

# **“Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) bei Patienten und in der aquatischen Umwelt“**

DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

Am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Claudia Böhme

Mainz, 2011

Die Untersuchungen der vorliegenden Dissertation wurden von Mai 2004 bis Juni 2010 in der Abteilung für Hygiene und Umweltmedizin der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt.

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 30.08.2011

## Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
ATCC	American Type Culture Collection, Rockeville, USA
Caso-Agar	Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar
CC17	engl. Clonal Complex 17, klonaler Komplex 17
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, USA
cm	Zentimeter
dH <sub>2</sub> O	deionisiertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTG	Deutsche Transport-Genossenschaft Binnenschifffahrt eG, Duisburg, Deutschland
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland
EARSS	The European Antimicrobial Resistance Surveillance System
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm, Schweden
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
engl.	englisch
E-Test	Epsilonometertertest
g	Gramm
h	Stunde
Hz	Hertz
J	Joule
kb	Kilobasen
KBE	Koloniebildende Einheit
l	Liter
M	Molar (mol/l)
mA	Milliampere
Mbar	Millibar
mg	Milligramm
MHK	minimale Hemmkonzentration

## Abkürzungsverzeichnis

---

min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
mS	Milli-Siemens
NCBI	National Center for Biotechnology Information, Rockville Pike, USA
PBS	Phosphate Buffered Saline
PEF	engl. pulsed electric field, gepulstes elektrisches Feld
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
rpm	engl. rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
SARI	engl. Surveillance of antibiotic use and resistance in Intensive Care Units, Kontrolle der Antibiotika-Anwendung und der bakteriellen Resistenzen auf Intensivstationen, Freiburg, Deutschland
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TSA	Trypton Soya Agar
U	engl. Units, Einheiten
u. a.	unter anderem
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean
V	Volt
VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken
VREf	Vancomycin-resistente <i>Enterococcus faecium</i>
°C	Grad Celsius
%	Prozent
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>I</b>
<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>III</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>2 GRUNDLAGEN</b> .....	<b>3</b>
2.1 Enterokokken .....	3
2.1.1 Eigenschaften .....	3
2.1.2 Taxonomie .....	4
2.1.3 Antibiotikaresistenz.....	5
2.1.4 Vorkommen von Enterokokken und VRE .....	13
2.2 Diversität und Genotypisierung bei Enterokokken und VRE .....	19
2.3 Gepulste elektrische Felder (engl. pulsed electric fields, PEF) .....	22
<b>3 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>26</b>
3.1 Material .....	26
3.1.1 Geräte und Hilfsmittel .....	26
3.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	27
3.1.3 Chemikalien .....	28
3.1.4 Referenzstämme und getestete Isolate .....	36
3.1.5 Die Elektroimpulsanlage .....	38
3.2 Methoden .....	43
3.2.1 Isolierung und Charakterisierung von VRE aus Patienten- und Umweltproben	43
3.2.2 Untersuchungen zur Keimzahlreduktion von VRE durch Elektroimpulsbehandlung in Verbindung mit thermischem Einfluss .....	56
<b>4 ERGEBNISSE</b> .....	<b>62</b>
4.1 Isolierung und Charakterisierung von VRE aus Patienten- und Umweltproben .....	62
4.1.1 Vorkommen von VRE in Umweltwasserproben.....	62
4.1.2 Keimzahlen von Enterokokken und VRE im Umfeld der Kläranlage .....	65
4.1.3 Genotypisierung durch Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) .....	67
4.1.4 Isolierte Vancomycin-resistente <i>Enterococcus faecium</i> (VREf) von Patienten und aus Umweltwasserproben .....	70
4.2 Untersuchungen zur Keimzahlreduktion von VRE durch Elektroimpulsbehandlung in Verbindung mit thermischem Einfluss .....	86
4.2.1 Keimzahlreduktion durch rein thermische Behandlung .....	86

4.2.2	Wirkungsweise des elektrischen Feldes .....	89
4.2.3	Keimzahlreduktion durch Elektroimpulsbehandlung in Verbindung mit thermischem Einfluss.....	93
4.2.4	Einfluss des Nährbodens auf die Keimzahlreduktion .....	99
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>107</b>
5.1	Isolierung und Charakterisierung von VRE aus Patienten- und Umweltproben .....	107
5.1.1	Vorkommen von VRE in Umweltwasserproben.....	108
5.1.2	Genotypisierung durch Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE).....	111
5.1.3	Fazit.....	119
5.2	Untersuchungen zur Keimzahlreduktion von VRE durch Elektroimpulsbehandlung in Verbindung mit Temperatur.....	120
5.2.1	Beeinflussende Größen des Elektroimpulsverfahrens.....	121
5.2.2	Keimzahlreduktion durch rein thermische Behandlung .....	122
5.2.3	Wirkungsweise des elektrischen Feldes.....	125
5.2.4	Keimzahlreduktion durch Elektroimpulsbehandlung in Verbindung mit thermischem Einfluss.....	128
5.2.5	Fazit.....	131
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>132</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>134</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>155</b>
8.1	Verwandtschaftsanalyse der VREf.....	155
8.2	Daten der Elektroimpulsversuche .....	156
8.2.1	VRE 1 .....	156
8.2.2	VRE 2 .....	159
8.2.3	VRE 7 .....	161
8.2.4	Stamm ATCC 6057.....	162
<b>9</b>	<b>VORVERÖFFENTLICHUNG DER ERGEBNISSE.....</b>	<b>V</b>
<b>10</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>VI</b>
<b>11</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>VII</b>

## 1 Einleitung

Das Glykopeptid-Antibiotikum Vancomycin wird oft zur Bekämpfung von antibiotikaresistenten, grampositiven Bakterien (wie z. B. resistente Enterokokken oder Methicillin-resistente Staphylokokken (MRSA)) eingesetzt, insbesondere wenn eine Unverträglichkeit gegenüber Penicillin vorliegt [91, 111, 151]. Wenn Enterokokken allerdings eine Resistenz gegen Vancomycin ausbilden, wie in den letzten Jahren zunehmend geschehen, werden die Therapiemöglichkeiten im medizinischen Umfeld in Bezug auf die Bekämpfung von nosokomialen Infektionen eingeschränkt. Das verbreitete Vorkommen dieser Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) bei Patienten und im Krankenhausumfeld wurde bereits bestätigt [4, 51, 91, 198, 201].

Enterokokken und VRE sind sowohl im Darm des Menschen nachweisbar, als auch in Abwasser [28, 73, 103, 131, 151, 192, 207]. Durch das Auftreten von VRE in der aquatischen Umwelt (Abwasser und Oberflächenwasser) besteht ein potenzielles Gesundheitsrisiko für den Menschen, denn VRE könnten über die Nahrungskette (z. B. über Klärschlamm, der als Dünger auf Agrarland ausgebracht wird) weiter verbreitet werden.

Wie sich VRE in der aquatischen Umwelt verbreiten bzw. ob VRE aus der aquatischen Umwelt genetische Verwandtschaften zu VRE von Patienten aufweisen, ist bis heute noch nicht näher untersucht. Wenige Studien zeigen lediglich Momentaufnahmen der resistenten Enterokokken-Population, da die Situation in der Umwelt nur stichprobenartig untersucht wurde.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine umfassende Untersuchung von Vancomycin-resistenten *Enterococcus faecium* (VREf) sowohl von Patienten als auch aus verschiedenen Umweltproben (Abwasser und Oberflächenwasser der Flüsse Rhein und Main) zu liefern. Die Erfassung des VREf-Vorkommens sollte über einen möglichst langen Zeitraum erfolgen, um Aussagen über den zeitlichen Verlauf der VREf-Situation zu ermöglichen. Da zu Beginn dieser Dissertation zwei durch VREf verursachte Ausbrüche unter Patienten auf den Hämatologiestationen auftraten (Ende 2004 und Anfang 2005), sollte außerdem die VRE-Situation zu Zeiten eines Ausbruchs mit anschließenden ausbruchsfreien Zeiten verglichen werden.

Da das Vorkommen von VRE in Abwasser und Oberflächenwasser je nach Region oder Land schwanken kann [28, 73, 131, 151], sollte die VRE-Situation in der aquatischen Umwelt von Mainz (Abwasser der Universitätsmedizin, Abwasser der Kläranlage Mainz, geklärtes Abwasser aus dem Auslauf und dem Vorfluter der Kläranlage, sowie Oberflächenwasser der Flüsse Rein und Main) qualitativ und quantitativ untersucht werden. Mit VREf aus den Umweltproben sollte, zusammen mit VREf von Patienten, eine Genotypisierung mit der Methode der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) durchgeführt werden, um die VREf bezüglich ihrer Resistenzen und genetischen Eigenschaften charakterisieren zu können und Aufschluss über die genetische Diversität (Vielfältigkeit) der VREf zu bekommen. Mit Hilfe einer Verwandtschaftsanalyse sollten außerdem genetische Gemeinsamkeiten zwischen den VREf verschiedener Herkunftsorte (Patienten, Abwasser und Oberflächenwasser) untersucht werden.

Das Vorkommen von resistenten Bakterien in der Umwelt, insbesondere in der aquatischen Umwelt, könnte durch Abwässer von potenziellen Quellen der resistenten Organismen oder Antibiotika (z. B. Abwasser aus Krankenhäusern) gefördert werden. Methoden zur wirksamen Desinfektion von solch belasteten Abwässern gewinnen daher in diesem Zusammenhang immer mehr an Bedeutung.

In einem Projekt der Abteilung für Hygiene und Umweltmedizin, des Forschungszentrums Karlsruhe und der Firma Eisenmann GmbH wurde eine Pilotanlage auf Basis der Elektroimpulstechnologie entwickelt, die u. a. in dieser Dissertation auf ihre Effizienz in Bezug auf die nebenproduktfreie Abtötung von klinisch relevanten VREf im Abwasser untersucht werden sollte. Durch das gepulste elektrische Feld in der Anlage sollten in der Bakterienmembran Poren erzeugt werden (Elektroporation), die zum Zelltod führen.

In den eigenen Untersuchungen sollte Abwasser der Universitätsmedizin Mainz vor der Elektroimpulsbehandlung mit VREf beimpft werden, um die Wirkungsweise des gepulsten elektrischen Feldes auf (resistente) Enterokokken zu untersuchen. Außerdem sollte der Frage nachgegangen werden, ob sich klinisch relevante VREf durch das gepulste elektrische Feld abtöten lassen, oder ob diese unempfindlich gegenüber der Elektroimpulsbehandlung sind.



## 2 Grundlagen

### 2.1 Enterokokken

#### 2.1.1 Eigenschaften

Die Gattung der Enterokokken (latinisiert *Enterococcus*) umfasst mehrere Arten von grampositiven, Katalase-negativen Kokken, die entweder alleine, in Paaren oder kurzen Ketten vorkommen [54]. Diese fakultativ anaeroben Bakterien sind natürlicher Bestandteil der Darm- und Hautflora von Mensch und Tier und gehören zur Ordnung der Milchsäurebakterien. Aber auch außerhalb ihres natürlichen Habitats sind Enterokokken extrem widerstandsfähig gegenüber diversen Umwelteinflüssen. So sind sie mit Ausnahme einiger weniger Arten in der Lage, innerhalb eines Temperaturbereichs zwischen 10°C und 45 °C problemlos zu wachsen. Die optimale Wachstumstemperatur liegt bei 35 °C. Die Hitzetoleranz von Enterokokken hängt nicht alleine von der Temperatur ab, sondern auch von der Wachstumsphase, in der sich die Bakterienkultur befindet [44, 117, 204].

Die Gegenwart von bis zu 6,5 % Natriumchlorid und ein pH-Wert bis 9,6 haben keinen hemmenden Einfluss auf das Wachstum von Enterokokken [53]. Außerdem besitzen sie die Fähigkeit Esculin zu spalten. Mit speziellen selektiven Nährböden wird die Fähigkeit der Esculinspaltung von Enterokokken als Anzeiger für Enterokokkenwachstum genutzt [161, 204].

Sind die hämolytischen Eigenschaften der Enterokokken auf Cytolysin (auch bekannt als Hämolyisin) zurückzuführen, dann tritt eine vollständige Hämolyse ( $\beta$ -Hämolyse) auf Blutagar auf. Das produzierte Cytolysin wird als Sekret in die Umgebung abgesondert und hämolysiert die Erythrozyten des Blutes [44, 51]. Bei der  $\beta$ -Hämolyse wird das Hämoglobin des Blutes vollständig abgebaut, was an einem klaren Hof (Hämolysezone) um die Bakterienkolonie zu erkennen ist. Außerdem besitzt Cytolysin eine bakterizide Wirkung auf andere grampositive Bakterien, weshalb es sich dabei um ein sog. Bactericin, bei Enterokokken Enterocin genannt, handelt. Bei Enterokokkenarten wie *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. casseliflavus* und *E. gallinarum* wurde die Enterocinproduktion bereits nachgewiesen [51, 76, 150]. Auch eine unvollständige Hämolyse ( $\alpha$ -Hämolyse) bzw. keinerlei Hämolyseverhalten ( $\gamma$ -Hämolyse) kann bei Enterokokken auftreten.

### 2.1.2 Taxonomie

Das Wort *Enterococcus* setzt sich zusammen aus den griechischen Wörtern *enteron* (Darm) und *kokkos* (Kern) und gibt Auskunft über das natürliche Vorkommen von Enterokokken. Erstmals erwähnt wurden die Enterokokken von Thiercelin im Jahre 1899 [124], wobei sie damals noch der Gattung der Streptokokken zugeordnet wurden. Ab dem Jahr 1906 wurden die Enterokokken zum festen Bestandteil des Klassifikationsschemas der Streptokokken (*Streptococcus faecium* und *Streptococcus faecalis*, [7]). 1930 erfolgte eine serologische Einteilung der Streptokokken durch Lancefield, wobei den Enterokokken der Name *Streptococcus* der Antigen-Gruppe D zugeordnet wurde [106]. Die Einteilung der Streptokokken in vier Teilbereiche von Sherman im Jahr 1937 korrelierte mit der serologischen Einteilung von Lancefield.

Im Jahr 1984 wurde nachgewiesen, dass *S. faecalis* und *S. faecium* nur entfernt verwandt mit den Streptokokken sind. Deshalb wurden diese beiden Spezies der eigenständigen Gattung *Enterococcus* zugeordnet [155]. Noch im selben Jahr wurden dieser neuen Gattung weitere Arten zugeordnet [32]. Zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit umfasste die Gattung der Enterokokken 40 Arten (Tabelle 1). Zu den wichtigsten Vertretern zählen *E. faecium* und *E. faecalis*, da sie am häufigsten auftreten [124, 204].

Die Gattung <i>Enterococcus</i> [Literaturstelle]			
<i>E. aquimarinus</i> [171]	<i>E. devriesei</i> [172]	<i>E. hirae</i> [49]	<i>E. ratti</i> [179]
<i>E. asini</i> [40]	<i>E. dispar</i> [35]	<i>E. italicus</i> [52]	<i>E. saccharolyticus</i> [147]
<i>E. avium</i> [32]	<i>E. durans</i> [32]	<i>E. malodoratus</i> [32]	<i>E. saccharominimus</i> [128, 190]
<i>E. caccae</i> [29]	<i>E. faecalis</i> [155]	<i>E. moraviensis</i> [170]	<i>E. seriolicida</i> [105]
<i>E. camelliae</i> [167]	<i>E. faecium</i> [155]	<i>E. mundtii</i> [33]	<i>E. silesiacus</i> [173]
<i>E. canintestini</i> [127]	<i>E. flavescens</i> [137]	<i>E. pallens</i> [186]	<i>E. solitarius</i> [34]
<i>E. canis</i> [39]	<i>E. gallinarum</i> [32]	<i>E. phoeniculicola</i> [107]	<i>E. sulfureus</i> [116]
<i>E. casseliflavus</i> [32]	<i>E. gilvus</i> [186]	<i>E. porcinius</i> [40, 179]	<i>E. termitis</i> [173]
<i>E. cecorum</i> [202]	<i>E. haemoperoxidus</i> [170]	<i>E. pseudoavium</i> [34]	<i>E. thailandicus</i> [175]
<i>E. columbae</i> [41]	<i>E. hermanniensis</i> [96]	<i>E. raffinosus</i> [34]	<i>E. villorum</i> [188]

**Tabelle 1: Die Gattung *Enterococcus*.** Quelle: „Bacterial Nomenclature Up-To-Date“, zugelassene, validierte Liste der aktuellen Bakteriennomenklatur, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (www.DSMZ.de). Alphabetische Aufführung, Stand Februar 2011.

