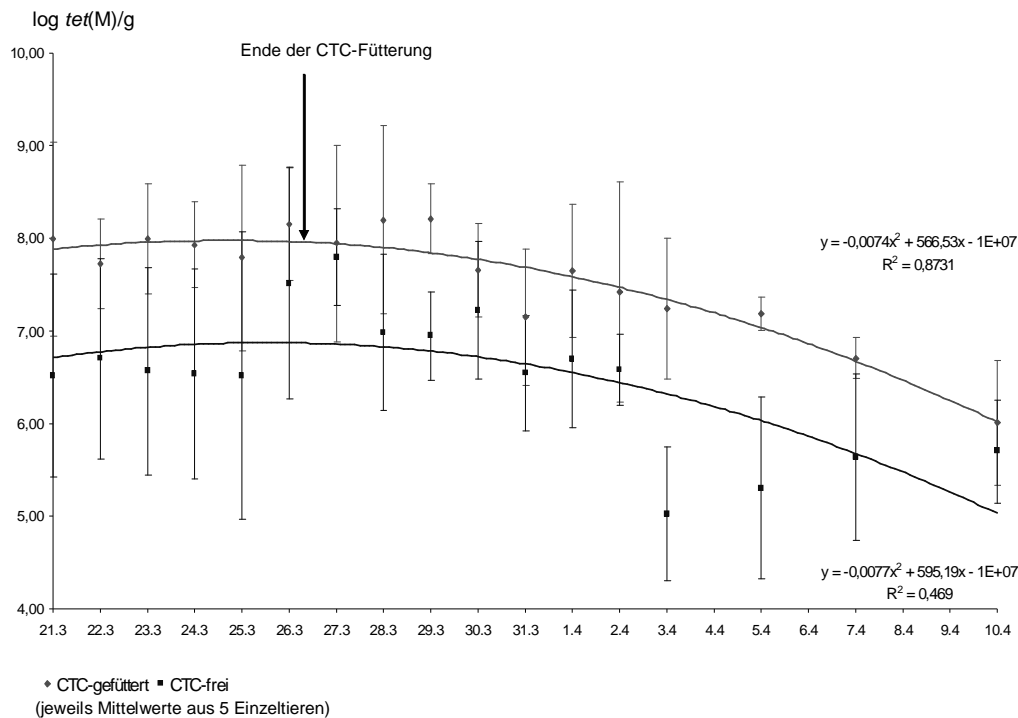


Abbildung 17: *tet(M)* Gehalte in Faeces von Schweinen eines Stallgebäudes mit Chlortetracyclin-haltiger und -freier Fütterung

Die *tet(M)*-Gehalte zwischen Versuchs- und Kontrolltieren differierten durchschnittlich um den Faktor 10. Die über Umweltfaktoren (Stallluft, Insekten) mit den Versuchstieren mittelbar in Kontakt stehenden Kontrolltiere zeigten einen Parallelverlauf der *tet(M)*-Gehalte mit den Versuchstieren, auf insgesamt niedrigerem Niveau und mit höheren Tier zu Tier und Tag zu Tag Schwankungen.

3.3 Tetrazyklin-Resistenzgene in Schweinegülle

tet(M)

Die Gehalte der Feldproben an *tet(M)* bewegten sich in Bereichen von 6,78 bis 9,39 \log_{10} Kopien pro Gramm Gülle (Median: 8,12; Mittelwert: 8,19).

Es zeigte sich ein hochsignifikanter ($p < 0,001$) Einfluss des Merkmales „Beprobungszeitpunkt“, mit einem partiellen Eta-Quadrat von 0,13. Das partielle Eta-Quadrat stellt ein Effektstärkemaß dar und definiert den anteiligen Einflussgrad des untersuchten Faktors im Gesamtmodell. Die im Frühjahr 2003 gewonnenen Proben wiesen deutlich höhere *tet(M)*-Gehalte auf als die im Herbst 2002 gezogenen Proben.

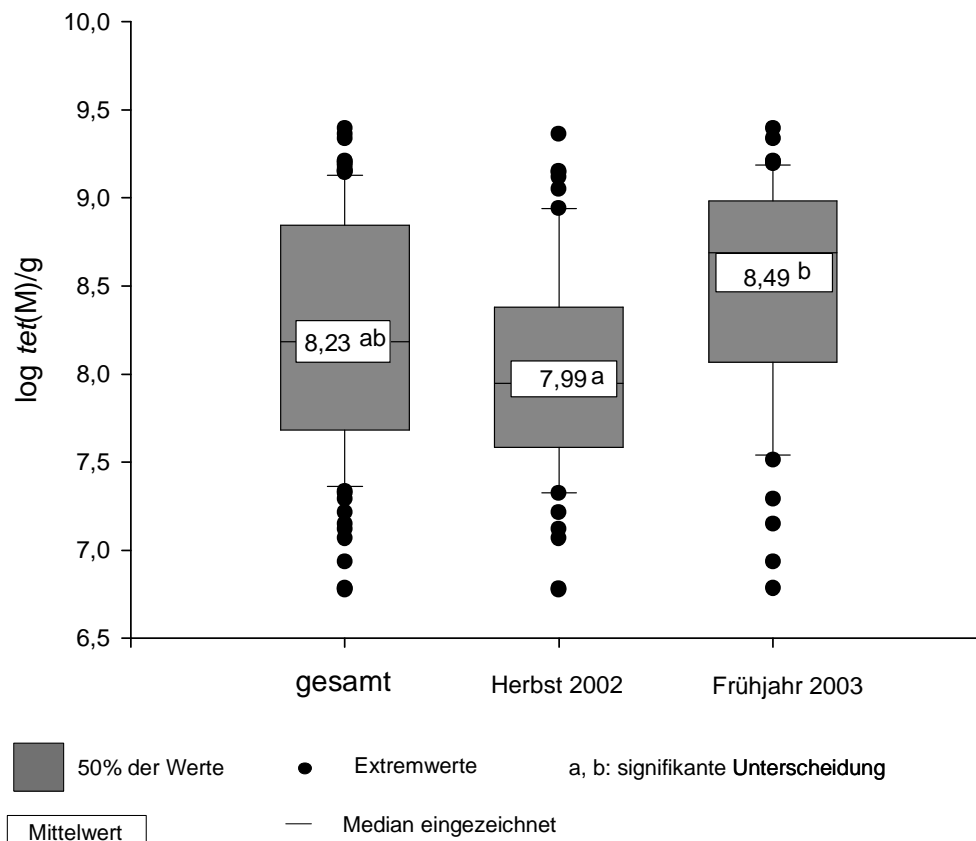


Abbildung 18: *tet(M)*-Gehalte in Abhängigkeit vom Beprobungszeitpunkt

Zudem ergab sich im Modell ein signifikanter ($p = 0,047$), wenn auch geringer Einfluss der Kovariaten „aerobe Gesamtkeimzahl“ (partielles Eta-Quadrat 0,04). Untersuchung auf Korrelation nach Pearson zeigte die aerobe Gesamtkeimzahl mit dem *tet(M)*-Gehalt signifikant positiv korreliert ($p = 0,005$, $\text{Korrelationskoeffizient}_{\text{Pearson}} = 0,258$).

tet(O)

Die Gehalte bewegten sich insgesamt zwischen 5,11 und 8,36 \log_{10} copies *tet(O)*/g, der Median lag bei 6,97, der Mittelwert bei 6,89 copies *tet(O)*/g.

Wie schon für *tet(M)* war ein signifikanter Einfluss des Beprobungszeitraums zu erkennen (Frühjahr > Herbst, $p = 0,001$, mittlere Differenz = -0,338, partielles Eta-Quadrat 0,1, vgl. Abbildung 19), ebenso der aeroben Gesamtkeimzahl ($p = 0,005$, partielles Eta-Quadrat 0,08). Aerobe Gesamtkeimzahl und *tet(O)*-Gehalt waren signifikant positiv korreliert ($p < 0,001$, Korrelationskoeffizient_{Pearson} = 0,321).

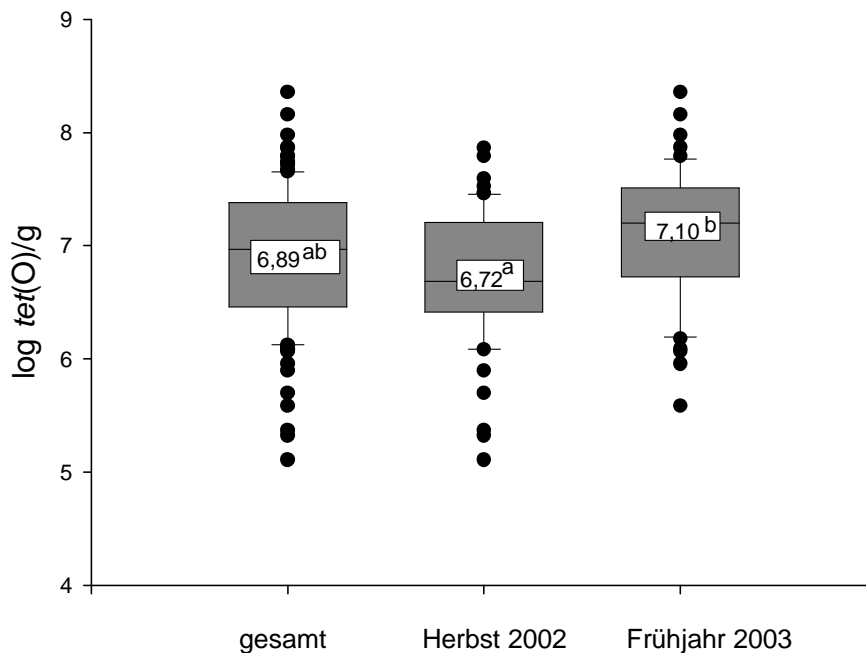


Abbildung 19: *tet(O)*-Gehalte in Gülle in Abhängigkeit vom Beprobungszeitraum; Legende vgl. Abbildung 18

Zusätzlich zu den bei *tet(M)* bereits zu Tage getretenen Einflüssen war bei *tet(O)* auch ein Einfluss des Betriebstyps zu beobachten ($p = 0,031$, partielles Eta-Quadrat = 0,07): Der mittlere *tet(O)*-Gehalt lag in Zuchtbetrieben signifikant höher als in Gemischtbetrieben ($p = 0,011$, Mittelwerte 7,08 vs. 6,75); der Unterschied zwischen Zucht- und Mastbetrieben (Mittelwert_{Mast} 6,95) war grenzwertig nicht-signifikant ($p = 0,057$); siehe hierzu Abbildung 20.

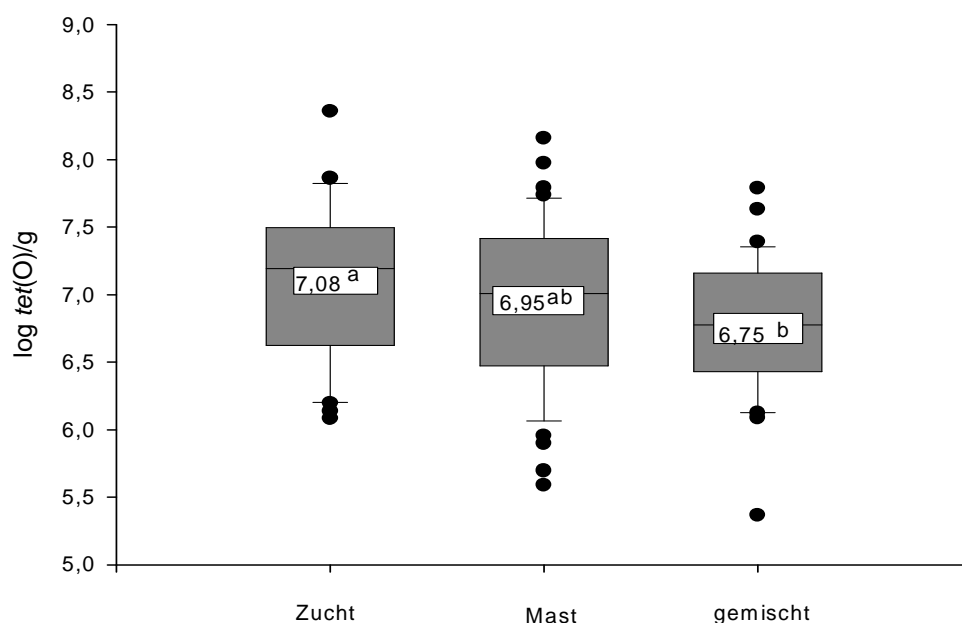


Abbildung 20: *tet(O)*-Gehalte in Gülle in Abhängigkeit vom Betriebstyp; Legende vgl. Abbildung 18

tet(B)

Insgesamt lagen die *tet(B)*-Gehalte deutlich niedriger als die *tet(O)*-Gehalte (die methodisch gleich erhoben worden waren); jedoch sind möglicherweise im *tet(O)* und *tet(B)*-Standard-Stamm jeweils unterschiedliche Kopien-Zahlen vorhanden. Die Differenz der Mittelwerte von *tet(O)* und *tet(B)* betrug mehr als eine Zehnerpotenz.

Die logarithmierten Gehalte reichten von 4,00 bis 7,68 \log_{10} copies pro Gramm, der Mittelwert lag bei 5,81 \log_{10} .

Auch hier gab es einen signifikanten Einfluss des *Beprobungszeitraumes* (Frühjahr > Herbst, $p < 0,001$, mittlere Differenz 0,57, partielles Eta-Quadrat = 0,15) und der *aeroben Gesamtkeimzahl* ($p = 0,047$, partielles Eta-Quadrat = 0,04; positive Korrelation mit $p = 0,024$ und Korrelationskoeffizient_{Pearson} = 0,212).

3.4 Tetrazyklin-Resistenzgene im Boden

Aufgrund der starken Inhibition der PCR durch Bodenbestandteile wurden alle Proben sowohl als Original-Extrakt als auch in der 1:10-Verdünnung untersucht. Ergebnisse zeigt Tabelle 36. Wie schon ausgewählte Amplifikate aus Gülleproben wurde auch ein *tet(M)*-Amplifikat aus einer Bodenprobe extern sequenziert. Ergebnis des Abgleichs der ermittelten Sequenz mittels NCBI nBLAST war die vollständige Übereinstimmung der 171 Basen umfassenden Sequenz mit dem Genabschnitt Position 70–240 des *tet(M)*-Genes aus *Bacillus* R89, Gen-Bank-Identität: AF491293.1 – GI: 20334956.

Tabelle 36: *tet*-Gen-Gehalte in Bodenproben (Oberboden 1-10 cm) vor und nach Behandlung mit Chlortetrazyklin-haltiger Gülle

| Versuch | Tet-Gen-Gehalte der Gülle | Probennahme | log <i>tet</i> (M)/g* | | log. <i>tet</i> (O)/g | | log <i>tet</i> (B)/g | |
|------------------------------|--|--------------|-----------------------|--------------|-----------------------|--------------|----------------------|--------------|
| | | | 1:1 | 1:10 x 10 | 1:1 | 1:10 x 10 | 1:1 | 1:10 x 10 |
| V1 (Acker, Pulling) | <i>tet</i> (M): 7,97 <i>tet</i> (O): 6,65 <i>tet</i> (B): 5,93 | 24.04.2003** | - | - | - | - | - | - |
| | | 16.05.2003 | - | - | - | - | - | - |
| | | 27.06.2003 | - | - | - | - | - | - |
| | | 10.07.2003 | - | - | - | - | - | - |
| | | 25.07.2003 | +*** | - | - | - | - | - |
| V2 (Acker, Pulling) | <i>tet</i> (M): 8,16 <i>tet</i> (O): 6,90 <i>tet</i> (B): 5,95 | 21.04.2004** | 1,32 | 0,72 | 1,88 | - | - | - |
| | | 22.04.2004 | 3,07 | 2,20 | 2,51 | 1,06 | - | - |
| | | 29.04.2004 | 4,81 | 6,11 | 3,82 | 4,85 | 4,57 | 5,63 |
| | | 12.05.2004 | - | - | - | - | - | - |
| | | 27.05.2004 | - | - | - | - | - | - |
| | | 13.05.2004** | - | 2,29 | - | 2,45 | - | - |
| V3 (Grünland, Kempten) | <i>tet</i> (M): 8,16 <i>tet</i> (O): 6,90 <i>tet</i> (B): 5,95 | 21.05.2004 | 3,52 | 4,44 | - | 3,78 | 2,68 | - |
| | | 26.05.2004 | 3,10 | 3,97 | - | 3,54 | - | - |
| | | 04.06.2004 | 1,68 | 3,82 | - | 3,14 | - | - |
| | | 09.06.2004 | 2,18 | 2,60 | - | 3,23 | - | - |
| | | 02.07.2004 | 1,75 | 1,98 | - | 3,21 | - | - |
| 02.08.2004 | - | - | - | - | - | - | | |

* Mittelwert aus drei Extraktionen

** unmittelbar vor Gülleausbringung

*** < 0,76

Demnach gelang der positive Nachweis von *tet*-Genen in Ackerland-Bodenproben aus einer Tiefe von bis zu 10 cm (vor und nach Gülle-Düngung) im Versuch V2, Pulling, am Tag 0, 1 und 7 nach Güllendüngung. Der positive Befund an Tag 7 fiel für alle *tet*-Gene übereinstimmend aus. Bereits drei Wochen nach Begüllung – dem Zeitpunkt der ersten Probenentnahme im Versuch V1, Pulling – waren weder *tet*(M) noch *tet*(O) oder *tet*(B) mehr nachweisbar.

Im Grünland-Boden fanden sich insgesamt niedrigere Gehalte, die jedoch länger persisierten. Wie in Ackerland ergaben für *tet(M)* und *tet(O)* bereits die vor der CTC-Güledüngung entnommenen Proben niedrig-positive PCR-Ergebnisse. Der Nachweis von *tet(B)* gelang nur in der 1:1-Analyse und ausschließlich in Woche 1 nach CTC-Begüllung. Der letzte positive Nachweis von *tet(M)* und *tet(O)* erfolgte 51 Tage nach CTC-Gülle-Düngung. Am 02.08.2004, 89 Tage nach Ausbringung der CTC-haltigen Gülle, ergaben alle Proben für alle untersuchten Gene negative Resultate.

Den zeitlichen Verlauf des Abbaus von *tet(M)* im Grünland zeigt Abbildung 21

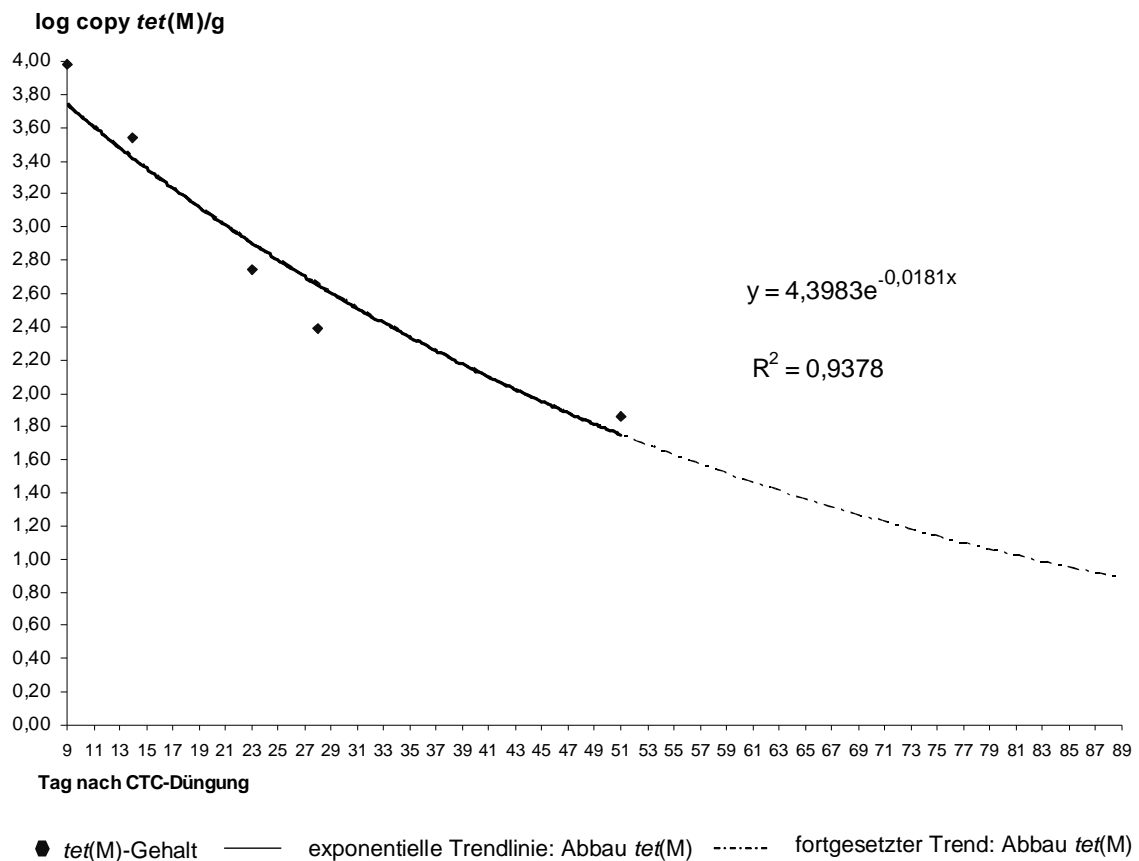


Abbildung 21: Abbau von *tet(M)* im Grünland

E Diskussion

1 Einordnung der phänotypischen Resistenzraten

Zur Einordnung der Resultate sollen Vergleiche der Daten mit denen der GENARS-Studie (<http://www.genars.de/data.htm>, 1/2003) und der DANMAP-Studie (2003) durchgeführt werden. Bei der Methodenwahl wurde darauf geachtet, dass die Ausführung der Sensibilitäts-Prüfung für *E. coli* und *Enterococcus faecalis/faecium* exakt mit der in der überwiegenden Zahl der GENARS-Laboratorien eingesetzten Methodik übereinstimmt. Dies betrifft nicht nur das methodische Vorgehen, sondern auch die verwendeten Geräte und Materialien, sodass eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse gegeben ist.

1.1 *E. coli*

Die Untersuchung von 613 *E. coli* aus Schweinegülle hat ergeben, dass 77,5 % der Isolate als resistent gegenüber mindestens einem der untersuchten Wirkstoffe einzustufen waren. Resistenzen traten auf gegenüber 23 der insgesamt 29 untersuchten Substanzen; die Resistenzraten reichten von 0,2 % (Amikacin) bis 56,5 % (Streptomycin; Details siehe Tabelle 17).

Der Vergleich mit den Ergebnissen der GENARS-Studie ordnet die Resultate folgendermaßen ein: Gegenüber 16 von 17 Substanzen, zu denen Vergleichsdaten aus dem GENARS-Projekt existieren, fanden sich unter den Gülle-Isolaten weniger resistente *E. coli* als dies im Vergleichszeitraum an den teilnehmenden GENARS-Krankenhäusern der Fall gewesen war. Die Ausnahme stellt das Doxycyclin dar, mit einer um ca. 20 % höheren Resistenzrate in der Gülle (ca. 55 vs. ca. 36 %). Die Unterschiede in der prozentualen Resistenzhäufigkeit waren im Chi-Quadrat-Test signifikant, mit Ausnahme einiger weniger Substanzen, gegen die weder bei GENARS noch in Gülle nennenswerte Resistenzraten erschienen waren (Meropenem, Amikacin, Colistin). Die vergleichende Darstellung der prozentualen Resistenzraten in Gülle- und GENARS-Isolaten ist Abbildung 22 zu entnehmen. Sofern vorhanden, sind auch die Daten der DANMAP-Studie aus dem Vergleichszeitraum aufgeführt.

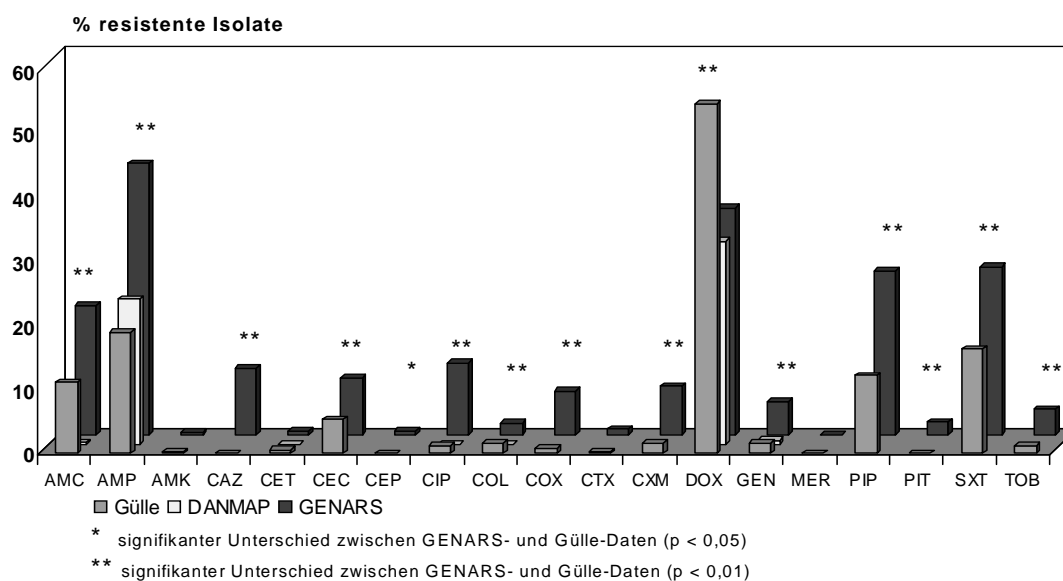


Abbildung 22: Vergleich der prozentualen Resistenzraten von *E. coli*-Isolaten aus Gülle, Mastschweinen (DANMAP) und aus Humankliniken (GENARS); Antibiotika-Kürzel vgl. Tabelle 4

Neben der verringerten Empfindlichkeit gegen Doxycyclin hatte bei den MHK-Werten der Substanzen Gentamicin und Amikacin eine Verschiebung in den Intermediärbereich stattgefunden. So zeigten sich ca. 3 % (Amikacin) bzw. ca. 8 % (Gentamicin) weniger Isolate aus Gülle sensibel als in den GENARS-Untersuchungen (Amikacin: ca. 93 vs. ca. 96 %; Gentamicin ca. 82 vs. ca. 90 %).

Die hohe Resistenzrate gegen **Doxycyclin** verwundert wenig, da mit der Testung des Doxycyclins zugleich die Resistenzen gegen Tetrazyklin, Chlortetrazyklin und Oxytetrazyklin erfasst werden, zusammen genommen die in der Nutztierhaltung am häufigsten und umfangreichsten eingesetzten antibakteriellen Fütterungsarzneimittel (FEDESA, 1998).

Amikacin hingegen wird ausschließlich humanmedizinisch eingesetzt; dort wird, aufgrund der vergleichsweise günstigen Resistenzlage verglichen mit anderen Aminoglykosiden, die beschränkte Verwendung der Substanz im Sinne eines Reserveantibiotikums empfohlen (EFSA, 2004). Die Verschiebung der MHK-Werte dieser Substanz wie auch des Gentamicins in den Intermediärbereich ist möglicherweise im Zusammenhang mit der hohen Resistenzrate gegen Spectinomycin zu sehen, die sich wiederum aus dessen vergleichsweise hoher Einsatzhäufigkeit, möglicherweise aber auch aus Anwendungsfehlern erklärt: BROLL et al. (2004) fanden bei der Untersuchung der Verschreibungspraxis für Spectinomycin als Fütterungsarzneimittel häufig Unterschreitungen der empfohlenen therapeutischen Dosis. Insgesamt lagen die Aminoglykoside in den Erhebungen der FEDESA (1998) in ihrer Anwendungsmenge nach den Tetrazyklinen an Platz zwei der gegen *E. coli* wirksamen Antibiotikaklassen; innerhalb der veterinärmedizinisch verfügbaren Aminoglykoside sind neben Spectinomycin nur zwei weitere Aminoglykoside als orale Arzneimittel-Zubereitung beim Schwein zugelassen (VETIDATA, 2006). Dementsprechend ist trotz fehlender Einzeldaten mit hoher Wahrscheinlichkeit davon auszugehen, dass Spectinomycin einen erheblichen Anteil der beim Schwein eingesetzten Aminoglykoside ausmacht.

Kreuzresistenz gegen Spectinomycin/Streptomycin ist beispielsweise auf dem Multi-resistenz-Plasmid Tn2424 codiert, das zugleich in *E. coli* Low-Level-Resistenz gegen Amikacin bedingt (MEYER et al., 1983); eine Coselektion durch die Anwendung von Spectinomycin ist also möglich. Für *Acinetobacter baumannii* wurde die Cointegration der Resistenzgene *aacA4* (Profil: Amikacin | Netilmicin | Tobramycin) und *aadA1* (Spectinomycin | Streptomycin) sowie *catB8* (Chloramphenicol) in ein gemeinsames Integron publiziert (TURTON et al., 2005). Da promotorfern gelegene Gene in Integrons weniger stark exprimiert werden als promotornahe (vgl. Punkt B1.1.2), wäre eine ähnliche Cointegration bei *E. coli* eine mögliche Erklärung für Spectinomycin/Streptomycin resistente Isolate mit intermediären MHK-Werten gegenüber Amikacin.

Dänische *E. coli*-Isolate vom Schwein (**DANMAP-Studie**) zeigten verglichen zu Isolaten aus bayerischer Schweinegülle erheblich niedrigere Resistenzraten gegenüber Doxycyclin; der Prozentsatz resistenter Isolate lag noch unter den Werten der GENARS-Studie. Ähnliche Resistenzraten ergaben sich hingegen gegenüber Ampicillin (22,7 %; diese Untersuchung: 19 %), jedoch mit einer erheblich höheren Empfindlichkeit gegenüber Clavulansäure (Amoxicillin/Clavulansäure: < 1 % in der DANMAP-Studie vs. 11 % Resistenz in Gülle-Isolaten). Resistenzen gegen Ceftiofur, Ciprofloxacin und Colistin traten nicht auf; in den vorliegenden Untersuchungen lag der Prozentsatz resistenter Isolate < 2 %. Gentamicin-Resistenz zeigten 1 % der DANMAP-Isolate vs. 2 % der Isolate aus Schweinegülle. Bemerkenswert ist, dass in der

DANMAP-Studie zugleich für einige Substanzen Vergleichswerte von gesunden wie stationär behandelten Menschen erhoben wurden; für Ampicillin betragen die Resistenzraten 21% (Isolate gesunder Probanden) bzw. rund 40 % (Klinik-Isolate).

Mehrfachresistenz und Resistenzprofile

NOVOTNA et al. (2005) fanden in Jordanien unter Shiga-Toxin-produzierenden *E. coli* des Schafes mehrfach die Koppelung Ampicillin | Chloramphenicol | Streptomycin-Resistenz. Diese Kombination tauchte in den eigenen Untersuchungen ebenfalls mehrfach auf, jedoch nie ohne additive Resistenzen (z. B. gegen Doxycyclin).

SUNDE et al. (1998) sahen in Isolaten aus gesunden Schweinen eine Dominanz der Streptomycin-Resistenz, codiert durch das *strA-strB*-Gen. Spätere Untersuchungen zeigten Streptomycin | Spectinomycin-Resistenzgen-Kassetten weit verbreitet in der Intestinalflora des Schweines: 17 Isolate aus 14 Schweinen von 7 Betrieben trugen class-1-Integrans; in jedem dieser Integrans lag das Streptomycin | Spectinomycin-Resistenz codierende *ant(3'')*-Ia-Gen vor. Weitere im selben Integron auftretende Genkassetten vermittelten Resistenz gegen Trimethoprim bzw. β -Laktame. (SUNDE & SORUM, 1999). Das Auftreten von Integrans prädestiniert die Entstehung von Mehrfachresistenzen (vgl. Punkt B1.1.2). Streptomycin-Resistenz zeigte sich im eigenen Probenmaterial im Chi-Quadrat-Test signifikant mit dem Auftreten von Hochmehrfach-Resistenz assoziiert. 93,1 % der Isolate mit ≥ 6 Resistenzen zeigten Streptomycin-Resistenz; unter den Isolaten mit ein bis fünf Resistenzen lag dagegen nur in 69,7 % der Fälle Streptomycin-Resistenz vor.

Fluorquinolon- und Fenicol-Resistenz

Fluorquinolon-Resistenz kann auf so genannten „target mutations“ im *gyrA* oder *gyrB*-Lokus beruhen; diese verändern das Zielmolekül DNA-Gyrase so, dass ein Angriffsort für das Antibiotikum nicht länger gegeben ist (RICE & BONOMO, 2005). Aber auch Multidrug-Transporter sind häufig fähig zur Ausschleusung von Fluorquinolonen. Substrate dieser Transporter sind ebenso (neben anderen, nicht primär als Antibiotika betrachteten Stoffen) Chloramphenicol, Tetrazykline und Trimethoprim (NISHINO & YAMAGUCHI, 2001). Der so genannte AcrAB-Transporter kann daneben auch an Ampicillin-Resistenz beteiligt sein (KACZMAREK et al., 2004). Hingegen sind Aminoglykoside – gegen die sechs der sieben Fluorquinolon-resistenten Stämme ebenfalls unempfindlich waren – keine eigentlichen Zielmoleküle des AcrAB-Systems; jedoch ist AcrA an der Ausschleusung der Aminoglykoside durch den Transporter AcrD beteiligt (AIRES & NIKAIDO, 2004). Darüber hinaus wurden in *Klebsiella spp.* Fluorquinolon-Resistenz vermittelnde Plasmide gefunden (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ et al., 1998), die neben der Fluorquinolon-Resistenz eine Extended-Spectrum- β -Laktamase codierten. In Fluorquinolon-resistenten *E. coli*-Isolaten aus Gülle gab es jedoch keine Hinweise auf die Anwesenheit eines Breit-Spektrum-Laktamase-Enzyms. Auch in der Spezies *E. coli* selbst wurden mittlerweile Fluorquinolon-Resistenz-codierende Plasmide identifiziert (WANG et al., 2003).

Sowohl Fluorquinolon- als auch Fenicol-Resistenz traten nie alleine, sondern stets in Kombination mit mindestens zwei anderen Wirkstoffen auf.

Fünf der sieben Fluorquinolon-resistenten *E. coli* waren zugleich Chloramphenicol-resistent; keines davon jedoch Florfenicol-resistent. Florfenicol-Resistenz trat umgekehrt – so vorhanden – in allen Fällen gemeinsam mit Chloramphenicol-Resistenz auf.

PATERSON et al. (2000) berichten eine signifikante Korrelation der Resistenzraten gegen Fluorquinolone und β -Laktame. Diese Korrelation war auch in Isolaten aus Gülle zu erkennen: Alle sieben Fluorquinolon-resistenten Isolate exprimierten zugleich Ampicillin-Resistenz.

In der Mehrzahl der Fälle lag die Anzahl der Resistenzen bei Fluorquinolon- oder Fenicol-resistenten Isolaten bei ≥ 6 Resistenzen: Fünf der sieben Fluorquinolon-resistenten Isolate zeigten 7- bis 12fache Resistenz; 29 der 45 Chloramphenicol-resistenten *E. coli* wiesen 6–12 Resistenzen auf. Die Tatsache, dass Fluorquinolon-Resistenz nahezu immer in Multiresistenz-Clustern auftrat, ist vor dem Hintergrund interessant, dass dies – eher als auf eine Mutation im *gyrA*- oder *gyrB*-Lokus (codierend für das Zielmolekül der Fluorquinolone, die DNA-Gyrase) – auf einen Plasmid- oder Multidrug-Transporter assoziierten Hintergrund der Fluorquinolon-Resistenz hinweisen könnte.

1.2 *E. faecalis*

Insgesamt zeigten sich 92,8 % der 387 *E. faecalis*-Isolate gegen mindestens einen Wirkstoff resistent. Resistenzen traten auf gegenüber 14 der 20 einbezogenen Substanzen; die Resistenzraten reichten von 0,3 % (Mezlocillin) bis 79,2 % (Doxycyclin).

Gegen zehn der zwölf Substanzen, zu denen GENARS-Vergleichswerte existieren, lagen die Resistenzraten aus Gülle isolierter Stämme signifikant niedriger als die im **GENARS**-Projekt erhobenen (vgl. Abbildung 23). Die Ausnahmen bildeten Doxycyclin (79 % Gülle vs. 65 % GENARS) und Rifampicin (52 % vs. 28 %). Zudem gab es bei Amoxicillin + Clavulansäure und Erythromycin jeweils eine Verschiebung in den Intermediärbereich und somit weniger voll empfindliche Isolate (AMC: 89 vs. 97 % sensible Isolate; ERY 12 vs. 20 %).

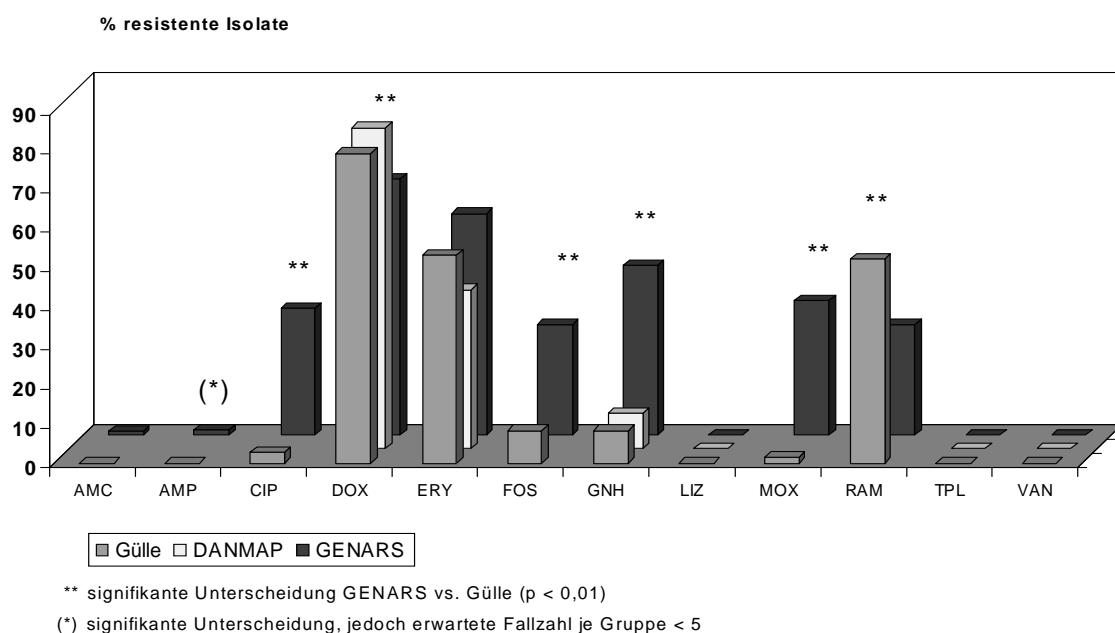


Abbildung 23: Vergleich der prozentualen Resistenzraten von *E. faecalis*-Isolaten aus Gülle, Mastschweinen (DANMAP) und aus Humankliniken (GENARS); Antibiotika-Kürzel vgl. Tabelle 4

Die Resistenzhäufigkeit im Chi-Quadrat-Test unterschied sich signifikant für alle Substanzen außer Erythromycin und Substanzen ohne oder mit marginalen Resistenzen (Amoxicillin/Clavulansäure, Teicoplanin, Vancomycin, Linezolid).

Die höheren Resistenzraten gegen **Doxycylin** sind analog zu *E. coli* erklärbar. Der Grund der unterschiedlichen Resistenzhäufigkeit gegen **Rifampicin** ist dagegen unklar. Rifampicin ist für lebensmittelliefernde Tiere nicht zugelassen; lediglich die Umwidmung der verwandten Substanz Rifamixin ist zur äußerlichen Anwendung möglich. In der Humanmedizin stellt das Rifampicin ein Reserveantibiotikum zur Tuberkulosebehandlung dar, wird jedoch auch zur antibiotischen Imprägnierung von Zentralvenenkathetern eingesetzt, um deren sekundäre Besiedelung durch Bakterien gering zu halten. In diesem Sinne hat es auch Bedeutung im Zusammenhang mit nosokomialer *E. faecalis*-Bakteriämie. Eine weitere wichtige Indikation ist die Therapie der Meningokokken-Meningitis. Darüber hinaus wird es als Kombinationsantibiotikum bei Infektionen durch *Staphylococcus aureus*, Streptokokken und auch Enterokokken eingesetzt (VOGEL et al., 2004).

Resistenz gegen Rifampicin wird im Allgemeinen erworben durch Spontanmutation des *rpoB*-Genes; diese kommt relativ häufig vor (RICE & BONOMO, 2005). Aufgrund der hohen Mutationsrate wird Rifampicin meist als Kombinationsantibiotikum eingesetzt (VOGEL et al., 2004, RICE & BONOMO, 2005). Die Frequenz der Rifampicin-Resistenz bei *E. faecalis* scheint jedoch stark zu schwanken: so reichen die Angaben aus der Literatur für humanklinische *E. faecalis*-Isolate von 12 % auf Gran Canaria (MARTIN et al., 2000) bis 63 % auf Cuba (QUINONES, 2005). Die Resistenzraten in den GENARS-Daten seit 2002 bis heute sind rückläufig. Rifampicin-Resistenz scheint im Genus *Enterococcus* mit nur geringen Fitness-Einbußen einherzugehen (ermittelte Rate für *E. faecium*: max. 10 %); diese sind in gewissem Ausmaß abhängig vom Ausmaß der Mutations-bedingten MHK-Wert-Verschiebung (ENNE et al., 2004).