### 2.1.3 Antibiotikaresistenz

Resistenzen gegen antimikrobielle Substanzen können bei Bakterien entweder von Natur aus als Eigenschaft der Spezies vorliegen (intrinsische Resistenz), oder neu erworben werden. Die intrinsische Resistenz ist im Chromosom des Bakteriums kodiert, wohingegen die erworbenen Resistenzen entweder im Chromosom durch Mutation entstehen, oder in den Plasmiden als Folge eines Austauschs von DNA-Stücken zwischen Bakterien (Transfer) vorliegen. Bei Plasmiden handelt es sich um meist ringförmig angeordnete, doppelsträngige DNA-Moleküle unterschiedlicher Größe (extrachromosomale Elemente).

Der Erwerb von fremder DNA durch Transfer kann entweder durch Konjugation (horizontaler Gentransfer), Transduktion (Übertragung zwischen Bakterien durch Viren/Bakteriophagen) oder Transformation (Aufnahme von freier DNA) erfolgen. Bei Enterokokken beschränkt sich dieser Vorgang überwiegend auf die Konjugation [91]. Für den Erwerb von Resistenzen ist nicht nur das genetische Potenzial zum Erwerb von Bedeutung, sondern auch der selektive Druck eines Antibiotikums.

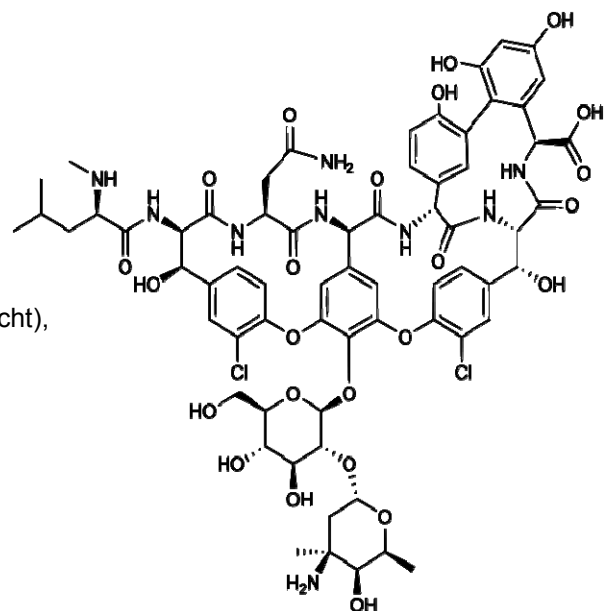
Intrinsische Resistenzen bei Enterokokken sind z. B. Resistenzen gegenüber Beta-Lactam-Antibiotika wie Penicillin, Cephalosporinen und geringe Konzentrationen an Aminoglykosiden und Clindamycin. Beispiele für Substanzen, gegen die erworbene Resistenzen vorliegen, sind u. a. Glykopeptide wie Vancomycin oder Teicoplanin, Chloramphenicol, Erythromycin, Tetracycline, hohe Konzentrationen von Aminoglykosiden etc., wobei die Resistenz gegen Vancomycin die größte Rolle spielt [124]. Die Empfindlichkeit bzw. Resistenz gegen Antibiotika wird u. a. mit dem Plattendiffusionstest gemessen (qualitatives Ergebnis). Um die Höhe einer Resistenz zu messen (quantitatives Ergebnis), wird die minimale Hemmkonzentration (MHK) eines Antibiotikums, z. B. mit einem Epsilon-Test (E-Test), ermittelt. Die MHK entspricht genau der Konzentration eines Antibiotikums, bei der das Wachstum von Bakterien gerade gehemmt wird und mit bloßem Auge nicht mehr sichtbar ist. Laut den Bestimmungen des Clinical and Laboratory Standards Institutes (CLSI) sind Enterokokken mit einer MHK von größer oder gleich 32 µg/ml gegen Vancomycin resistent.

### 2.1.3.1 Vancomycin-Resistenz

Bei Enterokokken ist in den letzten Jahren eine Zunahme der Resistenz gegenüber der in der Therapie eingesetzten Antibiotika zu beobachten. Vor allem Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) treten als Erreger von nosokomialen (im Rahmen von medizinischen Maßnahmen erworbenen) Infektionen immer häufiger auf.

Das 1954 aus einer Bakterienkultur der Familie der Pseudonocardiaceae (*Amycolatopsis orientalis*) isolierte Glykopeptid Vancomycin wird oft zur Bekämpfung von antibiotikaresistenten, grampositiven Bakterien (wie multiresistente Enterokokken und Methicillin-resistente Staphylokokken) eingesetzt, insbesondere wenn eine Resistenz gegen Ampicillin oder eine Unverträglichkeit gegenüber Penicillin vorliegt [91, 111, 151].

**Abbildung 1:**  
**Strukturformel des**  
**Glykopeptid-Antibiotikums Vancomycin**  
Quelle Wikipedia (uneingeschränktes Nutzungsrecht),  
Februar 2011.



Die Fähigkeit der Enterokokken, sich Resistenzen gegen Antibiotika schnell aneignen zu können und diese zu verbreiten, macht sie zu einem wichtigen Erreger von nosokomialen Infektionen weltweit. Besonders *Enterococcus faecium* ist anfällig dafür, Resistenzgene aufzunehmen und weiterzuverbreiten [37, 198]. Der potenzielle Transfer dieser Resistenzen in andere, viel pathogenere Bakterien wie z. B. Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) könnte dadurch gefördert werden [22]. In Verbindung mit der Vancomycin-Resistenz sind *Enterococcus faecium* und *Enterococcus faecalis* die am häufigsten vertretenen Arten unter den resistenten Enterokokken [122, 184].

Für die Vancomycin-Resistenz sind unterschiedliche Resistenzgene verantwortlich (Tabelle 2), die entweder im Chromosom oder auf einem Plasmid eines Bakteriums vorliegen [38, 198].

Genotyp	Van A	Van B*	Van C*	Van D*	Van E	Van G*	Van L
Resistenzart	erworben	erworben	intrinsisch	erworben	erworben	erworben	erworben
MHK [mg/l] Vancomycin	16 – 1000	4 - 32	2 - 32	64 - 128	8 - 32	16	8
MHK [mg/l] Teicoplanin	16 - 512	0,5 - 1	0,5 - 1	4 - 64	0,5	0,5	< 32
Lokalisation	Plasmid / Chromos.	Plasmid / Chromos.	Chromos.	Chromos.	Chromos.	Chromos.	wahrsch. Chromos.
Modifikation	D-Ala- D-Lac	D-Ala- D-Lac	D-Ala- D-Ser	D-Ala- D-Lac	D-Ala- D-Ser	D-Ala- D-Ser	Keine Angabe
Transfer durch Kunjugation	+ / -	+ / -	-	-	-	+	-
Vorkommen bei Enterococcus	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. durans</i> <i>E. hirae</i> <i>E. gallinarum</i> <i>E. casseliflavus</i> <i>E. raffinosus</i> <i>E. avium</i> <i>E. mundtii</i>	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. durans</i> <i>E. gallinarum</i>	<i>E. gallinarum</i> (C1) <i>E. casseliflavus</i> (C2 / 3)	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. raffinosus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>

\* hiervon existieren noch jeweils verschiedene Subtypen

**Tabelle 2: Überblick über die Genotypen der Vancomycin-Resistenz bei Enterokokken [38, 198].**

Eine Ausbreitung der Resistenz kann auf zweierlei Arten erfolgen. Entweder auf klonaler Ebene, indem sich bereits resistente Isolate durch Zellteilung vermehren, oder durch Transfer von Resistenzgenen zwischen den Bakterien [91, 151]. Um dies zu ermöglichen, sind die erworbenen Resistenzgene (u. a. *VanA* und *VanB*) mit mobilen genetischen Elementen verbunden, sog. Transposons, welche es ermöglichen, die Resistenzgene klonal und lateral weiter zu verbreiten („springende Gene“).

Die *VanA*- und *VanB*-Genotypen sind die am häufigsten auftretenden Resistenztypen unter den Enterokokken in ganz Europa. Der *VanA*-Genotyp ist in deutschen Krankenhäusern unter den Vancomycin-resistenten *Enterococcus faecium* (VREf) am häufigsten vertreten [198]. Gegenüber dem *VanB*-Genotyp zeichnet sich der *VanA*-Genotyp durch eine sehr hohe Vancomycin-Resistenz von bis zu 1000 µg/ml in Verbindung mit einer Kreuzresistenz gegenüber Teicoplanin aus.

Der bakteriostatische Wirkungsmechanismus von Glykopeptiden wie Vancomycin und Teicoplanin basiert bei Enterokokken auf einem Prinzip, bei dem der Wirkstoff nicht in das Cytoplasma der Zelle eindringt, sondern an der Hinderung der Zellwandsynthese beteiligt ist. Die dicke, mehrschichtige Zellwand aus Murein (lat. *murus* = Mauer, Wand) bei grampositiven Bakterien besteht aus Peptidoglykan-Bausteinen. Zentrale Elemente sind glykosidisch verbundene Zuckerderivatmoleküle (N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure), die über Peptidreste miteinander quervernetzt sind. Da bei gramnegativen Bakterien eine äußere Zellmembran die dünne Zellwand bedeckt, können Glykopeptidantibiotika dort nicht ihre antibakterielle Wirkung entfalten, da sie die äußere Zellmembran nicht durchdringen können.

Durch Bindung von Vancomycin an das Pentapeptidende der Murein-Vorstufe wird die Peptidoglykan-Biosynthese der Zellwand von grampositiven Bakterien durch sterische Hinderung gestört. Dabei bindet das Vancomycin an das Pentapeptidende, bestehend aus D-Alanyl–D-Alanin, und führt somit zu einer Blockierung der Zellwandbausteine, die untereinander nicht weiter vernetzt werden können [91].

Liegt eine Resistenz gegen Glykopeptide vor, so wird, je nach Resistenzgen, eine bestimmte Art von Ligase (bisher sind zwei verschiedene Ligasen bekannt, die zur Vancomycin-Resistenz führen) exprimiert. Dieses Enzym sorgt für eine Substitution des D-Alanin-Pentapeptidendes der Mureinvorstufe, je nach Ligase von D-Alanyl–D-Alanin entweder zu D-Alanyl–D-Lactat (*VanA*- und *VanB*-Genotyp) oder zu D-Alanyl–D-Serin (*VanC*-Genotyp), was zu einem Austausch der NH<sub>2</sub>-Gruppe durch eine OH-Gruppe führt (siehe Tabelle 2). Aufgrund dieser Änderung wird die Affinität von Vancomycin zur Bindung an die Rezeptor-Zielstelle, das Pentapeptidende, herabgesetzt bzw. ganz verhindert. Das D-Lactat-Ende setzt die Affinität zu Vancomycin um das 1000-fache herab, während das D-Serin-Ende die Affinität nur um das 7-fache verringert [59], was in einer geringeren Vancomycin-Resistenz resultiert. Eine Quervernetzung der Mureinbausteine zur Bildung der grampositiven Zellwand wird somit gestört oder ganz verhindert.

### 2.1.3.2 Entwicklung der Vancomycin-Resistenz

Nachdem 1988 zum ersten Mal über Ausbrüche (durch VRE verursacht) in Frankreich und England berichtet wurde [22, 110, 187], folgten Anfang der 1990er Jahre Berichte über isolierte VRE von Patienten und aus der aquatischen Umwelt (wie Abwasser aus Kläranlagen und Klärschlamm) in Deutschland [87, 193]. Viele Studien belegen, dass in deutschen und europäischen Krankenhäusern in den

letzten Jahren die Rate der an nosokomialen Infektionen beteiligten Vancomycin-resistenten *E. faecium* deutlich angestiegen ist. Länderbedingt ergaben sich in Europa zwar Unterschiede gerade in Beginn und der Höhe des Anstiegs der VRE-Raten, jedoch war eine ansteigende Tendenz sowohl in Deutschland als auch in vielen weiteren Ländern Europas in den letzten Jahren erkennbar.

Zur Überwachung der nationalen und internationalen aktuellen Resistenzsituation und Resistenzentwicklung der Bakterien sammeln Institutionen Daten über nosokomiale Pathogene wie VRE und werten sie aus, um statistische Analysen zu erstellen. Das wichtigste Resistenzmonitoring übernimmt in Europa das „European Antimicrobial Resistance Surveillance System“ (EARSS). Die Koordination dieses Netzwerks obliegt dem ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) in Schweden. Aufgrund unterschiedlicher Verbreitungsorte und -zeiten der VRE sowie unterschiedlicher Vorraussetzungen innerhalb eines Landes ist der aktuelle Trend bzw. die momentane Situation in Bezug auf das Vorkommen von VRE von Land zu Land verschieden.

In der Zeit vor 2003 waren VRE im klinischen Umfeld in Deutschland wie in Europa durchaus vorhanden, aber die VRE-Rate verharrte auf relativ niedrigem Niveau. Ein deutlicher Anstieg der VRE-Rate erfolgte in Deutschland erst ungefähr ab dem Jahr 2003. Wie die deutschen Daten der EARSS zeigen, lag die Rate der Vancomycin-resistenten *E. faecium* (VREf) unter den klinischen *E. faecium*-Isolaten im Jahr 2001 noch bei ca. 1 %. Danach erfolgte ein Anstieg auf 11 % bis zum Jahr 2004. In dem danach folgenden Zeitraum bis 2008 variierte die VRE-Rate zwischen 8 % in 2006, 15 % in 2007 und 6 % in 2008 [198, European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS)].

Neben der europäischen Einrichtung zur Überwachung der Resistenzentwicklung gibt es auch weitere nationale Überwachungssysteme, die die Ergebnisse der EARSS stützen. Beispiel hierfür ist das „German Network for Antimicrobial Resistance Surveillance“ (GENARS). Laut GENARS stieg die Rate der VREf in Deutschland in dem Zeitraum von 2002 bis 2006 von 0,9 % auf 15,3 % in 2006 an.

Wie eine Studie aus Südwestdeutschland belegt, lag die Isolationsrate von VREf unter allen isolierten Enterokokken vor 2003 noch bei  $\leq 5$  %, wohingegen ein Anstieg bis zu 14 % Ende 2003/Anfang 2004 zu verzeichnen war [60, 92, 99, 157].

Laut einer Statistik der VRE-Rate in Abhängigkeit von dem Antibiotika-Verbrauch auf deutschen Intensivstationen konnte der ansteigende VRE-Trend nicht auf einen steigenden Konsum von Antibiotika bzw. einer veränderten Antibiotikastrategie, Veränderungen in der medizinischen Ausstattung oder auf veränderte hygienische Maßnahmen zurück geführt werden [198, Surveillance of antibiotic use and resistance in Intensive Care Units (SARI)].

Wie Studien belegen, sind durch VRE<sub>f</sub> verursachte Ausbrüche in deutschen Krankenhäusern meistens polyklonal, d.h. Ausbrüche sind nicht nur auf einen bestimmten ubiquitär auftretenden klonalen Typ beschränkt, sondern es treten mehrere verschiedene klonale Typen auf [3, 23, 92, 94, 197].

Das Auftreten dieser Polyklonalität resultiert aus dem verbreiteten Vorkommen von verschiedenen, ans Krankenhausumfeld angepassten, Ampicillin-resistenten, Vancomycin-sensiblen *E. faecium*. Diese können Träger von verschiedenen virulenten Faktoren sein und nach Erwerb von Resistenz-Determinanten zu epidemischen VRE<sub>f</sub> werden [22, 37, 82, 168, 197]. Diese Vancomycin-sensiblen *E. faecium* waren im Krankenhausumfeld bereits verbreitet, bevor sie, unabhängig voneinander, eine Vancomycin-Resistenz durch Aufnahme eines Resistenz-Gens (meistens *VanA*) erworben haben [200, 201].

Diese Theorie des unabhängigen Erwerbs der Vancomycin-Resistenz von sensiblen Enterokokken wird durch Studien unterstützt, die auf die Existenz eines *VanA*-Genpools in Enterokokken sowohl im als auch außerhalb des Krankenhausumfeldes bzw. gänzlich außerhalb von Enterokokken hinweisen [61, 62, 66, 113, 164, 197]. Die Stabilität und der Transfer von *VanA*-Gen-Elementen wurde in vivo bei Enterokokken in Studien unter unterschiedlichen Bedingungen demonstriert. Doch der Entwicklung von VRE als Erreger von nosokomialen Infektionen in Krankenhäusern stehen noch viele weitere, teilweise noch unbekannte epidemiologische Einflussfaktoren gegenüber [25, 78, 112, 197].