Die chromosomale Lage des mutierten Genes hält vermutlich die horizontale Übertragung der Rifampicin-Resistenz gering.

In den vorliegenden Untersuchungen lag bereits der Median der Ursprungs-Population im intermediären Bereich, die Ausläufer der Normalverteilung somit auch im resistenten.

Die **DANMAP-Daten** bestätigen das Fehlen von Linezolid-, Teicoplanin und Vancomycin-Resistenz bei *E. faecalis*-Isolaten des Schweines; auch die vergleichsweise niedrige Inzidenz der Gentamicin-Resistenz stimmt mit unseren Erhebungen überein (9 % bei DANMAP vs. 8 % in Gülle; hingegen > 50 % bei GENARS-Isolaten).

Auffällig ist die Resistenzlage gegen Erythromycin auf etwas niedrigerem Level verglichen mit deutschen Isolaten, sei es aus Kliniken oder Schweinegülle (41 % bei DANMAP vs. 53 % in Gülle bzw. 57 % in GENARS-Kliniken). *E. faecalis*-Isolate gesunder Menschen aus der DANMAP-Studie zeigten jedoch noch erheblich niedrigere Resistenzraten von nur 7 %; dies weist darauf hin, dass der hohe Prozentsatz resistenter Isolate beim Tier wie beim Menschen auf die Selektion resistenter Klone im Zusammenhang mit der vergleichsweise hohen Einsatzhäufigkeit der Makrolide, sei es veterinär- oder humanmedizinisch, zurückgeht.

Die zusammengefasste Gruppe Makrolide/Lincosamide/Tiamulin lag in Dänemark 2003 bei Mastschweinen an Platz eins im veterinärtherapeutischen Antibiotika-Einsatz, gemessen in so genannten "Animal Daily Doses" (DANMAP, 2003). Quantitative Daten zum veterinärmedizinischen Einsatz der Makrolide in Deutschland sind nicht

verfügbar; der humanmedizinische Verbrauch der Makrolide liegt in Deutschland nur geringfügig höher als in Dänemark (in 2002: 2,26 vs 2,17 Daily Doses je 1000 Einwohner; ESAC, http://www.esac.ua.ac.be/main.aspx?c=*ESAC2). Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass die Resistenz gegen einzelne Makrolide nicht durch alle Makrolide gleichermaßen selektiert wird: Bemerkenswerter Weise zeigte sich in Untersuchungen von REINERT et al. (2002) an Pneumokokken keine signifikante Korrelation der Erythromycin-Resistenz mit dem Erythromycin-Konsum, wohl aber eine Korrelation mit dem Verbrauch neuerer Makrolide und der Clindamycin-Einnahme. HASMAN und AARESTRUP (2005) stellten andererseits eine starke Korrelation der Makrolid- (aber auch Glykopeptid-) Resistenz in *Enterococcus spp.* mit der Resistenz gegen das Schwermetall Kupfer fest. Die Autoren fanden die entsprechenden Resistenzdeterminanten auf einem gemeinsamen Plasmid vereint. Eine eventuelle Selektionswirkung des Kupfers müsste sich eher in Zucht- denn in Mastbetrieben abzeichnen: Das Futtermittelrecht lässt in Deutschland im Ferkelfutter 170 mg Kupfer/kg zu, im Futter für Mastschweine und Sauen hingegen nur 25 mg/kg. Hinweise auf höhere Makrolid-Resistenzraten bei *E. coli*-Isolaten aus Zuchtschweinen lassen sich aus den vorliegenden Daten jedoch nicht ableiten.

Mehrfachresistenz und Resistenzprofile

29 % der Isolate exprimierten Coresistenz gegen Makrolide, Doxycyclin und Streptomycin (High-Level). Eine Assoziation zwischen Tetrazyklin- und Makrolid-Resistenzdeterminanten sahen auch DE LEENER et al. (2004) bei Schweinen: 98 % der Träger des Erythromycin-Resistenzgenes *ermB* trugen zugleich die Tetrazyklin-Resistenzdeterminante *tet(M)*. Auch das Transposon Tn1545 vermittelt zugleich Resistenz gegen Erythromycin via *ermAM* und Tetrazyklin via *tet(M)* (COURVALIN & CARLIER, 1987).

8 % der Isolate exprimierten zusätzlich zur Makrolid | Doxycyclin | Streptomycin-High-Level-Resistenz auch Unempfindlichkeit gegen Chloramphenicol. MASCHIETO et al. (2004) fanden in *E. faecalis*-Isolaten in brasilianischen Krankenhäusern ebenfalls den Phänotyp Tetrazyklin | Erythromycin | Streptomycin-High-Level | Chloramphenicol. *E. faecalis*-Isolate mit dem Profil Tetrazyklin | Erythromycin | Tylosin | Streptomycin-High-Level | Chloramphenicol wurden auch aus Schweinefleisch isoliert; genetische Basis war das Plasmid pRE25 (TEUBER et al., 2003).

In 17 Fällen war dieses Resistenzprofil in Isolaten aus Gülle durch Rifampicin und gegebenenfalls weitere Resistenzen ergänzt: Resistenz gegen Gentamicin-High-Level (n = 9), Fosfomycin (n = 1) und Fluroquinolone (n = 1) trat zusätzlich auf. In sechs Fällen war die Streptomycin-High-Level-Resistenz durch Resistenz gegen Gentamicin-High-Level ersetzt; Isolate aus Rindern mit gleichem Profil trugen laut SCHWARZ et al. (2001) die Plasmide pESP91 und pESP1.

Fluorquinolon-Resistenz

Fluorquinolon-Resistenz in *E. faecalis* wird assoziiert mit Mutationen im *gyrA*-Lokus (KANEMATSU et al., 1998), aber auch mit Multidrug-Transportern (LEE et al., 2003).

Wie bei *E. coli* war Fluorquinolon-Resistenz mit (Hoch-)Mehrfachresistenz verknüpft: Sieben der zehn Ciprofloxacin-resistenten Stämme exprimierten ≥ 7 Resistenzen. Ein Ciprofloxacin-resistentes Isolat war (neben Unempfindlichkeit gegen Makrolide, Doxycyclin und Streptomycin-High-Level) zugleich resistent gegen Mezlocillin und

Carbapeneme; das Verhalten gegenüber Aminopenicillinen war intermediär. DE FATIMA SILVA LOPES et al. fanden 2005 in *Enterococcus*-Isolaten veterinär- und humanklinischer Herkunft ebenfalls das Auftreten von Fluorquinolon- bzw. Imipenem-Resistenz assoziiert mit Hochmehrfach-Resistenz der Isolate. FASS et al. (1995) beobachteten Coresistenz gegen Fluorquinolone und Imipenem in Staphylokokken.

Drei der zehn Ciprofloxacin-resistenten Isolate zeigten zugleich Chloramphenicol-Resistenz. GOULD et al. fanden 2004 in phänotypischen Untersuchungen an Vancomycin-resistenten Enterokokken eine Korrelation der Resistenz gegen Chloramphenicol mit dem vorangegangenen Einsatz von Fluorquinolonen.

1.3 *E. faecium*

Nur ein verschwindend geringer Prozentsatz der 183 *E. faecium*-Isolate wies keinerlei Resistenzen auf; gegen 97,2 % der Bakterien blieb mindestens eines der untersuchten Antibiotika wirkungslos. Resistenzen betrafen 18 der 22 einbezogenen Wirkstoffe, die Resistenzraten lagen zwischen 1,1 % (Amoxicillin/Clavulansäure) und 83,1 % (Fosfomycin).

Gegenüber 9 der 13 mit **GENARS** verglichenen Substanzen trat unter den Gülleisolaten ein geringerer Anteil resistenter Stämme auf (vgl. Abbildung 24). Die Ausnahme bildete neuerlich Doxycyclin (27 vs. 19 %), zudem Fosfomycin (83 vs. 41 %), Rifampicin (73 vs. 62 %) und Synercid (Quinupristin/ Dalfopristin, 10 vs. 6 %). Im Falle des Rifampicins traten jedoch in den GENARS-Proben nicht mehr sensible, sondern lediglich mehr intermediäre Stämme auf. Alle Synercid-resistenten Stämme ($n = 17$, $n_{\text{Proben}} = 15$) wurden im BBL-Crystal als *E. faecium* bestätigt.

Gülle- und GENARS-Isolate unterschieden sich signifikant für alle untersuchten Substanzen, abgesehen von der Quinupristin-Dalfopristin-Kombination (Synercid), den Glykopeptiden sowie von Linezolid und Rifampicin.

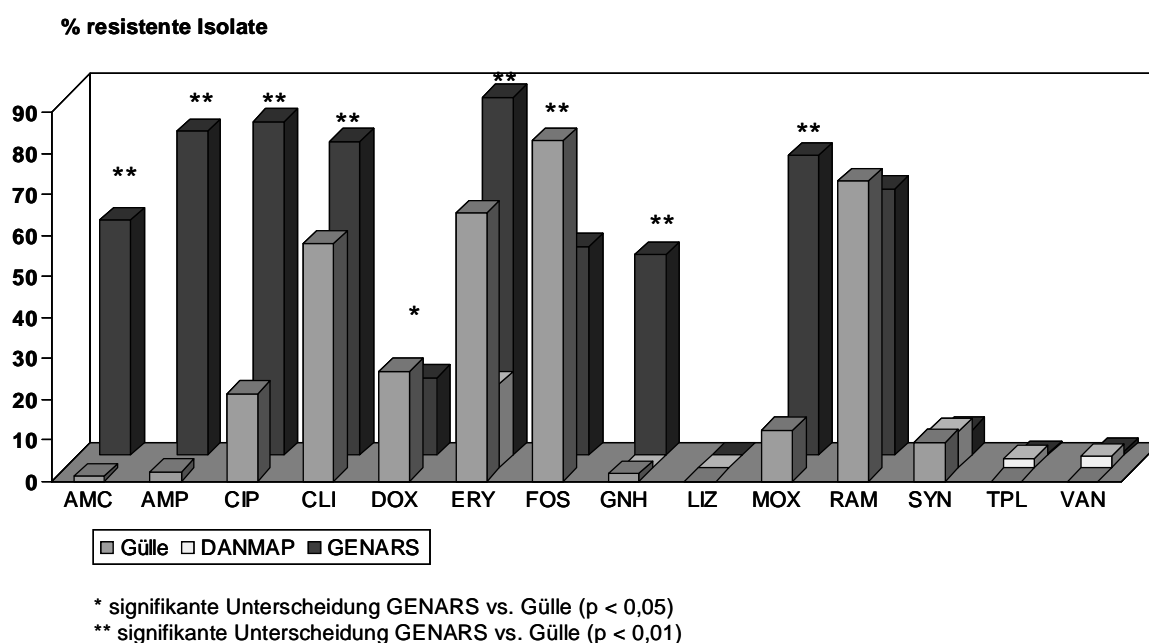


Abbildung 24: Vergleich der prozentualen Resistenzraten von *E. faecium*-Isolaten aus Gülle, Mastschweinen (DANMAP) und aus Humankliniken (GENARS); Antibiotika-Kürzel vgl. Tabelle 4

Auf den ersten Blick ergeben sich gravierend unterschiedliche Resistenzraten bezüglich des Fosfomycins (s. o.), und gegensinnig bezüglich der Aminopenicilline (Resistenzraten um 1–2 % in Gülle vs. über 57 bzw. über 79 % in GENARS-Isolaten). Die Unterschiede sind für das Fosfomycin jedoch artifiziell, da der Median der natürlichen *E. faecium*-Population hier mit dem Breakpoint zwischen sensiblem Bereich und Resistenzbereich zusammenfällt. Minimale Verschiebungen um eine MHK-Stufe bewirken so maximale Änderungen der Resistenzraten.

Dies erklärt jedoch die Unterschiede bei den Aminopenicillinen nur zum Teil. Auch methodische Differenzen bieten keine Erklärung, zumal die drastischen Unterschiede sich nur für *E. faecium*, nicht aber *E. faecalis* zeigten. Der einzige von der GENARS-Methodik abweichende Punkt in der phänotypischen Resistenztestung, nämlich die visuelle Auswertung, führt – in Folge der Tatsache, dass der „Cut-off“ des Micronaut-Scans oberhalb der minimal sichtbaren Trübung liegt – eher zu einer Über- denn zu einer Unterschätzung der Resistenzraten. WALLRAUCH et al. fanden 1997 in einer deutschen Multi-Center-Studie unter *E. faecium*-Isolaten eine zu GENARS ähnliche Ampicillin-Resistenzrate von 57 %. Möglicherweise liegen der von diesen Zahlen erheblich abweichenden Ampicillin-Rate bei *E. faecium* aus Gülle auch regionale Unterschiede zugrunde, sicher aber hat die nicht-klinische Herkunft der Proben wesentlichen Einfluss: So fanden LIETZAU et al. (2006) in Süddeutschland unter den *E. faecium*-Isolaten aus dem Stuhl zufällig ausgewählter ambulanter Patienten eine Ampicillin-Resistenzrate von nur 3,3 %.

In den **DANMAP-Daten** zeigt sich relative Übereinstimmung mit den Resistenzdaten aus Gülle-Isolaten; auffällig ist der – wenn auch auf insgesamt niedrigem Niveau – höhere Prozentsatz Glykopeptid-resistenter *E. faecium*-Isolate (2–3 % vs. jeweils 0 % in Gülle und < 1 % bei GENARS). BORGEN et al. vermuten einen auf Coselektion beruhenden Zusammenhang zwischen dem Einsatz von Makrolide und dem Erhalt Glykopeptid-resistenter *E. faecium* über das Verbot des Avoparcins hinaus (BORGEN et al., 2002). Dies deckt sich jedoch schlecht mit erheblich höheren Makrolid-, jedoch geringeren Glykopeptid-Resistenzraten in Deutschland (Erythromycin: 21 % bei DANMAP vs. 55 % in Gülle und 88 % bei GENARS).

Die Zahl simultan exprimierter Resistenzen bei *E. faecium* übersteigt diejenige bei *E. faecalis* deutlich. Dies kann nicht ausschließlich über die unterschiedliche Zahl einbezogener Wirkstoffe erklärt werden, da bei *E. faecium* im Vergleich zu *E. faecalis* lediglich Clindamycin und Synercid in die Auswertung hinzutreten. Jedoch trat bei *E. faecium*, anders als bei *E. faecalis*, in zwei Fällen eine umfassende Penicillin-Carbapenem-Resistenz auf; diese betrifft durch einen Kreuzresistenz-Mechanismus vier der einbezogenen Wirkstoffe zugleich und zeichnet für die höchste Zahl gleichzeitig exprimierter Resistenzen (12 bzw. 13) mitverantwortlich.

Mehrfachresistenz und Resistenzprofile

Das Vorkommen von Imipenem-Resistenz war signifikant mit dem Auftreten von Hoch-Mehrfachresistenz assoziiert: 7,6 % der Isolate mit > 1 < 7 Resistenzen zeigten Imipenem-Resistenz; bei den Isolaten mit ≥ 7 Resistenzen waren es 62 % (13 Isolate). Dies korreliert mit Untersuchungen von DE FATIMA SILVA LOPES et al. (2005) an *E. faecalis*.

Nur zwei dieser 13 Imipenem-resistenten Isolate zeigten zugleich auch Resistenz gegen Ampicillin. Imipenem-resistente, jedoch Ampicillin-sensible *E. faecium*-Isolate wurden mittlerweile mehrfach erwähnt (EL AMIN et al., 2002), der Mechanismus dieser

Resistenz scheint auf einer Überproduktion des Penicillin-Bindungs-Proteins PBP5 zu beruhen. (EL AMIN et al., 2001).

MASCHIETO et al. (2004) fanden in brasilianischen Kliniken *E. faecium*-Isolate mit ähnlichen Mehrfachresistenz-Profilen zu *E. faecalis*: Chloramphenicol | Erythromycin | Tetrazyklin | Gentamicin-High-Level | Streptomycin-High-Level-Resistenz traten auf. Auch in Gülle war dieses Profil in vier Isolaten gegeben, in einem Fall ergänzt durch Imipenem | Mezlocillin-Resistenz, in drei Fällen durch Resistenz gegen Synercid und Clindamycin. Das letztere Profil sahen WERNER et al. (2003) in mehreren (klonalen) *E. faecium*-Isolaten auf einer deutschen pädiatrischen Station; die Isolate waren jedoch zusätzlich resistent gegen Ampicillin und Vancomycin sowie Teicoplanin. Die verantwortlichen Resistenzgene *erm(B)* für die Resistenz gegen Makrolide, Linksoamide und eine der Synercid-Komponenten, Streptogramin B, sowie *vat(D)* für die andere Synercid-Komponente, Streptogramin A, lagen nach dem Bericht der Autoren auf einem gemeinsamen Plasmid, begleitet von dem Glykopeptid-Resistenz codierenden Gen *van(A)*. 2000 hatten WERNER et al. die Plasmid-assoziierte Verknüpfung der Gene *erm(B)*, *vat(E)* und *cat* nachgewiesen; *vat(E)* codiert ebenfalls Resistenz gegen Streptogramin A, während *cat*-Gene für die Inaktivierung von Chloramphenicol verantwortlich sind. Resistenzen gegen Penicilline und Carbapeneme in *E. faecium* sind hingegen im Allgemeinen nicht übertragbar, genauso wenig Resistenz gegen Fluorquinolone (WERNER et al., 2000).

Fluorquinolon-Resistenz

Die Mechanismen der Fluorquinolon-Resistenz bei *E. faecium* entsprechen jenen von *E. faecalis*. Wie bei *E. coli* und *E. faecalis* ergab sich eine (im Falle von *E. faecium* signifikante) Assoziation zwischen dem Auftreten von Fluorquinolon- und Mehrfachresistenz.

1.4 Differenzierung der Resistenzparameter von *E. coli*, *E. faecalis* und *E. faecium* nach Betriebstyp, -größe und Beprobungszeitraum

1.4.1 Einordnung der MHK-Mittelwertvergleiche

Eine Verschiebung um $0,5 \log_2$ bedeutet, dass beispielsweise die Hälfte aller Isolate innerhalb einer Betriebsform im MHK-Mittelwert um eine \log_2 -Stufe höher liegt als die Vergleichsgruppe oder dementsprechend ein Viertel um $2 \log_2$ Stufen. Einige resistente Isolate mehr oder weniger haben nur einen schwachen Einfluss: Liegt etwa für *E. coli* ($n = 613$) und Doxycyclin der Median der sensiblen Population bei $0 \log_2$ und der der resistenten bei $3 \log_2$ (da die höchste untersuchte Konzentration 4 mg/l beträgt, die Werte der darüberliegenden resistenten Population also gleich 8 mg/l oder $3 \log_2$ gesetzt werden), so steigt der \log_2 -MHK-Mittelwert mit jedem resistenten Isolat nur um $0,005$. Für *E. faecalis* ($n = 373$) liegt diese Kennzahl für Doxycyclin bei $0,008$ je resistentes Isolat, für *E. faecium* bei $0,017$. Pro Prozentpunkt Unterschied in der Doxycyclin-Resistenzrate beträgt der Unterschied der \log_2 MHK-Mittelwerte $0,03$.

Durch die Beschränkung der untersuchten Konzentrationsstufen auf acht kann die Differenz zwischen einem Isolat der sensiblen und der resistenten Population im Extremfall höchstens $8 \log_2$ sein. Dies bedeutet, dass die dadurch verursachte Mittelwertverschiebung bei *E. coli* also maximal $0,01$ je resistentes Isolat bzw. $0,045$ je Prozentpunkt beträgt.

Es ist umso wahrscheinlicher, vorhandene Unterschiede möglicherweise nicht zu entdecken, je weniger Konzentrationsstufen getestet wurden bzw. je enger die MHK-Werte der sensiblen und der resistenten Population beisammen liegen.

Aufgrund der logarithmischen Skalierung werden die absoluten Differenzmargen nach oben hin größer: Die absolute Spanne zwischen $0 \log_2$ und $1 \log_2$ beträgt 0,1 bis 1 mg/kg; die absolute Spanne zwischen $4 \log_2$ und $5 \log_2$ hingegen 0,1 bis 16 mg/kg. Jedoch ist zu berücksichtigen, dass der MHK-Wert keine Aussage darüber erlaubt, wie groß diese Spanne tatsächlich ist: Ein Isolat, das von der Wirkstoffkonzentration 16,1 mg/kg gehemmt wird, ergibt im Mikrodilutionsverfahren ebenso den MHK-Wert 32 mg/kg wie ein anderes, zu dessen Wachstumshemmung 32,0 mg/kg nötig sind.

1.4.2 Unterschiede nach Betriebsgröße

In allen Fällen, in denen sich ein Einfluss des Merkmals „Betriebsgröße“ ergab, lagen die MHK-Mittelwerte der großen Betriebe höher als die der kleinen. Die betroffenen Antibiotika waren Aminoglykoside (*E. coli*: Streptomycin, Spectinomycin, Gentamicin; *E. faecalis*: Gentamicin-High-Level), Chloramphenicol-derivate (*E. coli*: Chloramphenicol, Florfenicol), Doxycyclin (*E. coli*, *E. faecium*), Sulfamethoxazol-Trimethoprim (*E. coli*), Imipenem (im MHK-Mittelwert bei *E. coli*, in der Resistenzrate bei *E. faecium*), die Aminopenicilline (*E. faecalis*) und Vancomycin (*E. faecalis*).

Die größte Differenz gab es bei *E. faecium* und **Doxycyclin** mit $1 \log_2$; auch die Prüfung von *E. coli* ergab hier signifikant höhere MHK-Werte bei Isolaten aus großen denn aus kleinen Betrieben. Dieses Ergebnis stimmt mit Befunden von HARMS (2006) überein, die die gleichen Gülleproben einem Tetrazyklin-Nachweis mittels LC-MS unterzogen hatte und in großen Betrieben höhere Tetrazyklin-Gehalte fand. Dass ein solcher Unterschied für *E. faecalis* nicht hervortrat, mag methodischen Ursprungs sein, da bereits der MHK-Wert der Referenz-Population nahe an der höchsten untersuchten Konzentration lag (Grenzkontrollbereich nach DIN: 2–8 mg/l; höchste untersuchte Konzentrationsstufe ≥ 32 mg/l).

Hoch war auch die Differenz der Mittelwerte bei *E. coli* und **Sulfamethoxazol-Trimethoprim** ($0,8 \log_2$). Auch dieses Ergebnis korreliert mit dem Antibiotika-Nachweis: Zwar wurden im analytischen Nachweis nur drei Sulfamethoxazol-positive Proben gefunden, jedoch enthielten insgesamt 181 Proben Sulfamethazin und zeigten – zumindest in Zucht- und Gemischtbetrieben – ebenfalls eine Tendenz zu höheren Gehalten in größeren Betrieben (HARMS, 2006). Bakterien entwickeln Resistenz gegen Sulfonamide, indem sie einen alternativen Stoffwechselweg zur Umgehung der Sulfonamid-bedingten Hemmung der Dihydropteroat-Synthetase bereitstellen. Ist dieser Stoffwechselweg etabliert, bedingt er Kreuzresistenz gegen alle anderen Sulfonamide, somit auch gegen die Sulfamethoxazol-Komponente der Sulfamethoxazol-Trimethoprim-Kombination (RICE & BONOMO, 2005).

Auch **Aminoglykoside und Aminopenicilline** gehören zu den regelmäßig als Fütterungsarzneimittel verschriebenen Stoffen (BROLL et al., 2004). Nimmt man an, dass die niedrigeren Gehalte an Tetrazyklinen und Sulfonamiden in kleineren Betrieben nicht aufgrund einer Substitution dieser Substanzen durch andere zustande kommen, sondern auf allgemeine Unterschiede zwischen großen und kleinen Betrieben in der Anwendungsfrequenz, -häufigkeit oder -menge von Fütterungsarzneimitteln zurückgehen, scheinen die Ergebnisse auch für Aminoglykoside und -penicilline plausibel.

Anders muss der Erklärungsansatz sein für veterinärmedizinisch nicht zugelassene Arzneimittel, z. B. das **Imipenem**: Innerhalb der Gattung *Enterococcus* beruht die Resistenz gegen β -Laktame im Allgemeinen nicht auf der Anwesenheit von β -Laktamasen, sondern auf der Genese Penicillin-bindender-Proteine (PBP) mit verminderter β -Laktam-Affinität. ONO et al. (2005) beschreiben ein zweifach punktmutiertes PBP, das zugleich Resistenz gegen Ampicillin und Imipenem vermittelt. Eine Kreuz-Selektion durch Ampicillin scheint daher möglich, die Befunde wären dann analog zum Ampicillin zu interpretieren. Hingegen ist die Imipenem-Resistenz in *E. coli* durch Metallo- β -Laktamasen bedingt; die codierenden Gene sind häufig strukturell mit anderen Resistenzdeterminanten, u. a. gegen Aminoglykoside, verknüpft, welche hier also möglicherweise eine koselektierende Rolle spielen (HELFLAND & BONOMO, 2005). Nicht auszuschließen ist, dass die Signifikanz der Imipenem-Mittelwert-Unterschiede auch durch das Zusammenspiel vom Modalwert der sensiblen Population am äußersten unteren Ende der Skala, der geringen Standardabweichung und des weiten Abstands von sensibler und resistenter Population überschätzt wird, und der Unterschied in Wahrheit zufälliger Natur ist.

Aminoglykosid- und **Chloramphenicol**-Resistenz sind häufig von gemeinsamen Strukturen codiert. Beispielsweise codiert das Transposon Tn2424 gleichzeitig eine Chloramphenicol-Acetyltransferase (*catB2*; QIU, 2004) und die bereits erwähnte Aminoglykosid-Acetyltransferase *aacA1a* (PARENT & ROY, 1992). Diese und ähnliche Verknüpfungen erklären aufgrund der Coselektion durch Aminoglykoside, weshalb die Resistenz gegen Chloramphenicol auch Jahre nach dem Anwendungsverbot für lebensmittelliefernde Tiere noch immer nennenswerte Höhe erreicht. Die Betriebsgröße-bedingten Unterschiede beim Chloramphenicol sind daher im Zusammenhang mit den Ergebnissen der Aminoglykoside zu sehen.

Hingegen ist Resistenz gegen **Florfenicol** nicht durch *cat*-Gene, sondern durch *flo*-Gene bedingt, die ihrerseits jedoch zugleich Resistenz gegen Chloramphenicol bedingen (SCHWARZ et al., 2004; BISCHOFF et al., 2002). Eine Assoziation der *flo*-Gene mit diversen anderen Resistenzgenen ist beispielsweise auf einem Klasse-1-Integron im *Salmonella* Typhimurium-Stamm DT104 gegeben, der unter anderem Resistenz gegen Ampicillin, Tetrazykline und Sulfonamide sowie additional gegen Aminoglykoside exprimiert. Eine Übertragung dieses Integrons auf *E. coli* ist möglich (DOUBLET et al., 2005). Somit ist – eher als eine Florfenicol-eigenen Selektion – wohl auch hier die Coselektion durch Betriebsgröße-assoziierte Unterschiede in der Anwendung der Coselektoren (z. B. Tetrazykline) wahrscheinlich.

Die Verschiebung im **Vancomycin**-Mittelwert bei *E. faecalis* in Abhängigkeit von der Betriebsgröße und in Abwesenheit Vancomycin-resistenter Isolate kann nur schwer eingeordnet werden. Es handelte sich um eine marginale Differenz (0,17 log₂).

1.4.3 Unterschiede nach Betriebstyp

E. faecalis und *E. faecium* zeigen übereinstimmende, *E. coli* abweichende Tendenzen: Während bei *E. coli* generell die niedrigsten MHK-Mittelwerte in Gemischtbetrieben gefunden wurden (signifikant für alle untersuchten Aminoglykoside abgesehen vom Streptomycin, sowie für die Fenicole), gab es – sofern signifikant verschieden – die höheren Resistenzraten und MHK-Mittelwerte bei den *E. faecalis*-Isolaten aus Zuchtbetrieben, dicht gefolgt von Gemischtbetrieben. Dies betraf die Gentamicin- und Streptomycin-High-Level-Resistenz ebenso wie das Chloramphenicol und die Fluorquinolone (hier auch *E. faecium*).

Gentamicin- bzw. Streptomycin-High-Level-Resistenz in *Enterococcus spp.* ist allerdings in einem anderen Zusammenhang zu sehen als die Aminoglykosid-Resistenz in *E. coli*: Die getestete Aminoglykosid-Konzentration entspricht nicht der therapeutisch eingesetzten, sondern dient als Indikator für die synergistische Wirkung der Kombination von Aminoglykosid und Penicillin (ASLANGUL et al., 2005). Es ist davon auszugehen, dass neben dem in High-Level-Gentamicin-resistenten Enterokokken weit verbreiteten *aac(6')-Ie-aph(2')-Ia*-Gen (QU et al., 2006, ZARILLI et al., 2005) einige weitere High-Level-Aminoglykosid-Resistenz vermittelnde Gene, die bislang noch nicht identifiziert sind, Verbreitung in Schweine-Isolaten finden (JACKSON et al., 2005).

Die Selektion durch Aminoglykosid-Einwirkung, die bei der Selektion Aminoglykosid-resistenter *E. coli* vermutlich eine bedeutende Rolle spielt, ist aufgrund des ohnehin natürlichen Intermediär-Verhaltens der Enterokokken gegenüber Aminoglykosiden (in *E. faecium* bedingt durch konstitutiv exprimierte *aac(6')*-Gene, WRIGHT & LADAK, 1997), als epidemiologisch untergeordnet zu betrachten. Vielmehr scheinen hier andere – noch nicht aufgeklärte – epidemiologische Faktoren eine Rolle zu spielen. Das Vorkommen des *aac(6')-Ie-aph(2')-Ia*-Genes auf dem Transposon Tn5281 (SIMJEE et al., 1999) und wiederum dessen Vorkommen auf einem Pheromon-sensitivem Plasmid könnten dabei eine Rolle spielen. Auf diesem Plasmid wurden weitere Resistenzdeterminanten (z. B. für Erythromycin-Resistenz) und Virulenzfaktoren gefunden (POURNARAS et al., 2000).

Für die signifikant höheren Resistenzraten gegen **Fluorquinolone** in Zuchtbetrieben mag möglicherweise die zusätzliche Anwendung für die Indikation Mastitis/Metritis/Agalaktie („MMA-Syndrom“) bei Sauen eine Rolle spielen. Zwar sind Fluorquinolone bei der Behandlung von Saugferkeln und Läufer Schweinen bis 10 Wochen aufgrund möglicher Gelenkschädigungen kontraindiziert, sodass dem vermehrten Einsatz bei Sauen der fehlende Einsatz bei der Nachzucht entgegensteht, andererseits bleibt somit aber auch in Mastbetrieben ein Teil des Bestandes von der Fluorquinolon-Therapie ausgeschlossen.

Dass signifikant höhere MHK-Mittelwerte in Gemischt- oder Zucht-, nicht aber in Mastbetrieben auftreten, erklärt sich möglicherweise auch durch die Tatsache, dass in Mastbetrieben vergleichsweise häufig ein „Rein-raus-Verfahren“ gehandhabt wird. Dies etabliert immer wieder eine neue Keimflora – eventuell mitgebrachte resistente Flora einzelner Tiere muss sich erst gegen eine Vielzahl an Konkurrenten behaupten –, während sich stallspezifische Resistenzen in anderen Betriebsformen, in denen zudem die Tiere insgesamt älter werden, jahrelang halten können. SCHUPPERS et al. (2005) fanden einen Einfluss dieses Stallmanagements auf die Resistenzsituation in Form eines signifikant protektiven Einflusses der strikten Einhaltung eines „Rein-raus-Verfahrens“ hinsichtlich des Auftretens von Mehrfachresistenzen.

1.4.4 Unterschiede nach Beprobungszeitraum

Einheitlich zeigten *E. coli* und *E. faecalis* im Beprobungszeitraum „Frühjahr“ höhere MHK-Mittelwerte und Resistenzraten gegen Ampicillin, im „Herbst“ gegen Streptomycin.

Weitere Substanzen mit signifikant höheren Werten im „Frühjahr“ waren Amoxicillin-Clavulansäure, Glykopeptide, Chloramphenicol, Gentamicin und Nitrofurantoin (alle *E. faecalis*) sowie Cotrimoxazol und Tobramycin (*E. coli*). Höhere Werte im „Herbst“ erreichten dagegen Spectinomycin (*E. coli*) und Fosfomycin (*E. faecalis*) sowie Enrofloxacin (*E. faecium*).

Bei Fosfomycin handelt es sich, wie bereits unter Punkt 1.2 erwähnt, um eine nur scheinbare Erhöhung der Resistenzrate, die sich daher auch nicht im Mittelwert der Population widerspiegelt.

Scheint der – häufigere – Anstieg der Resistenzraten in den „Frühjahr“-Isolaten nachvollziehbar aufgrund der höheren Erkrankungsinzidenz und somit auch frequenteren Antibiotikagabe im Winter, so ist doch schwer erklärlich, weshalb die Resistenzmaxima innerhalb der Aminoglykoside jahreszeitlich unterschiedlich auftreten: Streptomycin | Spectinomycin im „Herbst“, Gentamicin und Tobramycin im „Frühjahr“.

1.5 Einordnung der phänotypischen Resistenz bei weiteren Spezies

1.5.1 *E. nonfc.*

Bei der Auswertung dieser Daten fällt auf, dass erhebliche Spezies(gruppen)-spezifische Unterschiede auftreten. Zur differenzierten Beurteilung des Resistenzverhaltens innerhalb der *E. nonfc.* wurden die MHK-Werte der entsprechenden DSM-Stämme in achtfacher Wiederholung erhoben. Orientierung über die Modalwerte der Minimalen Hemmkonzentrationen in DSM-Stämmen sowie die Modalwerte und Wertebereiche in Feldstämmen gibt Tabelle 38 (Anhang). Diese Erhebungen weisen auf erhebliche speziesspezifische Differenzen zwischen den MHK-Werten der Normalpopulationen insbesondere für Clindamycin hin (Empfindlichkeit bei der *hirae/durans*-Gruppe und in der *raffinosisus*-Gruppe, intrinsische Resistenz bei allen anderen Spezies). Auch die Wirkstoffe Erythromycin, Quinupristin/Dalfopristin sowie die Fluorquinolone hemmten die Gruppe *hirae/durans*, verglichen mit weiteren untersuchten *E. nonfc.*-Stämmen, bereits in geringeren Konzentrationen.

Im Hinblick auf erworbene Resistenz stellt sich insgesamt die Resistenzsituation für *E. avium* häufig ungünstiger dar als für die weiteren Spezies. Enterokokken der *raffinosisus*-Gruppe waren dagegen zu geringeren Prozentsätzen resistent. Chloramphenicol-Resistenz trat nicht auf bei *E. gallinarum*, Gentamicin-High-Level-Resistenz innerhalb der *E. nonfc.* nur in der *raffinosisus*-Gruppe (ein Fall aus 45) und (in zwei Fällen aus 351) in der *hirae/durans*-Gruppe. Streptomycin-High-Level-resistente Keime fanden sich dagegen in allen Spezies(gruppen) außer wiederum in *E. gallinarum*.

Demnach ist festzuhalten, dass die Resistenzentwicklung gegen Substanzen, die regelmäßig zur Therapie humaner Enterokokken-Infektionen eingesetzt werden, gering blieb. Hierunter fallen die Acylaminopenicilline (in den vorliegenden Untersuchungen vertreten durch das Mezlocillin) sowie in eingeschränktem Maße auch die Aminopenicilline Ampicillin und Amoxicillin (+ Clavulansäure), und als Reserve-Antibiotika die Glykopeptide, das Linezolid und – außer bei den natürlich resistenten *E. spp.* – das Synercid (PETERS, 2003; VOGEL et al., 2004). In den meisten Fällen blieben bezüglich dieser Substanzen die Resistenzraten zwischen 0 % (Glykopeptide, Linezolid) und < 2 % (Acylamino-, Aminopenicilline). Nur innerhalb der natürlich intermediären Spezies *E. faecium* kamen 11 % Mezlocillin-resistente Isolate vor.

Bei den natürlich sensiblen Spezies fand sich eine nicht unbeträchtliche Resistenzrate gegen Synercid (z. B.: *E. faecium* 9,5 %, *E. raff.*-Gruppe 13 %). Diese mag ein Erbe aus Zeiten sein, als der kreuzselektierende Wirkstoff Virginiamycin noch eingesetzt wurde; McDERMOTT et al. (2005) stellten allerdings die Notwendigkeit eines konstanten, wenn auch niedrigen Wirkstoff-Levels zur Aufrechterhaltung der Synercid-Resistenz

fest. Insgesamt scheinen die Resistenzraten gegen Synercid rückläufig zu sein: AARESTRUP et al. (2002) fanden in dänischen und PETERS (2003) in deutschen Schweinen bei *E. faecium* noch Synercid-Resistenzraten von über 50%. Das umfassende dänische Monitoring-Programm „DANMAP“ beobachtete einen Rückgang resistenter *E. faecium*-Isolate aus Schweinen von 19 % im Verbotsjahr des Virginiamycins (1999) auf 13 % im Jahr 2004.

1.5.2 Clostridien

Verglichen mit den weiteren in die Untersuchungen einbezogenen Spezies stellte sich die Resistenzsituation für die Clostridien relativ günstig dar. Dennoch zeigte knapp die Hälfte (47,2 %) der 536 Isolate Resistenz gegen mindestens einen Wirkstoff, 19 der 25 untersuchten Wirkstoffe waren betroffen. Die Spannweite der Resistenzraten war jedoch erheblich geringer als in anderen Gattungen, sie reichte von 0,2 % (Aminopenicilline, Moxifloxacin, Linezolid) bis 19 % (Fosfomycin).

Da die Gattung *Clostridium* nicht in Spezies aufgetrennt wurde, kann es zu einer Überschätzung der Resistenzraten infolge eines gewissen Anteiles an *C. difficile* kommen. Diese Spezies – Erreger der pseudomembranösen Colitis (und bei Schweinen eine häufige Ursache der Ferkel-Dysenterie) – weist eine Vielzahl intrinsischer Resistenzen auf.

Mittel der Wahl zur Behandlung clostridieller Infektionen durch z. B. *C. perfringens* stellen Benzylpenicillin und Clindamycin, sowie Metronidazol im Falle einer Penicillin-Resistenz dar (VOGEL et al., 2004). Etwas anders ist die Situation für *C. difficile*, hier gilt von vornherein Metronidazol als Mittel der Wahl, Glykopeptide werden als Reserveantibiotikum verwandt (AWMF, 2003).

Benzylpenicillin, ebenso wie die Aminopenicilline und das Oxacillin, war gut wirksam (75 % empfindliche Stämme bei Penicillin, 95 % bei Oxacillin, über 99 % bei Ampicillin und Amoxicillin/Clavulansäure), der Anteil resistenter Isolate auch bei Penicillin gering (< 2 %). Resistenz gegen Clindamycin (und Erythromycin) lag jedoch bei etwa 14 %, der Anteil sensibler Stämme bei 70 % (CLI) bzw. 40 % (ERY). Die unterschiedlichen Anteile sensibler Stämme sind leicht erklärbar: Für *Clostridium spp.* ist eine generalisierte Macrolid-/Lincosamid-/Streptogramin-Low-Level-Resistenz beschrieben (DUTTA & DEVRIESE, 1981), mit Clindamycin-MHK-Werten von 0,5 bis 2 mg/l. Diese Werte liegen teils unterhalb des Intermediärbereiches (2–8 mg/l). Zudem ist das Phänomen der induzierbaren Makrolid-/Lincosamid-Resistenz bekannt: Erythromycin ist ein potenter, Clindamycin ein schwacher Induktor; Träger des entsprechenden induzierbaren Genes erscheinen also (ohne Induktion durch Erythromycin) Clindamycin-sensibel (LECLERCQ, 2002).

Metronidazol-Resistenz betraf 6,9 % der Isolate, gut vergleichbar zu 6,3 % resistenten aus humanen Klinik-Isolaten (ausschließlich *C. difficile*; PELÁEZ et al., 2002).

Untersuchungen an caninen Isolaten aus den USA (MARKS & KATHER, 2003) ergaben vergleichsweise niedrigere Resistenzraten als in der Gülle für Makrolide, Ampicillin und Metronidazol. KOCH et al. (1998) fanden zu humanen *C. perfringens*-Isolaten in Südafrika jeweils Resistenzraten von 4 % gegen Penicillin B und Clindamycin, BAQUERO & REIG (1992) in Spanien Resistenz gegen Penicillin in ca. 10 %, Metronidazol in 5–10 %, Erythromycin in 27 % und gegen Clindamycin in 10–20 % der Isolate.

Glykopeptid-resistente Isolate traten nicht auf; Isolate mit intermediären MHK-Werten gegenüber Vancomycin wurden auf Spezies-Ebene differenziert und allesamt als Angehörige der Gattung *C. sporogenes* identifiziert. Dies stimmt überein mit Untersuchungen von SWENSON et al. (1980), der als MHK₅₀-Wert für *C. sporogenes* eine Vancomycin-Konzentration von 4 mg/l, als MHK₉₀-Wert 8 mg/l fand.

Resistenzprofile und Mehrfachresistenz

Ungewöhnliche Resistenz

Aus einer Gülle wurde ein *C. perfringens*-Stamm (Rapid-ANR-differenziert) mit Resistenz gegen Florfenicol und Linezolid isoliert (Resistenzprofil: Clindamycin | Erythromycin | Tylosin | Florfenicol | Chloramphenicol | Linezolid). Ein Einhergehen erhöhter Linezolid-MHK-Werte mit Makrolid-/Lincosamid-Resistenz berichteten ACKERMANN et al. (2003) für *C. difficile*. Die dort gemessenen MHK-Werte waren 6 mg/l (lineare Skalierung der Konzentrationen); in der vorliegenden Untersuchung betrug der Linezolid-MHK-Wert für das *C. perfringens*-Isolat $> 8 < 16$ mg/l. Resistenz gegen Linezolid wurde nach Sichtung der Literatur bislang in *C. difficile*, weder aber in humanen noch in Veterinärstämmen von *C. perfringens* gefunden.