Die weite Verbreitung von Vancomycin-sensiblen *E. faecium* im Krankenhausumfeld von ganz Europa ist bedenklich im Hinblick auf die Eigenschaft von *E. faecium*, Resistenzdeterminanten sehr leicht erwerben und verbreiten zu können. Erfahrungen aus den USA und anderen Ländern mit höheren VRE-Raten zeigen einen deutlichen, zeitlich versetzten Anstieg von Vancomycin-Resistenzen bei *E. faecium* als Folge der



Verbreitung von Vancomycin-sensiblen, klonalen Typen im klinischen Umfeld [109, 198, 201]. Der Trend der letzten Jahre in Deutschland und Europa ist vergleichbar mit dem in den USA, mit einer Verzögerung von ca. 10 bis 15 Jahren [201]. Während in Europa zwischen 1990 und 2000 die VRE-Rate unter den klinischen Enterokokken-Isolaten noch ein moderates, niedriges Level besaß, wurde in den USA ein deutlicher Anstieg der VRE-Rate dokumentiert. Die VRE-Infektionsrate auf US-amerikanischen Intensivstationen stieg innerhalb von 13 Jahren (von 1989 bis 2002) um über 75 Prozentpunkte auf 76,3 % [43, 79, 92, 119]. In den USA wird der Grund hierfür in dem hohen Konsum an Antibiotika wie Vancomycin gesehen, was zu einem selektiven Vorteil von (intrinsisch-) resistenten Bakterien wie den Enterokokken geführt haben könnte. Epidemisch-virulente Subpopulationen von VREf waren dort im Klinikumfeld ebenfalls weit verbreitet [86, 92].

Trotz gewisser Parallelen in der Entwicklung der Resistenzsituation von VRE im Krankenhausumfeld zwischen den USA und Deutschland gibt es bedeutende Unterschiede außerhalb der Krankenhäuser. So sind in den USA zwar VRE als Erreger von nosokomialen Infektionen weit verbreitet, aber bei der gesunden Bevölkerung treten VRE nur sehr selten, meistens als Folge eines Erwerbs im Krankenhausumfeld, auf [22].

In Deutschland und vielen weiteren Ländern Europas dagegen konnte sich ein sog. „community reservoir“ bzw. ein „animal reservoir“, also ein Reservoir an VRE oder Resistenz-Determinanten in der Bevölkerung und unter Tieren fern des Krankenhausumfeldes unabhängig entwickeln. Durch dieses Reservoir besteht die Gefahr der weiteren Übertragung entweder von resistenten Bakterien oder der Resistenzen durch horizontalen Gentransfer in das Krankenhausumfeld [22, 125, 132, 182, 198].

Der Wirkstoff Avoparcin gilt als Auslöser der Resistenzentwicklung gegen Glykopeptide wie Vancomycin außerhalb des klinischen Umfeldes. Bei Avoparcin handelt es sich um ein Vancomycin-ähnliches Glykopeptid-Antibiotikum, das seit den 1970er Jahren als Leistungsförderer (Wachstumsbeschleuniger) in der kommerziellen Nutztierhaltung in vielen Ländern Europas eingesetzt wurde. Seit Januar 1996 wurde der Einsatz von Avoparcin in der Tierhaltung in Deutschland und ab April 1997 auch in der gesamten EU verboten. Avoparcin steht unter Verdacht, Kreuzresistenzen gegen Vancomycin zu fördern und als Ursache für das vermehrte

Auftreten von VRE bei Nutztieren, in deren Exkrementen und in deren Fleisch verantwortlich zu sein. Nachdem sich Vancomycin-Resistenzen unter den Enterokokken der Nutztiere gebildet hatten, erfolgte die Ausbreitung bzw. der Übertrag von den besiedelten Nutztieren über die Nahrungskette oder durch direkten Kontakt auf die Bevölkerung [13, 14, 22, 89, 101, 122, 203, 207].

Für eine solche Entwicklung durch den Einsatz von Avoparcin sprechen auch einige molekularbiologische Studien. Sie bewiesen den Zusammenhang des Einsatzes von Avoparcin und der Entwicklung eines Resistenzreservoirs außerhalb des Krankenhausumfeldes, z. B. durch genotypische Verwandtschaftsanalysen von VRE von gesunden Probanden, von Patienten und aus anderen Quellen wie Tierhaltung oder aus Fleischprodukten. Identische Resistenz-Gencluster wurden sowohl bei VRE von Nutztieren als auch bei VRE aus gesunden Probanden gefunden, was für einen Zusammenhang des Avoparcin-Einsatzes und der daraufhin folgenden Resistenzentwicklung und Verbreitung spricht [103]. Auch der Rückgang der Zahlen von VRE-Kolonisationen bzw. Vorkommen in der Bevölkerung und in Nutztieren seitdem der Einsatz von Avoparcin verboten wurde, sprechen für diese Entwicklung [24, 47, 103]. In Schweden z. B. wurde der Einsatz von Avoparcin schon 1986 verboten, was einen Rückgang der VRE-Zahlen zur Folge hatte [72]. Auch die wesentlich niedrigere Besiedlungsrate mit VRE von Vegetariern, die also mit keinem mit VRE „kontaminiertem“ Fleisch in Berührung kommen, unterstützt diese Annahme. In den USA, wo Avoparcin oder vergleichbare Stoffe nie in der Tierzucht eingesetzt wurden, ist ein solches Resistenz-Reservoir in der Bevölkerung oder bei Nutztieren nicht zu finden [22, 36, 122, 200, 207], was ebenfalls für Avoparcin als Auslöser sprechen würde.

Dem gegenüber gibt es auch anders lautende Studien, die den Genpool in Tieren und in Menschen verschiedenen Genogruppen oder verschiedenen Transposon-Typen zuordnen, was wiederum für keinen Zusammenhang mit dem Einsatz von Avoparcin sprechen würde [22, 103, 189, 199].

### 2.1.3.3 Situation der Vancomycin-Resistenz

Die Resistenzsituation ist in Europa keineswegs einheitlich. Das Auftreten von VRE-Infektionen (verursacht durch *Enterococcus faecium*) variiert in den einzelnen Ländern von unter 1 % bis über 40 % unter den durch Enterokokken verursachten Infektionen (EARSS Annual Report 2008). In vielen Ländern ist in den letzten 6

Jahren ein drastischer Anstieg des Vorkommens von VRE bzw. ein Stagnieren des VRE-Vorkommens auf hohem Niveau zu verzeichnen.

Zu den Ländern mit dem höchsten Vorkommen von VRE (> 25 % invasive Isolate) im Jahr 2008 zählten Griechenland, Irland und England. Auch andere Länder wie Deutschland, Italien oder Portugal meldeten ein erhöhtes Vorkommen (5-25 % invasive Isolate). In einigen europäischen Ländern ist der Trend des VRE-Vorkommens tendenziell leicht rückläufig (Portugal, Griechenland oder Israel), trotzdem liegen diese Länder noch auf einem überdurchschnittlich hohen Level der VRE-Infektionen (zwischen 20 und 30 % invasive Isolate). Beispielsweise wurden in Deutschland im Jahr 2007 noch über 15 % invasive VRE-Isolate gemeldet. Diese Zahl sank im Jahr 2008 auf ca. 6 %. Zu den Ländern, in denen VRE generell nur vereinzelt auftreten, gehören die Niederlande oder nordische Staaten wie Norwegen oder Finnland (< 1 % invasive Isolate).

Die Gründe für diese unterschiedlichen Trends sind bislang nicht vollständig aufgeklärt, da zahlreiche Aspekte wie Verbreitung und Erwerb von VRE bislang nicht vollständig aufgeklärt sind. Neben den bislang als beeinflussende Größen der Vancomycin-Resistenz angesehenen Interventionen wie strikteres Antibiotika-Management oder strengere Hygienemaßnahmen, existieren eine Menge an weiteren (länderabhängigen) Faktoren, die Einfluss auf die Resistenzsituation nehmen [198].

### **2.1.4 Vorkommen von Enterokokken und VRE**

#### **2.1.4.1 Medizinischer Bereich**

Enterokokken sind in der Lage, unter bestimmten Umständen, etwa bei immungeschwächten Patienten in Krankenhäusern, schwere Infektionen hervorzurufen. Diese Tatsache macht die Enterokokken zu opportunistisch pathogenen Bakterien. Die Resistenzen gegenüber den in der Therapie eingesetzten Antibiotika (z. B. Penicillin oder Glykopeptide wie Vancomycin) besitzen zunehmend größere humanmedizinische Relevanz beim Bekämpfen dieser Infektionen. Vancomycin-resistente Enterokokken, vor allem resistente *E. faecium* und *E. faecalis*, sind zu wichtigen nosokomialen Pathogenen geworden, zuerst in den USA und später folgend auch in Europa und dem Rest der Welt [201]. Sie gehören heutzutage zu den dritt- bis

viert häufigsten nosokomialen Verursachern von Infektionen in Krankenhäusern weltweit [4, 91, 198].

In den letzten 15 Jahren konnte ein 20-facher Anstieg an nosokomialen Infektionen, verursacht durch VRE, beobachtet werden [51]. Eine Infektion mit VRE ist wegen eingeschränkter Therapiemöglichkeiten kritischer zu betrachten als eine Infektion mit sensiblen Enterokokken. Laut einer Studie aus den USA im Jahr 2005 stieg, verglichen mit der Sterberate bei Blutvergiftungen durch sensible Enterokokken, die Sterberate um 30 Prozentpunkte (auf 75 %) an, wenn an der Infektion VRE beteiligt waren [15].

Aufgrund der hygienischen und örtlichen Gegebenheiten auf den Stationen der Krankenhäuser (viele Patienten, wenig Toiletten etc.) und der dort häufigen Antibiotikatherapie sind Kliniken oft Orte, an denen Infektionen mit resistenten Bakterien auftreten und sich ausbreiten. Als typische, durch VRE verursachte Krankheitsbilder, treten häufig Harnwegsinfektionen, Meningitis, Endokarditis, Blutvergiftung und Wund- und Weichteilinfektionen auf [83, 124]. Oft sind Patienten mit diesen antibiotikaresistenten Keimen besiedelt (Kolonisation), ohne dass Krankheitsanzeichen auftreten [132]. Durch die fehlenden Krankheitsanzeichen bleiben Kolonisationen deshalb häufig unentdeckt, wodurch die Weiterverbreitung gefördert wird. Sind mehrere Patienten in einer Klinik mit einem nachweislich genetisch identischen Erreger kolonisiert oder infiziert, spricht man von einem „Ausbruch“.

Werden Patienten innerhalb des Krankenhauses oder zwischen verschiedenen Krankenhäusern verlegt, trägt dies zu einer weiteren Verbreitung des resistenten Bakteriums bei. Unzureichende Hygienemaßnahmen wie mangelnde Händedesinfektion und unzureichende Vorsorgemaßnahmen sind ein weiterer Faktor, der zur Verbreitung von nosokomialen Pathogenen wesentlich beiträgt [119]. Zahlreiche Untersuchungen bestätigen auch das Vorkommen und Überleben von Enterokokken bzw. VRE auf Oberflächen und Geräten in Krankenhäusern bis zu 7 Tage [80, 204]. Aus diesem Grund werden in vielen Kliniken auch eine aktive Kontrolle bzw. vorbeugende Maßnahmen (z. B. Screening nach VRE, verstärkte Händehygiene) auf kritischen Stationen durchgeführt.

Unter allen Enterokokken, die Infektionen verursachen, ist *Enterococcus faecalis* am häufigsten vertreten. Ca. 80-90 % aller nosokomialer Infektionen mit sensiblen

Enterokokken sind auf *E. faecalis* zurück zu führen, gefolgt von *E. faecium* mit 5-10 % Beteiligung [4, 77, 90, 122, 149, 204]. Auch im Gastrointestinaltrakt von Menschen und Tieren tritt diese Enterokokkenart am häufigsten auf [54, 149].

Bezüglich der Artenverteilung der VRE unter den Verursachern von nosokomialen Infektionen, ist ein Shift der Verteilung zu Gunsten von *E. faecium* zu erkennen, wegen der Eigenschaft, sich schnell multiple antibiotische Resistenzen aneignen zu können und zu deren Verbreitung im Krankenhausumfeld beizutragen [182, 197]. Vancomycin-resistente *E. faecalis* wurden bis heute selten in Verbindung mit nosokomialen Infektionen isoliert [198]. Weshalb sich die Vancomycin-Resistenz hauptsächlich auf *E. faecium* beschränkt, ist bis heute nicht geklärt [74, 122, 198].

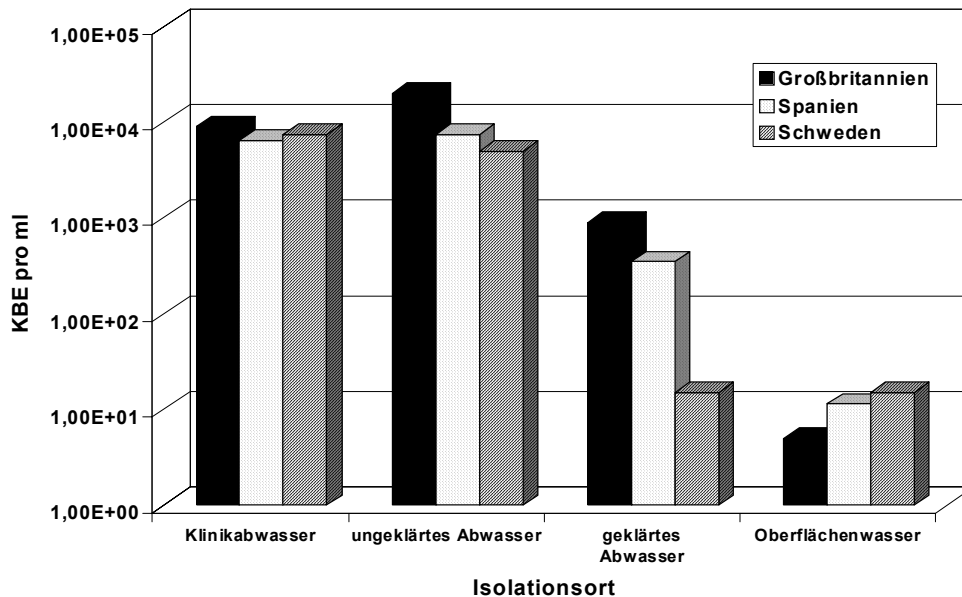
### 2.1.4.2 Umwelt

Enterokokken sind als Milchsäurebakterien nicht nur bei Tieren [103], sondern auch im Darm und im Stuhl von Menschen [124] vorhanden. Aufgrund ihrer Eigenschaft, in Grenzbereichen und unter den verschiedensten Wachstumsbedingungen problemlos überleben zu können, kommen Enterokokken in einem breiten Spektrum von Untersuchungsmaterialien auch außerhalb des Menschen vor. Dazu zählen u. a. Staub, Lebensmittel, (Oberflächen-) Wasser, Abwasser, Agrarland (Erde), Tiere, Futtermittel, Pflanzen und viele weitere Lebensräume, in denen Enterokokken schon nachgewiesen werden konnten [4, 101, 103, 124, 204]. Bei Qualitätsuntersuchungen von Wasserproben jeglicher Herkunft werden Enterokokken oft als Indikatorkeime (als Zeichen für fäkale Verunreinigungen) benutzt [81, 135].

Enterokokken werden über den Abwasserweg in die aquatische Umwelt eingetragen und können entlang des aquatischen Pfades (Abwasser => Kläranlage => geklärtes Abwasser => Vorfluter eines Flusses) bis hin zum Oberflächenwasser in allen Bereichen nachgewiesen werden, wie Studien aus Ländern wie Deutschland, Schweden, Portugal, Finnland und England beweisen [28, 72, 73, 103, 118, 131, 151, 192, 207]. In ungeklärtem Abwasser ist eine Anzahl von Enterokokken von ca.  $10^3$  bis  $10^4$  KBE/ml zu erwarten [19, 28, 103]. Diese Zahl reduziert sich mit dem steigenden Reinheitsgrad des Wassers bei Durchlaufen einer Kläranlage (Abb. 2) auf ca.  $10^1$  (bis  $10^3$ ) KBE/ml bei Oberflächenwasser [19, 103].

*Enterococcus faecium* ist in verschiedenen Umwelthabitaten (z. B. Erde oder Oberflächenwasser) in Vorkommen und Verbreitung die häufigste Art unter den

sensiblen Enterokokken [4, 18, 91]. Die Zusammensetzung der Enterokokkenarten von Krankenhausabwasser kann sich von der Zusammensetzung von städtischem Abwasser bzw. Oberflächenwasser unterscheiden, zumal das Krankenhaus nur einen bestimmten Anteil der Bevölkerung widerspiegelt und sich die Krankenhausumgebung selektiv auf bestimmte Bakterienarten auswirken kann [19].



**Abbildung 2: Enterokokken-Keimzahlen aus verschiedenen Ländern.**  
Graphik abgewandelt [101].

Resistente Enterokokken können prinzipiell in allen Lebensräumen vorkommen, in denen auch sensible Enterokokken bereits nachgewiesen wurden. VRE treten in Deutschland und weiteren Ländern Europas auch bei gesunden Menschen der Bevölkerung und Nutztieren außerhalb des klinischen Umfeldes auf (im Gegensatz zu den USA). Dies ist zurückzuführen auf die Resistenzentwicklung gegen Vancomycin durch den Einsatz des Wachstumsbeschleunigers Avoparcin in der kommerziellen Nutztierhaltung ab Beginn der 70er Jahre (siehe Kapitel 2.1.3.2 Entwicklung der Vancomycin-Resistenz).

In Abwasser wie auch in Oberflächenwasser ist, wie bei klinischen Isolaten ebenfalls, *E. faecium* die häufigste Art unter den VRE, gefolgt von *E. faecalis*. Dies trifft nicht nur auf Deutschland zu, sondern auch auf andere europäische Länder [19, 97, 151, 169]. Laut Studien über Vancomycin-Resistenzen ist das *VanA*-Gen (mit 86 %) die häufigste Ursache der Resistenz, gefolgt von *VanB* [139]. Vereinzelt Studien

berichten bei Untersuchungen von Abwasser von *E. hirae* als häufigste Enterokokkenart [50].

VRE sind nicht so zahlreich wie sensible Enterokokken in der aquatischen Umwelt vorhanden. Studien aus England und Schweden zeigen, dass die Keimzahlen pro Milliliter in Abwasser bei ca.  $10^1$  bis  $10^2$ , in Einzelfällen auch höher ( $10^3$  KBE/ml), liegen können [28]. Oftmals sind VRE in so geringen Keimzahlen, gerade in Oberflächenwasser, zu finden, dass sie nur mittels eines anreichernden Mediums isoliert werden können, dem häufig selektive Substanzen (wie z. B. Vancomycin) zugesetzt sind. Anreicherungen liefern allerdings rein qualitative Ergebnisse.

Das Auftreten von VRE in Oberflächenwasser hängt stark von dem jeweiligen Beprobungsort (regionale Unterschiede) bzw. Land ab. Studien in denen VRE aus Oberflächenwasser isoliert werden konnten [28, 81, 159, 176], stehen Studien gegenüber, in denen keine VRE nachgewiesen werden konnten [4, 131]. Neben Süßwasser konnten VRE auch aus Meerwasser und Sandproben von Stränden isoliert werden [81, 146].

Eine Studie aus dem Iran aus dem Jahr 2008 bestätigt, dass sich in Bezug auf das Resistenzspektrum gegen ein oder mehrere Antibiotika die VRE aus Abwasser nicht wesentlich von denen von Menschen (Patienten) unterscheiden. Die Resistenzspektren wurden in dieser Studie anhand des Plattendiffusionstests mit sieben verschiedenen Antibiotika an VRE-Isolaten getestet. Das Ergebnis spricht für den Eintrag und die Ausbreitung von resistenten Enterokokken aus bestimmten Quellen in die aquatische Umwelt [174].

### 2.1.4.3 Lebensmittel

Enterokokken sind bewusster Bestandteil in der Lebensmittelproduktion. Sie sind sehr zahlreich in Lebensmitteln vorhanden, um deren Qualität zu verbessern. Da sie zur Ordnung der Milchsäurebakterien gehören, werden sie oft in probiotischen Lebensmitteln und als Starterkulturen eingesetzt [53]. Aufgrund der hohen Anpassungsfähigkeit der Enterokokken an verschiedene Substrate und Wachstumsbedingungen (z. B. an extreme Temperaturen) sind sie sowohl in rohen, als auch in hitzebehandelten Lebensmitteln zu finden [4, 53].

Ihr Vorkommen in fermentierten Lebensmitteln wie Käse und Wurst (Salami, Landjäger), Früchten, Gemüse und Oliven ist zahlreich bestätigt. In der Herstellung von Fleisch und Milchprodukten werden Enterokokken oft eingesetzt, um z. B. ein charakteristisches Aroma auszubilden und zur Reifung von Käse beizutragen.

Allerdings können sie auch am Verderben und Vergiften von Lebensmitteln beteiligt sein. Als wichtiger Bestandteil in der Käseproduktion werden Enterokokken in Verbindung mit traditionell gereiftem Käse wie Feta- oder Cheddar-Käse gebracht, hergestellt aus Rohmilch oder pasteurisierter Milch in Gebieten von Europa.

Ihre proteolytischen und esterolytischen Eigenschaften sowie die Produktion von Diacetyl tragen zur Reifung und zur Aromaentwicklung (Geruch, Geschmack) von vielen Käsesorten bei [54]. Durch die von Enterokokken produzierten Enzyme und Stoffe, die in die Umgebung abgesondert werden, werden z. B. die Beschaffenheit und das Aroma stark positiv beeinflusst [51]. Positiv wird auch die Eigenschaft der Bacteriocin-Produktion der Enterokokken angesehen. Es handelt sich dabei um einen bakteriziden Stoff, der in die Umgebung abgesondert wird. Er dient dazu konkurrierende Bakterienstämme (auch Stämme der gleichen Art) abzutöten. Aber auch pathogene, lebensmittelassoziierte Bakterien wie z. B. Listerien werden dadurch abgetötet [54].

Enterokokken aus dem Gastrointestinaltrakt von Tieren können beim Schlachten das Fleisch kontaminieren. Viele Studien bestätigten das Vorkommen von Enterokokken in Fleisch wie Rindfleisch, Hackfleisch, Geflügelfleisch oder Schlachtabfällen [2, 54, 93]. Enterokokken sind nicht nur als Kontamination von frischem Fleisch anzusehen, sondern sind auch in bereits weiterverarbeitetem Fleisch (z. B. nach Hitzebehandlung) zu finden, wo sie zu Problemen wie Verderb oder Fäulnis beitragen [53, 54].

Resistenzgene bzw. resistente Enterokokken könnten durch die Nahrungskette weiterverbreitet werden [4, 89]. Bislang treten resistente Enterokokken bei Lebensmitteln wie Obst und Gemüse jedoch nicht häufig auf. Untersuchungen zeigten eine wesentlich niedrigere Anzahl von Resistenzen gegen getestete Antibiotika bei diesen Lebensmitteln als bei klinischen Isolaten von Patienten [4]. Studien, in denen VRE des VanA-Genotyps aus anderen Lebensmitteln isoliert werden konnten, beziehen sich meistens auf Fleisch wie Geflügel und Schweinefleisch, das aus Betrieben, in denen der Wachstumsbeschleuniger Avoparcin eingesetzt wurde, stammt. Aufgrund der Resistenzentwicklung gegen Vancomycin sind Nutztiere (bzw. deren Kot), die mit dem Leistungsförderer Avoparcin behandelt



wurden, oft mit VRE besiedelt. Bei der Schlachtung könnten dann, trotz der Beachtung der Hygienevorschriften, VRE das Fleisch kontaminieren [12, 13, 57, 89].

Das Abkochen von Lebensmitteln reduziert zwar die Zahl der Enterokokken mitunter drastisch, jedoch besteht weiterhin ein Risiko für hitzeinstabile Lebensmittel oder Rohkost wie Salat, die keiner Hitzbehandlung unterzogen werden (können). Diese Lebensmittel können als potentieller Vektor von resistenten Keimen oder deren Resistenz-Determinanten dienen [4, 204]. So wurden resistente *E. faecalis*-Isolate aus Rohmilchkäse isoliert, die eine klonale Verwandtschaft mit klinischen Isolaten aufwiesen [17].

Nicht nur Enterokokken mit Resistenzen gegen Vancomycin, sondern auch gegen andere Antibiotika wie Tetracycline, Erythromycin und Chloramphenicol wurden schon in Lebensmittel wie Käse, Milch, Milchprodukte, Tunfisch und probiotischen Produkten gefunden [70].

Der Einsatz von Enterokokken als Probiotika dient der Unterstützung der Darmflora, indem sie ein Gleichgewicht von positiven Mikroorganismen aufbauen und erhalten sollen. Gesundheitliche Unbedenklichkeit ist aufgrund des leichten Erwerbs von Resistenzgenen und der potenziellen pathogenen Eigenschaften nicht gegeben, denn es besteht die Möglichkeit, dass Resistenzgene oder Virulenzfaktoren mit den probiotischen Stämmen in den Gastrointestinaltrakt gelangen [51, 54].

## **2.2 Diversität und Genotypisierung bei Enterokokken und VRE**

Als Diversität bezeichnet man die Vielfalt bzw. die Verschiedenheit innerhalb einer einzelnen bestimmten Art (z. B. klonale Vielfalt bei Bakterien), oder zwischen verschiedenen Arten (z. B. Artenvielfalt in einem bestimmten Ökosystem). Eine klonale Diversität liegt vor, wenn genetische Unterschiede zwischen verschiedenen Isolaten der gleichen Art vorliegen. In Studien wurde die Diversität unter Patienten-VRE als hoch (Polyklonalität) eingeschätzt [3, 23, 92, 94].

In Bezug auf das Auftreten verschiedener Arten ist unter den VRE *E. faecium* die mengenmäßig häufigste Art, gefolgt von *E. faecalis* [19, 97, 151, 169]. Die Zusammensetzung von Abwasser aus verschiedenen Enterokokkenarten kann örtlich, regional und international beträchtlich variieren. Abwässer von

Krankenhäusern z. B. können eine völlig andere Diversität an Enterokokkenarten besitzen als kommunales Abwasser [19].

Veränderungen in der klonalen Struktur des Auftretens (für einen bestimmten Zeitraum an einem bestimmten Ort) sind bei Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) bereits bekannt [166]. Eine solche Veränderung der Diversität wurde bei den VRE noch nicht detailliert untersucht, aber dennoch bestehen Hinweise darauf, dass es einen solchen Shift in Vorkommen von bestimmten klonalen Typen auch bei den VRE gibt. Das Auftreten und die Verbreitung eines klonalen VRE-Typs in verschiedenen deutschen Krankenhäusern Ende der 90er Jahre mit charakteristischen, einheitlichen Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)-Mustern ist dokumentiert. Dieser klonale VRE-Typ konnte einige Zeit später dort nicht mehr nachgewiesen werden, was auf eine Veränderung des Vorkommens und des Auftretens von klonalen VRE hindeutet [90, 91, 143, 196].

Um die Diversität zu analysieren, werden sog. Verwandtschaftsanalysen (Clusteranalysen) durchgeführt. Dabei werden ein oder mehrere Merkmale herangezogen und unter den Individuen verglichen. Anhand dieser verglichenen Merkmale und des Verwandtschaftsgrades werden die Individuen in Gruppen eingeteilt. Anschließend kann dann ein Dendrogramm (Baumdiagramm) erstellt werden, welches die Diversität (z. B. die klonale Diversität unter den VRE) bildlich darstellt.

Für Verwandtschaftsanalysen werden meistens genetische Merkmale durch geeignete, molekularbiologische Typisierungsverfahren herangezogen (Genotypisierung). Das gewählte Typisierungsverfahren sollte verschiedenen Anforderungen genügen, um ein aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten. So sollten z. B. die genetischen Merkmale, die für die Typisierung verwendet werden, bei nahezu allen Isolaten der jeweiligen Spezies nachweisbar sein, um eine ausreichend hohe Typisierbarkeit gewährleisten zu können. Des Weiteren sollten die Ergebnisse der molekularbiologischen Typisierung bei wiederholten, unabhängigen Versuchsansätzen seriell reproduzierbar sein, über einen gewissen Zeitraum hinweg stabil sein und zu einem ausreichend diskriminatorischem Ergebnis führen [206]. Als geeignetes molekularbiologisches Typisierungsverfahren für VRE, oder Enterokokken im Allgemeinen, ist die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) nach wie vor der „Goldene

Standard“ unter den Typisierungsverfahren, weil sie gegenüber anderen Typisierungsverfahren sehr diskriminatorisch ist [11, 16, 195, 204]. Bei der PFGE werden die spezifischen Bandenmuster (erhalten aus der isolierten und enzymatisch gespaltenen DNA) der Individuen sichtbar gemacht und untereinander verglichen. Die DNA-Fragmente werden durch die PFGE der Größe nach aufgetrennt, wodurch ein spezifisches Bandenmuster entsteht, welches Rückschlüsse auf die intra- und interspezifische Differenzierung und epidemiologischen Fragestellungen zulässt [158].

Neben der PFGE gibt es noch viele weitere Genotypisierungsverfahren. Ein für Enterokokken ebenfalls häufig verwendetes Typisierungsverfahren ist das "multilocus sequence typing" (MLST). Dabei wird anhand der DNA-Sequenz von bestimmten, für die Bakterienart spezifischen Genen eine Verwandtschaftsanalyse durchgeführt. Studien haben gezeigt, dass im Gegensatz zu Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* oder anderen erworbenen Pathogenen alle nosokomial erworbenen *E. faecium*-Isolate einem bestimmten klonalen Komplex (genannt CC17) angehören [108, 197, 200]. *E. faecium*-Isolate dieses klonalen Komplexes sind meist Ampicillin-resistent und besitzen oft Virulenzfaktoren. Außerdem gehen wissenschaftliche Theorien davon aus, dass Vancomycin-sensible Isolate dieses klonalen Komplexes bereits im Krankenhausumfeld weit verbreitet waren (siehe Kapitel 2.1.3.2 Entwicklung der Vancomycin-Resistenz), bevor sie die Vancomycin-Resistenz erworben haben [22, 160, 168, 197, 201]. Patientenisolate aus deutschen Krankenhäusern von Anfang der 1990er Jahre gehören nicht diesem klonalen Typ CC17 an. Erklärt wird dies damit, dass zu dieser Zeit das Reservoir an VREf durch den weit verbreiteten Gebrauch des Glykopeptids Avoparcin in der kommerziellen Viehzucht und die anschließende Übertragung der resistenten *E. faecium* über die Nahrungskette auf den Menschen geprägt war [22, 89, 196].

### **2.3 Gepulste elektrische Felder (engl. pulsed electric fields, PEF)**

In den eigenen Untersuchungen wurde eine Pilotanlage auf Basis der Elektroimpulstechnologie auf ihre Effizienz in Bezug auf die nebenproduktfreie Abtötung von klinisch relevanten VREf im Abwasser untersucht. Durch das gepulste elektrische Feld in der Anlage sollten in der Bakterienmembran Poren erzeugt werden (Elektroporation), die zur Abtötung der Bakterien führen.

In der Nahrungsmittelindustrie sind starke, gepulste elektrische Felder als Alternative zur Hitzesterilisation etabliert, da unerwünschte Effekte durch thermale Behandlung (wie z. B. Nährstoff-, Vitaminverlust oder sensorische Veränderungen) von flüssigen Nahrungsmitteln wie Fruchtsäften, Most, Wein oder Milch durch die nicht-thermale Elektroimpulsbehandlung vermieden werden. Auch konnte bislang keine gentoxische Wirkung durch Behandlung mit PEF nachgewiesen werden [5, 63, 145].

Bei der Anwendung der PEF-Technologie werden Flüssigkeiten, die zwischen zwei Elektroden hindurchgeleitet werden, elektrischen Impulsen mit hoher Feldstärke (10-50 kV/cm) und kurzer Pulsdauer ( $\mu\text{s}$ -Bereich) ausgesetzt [31]. Der auf Mikroorganismen letale Effekt dieser Elektroimpulsbehandlung wurde in Studien nachgewiesen [45, 69, 153]. Wegen des erfolgreichen Einsatzes in der Lebensmittelindustrie wird zur Zeit verstärkt der Einsatz der PEF-Technologie zur Reduktion von bakteriell hochbelasteten Abwässern wie z. B. Klinikabwasser oder industrielles Prozessabwasser getestet [63].