Eine genetische Basis der Verknüpfung von Makrolid | Linezolid | Chloramphenicol-Resistenz wurde von WOLTER et al. (2005) für *Streptococcus pneumoniae* beschrieben. Es handelte sich hierbei um eine Deletions-Mutation in einem das Riboprotein R6-codierenden Gen. Die Resistenz war auf empfindliche Stämme – unter Beeinträchtigung deren Fitness – übertragbar.

Übertragbare Resistenz gegen Chloramphenicol wird im Genus *Clostridium* sonst in der Regel durch das Gen *catP* vermittelt, welches Enzyme aus der CatA-Familie codiert. Dieses Gen wird auf dem integrativen, mobilisierbaren Transposon Tn4451 gefunden (ADAMS et al., 2002; SHULTZ et al., 2003). Derzeit geht man jedoch davon aus, dass *cat*-Gene nie Florfenicol-, sondern ausschließlich Chloramphenicol-Resistenz bedingen (CANNON et al., 1990; SCHWARZ et al., 2004). Ein Vorkommen der Florfenicol- und Chloramphenicol-Resistenz vermittelnden *flo*-Gene ist bislang im Genus *Clostridium* noch nicht publiziert worden. Ein Resistenzmechanismus analog zu *Streptococcus pneumoniae* scheint die wahrscheinlichste Erklärung für das beobachtete Resistenzprofil des *C. perfringens*-Isolates. Bemerkenswert vor diesem Hintergrund ist jedoch auch das simultane Vorkommen von Florfenicol | Chloramphenicol-Resistenz in einem hochmehrfach-resistenten *E. coli*-Isolat derselben Gülle. Ob dies auf eine Parallelselektion durch Florfenicol-Anwendung oder doch auf horizontalen Gentransfer zurückzuführen ist, bleibt fraglich.

Weitere Resistenzprofile von Interesse

Eines der Isolate zeigte Resistenz gegen alle untersuchten Penicilline (auch in der Kombination mit Clavulansäure) und Cefalosporine, nicht aber gegen Carbapeneme; hinzu trat Resistenz gegen Metronidazol. Jedoch ergab die Differenzierung des Isolates im API-System keine eindeutige Identität; in den untersuchten Stoffwechselleistungen zeigte sich Ähnlichkeit zu *Capnocytophaga spp.*, einer obligat anaeroben Spezies, für die – im Gegensatz zum Genus *Clostridium* – die Produktion von β -Laktamasen berichtet wurde (HANDAL et al., 2005).

Fluorquinolon-Resistenz

Auch bei Clostridien kann Resistenz gegenüber Fluorquinolonen aus mutationsbasierten Veränderungen in der GyrA oder GyrB-Untereinheit der DNA-Gyrase rühren; ob es, wie dies bei anderen Anaerobiern (*Bacteroides spp.*) der Fall ist, auch gegen Fluorquinolone gerichtete Efflux-Mechanismen gibt, ist noch nicht abschließend aufgeklärt (OH & EDLUND, 2003)

Im Gegensatz zu *E. coli*, *E. faecalis* und *E. faecium* war eine Assoziation der Fluorquinolon-Resistenz mit Mehrfachresistenz im Genus *Clostridium* nicht gegeben.

1.5.3 Laktobazillen

Alle Laktobazillen waren auf LAMVAB-Agar vorausgewählt worden. Somit sind in die Untersuchungen ausschließlich Vancomycin-resistente Spezies einbezogen worden; Angaben von HARTEMINK (1997), wonach auch die Spezies *Lb. acidophilus* zum Wachstum im Vancomycin-haltigen Milieu fähig sei, wurden von HAMILTON-MILLER & SHAH (1999) nicht bestätigt.

Resistenz gegen mindestens einen Wirkstoff trat auf bei 50 % der 552 *Lactobacillus*-Isolate und traf 12 von 14 untersuchten Antibiotika. Die Resistenzraten reichten von 0,4 % (Amoxicillin/Clavulansäure) bis 43,8 % (Doxycyclin).

Therapeutischer Einsatz von Antibiotika gegen Laktobazillen ist selten nötig; Anlässe sind meist nosokomialer Natur. So kann es beispielsweise – zufällig oder unter probiotischer Therapie – in immunsupprimierten Patienten durch Laktobazillen zu einer Sepsis kommen (LAND et al., 2005; BERGER, 2005). Auch Endokarditis, nachgeordnet Peritonitis, Abszesse und Meningitis kommen vor (MAKARYUS et al., 2005, CANNON et al., 2005). Zur Therapie werden Penicilline als Monotherapie oder in Kombination mit einem Aminoglykosid, Cefalosporine und gelegentlich Makrolide eingesetzt (CANNON et al., 2005). Die meisten *Lactobacillus spp.* sind intrinsisch resistent gegen Glykopeptide; die Ausnahme bildet *Lb. acidophilus* (DANIELSEN & WIND, 2003).

In den vorliegenden Untersuchungen war die Empfindlichkeit gegen die ausgewählten Cephalosporine mäßig bis schlecht: Gegen das Cefazolin erwiesen sich alle Laktobazillen natürlich intermediär (ca. 50 %) bis resistent (ca. 50 %); gegen Cefuroxim waren etwa 50 % empfindlich. Auch die Penicillin-MHK-Werte lagen für 75 % der Isolate im Intermediär-, im Rest der Fälle im resistenten Bereich. Gut wirksam (mit Suszeptibilitätsraten > 90–98 %) waren hingegen die Aminopenicilline und das Mezlozillin. Etwa 90 % der Isolate waren empfindlich gegen Makrolide und Lincosamide. Untersuchungen von CANNON et al. (2005) ergaben hingegen verglichen mit Gülle höhere Suszeptibilitätsraten gegenüber Penicillin mit über 50 % Penicillin-empfindlichen Keimen, gleichzeitig aber eine geringere Empfindlichkeit (60 %) gegen das potentere Ampicillin. Auch das Cefazolin war in jener Untersuchung in fast 50 % der Fälle wirksam gewesen. Die Empfindlichkeit gegen Clindamycin und Erythromycin waren hingegen vergleichbar (91–94 %). Der hohe Anteil Penicillin-resistenter Isolate in den vorliegenden Untersuchungen passt zu einem hohen Anteil der Spezies *Lb. plantarum* unter den differenzierten Isolaten, der bestätigt wird durch Untersuchungen von DU TOIT et al., die 2001 in phylogenetischen Untersuchungen innerhalb des Genus *Lactobacillus* in Schweinefaeces ebenfalls eine relative Dominanz der Spezies *Lb. plantarum* feststellten. Diese Spezies ist natürlich-resistent gegen Penicillin (DANIELSEN & WIND, 2003). Ein Aspekt hinsichtlich der differierenden

Ergebnisse ist sicherlich auch, dass in die Untersuchungen von CANNON et al. (2005) auch 22,5 % Vancomycin-sensible Isolate einbezogen waren, während Vancomycin-sensible Isolate aus dem hier untersuchten Probenmaterial – in Folge der Verwendung von Vancomycin-haltigem Anzucht-Medium – nicht kultiviert wurden.

Resistenzprofile und Mehrfachresistenz

Die bereits bei *E. faecium* beschriebene Kombination der Resistenzen gegen Doxycyclin, Clindamycin, Erythromycin, Tylosin und Synercid findet sich auch bei den Laktobazillen; die genetische Basis ist homolog, wenn nicht gar identisch: GFELLER et al. (2003) fanden auf einem Multiresistenz-Plasmid (pLME300) in *Lb. fermentum* neben der Makrolid | Lincosamid | StreptograminB-Resistenz vermittelnden Determinante *erm(LF)* auch die Codierung für *VatE*, eine zum entsprechenden *E. faecium*-Enzym identische, Streptogramin A inaktivierende Acetyltransferase; die gesamte Region zeigte 91 % Sequenz-Identität zu einer korrespondierenden *erm-vat*-Region in *E. faecium*. Das *Lb. fermentum*-Isolat war zugleich Tetrazyklin-resistent; dies beruhte auf einem chromosomal verankerten *tet(M)*-Gen.

An die Stelle der Synercid-Resistenz trat in einigen Isolaten aus Gülle Resistenz gegen Chloramphenicol; diese Resistenz war in Untersuchungen an Laktobazillen der menschlichen Intestinalflora nicht zu Tage getreten (DELGADO et al., 2005), wohl aber tauchte Resistenz gegen Chloramphenicol (und Tetrazyklin) in *Lb. plantarum*-Isolaten aus Käse auf (FLOREZ et al., 2005). LIN et al. (1996) fanden in *Lb. reuteri* das Plasmid pTC82 und darauf das Chloramphenicol-Resistenz codierende *cat(TC)*-Gen. Ein Isolat aus tetrazyklinhaltiger Gülle zeigte zusätzlich zur Doxycyclin | Makrolid | Lincosamid-Resistenz auch Resistenz gegen Ampicillin und Amoxicillin + Clavulansäure; ein *E. coli*-Isolat derselben Probe war ebenfalls gegen Aminopenicilline und deren Kombination mit Clavulansäure resistent. Ampicillin-resistente *Lactobacillus spp.* wurden auch in Speichel gefunden (GFELLER et al., 2003).

2 Phänotypische Resistenzparameter im Hinblick auf die Antibiotikagehalte der untersuchten Gülleproben

Die vorliegende Arbeit repräsentiert ein Teilprojekt der übergeordneten Studie „Neubewertung von Wirtschaftsdüngern“. Im Rahmen dieses Projektes wurden unter anderem die Gehalte der auch in dieser Arbeit untersuchten Gülleproben an antibiotischen Wirkstoffen mittels LC-MS analysiert (HARMS, 2006). Einbezogene Wirkstoffe waren unter anderem Tetrazykline, Sulfonamide, Enrofloxacin und Florfenicol. Dabei wurden Tetrazykline und/oder Sulfonamide von HARMS in ca. 70 % der Gülleproben detektiert: Ca. 18 % der Gesamtproben zeigten einen reinen Sulfonamid-Befund (oberhalb der Nachweisgrenze, d. h. $> 0,05$ mg/kg), ca. 22 % einen reinen Tetrazyklin-Befund ($> 0,1$ mg/kg) und in ca. 30 % der Proben waren sowohl Tetrazyklin(e) als auch Sulfonamid(e) nachgewiesen worden. Enrofloxacin ($> 0,1$ mg/kg) und Florfenicol ($> 0,02$ mg/kg) wurden nicht detektiert.

Da die Konzentrationen an Sulfonamiden durchgehend unterhalb des Breakpoints zwischen sensibler und intermediärer Population lagen, soll eine Aufschlüsselung der Gehalte nur für die Tetrazykline dargestellt werden. Die Einteilung der detektierten Tetrazyklin-Konzentrationen zeigt Tabelle 37 (HARMS, 2006). Die Klassifizierung der Gehalte aus „subinhibitorisch“, „intermediär“ und „inhibitorisch“ richtet sich hierbei orientierend nach den DIN-Grenzkonzentrationen (Breakpoints) für die Klassifizierung von Bakterien als sensibel, intermediär und resistent gegenüber Tetrazyklinen.

Tabelle 37 Vorkommen von Tetrazyklin in Schweinegülle: Einteilung der Befunde nach Wirkklassen entsprechend DIN (HARMS, 2006)

| Konzentrationsklassen Summe CTC+TC [mg/kg] | Befunde [%] | Antibakterielle Wirkung |
|---|----------------|----------------------------|
| < 0,1 | 48,9 | subinhibitorisch* |
| 0,1–1,0 | 28,2 | subinhibitorisch* |
| > 1,0–4,0 | 13,2 | intermediär |
| > 4,0 | 9,7 | inhibitorisch |

* zu berücksichtigen ist, dass „subinhibitorische“ Tetrazyklin-Konzentrationen durchaus einzelne besonders empfindliche Spezies bereits schädigen können

Aus den Ergebnissen von HARMS geht hervor, dass der größte Teil der Gülleproben lediglich subinhibitorische Tetrazyklin-Konzentrationen aufwies (77,1 %).

2.1 Resistenzverhalten der *E. coli* und *E. faecium*-Population gegenüber Tetrazyklin in Gülle mit unterschiedlichem Antibiotikagehalt

Zur Betrachtung der Auswirkungen der Tetrazyklin-Gehalte wurde ein Summenparameter aus allen von HARMS (2006) detektierten Tetrazyklinen gebildet (Σ Chlortetrazyklin, Doxycyclin, Oxytetrazyklin, Tetrazyklin). Dieser Parameter wird im Weiteren als Gesamt-Tetrazyklin, abgekürzt TET, bezeichnet.

Die Auswirkungen der unterschiedlichen Tetrazyklin-Gehalte auf die *E. coli*-Populationen in Gülle zeigt Abbildung 25. Aus einer Gülle wurden 1–4 (im Ausnahmefall 8; durchschnittlich 3) Isolate entnommen. Diese Isolate gemeinsamer Herkunft aus einer Gülle wurden vergleichend im Hinblick auf ihre Tetrazyklin-Resistenz betrachtet.

Demnach ergibt sich mit steigendem TET-Gehalt ein zunehmender Rückgang der Gülleproben, aus denen ausschließlich sensible *E. coli* isoliert wurden: von anfänglich 13 % auf 0 % in Gülle mit Gehalten $> 1\text{mg/kg}$ und darüber. Hingegen steigt der Anteil der Gülleproben, aus denen ausschließlich resistente Isolate kultiviert werden konnten, kontinuierlich von 10 % auf über 52 % an. Der Anteil dieser Gülleproben hat sich hierbei bereits in Gülleproben mit subinhibitorischer Tetrazyklinbelastung ($> 0,1 < 1\text{mg/kg}$) auf 30 % verdreifacht. Ein ähnliches Bild zeigt Abbildung 26 für *E. faecium* (Rückgang der Proben, aus denen keine resistenten oder intermediären Bakterien isoliert wurden, von 71 % in Gülle $< 0,01\text{mg TET /kg}$ auf 23 % in Gülle $> 4\text{mg TET /kg}$); allerdings ist zu berücksichtigen, dass der Anteil von Gülleproben mit mehreren *E. faecium*-Isolaten doch zum Teil gering ist.

In Gülle mit inhibitorischen Gehalten treten in gemischter Population mit resistenten nach wie vor auch sensible *E. coli* auf. Dies rührt zum Teil daher, dass die Empfindlichkeit gegenüber der Wirkstoffgruppe Tetrazyklin mit der Substanz Doxycyclin ermittelt wurde, die – bei gleichem Breakpoint – um etwa 2 bis 3 \log_2 -Stufen potenter ist als die in der Mehrzahl der positiven Befunde nachgewiesenen Substanzen Tetrazyklin und Chlortetrazyklin. Zum anderen erklärt es sich jedoch aus der Tatsache, dass Tetrazykline Bakterien nicht abtöten, sondern nur hemmen (bakteriostatische Wirkung). Im Ökosystem „Körper“ erfolgt – ein intaktes Immunsystem vorausgesetzt – die Beseitigung dieser inhibierten Bakterien in der Hauptsache durch Makrophagen und cytotoxische Effektor-Zellen (JANEWAY & TRAVERS, 1997). Offensichtlich gibt es in der Gülle keine vergleichbaren Abbau-Vorgänge, so dass bei Überführung in ein antibiotikafreies Milieu (Agarplatte) eine Rekonstitution der sensiblen Bakterienpopulation erfolgen kann.

Zudem fanden BAHL et al. (2004) auch im Darm gnotobiotischer Mäuse eine beträchtliche Zahl (10^7 KBE/g) Tetrazyklin-sensibler Keime trotz der Anwesenheit inhibitorischer Tetrazyklin-Konzentrationen. Die Autoren vermuten als Ursache die Ausbildung Tetrazyklin-armer bzw. -freier Kompartimente im Darm.

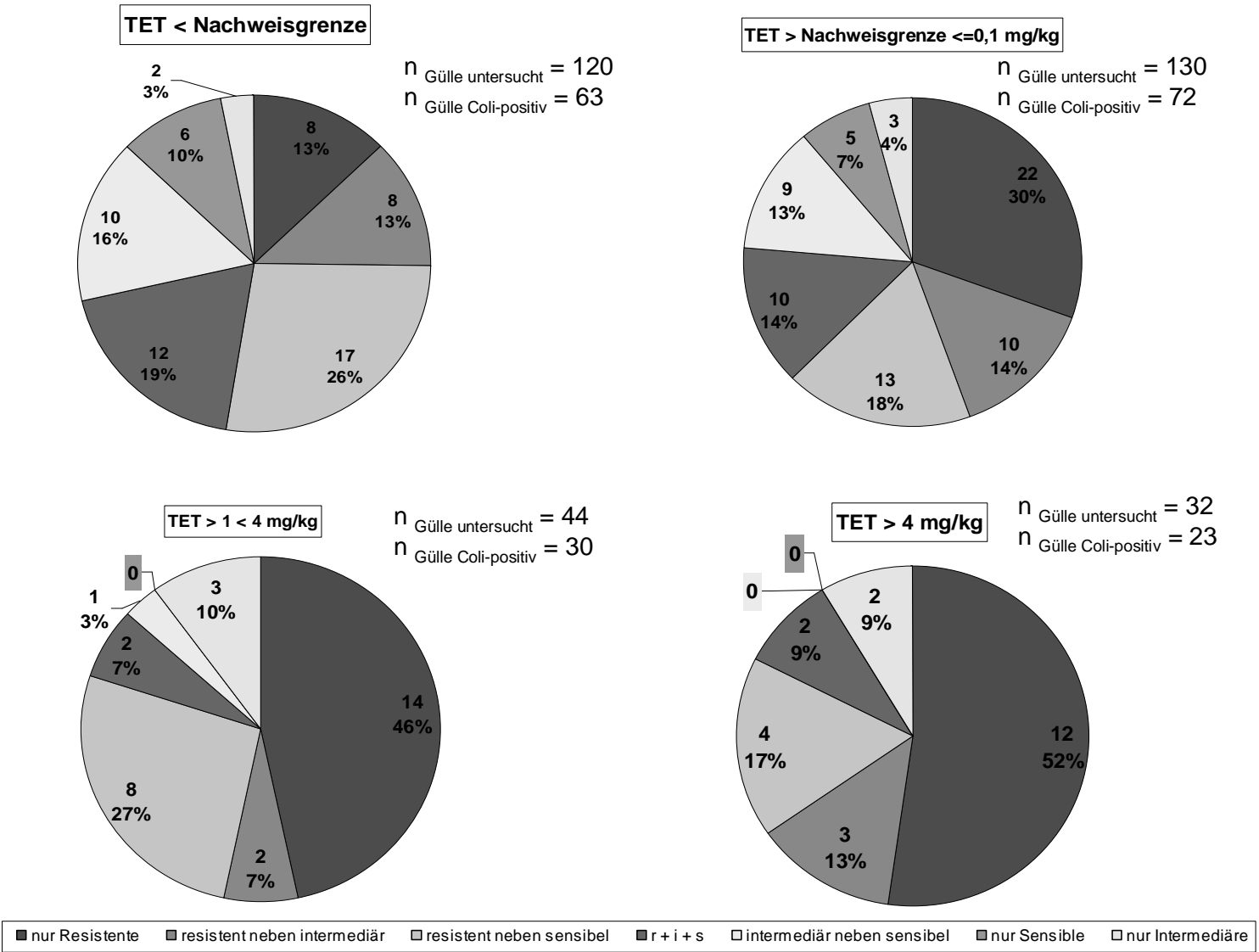


Abbildung 25: Resistenzstatus der *E. coli*-Isolate (\emptyset n = 3/Gülle) aus Gülle mit unterschiedlichen Tetracyclin-Gehalten gegenüber Doxycyclin

TET = Gesamt-Tetracyclin; r+i+s = resistent neben intermediär neben sensibel
 *) Anzahl der Gülleproben mit mehreren *E. coli*-Isolaten

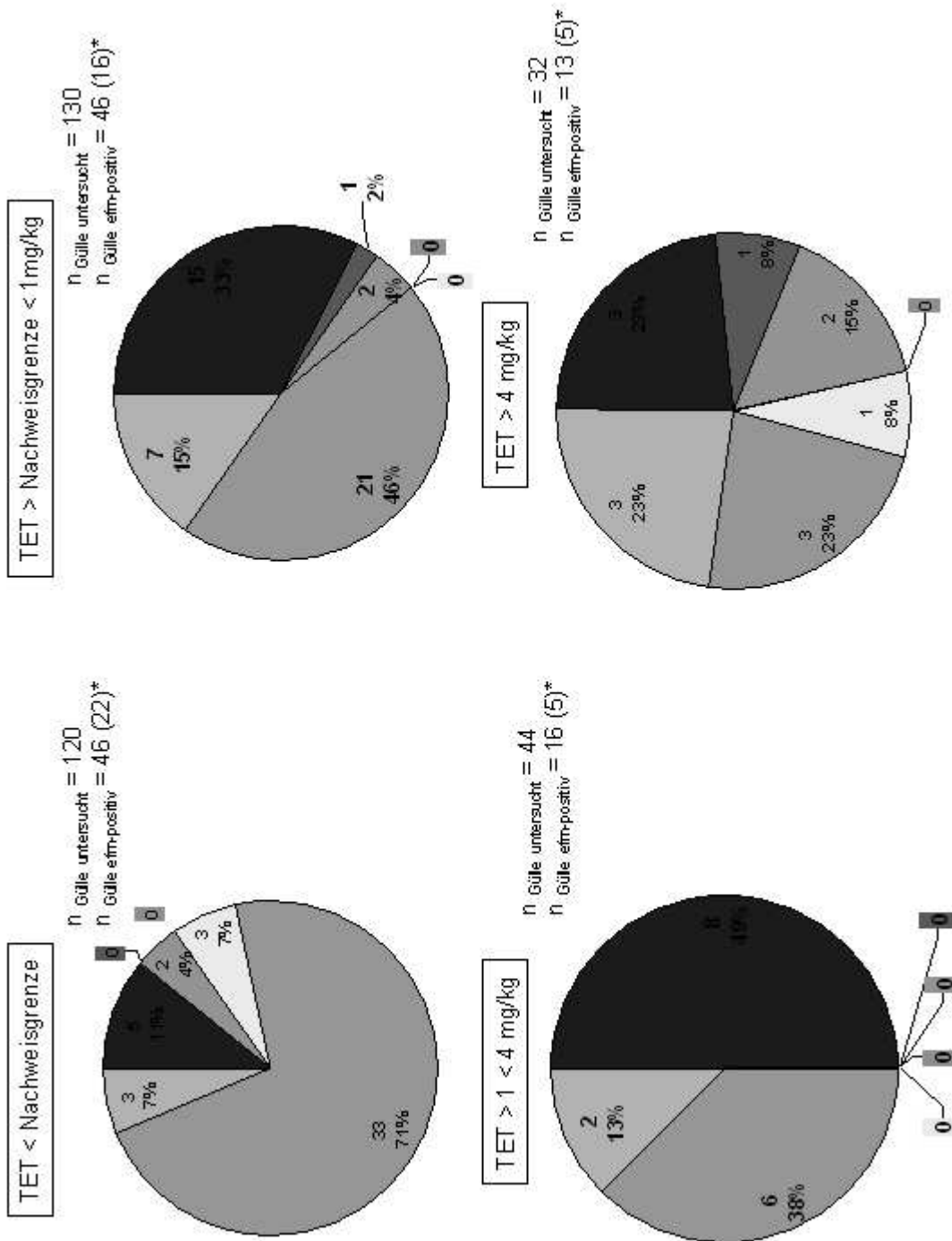


Abbildung 26: Resistenzstatus der *E. faecium*- Isolate aus Gülle mit unterschiedlichen Tetracyclin-Gehalten gegenüber Doxycyclin

Legende vgl. Abbildung 25

2.2 Einfluss von Antibiotikagehalten in Gülle auf Resistenzraten und Mehrfachresistenzen

Um die beschriebene phänotypische Resistenzsituation einordnen zu können, sollen im Folgenden die eigenen Resultate unter Berücksichtigung der von HARMS (2006) analytisch erhobenen Antibiotikarückstände in den Gülleproben diskutiert werden. Hierzu wurde unterschieden zwischen dem Resistenzverhalten der Isolate aus Gülleproben, in denen eines der im Verbundprojekt analytisch nachgewiesenen Antibiotika quantifiziert worden war, und solchen aus Gülle, die keines der einbezogenen Antibiotika in Konzentrationen oberhalb der Nachweisgrenzen (Tetrazykline 0,1 mg/kg, Sulfonamide 0,05 mg/kg) beinhaltete.

2.2.1 Resistenzraten

E. coli

Die generelle Resistenzrate gegen Doxycyclin lag in Antibiotika-positiven Proben signifikant höher als in der Vergleichsgruppe (Antibiotikanachweis_{pos.} 60 %; Antibiotikanachweis_{neg.} 37 %). Dies korreliert mit der Tatsache, dass Tetrazykline der häufigste Antibiotika-Befund waren. Auch Sulfamethoxazol-Trimethoprim (als einziger untersuchter Vertreter der Sulfonamide) traf in Isolaten aus Antibiotika-positiven Proben signifikant häufiger auf Resistenz (Antibiotikanachweis_{pos.} 19 %; Antibiotikanachweis_{neg.} 9 %); auch Sulfonamide gehörten zu jenen Substanzen, die im Monitoring direkt und häufig, wenn auch in geringen Konzentrationen, erfasst worden waren.

Gleichsinnige Unterschiede zeigten sich aber genauso signifikant bei Ampicillin (Antibiotikanachweis_{pos.} 21 %; Antibiotikanachweis_{neg.} 13 %) sowie unterhalb des Signifikanz-Niveaus für Streptomycin (Antibiotikanachweis_{pos.} 59 %; Antibiotikanachweis_{neg.} 50 %) und weitere Aminoglykoside. Diese Substanzen waren in das Monitoring – zum Teil aufgrund ihrer mangelnden Stabilität in der Umwelt – nicht einbezogen worden. Fluorquinolon- (1,72 % vs. 0 %) und Fencicol-Resistenz (Chloramphenicol: 8,37 vs. 4,08 %; Florfencicol 1,72 % vs. 0 %) zeigten eine (statistisch nicht signifikante) Tendenz zu höherer Vorkommenshäufigkeit in Antibiotika-positiven Proben.

Dass ein gleich gerichteter Unterschied zwischen den Resistenzprävalenzen beider Gruppen auch für die im Monitoring nicht erfassten bzw. nicht nachgewiesenen, aber veterinärmedizinisch häufig eingesetzten Substanzen besteht, zeigt, dass in gewissem Maße von den Befunden des Antibiotika-Monitorings auf die generelle Antibiotika-Anwendungspraxis geschlossen werden kann. Diese Annahme wird unterstützt durch Ergebnisse von DELSOL et al. (2003), die während einer Chlortetrazyklin-Fütterung an Schweine in den fäkalen *E. coli*-Isolaten der Versuchtiere keine signifikanten Veränderungen der MHK-Werte gegenüber Ampicillin, Chloramphenicol und Ciprofloxacin fanden. Dies zeigt, dass die unterschiedlichen Resistenzprävalenzen nicht allein durch Chlortetrazyklin-bedingte Coselektion zustande kamen.

Dass die Unterschiede in der Resistenzprävalenz zwischen den Gülleproben je nach Antibiotikanachweis für die nicht-untersuchten Substanzen deutlich geringer sind als für die einbezogenen Stoffklassen Tetrazykline und Sulfonamide, zeigt jedoch auch, dass eine Übertragung der Befunde zu Tetrazyklinen und Sulfonamiden auf andere antibiotische Wirkstoffe nur bedingt zulässig ist.

Fluorquinolon- und Florfenicol-Resistenz trat ausschließlich in Proben mit positivem Antibiotikanachweis auf. Veterinärmedizinisch zugelassene Vertreter beider Substanzklassen waren in das Antibiotika-Rückstandsmonitoring einbezogen, jedoch nicht nachgewiesen worden. Beide Resistenztypen traten nie alleine, sondern stets in Kombination mit mindestens zwei anderen Wirkstoffen auf; bei Chloramphenicol-Resistenz in Proben mit positivem Monitoring-Befund lag in 33 von 39 Fällen gleichzeitig Resistenz gegen Doxycyclin und einen oder mehrere weitere Wirkstoffe vor. Koppelung der Resistenzselektion für Fluorquinolon- bzw. Florfenicol-Resistenz an die Tetracyclinresistenz könnte die Assoziation dieser Resistenztypen mit positivem Monitoring-Befund trotz der Abwesenheit von Enrofloxacin- (und Florfenicol-) Gehalten oberhalb der Nachweisgrenze erklären.

Möglich wäre jedoch auch insbesondere für die Fluorquinolone eine Selektion von Spontanmutanten durch Fluorquinolon-Kontaminationen unterhalb der Nachweisgrenze: Nach VAN BAMBEKE et al. (2005) liegt die Nachweisgrenze von 0,1 mg/kg oberhalb der MIC₉₀ nativ-sensibler *E. coli*. Eine – subanalytische – Konzentration von 0,01 mg Fluorquinolon/kg würde nach den Daten des Autors bereits ca. 50 % der nativ-sensiblen *E. coli* konterselektieren.

E. faecalis

Die generelle Resistenzrate gegen Doxycyclin unterschied sich zwischen Proben mit und ohne positiven Monitoring-Befund nicht. Sie lag gleichermaßen hoch bei 81 – 82 %. Jedoch unterschied sich signifikant die Höhe der MHK-Mittelwerte gegenüber Doxycyclin im Whitney-Rank-Sum-Test ($p < 0,001$), mit höheren Werten in antibiotikahaltigen Proben. Diese zusätzliche Erhebung war nur für Doxycyclin und *E. faecalis* durchgeführt worden, da ein bloßer Vergleich der Resistenzraten aufgrund der mit dem Resistenzbereich überlappenden Verteilung der nativen Population (vgl. DIN-Kontrollbereich 2–8 mg/kg) wenig aussagekräftig wäre. Mit der Anwesenheit transmissibler Tetracyclin-Resistenzdeterminanten werden MHK-Werte zwischen 32 und >64 mg/kg in Verbindung gebracht. Signifikant unterschied sich die Ausprägung der Streptomycin-High-Level-Resistenz mit 24 % Resistenz in Monitoring-negativen Proben gegenüber 40 % in Proben mit nachweislicher Antibiotika-Kontamination. Diese Tendenz war auf Proben mit Gentamicin-High-Level-Resistenz nicht übertragbar (10,3 % in „negativen“ vs. 7,8 % in Antibiotika-positiven Proben).

Eine statistisch nicht signifikante Tendenz zu niedrigeren Resistenzraten in Betrieben ohne positiven Monitoring-Befund zeigte sich für die Makrolide (Erythromycin: 48,5 % vs. 53,9 %; Tylosin: 38 % vs. 49 %).

Keine dieser Substanzen, für die sich (tendentielle oder signifikante) Unterschiede in den Resistenzraten abhängig vom Antibiotikabefund abzeichneten, war selbst Untersuchungsgegenstand des Antibiotika-Monitorings gewesen. Die tendentiellen Unterschiede in der Häufigkeit der Makrolid-Resistenz zwischen Isolaten aus Gülleproben mit unterschiedlichen Monitoring-Befunden scheinen vor dem Hintergrund ihrer möglichen Kopplung an Tetracyclin-Resistenzdeterminanten (COURVALIN & CARLIER, 1987; DE LEENER et al., 2004;) plausibel. Gleichermäßen erklärt möglicherweise die Koppelung der Streptomycin-Resistenz an die transmissible Tetracyclin- (und Makrolid-) Resistenz, wie sie beispielsweise – neben anderen – auf dem zusammengesetzten Transposon Tn5385 in *E. faecalis* besteht (RICE & CARIAS, 1998), weshalb ein signifikanter Unterschied in der Ausprägung der Streptomycin-Resistenz in Abhängigkeit vom Antibiotika-

Monitoring-Befund bestand. Wie schon bei *E.coli* traten Fluorquinolon-resistente Keime nur in Gülleproben mit positivem Antibiotikanachweis (ungleich Fluorquinolone) auf. (Resistenzrate je nach Fluorquinolon 2–3 %).

E. faecium

Für die häufigsten Resistenzen bei *E. faecium*, nämlich Resistenzen gegen Fosfomycin, Rifampicin, Erythromycin und Clindamycin, ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Isolaten aus Proben mit unterschiedlichem Antibiotika-Status.

Hingegen zeigten sich solche Unterschiede für alle Fluorquinolone signifikant. Auch Doxycyclin-, Synercid- und Tylosin-Resistenz traten signifikant häufiger in Proben mit positivem Antibiotika-Monitoringbefund auf; für Streptomycin-High-Level blieben die Unterschiede knapp außerhalb der Signifikanz-Grenze. MOLITORIS et al. fanden 1986 bei Untersuchungen an Chlortetrazyklin-gefütterten Schweinen und Kontrolltieren einen numerischen Unterschied im Anteil Tetrazyklin-resistenter *E. faecium*-Stämme, der jedoch statistisch nicht signifikant war.

Auf den ersten Blick mag verwundern, dass Unterschiede in der Tylosin-Resistenzrate, nicht aber in der Erythromycin-Resistenzrate zu Tage treten, obgleich es sich bei beiden Substanzen um Makrolide handelt, und obgleich sich solche Unterschiede für das Erythromycin bei *E. faecalis* sehr wohl abzeichnen. Jedoch scheint dies darin begründet zu sein, dass in *E. faecium*, anders als in *E. faecalis*, sich die Makrolid-Resistenz häufig gegen Erythromycin allein richtet, ohne das Tylosin einzuschließen: 76,2 % der Erythromycin-resistenten *E. faecalis* waren zugleich Tylosin-resistent; jedoch nur 20,8 % der *E. faecium*.

Erythromycin besitzt einen 14-gliedrigen Lakton-Ring, während der Lakton-Ring des Tylosins sich aus 16 Gliedern zusammensetzt. Während Resistenzgene vom *erm*-Typ Resistenz gegen 14- und 16-Ring-Makrolide zugleich vermitteln, richten sich *msr*-Gen-codierte Resistenzen ausschließlich gegen 14-Ring-Makrolide (LECLERCQ, 2002). McDERMOTT et al. (2005) fanden in *Enterococcus faecium*-Isolaten aus Virginiamycin-gefütterten Schweinen eine hohe Prävalenz von *msr*-Genen.

Möglicherweise beruhen die vom Antibiotika-Status abhängigen Unterschiede in der Resistenzrate gegen Erythromycin bei *E. faecalis* überwiegend auf Kreuzselektion durch das – verglichen mit Erythromycin häufiger angewandte, und eventuell auch potenter selektierende – Tylosin. Da die phänotypischen Daten darauf hindeuten, dass Erythromycin-Resistenz in *E. faecium* überwiegend durch einen ausschließlich gegen 14-Ring-Makrolide gerichteten Mechanismus vermittelt wird, und daher, aufgrund der erhaltenen Sensibilität gegenüber dem 16-Ring Makrolid Tylosin, Kreuzselektion durch Tylosin nicht stattfindet, übertragen sich die Prävalenz-Unterschiede der Tylosin-Resistenz bei *E. faecium* nicht auf die Prävalenz der Erythromycin-Resistenz.

Clostridien

Signifikante Unterschiede in den Resistenzraten der Isolate aus Proben mit und ohne Antibiotikanachweis ergaben sich für Fosfomycin und für die Fluorquinolone Enrofloxacin und Ciprofloxacin. Wie schon bei *E. coli*, *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium* fand sich eine gesteigerte Fluorquinolon-Resistenzrate in Isolaten aus antibiotikahaltigen Proben. Doxycyclin-Resistenz trat ausschließlich in nachweislich antibiotikahaltigen Proben auf.

Laktobazillen

Signifikante Unterschiede in den Resistenzraten der Isolate abhängig vom Antibiotika-Status der Proben zugunsten der analytisch negativen Proben ergaben sich für Doxycyclin (5,1 % vs. 38,6 %), Clindamycin, Erythromycin und Tylosin (je < 1,5 % vs. 7,6–8,5 %). Die – Kreuzresistenz gegen Doxycyclin selektierenden – Tetrazykline Chlortetrazyklin und Oxytetrazyklin waren die häufigsten Monitoring-Befunde gewesen. Makrolide hingegen waren nicht untersucht worden. Eine Coselektion der Makrolid-Resistenz durch Tetrazyklin ist jedoch wahrscheinlich: Untersuchungen von READY et al. (2002) an *Lactobacillus spp.* aus Speichel ergaben unter Laborbedingungen eine Erhöhung des Prozentsatzes Erythromycin-resistenter Keime von 5 % auf 28 % nach Zugabe von Tetrazyklin zum Speichel.

2.2.2 Mehrfachresistenzen

Betrachtet man die Isolate hinsichtlich ihrer Mehrfachresistenzen unter Berücksichtigung der Antibiotikabefunde, so ergibt sich in der grafischen Darstellung der kumulativen Häufigkeiten für alle Spezies, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß, eine Rechts-Verschiebung der Prozentkurven (vgl. Abbildung 27). Dies bedeutet, dass in nachweislich antibiotikahaltiger Gülle im Vergleich zu analytisch negativen Proben stets ein geringerer Prozentsatz der Isolate im sensiblen, einfach bzw. gering-mehrfachresistenten Bereich lag; hingegen zeigte stets ein höherer Prozentsatz dieser Isolate Hochmehrfach-Resistenz.