Der Effekt von PEF beruht auf dem Elektroimpulsverfahren. Dabei entstehen je nach Pulsanzahl, Pulsdauer und Stärke eines extern angelegten Feldes vorübergehende (reversible) oder dauerhafte (irreversible) Poren in der bakteriellen Zellmembran, weil sich, induziert durch die transmembrane Feldstärke, die Bestandteile der Doppellipidschicht anders anordnen (Elektroporation). Die Bildung von irreversiblen Poren führt zum Austritt des Zellplasmas aus der bakteriellen Zelle und deshalb zum Zelltod [185].

Die Vorgänge innerhalb der Zellen sind bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt. Nach heutigem Verständnis geht man davon aus, dass, wenn ein externes elektrisches Feld angelegt wird, es zur Polarisierung an der isolierenden Phospholipid-Doppelschicht der Zellwand bzw. Cytoplasmamembran kommt, sofern sich die Bakterienzelle in einem elektrisch leitenden Medium befindet. Dabei wird die Feldstärke in die isolierende Zellmembran verdrängt. Die induzierte Feldstärke

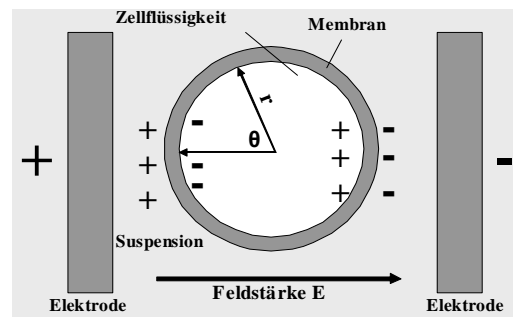
innerhalb der Membran ( $E_{Mem}$ ) ist proportional zur Transmembranspannung ( $U_{Mem}$ , Spannung innerhalb der Membran) und hängt zusätzlich von der Dicke der Membran ( $\sim 5 \text{ nm}$ ) ab. Die Feldstärke wird anhand folgender Formel berechnet:

$$E_{Mem} = U_{Mem} / d$$

Feldkräfte innerhalb der Membran sorgen anschließend bei ausreichender Pulsdauer für eine Umlagerung der Phospholipide in der Doppelschicht der Membran, wodurch sich Poren in der Membran bilden (dielectric breakdown), deren Durchmesser mit steigender Feldstärke wächst [45, 85].

Dieser Vorgang ist reversibel, solange der Radius der gebildeten Poren nicht eine kritische Größe überschreitet. Nachdem kein externes elektrisches Feld mehr vorhanden ist, kann die Membran in ihren ursprünglichen Zustand zurückkehren und die entstandenen Poren schließen sich wieder. In der Gentechnik wird das Verfahren der Elektroporation deshalb bei geringer Feldstärke angewendet, um z. B. Fremd-DNA durch entstehende reversible Poren in die bakteriellen Zellen einzuschleusen, ohne die Bakterien abzutöten (Transformation).

**Abbildung 3: Darstellung der Polarisation an der Membran einer kugelförmigen Zelle in einem elektrischen Feld [20].**



Erreicht der Radius der gebildeten Poren einen bestimmten kritischen Wert, sind die Poren irreversibel, denn sie können sich nicht mehr zurückbilden. Dies geschieht bei einer Membranspannung von  $\sim 0,5\text{-}1 \text{ V}$  für eine Phospholipid-Doppelschicht [8, 85, 177, 194]. Für kugelförmige Zellen, wie z. B. Enterokokken, ergibt sich folgendes vereinfachtes Modell zur Berechnung der Membranspannung entlang des Umfangs der Zelle:

$$U_{Mem} = f \cdot r \cdot E_{ex} \cdot \cos\theta$$

**Einstein-Smoluchowsky-Gleichung [129, 194].**

Der Buchstabe  $f$  ist dabei der Zellform-Faktor (1,5 bei kugelförmigen Zellen),  $r$  der Zellradius und  $E_{ex}$  die kritische extern angelegte Feldstärke. Der Winkel zwischen der externen Feldstärke und dem Messpunkt auf der Membran wird als  $\theta$  (Theta) bezeichnet [8, 69, 98, 129, 153, 194], weswegen bei nicht-kugelförmigen Bakterien (elliptisch oder stäbchenförmig) auch die räumliche Ausrichtung zur externen Feldstärke eine große Rolle spielt.

Die Membranspannung ist bei konstanter, extern angelegter Feldstärke an den Membranstellen, die den Elektroden zugewandt sind, bei kugelförmigen Zellen maximal (Winkel  $\theta = 0^\circ$ ). Bei dem kleinen Durchmesser von Bakterienzellen (ca.  $1 \mu\text{m}$ ) sollte die Feldstärke rechnerisch bei ca.  $6,7 \text{ kV/cm}$  liegen, um die nötige kritische Membranspannung an diesen Stellen der Membran zu erreichen. Für eine effiziente Keimzahlreduktion ist es vorteilhaft, möglichst auf der gesamten Membranoberfläche irreversible Poren zu erzeugen. Deshalb muss die extern angelegte Feldstärke höher sein, da sich die kritische Membranspannung in Abhängigkeit mit  $\cos\theta$  zu den jeweiligen Messpunkten auf der Membran (siehe Abbildung 3) verkleinert.

Die Elektroporation einer Zellmembran ist nicht nur auf die Doppellipidschicht beschränkt, sondern betrifft auch die in die Membran eingelagerten Proteinkanäle und Protonenpumpen, welche ebenfalls irreversibel denaturiert werden können. Sie besitzen außerdem ein niedrigeres kritisches Transmembranpotenzial als die Zellmembran [30, 185].

Die Polarisierung der Zellmembran und die Porenbildung bedürfen einer gewissen Zeitdauer, die abhängig von den Zellabmessungen, der spezifischen Membrankapazität und der spezifischen Leitfähigkeiten innerhalb und außerhalb der Zelle sind [20]. Deshalb ist nicht nur die Höhe der Feldstärke, sondern auch die Pulsdauer ein entscheidender Faktor, der beachtet werden muss [8, 69, 153, 194]. Je nach Bedingungen dauert die Polarisierung der Zellmembran bis zu  $0,51 \mu\text{s}$  (von Startzeit  $0 \mu\text{s}$  bis  $0,51 \mu\text{s}$ ), danach folgen bis zu  $0,92 \mu\text{s}$  für die Bildung von Poren ( $0,51 \mu\text{s}$  bis  $1,43 \mu\text{s}$ ). Das Wachsen des Porenradius nimmt dann die restliche Zeit bis zu einer vollen Millisekunde in Anspruch [98]. Soll eine letale Wirkung durch dauerhafte Öffnung der Poren erreicht werden, so muss die Pulsdauer größer sein als die Summe der Zeitkonstanten für die Einstellung der Polarisierung und für das Erreichen des kritischen Porenradius.

Die Effizienz der Keimzahlreduktion einer Elektroimpulsbehandlung hängt von einer großen Zahl variabler Parameter ab. Je nach Zellwand- und Membranbeschaffenheit, aber auch je nach Zellgröße und Zellform kann es zu unterschiedlichen Sensitivitäten gegenüber dem externen elektrischen Feld kommen. So geht die Einstein-Smoluchowsky-Gleichung zur Berechnung der Porenbildungsdynamik nur von einem vereinfachten Modell einer kugelförmigen Zelle mit einer einfachen Zellmembran aus. Aufgrund des komplexeren Aufbaus realer biologischer Zellmembranen (z. B. mehrere Peptidoglycanschichten) sind die Ergebnisse der Elektroimpulsbehandlung organismusabhängig und nicht zu verallgemeinern.

Studien haben bewiesen, dass sich große Zellen (z. B. Hefezellen) und gramnegative Zellen (z. B. Pseudomonaden) durch PEF viel leichter abtöten lassen als grampositive Zellen mit einer vergleichsweise dicken Zellwand, wie z. B. Enterokokken [8, 30, 69, 120]. Bei größeren Zellen wird schon durch geringere externe Feldstärken die Größe des kritischen Transmembranpotenzials erreicht [8, 115, 211]. Sie lassen sich somit besser abtöten als kleinere Zellen.

Auch das Wachstumsstadium, in dem sich die Bakterienzellen befinden, ist entscheidend für die Keimzahlreduktion. So sind Bakterien, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befinden, viel anfälliger gegenüber Elektroimpulsbehandlung als Bakterienzellen, die sich in der stationären Wachstumsphase befinden [30, 69, 138].

Zelleigenschaften und Prozessparameter wie Feldstärke, Pulsdauer und Pulsanzahl spielen bei der Abtötung ebenso wie Millieubedingungen eine große Rolle. Dazu zählen z. B. die Leitfähigkeit des Mediums, der pH-Wert oder auch die Temperatur, bei der die Elektroimpulsbehandlung stattfindet. Gerade der Temperatur wird eine entscheidende Rolle in der Abtötung durch Elektroimpulsbehandlung zugeordnet, denn das kritische Membranpotenzial wird mit steigender Temperatur um Faktor 2 heruntersetzt. Somit werden bei höheren Temperaturen die Bakterien besser abgetötet als bei niedrigeren Temperaturen [30, 138, 191].

Es existieren verschiedene Modelle über prinzipielle Gesetzmäßigkeiten der Abtötung mittels Elektroimpulsbehandlung, jedoch gibt es keine quantitativen Werte für Abtötungsraten abhängig von den Behandlungsparametern. Diese können nach derzeitigem Stand nur experimentell bestimmt werden.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Geräte und Hilfsmittel

- Abzug (Köttermann, Uetze-Hänigsen)
- Analysewaagen
  - Scout 200II (Ohaus, Kirchheim)
  - Kern 770 (Kern und Sohn GmbH, Balingen-Frommern)
- Antibiotikastempel (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg)
- BBL-Crystal Auswerteeinheit (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg)
- BBL-Crystal GP System (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg)
- Brutschränke
  - 37 °C (WTC Binder, Tuttlingen)
  - 42 °C (Heraeus Instruments GmbH, Düsseldorf)
- Chef DRIII PFGE-Gerät (Bio-Rad, München)
- Cryobank Einfrierröhrchen (Mast Diagnostica GmbH, Reinfeld)
- Datenbanken und Software:
  - BBL-Crystal Auswertungssoftware (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg)
  - DIN (Deutsches Institut für Normung), Internetseite: <http://www.din.de>
  - DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH), Internetseite: <http://www.dsmz.de>
  - DTG (Deutsche Transport-Genossenschaft Binnenschifffahrt eG), Internetseite: <http://www.dtg-eg.de>
  - EARSS (The European Antimicrobial Resistance Surveillance System), Internetseite: <http://www.rivm.nl/earss/>
  - GelCompar II Version 4.5 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgien)
  - PubMed, Internetseite: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>
  - SARI (Surveillance of antibiotic use and resistance in Intensive Care Units), Internetseite: <http://sari.ipse-freiburg.de>
  - Universitätsbibliothek, Internetseite: <http://www.ub.uni-mainz.de>
  - Wikipedia, freie Internet-Enzyklopädie, Internetseite: <http://de.wikipedia.org>
- Densimeter Densimat (BioMerieux Deutschland GmbH, Nürtingen)



- Elektroimpulsanlage (Eisenmann GmbH, Holzgerlingen)
- Geldokumentationseinheit BioDoc Analyze Ti5 (Biometra, Göttingen)
  - Bedienungssoftware BioDoc Analyze 2.1 (Biometra, Göttingen)
- Gefrierschrank, -20 °C (Liebherr, Biberach)
- Gießformen Disposable Plug Mold (Bio-Rad, München)
- Kühlschränke (VWR International GmbH, Darmstadt und Liebherr, Biberach)
- Leitfähigkeitsmessgerät Conductivitymeter HI 8733 (Hanna Instruments Deutschland GmbH, Kehl am Rhein)
- Magnetrührer Poly 15 (Variomag, Daytona Beach, USA)
- Magnetrührer mit Heizelement RCTbasic (IKA-Labortechnik, Staufen)
- Mikrowelle (LG Electronics Deutschland GmbH, Willich)
- Nephelometer Crystal Spec™ (Becton-Dickinson GmbH, Heidelberg)
- Oszilloskop TDS 1002B (Tektronix, Beaverton, USA)
- Pumpen:
  - Membranpumpe zur Probenfiltration N820.3FT.18 (KNF Neuberger, Freiburg)
  - Membranpumpe der Elektroimpulsanlage Primus 221 (Alldos GmbH, Pfinztal)
  - Tauchpumpe zur Entnahme von Wasserproben Best One MA (Ebara, Brendola, Italien)
- Schöpf-Spindel
- Schüttler HS 501 D (Janke & Kunkel, Staufen)
- Schüttelinkubator Certomat IS (B. Braun AG, Melsungen)
- Thermoheizblock (Haep Labor Consult, Bovenden)
- Thermometer Qtemp 200 (VWR International GmbH, Darmstadt)
- Ultraschallbad Branson 3210 (Branson, Danbury, USA)
- Vortexer Reax 1R (Heidolph, Schwabach)
- Zentrifuge 5451 D (Eppendorf GmbH, Hamburg)

### **3.1.2 Verbrauchsmaterialien**

- Bechergläser
  - 25 ml, 50 ml und 100 ml (Schott Duran, Mainz)
  - 3000 ml (Simax, Tschechien)
- Drigalski-Glasspatel (VWR International GmbH, Darmstadt)
- Einmalhandschuhe Purple Nitrile (Kimberly-Clark, Mainz)
- Einmaltupfer (VWR International GmbH, Darmstadt)

- Eppendorfggefäße 1,5 ml und 2 ml (Eppendorf GmbH, Hamburg)
- Epsilometer-Teststreifen (AB Biodisk, Solna, Schweden)
  - Vancomycin, Gradient zwischen 0,016 und 256 µg/ml Vancomycin
- Erlenmeyerkolben 25 ml, 50 ml und 100 ml (Schott Duran, Mainz)
- Filtrationseinheit
- Filteraufsatz (Sartorius Membranfilter GmbH, Göttingen)
- Saugflasche Pyrex (Millipore GmbH, Eschborn)
- Glasflaschen 100 ml (Schott Duran, Mainz)
- Impfösen, steril, 1 µl und 10 µl (VWR International GmbH, Darmstadt)
- Kunststofffässer 60 l und 100 l
- Kunststoffröhrchen 15 ml (VWR International GmbH, Darmstadt)
- Magnetrührfische (VWR International GmbH, Darmstadt)
- Messzylinder 100 ml aus Glas (Schott Duran, Mainz)
- Pinzetten (VWR International GmbH, Darmstadt)
- Pipetten 10 µl, 100 µl und 1000 µl (Eppendorf GmbH, Hamburg)
- Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl und 1000 µl (Eppendorf GmbH, Hamburg)
- Reagenzglasständer (VWR International GmbH, Darmstadt)
- Skalpell (VWR International GmbH, Darmstadt)
- Sterilfilter, Porengröße 0,45 µm, ø 47 mm (Millipore GmbH, Eschborn)
- Vernichtungsbeutel PP 300 x 200mm (VWR International GmbH, Darmstadt)

### **3.1.3 Chemikalien**

- Agarose:
  - Embedding Agarose (Plugherstellung, Gene Path Kit, Bio-Rad, München)
  - PeqGold Pulsed Field Agarose (PFGE-Gele, PeqLab, Erlangen)
- Amoxicillin (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München)
- Antibiotika-Testplättchen Sensi Disc (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg)
- Borat (Roth, Karlsruhe)
- Brij® 58 (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München)
- Di-Natrium-EDTA, Di-Natrium-Ethylendiamintetraacetat (Merck, Darmstadt)
- Di-Natriumhydrogenphosphat (Fluka, Neu Ulm)
- Ethidiumbromid-Lösung [10 mg/ml] (Roth, Karlsruhe)
- Formaldehyd, 37 %ige Stammlösung (AppliChem, Darmstadt)
- Lysozym [47 U/mg] (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München)

- Natriumchlorid (Merck, Darmstadt)
- Natriumchlorid Salztabletten, SalineTablets (Oxoid GmbH, Wesel)
- Na-Desoxycholate (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München)
- Natriumdihydrogenphosphat (Fluka, Neu Ulm)
- Natriumhydroxid (Fluka, Neu Ulm)
- N-Laurolylsarcosine (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München)
- Restriktionsenzym *Sma*I [10 U/ $\mu$ l] (Fermentas, St. Leon-Rot)
- Salzsäure (USB-Amersham, Braunschweig)
- Tris, Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Boehringer, Ingelheim)
- Tris-HCl, Tris-hydrochlorid (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München)
- Vancomycin (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München)

### 3.1.3.1 Puffer und Lösungen

- ◆ Agarosegel (PFGE) [1 %ig]

PeqGold Agarose .....	1,1 g
TBE-Puffer (0,5x).....	110 ml

- ◆ EC-Puffer (pH 7,5):

Brij ® 58.....	5,0 g
Di-Natrium-EDTA.....	37,0 g
Natriumchlorid .....	58,0 g
Na-Desoxycholate .....	2,0 g
N-Laurolylsarcosine .....	5,0 g
Tris-HCl .....	0,95 g
dH <sub>2</sub> O .....	ad1000 ml

Der pH-Wert wurde mit Natriumhydroxid eingestellt. Anschließend wurde der Puffer für 15 min bei 121 °C autoklaviert.

◆ Ethidiumbromidlösung [1 µg/ml]

Ethidiumbromid.....	50 µl
TBE-Puffer (0,5x).....	ad 500 ml

◆ Lysozymbilösung [25 mg/ml]

Lysozym (lyophilisiert) .....	25,0 mg
Tris-HCl (10 mM) .....	1,0 ml

◆ NaCl-Fertiglösung, steril, 3 ml [0,85 %] (BioMerieux, Frankreich)

◆ NaCl-Lösung

dH <sub>2</sub> O .....	1000 ml
NaCl-Tabletten .....	2 Stück

Die 0,9 %ige Lösung wurde in Reagenzgläser zu 9 ml abgefüllt und anschließend bei 121 °C für 15 min autoklaviert.

◆ PBS-Lösung (Phosphate-Buffered-Saline)

Angaben pro 1 l deionisiertes Wasser:

Di-Natriumhydrogenphosphat.....	1,39 g
Natriumdihydrogenphosphat.....	318 mg
Natriumchlorid .....	9,0 g

Der pH-Wert wurde nach der Herstellung auf 7,2 mit Natriumhydroxid bzw. Salzsäure eingestellt. Anschließend wurde der Puffer bei 121 °C für 15 min autoklaviert.

◆ Proteinase K (Gene Path Universal Module, Bio-Rad Labs, USA)

◆ Proteinase K Puffer (Gene Path Universal Module, Bio-Rad Labs, USA)

◆ Restriktaselösung (Einzelansatz)

10 x Y+/Tango-Puffer mit BSA .....	10,0 µl
Enzym <i>Sma</i> I (10 U/µl) .....	1,2 µl
dH <sub>2</sub> O .....	89 µl

◆ TBE-Puffer 10x (Tris-Borat-EDTA)

Borat .....	55,0 g
Di-Natrium-EDTA .....	7,44 g
Tris .....	107,8 g
dH <sub>2</sub> O .....	ad 1000 ml

Der Puffer wurde für 15 min bei 121 °C autoklaviert.

◆ TBE-Puffer 0,5x (Tris-Borat-EDTA)

TBE-Puffer (10x) .....	105 ml
dH <sub>2</sub> O .....	ad 2100 ml

Der Puffer wurde für 15 min bei 121 °C autoklaviert.

◆ TE-Puffer pH 8,0 (Tris-EDTA):

Di-Natrium-EDTA .....	0,37 g
Tris .....	1,21 g
dH <sub>2</sub> O .....	ad 1000 ml

Der pH-Wert wurde mit Salzsäure eingestellt. Anschließend wurde der Puffer für 15 min bei 121 °C autoklaviert.

- ◆ TEN-Puffer (Tris-EDTA-Natriumchlorid) pH 7,5:

Di-Natrium-EDTA.....	37 g
Natriumchlorid .....	8,7 g
Tris .....	12,12 g
dH <sub>2</sub> O.....	ad 1000 ml

Der pH-Wert wurde mit Natriumhydroxid eingestellt. Anschließend wurde der Puffer für 15 min bei 121 °C autoklaviert.

- ◆ TEN-Formaldehyd-Lösung (3,7 %ig)

TEN-Puffer.....	90 ml
Formaldehyd-Lösung 37 %ig.....	10 ml

- ◆ Y+/Tango-Puffer mit BSA 10x (Fermentas, St. Leon-Rot)
- ◆ Zellsuspensionspuffer (Gene Path Universal Module, Bio-Rad Labs, USA)

### 3.1.3.2 Verwendete Nährmedien

#### Feste Nährböden

- ◆ Caseinpepton-Sojamehlpepton (Caso)-Agar (Oxoid GmbH, Wesel)

Herstellerangaben pro 1 l deionisiertes Wasser:

Agar.....	15,0 g
Caseinpepton .....	15,0 g
Natriumchlorid .....	5,0 g
Sojamehlpepton.....	5,0 g

◆ Columbia-Blutagar mit CNA (Heipha GmbH, Eppelheim)

Herstellerangaben pro 1 l deionisiertes Wasser:

Agar .....	15,0 g
Colistin .....	10,0 mg
Nalidixinsäure .....	15,0 mg
Natriumchlorid .....	5,0 g
Schafblut.....	80,0 ml
Spezialpepton .....	23,0 g
Stärke .....	1,0 g

◆ Columbia-Blutagar mit Schafblut (Oxoid GmbH, Wesel)

Herstellerangaben pro 1 l deionisiertes Wasser:

Agar .....	10,0 g
Natriumchlorid .....	5,0 g
Schafblut.....	50,0 ml
Spezialpepton .....	23,0 g
Stärke .....	1,0 g

◆ Mueller-Hinton Agar (Oxoid GmbH, Wesel)

Herstellerangaben pro 1 l deionisiertes Wasser:

Agar .....	17,0 g
Caseinhydrolysat .....	17,5 g
Rindfleisch, getrocknete Infusion aus 300 g .....	2,0 g
Stärke .....	1,5 g

◆ Slanetz-Bartley-Agar (Oxiod GmbH, Wesel)

Herstellerangaben pro 1 l deionisiertes Wasser:

Agar .....	10,0 g
Dikaliumhydrogenphosphat .....	4,0 g
Glucose .....	2,0 g
Hefeextrakt .....	5,0 g
Natriumazid .....	0,4 g
Tryptose.....	20,0 g
2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid.....	0,1 g

◆ Vancomycin-Enterococcosel-Agar (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg)

Herstellerangaben pro 1 l deionisiertes Wasser:

Agar .....	13,5 g
Ammonium Eisen (III)-citrat.....	0,5 g
Eskulin .....	1,0 g
Hefeextrakt .....	5,0 g
Natriumazid .....	0,25 g
Natriumchlorid .....	5,0 g
Natriumcitrat .....	1,0 g
Ochsengalle.....	10,0 g
Pankreatisch abgebautes Casein .....	17,0 g
Peptisch abgebautes Tiergewebe .....	3,0 g
Vancomycin .....	8 mg



### Flüssige Nährmedien

#### ◆ BHI (Brain Heart Infusion, Heipha GmbH, Eppelheim)

Das Medium wurde nach Herstellerangaben hergestellt (Angaben pro 1 l deionisiertes Wasser):

Glucose .....	2,0 g
Kalbshirninfus .....	12,5 g
NaCl .....	5,0 g
Pepton .....	10,0 g
Phosphatpuffer .....	2,5 g
Rinderherzinfus .....	5,0 g

37,0 g des fertigen Pulvers wurden in 1 l deionisiertes Wasser eingerührt und anschließend bei 121 °C für 15 min autoklaviert.

#### ◆ Enterococcosel-Bouillon (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg)

Das Medium wurde nach Herstellerangaben hergestellt (Angaben pro 1 l deionisiertes Wasser):

Ammonium Eisen (III)-citrat.....	0,5 g
Eskulin .....	1,0 g
Hefeextrakt .....	5,0 g
Natriumazid .....	0,25 g
Natriumchlorid .....	5,0 g
Natriumcitrat .....	1,0 g
Ochsengalle.....	10,0 g
Pankreatisch abgebautes Casein .....	17,0 g
Peptisch abgebautes Tiergewebe .....	3,0 g

Zur Herstellung der benötigten doppelt-konzentrierten Bouillon wurden 86 g des Pulvers in 1 l deionisiertes Wasser eingerührt und anschließend bei 121 °C für 15 min autoklaviert.

### 3.1.4 Referenzstämme und getestete Isolate

#### 3.1.4.1 Referenzstamm (für Resistenztestungen)

Für die Resistenztestungen wurde als Kontrolle der Vancomycin-sensible *Enterococcus faecium* ATCC 6057 (ATCC = American Type Culture Collection, USA) verwendet.

#### 3.1.4.2 Molekularer Größenstandard (für die Pulsfeld-Gelelektrophorese)

Verwendet wurde als Größenstandard bei der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) die DNA von *Staphylococcus aureus* NCTC 8325 (National Collection of Type Cultures, England). Eine Kolonie dieses Stamms wurde allen Arbeitsschritten der PFGE unterzogen (siehe Kapitel 3.2.1.6 Methoden, Pulsfeld-Gelelektrophorese), um so einen geeigneten Größenstandard für die PFGE herzustellen [195]. Nach enzymatischem Verdau durch das Restriktionsenzym *Sma*I ergab sich für den NCTC 8325-Stamm ein spezifisches Bandenmuster mit Bandengrößen zwischen 10 und 674 kb, welches für die Normierung der PFGE-Gele benutzt wurde.

#### 3.1.4.3 Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE)

##### VRE der Verwandtschaftsanalyse aus Patienten- und Umweltproben:

Die für die Genotypisierung verwendeten VRE stammten aus verschiedenen Umweltproben (Abwasser und Oberflächenwasser) bzw. Patientenproben (Patienten der Hämatologiestationen der Universitätsmedizin Mainz), die zwischen 2004 und 2009 gesammelt wurden. Dazu zählten 196 Vancomycin-resistente *Enterococcus faecium* (VREf) von Patienten, 146 VREf aus Abwasserproben und 133 VREf aus Oberflächenwasserproben (siehe Kapitel 3.2.1 Methoden). Unter den VREf befanden sich sowohl solche, die während Ausbruchssituationen isoliert wurden (VRE 1 und VRE 2), als auch VREf aus ausbruchsfreien Zeiten. Dies erlaubte einen umfassenden Überblick über das Spektrum an verschiedenen VREf über einen längeren Zeitraum hinweg.

##### VRE der Elektroimpulsversuche:

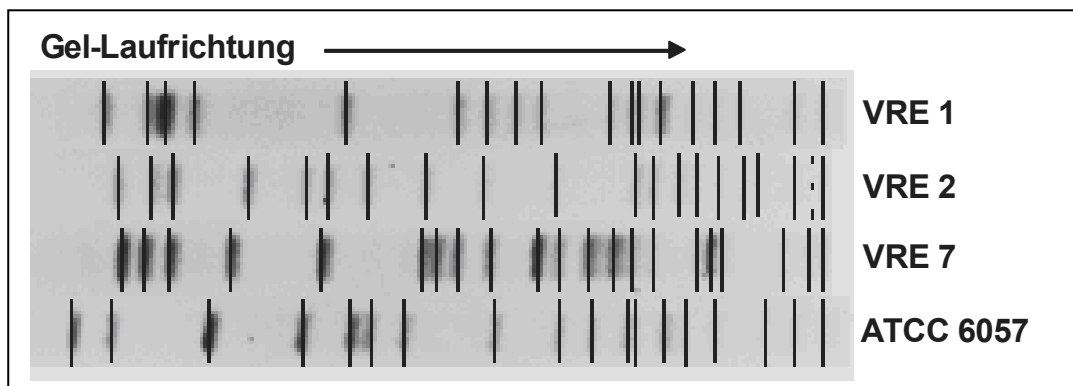
Die in der Elektroimpulsanlage untersuchten VRE (*Enterococcus faecium*) stammten aus Patientenproben der Hämatologiestationen der Universitätsmedizin Mainz und besaßen charakteristische PFGE-Bandenmuster (Abbildung 4). VRE 1 und VRE 2 wurden während zwei Ausbrüchen unter den Patienten in den Jahren 2004 und 2005

isoliert. Es handelte sich dabei um vorherrschende klonale Isolate, von denen, zu Zeiten dieser Ausbrüche, viele Patienten betroffen waren. VRE 7 war ebenfalls ein Patientenisolat, allerdings war dieser VRE nicht Teil eines Ausbruchs, sondern wurde lediglich bei einem einzigen Patienten nachgewiesen (Tab. 3 und Abb. 4).

Bezeichnung	Herkunft	Labornummer	Vancomycin MHK [mg/l]
ATCC 6057	Referenz	ATCC 6057	Sensibel (1,0)
VRE 1	Patient	KH 39/04	≥ 256
VRE 2	Patient	KH 39/05	48
VRE 7	Patient	KH 67/08	≥ 256

**Tabelle 3: Übersicht über die (resistenten) Enterokokken der Elektroimpulsversuche.**

Zusätzlich zu den VRE wurde auch der Referenzstamm ATCC 6057 in der Elektroimpulsanlage getestet (siehe Kapitel 3.2.2 Methoden, Untersuchungen zur Keimzahlreduktion von VRE durch Elektroimpulsbehandlung in Verbindung mit thermischem Einfluss). Abb. 4 zeigt die PFGE-Muster der für die Versuche verwendeten Enterokokken.



**Abbildung 4: PFGE-Muster von VRE 1, VRE 2, VRE 7 und Referenzstamm ATCC 6057.** Farben invertiert. Die teilweise sehr blassen Banden wurden durch das Computerprogramm und graphisch hervorgehoben.

### 3.1.5 Die Elektroimpulsanlage

Im Rahmen eines vom BMBF geförderten Drittmittelprojekts wurde von der Firma Eisenmann GmbH (Böblingen) eine Pilotbehandlungsanlage nach dem Elektroimpulsverfahren entwickelt und in Mainz zur Behandlung von Bakteriensuspensionen mit gepulsten elektrischen Feldern eingesetzt (Abb. 5).



Abbildung 5: Die Elektroimpulsanlage

#### 3.1.5.1 Aufbau und Funktion

In der Elektroimpulsanlage (3,60 m x 0,60 m x 2,50 m) konnte eine maximale Abwassermenge von 85,3 Litern pro Stunde behandelt werden. Der für die Behandlung benötigte Strom wurde durch die Kondensatoren zunächst gespeichert. Bei Erreichen der eingestellten Stromstärke zündete die Funkenstrecke (Überschlagspannung), und die beiden Elektroden im Reaktor wurden aufgeladen. Dadurch wurde im Reaktor ein gepulstes elektrisches Starkstromfeld erzeugt. Bedingt durch die Bauweise der Elektroimpulsanlage wurde die Flüssigkeit im Reaktor durch die Behandlung automatisch erwärmt. Die Interpretation der Ergebnisse erfolgte deshalb nur in Korrelation aus Temperatur und elektrischem Feld.

- *Membranpumpe*

Über eine Membranpumpe wurde das Abwasser durch die Reaktorkammer befördert. Nach Durchlaufen der Reaktorkammer verließ das Abwasser die Elektroimpulsanlage über einen Auslaufschlauch und wurde in einem Fass aufgefangen. Während aller durchgeführten Versuche förderte die Membranpumpe das Abwasser mit einer Förderleistung von 53,3 Litern pro Stunde durch die Elektroimpulsanlage.

- *Kondensatoren*

Zwischen den Elektroden der Reaktorkammer wurde ein gepulstes Starkstromfeld mit Hilfe von sechs in Reihe geschalteten Kondensatoren erzeugt. Sie wurden parallel mit Gleichstrom aufgeladen, und entluden sich dann anschließend über eine Funkenstrecke nacheinander (sog. Marx-Generatoren). Die Spannungen der einzelnen Kondensatoren addierten sich, wodurch elektrische Impulse im Hochspannungsbereich erzeugt werden konnten.