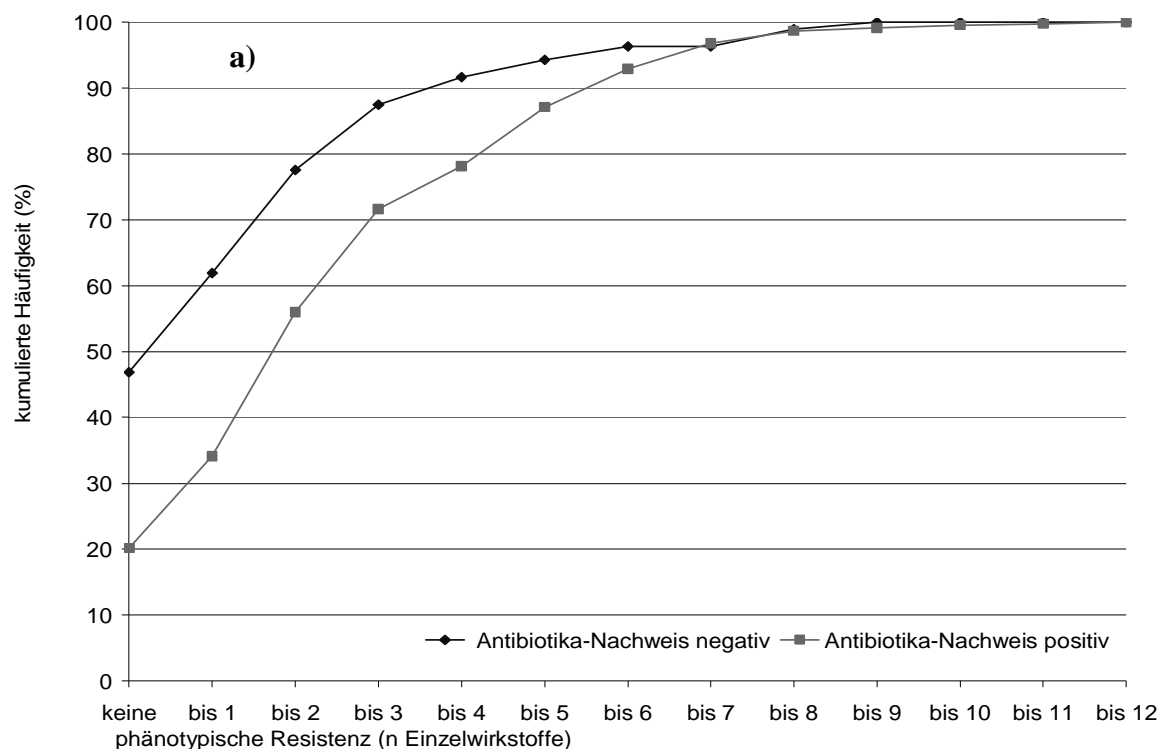
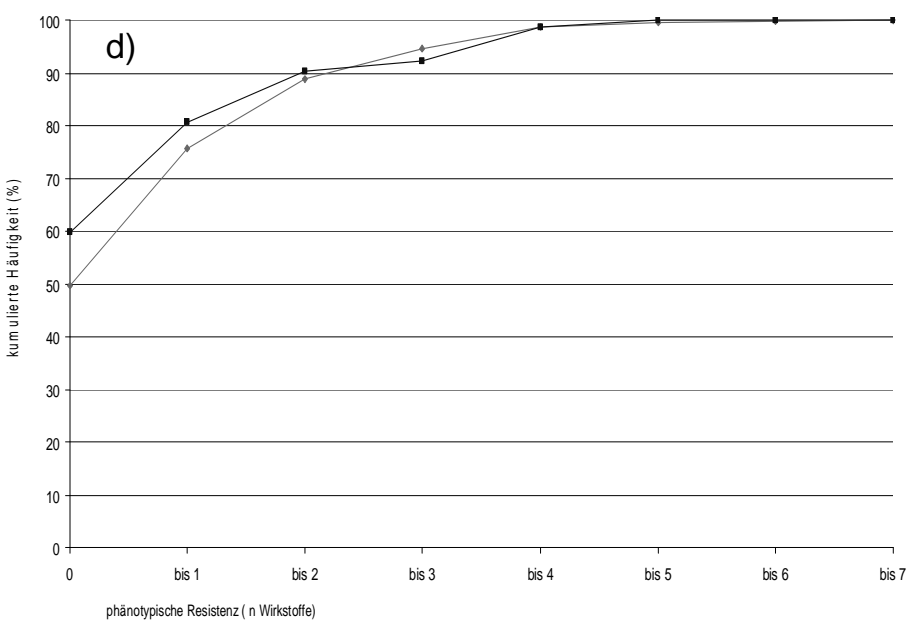
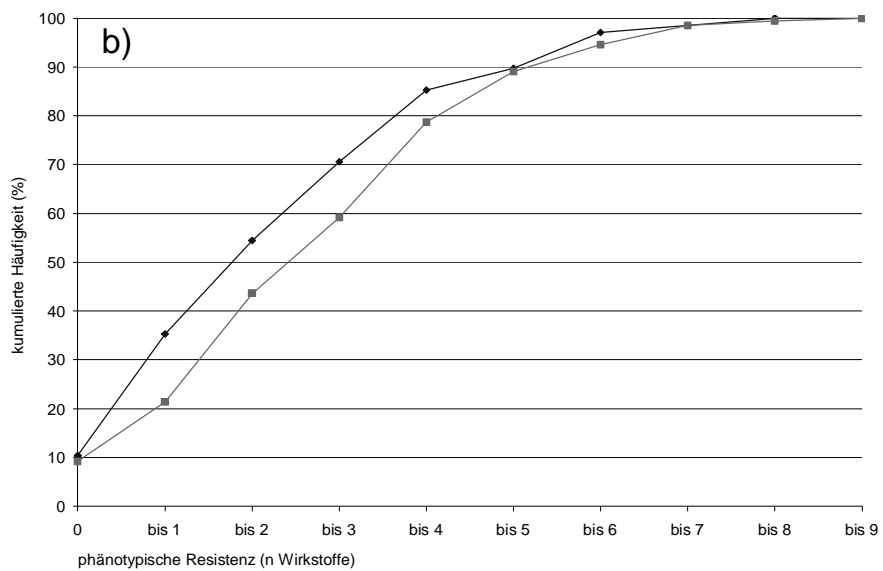
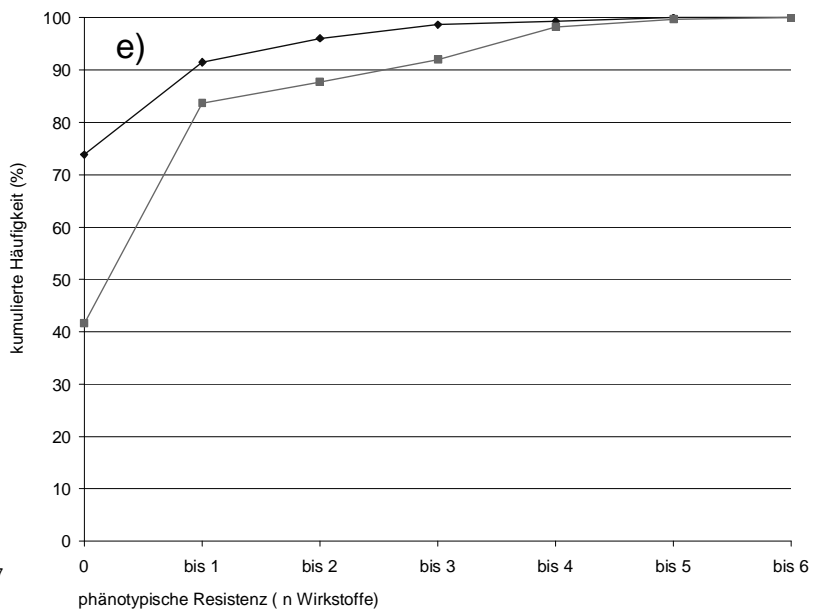
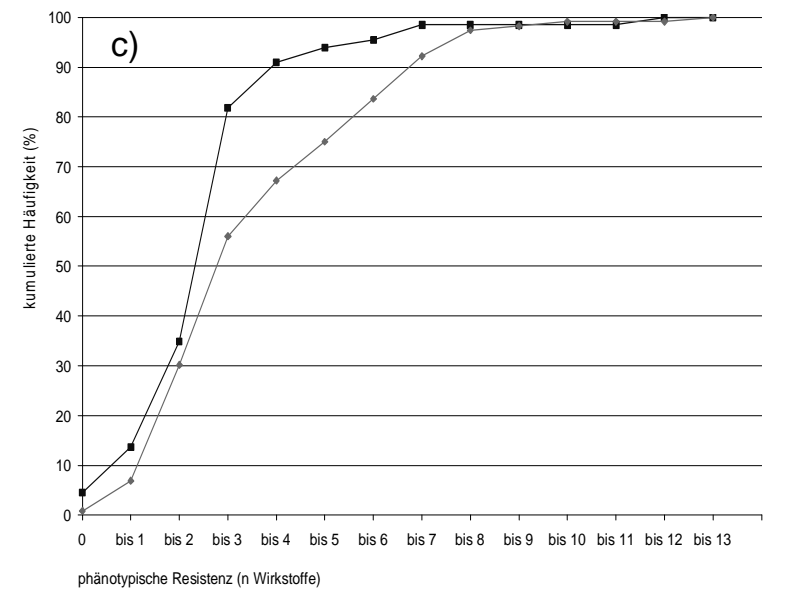


Abbildung 27 a-e: Mehrfachresistenz bei Bakterienisolaten aus Schweinegülle mit unterschiedlichem Antibiotika-Status

a) *E. coli*



Fortsetzung Abbildung 27 a-e: Mehrfachresistenz bei Bakterienisolaten aus Schweinegülle mit unterschiedlichem Antibiotika-Status
 b) *E. faecalis* c) *E. faecium* d) *Clostridium spp.* e) *Lactobacillus spp.*

Die Verschiebungen im sensiblen und gering mehrfach-resistenten Bereich zwischen Isolaten aus Gülleproben mit unterschiedlichem Monitoring-Befund erklären sich zu einem großen Teil über die unterschiedliche Prävalenz bestimmter Einzelresistenzen bei den jeweiligen Spezies in beiden Probengruppen (z. B. *E. coli*: Doxycyclin). Auch im mittleren Mehrfachresistenz-Bereich (4 bis 6 Resistenzen) waren vornehmlich solche Resistenzen beteiligt, deren Einzelprävalenzen sich bereits (zum Teil signifikant) in den beiden Probengruppen unterschieden (z. B. *E. coli*: Aminoglykoside, Ampicillin, Doxycyclin, Cotrimoxazol).

Dass aus der Abbildung z. B. für *E. faecium* keine signifikanten Unterschiede in der Resistenzausprägung gegen keine, eine oder zwei Substanzen ersichtlich sind, korreliert mit der Tatsache, dass die häufigsten Einzel- oder Doppelresistenzen bei dieser Spezies Rifampicin, Erythromycin und Clindamycin betrafen: Stoffe, für die die Vorkommenshäufigkeit der jeweiligen Resistenz sich zwischen den Untersuchungsgruppen nicht signifikant unterschied. Hingegen involviert das häufigste Vierfach-Resistenzprofil die Fluorquinolone; hier bestanden signifikante Unterschiede in der Resistenzausprägung zwischen Isolaten aus Gülle mit und ohne Monitoring-Befund, mit höheren Resistenzraten in nachweislich Antibiotika-positiven Gülleproben; dementsprechend bewegen sich die kumulativen Prozentkurven ab der Dreifach-Resistenz auseinander.

Untersuchungen von MOLITORIS et al. (1986) zeigten eine Einengung der Resistenzprofile in fäkalen Streptokokken Chlortetrazyklin-gefütterter Schweine von 57 unterschiedlichen Mustern (Kontrolltiere) auf 43 (Versuchstiere). Im Gegensatz dazu lag in den hier untersuchten *E. faecium*-Isolaten aus antibiotikahaltiger Gülle die Diversität der Resistenzprofile mit 70 unterschiedlichen Profilen weit über der Diversität der Resistenzmuster in *E. faecium*-Isolaten aus analytisch Antibiotika-negativer Gülle (29 Profile). Diese Unterschiede in der Diversität der Resistenzmuster gehen mit einiger Wahrscheinlichkeit auf die Tatsache zurück, dass in den Untersuchungen von MOLITORIS et al. ausschließlich Chlortetrazyklin eingesetzt wurde, während in den vorliegenden Untersuchungen das Vorkommen weiterer Antibiotika in Tetrazyklin- und/oder Sulfonamid-positiver Gülle nicht ausgeschlossen werden kann.

Über alle Spezies hinweg gab es eine (statistisch nicht signifikante) Tendenz zu höheren Mehrfachresistenz-Maxima in Gülle mit positivem Antibiotikanachweis: Bei *E. coli* standen maximal 9 Resistenzen in Isolaten aus Proben ohne Antibiotikanachweis gegen 12 Resistenzen in analytisch positiven Proben. Bei *E. faecalis* waren es 8 vs. 9 simultane Resistenzen; bei *E. faecium* fand sich unter den Isolaten mit 8 bis 13 Resistenzen nur ein Isolat aus Proben ohne Antibiotikanachweis – dieses allerdings mit einer 12fach-Resistenz –, verglichen zu neun Isolaten aus analytisch positiven Proben (Maximum: 13fach-Resistenz). Bei Clostridien lag die Obergrenze bei 5 vs. 7 Resistenzen, bei Laktobazillen waren es 5 vs. 6 Resistenzen. Ein 6fach-resistentes *Lactobacillus*-Isolat aus tetrazyklinhaltiger Gülle zeigte zusätzlich zu einer Doxycyclin | Makrolid | Lincosamid-Resistenz auch Resistenz gegen Ampicillin und Amoxycillin + Clavulansäure. READY et al. (2002) hatten Ampicillin-resistente Isolate im Speichel gefunden, die dort in gewissem Grad durch die Anwesenheit von Tetrazyklinen coselektiert werden konnten: Die Ampicillin-Resistenzrate stieg unter Laborbedingungen von 0,4 auf 3 % bei Tetrazyklinzusatz zum Speichel.

Hochmehrfach-Resistenz ist in vielen Fällen durch das Auftreten von Resistenzgenen kumulierenden Plasmiden oder die Überexpression von Multidrug-Transportern bedingt. Tetrazykline (ebenso wie Chloramphenicol) können eine Überexpression des Multidrug-Transporters AcrAB induzieren (GHISALBERTI et al., 2005). Zudem ist Tetrazyklin ein potenter Induktor des Transfers bzw. Cotransfers Resistenz codierender Plasmide, selbst dann, wenn diese Resistenzen sich gegen andere

Wirkstoffe als Tetracykline richten (VALENTINE et al., 1988; STEVENS et al., 1993; SALYIERS et al., 1995). Beide Tatsachen bieten einen Erklärungsansatz für eine erhöhte Neigung zu Mehrfachresistenz in Proben mit positivem Antibiotikanachweis.

2.2.3 Charakterisierung der Bakterienpopulation aller einbezogenen Spezies in Gülle mit hochmehrfach-resistenten Isolaten

In 36 Gülleproben wurden hochmehrfach-resistente Isolate gefunden. Die Grenze der Hochmehrfach-Resistenz wurde aufgrund der unterschiedlichen Zahl einbezogener Antibiotika sowie aufgrund der unterschiedlichen Disposition zur Mehrfachresistenz je nach Spezies unterschiedlich gehandhabt: *E. coli* wurden ab 9 Resistenzen als hochmehrfach-resistent gewertet; *E. faecalis* und *E. faecium* hingegen ab 8 Resistenzen, Laktobazillen und Clostridien bereits ab 5 Resistenzen. Antibiotika-kontaminierte Proben machten etwa zwei Drittel der Probengesamtheit aus; sie stellten ca. drei Viertel derjenigen Gülleproben, die hochmehrfach-resistente Keime beherbergten. Innerhalb dieser Proben wiesen 4,3 % ausschließlich einen Sulfonamid-Befund auf; 30,4 % beinhalteten ausschließlich ein oder mehrere Tetracykline und 65,2 % waren zugleich mit Tetracyklin(en) und Sulfonamid(en) kontaminiert. Umgekehrt beherbergten 8,1 % der Proben ohne Monitoring-Befund und 10,0 % der nachweislich Antibiotika-kontaminierten Proben hochmehrfach-resistente Isolate. Bezogen auf die Art der Antibiotika-Kontamination fanden sich hochmehrfach-resistente Isolate in 1,4 % der ausschließlich Sulfonamid-positiven Proben, 8,3 % der ausschließlich Tetracyklin-positiven Proben und 12,9 % der Proben mit Tetracyklin- und Sulfonamid-Befund. (Unterschiede zwischen Sulfonamid- und Misch-kontaminierten Proben signifikant). Auch die Höhe der Antibiotikabefunde spielte bei Tetracyklinen eine Rolle: 6,3 % der Proben mit Tetracyklin-Konzentrationen < 0,1 mg/kg beinhalteten mehrfach-resistente Keime; für Proben mit Gehalten zwischen 0,1 und 1 mg/kg bzw. 1–4 mg/kg bzw. > 4 mg/kg waren es 8,8 % bzw. 11,8 % bzw. 18,4 %.

Der Durchschnitt aller aus einer Probe mit hochmehrfach-resistenten Bakterien isolierten Keime war in antibiotikahaltigen Proben gegen 3,32 Wirkstoffe resistent, in Proben ohne entsprechenden Monitoring-Befund gegen 2,47 Antibiotika (Differenz signifikant, wenn auch begründet auf eine geringe Zahl untersuchter Proben; $p = 0,045$).

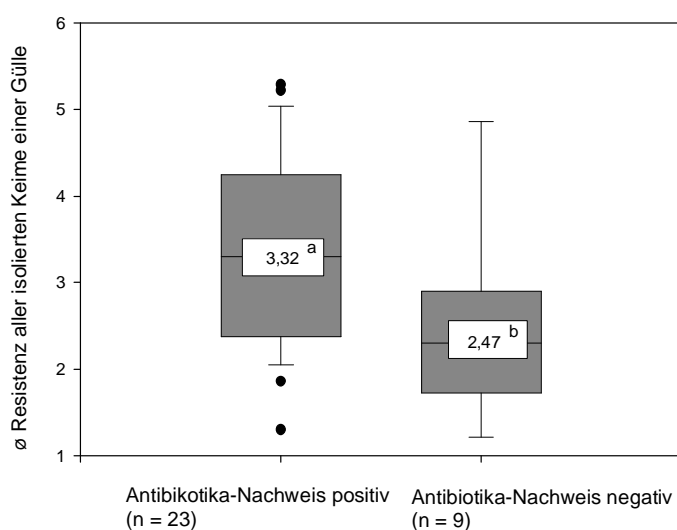


Abbildung 28: Vergleich der durchschnittlichen Resistenz der isolierten Bakterienpopulation aus Gülle mit hochmehrfach-resistenten Isolaten und positivem bzw. negativem Antibiotika-befund

a, b: signifikante Unterscheidung

Parallelresistenzen

Mit Ausnahme zweier Proben zeigten in allen Gülleproben andere Isolate Parallelresistenzen mit dem hochmehrfach-resistenten Isolat. Die Ausnahme bildeten eine Probe mit *Salmonella* Derby (weitere Isolate: alle untersuchten Spezies) und eine Probe mit *Lactobacillus* spp. (weitere Isolate: nur *Clostridium* spp.).

Die häufigste Parallelresistenz richtete sich gegen Doxycyclin. Diese Resistenz war in 28 Fällen an der Hochmehrfach-Resistenz beteiligt und trat in 24 Fällen zugleich in weiteren Isolaten auf. Aufgrund des hohen Anteiles der Proben mit Tetrazyklin-Befunden kommen als Ursache dieser Parallelresistenz sowohl eine parallele Selektion durch Tetrazyklin-Gehalte als auch eine horizontale Weitergabe der Resistenzgene in Frage. Ersteres ist wahrscheinlicher für die simultane Doxycyclin-Resistenz in gramnegativen (*E. coli*, *Salmonella* spp.) und grampositiven Bakterien (*Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp.); letztere ist eher anzunehmen für (nicht-klonale) Isolate derselben Spezies bzw. zwischen *E. faecalis*, *E. faecium* und *Lactobacillus* spp. einerseits (BENTORCHA et al., 1991.; GEVERS et al., 2003), *E. coli* und *Salmonella* spp. andererseits (DOUBLET et al., 2005). Jedoch ist eine horizontale Weitergabe von Resistenzgenen mindestens auch zwischen *Enterococcus* spp. und *E. coli* in Betracht zu ziehen (POYART et al., 1995)

Die höchste Zahl an Parallelresistenzen außerhalb der eigenen Spezies zeigten *E. coli* und *Salmonella* Typhimurium: Beide Isolate waren resistent gegen Ampicillin, Chloramphenicol, Doxycyclin, Sulfamethoxazol-Trimethoprim sowie Spectinomycin-Streptomycin. Alle diese Resistenzen liegen auf der genetischen Einheit „*Salmonella* Genomic Island 1“, einem integrativen, mobilisierbaren genetischen Element, das nachweislich auf *E. coli* übertragbar ist (DOUBLET et al., 2005). Der MHK-Wert des *E. coli*-Isolates gegen Florfenicol betrug lediglich 8 mg/kg, im *S. Typhimurium*-Isolat hingegen > 32 mg/kg. Fehlende phänotypische Florfenicol-Resistenz beschreiben BOLTON et al. (1999) bei einem *Salmonella* Typhimurium-Isolat trotz Anwesenheit des *flo*-Genes.

Häufig war in Gülle mit hochmehrfach-resistenten *E. coli* oder *E. faecalis* bzw. *faecium*-Isolaten zugleich Streptomycin-Resistenz in *E. coli* und Streptomycin-High-Level-Resistenz in *Enterococcus* spp. zu beobachten. Diese traten parallel auf in 12 von 14 Proben, in denen beide Gattungen zugleich isoliert worden waren und Streptomycin-Resistenz in einer der Gattungen gegeben war. CLARK et al. (1999) identifizierten in einem Streptomycin-High-Level-resistenten *E. faecalis*-Isolat anstelle des nach JACKSON et al. (2005) in dergestalt resistenten *Enterococcus* spp. verbreiteteren *aadE* = *ant*(6')-Ia-Genes das *aadA* = *ant*(3'')(9)-Gen; dieses Gen war identisch zum *aadA*-Gen des *E. coli*-Plasmids R 6-5 (SUNDSTROM et al., 1988), während *aadE* nicht mit Streptomycin-Resistenz in *E. coli* in Verbindung gebracht wird.

E. faecalis und *Lactobacillus* spp. sowie *Clostridium* spp. wiesen mehrfach gemeinsame Makrolid-Resistenz auf. Übereinstimmung bzw. Transfer entsprechender Gene, z. B. *erm*(GT) (*Enterococcus faecalis*/*Lactobacillus* spp.; TANNOCK et al., 1994) und *erm*(BP) (*Enterococcus faecalis*/*C. perfringens*; BERRYMAN & ROOD, 1995) sind aus der Literatur bekannt.

Weitere Parallelresistenzen von besonderem Interesse waren Chloramphenicol-Resistenz in *E. coli* und *E. faecalis* (n = 2), in *C. fallax* und *E. faecalis*, sowie zugleich in *E. coli*, *E. faecalis* und *Lactobacillus* spp.; Florfenicol-/Chloramphenicol-Resistenz in *E. coli* und *C. perfringens*; Enrofloxacin-Resistenz in *Clostridium* spp. und *E. coli*

bzw. *E. faecalis* (n=2) bzw. *E. faecium* und die parallele Ampicillin | Amoxycillin+Clavulansäure-Resistenz in *Lactobacillus spp.* und *E. coli*.

Für Chloramphenicol-Resistenzgene in *E. faecalis* beschreiben KRAH & MACRINA (1989) eine Lokalisation auf dem broad-host-range Plasmid pIP501; KURENBACH et al. (2003) gelang der konjugative Transfer dieses Plasmides aus *E. faecalis* in *E. coli*. Erläuterungen zur Florfenicol-Chloramphenicol-Parallelresistenz in *E. coli* und *C. perfringens* finden sich unter Punkt D2.7. Aufgrund der häufigen Mutations-Genese der – dann horizontal nicht übertragbaren – Fluorquinolon-Resistenz scheint als Ursache der Enrofloxacin-Parallelresistenzen eine Paralleleselektion wahrscheinlicher als eine horizontale Übertragung. Zu den genetischen Ursachen einer Resistenz gegen Aminopenicilline und Clavulansäure im Genus *Lactobacillus* liegen bislang keine Publikationen vor; erst recht ist die Frage der intergenerischer Übertragbarkeit einer solchen Resistenz offen.

Eine detaillierte Aufstellung der im gesamten Abschnitt 2.2.3 erläuterten Sachverhalte gibt Tabelle 39, Anhang.

3 Verbreitung ausgewählter Tetracyclin-Resistenzgene in Schweinegülle

3.1 Methodische Aspekte

AGERSØ et al. (2004) verwendeten eine γ -Bestrahlungsdosis von 25 kGy, um Bodenproben zur Nutzung als Leerprobe im *tet(M)*-Dotierungsversuch aufzubereiten. Im Unterschied zum Material der vorliegenden Untersuchung war jedoch die so behandelte Probe bereits vorher im *tet(M)*-Nachweis mittels Real-Time-PCR negativ. Die im Rahmen dieser Untersuchungen verwandte Standardgülle enthielt dagegen ursprünglich rund 10^8 Kopien *tet(M)* pro Gramm. Die von AGERSØ et al. (2004) gewählte Dosis war daher zur Behandlung unseres Probenmaterials nicht ausreichend, eine höhere Dosis von ca. 400 kGy musste Anwendung finden.

Eine Nachweisgrenze für den Nachweis von *tet(M)* konnte nicht festgesetzt werden, da auch die mit 400 kGray behandelte Probe etwa $2,5 \log_{10}$ Kopien *tet(M)* im PCR-Aliquot aufwies. Daher konnten (unter Einbeziehung einer Sicherheitsmarge) nur im Konzentrationsbereich ab $3,5 \log_{10}$ Kopien im Aliquot (ca. $5,1 \log_{10}/g$) verlässlich gemessen werden. Für die Zielsetzung dieser Studie, den Vergleich von Feldgülle aus der Schweinehaltung, spielte dies jedoch keine Rolle, da die niedrigste aufgetretene Konzentration $6,8 \log_{10}/g$ betrug.

Die Verwendung eines *tet(M)*-Extraktes aus Gülle als Standard hat den Vorteil, dass eventuell auftretende inhibitorische Effekte der Gülle den Standard ebenso betreffen wie die Proben. Betrachtet man jedoch die Wiederfindungsraten und setzt die Ergebnisse in Bezug zur Untersuchung der Bodenproben, scheint von Schweinegülle ein vergleichsweise geringer inhibitorischer Effekt auszugehen.

Bei der Bewertung der einzelnen Gene ist zu berücksichtigen, dass die Ergebnisse von *tet(M)*, *tet(O)* und *tet(B)* nicht unmittelbar vergleichbar sind, da *tet(O)*- und *tet(B)*-Standardstämme eine nicht bekannte Anzahl von Kopien des jeweiligen Genes im Genom tragen. Die Ergebnisse zu *tet(M)* sind zudem – durch die Verwendung eines DNA-Extraktes aus Gülle – indirekt bereits um die Wiederfindungsrate (die je nach Konzentrationsbereich 15–37 % betrug) korrigiert.

Geht man für *tet(O)* und *tet(B)* von einer ähnlichen Wiederfindungsrate bei jeweils gleicher Kopienzahl im Standard aus, so läge der mittlere Gehalt an *tet(O)* nur wenig unter dem mittleren *tet(M)*-Gehalt; der Gehalt an *tet(B)* jedoch deutlich niedriger. Zu einer Unterschätzung der Gehalte an *tet(B)* wie *tet(O)* käme es, falls der Standardstamm mehr als eine Kopie trägt. Die angegebenen Werte für *tet(O)* und *tet(B)* müssen daher als Minimalwerte \leq den Tatsächlichen gesehen werden.

3.2 Ausscheidungskinetik von Tetrazyklin-Resistenzgenen in Schweinefaeces

Die Untersuchung der Ausscheidung von Resistenzgenen in Faeces während und nach antibiotischer Behandlung stellt ein geeignetes Instrumentarium dar, gezielt das Selektionspotential wie auch das Co-Selektor-Verhalten bestimmter Antibiotika im Hinblick auf ausgewählte Resistenzgene einzuschätzen. Gegenüber dem bloßen Nachweis antibiotikaresistenter Bakterien bietet dieses Vorgehen eine Beobachtungsmöglichkeit genetischer Veränderungen auch in der nicht-kultivierbaren Flora.

Betrachtet man den Verlauf der fäkalen Ausscheidung von *tet(O)* unter Chlortetrazyklin- (CTC) Fütterung der Versuchsschweine, so zeigt sich ein rasches Ansteigen der *tet(O)*-Gehalte in Anwesenheit von Tetrazyklin: Bereits an Tag 2 der Tetrazyklinfütterung (Zeitraum: vom Morgen des ersten CTC-Fütterungstages bis zum Morgen des Probennahmetages) hatte sich der absolute *tet(O)*-Gehalt gegenüber dem Vortag im Mittel vervierfacht. Hingegen erfolgte das Absinken der Gehalte erheblich langsamer: die *tet(O)*-Konzentration lag 14 Tage nach Ende der CTC-Fütterung noch immer durchschnittlich um den Faktor 5,5 über der Ausgangskonzentration. Dies deckt sich mit Untersuchungen von LEVY, der, bezogen auf phänotypische Resistenz, ebenfalls von einem raschen Anstieg und ungleich langsameren Absinken der Resistenz berichtet (LEVY, 1986).

tet(M)-Gehalte in Faeces von Schweinen, die in Stoffwechselläufigen innerhalb desselben Stallraumes mit den Chlortetrazyklin-gefütterten Versuchsschweinen gehalten worden waren, jedoch selbst nicht in Kontakt mit Tetrazyklin kamen und antibiotika-freier Aufzucht entstammten, korrelierten in ihrem Verlauf signifikant mit den *tet(M)*-Gehalten der Faeces der Versuchstiere.

MARSHALL et al. (1990) fanden die Verbreitung Resistenzplasmid tragender *E. coli* innerhalb eines landwirtschaftlichen Betriebes in verschiedensten Vektoren wie Mäusen und Fliegen, aber auch dem Stallpersonal, ohne dass eine Verbreitung der resistenten Keime (bzw. der Plasmide) durch Antibiotikagabe forciert worden wäre. Auch im Einstreu-Material, in Stall-Luft- sowie in Oberflächen-Proben wurden die Resistenzgen-Träger gefunden. Vor diesem Hintergrund erscheint der parallele Verlauf der Ausscheidungskinetik von Tetrazyklin-Resistenzgenen zwischen den Versuchs- und Kontrolltieren plausibel.

3.3 Bodenproben

Betrachtet man die Entwicklung der Resistenzgen-Gehalte im seit mehreren Jahren ausschließlich mineralisch gedüngtem Boden nach Düngung mit Gülle von Chlortetrazyklin-gefütterten Schweinen, so sind sowohl der Resistenzgen-Gehalt wie auch der Wirkstoffgehalt der Gülle von Bedeutung, da beides – direkt durch Eintrag oder indirekt durch Selektion – Einfluss auf die Resistenzgen-Gehalte haben kann. Als Quelle der Tetrazyklin-Resistenzgene im Boden sind somit grundsätzlich drei Möglichkeiten vorstellbar:

1. Selektion und somit Vermehrung der Tetrazyklin-resistenten Bodenbakterien („Reservoir-Bakterien“) durch den Chlortetrazyklin-Gehalt der Gülle;
2. Weitergabe der Resistenzgene aus der Gülle-Population an die Bodenflora (wofür wiederum die Anwesenheit von Antibiotikum im Boden ein begünstigender Faktor ist);
3. (temporäres) Überleben bzw. Vermehrung einer Resistenzgen-Träger-Population aus der Gülle im Boden.

Eine generelle Annahme oder Ablehnung dieser Thesen ist auf der Basis der geringen untersuchten Probenzahl nicht möglich. Jedoch soll die Plausibilität der Erklärungsansätze in Hinblick auf die Einzelbefunde orientierend diskutiert werden.

Die Weitergabe von Resistenzgenen via Konjugation erscheint im Boden zunächst untergeordnet, da die Bakteriendichte und -mobilität als vergleichsweise gering anzunehmen sind. Sowohl geringe Bakteriendichte als auch behinderter räumlicher Kontakt gelten als Barrieren des Gentransfers (STOTZKY & BABICH, 1986; KINKLE & SCHMIDT, 1991). Jedoch wurde im Mikrokosmos für das „broad host range“-Plasmid IncP1 ein hohes Transferpotential in Boden und Rhizosphäre nachgewiesen; dies beinhaltete auch den Transfer auf autochthone Bodenbakterien (PUKALL et al., 1996). GÖTZ et al. (1996) fanden häufig IncP-Plasmide sowohl in Schweinegülle als auch in landwirtschaftlichen Böden. GÖTZ und SMALLA (1997) beobachteten die Mobilisierung nicht-konjugativer IncQ-Plasmide durch IncP-Plasmide in Gülle-gedüngtem, nicht aber in ungedüngtem Boden und leiten daraus – wie auch TOP et al. (1994) aus dem Vorkommen von IncP-Plasmiden in verschmutzten Böden – Anhaltspunkte für eine hohe Gen-Mobilisierungs-Kapazität in derart Nährstoff-angereicherten Habitaten ab (GÖTZ & SMALLA, 1997). IncP-Plasmide sind – wie viele Plasmide – in der Lage, chromosomale Gene zu mobilisieren (TROXLER et al., 1997), können also auch Resistenzgene übertragen.

Auch der Transfer des *tet(M)* beinhaltenden Transposons Tn916 wurde in nicht-sterilen Boden-Mikrokosmen unter *Bacillus*-Spezies nachgewiesen (HAACK et al., 1996). Eine initiale Weitergabe der *tet*-Gene an die autochthone Bodenflora wäre eine Erklärung dafür, dass nach niedrigen Initial-Gehalten in den auf die Düngung folgenden Tagen zunächst ein Anstieg der Resistenzgen-Gehalte zu beobachten war.

Eine dauerhafte Etablierung einer Resistenzgen-Träger-Population aus der Gülle im Boden lässt sich aus den eigenen Beobachtungen nicht ableiten, da die Resistenzgen-Gehalte kontinuierlich abnehmen und zuletzt unter die Nachweisgrenze absinken. Zieht man die Ergebnisse zur Untersuchung von Tetrazyklin-Resistenzgenen in Gülle-Proben heran, die auch in Gülle von Tetrazyklin-frei gehaltenen Schweinen Resistenzgen-Gehalte bis 10^7 copies/g ergaben, erscheint es wenig wahrscheinlich,

dass die Gülle-Bakterien zwar überlebten, jedoch in Abwesenheit eines Tetrazyklin-Selektionsdruckes ihre Resistenzgene verloren; vielmehr scheinen diese Bakterien in Konkurrenz mit der autochthonen Bodenflora zu unterliegen und kontinuierlich abzusterben. Dass dies möglicherweise rasch geschieht, ist kein Widerspruch zu den bis Tag 50 nach Düngung nachweislich persistierenden Resistenzgen-Gehalten, da auch frei vorliegende DNA im Boden relativ lange persistieren kann: LORENZ und WACKERNAGEL (1994) konnten nach Inokulation extrazellulärer DNA in unsterile Mikrokosmen einzelne Gene noch 60 Tage später nachweisen.

Die Ergebnisse der Quantifizierung phänotypisch resistenter Bakterien im Boden nach Güllendüngung mittels kultureller Methoden (SENGELØV et al., 2003) ähneln jenen der vorliegenden Studie: Auch in der Relation Tetrazyklin-resistenter Bakterien zur aeroben Gesamtkeimzahl ergaben sich nach Düngung mit unter Tetrazyklin-Behandlung erzeugter Gülle nur temporäre Veränderungen. In zwei von vier Feldern war die Rate Tetrazyklin-resistenter Bakterien (Mittelwert aus 10 Messungen) bereits innerhalb von 50 Tagen auf das Niveau der Kontrollproben (25–75 Perzentil) zurückgegangen; auch auf dem Feld, das mit Gülle des höchsten Tetrazyklin-Gehaltes gedüngt worden war, lagen 4 der 10 Messwerte nach 50 Tagen auf der Höhe der Kontrollproben (25–75 Perzentil). Der maximale Tetrazyklin-Gehalt in der Gülle betrug hierbei 0,7 mg/l. Zum nächsten Messzeitpunkt, ca. 5 Monate nach Düngung, lagen alle Proben aller Felder innerhalb des Wertebereichs der Kontrollproben.

Die Autoren untersuchten auch das Vorkommen der Resistenzgene *tet(A)*, *tet(B)* und *tet(C)* in gramnegativen Tetrazyklin-resistenten Bakterien, die aus den Güllendüngten Böden isoliert worden waren: nur eines von 45 Isolaten trug *tet(B)*, keines *tet(A)* oder *tet(C)* (SENGELØV et al., 2003). Dies korreliert mit den niedrigen und rasch verschwindenden *tet(B)*-Gehalten im hier vorliegenden Direkt-Nachweis der *tet(B)*-Gene aus Güllendüngten Böden.

Überträgt man die worst-case-Schätzung der Tetrazyklin-Gehalte im Boden aus der Studie von SENDELØV et al. (2003), die bei einem Tetrazyklin-Gehalt der Gülle von 0,7 mg/kg den Tetrazyklin-Gehalt im Boden bei 0,01 mg/kg ergibt, auf die hier vorliegenden Tetrazyklin-Gehalte in Gülle (9,1 mg/kg), so wäre im Versuch von 2004 von einer Boden-Tetrazyklin-Konzentration von ca. 0,2 mg/kg auszugehen. Diese Konzentration läge deutlich im subinhibitorischen Bereich (vgl. Tabelle 37), von einer direkten Selektor-Wirkung der Tetrazyklin-Kontamination wäre nicht auszugehen.

AGERSØ et al. (2004) fanden nach Extraktion mit dem UltraClean™ Soil DNA Isolation Kit drei Tage nach Güllendüngung auf regelmäßig gedüngter landwirtschaftlicher Fläche in einer Tiefe von 10 cm vier von fünf Proben im qualitativen *tet(M)*-PCR-Nachweis positiv. Die Nachweisgrenze lag bei 2–3 log₁₀ Kopien pro Gramm. Im Gegensatz zu den hier vorliegenden Untersuchungen, in denen abhängig vom Bodentyp schon 3 bis 11 Wochen nach der Güllendüngung weder *tet(M)* noch *tet(O)* oder *tet(B)* mehr gefunden wurde, war *tet(M)* in den Untersuchungen von AGERSØ auch ein Jahr nach Begüllung noch nachweisbar. Die Böden der AGERSØ-Studie waren ein Jahr vor der ersten Beprobung gedüngt, nicht aber unmittelbar vor der Düngung im Versuchsjahr untersucht worden. Nachweisbar war *tet(M)* auch auf einer zuletzt zwei Jahre zuvor Güllendüngten Fläche (AGERSØ et al., 2004). Ein kumulativer Effekt kann daher beim positiven Nachweis eine Rolle gespielt haben.

Die in Grünland ermittelten Gehalte an *tet(M)* und *tet(O)* lagen – bei gleichem Wirkstoff- und Resistenzgen-Gehalt der eingesetzten Gülle – deutlich unter den

Gehalten in Ackerboden (Differenz $> 1 \log 10$), hielten sich aber erheblich länger ($> 7 < 11,5$ Wochen). Die Abhängigkeit der Überlebensraten im Boden für Bakterien aus Gülle vom Bodentyp wird unterschiedlich eingeschätzt: Während NICHOLSON et al. (2005) ähnliche Überlebensraten in zwei Bodentypen berichten, mit leichter Tendenz zum langsameren Absterben der Bakterien in tonreichem Grünland verglichen zu sandigem Ackerland, sprechen TOP et al. (1990) von einem deutlichen Einfluss des Bodentyps auf die Überlebensraten von inokulierten Bakterien (wie auch auf die Gentransfer-Raten): Während in sandigen und lehmig-sandigen Boden okulierte *E. coli* gute Überlebensfähigkeit zeigten, verringerte sich ihre Zahl in sehr tonreichem Boden innerhalb der ersten zwei Wochen nach Inokulation rasch. Darüber hinaus fanden FOSTER et al. (1983) eine Stimulation des Bakterienwachstums durch die Rhizosphäre; VAN ELSAS et al. (1989) sahen gesteigerte Gentransfer-Raten in der Umgebung von Pflanzenwurzeln. Beide Faktoren – der geringere Tongehalt wie auch die höhere Durchwurzelung im Grünland – könnten somit die längere Persistenz der Resistenzgene im Grünland erklären, nicht aber die initial niedrigeren Gehalte verglichen zu Ackerland. Möglicherweise spielen hierbei von der Bodenart abhängig unterschiedliche Matrix-Effekte im PCR-Nachweis eine Rolle.

3.4 Vorkommen von Tetracyclin-Resistenzgenen in Praxisgülle

Die gefundenen *tet*-Gengehalte wurden im univariaten linearen Modell auf ihre Abhängigkeit von den einbezogenen Faktoren „Beprobungszeitraum“, „Betriebstyp“, „Betriebsgröße“, „Keimgehalt“ und „Antibiotikagehalt“ überprüft.

Das verwendete statistische Modell zur Einordnung der erhobenen Faktoren hatte ein R-Quadrat von 0,38. Es ist nicht gedacht (noch geeignet) als Vorhersage-Modell, da der überwiegende Anteil der Einflussfaktoren unbekannt ist und nicht in das Modell eingehen kann (z. B. vollständige Zusammensetzung der Keimflora; Art und Häufigkeit der Tetracyclin-Behandlungen, Schwermetallgehalte der Gülle). Hingegen ist es gut geeignet, den partiellen Einfluss der bekannten Größen einzuschätzen und deren relative Gewichtung abzuwägen.

Beprobungszeitraum

Im Frühjahr 2003 eingegangene Proben wiesen höhere *tet*-Gengehalte auf als dies für Proben aus dem Herbst 2002 der Fall war. Dies stimmt überein mit (wenn auch nicht-signifikant) höheren Prozentsätzen Doxycyclin-resistenter Bakterien im Frühjahr. Der Einfluss des Beprobungszeitraumes kann nicht über die höheren Tetracyclin-Gehalte im Frühjahr erklärt werden, da er in Proben aller Tetracyclin-Konzentrationen sowie in analytisch Tetracyclin-negativen Proben auftrat. Denkbar ist eine Coselektion durch andere Antibiotika mit Anwendungsspitzen im Winter. Erwogen werden muss auch der mögliche Einfluss einer unterschiedlichen Lagerzeit der Herbst- und Frühjahrsproben (von ca. 6 Monaten) bis zur gleichzeitigen Untersuchung in der PCR.

Betriebstyp

Eine nahe liegende Erklärung für den ausschließlich für *tet(O)* nachgewiesenen Einfluss des Betriebstyps (mit höheren Werten in Zuchtbetrieben) ist nicht gegeben, die Aussagekraft des Befundes fraglich. Ein Erklärungsansatz könnten Betriebstyp-abhängig unterschiedliche Prävalenzen der als *tet(O)*-Träger in Frage kommenden Keime sein (bisher nachweislich z. B. *Campylobacter spp.*, Enterokokken, Laktobazillen, *Peptostreptococcus spp.*, *Neisseria spp.*, *Mobiluncus spp.*; *Megasphaera elsdenii*, *Streptococcus suis* und *Streptococcus pneumoniae*; MANAVATHU et al., 1988; ZILHAO et al., 1988; WASTESON et al., 1994; WIDDOWSON et al., 1996; ROBERTS et al., 1990, 1991; VILLEDIEU et al., 2003; STANTON et al., 2003, 2004). Da jedoch bislang die Zusammensetzung der Darmflora des Schweines nicht umfassend bekannt ist (LEUNG & POPP, 2001) und die Erkenntnisse zum Resistenzgen-Vorkommen in der nicht-kultivierbaren Flora lückenhaft sind (HANDELSMAN, 2004), kann zum heutigen Zeitpunkt ein Zusammenhang der Verschiebungen im Genvorkommen mit Veränderungen der Darmflora nicht belegt werden.

Betriebsgröße

Das Merkmal „Betriebsgröße“ zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die *tet*-Gengehalte in Gülle. Dies ist kein Widerspruch zum Einfluss der Betriebsgröße auf die phänotypischen Resistenzraten gegenüber Doxycylin, da letzterer im Wesentlichen auf die Betriebsgröße-abhängig unterschiedlichen Tetrazyklin-Gehalte zurückgeführt werden kann. Der mittelbar über die Tetrazyklin-Konzentration ausgeübte Einfluss der Betriebsgröße wird jedoch durch die Verwendung des univariaten linearen Modells statistisch korrigiert, da der Einfluss der Betriebsgröße auf den *tet*-Gengehalt über alle Tetrazyklin-Konzentrationen (einschließlich negativer Proben) hinweg erhoben wird. Es verbliebe gegebenenfalls lediglich ein von den anderen im Modell einbezogenen Parametern unabhängiger Einfluss. Ein solcher konnte nicht nachgewiesen werden.