**Abbildung 6: Die sechs Kondensatoren.**

- *Funkenstrecke*

Bei der Funkenstrecke handelte es sich um einen Entladungsraum mit zwei Leitern (Elektroden), die sich in einem gasgefüllten Behälter gegenüber lagen (Abb. 7). Stieg die Spannung zwischen den Elektroden auf die Überschlagsspannung an, wurde das Gas im Entladungsraum ionisiert und somit leitfähig. Aufgrund der Stoßionisation wurde die Strecke innerhalb von Bruchteilen einer Mikrosekunde durch einen Funken kurzgeschlossen und die Kondensatoren entluden sich. Dadurch wurde in der Reaktorkammer ein elektrisches Feld zwischen den Elektroden erzeugt. Nach der

Entladung wurde die Funkenstrecke wieder nichtleitend, bis das elektrische Feld wieder soweit aufgeladen war, dass das Gas ionisiert wurde.

Auf die Überschlagspannung konnte durch zwei Parameter manuell Einfluss genommen werden. Entweder der Abstand zwischen den beiden Elektroden, oder der Luftdruck in der Entladungskammer wurden geändert. Während der Versuche wurde die Überschlagsspannung ausschließlich über den Luftdruck in der Funkenstrecke geregelt (über ein Bedienelement an der Anlagenvorderseite, Abb. 9). Eine Erhöhung des Luftdrucks hatte eine höhere Überschlagsspannung zur Folge.

**Abbildung 7: Die Funkenstrecke.**



- *Reaktorkammer*

Die Reaktorkammer (Abb. 8) bestand aus parallel angeordneten Edelstahl-Elektroden in einem stabilen Kunststoffgehäuse, zwischen denen das Abwasser senkrecht hindurch gepumpt wurde (von unten nach oben). In dieser Reaktorkammer wurden sog. Rechteckimpulse mit einer Pulszeit von 1-2  $\mu\text{s}$  erzeugt. Die Fläche der Elektroden betrug  $52 \text{ cm}^2$ . Aus dem Abstand zwischen den Elektroden von 0,8 cm ergab sich ein gesamtes Reaktorvolumen von  $41,6 \text{ cm}^3$ . Bei einer Förderleistung der Membranpumpe von 53,3 Litern pro Stunde, verweilte das Abwasser für 2,81 s im Reaktorgehäuse, und wurde in dieser Zeit elektrisch bepulst.

**Abbildung 8: Die Reaktorkammer.**  
Fließrichtung des Abwassers:  
von unten (Einlauf) nach oben (Auslauf)



- *Elektrische Feldstärke [kV/cm]*

Durch ein Oszilloskop wurde die Stärke des elektrischen Feldes in der Reaktorkammer vor und während der Versuche ermittelt. Angestrebt wurde eine Feldstärke zwischen 75 und 80 kV/cm, um bei den Bakterienzellen die kritische Membranspannung, die zum Zelltod führen soll, zu erreichen.

Auf die Höhe der Feldstärke konnte nur indirekt, über den Druck in der Funkenstrecke, Einfluss genommen werden. Erhöhung dieses Drucks führte zur Erhöhung der elektrischen Feldstärke und umgekehrt. Das Oszilloskop stellte die angelegte Spannung zwischen den Elektroden 250fach verringert dar. Deshalb musste der am Oszilloskop abgelesene Wert, von idealerweise 256 V, mit 250 multipliziert werden. Über den Druck in der Funkenstrecke wurde die Spannung zwischen den Elektroden zu Beginn der Versuche auf 64 kV eingestellt. Da sich die Feldstärke aus der Spannung pro Flächenabstand berechnet, musste die abgelesene Spannung nochmals durch den Abstand zwischen den beiden Elektroden (0,8 cm) geteilt werden. Somit entsprachen die gemessenen 64 kV Spannung einer angelegten elektrischen Feldstärke von 80 kV/cm (64 kV/0,8 cm).

- *Bedienelemente*

Temperaturanzeige:

Die Temperatur des Abwassers in Ein- und Auslauf der Elektroimpulsanlage wurde mit Hilfe von zwei Thermometern gemessen und digital auf zwei Displays dargestellt (Abb. 9). Die Temperatur des Abwassers im Einlauf der Anlage konnte in Display 1, und die Temperatur des Abwassers im Auslauf konnte in Display 2 abgelesen werden.

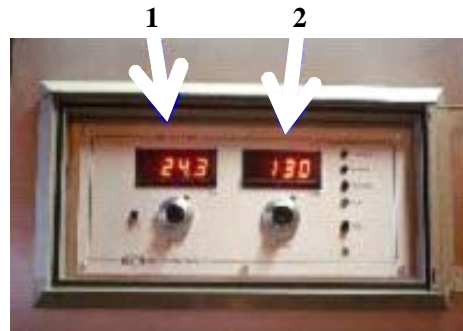
**Abbildung 9: Temperaturanzeige des Ein- und Auslaufs (1 und 2) und das Bedienelement der Elektroimpulsanlage (3, Steuerung der Membranpumpe und des Drucks in der Funkenstrecke).**



Überschlagspannung und Ladestromstärke:

Die Überschlagspannung und die Ladestromstärke wurden über dieses Bedienfeld ermittelt/geregelt (Abb. 10).

**Abbildung 10: Bedienelemente der Überschlagspannung (Pfeil 1) und der Ladestromstärke (Pfeil 2).**



Mit dem linken Drehknopf wurde die Höhe der Überschlagspannung [kV] bei jedem Versuch ermittelt und konnte anschließend im Display abgelesen werden. Bei der Überschlagspannung handelte es sich um eine variable Größe, die von der physikalischen Eigenschaft (z. B. Temperatur, Druck, Leitfähigkeit etc.) des verwendeten Abwassers abhing. Änderungen an der Überschlagspannung wurden nur über Änderungen des Drucks in der Funkenstrecke vorgenommen.

Der rechte Drehknopf regelte die Stromstärke [mA] der Elektroimpulsanlage. Der gewünschte Eintrag an spezifischer Energie in das Abwasser wurde zuvor mit Hilfe der bekannten Größe der Überschlagspannung in die einzustellende Ladestromstärke umgerechnet. Diese wurde dann über den Drehknopf an der Anlage eingestellt. Die Formel zur Berechnung der Ladestromstärke lautete:

$$\text{Ladestromstärke} = \text{spez. Energie} * D / V / 500$$

Die Ladestromstärke [A] wurde anhand der Formel aus der spezifischen Energie [J/ml], der Durchflussgeschwindigkeit D des Abwassers [l/h] und der Überschlagspannung V [kV] berechnet.



## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Isolierung und Charakterisierung von VRE aus Patienten- und Umweltproben

#### 3.2.1.1 Probenentnahme

- Patientenproben

Patienten der Hämatologiestationen der Universitätsmedizin Mainz werden regelmäßig auf Kolonisation mit VRE untersucht. Dazu wird den Patienten durch das medizinische Personal ein Analabstrich entnommen. Diese eingesandten Proben werden im Labor der Abteilung für Hygiene und Umweltmedizin auf das Vorhandensein von VRE hin untersucht (VRE-Screening). Alle in dieser Arbeit untersuchten Vancomycin-resistenten *Enterococcus faecium* (VREf) stammten aus diesem Screening der Patienten (von Januar 2004 bis Juni 2009). Die Reinkulturen der isolierten VREf wurden zur langfristigen Lagerung in Cryobank-Röhrchen eingerührt und bei – 80 °C im Gefrierschrank gelagert.

Nach der Genotypisierung durch die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) wurden zunächst alle Mehrfachisolate (gleiche Isolate desselben Patienten) verworfen. Von den restlichen 196 VREf von verschiedenen Patienten waren 106 klonal unterschiedliche VREf (VREf mit unterschiedlichen PFGE-Mustern). Diese wurden anschließend in die Verwandtschaftsanalyse mit einbezogen.

Unter diesen 106 VREf befanden sich auch zwei Isolate (VRE 1 und VRE 2), die in den Jahren 2004 und 2005 während zwei Ausbrüchen, verursacht durch VRE, auf den Hämatologiestationen der Universitätsmedizin Mainz isoliert wurden. Es handelte sich um vorherrschende Isolate, von denen in dieser Zeit viele Patienten betroffen waren. Ein Überblick über VREf von Patienten konnte somit in ausbruchsfreien Zeiten, genauso wie zu Zeiten von Ausbrüchen, gewonnen werden.

- Umweltproben:

Um die Situation von VREf aus der aquatischen Umwelt beurteilen zu können, wurden zwischen 2004 und 2008 Abwasserproben entlang des Abwasserpfades (Abwasser, Kläranlage, Vorfluter) und Oberflächenwasserproben aus den Flüssen Rhein und Main von verschiedenen Probestellen entnommen und auf das Vorhandensein von Vancomycin-resistenten *Enterococcus faecium* (VREf) hin untersucht.

### Abwasserproben der Universitätsmedizin Mainz (Probestelle B):

Die Abwasserproben der Universitätsmedizin Mainz wurden über einen Zeitraum von fünf Jahren aus einem Kanal auf dem Klinikgelände entnommen und auf das Vorkommen von VREf hin untersucht (Abb. 11, Stelle B). Dieser Kanal befindet sich auf der Rückseite des Gebäudes 505 (Chirurgie). In diesem Kanal fließen mehrere Abwasserstränge zusammen, u. a. auch das Abwasser der Hämatologie. Dieses war für die Untersuchungen von besonderem Interesse, da von den Patienten in diesem Gebäude auch die untersuchten Patienten-VREf stammten.

Die Abwasserproben aus dem Kanal wurden als Schöpfproben mit einer Schöpfspindel (steriles Probenentnahmegesäß an einem langen Seil) aus dem Kanal entnommen und in eine sterile Glasflasche gefüllt. Die entnommenen Proben wurden bis zu Beginn der Untersuchungen bei 6 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

### Abwasserproben der Kläranlage Mainz (Probestellen: C, D und E):

Über einen Zeitraum von fünf Jahren (2004 bis 2008) wurden turnusmäßig Wasserproben aus dem Klärwerk der Stadt Mainz (in Mainz-Mombach) entnommen (Abb. 11). Dieses Klärwerk verfügte über zwei verschiedene Zuläufe. In dem einen Zulauf (Einlass C) liefen das Abwasser aus dem Stadtgebiet Mainz, u. a. auch das der Universitätsmedizin, sowie verschiedene industrielle Abwässer zusammen. Der andere Zulauf (Einlass D) beinhaltete die Abwässer aus dem Wohngebiet Mainz-Mombach. Nachdem das Abwasser die Kläranlage durchlaufen hat, wurde es durch den Auslauf (E) in den Vorfluter des Rheins geleitet.

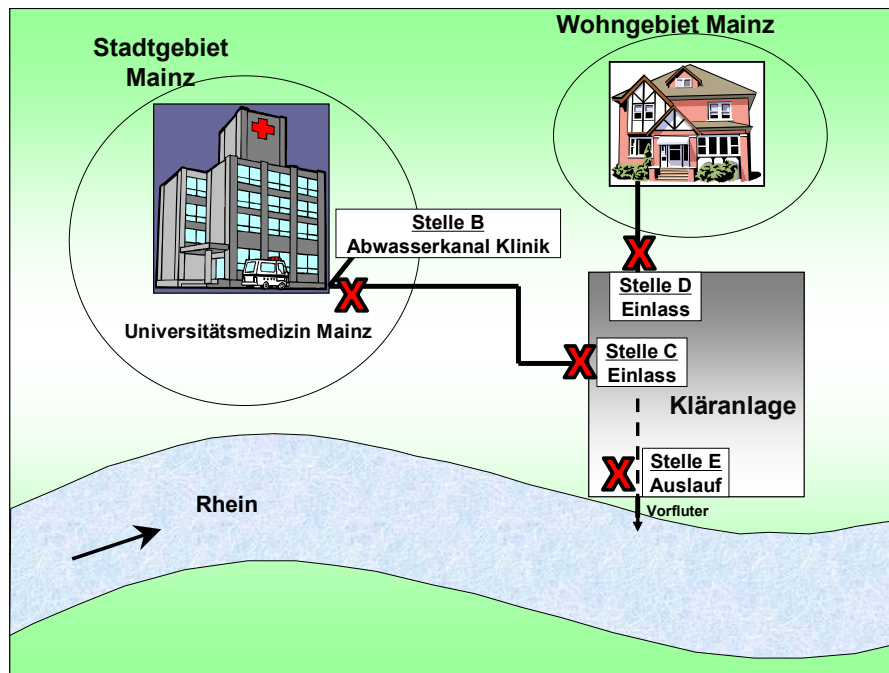
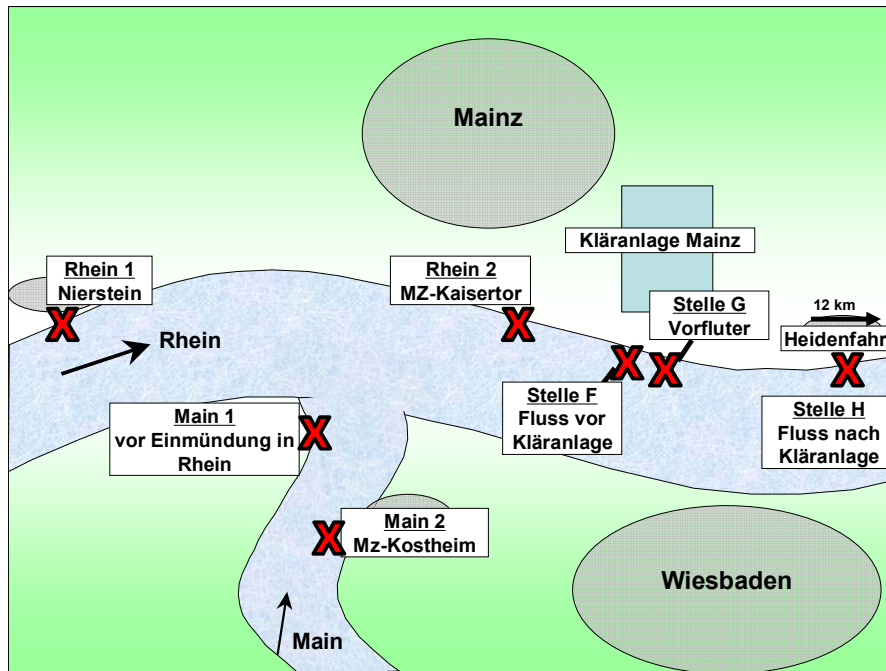


Abbildung 11: Schematische Darstellung der vier Entnahmestellen (rote Kreuze) von Abwasserproben in Mainz.

Die Kläranlage Mainz verfügte über ein automatisches Probenentnahmegesetz, mit dessen Hilfe die Abwasserproben an den Stellen C, D und E für die Untersuchungen entnommen wurden. Dabei wurden jeweils über einen Zeitraum von 4 h kleine Mengen an Abwasser an den Probestellen entnommen und in einer sterilen Literflasche gesammelt (Sammelproben). Die entnommenen Abwasserproben wurden bis zu Beginn der Untersuchungen bei 6 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

Oberflächenwasserproben (Probestellen: F, G, H, Rhein 1 und 2; Main 1 und 2):

Für die Untersuchungen am Rhein, in der Nähe von Mainz, wurden fünf Probestellen (linksrheinisch) ausgewählt (Abb. 12). Die erste Probestelle befand sich oberhalb der Mündung des Mains in den Rhein bei Nierstein (Rheinkilometer 482, Quelle DTG). Die zweite Probestelle lag unmittelbar unterhalb der Einmündung des Mains in den Rhein am Kaisertor in der Mainzer Neustadt (Rheinkilometer 499). Weitere zwei Probestellen am Rhein befanden sich direkt vor dem Auslauf des Klärwerks Mainz (Vorfluter, Probestelle G, Rheinkilometer 502) bzw. ca. 500 m davor flussaufwärts (Probestelle F). 12 km flussabwärts bei Heidenfahrt lag Stelle H (Rheinkilometer 514). Zur Probenentnahme wurde mit einem sterilen Schöpfgefäß jeweils ein Liter an der jeweiligen Probestellen entnommen und in eine sterile Glasflasche abgefüllt (Schöpfprobe).