Antibiotikagehalt

Der Einfluss der von HARMS (2006) erhobenen Tetrazyklin-Konzentrationen auf die Gehalte der Gene *tet(M)*, *tet(O)* und *tet(B)* wurde gemeinsam mit den bereits angesprochenen Einflussfaktoren in das univariate lineare Modell einbezogen. Hierzu wurde der Parameter „Gesamt-Tetrazyklin“ (TET) verwendet, vergleiche Punkt 2.1

Für die *tet(M)*-Gehalte ergaben sich hierbei, wie aus Abbildung 29 ersichtlich, in TET-freier Gülle mit einem Mittelwert von 7,75 log *tet(M)*/g signifikant niedrigere Werte als in TET-positiven Proben mit einem Mittelwert von 8,34 log *tet(M)*/g ($p \leq ,001$).

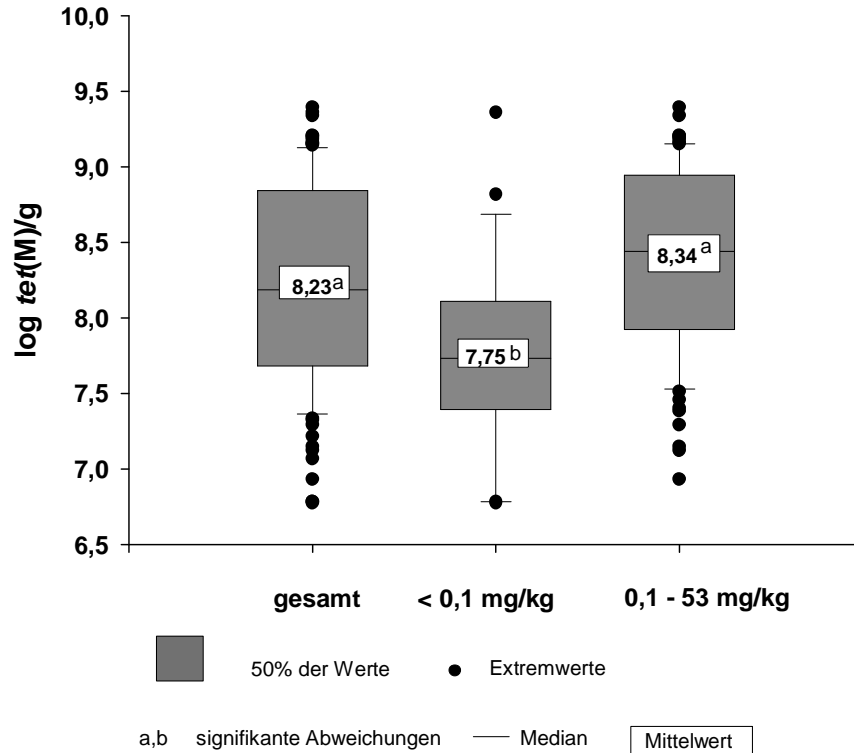


Abbildung 29: *tet(M)*-Gehalte in Schweinegülle

Die Ergebnisse gleichen in gewissem Maße denen von SMITH et al. (2004). Diese untersuchten den Gehalt an *tet(W)*, *tet(O)* und *tet(Q)* – wie *tet(M)* Gene aus der Klasse der Schutzprotein-codierenden Gene – in verschiedenen Rindergülle-Lagunen mit unterschiedlichen Tetrazyklin-Gehalten (nachgewiesen im ELISA). Jedoch unterschieden die Autoren nicht zwischen antibiotikafreier und antibiotikahaltiger Gülle, sondern zwischen sub- und supermedianen Konzentrationen. Für alle untersuchten Gene ergaben sich zwischen diesen beiden Gruppen in der Untersuchung von SMITH et al. (2004) signifikante Unterschiede, mit höheren Gengehalten in Proben supermedianer Tetrazyklin-Konzentration.

Bei Aufgliederung nach TET-Gehalten unterschieden sich in den vorliegenden Untersuchungen die *tet(M)*-Gehalte innerhalb der TET-haltigen Proben nicht signifikant voneinander (s. Abbildung 30). Auch unterschieden sich im univariaten linearen Modell nur die Proben mit TET-Gehalten zwischen 0,1 und 1 mg/kg signifikant von TET-freien Proben ($p = 0,015$, mittlere Differenz = 0,51 log₁₀), nicht jedoch jene Proben mit höheren TET-Gehalten. Der Anteil des Faktors „TET-Gehalt“ an der Gesamtvarianz hatte ein partielles Eta-Quadrat von 0,1.

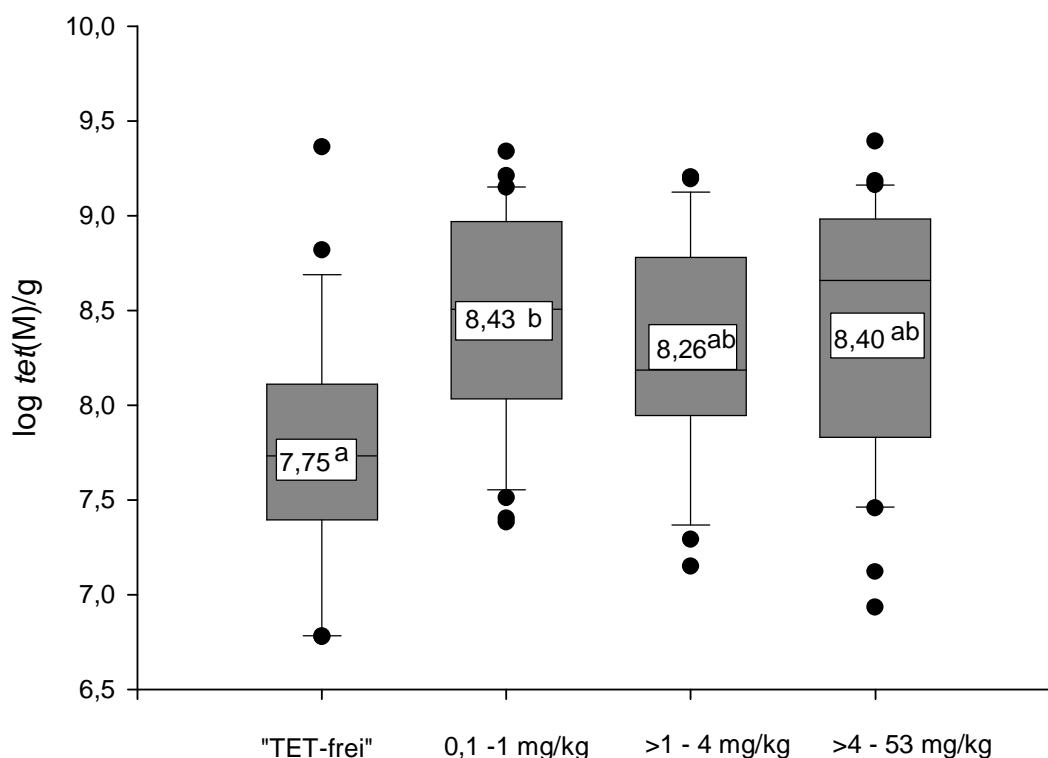


Abbildung 30: Aufgliederung der *tet(M)*-Gehalte in Gülleproben nach Gesamt-Tetrazyklin-Gehalt; Legende vgl. Abbildung 29

Um einen möglichen Schwellenwert innerhalb des Konzentrationsbereiches 0,1 bis 1 mg/kg auszumachen, wurde diese Gruppe in 0,1 mg/kg-Unterteilungen aufgespalten und im t-Test mit den TET-negativen Proben verglichen. Dies ergab, dass ein signifikanter Anstieg sich bereits in der Konzentrationsstufe von 0,1 bis 0,2 mg/kg vollzogen hatte.

Dies ist in Übereinstimmung mit Untersuchungen von BAHL et al. (2004) über den Transfer des *tet(M)* tragenden Transposons *Tn916* im Darm gnotobiotischer Ratten: Die Zahl der Transkonjuganten unterschied sich hochsignifikant zwischen den Tieren abhängig davon, ob eine Tetrazyklinsupplementierung des Trinkwassers durchgeführt worden war; in den Tetrazyklin-supplementierten Versuchsgruppen war jedoch die Zahl der Transkonjuganten unabhängig von der angewandten Tetrazyklin-Konzentration identisch. Die unterschiedlichen Konzentrationen betrug dabei 5, 10 und 50 mg/l Trinkwasser; dies resultierte nach Aussage der Autoren in einem verfügbaren Tetrazyklin-Gehalt in Faeces von durchschnittlich 0,65, 2,85 bzw. 17,19 mg/kg.

CORPET et al. definierten im Mausmodell 6,5mg/l Trinkwasser/Tag als minimale selektive Dosis; DOUCET-POPULAIRE fanden dagegen ebenfalls bei Mäusen schon nach Trinkwassersupplementierung in Höhe von 1mg/l/Tag über 35 Tage hinweg anschließend eine Verzehnfachung der Transkonjugate. (CORPET et al., 1989; DOUCET-POPULAIRE et al., 1991). PERRIN-GUYOMARD bestimmte nach Tetrazyklin-Supplementierung des Trinkwassers auch die TET-Gehalte in Faeces, und fand bereits bei einer Konzentration unter der Nachweisgrenze von 0,6 mg/kg eine signifikant erhöhte Rate resistenter Bakterien in Faeces weiblicher Mäuse mit human-assoziiertes Darmflora (PERRIN-GUYOMARD et al., 2001).

Korrelationen

Obwohl ein signifikanter Unterschied nur zwischen den Gruppen TET-frei und 0,1–1 mg/kg festgestellt wurde, war der Gehalt an *tet*(M) mit den TET-Gehalten der Gülleproben insgesamt positiv korreliert ($p = 0,004$, $k = 0,265$; Korrelationsberechnung nach Spearman). Die Scatterplot-Darstellung dieser Korrelation zeigt Abbildung 31.

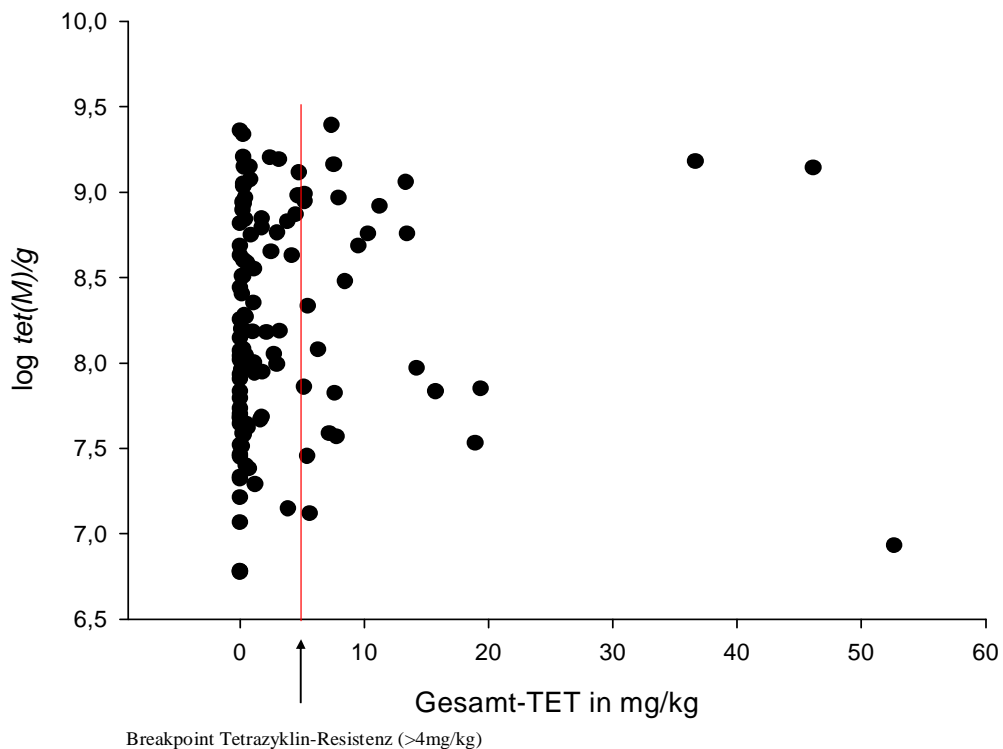


Abbildung 31: Korrelation zwischen Gesamt-Tetrazyklin-Gehalt und dem logarithmischen *tet*(M)-Gehalt in der Gülle

Zudem hatte sich im Modell ein signifikanter, wenn auch geringer Einfluss der Kovariaten „aerobe Gesamtkeimzahl“ auf die *tet*(M)-Gehalte gezeigt; beide Faktoren waren signifikant positiv korreliert. Die Korrelation der *tet*-Gehalte mit der Gesamtkeimzahl erscheint logisch unter dem Gesichtspunkt, dass nur ein geringer Teil der untersuchten Gülleproben tatsächlich inhibitorische TET-Konzentrationen aufwies. Eine substantielle Verringerung der gesamten Keimflora ist daher zumindest für den Anteil der Gülleproben mit Gehalten ≤ 1 mg/l nicht zu erwarten; stattdessen steigt der prozentuale Anteil der Resistenzgen-Träger. Höhere Gesamtkeimzahlen bedeuten dann höhere absolute *tet*-Gehalte. Mit mäßig steigendem TET-Gehalt steigt so die Zahl der „Gene je KBE“, da der Anteil der Genträger an der Population steigt.

Darüber hinaus waren jedoch auch – ausschließlich in den TET-positiven-Proben – die aerobe Gesamtkeimzahl und die TET-Gehalte positiv korreliert ($p = 0,04$, Korrelationskoeffizient nach Spearman = 0,219; vgl. Abbildung 32).

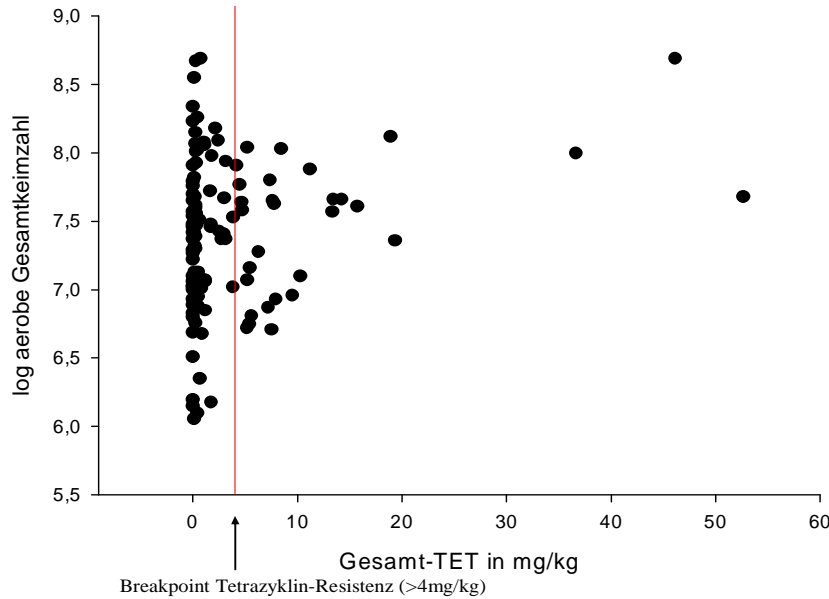


Abbildung 32: Korrelation zwischen aerober Gesamtkeimzahl und Gesamt-Tetrazyklin-Gehalt in den Gülleproben

Aufgrund der vorhandenen Mehrfach-Korrelation zwischen *tet(M)*, der aeroben Gesamtkeimzahl und dem Gesamt-TET-Gehalt (sowie den im Frühjahr signifikant höheren Keimzahlen, ohne Abb., und dem Einfluss des Beprobungszeitpunktes) wurde die Zahl der *tet(M)*-Gene in einem zweiten statistischen Ansatz auf die Zahl der Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) bezogen. Auch in dieser Auswertung (vgl. Abbildung 33) erschien ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen TET-freier und TET-haltiger Gülle: im Mittelwert 0,55 vs. 0,92 log copies *tet(M)* pro logKBE ($p = 0,048$).

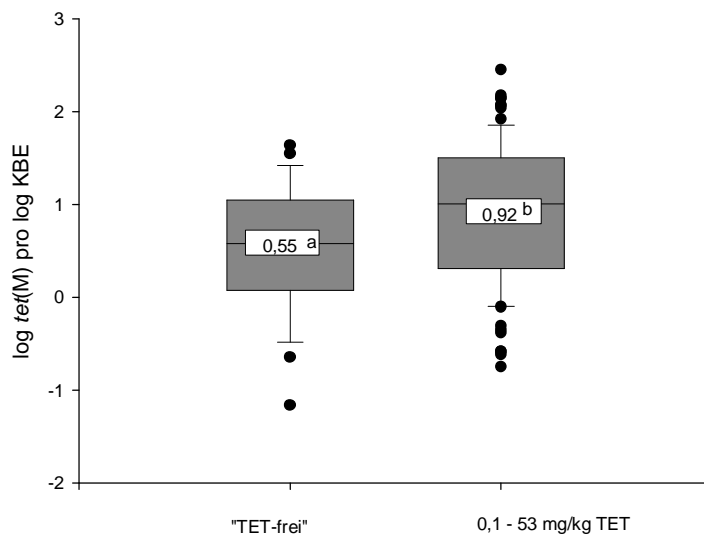


Abbildung 33: *tet(M)*-Konzentration pro KBE in Tetrazyklin-haltigen und -„freien“ Gülleproben; Legende vgl. Abbildung 29

Zur Einordnung der „Gehalte je KBE“ muss jedoch berücksichtigt werden, dass dies eine artifizielle Größe ist, da das Vorkommen der Gene an bestimmte Keimgruppen gebunden ist. Diese sind zu divers, als dass sie einzeln hätten erhoben werden können; zudem ist anzunehmen, dass *tet*-Gene auch in dem großen Prozentsatz der – generell oder temporär – nicht kultivierbaren Zellen vorkommen (BARER & HARWOOD, 1999). Jedoch waren die erhobenen Keimzahlen von verschiedensten Untergruppen hochsignifikant mit der aeroben Gesamtkeimzahl kreuzkorreliert (Korrelationskoeffizient nach Pearson für Enterokokken = 0,6, $p < 0,001$, Enterobacteriaceae = 0,26, $p = 0,007$; Laktobazillen = 0,5; $p < 0,001$, anaerobe Gesamtkeimzahl = 0,6; $p < 0,001$).

Hypothetisch kann angenommen werden, dass in der Sammelprobe Gülle ein Kausalzusammenhang zwischen dem Wachstum unterschiedlicher Bakterienarten mit jeweils ähnlichen Einflussfaktoren besteht und so die Relationen der Gengehalte in der Gesamtkeimzahl auch auf viele im kulturellen Standardverfahren nicht kultivierbare Bakterien übertragbar sind.

Da die „*tet*-Gengehalte je Keim“ auf die Gesamtkeimzahl bezogen werden, also auch auf Spezies, die nicht als Träger des jeweiligen Genes gelten, wird die Zahl der Gene je KBE in jenen Keimgruppen, die tatsächlich potentielle Träger des Genes sind, unterschätzt. Jedoch muss vermutet werden, dass insgesamt die Zahl der Bakterien durch die kulturelle Bestimmung stark unterschätzt und somit die Zahl der Gene je KBE überschätzt wird.

Die statistische Untersuchung der Einflüsse des Tetrazyklin-Gehaltes auf *tet(O)* brachte ähnliche Ergebnisse zu *tet(M)*: Wieder gab es einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen „TET-freier“ und TET-haltiger Gülle ($p = 0,001$, mittlere Differenz = 0,386, partielles Eta-Quadrat = 0,11; R-Quadrat 0,4; vgl. Abbildung 34).

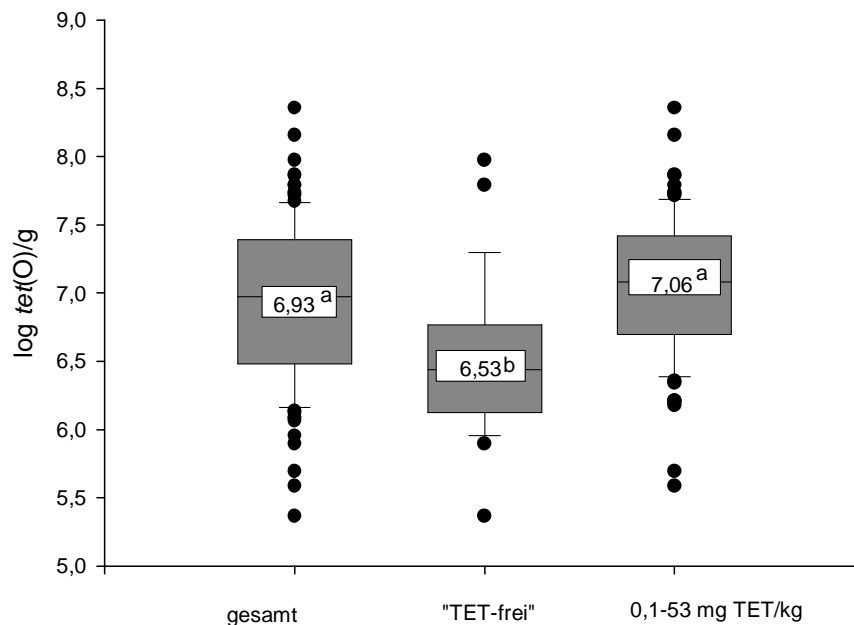


Abbildung 34: *tet(O)*-Gehalte in Gülleproben; Legende vgl. Abbildung 29

Im Unterschied zu *tet(M)* waren alle Konzentrationsstufen TET-haltiger Gülle signifikant von TET-freier Gülle verschieden (vgl. Abbildung 35).

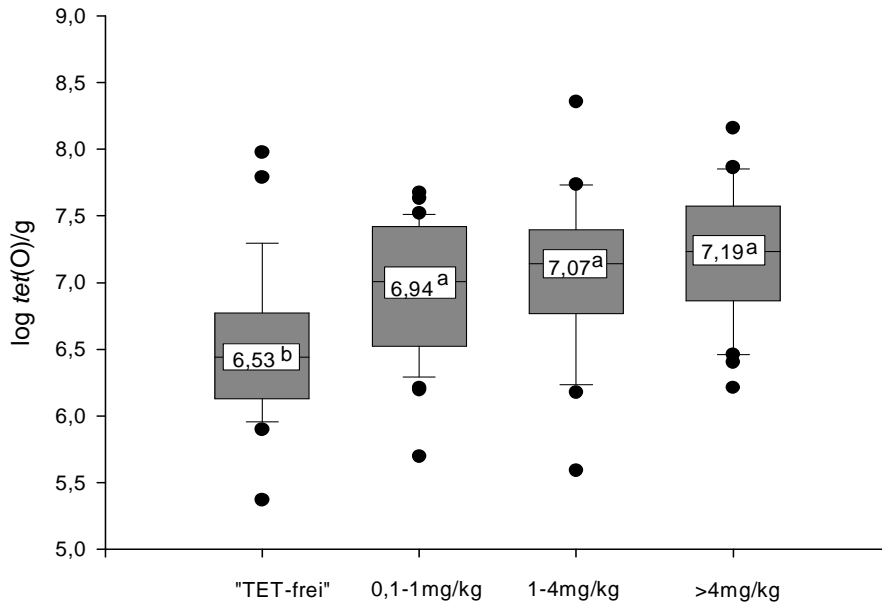


Abbildung 35: Aufgliederung der *tet(O)*-Gehalte in Gülleproben nach Gesamt-Tetrazyklin-Gehalt; Legende vgl. Abbildung 29

Gesamt-TET und *tet(O)*-Gehalt waren ebenfalls positiv korreliert (vgl. Abbildung 36; $p < 0,001$, Korrelationskoeffizient nach Spearman = 0,436).

SMITH et al. (2004) hatten ebenso eine Korrelation der Antibiotikagehalte mit den addierten Gehalten aller untersuchten *tet*-Resistenzgene einschließlich *tet(O)* gefunden.

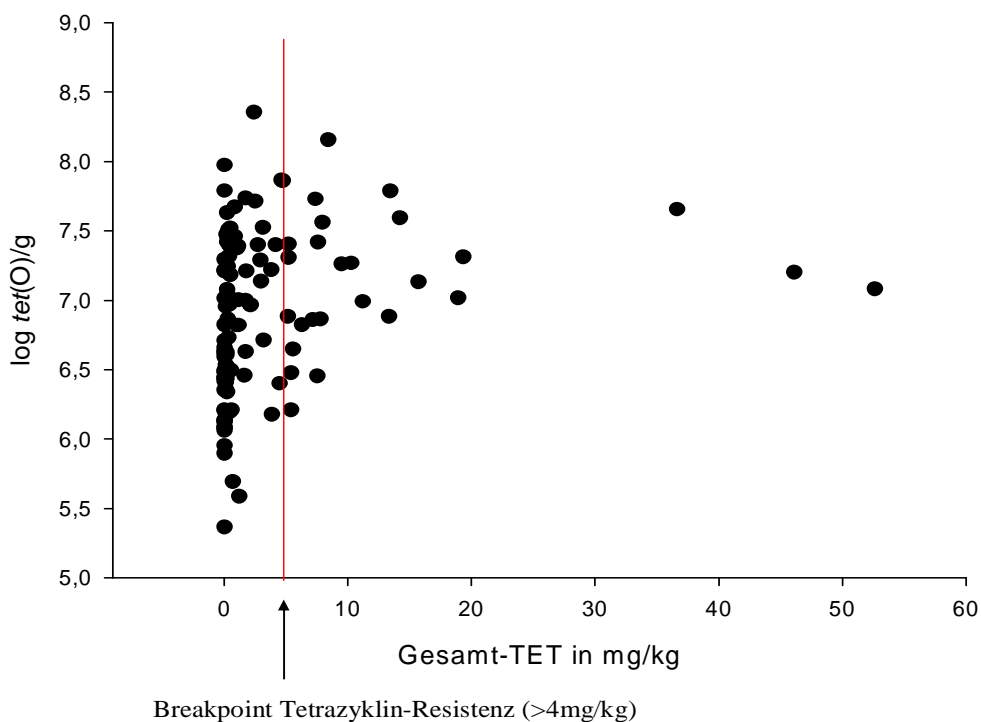


Abbildung 36: Korrelation zwischen Gesamt-Tetrazyklin-Gehalt und dem logarithmischen *tet(O)*-Gehalt in den Gülleproben

Auch nachdem die Zahl der *tet(O)*-Kopien auf die koloniebildenden Einheiten bezogen worden war, blieb der signifikante Unterschied zwischen TET-freier und TET-haltiger Gülle erhalten ($p = 0,017$, Mittelwerte $-0,75$ bzw. $-0,37 \log \text{tet(O)}$ pro $\log \text{KBE}$).

Bezüglich der *tet(B)*-Gehalte konnte zwischen TET-freier und TET-haltiger Gülle ein numerischer, statistisch aber nicht signifikanter Unterschied festgestellt werden (Mittelwerte $5,73$ vs. $5,90$, $p = 0,238$). Eine denkbare Erklärung für dieses Phänomen ist die Tatsache, dass das *tet(B)*-Gen durch seine strenge Regulierung im Bakterium schadlos bevorratet werden kann, und sich unter Tetrazyklin-Einwirkung die Menge des Transkriptes, nicht aber die Höhe der *tet(B)*-Gehalte substantiell ändert.

Eine andere mögliche Erklärung ist die starke Assoziation des Vorkommens von *tet(B)*- und *sulI*- (Sulfadiazin-Resistenz-) Genen (MAYNARD et al., 2003). Molekularbiologischer Hintergrund dieser Verknüpfung könnte das in *Salmonella* Typhimurium nachgewiesene Resistenzplasmid pUO-StVR2 sein (HERRERO et al., 2006). Möglicherweise wurde *tet(B)* durch die ebenfalls häufig – wenn auch weit überwiegend in deutlich subinhibitorischen Konzentrationen – nachgewiesenen Sulfonamide koselektiert, die Korrelation mit den TET-Gehalten dadurch abgeschwächt. Im t-Test ergab sich ein signifikanter Unterschied der $\log \text{tet(B)}$ -Gehalte zwischen Gülle mit und ohne Sulfonamid-Kontamination: Sulfonamid-haltige Gülle wies höhere *tet(B)*-Gehalte auf als solche ohne entsprechenden Monitoring-Befund (Differenz der Mittelwerte = $0,26$, $p = 0,048$).

BLAKE et al. fanden 2003 in Untersuchungen an zwei Muttersauen aus unterschiedlichen Betriebsformen (dies beinhaltete in einem Fall die antibiotikafreie Aufzucht und Haltung) ein unterschiedliches Verteilungsmuster der Gene *tet(A)*, *tet(B)/(G)* und *tet(C)*: *tet(B)/(G)* wurde in 70% der faekalen *E.coli* einer antibiotikafrei gehaltenen Sau gefunden, nicht jedoch beim Vergleichstier aus einem Betrieb, der Antibiotika regelmäßig einsetzte. Da es sich hierbei um Einzeltier-Untersuchungen handelt, sind generelle Rückschlüsse nicht möglich; der Befund gibt jedoch Hinweise darauf, dass die Verbreitung von *tet(B)* wesentlich von anderen Faktoren als dem Antibiotika-Einsatz abhängen könnte.

tet-Gengehalte in hochkontaminierter Gülle

Von den untersuchten TET-haltigen Gülleproben wiesen nur drei TET-Konzentrationen in einer Höhe auf, die an die MHK-Werte *tet*-Gen-tragender Bakterien heranreicht. So haben Enterokokken-Isolate mit *tet(O)* und (M)-Genen Tetrazyklin-MHK-Werte von 32 bis 64 mg/l (WEIR et al., 2003).

Die niedrigeren beiden der drei hochbelasteten Gülleproben (TET: 37 bzw. 46 mg/l) hatten hierbei vergleichsweise hohe *tet(M)*-Gehalte nahe des Maximalwertes (rund $9 \log_{10}$), gleichzeitig aber relativ geringe *tet(O)*-Gehalte (rund $7 \log_{10}$); hingegen zeigte die Probe mit dem maximalen TET-Gehalt unter den TET-positiven Proben den geringsten *tet(M)*-Gehalt (unter $7 \log_{10}$). Sind dies auch Einzelergebnisse, so sind sie doch gut erklärlich aus der Tatsache, dass die Anwesenheit von Resistenzgenen den MHK-Wert nicht gegen unendlich verschiebt, sondern lediglich in Bereiche jenseits therapeutisch erreichbarer Konzentrationen. Oberhalb der MHK-Werte resistenter Populationen findet nach wie vor eine Hemmung statt, wenn auch ohne therapeutische Nutzwirkung.

In Proben bis 46 mg/l erfolgte hingegen durch die – inhibitorische – Antibiotika-konzentration keine signifikante Reduktion der *tet*(M)-Träger (noch der aeroben Gesamtkeimzahlen), es stieg im Gegenteil nicht nur der relative Anteil der Tetrazyklin-Resistenzgen-Träger an der Population, sondern auch ihre absolute Anzahl.

4 Einordnung der Befunde im Hinblick auf eventuelle Risiken

Aus den phänotypischen Resistenzdaten der Gülle-Isolate lässt sich keine gravierende Gefährdung humantherapeutischer Optionen ableiten: Verglichen mit den deutschlandweit erhobenen Daten zu human-klinischen Isolaten (GENARS-Projekt) lag der Prozentsatz resistenter Bakterienisolate aus Gülle in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle signifikant unter den humanmedizinischen Resistenzraten. Eine Ausnahme bildete Doxycyclin (als Vertreter der Tetrazykline) mit bis zu 20 % höherem Resistenzauftreten in der Gülle, was mit dem weit verbreiteten Einsatz der Tetrazykline in der Nutztierhaltung begründet werden kann. Die Resistenz gegen Reserve-Antibiotika lag bei *E. coli* zwischen 0 und 2 %; im Einzelfall höher bei Enterokokken (z. B. Rifampicin; Synercid bei *E. faecium*). Glykopeptid-resistente Enterokokken traten nicht auf.

Die Ergebnisse reflektieren die momentane Situation und können nicht als Freibrief für eine eventuell unbedachte Anwendung von Antibiotika in der Nutztierhaltung gewertet werden: Missachtung des „prudent use“ könnte analog zur Entwicklung bei den Tetrazyklinen eine forcierte Resistenzentwicklung auch für andere Wirkstoffe bedingen.

Unter Berücksichtigung der aufgeführten Befunde scheint sich ein Risiko derzeit hauptsächlich für den Landwirt selbst zu ergeben. Mit großer Wahrscheinlichkeit entsteht die Mehrzahl der in Gülle gefundenen resistenten Keime bereits im Tier. Der Landwirt kommt somit nicht nur während des betriebsbedingten Umganges mit Gülle, sondern insbesondere beim täglichen Tierkontakt in Berührung mit resistenten Keimen; der Übergang resistenter Keime von Tier zu Mensch wurde in diesem Zusammenhang schon in den 70er Jahren nachgewiesen (LEVY et al., 1976; LINTON, 1977). VAN DEN BOGAARD et al. fanden 1997 unter Putenmästern erheblich höhere Besiedelungsraten mit Vancomycin-resistenten Enterokokken als bei Vergleichspersonen aus derselben Region (39 vs. 14 %). AUBRY-DAMON et al. publizierten 2004 beim Menschen eine signifikante Assoziation der Antibiotika-resistenz in Kommensal-Bakterien mit dem Faktor „Schweinehaltung“.

Die hohe Rate der Spontan-Mutation-basierten Resistenz gegen Rifampicin und die – möglicherweise ebenfalls auf Mutation beruhende – seltene Linezolid-Resistenz des *C. perfringens*-Isolates geben zudem Hinweise darauf, dass sich in der Gülle ein Gefährdungspotential aufgrund günstiger Bedingungen für die Entwicklung mutationsbedingter Resistenzdeterminanten finden könnte. Ursache können hierbei in Gülle nachgewiesene mutagene Substanzen unterschiedlichster Art sein, von Schwermetallen (NICHOLSON et al., 1999) bis hin zu polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen und polychlorierten Biphenylen (BERSET & HOLZER, 1995).

Ein quantitativ nennenswerter Übergang der Resistenzgene aus der Gülle über Boden und Nahrung zum Menschen scheint hingegen nach derzeitigem Erkenntnisstand aufgrund der vergleichsweise niedrigen Gehalte im Boden, vor allem aber aufgrund deren geringer Persistenz, eher unwahrscheinlich. Auch bei einer Berücksichtigung

der – im Boden gegenüber der Gülle niedrigeren – Wiederfindungsrate betragen die maximalen nach CTC-Gülle-Düngung im Boden gefundenen *tet*(M)-Konzentrationen nur etwa 0,3 % der durchschnittlichen Gehalte in Gülle; dies entspricht in etwa 5×10^5 copies *tet*(M)/g Boden, persistierend über einen Zeitraum von weniger als zwei Wochen.

Bei einer je nach Bodenart und Nährstoffgehalt schwankenden intergenerischen Transferhäufigkeit von 10^{-4} bis 10^{-7} (HILL & TOP, 1998) sind bereits bei diesen Konzentrationen einzelne Transferereignisse stochastisch zu erwarten. Eine quantitativ nennenswerte Positiv-Selektion (= Vermehrung) dieser Transkonjuganten scheint jedoch nicht stattzufinden, da die *tet*-Gengehalte mit dem Absterben der Gülle-Bakterien unter die Nachweisgrenze absinken. Ob allerdings auch die möglicherweise entstandenen Transkonjuganten absterben oder ihre erworbenen Resistenzgene verlieren, kann nicht beurteilt werden, da bei der erwähnten Transferhäufigkeit und dem ermittelten Gengehalt in den Güllebakterien als potentiellen Donorbakterien die Zahl der Transkonjuganten maximal bei 10^1 copies/g Boden und somit unter 10^0 copies/PCR läge.

Für eine tatsächliche Risikobewertung ist die Zahl untersuchter Proben zu gering. Zudem können aufgrund der Verwendung jahrelang ausschließlich mineralisch gedüngter Böden kumulative Effekte durch die hier vorgenommenen Untersuchungen nicht abgeschätzt und somit auch nicht ausgeschlossen werden.

F Zusammenfassung

Die Bedeutung des Antibiotika-Einsatzes in der Veterinärmedizin für die humanmedizinische Resistenzproblematik steht seit mehreren Jahren wiederholt in der Diskussion. Die vorliegende Untersuchung sollte die Rolle von Bakterien aus Schweinegülle im Zusammenhang mit dem humanrelevanten phänotypischen und genotypischen Resistenzgeschehen objektivieren. Hierzu wurde untersucht, ob und in welchem Umfang Bakterien in Schweinegülle zum Zeitpunkt des Ausbringens Resistenzen gegen ausgewählte veterinärmedizinische, vor allem aber gegen humantherapeutisch relevante antimikrobielle Wirkstoffe exprimieren. Zudem wurden die Gehalte an ausgewählten Tetrazyklin-Resistenzgenen erhoben und unter Einbeziehung verschiedener Einflussfaktoren, darunter auch des Tetrazyklin-Gehaltes der Gülle, verglichen.

Zu diesen Zwecken wurden 306 Gülleproben mit bekanntem Antibiotikagehalt aus bayerischen Schweinehaltenden Betrieben mikrobiologisch-kulturellen Untersuchungen einschließlich der phänotypischen Resistenztestung der Isolate unterzogen. Das quantitative Vorkommen der Tetrazyklin-Resistenzgene *tet(M)*, *tet(O)* und *tet(B)* in 115 der Gülleproben wurde mittels RealTime-PCR nach Direkt-Extraktion der DNA erhoben.

380 Gülleproben wurden auf das Vorkommen von *Salmonella spp.* untersucht, aus 306 Proben wurden Bakterien der Gattungen *Escherichia* (*E. coli*, n = 613), *Enterococcus* (*E. faecalis*, n = 387; *E. faecium*, n = 183; andere, n = 467), *Clostridium* (n = 536) und *Lactobacillus* (n = 552) isoliert. Das Resistenzverhalten der Isolate gegenüber bis zu 29 größtenteils human-relevanten Wirkstoffen wurde im Mikrodilutionsverfahren überprüft.

Verglichen mit den deutschlandweit erhobenen Daten zu human-klinischen Isolaten (GENARS-Projekt) lag der Prozentsatz resistenter Bakterienisolate aus Gülle in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle unter den humanmedizinischen Resistenzraten. Eine Ausnahme bildete Doxycyclin (als Vertreter der Tetrazykline) mit bis zu 20 % höherem Resistenzauftreten in der Gülle, was mit dem weit verbreiteten Einsatz der Tetrazykline in der Nutztierhaltung begründet werden kann. Die Resistenz gegen Reserve-Antibiotika lag bei *E. coli* zwischen 0 und 2 %; im Einzelfall höher bei Enterokokken. Glykopeptid-resistente Enterokokken traten nicht auf. Somit zeigten sich keine besonders auffälligen Resistenzentwicklungen gegenüber humanmedizinischen Antibiotika in Gülle-Isolaten.

Es zeichnete sich übereinstimmend ein signifikanter Einfluss der Betriebsgröße auf die Resistenzparameter ab, mit höheren Resistenzraten in größeren Betrieben aller Betriebsformen.

Die Analyse der phänotypischen und ausgewählten genotypischen Resistenzparameter im Zusammenhang mit den Antibiotikagehalten der Gülleproben ergab in mehrerlei Hinsicht Einflüsse der von HARMS (2006) erhobenen analytischen Antibiotikabefunde: Unter Tetrazyklin-haltigen Gülleproben nahm die Zahl solcher Proben, aus denen ausschließlich Doxycyclin-resistente *E. coli* isoliert worden waren, mit steigendem Tetrazyklin-Gehalt kontinuierlich zu; gleichzeitig nahm der Anteil an Gülleproben ohne resistente *E. coli*-Isolate kontinuierlich ab (von 29 % in Tetrazyklin-freier Gülle auf 9 % in Gülle mit Tetrazyklin-Konzentrationen > 4 mg/kg). Auch *E. faecium* zeigte ähnliches Verhalten: die Zahl der Gülleproben mit ausschließlich sensiblen Isolaten nahm mit steigendem Antibiotikagehalt kontinuierlich ab, von 71 % auf 23 %. Jedoch finden sich auch in Konzentrationsbereichen > 4 mg/kg neben resistenten nach wie vor auch sensible Bakterien. Dieser Befund ist von Bedeutung, da die erhaltenen sensiblen Bakterien als Schlüsselstelle für die Verdrängung der resistenten Keime und die Re-Etablierung einer sensiblen Population gelten.

Abhängig davon, ob in der Gülle der Nachweis eines oder mehrerer Antibiotika (Tetrazykline, Sulfonamide) gelang, stiegen die Resistenzraten für mehrere Substanz-Keim-

Paarungen. Dies betraf auf signifikantem Niveau Doxycyclin und *E. coli*, *E. faecium*, *Lactobacillus spp.*; Sulfamethoxazol-Trimethoprim und *E. coli*; Ampicillin und *E. coli*; Streptomycin-High-Level und *E. faecalis*; Fluorquinolone und *E. faecium* sowie Clostridien; Synercid und *E. faecium*; Tylosin und *E. faecium*. Von dieser Entwicklung sind neben veterinärmedizinischen Wirkstoffen, die im Antibiotika-Monitoring tatsächlich nachgewiesen worden waren, auch andere – teils veterinärmedizinisch nicht zugelassene – Wirk-substanzen betroffen, darunter auch solche, deren restriktive Handhabung empfohlen wird (Fluorquinolone, Synercid).

Die Zahl der Gülleproben, die hochmehrfach-resistente Bakterien beherbergten, war zwischen antibiotikafreien und antibiotikahaltigen Proben nicht signifikant verschieden. Jedoch differierte der Prozentsatz hochmehrfach-resistenter Isolate nach Tetrazyklin-Gehalt: 6,3 % der Proben mit einem Tetrazyklin-Gehalt von 0,1–1 mg/kg enthielten hochmehrfach-resistente Isolate, hingegen 18,3 % der Proben mit Gehalten > 4 mg/kg. Zudem exprimierte der Querschnitt aller Isolate innerhalb einer Gülle mit hochmehrfach-resistenten Keime in nachweislich antibiotikahaltigen Proben signifikant mehr Antibiotikaresistenzen (3,3), verglichen mit analytisch negativen Proben (2,5). In mehreren Gülleproben mit hochmehrfach-resistenten Keimen gab es phänotypische Indizien für den horizontalen Transfer eines oder mehrerer Resistenzgene.

Bei der Verfütterung therapeutischer Chlortetrazyklin-Konzentrationen an Schweine konnte ein Anstieg der Gene *tet(M)* und *tet(O)* in den Faeces nachgewiesen werden. Quantitative Untersuchungen zum Vorkommen der Resistenzgene *tet(M)* und *tet(O)* in Praxisgülle zeigten einen signifikanten Anstieg der Resistenzgen-Gehalte bereits im Konzentrationsbereich ab 0,1 mg Tetrazyklin/kg Gülle (Summe der untersuchten Tetrazykline: Chlortetrazyklin, Tetrazyklin, Oxytetracyclin und Doxycyclin) gegenüber Tetrazyklin-„freier“ Gülle (Bestimmbarkeitsgrenze 0,1 mg/kg). Der Anstieg bewegte sich für *tet(M)* und Tetrazyklin-Konzentrationen > 0,1 < 1 mg/kg im Bereich von ca. 200 Mio. copies gegenüber Tetrazyklin-freier Gülle. Ein signifikanter Einfluss der Tetrazyklin-Gehalte auf *tet(B)* konnte hingegen nicht nachgewiesen werden. Für *tet(M)* war ein signifikanter Einfluss bereits bei Gehalten im Bereich der Nachweisgrenze gegeben.

Bedeutsam scheint, dass bereits in Anwesenheit von Tetrazyklinen in nur geringen Konzentrationen die absoluten Gengehalte ansteigen. Da die Hemmung der Ursprungspopulationen im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 1 mg/kg erst allmählich einsetzt (Staphylokokken: ab 0,25–0,5 mg/kg; *E. faecalis* ab 2–8 mg/kg), ist dieser absolute Anstieg nicht in erster Linie durch eine Selektion der Genträger zu erklären, sondern geht mit großer Wahrscheinlichkeit auch auf eine induzierte Weitergabe der Resistenzgene an bis dahin Nicht-Träger zurück.

Die genetischen Untersuchungen der Praxisgülle ergaben keine Hinweise auf eine vom Tetrazyklin-Gehalt unabhängige Beeinflussung der Gengehalte durch die Betriebsgröße; wohl aber variierten die Gehalte an *tet(M)*, *tet(O)* und *tet(B)* in Abhängigkeit vom Beprobungszeitraum (Frühjahr > Herbst).

Der Anteil der Resistenzgene, der sich nach Düngung mit Chlortetrazyklin-haltiger Gülle im Boden wiederfand, war erheblich geringer als die in Gülle gefundenen Gehalte; die maximalen nach CTC-Gülle-Düngung im Boden gefundenen *tet(M)*-Konzentrationen betragen nur etwa 0,3 % der durchschnittlichen Gehalte in Gülle und erreichten in Ackerland bis zu einer Woche nach Ausbringung Maximalwerte von 480 000 copies/g. Ab Woche 3 nach Begüllung gab es keinerlei positive Befunde (Nachweisgrenze: 10² copies/g). Im Grünland waren die *tet*-Resistenz-determinanten nach initialen Maximalwerten um 10 000 copies/g Boden nach sieben Wochen noch in Konzentrationen bis 100 copies/g nachzuweisen; nach 12 Wochen war jedoch keines der untersuchten Gene mehr detektierbar.

G Summary

Antibiotic-Resistant Bacteria and Resistance Genes in Liquid Pig Manure

During the past decades, a discussion arose about the relevance of antibiotic use in veterinary medicine for bacterial resistance which is threatening human health.

This study aims to clarify the role of bacteria isolated from pig-manure concerning major problems of phenotypic and genotypic resistance with relevance for men. For this purpose, bacteria from pig-manure at the timepoint of its application to soil were investigated regarding their resistance towards selected antibiotics used in veterinary medicine, but particularly towards antibiotics used as therapeutics in humans. Furthermore, concentrations of selected genes encoding resistance towards tetracyclines were determined in the samples and compared with involvement of different factors, including the concentration of tetracyclines in the manure samples. To this end, 306 samples of manure with known concentrations of tetracyclines and sulfonamides from Bavarian pig farms were subjected to microbiological and cultural investigations including the determination of phenotypic resistance. From 115 of these samples, bacterial DNA was extracted and the concentration of the genes encoding tetracycline resistance *tet(M)*, *tet(O)* and *tet(B)* was quantified by RealTime PCR.

380 manures were screened for the presence of *Salmonella spp.*, from 306 manures bacteria belonging to the following genus were isolated: *Escherichia (E. coli)*, n= 613; *Enterococcus (E. faecalis)*, n = 387; *E. faecium*, n = 183; others, n = 467), *Clostridium* (n = 536), *Lactobacillus* (n = 552). Resistance of these isolates towards up to 29 therapeutics mainly for use in humans was examined by a standardized microdilution procedure.

Compared to data from German human clinical isolates (GENARS project), the percentage of resistant bacteria from manure was lower than the percentage of resistant isolates from human sources in the predominant majority of cases. An exception was doxycycline (representing tetracyclines) with an up to 20 % higher degree of resistance in manure, which can be explained by the wide use of tetracyclines in the treatment of farm animals. Resistance against „reserve antibiotics“ was between 0 and 2 % in *E. coli*, sometimes higher in enterococci (e. g. rifampicin; synergid in *E. faecium*). Glycopeptide resistant enterococci were not observed. Thus, no particularly noticeable development of resistance towards antibiotics for human use occurred in isolates from manure. A significant influence of farm size onto parameters of resistance, with higher percentages of resistant isolates in greater farms of all farming-types, was found consistently.

Analyzing the phenotypic and genotypic parameters of resistance, there were seen influences of the antibiotic concentrations in manure as measured by HARMS (2006): Regarding tetracycline containing, the number of manure samples from which solely tetracycline-resistant *E. coli* have been isolated, steadily increased with rising amounts of tetracycline. In addition the number of manure samples without any resistant isolates of *E. coli* continuously declined (from 29 % in manure free of tetracyclines to 9 % in manure containing more than 4 mg tetracycline/kg). *E. faecium* comported similar: the number of manure samples containing solely sensitive isolates declined with rising concentrations of tetracyclines, from 71 % to 23 %. However, even in manure containing more than 4 mg tetracyclines/kg susceptible bacteria are still present besides resistant ones. This is important because of the assumed key role of susceptible bacteria in squeezing out the resistant ones and re-establishing a sensitive population.

Depending on whether one or more antibiotics (Tetracyclines, Sulfonamides) were detected in the manure probes, resistance rates increased for several pairings of substances and germs. On a significant level, this was true for doxycycline and *E. coli*, *E. faecium*, *Lactobacillus spp.*; sulfamethoxazole + trimethoprim and *E. coli*; ampicillin and *E. coli*; streptomycin high level and *E. faecalis*; fluoroquinolones and *E. faecium*, *Clostridium spp.*; synergid and *E. faecium*; tylosin and *E. faecium*. This development affected not only substances used in veterinary medicine, which have been detected in the monitoring, but also other antibiotics, which are partly not approved for use in farm animals, also including agents for which restrictive application has been recommended (fluoroquinolones, synergid).

The number of manure samples containing isolates expressing simultaneously high numbers of resistances did not significantly differ between manure with or without any of the monitored antibiotics. However, the percentage of high level multiresistant isolates differed with the concentrations of Tetracycline: 6.3% of manures with 0.1–1 mg/kg tetracycline, compared to 18.3 % of manures with concentrations higher than 4 mg/kg, contained high level multiresistant isolates. Furthermore, the cross section of all isolates out of manure from which a high level multiresistant isolate had been cultured, expressed significantly more resistances when antibiotic agents had been detected. Several manure samples with high level multiresistant isolates showed phenotypic indications for the horizontal transfer of one or more resistance genes.

During therapeutic application of chlortetracycline, the concentration of the genes *tet(M)* and *tet(O)* in faeces increased.

Quantitative analysis of the occurrence of resistance genes *tet(M)* and *tet(O)* showed a significant rise of their concentrations even for the range of the lowest “total tetracycline” concentrations from 0.1–1 mg/kg, compared to manure “free” of tetracyclines (< 0,1 mg/kg). Total tetracycline concentration was formed as a sum parameter from the measured contents of chlortetracycline, tetracycline, oxytetracycline and doxycycline. *tet(M)* concentrations rose significantly by 200 million copies in the concentration range 0.1–1 mg/kg, compared to manure free of tetracyclines. However, no significant influence on *tet(B)* could be seen. For *tet(M)*, a significant influence already was given regarding tetracycline-concentrations at the detection limit.

It seems to be important that only low concentrations of tetracyclines resulted in an increase of tetracycline resistance genes. As inhibition of susceptible populations occurs only gradually in this concentration range (staphylococci: from 0.25–0.5 mg on; *E. faecalis*: from 2–8 mg/kg on), it seems that not primarily selection of the gene bearing organisms accounts for the absolute increase of contents, but that — with high probability — resistance genes were passed down to by then native organisms. Genetic exploration of farm manure did not provide any evidence for an independent influence of farm-size, but showed clearly an influence of the sampling period for all genes examined (spring > autumn).

The concentration of resistance genes appearing in soil after application of manure containing chlortetracycline and resistance genes was considerably lower than concentrations found in manure. Maximum *tet(M)* levels in soil after application of manure containing chlortetracycline were only 0.3 % of average contents in manure. In farmland, onto one week after application *tet(M)* reached maximum levels of 480 000 copies/g; 3 weeks after manuring, there were no positive findings (detection limit 10²/g). In grassland, after initial maximum levels about 10 000 copies/g soil, there were still concentrations of 100 copies/g detectable 7 weeks later; however, after 12 weeks none of the investigated genes could be found.

H Literaturverzeichnis

- AARESTRUP, F.M., HASMAN, H., JENSEN, L.B., MORENO, M., HERRERO, I.A., DOMINGUEZ, L., FINN, M., FRANKLIN, A. (2002):
Antimicrobial resistance among enterococci from pigs in three European countries.
Applied and Environmental Microbiology 68, 4127–4129
- ACAR, J., RÖSTEL, B. (2001):
Antimicrobial resistance: an overview.
Revue Scientifique et Technique - Office International des Epizooties 20, 797–810
- ACKERMANN, G., ADLER, D., RODLOFF, A.C. (2003):
In vitro activity of linezolid against *Clostridium difficile*.
Journal of Antimicrobial Chemotherapy 51, 743–745
- ADAMS, V., LYRAS, D., FARROW, K.A., ROOD, J.I. (2002):
The clostridial mobilisable transposons.
Cellular and Molecular Life Sciences 59, 2033–2043
- AGERSØ, I., SENDELØV, G., JENSEN, L.B. (2004):
Development of a rapid method for direct detection of *tet(M)* genes in soil from Danish farmland.
Environment International 30, 117–122
- AIRES, J.R.; NIKAIDO, H. (2005):
Aminoglycosides are captured from both periplasm and cytoplasm by the AcrD multidrug efflux transporter of *Escherichia coli*.
Journal of Bacteriology 187, 1923–1929
- AL-MASAUDI, S.B., DAY, M.J., RUSSELL, A.D. (1991):
Effect of some antibiotics and biocides on plasmid transfer in *Staphylococcus aureus*.
Journal of Applied Bacteriology 71, 239–243
- ALEKSHUN, M.N.; LEVY, S.B. (1999):
The *mar* regulon: multiple resistance to antibiotics and other toxic chemicals.
Trends in Microbiology 7, 410–413
- ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHAFFER, A.A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D.J. (1997):
Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.
Nucleic Acids Research 25, 3389–3402
- AMINOV, R.I., GARRIGUES-JEANJEAN, N., MACKIE, R.I. (2001):
Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins.
Applied and Environmental Microbiology 67, 22–32

- AMINOV, R.I., CHEE-SANFORD, J.C., GARRIGUES, N., TEFEREDEGNE, B., KRAPAC, I.J., WHITE, B.A., MACKIE, R.I. (2002):
Development, validation, and application of PCR primers for detection of tetracycline efflux genes of gram-negative bacteria.
Applied and Environmental Microbiology 68, 1786–1793
- ASLANGUL, E., RUIMY, R., CHAU, F., GARRY, L., ANDREMONT, A., FANTIN, B. (2005):
Relationship between the level of acquired resistance to gentamicin and synergism with amoxicillin in *Enterococcus faecalis*.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 49, 4144–4148
- ATWILL, E.R. (1999):
Is Livestock Manure a Risk to Public Health?
Advances in Pork Production 10, 75–80
- AUBRY-DAMON, H., GRENET, K., SALL-NDIAYE, P., CHE, D., CORDEIRO, E., BOUGNOUX, M.E., RIGAUD, E., LE STRAT, Y., LEMANISSIER, V., ARMAND-LEFEVRE, L., DELZESCAUX, D., DESENCLOS, J.C., LIENARD, M., ANDREMONT, A. (2004):
Antimicrobial resistance in commensal flora of pig farmers.
Emerging Infectious Diseases 10, 873–879
- AUSTIN, D.J., KAKEHASHI, M., ANDERSON, R.M. (1997):
The transmission dynamics of antibiotic-resistant bacteria: the relationship between resistance in commensal organisms and antibiotic consumption.
Proceedings. Biological Sciences/ The Royal Society 264, 1629–1638
- AWMF Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften: Deutsche Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie (2003):
Antibiotikatherapie der Infektionen an Kopf und Hals.
AWMF-Leitlinien-Register Nr. 017/066 Entwicklungsstufe: 2
- BAHL, M.I., SORENSEN, S.J., HANSEN, L.H., LICHT, T.R. (2004):
Effect of tetracycline on transfer and establishment of the tetracycline-inducible conjugative transposon Tn916 in the guts of gnotobiotic rats.
Applied and Environmental Microbiology 70, 758–764
- BAILEY, J.E., DA SILVA, N.A., PERETTI, S.W., SEO, J.H., SRIENC, F. (1986):
Studies of host-plasmid interactions in recombinant microorganisms.
Annals of the New York Academy of Sciences 469, 194–211
- BAQUERO, F., REIG, M. (1992):
Resistance of anaerobic bacteria to antimicrobial agents in Spain.
European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 11, 1016–1020

- BAQUERO, F., NEGRI, M., MOROSINI, M., BLÁZQUEZ, J. (1997):
The antibiotic selective process: concentration-specific amplification of low-level resistant populations.
In: CHADWICK, D.J., GOODE, J. (Herausgeber): Antibiotic resistance: Origin, evolution and spread. Ciba Foundation Symposium, Wiley, Chichester
- BAQUERO, F., NEGRI, M., MOROSINI, M., BLÁZQUEZ, J. (1998):
Selection of very small differences in bacterial evolution.
International Microbiology 1, 295–300
- BARER, M.R., HARWOOD, C.R. (1999):
Bacterial viability and culturability.
Advances in Microbiology and Physiology 41, 93–137
- BEJUK, D., BEGOVAC, J., GAMBERGER, D., KUCISEC-TEPES, N. (2000):
Evaluation of phenotypic characteristics for differentiation of enterococcal species using an example based algorithm.
Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 38, 201–205
- BENTORCHA, F., DE CESPEDES, G., HORAUD, T. (1991):
Tetracycline resistance heterogeneity in *Enterococcus faecium*.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 35, 808–812
- BERENS, C., HILLEN, W. (2003):
Gene regulation by tetracyclines. Constraints of resistance regulation in bacteria shape TetR for application in eukaryotes.
European Journal of Biochemistry 270, 3109–3121
- BERGER, R.E. (2005):
Lactobacillus sepsis associated with probiotic therapy.
Journal of Urology 174, 1843
- BERRYMAN, D.I., ROOD, J.I. (1995):
The closely related *ermB-ermAM* genes from *Clostridium perfringens*, *Enterococcus faecalis* (pAM beta 1), and *Streptococcus agalactiae* (pIP501) are flanked by variants of a directly repeated sequence.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 39, 1830–1834
- BERSET, J. D., HOLZER, R. (1995):
Organic micropollutants in swiss agriculture: distribution of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAH) and polychlorinated biphenyls (PCB) in soil, liquid manure, sewage sludge and compost samples: a comparative study.
International Journal of Environmental Analytical Chemistry 59, 145–165
- BISCHOFF, K.M., WHITE, D.G., McDERMOTT, P.F., ZHAO, S., GAINES, S., MAURER, J.J., NISBET, D.J. (2002):
Characterization of chloramphenicol resistance in beta-hemolytic *Escherichia coli* associated with diarrhea in neonatal swine.
Journal of Clinical Microbiology 40, 389–394

- BLAKE, D.P., HUMPHRY, R.W., SCOTT, K.P., HILLMAN, K., FENLON, D.R., LOW, J.C. (2003):
Influence of tetracycline exposure on tetracycline resistance and the carriage of tetracycline resistance genes within commensal *Escherichia coli* populations.
Journal of Applied Microbiology 94, 1087–1097
- BOLTON, L.F., KELLEY, L.C., LEE, M.D., FEDORKA-CRAY, P.J., MAURER, J.J. (1999):
Detection of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 based on a gene which confers cross-resistance to florfenicol and chloramphenicol.
Journal of Clinical Microbiology 37, 1348–1351
- BORGEN, K., SØRUM, M., WASTESON, Y., KRUSE, H., OPPEGAARD, H. (2002):
Genetic linkage between *erm*(B) and *vanA* in *Enterococcus hirae* of poultry origin.
Microbial Drug Resistance 8, 363–368
- BOUMA, J.E., LENSKI, R.E. (1988):
Evolution of a bacteria/plasmid association.
Nature 335, 351–352
- BRADFORD, P.A., SANDERS, C.C. (1995):
Development of test panel of beta-lactamases expressed in a common *Escherichia coli* host background for evaluation of new beta-lactam antibiotics.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 39, 308–313
- BROLL, S., KIETZMANN, M., BETTIN, U., KREIENBROCK, L. (2004):
Zum Einsatz von Aminoglykosiden, Colistin und beta-Laktam-Antibiotika in Fütterungsarzneimitteln für Schweine in Schleswig-Holstein.
Berliner und Münchner Tierärztliche Wochenschrift 117, 398–403
- BRYAN, A., SHAPIR, N., SADOWSKY, M.J. (2004):
Frequency and distribution of tetracycline resistance genes in genetically diverse, nonselected, and nonclinical *Escherichia coli* strains isolated from diverse human and animal sources.
Applied and Environmental Microbiology 70, 2503–2507
- BUNDESTIERÄRZTEKAMMER (BTK); ARBEITSGEMEINSCHAFT DER LEITENDEN VETERINÄRBEAMTEN (ArgeVET) (Online-Zugriff 4/2006):
Leitlinien für den sorgfältigen Umgang mit antimikrobiell wirksamen Tierarzneimitteln.
http://www.bundestieraerztekammer.de/datei.htm?filename=ab_leitlinien.pdf&theme_n_id=4868
- BURDETT, V. (1996):
Tet(M)-promoted release of tetracycline from ribosomes is GTP dependent.
Journal of Bacteriology 178, 3246–3251

- BUSTAMANTE, W., ALPIZAR, A., HERNANDEZ, S., PACHECO, A., VARGAS, N., HERRERA, M.L., VARGAS, A., CABALLERO, M., GARCIA, F. (2003):
Predominance of *vanA* genotype among vancomycin-resistant *Enterococcus* isolates from poultry and swine in Costa Rica.
Applied and Environmental Microbiology 69, 7414–7419
- CANNON, J.P., LEE, T.A., BOLANOS, J.T., DANZIGER, L.H. (2005):
Pathogenic relevance of *Lactobacillus*: a retrospective review of over 200 cases.
European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 24, 31–40
- CANNON, M., HARTFORD, S., DAVIES, J. (1990):
A comparative study on the inhibitory actions of chloramphenicol, thiamphenicol, and some fluorinated derivatives.
Journal of Antimicrobial Chemotherapy 26, 307–317
- CAVALLI, L.L., MACCACARO, G.A. (1952):
Polygenic inheritance of drug-resistance in the bacterium *Escherichia coli*.
Heredity 6, 311–331
- CHANG, L.L., CHEN, H.F., CHANG, C.Y., LEE, T.M., WU, W.J. (2004):
Contribution of integrons, and SmeABC and SmeDEF efflux pumps to multidrug resistance in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*.
Journal of Antimicrobial Chemotherapy 53, 518–521
- CHAPIN, A., RULE, A., GIBSON, K., BUCKLEY, T., SCHWAB, K. (2005):
Airborne Multidrug-Resistant Bacteria Isolated from a Concentrated Swine Feeding Operation.
Environmental Health Perspectives 113, 137–142
- CHEE-SANFORD, J.C., AMINOV, R.I., KRAPAC, I.J., GARRIGUES-JEANJEAN, N., MACKIE, R.I. (2001):
Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater underlying two swine production facilities.
Applied and Environmental Microbiology 67, 1494–1502
- CHOPRA, I., ROBERTS, M. (2001):
Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance.
Microbiology and Molecular Biology Reviews 65, 232–260
- CHOPRA, I., O'NEILL, A.J, MILLER, K. (2003):
The role of mutators in the emergence of antibiotic-resistant bacteria.
Drug Resistance Updates 6, 137–145
- CHOU, C.C., LIN, Y.C., SU, J.J. (2004):
Microbial indicators for differentiation of human- and pig-sourced fecal pollution.
Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering 39, 1415–1421

- CLARK, N.C., OLSVIK, O., SWENSON, J.M., SPIEGEL, C.A., TENOVER, F.C. (1999):
Detection of a streptomycin/spectinomycin adenylyltransferase gene (*aadA*) in *Enterococcus faecalis*.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 43, 157–160
- CLEWELL, D.B., FLANNAGAN, S.E., JAWORSKI, D.D. (1995):
Unconstrained bacterial promiscuity: the Tn916-Tn1545 family of conjugative transposons.
Trends in Microbiology 3, 229–236
- COLE, S.T. (1994):
Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*.
Immunobiology 191, 584–585
- CONNELL, S.R., TRIEBER, C.A., DINOS, G.P., EINFELDT, E., TAYLOR, D.E., NIERHAUS, K.H. (2003):
Mechanism of Tet(O)-mediated tetracycline resistance.
The EMBO Journal 22, 945–953
- CORPET, D.E., LUMEAU, S., CORPET, F. (1999):
Minimum antibiotic levels for selecting a resistance plasmid in a gnotobiotic animal model.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 33, 535–540
- COTTA, M.A.; WHITEHEAD, T.R.; ZELTWANGER, R.L. (2003):
Isolation, characterization and comparison of bacteria from swine faeces and manure storage pits.
Environmental Microbiology 5, 737–745
- COURVALIN, P., CARLIER, C. (1987):
Tn1545: a conjugative shuttle transposon.
Molecular and General Genetics 206, 259–264
- DAHLBERG, C., CHAO, L. (2003):
Amelioration of the Cost of Conjugative Plasmid Carriage in *Escherichia coli* K 12.
Genetics 165, 1641–1649
- DANMAP (1997, 1999, 2001, 2002, 2003, 2004):
Consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark.
Statens Serum Institut, Danish Veterinary & Food Administration, Danish Medicines Agency, Danish Veterinary Laboratory; <http://www.dfvf.dk/Default.asp?ID=9200>
- DANIELSEN, M., WIND, A. (2003):
Susceptibility of *Lactobacillus spp.* to antimicrobial agents.
International Journal of Food Microbiology 82, 1–11
- DANTLEY, K.A., DANNELLY, H.K., BURDETT, V. (1998):
Binding interaction between Tet(M) and the ribosome: requirements for binding.
Journal of Bacteriology 180, 4089–4092

DAVIES, J.E. (1997):

Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants.

In: CHADWICK, D.J., GOODE, J. (Herausgeber): Antibiotic resistance: Origin, evolution and spread. Ciba Foundation Symposium, Wiley, Chichester

DAVIS, B.D. (1990):

Gene variation and transfer.

In: DAVIS, D.B., DULBECCO, R., EISEN, N., GINSBERG, H.S. (Herausgeber): Microbiology. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia

DE GELDER, L., PONCIANO, J.M., ABDO, Z., JOYCE, P., FORNEY, L.J., TOP, E.M. (2004):

Combining Mathematical Models and Statistical Methods to Understand and Predict the Dynamics of Antibiotic-Sensitive Mutants in a Population of Resistant Bacteria During Experimental Evolution.

Genetics 168, 1131–1144

DE FATIMA SILVA LOPES, M., RIBEIRO, T., ABRANTES, M., FIGUEIREDO MARQUES, J.J., TENREIRO, R., CRESPO, M.T. (2005):

Antimicrobial resistance profiles of dairy and clinical isolates and type strains of enterococci.

International Journal of Food Microbiology 103, 191–198

DE LEENER, E., MARTEL, A., DECOSTERE, A., HAESEBROUCK, F. (2004):

Distribution of the *erm(B)* gene, tetracycline resistance genes, and Tn1545-like transposons in macrolide- and lincosamide-resistant enterococci from pigs and humans.

Microbial Drug Resistance 10, 341–345

DELGADO, S., FLOREZ, A.B., MAYO, B. (2005):

Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species from the human gastrointestinal tract.

Current Microbiology 50, 202–207

DELSOL, A.A., ANJUM, M., WOODWARD, M.J., SUNDERLAND, J., ROE, J.M. (2003):

The effect of chlortetracycline treatment and its subsequent withdrawal on multi-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 and commensal *Escherichia coli* in the pig.

Journal of Applied Microbiology 95, 1226–1234

DEVRIESE, L.A., HOMMEZ, J., POT, B., HAESEBROUCK, F. (1994):

Identification and composition of the streptococcal and enterococcal flora of tonsils, intestines and faeces of pigs.

Journal of Applied Bacteriology 77, 31–36

DEVRIESE, L.A., VANCANNEYT, M., DESCHEEMAER, P., BAELE, M., VAN LANDUYT, H.W., GORDTS, B., BUTAYE, P., SWINGS, J., HAESEBROUCK, F. (2002):

Differentiation and identification of *Enterococcus durans*, *E. hirae* and *E. villorum*.

Journal of Applied Microbiology 92, 821–827

DIN 58940-81 (2002):

Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika. Teil 81: Mikrodilution. Spezielle Anforderungen an die Testung von nicht anspruchsvollen Bakterien. Beuth-Verlag, Berlin

DIN 58940-83 (1999):

Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika. Teil 83: Mikrodilution. Spezielle Anforderungen an die Testung von obligat anaeroben Bakterien. Beuth-Verlag, Berlin

DIN 58940-4 Beiblatt 1 (2004):

Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheits-erregern gegen Chemotherapeutika. Teil 4: Bewertungsstufen für die minimale Hemmkonzentration; MHK-Grenzwerte von antibakteriellen Wirkstoffen. Beuth-Verlag, Berlin

DIONISIO, F., CONCEIÇÃO, I.C., MARQUES, A.C.R., FERNANDES, L., GORDO, I. (2005):

The evolution of a conjugative plasmid and its ability to increase bacterial fitness. *Biology Letters* 1, 250–252

DOBLER, G. (2005): Rationelle Infektionstherapie in der Klinik. Spitta-Verlag, Balingen

DOUBLET, B., BOYD, D., MULVEY, M.R., CLOECKAERT, A. (2005):

The *Salmonella* genomic island 1 is an integrative mobilizable element. *Molecular Microbiology* 55, 1911–1924

DOUCET-POPULAIRE, F., TRIEU-CUOT, P., DOSBAA, I., ANDREMONT, A., COURVALIN, P. (1991)

Inducible transfer of conjugative transposon Tn1545 from *Enterococcus faecalis* to *Listeria monocytogenes* in the digestive tracts of gnotobiotic mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 35, 185–187

DRIDI, L., TANKOVIC, J., PETIT, J.C. (2004):

CdeA of *Clostridium difficile*, a new multidrug efflux transporter of the MATE family.

Microbial Drug Resistance 10, 191–196.

DU TOIT, M., DICKS, L.M., HOLZAPFEL, W.H. (2001):

Taxonomy of obligately homofermentative and facultatively heterofermentative lactobacilli in pig faeces.

Letters in Applied Microbiology 32, 199–204

DÜRCKHEIMER, W. (1975):

Tetrazykline: Chemie, Biochemie und Struktur-Wirkungs-Beziehungen. *Angewandte Chemie* 21, 751–784

DUNLOP, R.H., McEWEN, S.A., MEEK, A.H., FRIENDSHIP, R.M., BLACK, W.D., CLARKE, R.C. (1999):

Sampling considerations for herd-level measurement of faecal *Escherichia coli* antimicrobial resistance in finisher pigs.

Epidemiology and Infection 122, 485–96

DUTTA, G.N., DEVRIESE, L.A. (1981):

Macrolide-lincosamide-streptogramin resistance patterns in *Clostridium perfringens* from animals.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy 19, 274–278

EFSA (European Food Safety Authority) (2004):

Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on the use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants.

Question N° EFSA-Q-2003-109

EG (2003):

Artikel 11 Absatz 2 der Verordnung (EG) 1831/2003

EL AMIN, N., LUND, B., TJERNLUND, A., LUNDBERG, C., JALAKAS, K., WRETLIND, B. (2001):

Mechanisms of resistance to imipenem in imipenem-resistant, ampicillin-sensitive *Enterococcus faecium*.

Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica 109, 791–796

EL AMIN, N., WRETLIND, B., WENGER, A., BRANDT, V., BILLE, J. (2002):

Ampicillin-sensitive, imipenem-resistant strains of *Enterococcus faecium*.

Journal of Clinical Microbiology 40, 738

EMEA (1999):

Antimicrobial Resistance in the EU Associated with the Therapeutic Use of Antimicrobials.

EMEA/CVMP/342/99-Final, London

ENGELS, H. (2004):

Verhalten von ausgewählten Tetrazyklinen und Sulfonamiden in Wirtschaftsdüngern und in Böden.

Georg-August-Universität Göttingen, Dissertation

ENNE, V.I., DELSOL, A.A., ROE, J.M., BENNETT, P.M. (2004):

Rifampicin resistance and its fitness cost in *Enterococcus faecium*.

Journal of Antimicrobial Chemotherapy 53, 203–207

ESAC (2002):

European Surveillance of Antimicrobial Consumption – Interactive Database,

http://www.esac.ua.ac.be/main.aspx?c=*ESAC2

EWG (1987):

Richtlinie des Rates zur Festlegung von Leitlinien zur Beurteilung von Zusatzstoffen in der Tierernährung.

Verordnung (EWG) 87/153: Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaft Nr.L 64/19

- FAHRMEIR, L., TUTZ, G. (2001):
Multivariate Statistical Modelling Based on Generalized Linear Models.
2. Auflage. Springer-Verlag, New York
- FASS, R.J., BARNISHAN, J., AYERS, L.W. (1995):
Emergence of bacterial resistance to imipenem and ciprofloxacin in a university hospital.
Journal of Antimicrobial Chemotherapy 36, 343–353
- FEDESA (1998):
Verbrauch von Antibiotika. Deutsches Tierärzteblatt 11, 1093
- FERNANDEZ-GUERRERO, M., ROUSE, M.S., HENRY, N.K., GERACI, J.E., WILSON, W.R. (1987):
In vitro and in vivo activity of ciprofloxacin against enterococci isolated from patients with infective endocarditis.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 31, 430–433
- FLOREZ, A.B., DELGADO, S., MAYO, B. (2005):
Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from a cheese environment.
Canadian Journal of Microbiology 51, 51–58
- FLUIT, A.C., SCHMITZ, F.J. (2004):
Resistance integrons and super-integrons.
Clinical Microbiology and Infection 10, 272–288
- FOSTER, R.C., ROVIRA, A.D., COCK, T.W. (1983):
Ultrastructure of the Root-Soil Interface.
The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota
- FRANKLIN, A., ACAR, J., ANTHONY, F., GUPTA, R., NICHOLLS, T., TAMURA, Y., THOMPSON, S., THRELFALL, E.J., VOSE, D., VAN VUUREN, M., WHITE, D.G., WEGENER, H.C., COSTARRICA, M.L.; Office International des Epizooties Ad hoc Group (2001):
Antimicrobial resistance: harmonisation of national antimicrobial resistance monitoring and surveillance programmes in animals and in animal-derived food.
Scientific and Technical Review 20, 859–870
- GEDEK, B. (1974):
Möglichkeiten und Grenzen der mikrobiologischen Futtermittelkontrolle.
Deutsche tierärztliche Wochenschrift 81, 37–40 und 65–69
- GENARS – German Network for Antimicrobial Resistance Surveillance.
Resistenzdaten auf <http://www.genars.de/data.htm> 1. Halbjahr 2003
- GEORGE, A.M., LEVY, S.B. (1983):
Amplifiable Resistance to Tetracycline, Chloramphenicol, and Other Antibiotics in *Escherichia coli*: Involvement of a Non-Plasmid-Determined Efflux of Tetracycline.
Journal of Bacteriology 155, 531–540

- GEVERS, D., HUYS, G., SWINGS, J. (2003):
In vitro conjugal transfer of tetracycline resistance from *Lactobacillus* isolates to other Gram-positive bacteria.
FEMS Microbiology Letters 225, 125–130
- GFELLER, K.Y., ROTH, M., MEILE, L., TEUBER, M. (2003):
Sequence and genetic organization of the 19.3-kb erythromycin- and dalbapristin-resistance plasmid pLME300 from *Lactobacillus fermentum* ROT1.
Plasmid 50, 190–201
- GHISALBERTI, D., MASI, M., PAGES, J.M., CHEVALIER, J. (2005):
Chloramphenicol and expression of multidrug efflux pump in *Enterobacter aerogenes*.
Biochemical and Biophysical Research Community 328, 1113–1118
- GOBERNADO, M. (2003):
Fosfomicina.
Revista Española de Quimioterapia 16, 15–40
- GOULD, C.V., FISHMAN, N.O., NACHAMKIN, I., LAUTENBACH, E. (2004):
Chloramphenicol resistance in vancomycin-resistant enterococcal bacteremia: impact of prior fluoroquinolone use?
Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America. 25, 138–145
- GÖTZ, A., PUKALL, R., SMIT, E., TIETZE, E., PRAGER, R., TSCHÄPE, H., VAN ELSAS, J.D., SMALLA, K. (1996):
Detection and characterisation of broad-host-range plasmids in environmental bacteria using PCR.
Applied and Environmental Microbiology 62, 2621–2628
- GÖTZ, A., SMALLA, K. (1997):
Manure Enhances Plasmid Mobilization and Survival of *Pseudomonas putida* Introduced into Field Soil.
Applied and Environmental Microbiology 63, 1980–1986
- GRÄFE, U. (1992):
Biochemie der Antibiotika: Struktur – Biosynthese – Wirkungsmechanismus.
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford
- GRAFE, A. (2000):
Untersuchungen zum Einsatz pharmakologisch wirksamer Stoffe in der Veredelungswirtschaft unter besonderer Berücksichtigung der Tetrazykline.
Georg-August-Universität Göttingen, Dissertation
- GRAYSON, M.L., ELIOPOULOS, G.M., WENNERSTEN, C.B., RUOFF, K.L., KLIMM, K., SAPICO, F.L., BAYER, A.S., MOELLERING JR., R.C. (1991):
Comparison of *Enterococcus raffinosus* with *Enterococcus avium* on the basis of penicillin susceptibility, penicillin-binding protein analysis, and high-level aminoglycoside resistance.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 35, 1408–1412

- HAACK, B.J., ANDREWS, R.E., LOYNACHAN, T.E. (1996):
Tn916-mediated genetic exchange in soil.
Soil Biology and Biochemistry 28, 765–771
- HAMILTON-MILLER, J.M., SHAH, S. (1999):
Identification of clinically isolated vancomycin-resistant enterococci: comparison of API and BBL Crystal systems.
The Journal of Medical Microbiology 48, 695–696
- HAMSCHER, G., SCZESNY, S., ABU-QARE, A., HÖPER, H., NAU, H. (2000a):
Stoffe mit pharmakologischer Wirkung einschließlich hormonell aktiver Substanzen in der Umwelt: Nachweis von Tetracyclinen in güllegedüngten Böden.
Deutsche Tierärztliche Wochenschrift 107, 293–348
- HAMSCHER, G., SCZESNY, S., HÖPER, H., NAU, H. (2000b):
Tetracyclin- und Chlortetracyclinrückstände in güllegedüngten Böden.
In: HARTUNG, J., WATHES, C. (2000) (Herausgeber) Livestock farming and the environment. Sonderheft 226, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Braunschweig
- HAMSCHER, G., SCZESNY, S., HÖPER, H., NAU, H. (2002):
Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry.
Analytical Chemistry 74, 1509–1518
- HANDAL, T., GIRAUD-MORIN, C., CAUGANT, D.A., MADINIER, I., OLSEN, I., FOSSE, T. (2005):
Chromosome- and plasmid-encoded beta-lactamases in *Capnocytophaga spp.*
Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 49, 3940–3943
- HANDELSMAN, J. (2004):
Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms.
Microbiology and Molecular Biology Reviews 68, 669–685
- HANSEN, L.H., JOHANNESSEN, E., BURMOLLE, M., SØRENSEN, A.H., SØRENSEN, S.J. (2004):
Plasmid-Encoded Multidrug Efflux Pump Conferring Resistance to Olaquinox in *Escherichia coli*.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 48, 3332–3337
- HARMS, K. (2006):
Untersuchungen zum Nachweis und Vorkommen von Antibiotika und deren Metaboliten in Schweinegülle.
Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München, Dissertation
- HARTEMINK, R., DOMENECH, V.R., ROMBOUTS, F.M. (1997):
LAMVAB – A new selective medium for the isolation of lactobacilli from faeces.
Journal of Microbiological Methods 29, 77–84

- HARTEMINK, R., ROMBOOTS, F.M. (1999):
Comparison of media for the detection of bifidobacteria, lactobacilli and total anaerobes from faecal samples.
Journal of Microbiological Methods (Netherlands) 36, 181–192
- HASMAN, H., AARESTRUP, F.M. (2005):
Relationship between copper, glycopeptide and macrolide resistance among *Enterococcus faecium* strains isolated from pigs in Denmark between 1997 and 2003.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 49, 454–456
- HELFAND, M.S., BONOMO, R.A. (2005):
Current challenges in antimicrobial chemotherapy: the impact of extended-spectrum beta-lactamases and metallo-beta-lactamases on the treatment of resistant Gram-negative pathogens.
Current Opinion in Pharmacology 5, 452–458
- HEINEMANN, J.A., ANKENBAUER, R.G., AMABILE-CUEVAS, C.F. (2000):
Do antibiotics maintain antibiotic resistance?
Drug Discovery Today 5, 195–204
- HERRERO, A., RODICIO, M.R., GONZALEZ-HEVIA, M.A., MENDOZA, M.C. (2006):
Molecular epidemiology of emergent multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium strains carrying the virulence resistance plasmid pUO-StVR2.
Journal of Antimicrobial Chemotherapy 57, 39–45
- HILL, K.E., TOP, E.M. (1998):
Gene transfer in soil systems using microcosms.
FEMS Microbiology Ecology 25, 319–329
- HILLEN, W., BERENS, C. (1994)
Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance.
Annual Review of Microbiology 48, 45–46
- HOLZAPFEL, W.H., HABERER, P., SNEL, J., SCHILLINGER, U., HUIS IN'T VELD, J.H. (1998):
Overview of gut flora and probiotics.
International Journal of Food Microbiology 41, 85–101
- HUDSON, C.R., FEDORKA-CRAY, P.J., JACKSON-HALL, M.C., HIOTT, L.M. (2003):
Anomalies in species identification of enterococci from veterinary sources using a commercial biochemical identification system.
Letters in Applied Microbiology 36, 245–250
- HUGHES, V., DATTA, N. (1983):
Conjugative plasmids in bacteria of the 'pre-antibiotic' era.
Nature 302, 725–726

- HUPPERTZ, K., WIEDEMANN, B. (2000):
Genars-Projekt etabliert.
Chemotherapie Journal 9, 200–212
- JACKSON, C.R., FEDORKA-CRAY, P.J., BARRETT, J.B., LADELY, S.R. (2005):
High-level aminoglycoside resistant enterococci isolated from swine.
Epidemiology and Infection 133, 367–371
- JANEWAY, C.A., TRAVERS, P. (1997):
Immunologie.
2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford
- JOHNSON, R., ADAMS, J. (1992):
The ecology and evolution of tetracycline resistance.
Trends in Ecology and Evolution 7, 295–299
- JONES, P.W. (1980):
Health hazards associated with the handling of animal wastes.
The Veterinary Record 106, 4–7
- JUAN, C., MACIA, M.D., GUTIERREZ, O., VIDAL, C., PEREZ, J.L.,
OLIVER, A. (2005): Molecular Mechanisms of beta-Lactam Resistance Mediated by
AmpC Hyperproduction in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Strains.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 49, 4733–4738
- KACZMAREK, F.S., GOOTZ, T.D., DIB-HAJJ, F., SHANG, W., HALLOWELL, S.,
CRONAN, M. (2004):
Genetic and molecular characterization of beta-lactamase-negative ampicillin-
resistant *Haemophilus influenzae* with unusually high resistance to ampicillin.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 48, 1630–1639
- KANEMATSU, E., DEGUCHI, T., YASUDA, M., KAWAMURA, T., NISHINO, Y.,
KAWADA, Y. (1998):
Alterations in the GyrA subunit of DNA gyrase and the ParC subunit of DNA
topoisomerase IV associated with quinolone resistance in *Enterococcus faecalis*.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 42, 433–435
- KINKLE, B.K., SCHMIDT, E.L. (1991):
Transfer of the Pea Symbiotic Plasmid pJB5JI in Nonsterile Soil.
Applied and Environmental Microbiology 57, 3264–3269
- KLARE, I., HEIER, H., CLAUS, H., REISSBRODT, R., WITTE, W. (1995):
vanA-mediated high-level glycopeptide resistance in *Enterococcus faecium* from
animal husbandry.
FEMS Microbiology Letters 125, 165–172
- KOCH, C.L., DERBY, P., ABRATT, V.R. (1998):
In-vitro antibiotic susceptibility and molecular analysis of anaerobic bacteria isolated
in Cape Town, South Africa.
Journal of Antimicrobial Chemotherapy 42, 245–248

KOHLER, T., KOK, M., MICHEA-HAMZEHPUR, M., PLESIAT, P., GOTOH, N., NISHINO, T., CURTY, L.K., PECHERE, J.C. (1996):
Multidrug efflux in intrinsic resistance to trimethoprim and sulfamethoxazole in *Pseudomonas aeruginosa*.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 40, 2288–2290

KRAH, E.R. 3RD, MACRINA, F.L. (1989):
Genetic analysis of the conjugal transfer determinants encoded by the streptococcal broad-host-range plasmid pIP501.
Journal of Bacteriology 171, 6005–6012

KÜHN, I., IVERSEN, A., BURMAN, L.G., OLSSON-LILJEQUIST, B., FRANKLIN, A., FINN, M., AARESTRUP, F., SEYFARTH, A.M., BLANCH, A.R., VILANOVA, X., TAYLOR, H., CAPLIN, J., MORENO, M.A., DOMINGUEZ, L., HERRERO, I.A., MOLLBY, R. (2003):
Comparison of enterococcal populations in animals, humans, and the environment – a European study.
International Journal of Food Microbiology 88, 133–145

KUMAR, A., SCHWEIZER, H.P. (2005):
Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake.
Advanced Drug Delivery Reviews 57, 1486–1513

KURENBACH, B., BOHN, C., PRABHU, J., ABUDUKERIM, M., SZEWZYK, U., GROHMANN, E. (2003):
Intergeneric transfer of the *Enterococcus faecalis* plasmid pIP501 to *Escherichia coli* and *Streptomyces lividans* and sequence analysis of its *tra* region.
Plasmid 50, 86–93

LAMBERT, P.A. (2005):
Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites.
Advanced Drug Delivery Reviews 57, 1471–1485

LAND, M.H., ROUSTER-STEVENSON, K., WOODS, C.R., CANNON, M.L., CNOTA, J., SHETTY, A.K. (2005):
Lactobacillus sepsis associated with probiotic therapy.
Pediatrics 115, 178–181

LANGHAMMER, J.-P. (1989):
Untersuchungen zum Verbleib antimikrobiell wirksamer Arzneistoffe als Rückstände in Gülle und im landwirtschaftlichen Umfeld.
Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Dissertation

LEBUHN, M., EFFENBERGER, M., GARCES, G., GRONAUER, A., WILDERER, P.A. (2005):
Hygienization by anaerobic digestion: comparison between evaluation by cultivation and quantitative real-time PCR.
Water Science and Technology 52, 93–99

- LECLERCQ, R., DERLOT, E., DUVAL, J., COURVALIN, P. (1987):
Strains of *Enterococcus faecium* highly resistant to vancomycin and teicoplanin.
In: Abstracts of the 27th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and
Chemotherapy. American Society for Microbiology, New York
- LECLERCQ, R. (2002):
Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance
elements and their clinical implications.
Clinical Infectious Disease 34, 482–492
- LEE, E.W., HUDA, M.N., KURODA, T., MIZUSHIMA, T., TSUCHIYA, T. (2003):
EfrAB, an ABC multidrug efflux pump in *Enterococcus faecalis*.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 47, 3733–3738
- LENSKI, R.E., NGUYEN, T.T. (1988):
Stability of recombinant DNA and its effects on fitness.
Trends in Ecology and Evolution 3, 18–20
- LENSKI, R.E. (1998):
Bacterial evolution and the cost of antibiotic resistance.
International Microbiology 1, 265–270
- LESER, T.D., AMENUVOR, J.Z., JENSEN, T.K., LINDECORONA, R.H., BOYE, M.,
MØLLER, K. (2002):
Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastro-intestinal tract microbiota
revisited.
Applied and Environmental Microbiology 68, 673–690
- LEUNG, K., POPP, E. (2001):
Bacterial community dynamics in liquid swine manure during storage: molecular
analysis using DGGE/PCR of 16S rDNA.
FEMS Microbiology Ecology 38, 169–177
- LEVIN, B.R., LIPSITCH, M., PERROT, V., SCHRAG, S., ANTIA, R.,
SIMONSEN, L., WALKER, N.M., STEWART, F.M. (1997):
The population genetics of antibiotic resistance.
Clinical Infectious Diseases 24 Supplement 1, 9–16
- LEVY, S.B., FITZGERALD, G.B., MACONE, A.B. (1976):
Spread of antibiotic-resistant plasmids from chicken to chicken and from chicken to
man.
Nature 260, 40–42
- LEVY, S.B. (1986):
Ecology of antibiotic resistance determinants.
In: LEVY, S.B., NOVICK, R.P. (Herausgeber): Antibiotic resistance genes: ecology,
transfer and expression. Cold Spring Hbr Press, New York
- LEVY, S.B. (1992):
Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 36, 695–703

- LEVY, S.B. (1997):
Antibiotic resistance: an ecological imbalance.
In: CHADWICK, D.J., GOODE, J. (Herausgeber): Antibiotic resistance: Origin, evolution and spread. Ciba Foundation Symposium, Wiley, Chichester
- LIETZAU, S., HOEWNER, M., VON BAUM, H., MARRE, R.,
BRENNER, H.. (2006):
Antibiotic resistant fecal isolates of Enterococci among unselected patients outside the clinical sector: an epidemiological study from Southern Germany.
Pharmacoepidemiology and Drug Safety 15, 275–277
- LIN, C.F., FUNG, Z.F., WU, C.L., CHUNG, T.C. (1996):
Molecular characterization of a plasmid-borne (pTC82) chloramphenicol resistance determinant (*cat-TC*) from *Lactobacillus reuteri* G4.
Plasmid 36, 116–124
- LINTON, A.H. (1977):
Animal to man transmission of Enterobacteriaceae.
Royal Society of Health Journal 97, 115–118
- LORENZ, M.G., WACKERNAGEL, W. (1994):
Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment.
Microbiological Reviews 58, 563–602
- LUO, N., PEREIRA, S., SAHIN, O., LIN, J., HUANG, S., MICHEL, L.,
ZHANG, Q. (2005):
Enhanced in vivo fitness of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter jejuni* in the absence of antibiotic selection pressure.
Proceedings of the National Academy of Sciences USA 102, 541–546
- MAC, K., WICHMANN-SCHAUER, H., PETERS, J., ELLERBROEK, L. (2003):
Species identification and detection of vancomycin resistance genes in enterococci of animal origin by multiplex PCR.
International Journal of Food Microbiology 88, 305–309
- MAKARYUS, A.N., YANG, R., HAHN, R.T., KORT, S. (2005):
A rare case of *Lactobacillus acidophilus* presenting as mitral valve bacterial endocarditis.
Echocardiography 22 421–425
- MANAVATHU, E.K., HIRATSUKA, K., TAYLOR, D.E. (1988):
Nucleotide sequence analysis and expression of a tetracycline-resistance gene from *Campylobacter jejuni*.
Gene 62, 17–26
- MARKS, S.L., KATHER, E.J. (2003):
Antimicrobial susceptibilities of canine *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* isolates to commonly utilized antimicrobial drugs.
Veterinary Microbiology 94, 39–45

- MARSHALL, B., PETROWSKI, D., LEVY, S.B. (1990):
Inter- and intraspecies spread of *Escherichia coli* in a farm environment in the absence of antibiotic usage.
Proceedings of the Northatlantic Academy of Sciences USA 87, 6609–6613
- MAROTHI, Y.A.; AGNIHOTRI, H.; DUBEY, D. (2005):
Enterococcal resistance – an overview.
Indian Journal of Medical Microbiology 23, 214–219
- MARTIN, M.G., DE MIGUEL, I., CAÑAS, A., SANCHEZ, A.M. (2000):
Resistencia a antibióticos en aislamientos clínicos del género *Enterococcus*.
Revista Española de Quimioterapia 13, 412–416
- MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L., PASCUAL, A., JACOBY, G.A. (1998):
Quinolone resistance from a transferable plasmid.
Lancet 351, 797–799
- MASCHIETO, A., MARTINEZ, R., PALAZZO, I.C., DARINI, A.L. (2004):
Anti-microbial resistance of *Enterococcus sp.* isolated from the intestinal tract of patients from a university hospital in Brazil.
Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 99, 763–767
- MAYNARD, C., FAIRBROTHER, J.M., BEKAL, S., SANSCHAGRIN, F., LEVESQUE, R.C., BROUSSEAU, R., MASSON, L., LARIVIERE, S., HAREL, J. (2003):
Antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* O149:K91 isolates obtained over a 23-year period from pigs.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 47, 3214–3221
- MAZURKIEWICZ, P., SAKAMOTO, K., POELARENDS, G.J., KONINGS, W.N. (2005): Multidrug transporters in lactic acid bacteria.
Mini Reviews in Medicinal Chemistry 5, 173–181
- McCULLOCH, C.E., SEARLE, S.R. (2000):
Generalized, Linear, and Mixed Models. Wiley, Chichester
- McDERMOTT, P.F., CULLEN, P., HUBERT, S.K., McDERMOTT, S.D., BARTHOLOMEW, M., SIMJEE, S., WAGNER, D.D. (2005):
Changes in antimicrobial susceptibility of native *Enterococcus faecium* in chickens fed virginiamycin.
Applied and Environmental Microbiology 71, 4986–4991
- MEHLHORN, G. (1985):
Mikroflora im Stall – Ein wichtiger tierhygienischer Faktor.
V. Internationaler Kongress für Tierhygiene, Hannover, 10.–13. September, Band I
- MERCER, D.K, SCOTT, K.P., MELVILLE, C.M., GLOVER, L.A., FLINT, H.J. (2001):
Transformation of an oral bacterium via chromosomal integration of free DNA in the presence of human saliva.
FEMS Microbiology Letters 200, 163–167

- MEYER, J.F., NIES, B.A., WIEDEMANN, B. (1983):
Amikacin resistance mediated by multiresistance transposon Tn2424.
Journal of Bacteriology 155, 755–760
- MOLITORIS, E., KRICHEVSKY, M.I., FAGERBERG, D.J.,
QUARLES, C.L. (1986):
Effects of dietary chlortetracycline on the antimicrobial resistance of porcine faecal streptococcaceae.
Journal of Applied Bacteriology 60, 111–120
- MURGA, M.L.F., CABRERA, G.M., DE VALDEZ, G.F., DISALVO, A.,
SELDES, A.M. (2000):
Influence of growth temperature on cryotolerance and lipid composition of *Lactobacillus acidophilus*.
Journal of Applied Microbiology 88, 342–348
- MURRAY, B., MOELLERING, R.J.R. (1978):
Patterns and mechanisms of antibiotic resistance.
The Medical Clinics of North America 62, 899–923
- NCBI-nBLAST:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
- NICHOLSON, F.A., CHAMBERS, B.J., WILLIAMS, J.R., UNWIN, R.J. (1999):
Heavy metal contents of livestock feeds and animal manures in England and Wales.
Bioresource Technology 70, 23–31
- NICHOLSON, F.A., GROVES, S.J., CHAMBERS, B.J. (2005):
Pathogen survival during livestock manure storage and following land application.
Bioresource Technology 96, 135–143
- NIKAIDO, H. (1989):
Role of the outer membrane of Gram-negative bacteria in antimicrobial resistance.
In: BRYAN, L. (Herausgeber): *Handbook of experimental pharmacology: microbial resistance to drugs*. Springer-Verlag, Berlin
- NIKAIDO, H. (1996):
Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria.
Journal of Bacteriology 178, 5853–5859
- NIKAIDO, H. (2003):
Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited.
Microbiology and molecular biology reviews 67, 593–656
- NISHINO, K., YAMAGUCHI, A. (2001):
Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*.
Journal of Bacteriology 183, 5803–5812
- NGUYEN, T.N., PHAN, G.Q., DUONG, L.P. (1989):
Effects of Carriage and Expression of the Tn10 Tetracycline-Resistance Operon on the Fitness of *Escherichia coli* K12l.
Molecular Biology and Evolution 6, 213–225

- NOVOTNA, R., ALEXA, P., HAMRIK, J., MADANAT, A., SMOLA, J., CIZEK, A. (2005):
Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from sheep and goats in Jordan with evidence of multiresistant serotype O157:H7.
Veterinary Medicine – Czech Republic 50, 111–118
- OLDENHOLT-TORNQVIST, I., LOWDIN, E., CARS, O. (2000):
Pharmacodynamic Effects of Subinhibitory Concentrations of β -Lactam Antibiotics in Vitro.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 35, 1834–1839
- OH, H., EDLUND, C. (2003):
Mechanism of quinolone resistance in anaerobic bacteria.
Clinical Microbiology and Infection 9, 512–517
- OHLSEN, K., TERNES, T., WERNER, G., WALLNER, U., LOFFLER, D., ZIEBUHR, W., WITTE, W., HACKER, J. (2003):
Impact of antibiotics on conjugational resistance gene transfer in *Staphylococcus aureus* in sewage.
Environmental Microbiology 5, 711–716.
- ONO, S., MURATANI, T., MATSUMOTO, T. (2005):
Mechanisms of resistance to imipenem and ampicillin in *Enterococcus faecalis*.
Antimicrobial Agents and Chemo-therapy 49, 2954–2958
- PARENT, R., ROY, P.H. (1992):
The chloramphenicol acetyltransferase gene of Tn2424: a new breed of *cat*.
Journal of Bacteriology 174, 2891–2897
- PATERSON, D.L., MULAZIMOGLU, L., CASELLAS, J.M., KO, W.C., GOOSSENS, H., VON GOTTBURG, A., MOHAPATRA, S., TRENHOLME, G.M., KLUGMAN, K.P., MCCORMACK, J.G., YU, V.L. (2000):
Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum beta-lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteremia.
Clinical Infectious Diseases 30, 473–478
- PELÁEZ, T., ALCALÁ, L., ALONSO, R., RODRÍGUEZ-CRÉIXEMS, M., GARCÍA-LECHUZ, J., BOUZA, E. (2002):
Reassessment of *Clostridium difficile* susceptibility to metronidazole and vancomycin.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 46, 1647–1650
- PERRI, M.B., HERSHBERGER, E., IONESCU, M., LAUTER, C., ZERVOS, M.J. (2002):
In vitro susceptibility of vancomycin-resistant enterococci (VRE) to fosfomicin.
Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases 42, 269–271
- PERRIN-GUYOMARD, A., COTTIN, S., CORPET, D.E., BOISSEAU, J., POUL, J.M. (2001):
Evaluation of residual and therapeutic doses of tetracycline in the human-flora-associated (HFA) mice model.
Regulatory Toxicology and Pharmacology 34, 125–36

- PETERS, J. (2003):
Antibiotikaresistenz von Enterokokken aus landwirtschaftlichen Nutztieren und
Lebensmitteln tierischer Herkunft.
FU Berlin, Journal-Nr. 2722, Dissertation
- POOLE, K. (2004):
Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria.
Clinical Microbiology and Infection 10, 12–26
- POPPE, C., MARTIN, L.C., GYLES, C.L., REID-SMITH, R., BOERLIN, P.,
MCEWEN, S.A., PRESCOTT, J.F., FORWARD, K.R. (2005):
Acquisition of resistance to extended-spectrum cephalosporins by *Salmonella enterica*
subsp. enterica serovar Newport and Escherichia coli in the turkey poult intestinal
tract.
Applied and Environmental Microbiology 71, 1184–1192
- POURNARAS, S., TSAKRIS, A., PALEPOU, M.F., PAPA, A., DOUBOYAS, J.,
ANTONIADIS, A., WOODFORD, N. (2000):
Pheromone responses and high-level aminoglycoside resistance of conjugative
plasmids of *Enterococcus faecalis* from Greece.
Journal of Antimicrobial Chemotherapy 46, 1013–1016
- POYART, C., CELLI, J., TRIEU-CUOT, P. (1995):
Conjugative transposition of Tn916-related elements from *Enterococcus faecalis* to
Escherichia coli and *Pseudomonas fluorescens*.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 39, 500–506
- PUKALL, R., TSCHÄPE, H., SMALLA, K. (1996):
Monitoring the spread of broad host and narrow host range plasmids in soil
microcosms.
FEMS Microbiology Ecology 20, 53–66
- QIU, W., SHI, R., LU, M.L., ZHOU, M., ROY, P.H., LAPOINTE, J.,
LIN, S.X. (2004):
Crystal structure of chloramphenicol acetyltransferase B2 encoded by the multi-
resistance transposon Tn2424.
Proteins 57, 858–861
- QU, T.T., CHEN, Y.G., YU, Y.S., WEI, Z.Q., ZHOU, Z.H., LI, L.J. (2006):
Genotypic diversity and epidemiology of high-level gentamicin resistant
Enterococcus in a Chinese hospital.
Journal of Infectiology 52, 124–130
- QUINONES, D., GONI, P., RUBIO, M.C., DURAN, E., GOMEZ-LUS, R. (2005):
Enterococci spp. isolated from Cuba: species frequency of occurrence and anti-
microbial susceptibility profile.
Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 51, 63–67
- RANDALL, L.P., WOODWARD, M.J. (2002):
The multiple antibiotic resistance (*mar*) locus and its significance.
Research Veterinary Science 72, 87–93

- RASSOW, D., SCHAPER, H. (1996):
Zum Einsatz von Fütterungsarzneimitteln in Schweine- und Geflügelbeständen in der Region Weser-Ems.
Deutsche tierärztliche Wochenschrift, 103, 237–284
- READY, D., ROBERTS, A.P., PRATTEN, J., SPRATT, D.A., WILSON, M., MULLANY, P. (2002):
Composition and antibiotic resistance profile of microcosm dental plaques before and after exposure to tetracycline.
Journal of Antimicrobial Chemotherapy 49, 769–775
- REINERT, R.R., AL-LAHHAM, A., LEMPERLE, M., TENHOLTE, C., BRIEFS, C., HAUPTS, S., GERARDS, H.H., LÜTTICKEN, R. (2002):
Emergence of macrolide and penicillin resistance among invasive pneumococcal isolates in Germany.
Journal of Antimicrobial Chemotherapy 49, 61–68
- RICE, B., BONOMO, R.A. (1996, 2005):
Genetic and Biochemical Mechanisms of Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents.
In: LORIAN, V.: Antibiotics in Laboratory Medicine (Fourth/ Fifth Edition),
Williams & Wilkins, Baltimore
- RICE, L.B., CARIAS, L.L. (1998):
Transfer of Tn5385, a composite, multiresistance chromosomal element from *Enterococcus faecalis*.
Journal of Bacteriology 180, 714–721
- ROBERTS, M.C., HILLIER, S.L. (1990): Genetic basis of tetracycline resistance in urogenital bacteria. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 34, 261–264
- ROBERTS, M.C., MONCLA, B.J., HILLIER, S.L. (1991):
Characterization of unusual tetracycline-resistant gram-positive bacteria.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 35, 2655–2657
- ROBERTS, M.C. (1996):
Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution.
FEMS Microbiology Reviews 19, 1–24
- ROBERTS, M.C. (1997):
Genetic mobility and distribution of tetracycline resistance determinants.
In: CHADWICK, D.J., GOODE, J. (Herausgeber): Antibiotic resistance: Origin, evolution and spread. Ciba Foundation Symposium, Wiley, Chichester
- ROBERTS, M.C. (2005):
Update on acquired tetracycline resistance genes.
FEMS Microbiology Letters 245, 195–203

- SALYERS, A.A., SHOEMAKER, N.B., STEVENS, A.M., LI, L.-Y. (1995):
Conjugative Transposons: an Unusual and Diverse Set of Integrated Gene Transfer Elements.
Microbiological Reviews, 59, 579–590
- SANDERS, C.C., SANDERS JR. W.E., GOERING, R.V., WERNER, V. (1984):
Selection of multiple antibiotic resistance by quinolones, beta-lactams, and aminoglycosides with special reference to cross-resistance between unrelated drug classes.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 26, 797–801
- SCHMIEGER, H., SCHICKLMAIER, P. (1999):
Transduction of multiple drug resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104.
FEMS Microbiology Letters 170, 251–256
- SCHOLZ, O., KOSTNER, M., REICH, M., GASTIGER, S., HILLEN, W. (2003):
Teaching TetR to recognize a new inducer.
Journal of Molecular Biology 329, 217–227
- SCHUPPERS, M.E., STEPHAN, R., LEDERGERBER, U., DANUSER, J., BISSIG-CHOISAT, B., STARK, K.D., REGULA, G. (2005):
Clinical herd health, farm management and antimicrobial resistance in *Campylobacter coli* on finishing pig farms in Switzerland.
Preventive Veterinary Medicine 69, 189–202
- SCHWAB, M., DÖHLER, H. (2000):
Wirtschaftsdüngeranfall.
Landtechnik, 55, 189–190
- SCHWABER, M.J., NAVON-VENEZIA, S., SCHWARTZ, D., CARMELI, Y. (2005):
High levels of antimicrobial coresistance among extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 49, 2137–2139
- SCHWARZ, S., ROBERTS, M.C., WERCKENTHIN, C., PANG, Y., LANGE, C. (1998):
Tetracycline resistance in *Staphylococcus spp.* from domestic animals.
Veterinary Microbiology 63, 217–227
- SCHWARZ, F.V., PERRETEN, V., TEUBER, M. (2001):
Sequence of the 50-kb conjugative multiresistance plasmid pRE25 from *Enterococcus faecalis* RE25.
Plasmid 46, 170–187
- SCHWARZ, S., KEHRENBERG, C., DOUBLET, B., CLOECKAERT, A. (2004):
Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol.
FEMS Microbiology Reviews 28, 519–542

- SENGELØV, G., AGERSØ, Y., HALLING-SØRENSEN, B., BALODA, S.B., ANDERSEN, J.S., JENSEN, L.B. (2003):
Bacterial antibiotic resistance levels in Danish farmland as a result of treatment with pig manure slurry.
Environment International 28, 587–595
- SHAH, P.M. (2005):
The need for new therapeutic agents: what is in the pipeline?
Clinical Microbiology and Infection 11, 36–42
- SHULTZ, T.R., TAPSALL, J.W., WHITE, P.A., RYAN, C.S., LYRAS, D., ROOD, J.I., BI-NOTTO, E., RICHARDSON, C.J. (2003):
Chloramphenicol-resistant *Neisseria meningitidis* containing *catP* isolated in Australia.
Journal of Antimicrobial Chemotherapy 52, 856–859
- SIMJEE, S., FRAISE, A.P., GILL, M.J. (1999):
Plasmid heterogeneity and identification of a Tn5281-like element in clinical isolates of high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecium* isolated in the UK.
Journal of Antimicrobial Chemotherapy 43, 625–635
- SMITH, M.S., YANG, R.K., KNAPP, C.W., NIU, Y., PEAK, N., HANFELT, M.M., GALLAND, J.C., GRAHAM, D.W. (2004):
Quantification of tetracycline resistance genes in feedlot lagoons by real-time PCR.
Applied and Environmental Microbiology 70, 7372–7377
- SONGER, J.G., POST, K.W., LARSON, D.J., JOST, B.H., GLOCK, R.D. (2000):
Infection of neonatal swine with *Clostridium difficile*.
Swine Health and Production 4, 185–189
- SPAHN, C.M., BLAHA, G., AGRAWAL, R.K., PENCZEK, P., GRASSUCCI, R.A., TRIEBER, C.A., CONNELL, S.R., TAYLOR, D.E., NIERHAUS, K.H., FRANK, J. (2001):
Localization of the ribosomal protection protein Tet(O) on the ribosome and the mechanism of tetracycline resistance.
Molecular Cell 7, 1037–1045
- STANTON, T.B., HUMPHREY, S.B. (2003):
Isolation of tetracycline-resistant *Megasphaera elsdenii* strains with novel mosaic gene combinations of *tet(O)* and *tet(W)* from swine.
Applied and Environmental Microbiology 69, 3874–3882
- STANTON, T.B., McDOWALL, J.S., RASMUSSEN, M.A. (2004):
Diverse tetracycline resistance genotypes of *Megasphaera elsdenii* strains selectively cultured from swine feces.
Applied and Environmental Microbiology 70, 3754–3757
- STEVENS, A.M., SHOEMAKER, N.B., LI, L.-Y., SALYERS, A.A. (1993):
Tetracycline Regulation of Genes on *Bacteroides* Conjugative Transposons.
Journal of Bacteriology 175, 6134–6141

- STOTZKY, G., BABICH, H. (1986):
Survival of, and genetic transfer by, genetically engineered bacteria in natural environments.
Advances in Applied Microbiology 31, 93–138
- STRATTON, C.W. (2005):
Mechanism of Action for Antimicrobial Agents: General Principles and Mechanisms for Selected Classes of Antibiotics.
In: LORIAN, V.: *Antibiotics in Laboratory Medicine* (Fifth Edition), Williams & Wilkins, Baltimore
- SUNDE, M., FOSSUM, K., SOLBERG, A., SØRUM, H. (1998):
Antibiotic resistance in *Escherichia coli* of the normal intestinal flora of swine.
Microbial Drug Resistance 4, 289–299
- SUNDE, M., SØRUM, H. (1999):
Characterization of integrons in *Escherichia coli* of the normal intestinal flora of swine.
Microbial Drug Resistance 5, 279–287
- SUNDIN, G.W., BENDER, C.L. (1996):
Dissemination of the *strA-strB* streptomycin-resistance genes among commensal and pathogenic bacteria from humans, animals, and plants.
Molecular Ecology 5, 133–143
- SUNDSTRÖM, L., RÅDSTRÖM, P., SWEDBERG, G., SKÖLD, O. (1988):
Site-specific recombination promotes linkage between trimethoprim and sulfonamide resistance genes. Sequence characterization of *dhfrV* and *sulII* and a recombination active locus of Tn21.
Molecular and General Genetics 213, 191–201
- SWANN, M.M. (1969):
Joint Committee on the Use of Antibiotics in Animal Husbandry and Veterinary Medicine.
HMSO, London
- SWENSON, J.M., THORNSBERRY, C., McCROSKEY, L.M., HATHEWAY, C.L., DOWELL JR., V.R. (1980):
Susceptibility of *Clostridium botulinum* to thirteen antimicrobial agents.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 18, 13–19
- TANNOCK, G.W., LUCHANSKY, J.B., MILLER, L., CONNELL, H., THODE-ANDERSEN, S., MERCER, A.A., KLAENHAMMER, T.R. (1994):
Molecular characterization of a plasmid-borne (pGT633) erythromycin resistance determinant (*ermGT*) from *Lactobacillus reuteri* 100-63.
Plasmid 31, 60–71
- TEUBER, M., SCHWARZ, F., PERRETEN, V. (2003):
Molecular structure and evolution of the conjugative multiresistance plasmid pRE25 of *Enterococcus faecalis* isolated from a raw-fermented sausage.
International Journal of Food Microbiology 88, 325–329

- THOMAS, C.M., NIELSEN, K.M. (2005):
Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria.
Nature reviews Microbiology 3, 711–721
- TOP, E., MERGEAY, M., SPRINGAEL, D., VERSTRAETE, W. (1990):
Gene escape model: transfer of heavy metal resistance genes from *Escherichia coli* to
Alcaligenes eutrophus on agar plates and in soil samples.
Applied and Environmental Microbiology 56, 2471–2479
- TOP, E., DE SMET, I., VERSTRAETE, W., DIJKMANS, R.,
MERGEAY, M. (1994): Exogenous Isolation of Mobilizing Plasmids from Polluted
Soils and Sludges.
Applied and Environmental Microbiology 60, 831–839
- TORRES, C., TENORIO, C., PORTILLO, A., GARCIA, M., MARTINEZ, C., DEL
CAMPO, R., RUIZ-LARREA, F., ZARAZAGA, M. (2003):
Intestinal colonization by *vanA*- or *vanB2*-containing enterococcal isolates of healthy
animals in Spain.
Microbial Drug Resistance 9, Supplement 1, 47–52
- TROXLER, J., AZELVANDRE, P., ZALA, M., DEFAGO, G., HAAS, D. (1997):
Conjugative transfer of chromosomal genes between fluorescent *Pseudomonads* in the
rhizosphere of wheat.
Applied and Environmental Microbiology 63, 213–219
- TURTON, J.F., KAUFMANN, M.E., GLOVER, J., COELHO, J.M., WARNER, M.,
PIKE, R., PITT, T.L. (2005):
Detection and typing of integrons in epidemic strains of *Acinetobacter baumannii*
found in the United Kingdom.
Journal of Clinical Microbiology 43, 3074–3082
- UNGEMACH, F. (2000):
Figures on quantities of antibacterials used for different purposes in the EU countries
and interpretation.
Acta agriculturæ scandinavica supply 93, 89–97
- VALENTINE, P.J., SHOEMAKER, N.B., SALYERS, A.A. (1988):
Mobilization of *Bacteroides* Plasmids by *Bacteroides* Conjugal Elements.
Journal of Bacteriology 170, 1319–1324
- VAN BAMBEKE, F., MICHOT, J.M., VAN ELDERE, J., TULKENS, P.M. (2005):
Quinolones in 2005: an update.
Clinical Microbiology and Infection 11, 256–280
- VAN DEN BOGAARD, A.E., JENSEN, L.B., STOBBERINGH, E.E. (1997):
Vancomycin-resistant enterococci in turkeys and farmers.
New England Journal of Medicine 337, 1558–1559

- VAN ELSAS, J.D., NIKKEL, M., VAN OVERBEEK, L.S. (1989):
Detection of plasmid RP4 transfer in soil and rhizosphere, and the occurrence of
homology to RP4 in soil bacteria.
Current Microbiology 19, 375–381
- VANCANNEYT, M., SNAUWAERT, C., CLEENWERCK, I., BAELE, M.,
DESCHEEMAER, P., GOOSSENS, H., POT, B., VANDAMME, P., SWINGS, J.,
HAESEBROUCK, F., DEVRIESE, L.A. (2001):
Enterococcus villorum sp. nov., an enteroadherent bacterium associated with
diarrhoea in piglets.
International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51, 393–400
- VETIDATA (2006)
www.vetidata.de
- VILLEDIEU, A., DIAZ-TORRES, M.L., HUNT, N., McNAB, R., SPRATT, D.A.,
WILSON, M., MULLANY, P. (2003):
Prevalence of tetracycline resistance genes in oral bacteria.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 47, 878–882
- VOGEL, F., BODMANN, K.-F und eine Expertengruppe der PEG (2004):
Empfehlungen zur kalkulierten parenteralen Initialtherapie bakterieller Erkrankungen
bei Erwachsenen.
Chemotherapie Journal 13, 46–105
- WALLRAUCH, C., ELSNER, E., MILATOVIC, D., CREMER, J.,
BRAVENY, I. (1997):
Antibiotikaresistenz der Enterokokken in Deutschland.
Medizinische Klinik 92, 464–468
- WANG, M.; TRAN, J.H.; JACOBY, G.A.; ZHANG, Y.; WANG, F.;
HOOPER, D.C. (2003): Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of
Escherichia coli from Shanghai, China.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 47, 2242–2248
- WASTESON, Y., HOIE, S., ROBERTS, M.C. (1994):
Characterization of antibiotic resistance in *Streptococcus suis*.
Veterinary Microbiology 41, 41–49
- WEIR, S., MACONE, A., DONATELLI, J., TRIEBER, C., TAYLOR, D.E.,
TANAKA, S.K., LEVY, S.B. (2003):
The Activity of PTK 0796 (BAY 73-6944) Against Tetracycline Resistance.
43rd Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy
(ICAAC) in Chicago, IL, Abstract 2611, Poster F-752
- WERNER, G., KLARE, I., WITTE, W. (1998):
Association between quinupristin/dalfopristin resistance in glycopeptide-resistant
Enterococcus faecium and the use of additives in animal feed.
European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 17, 401–402

- WERNER, G., HILDEBRANDT, B., KLARE, I., WITTE, W. (2000):
Linkage of determinants for Streptogramin A, Macrolide-Lincosamide-
Streptogramin B, and Chloramphenicol resistance on a conjugative plasmid in
Enterococcus faecium and dissemination of this cluster among Streptogramin-
resistant enterococci.
International Journal of Medical Microbiology 290, 543–548
- WERNER, G., KLARE, I., SPENCKER, F.B., WITTE, W. (2003):
Intra-hospital dissemination of quinupristin/dalfopristin- and vancomycin-resistant
Enterococcus faecium in a paediatric ward of a German hospital.
Journal of Antimicrobial Chemotherapy 52, 113–115
- WHITTLE, G., SHOEMAKER, N.B., SALYERS, A.A. (2002):
The role of *Bacteroides* conjugative transposons in the dissemination of antibiotic
resistance genes.
Cellular and Molecular Life Sciences 59, 2044–54
- WHO (1997):
The Medical Impact of Antimicrobial Use in Food Animals.
Report of a WHO Meeting, Berlin, Germany, 13–17 October 1997.
WHO/EMC/ZOO/97.4
- WHO (1998):
Use of Quinolones in Food Animals and Potential Impact on Human Health.
Report of a WHO Meeting, Geneva, Switzerland, 2–5 June 1998.
WHO/EMC/ZDI/98.10
- WIDDOWSON, C.A., KLUGMAN, K.P., HANSLO, D. (1996):
Identification of the tetracycline resistance gene, *tet(O)*, in *Streptococcus pneumoniae*.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 40, 2891–2893
- WIKLER, M.A.; AMBROSE, P.G. (2005):
The Breakpoint.
In: LORIAN, V.: Antibiotics in Laboratory Medicine (Fifth Edition),
Williams & Wilkins, Baltimore
- WILLIAMS, D.R., THOMAS, C.M. (1992):
Active partitioning of bacterial plasmids.
Journal of Genetic Microbiology 138, 1–16
- WINCKLER, C., GRAFE, A. (2000):
Stoffeintrag durch Tierarzneimittel und pharmakologische Futterzusatzstoffe unter
besonderer Berücksichtigung der Tetrazykline.
UBA Texte 44/00
- WOEGERBAUER, M., JENNI, B., THALHAMMER, F., GRANINGER, W.,
BURGMANN, H. (2002):
Natural genetic transformation of clinical isolates of *Escherichia coli* in urine and
water.
Applied and Environmental Microbiology 68, 440–443

WOLTER, N., SMITH, A.M., FARRELL, D.J., SCHAFFNER, W., MOORE, M., WHITNEY, C.G., JORGENSEN, J.H., KLUGMAN, K.P. (2005):
Novel mechanism of resistance to oxazolidinones, macrolides, and chloramphenicol in ribosomal protein L4 of the pneumococcus.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy 49, 3554–3557

WOODFORD, N. (2005):

Biological counterstrike: antibiotic resistance mechanisms of Gram-positive cocci.
Clinical Infectious Diseases 11, Supplement 3, 2–21

WRIGHT, G.D., LADAK, P. (1997):

Overexpression and characterization of the chromosomal aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase from *Enterococcus faecium*.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy 41, 956–960

WRIGHT, G.D. (2005):

Enzymatic degradation and modification.

Advanced Drug Delivery Reviews 57, 1451–1470

ZARRILLI, R., TRIPODI, M.F., DI POPOLO, A., FORTUNATO, R., BAGATTINI, M., CRISPINO, M., FLORIO, A., TRIASSI, M., UTILI, R. (2005):

Molecular epidemiology of high-level aminoglycoside-resistant enterococci isolated from patients in a university hospital in southern Italy.

Journal of Antimicrobial Chemotherapy 56, 827–835

ZERVOS, M.J.; SCHABERG, D.S. (1985):

Reversal of the in vitro susceptibility of enterococci to trimethoprim-sulfamethoxazole by folinic acid.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy 28, 446–448

ZILHAO, R., PAPADOPOULOU, B., COURVALIN, P. (1988):

Occurrence of the *Campylobacter* resistance gene *tetO* in *Enterococcus* and *Streptococcus spp.*

Antimicrobial Agents of Chemotherapy 32, 1793–1796

I Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------|---|
| ^{60}Co | synthetisches Radioisotop des Kobalt-Elementes |
| ^{60}Ni | natürliches Isotop des Nickel-Elementes |
| AB | Antibiotikum |
| aatRNA | Aminoacyl-Transfer-Ribonukleinsäure |
| ANOVA | Analysis of Variance |
| adapt. | adaptiert |
| A-Site | Akzeptorstelle |
| AWMF | Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften |
| β -Strahlung | Betastrahlung |
| β^- -Zerfall | Betazerfall mit abgestrahltem Elektron |
| bp | Basenpaare |
| BLAST | Basic Local Alignment Search Tool |
| Bq | Becquerel |
| BSAC | British Society for Antimicrobial Chemotherapy |
| bzw. | beziehungsweise |
| γ -Strahlen | Gammastrahlen |
| C. | <i>Clostridium</i> |
| ca. | circa |
| CAMHB | Kationen-Adjustierte Müller Hinton Bouillon |
| CO ₂ | Kohlendioxid |
| CTC | Chlortetrazyklin |
| d. h. | das heißt |
| DIN | Deutsches Instiut für Normung |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DSM(Z) | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (und Zellkulturen) |
| e | Eulersche Zahl |
| <i>E.</i> | 1. in der Verbindung <i>E. coli</i> : <i>Escherichia</i> 2. sonst: <i>Enterococcus</i> |
| EF | Elongationsfaktor |
| EFSA | European Food Safety Authority |
| EG | Europäische Gemeinschaft |
| ELISA | Enzyme-linked Immunosorbent Assay |
| EMA | Europäische Agentur zur Beurteilung von Arzneimitteln |
| <i>E. nonfc.</i> | <i>Enterococcus nonfaecalis/nonfaecium</i> |
| ESBL | Extended-Spectrum-Beta-Laktamase |

| | |
|------------------------|--|
| et al. | und andere |
| EWG | Europäische Wirtschaftsgemeinschaft |
| Fa. | Firma |
| FEDESA | Federation Européenne de la Santé Animale |
| F-Faktor | Fertilitäts-Faktor |
| g | 1. Gramm (generell, mit Ausnahme S. 41) 2. Schwerebeschleunigung (ausschließlich S. 41) |
| GER | Deutschland |
| ggf. | gegebenenfalls |
| GP | Resistenztest-Panels zur Testung grampositiver Bakterien |
| GN | Resistenztest-Panels zur Testung gramnegativer Bakterien |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| h | Stunde |
| HCL | Salzsäure |
| HTM | Haemophilus-Test-Medium |
| ILBA | Institut für Ländliche Strukturentwicklung, Betriebswirtschaft und Agrarinformatik |
| inkl. | inklusive |
| InVeKoS | Integriertes Verwaltungs- und Kontrollsystem |
| ISO | Internationale Standard Organisation |
| ITE | Institut für Tierernährung und Futtermittel |
| J | Joule |
| KBE | Koloniebildende Einheiten |
| keV | Kilo-Elektronvolt |
| kg | Kilogramm |
| kGy | Kilo-Gray |
| λ | Wellenlänge |
| l | Liter |
| <i>Lb.</i> | <i>Lactobacillus</i> |
| LC-MS | Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie |
| LfL | Landesanstalt für Landwirtschaft |
| log ₂ | binärer Logarithmus (Logarithmus zur Basis 2) |
| log, log ₁₀ | dekadischer Logarithmus (Logarithmus zur Basis 10) |
| μ l | Mikroliter |
| μ M | mikromolar |
| <i>mar</i> -Locus | Multiple Antibiotic Resistance-Locus |
| mM | millimolar |
| MeV | Mega-Elektronvolt |

| | |
|-------------------|---|
| mg | Milligramm |
| MHK | Minimale Hemmkonzentration |
| MHK ₅₀ | minimale Konzentration eines Antibiotikums, die 50 % der untersuchten Isolate einer Spezies hemmt |
| MHK ₉₀ | minimale Konzentration eines Antibiotikums, die 90 % der untersuchten Isolate einer Spezies hemmt |
| min | Minute |
| Mio. | Millionen |
| ml | Milliliter |
| MMA | Mastitis-Metritis-Agalaktie |
| mRNA | Messenger-Ribonukleinsäure |
| n | Anzahl |
| NaCl | Kochsalz |
| nBLAST | Nukleotidsequenz-basiertes Basic Local Alignment Search Tool |
| NCCLS | National Committee for Clinical Laboratory Standards |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information |
| neg. | negativ |
| Nm | Nanometer |
| OIE | Office International des Epizooties |
| Otr | Oxytetracyclin-Resistenzprotein |
| p | Überschreitungswahrscheinlichkeit |
| PASME | Postantibiotischer Sub-MHK-Effekt |
| PBP | Penicillin-binding Protein |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| pH | negativer dekadischer Logarithmus der Hydroxonium-Ionenkonzentration (Maß für den Säuregrad einer Lösung) |
| pos. | positiv |
| P-Site | Peptidylstelle |
| R-Plasmid | Resistenzplasmid |
| R-Quadrat | Bestimmtheitsmaß |
| s | Sekunde |
| <i>S.</i> | <i>Salmonella enterica subsp. enterica</i> |
| s. o. | siehe oben |
| <i>spp.</i> | <i>species</i> |
| SPSS | Statistical Product and Service Solution |
| STABLAB | Statistisches Beratungslabor |
| t | Tonne |
| T _{1/2} | Halbwertszeit |

| | |
|------------|--------------------------------------|
| Tcr | Tetrazyklin-Resistenzprotein |
| Tet | Tetrazyklin-Resistenzprotein |
| <i>tet</i> | Tetrazyklin-Resistenzgen |
| TET | Gesamt-Tetrazyklin (Summenparameter) |
| Tn | Transposon |
| tRNA | Transfer-Ribonukleinsäure |
| UK | Großbritannien |
| USA | Vereinigte Staaten von Amerika |
| v. a. | vor allem |
| vgl. | vergleiche |
| vs. | versus |
| wdh. | wiederholen |
| WHO | Weltgesundheitsorganisation |
| z. B. | zum Beispiel |

J AnhangTabelle 38: Modalwerte der Minimalen Hemmkonzentrationen bei *E. nonfc-* Feldstämmen und DSM-Isolate

| Spezies | Stämme | Minimale Hemmkonzentration: Modalwert in mg/kg (Wertebereich der Feldstämmen) | | | | | | |
|--------------------------|-------------|---|------------------------|--------------------------------------|------------------------------|-------------------------------|---------------------|--------------------|
| | | Ampicillin | Amoxycillin | Doxycyclin | Imipenem | Erythromycin | Clindamycin | Vancomycin |
| <i>E. casseli-flavus</i> | DSM | 0,5 | 0,5 | ≤ 0,13 | ≤ 0,13 | 4 | 4 | 4 |
| | Feld* | 0,5 (≤ 0,13 – 2) | 0,5 (≤ 0,13 – 2) | ≤ 0,13 (≤ 0,13 – 0,25; 2 – 16) | 2 (≤ 0,13 – 4) | 4/8 (0,5; 2 – >8) | 8 (1; 4 – >8) | 4 (≤ 0,5 – 8) |
| <i>E. gallinarum</i> | DSM | 2 | 2 | 8 | 8 | 2 | 8 | 8 |
| | Feld | 1 (≤ 0,13 – 2) | 0,5 (≤ 0,13 – 4) | 4/8 (≤ 0,13 – 0,25; 2 – 16) | 2/4 (≤ 0,125 – 4; >16) | 0,5 (0,13 – 1; 4 – > 8) | >8 (1; 4 – >8) | 4 (≤ 0,5 – 8) |
| <i>E. avium</i> | DSM | 0,5 | 0,5 | 0,25 | 0,25 | 2 | 8 | 1 |
| | Feld | 1 (≤ 0,13 – 4) | 0,5 (≤ 0,13 – 4) | 2 (≤ 0,13 – 0,25; 2 – >16) | 8 (≤ 0,13 – 4; 16) | >8 (0,25 – >8) | >8 (1; 4 – >8) | 1 (≤ 0,5 – 8) |
| <i>E. hirae/durans</i> | DSM: hirae | 0,5 | 0,5 | ≤ 0,13 | 4 | 0,5 | 0,25 | 1 |
| | DSM: durans | 0,5 | 0,25 | ≤ 0,13 | 2 | 0,25 | 0,125 | 0,5 |
| | Feld** | ≤ 0,13 (≤ 0,13 – 8) | ≤ 0,13 (≤ 0,13 – 8) | ≤ 0,13 (≤ 0,13 – >16) | 4 (≤ 0,13 – >16) | 0,5 (≤ 0,06 – >8) | >8 (≤ 0,13 – >8) | 0,5 (≤ 0,5 – 4) |

* phänotypische Identifizierung ** hirae/ durans nicht unterschieden

Fortsetzung Tabelle 38: Modalwerte der Minimalen Hemmkonzentrationen bei *E. nonfc*-Feldstämmen und DSM-Isolate

| Spezies | Stämme | Minimale Hemmkonzentration: Modalwert in mg/kg (Wertebereich in mg/kg) | | | | | | |
|-----------------------------|-----------------------|--|------------------|--------------------|-------------------|-------------------------------|----------------------|------------------------------------|
| | | Chloramphenicol | Florfenicol | Fosfomycin | Linezolid | Quinupristin/ Dalfopristin | Nitrofurantoin | Teicoplanin |
| <i>E. casseliflavus</i> | DSM | 8 | ≤ 2 | 32 | 2 | 2 | ≤ 32 | ≤ 0,25 |
| | Feld* | 8 (4 – 16; 64) | 4 (≤ 2 – 8) | 64 (≤ 8 – >64) | 2 (1 – 4) | 2 (1 – 8) | ≤ 32 (32 – 64) | ≤ 0,25/0,5 (≤ 0,25 – 2) |
| <i>E. gallinarum</i> | DSM | 4 | ≤ 2 | 32 | 1 | 2 | ≤ 32 | 0,5 |
| | Feld | 8 (4 – 8) | ≤ 2 (≤ 2 – 4) | 32 (16 – >64) | 2 (1 – 4) | 2 (1 – 4) | ≤ 32 (≤ 32 – 128) | ≤ 0,25 (≤ 0,25 – 0,5) |
| <i>E. avium</i> | DSM | 4 | ≤ 2 | 8 | 2 | 2 | 64 | ≤ 0,25 |
| | Feld | 8 (4 – 16; 64) | 4 (≤ 2 – 4) | 64 (≤ 8 – 64) | 2 (0,5 – 4) | 4 (0,5 – 8) | 32 (32 – 128) | ≤ 0,25 (≤ 0,25 – 0,5) |
| <i>E. hirae/ durans</i> | DSM: <i>hirae</i> | 4 | 4 | 32 | 2 | 0,25 | 32 | ≤ 0,25 |
| | DSM: <i>durans</i> | 4 | ≤ 2 | 32 | 2 | 0,25 | 128 | ≤ 0,25 |
| | Feld** | 8 (≤ 2 – 8; 32) | ≤ 2 (≤ 2 – 4) | 32 (≤ 8 – > 64) | 1 (≤ 0,13 – 2) | 1 (≤ 0,25 – 8) | 64 (≤ 32 – >256) | ≤ 0,25 (≤ 0,25 – 0,5; 2 – 4) |

* phänotypische Identifizierung ** *hirae*/ *durans* nicht unterschieden

Fortsetzung Tabelle 38: Modalwerte der Minimalen Hemmkonzentrationen bei *E. nonfc*-Feldstämmen und DSM-Isolate

| Spezies | Stämme | Minimale Hemmkonzentration: Modalwert in mg/kg (Wertebereich in mg/kg) | | | | | |
|-------------------------|--------------------|--|--------------------|-------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| | | Tylosin | Mezlocillin | Moxifloxacin | Ciprofloxacin | Rifampicin | Enrofloxacin |
| <i>E. casseliflavus</i> | DSM | 4 | ≤ 2 | 1 | 4 | 1 | 2 |
| | Feld* | 2 (≤ 0,5 – >4) | ≤ 2 (≤ 2 – 4) | 0,5 (0,13 – 1) | 2 (≤ 0,25 – 4) | ≤ 0,5 (≤ 0,5 – >8) | 2 (0,13; 0,5 – 2) |
| <i>E. gallinarum</i> | DSM | 4 | 32 | 0,25 | 1 | 2 | 0,5 |
| | Feld | 2 (1 – >4) | ≤ 2 (≤ 2 – 4) | 0,25 (0,25 – 2) | 2 (0,5 – 4) | ≤ 0,5/ >8 (≤ 0,5; 4 – >8) | 1 (0,5 – 4) |
| <i>E. avium</i> | DSM | 4 | 2 | 1 | 2 | ≤ 0,5 | 2 |
| | Feld | 4/ >4 (≤ 0,5 – >4) | (2 – 16) | 0,5 (≤ 0,06 – 4) | 1 (≤ 0,25; 1 – 4; 64) | ≤ 0,5 (≤ 0,5; 2 – >8) | 1 (0,13; 0,5 – 4; >8) |
| <i>E. hirae/ durans</i> | DSM: <i>hirae</i> | 2 | 8 | 0,5 | 0,5 | 1 | 1 |
| | DSM: <i>durans</i> | 2 | 2 | 0,25 | 0,5 | ≤ 0,5 | 0,5 |
| | Feld** | 2 (≤ 0,5 – >4) | ≤ 2 (≤ 2 – 128) | 0,25 (≤ 0,06 – 2; 8) | 0,5 (≤ 0,25 – 8; 32) | ≤ 0,5 (≤ 0,5 – >8) | 0,5 (≤ 0,06 – 4; >8) |

* phänotypische Identifizierung ** *hirae/ durans* nicht unterschieden

Tabelle 39: Resistenzprofile hochmehrfach-resistenter Isolate aus Schweinegülle und Parallelresistenzen in weiteren Spezies aus derselben Gülle

| Gülle | Antibiotika-Befund (mg/kg) | Hochmehrfachresistentes Isolat | | n Resistenzen weiterer Isolate gegebenenfalls <i>Parallelresistenzen</i> zu Isolat Spalte 4 | | | |
|-------|---------------------------------------|----------------------------------|---|--|-----------------------------|----------------|--------------------|
| | | Spezies | n Resistenzen Profil | <i>E. coli</i> | <i>E. faecalis/ faecium</i> | Clostridien | Laktobazillen |
| 182 | CTC (0,19) SMT (0,58) SD (0,89) | <i>Salmonella</i> Typhimurium | 10 AMP MZL PIP AMC FLO <i>CMP</i> DOX SXT SPT STR | 2/ 3/ 4/ 7 AMP <i>CMP</i> DOX SXT SPT STR | 1 DOX | 2/ 2 | 1/ 0 DOX |
| 286 | Kein Nachweis | <i>Salmonella</i> Typhimurium | 10 AMP MZL PIP AMC FLO <i>CMP</i> DOX SXT SPT STR | 2/ 4 STR SPT DOX | 2/ 2/ 3 DOX SNH | 0/ 0 | 0 |
| 383 | Kein Nachweis | <i>Salmonella</i> Derby | 7 AMP AMC MZL PIP KAN NEO STR | 0/ 0/ 0/ 1 | 2/ 2/ 2/ 2 | 0/ 0/ 0 | 0/ 1 |
| 40 | CTC (0,11) SMT (0,16) | <i>E. coli</i> | 9 AMP AMC PIP CIP ENR <i>CMP</i> DOX SXT NEO | 1/ 5 AMP AMC <i>CMP</i> DOX | 1/ 4 DOX | 1/ 3 | 1 DOX |
| 41 | CTC (0,22) SMT (0,51) | <i>E. coli</i> | 12 AMP AMC PIP CIP ENR <i>CMP</i> DOX SXT AMK NEO SPT STR | 3/ 3 DOX SPT STR | 2/ 3/ 3 DOX | Nicht isoliert | 4/ 4 DOX |
| 161 | Kein Nachweis | <i>E. coli</i> | 9 AMP AMC PIP PIT CIP ENR DOX NEO SPT STR | 6/ 8/ 8 AMP AMC PIP DOX SPT STR | Nicht isoliert | 0 | 0/ 3 |

Antibiotika-Kürzel Spalte 4–8 vgl. Tabelle 4; Legende vgl. Tabellenende

Fortsetzung Tabelle 39: Resistenzprofile hochmehrfach-resistenter Isolate aus Schweinegülle und Parallelresistenzen in weiteren Spezies aus derselben Gülle

| Gülle | Antibiotika-Befund (mg/kg) | Hochmehrfachresistentes Isolat | | n Resistenzen weiterer Isolate gegebenenfalls <i>Parallelresistenzen</i> zu Isolat Spalte 4 | | | |
|-------|---|--|--|--|--|------------------------|---------------------------------------|
| | | Spezies | n Resistenzen Profil | <i>E. coli</i> | <i>E. faecalis/</i> <i>faecium</i> | Clostridien | Laktobazillen |
| 184 | CTC (0,69) SMT (0,22) ST (0,93) | <i>E. coli</i> | 11 AMP AMC CMP DOX SXT APR GEN NEO SPT STR TOB | 5/ 5/ 7 AMP AMC CMP DOX SXT SPT STR | 6* DOX SNH | 2* | 1 DOX |
| 220 | Kein Nachweis | <i>E. coli</i> | 9 AMP AMC PIP PIT CEC DOX SXT NEO STR | 0/ 0/ 1 STR | 3/ 4 DOX SNH | 1/ 2 | 0/ 3 |
| 391 | CTC (12,5) TC (0,76) SMT (1,0) SD (0,14) SMX (0,59) | <i>E.coli</i> | 10 AMP AMC PIP CEC ENR FLL CMP DOX SPT STR | 0/ 8 AMP CEC SPT STR | 2/ 2/ 4/ 4 DOX SNH CMP | Nicht isoliert | 4/ 5 DOX |
| | | <i>Lactobacillus</i> <i>spp.</i> | 5 DOX ERY TLS CLI QDA | 0/ 8/ 10 DOX | 2/ 2/ 4/ 4 DOX ERY TLS CLI | | 4 DOX ERY TLS CLI |
| 399 | CTC (1,3) TC (1,83) SMX (0,49) SD (0,78) | <i>E.coli</i> | 9 AMP AMC PIP FLL CMP DOX SXT NEO SPT STR | 3/ 7/ 8 AMP AMC PIP DOX NEO SPT STR | 1 DOX | 1/ 5 FLL CMP | 0/ 0 |
| | | <i>Clostridium</i> <i>perfringens</i> | 5 FLL CMP ERY CLI LIZ | 3/ 7/ 8/ 9 FLL CMP | 1 | 1 | 0/ 0 |

Antibiotika-Kürzel Spalte 4–8 vgl. Tabelle 4; Legende vgl. Tabellenende

Fortsetzung Tabelle 39: Resistenzprofile hochmehrfach-resistenter Isolate aus Schweinegülle und Parallelresistenzen in weiteren Spezies aus derselben Gülle

| Gülle | Antibiotika-Befund (mg/kg) | Hochmehrfachresistentes Isolat | | n Resistenzen weiterer Isolate gegebenenfalls <i>Parallelresistenzen</i> zu Isolat Spalte 4 | | | |
|-------|--------------------------------------|--------------------------------|--|--|---|-----------------|----------------------------|
| | | Spezies | n Resistenzen Profil | <i>E. coli</i> | <i>E. faecalis/ faecium</i> | Clostridien | Laktobazillen |
| 434 | CTC (0,33) SMT (0,12) | <i>E. coli</i> | 10 AMP PIP ENR CIP CMP DOX SXT NEO SPT STR | 1/ 2/ 3/ 4/ 5/ 7 AMP PIP SXT CMP DOX SPT | 4 DOX SNH | 1 ENR | 0/ 1 DOX |
| 56 | CTC (0,18) OTC (0,16) | <i>E. faecalis</i> (n=2) | 8 CIP ENR MOX DOX GNH SNH ERY TLS | 1/ 2/ 2/ 3 STR DOX | 5 DOX ERY | 0/ 0 | 0/ 1 ERY |
| 285 | CTC (3,13) | <i>E. faecalis</i> | 9 MZL IMP CIP ENR DOX SNH ERY TLS RAM | Nicht isoliert | Keine weiteren Isolate | 0/ 0 | 1/ 5 DOX ERY TLS |
| | | <i>Lactobacillus spp.</i> | 5 DOX ERY TLS CLI QDA | | 9 DOX ERY TLS | 0/ 0 | 1 DOX |
| 426 | CTC (7,7) TC (0,22) SMT (0,97) | <i>E. faecalis</i> | 9 CIP ENR MOX CMP DOX SNH ERY TLS RAM | Nicht isoliert | 5 DOX SNH ERY TLS RAM | Nicht isoliert | 1/ 5 DOX ERY TLS |
| | | <i>Lactobacillus spp.</i> | 5 IMP DOX ERY TLS CLI | | 9/ 5 DOX ERY TLS | | 1 DOX |

Antibiotika-Kürzel Spalte 4–8 vgl. Tabelle 4; Legende vgl. Tabellenende

Fortsetzung Tabelle 39: Resistenzprofile hochmehrfach-resistenter Isolate aus Schweinegülle und Parallelresistenzen in weiteren Spezies aus derselben Gülle

| Gülle | Antibiotika-Befund (mg/kg) | Hochmehrfachresistentes Isolat | | n Resistenzen weiterer Isolate gegebenenfalls <i>Parallelresistenzen</i> zu Isolat Spalte 4 | | | |
|-------|---|--------------------------------|---|--|--|---|-------------------------|
| | | Spezies | n Resistenzen Profil | <i>E. coli</i> | <i>E. faecalis/</i> <i>faecium</i> | Clostridien | Laktobazillen |
| 427 | CTC (0,29) | <i>E. faecalis</i> | 8 CIP ENR MOX CMP DOX SNH ERY TLS | 2/ 4/ 6 DOX STR | 1/ 2 DOX | 1/ 2/ 3 ERY TLS | 4 DOX ERY TLS |
| 452 | Kein Nachweis | <i>E. faecalis</i> | 8 CMP DOX GNH SNH ERY TLS RAM LIZ | Nicht isoliert | 1/ 3 DOX ERY RAM | 0/ 1/ 1 | 0/ 0 |
| 86 | CTC (3,29) TC (15,37) OTC (0,1) DOX (0,14) | <i>E. faecium</i> | 9 CIP ENR MOX DOX SNH ERY TLS CLI RAM | 2 STR | 3 ERY CLI RAM | 0/ 0/ 3 ENR MOX CLI | 1/ 1 DOX |
| 89 | CTC (0,18) TC (0,71) SMT (0,06) SD (0,39) | <i>E. faecium</i> | 13 AMP AMC MZL IMP CIP ENR DOX SNH ERY TLS CLI QDA RAM | Nicht isoliert | 3/ 4 DOX SNH ERY TLS RAM | Nicht isoliert | 1/ 1 DOX |
| 108 | CTC (0,19) TC (1,92) SMT (1,73) | <i>E. faecium</i> | 8 MZL IMP DOX SNH ERY TLS CLI QDA | 0/ 3/ 4/ 5 DOX STR | 2/ 4 DOX ERY CLI | 0/ 1/ 2 ERY | 1/ 1 DOX |

Antibiotika-Kürzel Spalte 4–8 vgl. Tabelle 4; Legende vgl. Tabellenende

Fortsetzung Tabelle 39: Resistenzprofile hochmehrfach-resistenter Isolate aus Schweinegülle und Parallelresistenzen in weiteren Spezies aus derselben Gülle

| Gülle | Antibiotika-Befund (mg/kg) | Hochmehrfachresistentes Isolat | | n Resistenzen weiterer Isolate gegebenenfalls <i>Parallelresistenzen</i> zu Isolat Spalte 4 | | | |
|-------|--|--------------------------------|--|--|---|---------------------------|--|
| | | Spezies | n Resistenzen Profil | <i>E. coli</i> | <i>E. faecalis/ faecium</i> | Clostridien | Laktobazillen |
| 174 | CTC (0,43) TC (4,6) OTC (0,11) SMT (1,47) | <i>E. faecium</i> | 10 MZL IMP CIP ENR MOX DOX SNH ERY TLS CLI | 2/ 5/ 5/ 6** DOX STR | 2/ 4/ 5** DOX SNH ERY TLS | Nicht isoliert | 1/ 4 DOX SNH ERY TLS |
| 225 | Kein Nachweis | <i>E. faecium</i> | 12 AMP AMC MZL IMP CIP ENR DOX SNH ERY TLS CLI RAM | Nicht isoliert | 2/ 3/ 4 SNH ERY CLI RAM | 1/ 4 CLI ERY | 0/ 0 |
| 250 | TC (3,02) | <i>E. faecium</i> | 8 IMP ENR DOX SNH ERY TLS CLI RAM | Nicht isoliert | 7 IMP ENR DOX SNH ERY TLS RAM | 1/ 1 ERY | 1 DOX |
| 268 | CTC (0,4) TC (0,47) SMT (0,18) | <i>E. faecium</i> | 8 IMP MZL CIP ENR MOX SNH CLI RAM | 4/ 6/ 6 STR | Keine weiteren Isolate | 0/ 0/ 2 CIP ENR | 1/ 1 |
| 378 | CTC (0,119) | <i>E. faecium</i> (n=3) | 8 CMP DOX GNH/ SNH ERY TLS CLI QDA RAM | 0/ 0/ 1/ 2 STR | Keine weiteren Isolate | 0/ 1/ 1 | 0/ 0 |

Antibiotika-Kürzel Spalte 4–8 vgl. Tabelle 4; Legende vgl. Tabellenende

Fortsetzung Tabelle 39: Resistenzprofile hochmehrfach-resistenter Isolate aus Schweinegülle und Parallelresistenzen in weiteren Spezies aus derselben Gülle

| Gülle | Antibiotika-Befund (mg/kg) | Hochmehrfachresistentes Isolat | | n Resistenzen weiterer Isolate gegebenenfalls <i>Parallelresistenzen</i> zu Isolat Spalte 4 | | | |
|-------|--|-------------------------------------|---|--|--|---------------------------------------|---------------------------------------|
| | | Spezies | n Resistenzen Profil | <i>E. coli</i> | <i>E. faecalis/</i> <i>faecium</i> | Clostridien | Laktobazillen |
| 117 | TC (1,46) OTC (0,18) SMT (0,61) SDM (0,19) | <i>Lactobacillus</i> <i>spp.</i> | 6 AMP AMC DOX ERY TLS CLI | 3/ 6**/ 6**/ 7** AMP AMC DOX | 6**/7** DOX ERY TLS | 2/ 3 ERY TLS CLI | 1 DOX |
| 372 | CTC (0,11) TC (0,28) | <i>Lactobacillus</i> <i>spp.</i> | 5 DOX ERY TLS CLI QDA | Nicht isoliert | Nicht isoliert | 2/ 3 | 0 |
| 396 | CTC (18,33) TC (0,91) OTC (0,11) SMT (0,69) | <i>Lactobacillus</i> <i>spp.</i> | 5 CMP DOX ERY TLS CLI | 2/ 7 CMP DOX | 5/ 5 CMP DOX ERY TLS | 0/ 0/ 0 | 4 DOX CLI ERY TLS |
| 420 | Kein Nachweis | <i>Lactobacillus</i> <i>spp.</i> | 5 CMP DOX ERY TLS CLI | 0/ 0/ 1/ 1 DOX | 1 DOX | 2/ 3/ 4 ERY CLI | 0 |
| 481 | CTC (4,19) SMT (0,07) | <i>Lactobacillus</i> <i>spp.</i> | 5 DOX ERY TLS CLI NFT | Nicht isoliert | 2/ 2/ 2 DOX | 0/ 1 ERY | 1 DOX |
| 59 | Kein Nachweis | <i>Clostridium</i> <i>spp.</i> | 5 ERY TLS CLI QDA FOS | 1/ 2/ 2/ 3 | Nicht isoliert | 4 ERY TLS CLI QDA | 0 |

Antibiotika-Kürzel Spalte 4–8 vgl. Tabelle 4; Legende vgl. Tabellenende

Fortsetzung Tabelle 39: Resistenzprofile hochmehrfach-resistenter Isolate aus Schweinegülle und Parallelresistenzen in weiteren Spezies aus derselben Gülle

| Gülle | Antibiotika-Befund (mg/kg) | Hochmehrfachresistentes Isolat | | n Resistenzen weiterer Isolate gegebenenfalls <i>Parallelresistenzen</i> zu Isolat Spalte 4 | | | |
|-------|-------------------------------------|---------------------------------|---|--|-------------------------------|--------------------------------|--------------------|
| | | Spezies | n Resistenzen Profil | <i>E. coli</i> | <i>E. faecalis/ faecium</i> | Clostridien | Laktobazillen |
| 178 | SMT (0,08) | <i>Clostridium perfringens.</i> | 5 OXA ERY TLS CLI FOS | 2/ 5/ 5/ 5 | Nicht isoliert | 1/ 3 ERY TLS CLI FOS | Nicht isoliert |
| 222 | Kein Nachweis | <i>Clostridium perfringens</i> | 5 OXA ERY TLS CLI FOS | Nicht isoliert | 4 ERY | 0/ 2 CLI OXA | 0 |
| 404 | CTC (0,1) TC (0,2) SMT (0,11) | <i>Clostridium spp.</i> | 5 OXA ERY TLS CLI FOS | 1/ 2/ 2/ 4 | 2/ 2 | 1/ 1 FOS | 1/ 1 |
| 413 | TC (5,32) | <i>unklar***</i> | 7 AMP AMC OXA PEN CEZ CXM MTR | 3/ 6/ 7 AMP AMC | 2/ 2/ 3 | 0 | 3/ 3 |
| 417 | TC (0,67) | <i>Clostridium fallax</i> | 6 OXA PEN CXM CMP TLS FOS | 0/ 0/ 0 | 1/ 2/ 5/ 6* CMP TLS | 1/ 4* FOS | 0/ 1 |
| 444 | TC (3,33) | <i>Clostridium spp.</i> | 5 DOX ERY TLS CLI FOS | 0/ 2/ 5 DOX | 1/ 2/ 7 DOX ERY TLS | 0/ 1 FOS | 1/ 1 DOX |

Kürzel Spalte 2: CTC Chlortetrazyklin; DOX Doxycyclin; OTC Oxytetrazyklin; SD Sulfadiazin; SDM Sulfadimethaxin;
SMT Sulfamethazin; SMX Sulfamethoxazol; ST Sulfathiazol; Antibiotika-Kürzel Spalte 4–8 vgl. Tabelle 4

* Fluorquinolon-Parallelresistenz
** Chloramphenicol-Parallelresistenz } mit weiteren Isolaten ≠ Spalte 4

*** Identitätsermittlung im RAPID ANR negativ, Ähnlichkeit zu *Capnocytophaga spp.*

K Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|------|
| Abbildung 1: Schematische Darstellung der Translationshemmung durch Tetrazyklin..... | 11 - |
| Abbildung 2: Regulation der Tetrazyklin-Efflux-codierenden Gene am Beispiel <i>tet(B)</i> | 13 - |
| Abbildung 3: Normalverteilung der MHK-Werte Cefotaxim-empfindlicher <i>E. coli</i> gegenüber Cefotaxim | 14 - |
| Abbildung 4: „Klinische“ und „relative“ Resistenz | 15 - |
| Abbildung 5: Überblick über das Untersuchungsprogramm | 25 - |
| Abbildung 6: Aufteilung der Gülleproben aus Schweinehaltungen nach Betriebsart und –größe | 30 - |
| Abbildung 7: Eichkurve zur Bestimmung der Inokulumkonzentration bei <i>Enterococcus spp.</i> | 40 - |
| Abbildung 8: Ablauf der DNA-Extraktion mittels PowerSoil™ DNA Isolation Kits..... | 47 - |
| Abbildung 9: Mittelwerte und Standardabweichungen verschiedener Keimgruppen in Gülle aus Schweinehaltungen..... | 53 - |
| Abbildung 10: <i>E. faecalis</i> DSM 2570: Vergleich der MHK-Werte in Müller-Hinton- und Hämophilus-Test-Medium..... | 56 - |
| Abbildung 11: Differenz der MHK-Mittelwerte (\log_2) von <i>E. coli</i> -Isolaten aus Schweinegülle kleiner und großer Betriebe..... | 60 - |
| Abbildung 12: Differenz der MHK-Mittelwerte (\log_2) von im Herbst bzw. Frühjahr aus Schweinegülle gewonnenen <i>E. faecalis</i> -Isolaten..... | 64 - |
| Abbildung 13: Einfluss der Bestrahlungsdosis auf die Anzahl amplifizierbarer <i>tet(M)</i> -Kopien in Gülle..... | 81 - |
| Abbildung 14: PCR-Amplifikation von <i>tet(M)</i> : Standard und dotierte Gülle | 82 - |
| Abbildung 15: Schmelzkurven-Analyse der Amplifikate aus Abbildung 14 | 83 - |
| Abbildung 16: <i>tet(O)</i> -Gehalte in Schweine-Faeces während und nach Chlortetrazyklin-Fütterung | 85 - |
| Abbildung 17: <i>tet(M)</i> Gehalte in Faeces von Schweinen eines Stallgebäudes mit Chlortetrazyklin-haltiger und –freier Fütterung | 86 - |
| Abbildung 18: <i>tet(M)</i> -Gehalte in Abhängigkeit vom Beprobungszeitpunkt | 87 - |

| | |
|--|---------|
| Abbildung 19: <i>tet(O)</i> -Gehalte in Gülle in Abhängigkeit vom Beprobungszeitraum..... | - 88 - |
| Abbildung 20: <i>tet(O)</i> -Gehalte in Gülle in Abhängigkeit vom Betriebstyp | - 89 - |
| Abbildung 21: Abbau von <i>tet(M)</i> im Grünland | - 91 - |
| Abbildung 22: Vergleich der prozentualen Resistenzraten von <i>E. coli</i> -Isolaten aus Gülle, Mastschweinen (DANMAP) und aus Humankliniken (GENARS)..... | - 92 - |
| Abbildung 23: Vergleich der prozentualen Resistenzraten von <i>E. faecalis</i> -Isolaten aus Gülle, Mastschweinen (DANMAP) und aus Humankliniken (GENARS)..... | - 95 - |
| Abbildung 24: Vergleich der prozentualen Resistenzraten von <i>E. faecium</i> -Isolaten aus Gülle, Mastschweinen (DANMAP) und aus Humankliniken (GENARS)..... | - 98 - |
| Abbildung 25: Resistenzstatus der <i>E. coli</i> -Isolate (\emptyset n = 3/Gülle) aus Gülleproben mit unterschiedlichen Tetrazyklin-Gehalten gegenüber Doxycyclin..... | - 111 - |
| Abbildung 26: Resistenzstatus der <i>E. faecium</i> - Isolate aus Gülleproben mit unterschiedlichen Tetrazyklin-Gehalten gegenüber Doxycyclin..... | - 112 - |
| Abbildung 27: Mehrfachresistenz bei Bakterienisolaten aus Schweinegülle mit unterschiedlichem Antibiotika-Status | - 116 - |
| Abbildung 28: Vergleich der durchschnittlichen Resistenz der isolierten Bakterienpopulation aus Gülle mit hochmehrfach-resistenten Isolaten und positivem bzw. negativem Antibiotikabefund | - 119 - |
| Abbildung 29: <i>tet(M)</i> -Gehalte in Schweinegülle | - 127 - |
| Abbildung 30: Aufgliederung der <i>tet(M)</i> -Gehalte in Gülleproben nach Gesamt-Tetrazyklin-Gehalt | - 128 - |
| Abbildung 31: Korrelation zwischen Gesamt-Tetrazyklin-Gehalt und dem logarithmischen <i>tet(M)</i> -Gehalt in der Gülle | - 129 - |
| Abbildung 32: Korrelation zwischen aerober Gesamtkeimzahl und Gesamt-Tetrazyklin-Gehalt in den Gülleproben..... | - 130 - |
| Abbildung 33: <i>tet(M)</i> -Konzentration pro KBE in Tetrazyklin-haltigen und – „freien“ Gülleproben | - 130 - |
| Abbildung 34: <i>tet(O)</i> -Gehalte in Gülleproben..... | - 131 - |
| Abbildung 35: Aufgliederung der <i>tet(O)</i> -Gehalte in Gülleproben nach Gesamt-Tetrazyklin-Gehalt..... | - 132 - |
| Abbildung 36: Korrelation zwischen Gesamt-Tetrazyklin-Gehalt und dem logarithmischen <i>tet(O)</i> -Gehalt in den Gülleproben | - 132 - |

L Tabellenverzeichnis

| | | |
|-------------|---|--------|
| Tabelle 1: | Resistenzmechanismen gegen verschiedene antibiotische Wirkstoffe | - 8 - |
| Tabelle 2: | Veterinärmedizinischer Einsatz von Antibiotika in Europa | - 23 - |
| Tabelle 3: | Kriterien zur Einordnung der Betriebstypen in zwei Größenklassen | - 29 - |
| Tabelle 4: | Untersuchte Antibiotika mit Konzentrationsbereichen und Breakpoints . | - 35 - |
| Tabelle 5: | Zur Keimzahlbestimmung verwendete Nährmedien | - 35 - |
| Tabelle 6: | Prüfschema zur orientierenden Differenzierung in Gülle vorkommender Bakterien..... | - 36 - |
| Tabelle 7: | Stoffwechselprofile von <i>Enterococcus faecalis</i> und <i>E. faecium</i> sowie von weiteren <i>E. spp.</i> | - 37 - |
| Tabelle 8: | Aufgliederung der molekularbiologisch untersuchten Gülle-Proben | - 44 - |
| Tabelle 9: | ⁶⁰ Co Bestrahlung von Gülle-Aliquots..... | - 45 - |
| Tabelle 10: | Zusammensetzung des PowerSoil™ DNA Isolation Kits | - 46 - |
| Tabelle 11: | Primer, Annealing-Temperatur und Amplicongrößen: Amplifikation von <i>tet(B)</i> , <i>tet(M)</i> und <i>tet(O)</i> | - 48 - |
| Tabelle 12: | Zusammensetzung des PCR-Gesamtmastermix | - 48 - |
| Tabelle 13: | LightCycler®-Protokoll | - 49 - |
| Tabelle 14: | Systematische Zugehörigkeit von Bakterienisolaten aus Gülle | - 54 - |
| Tabelle 15: | Serotyp und Lysotyp aus Schweinegülle isolierter <i>Salmonella spp.</i> | - 54 - |
| Tabelle 16: | Resistenzprofile bei <i>Salmonella spp.</i> aus Schweinegülle | - 57 - |
| Tabelle 17: | Prozentuale Verteilung der MHK-Werte von <i>E. coli</i> -Isolaten (n = 613) aus Schweinegülle | - 58 - |
| Tabelle 18: | Prozentuale Verteilung der Mehrfachresistenz sowie phänotypische Resistenzprofile in <i>E. coli</i> -Isolaten (n = 613) aus Schweinegülle | - 61 - |
| Tabelle 19: | Resistenzprofile hochmehrfach-resistenter <i>E. coli</i> aus Schweinegülle | - 62 - |
| Tabelle 20: | Prozentuale Verteilung der MHK-Werte von <i>E. faecalis</i> -Isolaten (n = 387) aus Schweinegülle..... | - 63 - |
| Tabelle 21: | Prozentuale Verteilung der Mehrfachresistenz sowie phänotypische Resistenzprofile von <i>E. faecalis</i> -Isolaten (n = 387) aus Schweinegülle .. | - 66 - |

| | | |
|-------------|--|---------|
| Tabelle 22: | Resistenzprofile hochmehrfach-resistenter <i>E. faecalis</i> -Isolate aus Schweinegülle | - 66 - |
| Tabelle 23: | Prozentuale Verteilung der MHK-Werte von <i>E. faecium</i> -Isolaten (n = 183) aus Schweinegülle..... | - 67 - |
| Tabelle 24: | Prozentuale Verteilung der Mehrfachresistenz sowie phänotypische Resistenzprofile von <i>E. faecium</i> -Isolaten (n = 183) aus Schweinegülle .. | - 69 - |
| Tabelle 25: | Resistenzprofile hochmehrfach-resistenter <i>E. faecium</i> -Isolate aus Schweinegülle (n Resistenzen = 8–13) | - 70 - |
| Tabelle 26: | Prozentuale Verteilung der MHK-Werte von Isolaten aus verschiedenen <i>E. nonfc</i> -Gruppen..... | - 71 - |
| Tabelle 27: | Prozentuale Verteilung der MHK-Werte von Clostridien-Isolaten (n = 536) aus Schweinegülle..... | - 73 - |
| Tabelle 28: | Prozentuale Verteilung der Mehrfachresistenz sowie phänotypische Resistenzprofile von <i>Clostridium spp.</i> -Isolaten (n = 536) aus Schweinegülle | - 74 - |
| Tabelle 29: | Resistenzprofile hochmehrfach-resistenter <i>Clostridium spp.</i> -Isolate aus Schweinegülle | - 75 - |
| Tabelle 30: | Prozentuale Verteilung der MHK-Werte von Laktobazillen (n = 552) isoliert aus Schweinegülle..... | - 76 - |
| Tabelle 31: | Prozentuale Verteilung der Mehrfachresistenz sowie phänotypische Resistenzprofile von Laktobazillen (n = 552) aus Schweinegülle..... | - 77 - |
| Tabelle 32: | Resistenzprofile hochmehrfach-resistenter Laktobazillen aus Schweinegülle | - 78 - |
| Tabelle 33: | Gehalt ausgewählter Tetrazyklin-Resistenzgene in Schweinegülle von Chlortetrazyklin-gefütterten Schweinen und Kontrolltieren | - 80 - |
| Tabelle 34: | Abgleich der extern ermittelten Gensequenzen präsumptiver <i>tet(M)</i> -Amplifikate aus Schweinegülle mit der Gendatenbank „NCBI-Nucleotide“ (nBLAST) | - 80 - |
| Tabelle 35: | Wiederfindungsraten [% (\pm s)] für <i>tet(M)</i> -Gene aus <i>Bacillus</i> R89 in Gülle- und Bodenproben (3 Wiederholungen) | - 84 - |
| Tabelle 36: | <i>tet</i> -Gen-Gehalte in Bodenproben (Oberboden 1-10 cm) vor und nach Behandlung mit Chlortetrazyklin-haltiger Gülle | - 90 - |
| Tabelle 37 | Vorkommen von Tetrazyklin in Schweinegülle: Einteilung der Befunde nach Wirkklassen entsprechend DIN (HARMS, 2006) | - 109 - |
| Tabelle 38: | Modalwerte der Minimalen Hemmkonzentrationen bei <i>E. nonfc</i> -Feldstämmen und DSM-Isolate | - 173 - |
| Tabelle 39: | Resistenzprofile hochmehrfach-resistenter Isolate aus Schweinegülle und Parallelresistenzen in weiteren Spezies aus derselben Gülle..... | - 176 - |

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

| | |
|---------------|---|
| Name | Christina Susanne Hölzel, geb. Burghard |
| Anschrift | Schwanthalerstr. 19 80336 München |
| Geburtsdatum | 02.07.1974 in Augsburg |
| Eltern | Gisela Burghard, geb. Siedschlag, Diplompsychologin Augustin Burghard, Notar |
| Familienstand | verheiratet seit 1.7.2006 mit Marco Hölzel, Architekt |

HOCHSCHULSTUDIUM

| | |
|-----------|---|
| 1994–1995 | Sonderschulpädagogik (LMU München) |
| 1995–2001 | Veterinärmedizin (LMU München) |
| 2001 | Staatsexamen mit Gesamtnote „gut“ (1,88); Erlangung der Approbation als Tierärztin |

BERUFLICHE TÄTIGKEITEN

| | |
|-------------------|---|
| 05/2002 – 10/2004 | Wissenschaftliche Angestellte (BAT 2a½) am Lehrstuhl für Tierhygiene, TU München, Freising; Projekt „Fachliche Überprüfung und Neubewertung von Wirtschaftsdüngern“ in Kooperation mit der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft |
| seit 10/2004 | Wissenschaftliche Angestellte (BAT 2a) ebendort; Projekt „Bayernweite Dokumentation von Antibiotikaresistenzen“ in Kooperation mit dem Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit |

SCHULBILDUNG

| | |
|-------------------|--|
| 09/1980 – 12/1980 | Grundschule Augsburg |
| 12/1980 – 07/1984 | Grundschule Neunburg vorm Wald |
| 09/1984 – 12/1984 | Gymnasium Nittenau i. d. Obpf. |
| 12/1984 – 07/1993 | Johannes-Nepomuk-Gymnasium der Benediktiner in Rohr i. Ndb. |

WEITERE KENNTNISSE UND INTERESSEN

| | |
|---------------|---|
| Fremdsprachen | Englisch, Spanisch, Latein, Französisch |
| EDV | Microsoft Office, WHO-Net |

ICH DANKE...

...dem Bayerischen Staatsministerium für Landwirtschaft und Forsten für die Projektfinanzierung

...Prof. Dr. Johann Bauer für die exzellente, fördernde und ungemein motivierende Betreuung

...Prof. Dr. Michael Erhard für seine herzliche Bereitschaft, diese Arbeit als Inaugural-Dissertation anzunehmen

...der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft für die gute Zusammenarbeit im übergeordneten Gemeinschaftsprojekt „Fachliche Überprüfung und Neubewertung von Wirtschaftsdüngern“

...Dr. Richard Henkelmann, Leitender Akademischer Direktor am Institut für Radiochemie, für die ebenso freundliche wie interessante Einführung in die Kobaltbestrahlungsanlage und die Ausführung der Bestrahlung

...Anne Kunz und Prof. Dr. Helmut Küchenhoff, Statistisches Beratungslabor STABLAB, für die gründliche, interessierte und spannende gemeinsame Erarbeitung der geeigneten statistischen Methodik

...allen ehemaligen und derzeitigen Angestellten des Lehrstuhls, insbesondere auch den Auszubildenden Michaela Bauer und Katharina Rank, für ihre hervorragende Arbeit

...Katrin Harms für die schöne Zusammenarbeit und den unkomplizierten Austausch von Informationen im Gemeinschaftsprojekt

...Karin Schwaiger für die unermüdliche Bereitschaft, über Formatierungsprobleme hinwegzuhelfen

...Eva-Maria Schmied für das stete Spenden von Kuchen und Trost und beiden gemeinsam für die freundschaftliche, entspannte und heitere Büroatmosphäre

...Javier Jimenez für das Ersinnen von Softwaretools und deren erheiternde Namensgebung

...Konstanze Knies, Sandra Heyer und Roman Kischel für die formale Korrektur dieser Arbeit

...meinen Großeltern Dr. Georg und Hedwig Burghard und meiner Großtante Ruth Siedschlag, nicht zuletzt für die finanzielle Unterstützung zu Studienzeiten

...meiner Oma Irmgard Siedschlag für eine behütete Kindheit und noch so viel mehr

...meinen Eltern Gisela und Augustin Burghard für ihre liebevolle Unterstützung meiner Lebenswege

...Marco Hölzel – für alles