**Abbildung 12: Schematische Darstellung der sieben Entnahmestellen (rote Kreuze) von Oberflächenwasserproben aus den Flüssen Rhein und Main. Mz = Mainz.**

Die entnommenen Wasserproben wurden bis zu Beginn der Untersuchungen bei 6 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

An Rheinkilometer 496,6 mündet der Main in den Rhein. Zur Entnahme von Oberflächenwasserproben aus dem Main wurden zwei Entnahmestellen relativ kurz vor der Mündung festgelegt (Abb. 12). Diese Probestellen lagen ca. 500 m (linke Mainseite) und 1,5 km (rechte Mainseite, bei Mainz-Kostheim) vor der Einmündung des Mains in den Rhein. Zur Probenentnahme wurde mit einem sterilen Schöpfgefäß jeweils ein Liter an der jeweiligen Probestellen entnommen und in sterile Glasflaschen abgefüllt (Schöpfproben). Die entnommenen Wasserproben wurden bis zu Beginn der Untersuchungen bei 6 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

### 3.2.1.2 Keimzahlbestimmung durch Kultivierungsmethoden

Zur Bestimmung der Anzahl der kultivierbaren Bakterien (Koloniebildende Einheiten, KBE) in den Wasserproben wurden diese in einer dezimalen Verdünnungsreihe auf verschiedenen Nährböden kultiviert. Dazu wurde 1 ml der zu untersuchenden Probe in 9 ml sterile NaCl-Lösung eingerührt und durch schütteln gut durchmischt. Dies entsprach einer zehnfachen Verdünnung ( $10^{-1}$ ). Aus dieser Verdünnung wurde wieder 1 ml entnommen und in 9 ml sterile NaCl-Lösung gegeben und gut durchmischt. Somit erhielt man eine hundertfache Verdünnung ( $10^{-2}$ ). Dieser Schritt

wurde noch viermal wiederholt, bis eine Verdünnung von  $10^{-6}$  erreicht war. Anschließend wurden aus jeder Verdünnungsstufe 100  $\mu$ l auf verschiedene Nährböden mit einem Glasspatel ausplattiert. Aus der unverdünnten Wasserprobe wurden ebenfalls 1000  $\mu$ l und 100  $\mu$ l auf die Nährböden ausplattiert. Zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl in der Wasserprobe wurde Caso-Agar verwendet. Die Keimzahl der Enterokokken wurde mit Slanetz-Bartley-Agar und die Keimzahl der VRE mit Enterococcosel-Agar ermittelt. Je nach Nährboden wurden die ausplattierten Wasserproben bei 37 °C bzw. 42 °C in einem Brutschrank bebrütet. Nach 48 h wurden alle mit dem Auge sichtbaren Kolonien auf den Nährböden ausgezählt.

Die Anzahl der Kolonien aller aufeinander folgenden und zählbaren (bis 500 Kolonien) Verdünnungsstufen (meistens drei) wurden auf KBE/ml entsprechend der Verdünnung hochgerechnet. Dann wurde der Mittelwert der aufeinander folgenden Verdünnungsstufen gebildet und als Keimzahl der kultivierbaren Bakterien verwendet.

### 3.2.1.3 Anreicherung der VRE in den Wasserproben

VRE sind oftmals, gerade in Oberflächenwasser, in so geringen Keimzahlen vorhanden, dass sie nur anhand eines anreichernden Mediums isoliert werden können. Die Anreicherung wird mit einem flüssigen Medium (Bouillon) durchgeführt, das speziell auf die zu isolierenden Bakterien abgestimmt ist und selektierende Substanzen enthält. Die Anreicherung der Wasserproben der eigenen Versuche erfolgte mit Enterococcosel-Bouillon (siehe Kapitel 3.1.3.2 Verwendete Nährmedien). Um ein breites Spektrum an VRE isolieren zu können, wurden zur Untersuchung jeder Wasserprobe jeweils drei Anreicherungen Enterococcosel-Bouillon mit dem Zusatz von Vancomycin, oder der Kombination aus Vancomycin und Amoxicillin, in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt (Tab. 4).

Anreicherung 100 ml	Zusatz- Antibiotikum	Einwaage Antibiotikum [mg]	Einsatzkonzentration [ $\mu$ g/ml]
1	Vancomycin	6,4	64
2	Vancomycin	12,8	128
3	Vancomycin und Amoxicillin	12,8 (Vancomycin) und 1,6 (Amoxicillin)	128 (Vancomycin) und 16 (Amoxicillin)

**Tabelle 4: Verwendete Anreicherungen aus Enterococcosel-Bouillon und dem Zusatz von Antibiotika bei Wasserproben.**

In Voruntersuchungen bezüglich der MHK von Enterokokken wurde bewiesen, dass durch die Verwendung der Enterococcosel-Bouillon (im Gegensatz zu der Müller-

Hinton-Bouillon) die MHK um eine Stufe (z. B. von 32 µg/ml auf 64 µg/ml) erhöht wird. Mit den Anreicherungen 1 und 2 (64 bzw. 128 µg/ml Vancomycinkonzentration) sollten Enterokokken mit einer MHK von 32 bzw. 64 µg/ml oder höher aus den Wasserproben selektiert werden.

Die Anreicherung mit Vancomycin und Amoxicillin in Kombination diente speziell der Isolierung von VRE aus dem Krankenhausumfeld, die häufig Resistenzen gegen Beta-Lactam-Antibiotika aufweisen (Amoxicillin gehört wie Ampicillin zu den  $\beta$ -Lactam-Antibiotika, ist aber in Flüssigkeiten besser löslich). Da auch die beiden VREf (VRE 1 und VRE 2), die während zwei Ausbrüchen isoliert wurden, gegen Amoxicillin resistent waren, wurde diese Anreicherung auch eingesetzt, um das Vorhandensein dieser Patientenisolate in den Wasserproben besser nachweisen zu können.

Zur Verarbeitung der Wasserproben wurden zunächst die beiden Antibiotika Vancomycin und Amoxicillin (siehe Tab. 4) abgewogen und in 50 ml doppelt konzentrierter Enterococcosel-Bouillon gelöst. Anschließend wurden 50 ml der gut durchmischten Wasserprobe in einem Messkolben abgemessen und zu den 50 ml doppelt konzentrierter und bereits mit Vancomycin (und Amoxicillin) versetzter Enterococcosel-Bouillon gegeben. Die Inkubation erfolgte für 48 h bei 37 °C auf einem Schüttler.

Von den Oberflächenwasserproben wurden zusätzlich jeweils 100 ml steril filtriert, um so die Bakterien im Wasser auf dem Filter zu konzentrieren. Dazu wurde pro Probenansatz eine Filtrationseinheit mit einem Membranfilter verwendet. Dieser Filter wurde anschließend mit einer Pinzette in die vorbereitete Flasche mit Enterococcosel-Antibiotikum-Lösung und 50 ml Probe gegeben. Um die Bakterien wieder von dem Filter zu lösen, wurden die Probeflaschen 1 min im Ultraschallbad behandelt. Danach folgte die Inkubation für 48 h bei 37 °C im Brutschrank auf einem Schüttler.

Waren in der Wasserprobe resistente Enterokokken enthalten, reicherten sie sich in der Bouillon an und hydrolysierten das darin enthaltene Eskulin. Durch den Komplex aus Eisenionen und hydrolysiertem Eskulin verdunkelte sich die Bouillon anschließend von hellbraun zu schwarz. Nach 24 h und 48 h wurden die Proben auf das Vorhandensein von VRE hin überprüft. Zusätzlich zur optischen Auswertung (Kontrolle der Schwarzfärbung) wurde ein steriler Tupfer in die Bouillon getaucht und auf einem Viertel einer Columbia-Blutagarplatte mit CNA verteilt. Bei dieser Blutagarplatte handelte es sich um einen Selektivagar für grampositive Bakterien, der

das Wachstum der störenden gramnegativen Begleitflora durch Colistin und Nalidixinsäure unterdrückte. Durch Ausstreichen der aufgetragenen Bouillon mit einer sterilen Impföse wurden die Bakterien durch einen 3-Ösenausstrich vereinzelt, damit nach Bebrütung (bei 37 °C für 24 h) Einzelkolonien sichtbar wurden.

- Gewinnung von Reinkulturen

Nach 24 h Bebrütungszeit wurden morphologisch charakteristische VRE-Kolonien von den CNA-Blutagarplatten einzeln mit einer Impföse abgenommen und auf einer frischen Blutagarplatte ausgestrichen (Einzelkolonievermehrung). Charakteristische VRE-Kolonien waren überwiegend weiße bis hellgraue, glatte Kolonien, die auf dem Agar meistens  $\alpha$ -Hämolyse (Vergrünung der Hämolysezone, unvollständiger Abbau der Erythrozyten) bzw.  $\gamma$ -Hämolyse (keine sichtbare Hämolysezone) aufwiesen.

Von den Blutagarplatten wurden alle morphologisch verschiedenen Kolonien isoliert. Waren mehrere morphologisch gleiche Kolonien vorhanden, wurden davon je sechs Kolonien isoliert, um ein möglichst standardisiertes Vorgehen bei allen Wasserproben zu erreichen. Die auf Columbia-Blutagarplatten ausgestrichenen Kolonien wurden anschließend bei 37 °C für 24 h angezüchtet.

- Identifizierung der Isolate

Die Identifizierung der Kolonien, also die Feststellung von Gattung und Art, erfolgte biochemisch mit dem BBL Crystal™ GP Systems für grampositive Bakterien. Dabei wurden anhand von Stoffwechselreaktionen (z. B. Zuckerverwertung) Rückschlüsse auf die Identität der Bakterien getroffen.

Dazu wurde eine Reinkultur mit einer sterilen Impföse in ein flüssiges Kulturmedium eingerührt. Mit einem Nephelometer wurde die Zellsuspension anschließend auf eine Dichte von 0,5 McFarland-Standard (entspricht ca.  $10^8$  Zellen/ml) eingestellt und in der Reaktionswanne verteilt. Diese Reaktionswanne enthielt zahlreiche Vertiefungen mit biochemischen Stoffen und Indikatoren. In diesen Vertiefungen fanden während der Bebrütungszeit von 24 h bei 37 °C Stoffwechselreaktionen statt, welche durch Farbumschlag sichtbar wurden. Mit der BBL-Auswertungssoftware konnte anschließend am Computer ausgewertet werden, um welches Bakterium es sich aufgrund der gezeigten Reaktionen handelte. Alle Enterokokken der Art *E. faecium* wurden anschließend einem Resistenztest unterzogen.

### 3.2.1.4 Langfristige Aufbewahrung der VRE

Um die VRE über einen langen Zeitraum aufbewahren zu können, wurden sie in Cryobank-Röhrchen als Reinkultur eingerührt und im Gefrierschrank bei -20 °C gelagert.

### 3.2.1.5 Resistenztestung

Die Resistenzen der isolierten Enterokokken gegen verschiedene Antibiotika wurden untersucht, indem mit allen Enterokokken der Epsilometertest und der Plattendiffusionstest durchgeführt wurden.

- **Epsilometertest**

Der Epsilometertest (E-Test) wurde verwendet, um von den isolierten Enterokokken die minimale Hemmkonzentration (MHK) von Vancomycin zu ermitteln. Die MHK entsprach der Konzentration an Vancomycin, bei der das Wachstum der Bakterien gerade gehemmt wird und mit bloßem Auge nicht mehr sichtbar ist. Die Resistenztestung wurde nach den Richtlinien der CLSI-Norm durchgeführt.

Von 24 h alten Reinkulturen wurde zunächst eine Keimsuspension in steriler NaCl-Lösung auf McFarland-Standard 0,5 (ca.  $10^8$  Zellen/ml) eingestellt. Mit einem sterilen Tupfer wurde diese Keimsuspension anschließend durch einen Netzausstrich flächendeckend auf eine Müller-Hinton-Agarplatte aufgetragen. Dann wurde mit einer sterilen Pinzette ein E-Teststreifen mit Vancomycin aus der Verpackung entnommen und auf die Agarplatte aufgelegt. Es handelte sich hierbei um einen Kunststoffstreifen auf den das jeweilige Antibiotikum in abfallenden Konzentrationen (Gradient) aufgebracht war. Bei dem E-Teststreifen mit Vancomycin reichte dieser Gradient von 0,016 bis 256 µg/ml Vancomycin. Nach dem Auflegen auf den Agar, diffundierte das Antibiotikum in die umliegenden Bereiche des Agars hinein. Dabei nahm die Antibiotikumkonzentration mit zunehmendem Abstand zu E-Teststreifen ab. Nach der Bebrütung der Agarplatten für 24 h bei 37 °C bildete sich gegebenenfalls eine elipsenförmige Zone (Hemmhof) um den E-Teststreifen, in der das Wachstum der Bakterienzellen gehemmt wurde. Anhand der auf dem E-Teststreifen abgebildeten Skala der Antibiotikumkonzentration konnte die MHK (in Höhe des Hemmhofs) abgelesen werden. War kein Hemmhof sichtbar, wurde das Wachstum der Bakterien überhaupt nicht gehemmt.



Laut den Bestimmungen des CLSI sind Enterokokken mit einer MHK von 8-16 µg/ml als Vancomycin intermediär resistent und größer oder gleich 32 µg/ml als Vancomycin-resistent eingestuft. Aus Wasserproben isolierte Enterokokken mit einer Resistenz gegen Vancomycin von 32 µg/ml oder mehr wurden anschließend dem Plattendiffusionstest unterzogen.

Die Resistenztestung der Patientenisolate wurde von Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt. Die aus den mikrobiologischen Befunden resultierenden Daten wurden anschließend übernommen.

- Plattendiffusionstest

Um unter den isolierten Enterokokken eine Vorauswahl für die anschließende Genotypisierung zu treffen, wurden alle Isolate einer Resistenztestung gegen mehrere Antibiotika unterzogen. So konnte für jedes Isolat ein spezifisches Antibiogramm (Resistenzmuster) erstellt werden. Pro Anreicherung einer Wasserprobe wurden nur zwei Isolate mit demselben Resistenzmuster durch die PFGE genotypisiert, um Mehrfachisolate auszuschließen.

Das Resistenzbild der Enterokokken wurde nach den Richtlinien der CLSI-Norm mit einem Plattendiffusionstest durchgeführt. Dabei wurde von 24 h alten Reinkulturen zunächst eine Keimsuspension in steriler NaCl-Lösung auf McFarland-Standard 0,5 (ca.  $10^8$  Zellen/ml) eingestellt, die mit einem sterilen Tupfer anschließend durch einen Netzausstrich flächendeckend auf eine Müller-Hinton-Agarplatte aufgetragen wurde. Mit einem Antibiotikastempel wurden dann Antibiotika-Testplättchen auf den Agar aufgebracht. Die Inkubation erfolgte für 24 h bei 37 °C im Brutschrank.

Die aufgetragenen Testplättchen waren jeweils mit einem Antibiotikum getränkt, welches in den Agar hinein diffundierte. Mit zunehmendem Abstand zu dem Testplättchen auf der Agarplatte verringerte sich auch die Antibiotikumkonzentration in den umliegenden Agarbereichen (Gradient). Nach Bebrütung bildete sich um das Testplättchen ein Hemmhof, in dem das Wachstum der Bakterienzellen durch das Antibiotikum unterdrückt wurde. Mit einer Schieblehre wurde nach 24 h der Durchmesser des Hemmhofes gemessen. Je nach Durchmesser (Richtwerte variierten von Antibiotikum zu Antibiotikum) wurden die Isolate dann als resistent, intermediär oder sensibel eingeteilt. Pro Enterokokkenisolat wurden insgesamt dreizehn verschiedene Antibiotika durch den Plattendiffusionstest getestet (Tab. 5).

Antibiotikum	Konzentration im Plättchen [µg]	Hemmhofdurchmesser [mm]	
		Resistent	Sensibel
Amoxicillin (AMX)	25	≤ 20	≥ 27
AMX+Clavulansäure	20 + 10	≤ 20	≥ 28
Ciprofloxacin	5	≤ 15	≥ 21
Erythromycin	15	≤ 16	≥ 21
Gentamycin	120	≤ 6	≥ 10
Imipinem	10	≤ 13	≥ 16
Linezolid	30	≤ 14	≥ 18
Sulfametroxazol + Trimethoprim	23,75 + 1,25	≤ 10	≥ 16
Synercid	15	≤ 15	≥ 19
Teicoplanin	30	≤ 10	≥ 14
Tetracyclin	30	≤ 16	≥ 22
Vancomycin	30	≤ 14	≥ 17

**Tabelle 5: Interpretations-Standards bei Enterokokken (nach CLSI).**

### 3.2.1.6 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

Die Genotypisierung der resistenten Enterokokkenisolate erfolgte mit Hilfe der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE). Sie stellt den „Goldenen Standard“ in der Überprüfung von Verwandtschaften und Identitäten bei Enterokokken dar [11, 204]. Der Arbeitsablauf umfasste folgende Arbeitsschritte:

- Anzucht der Isolate und Inaktivierung der DNase

Eine 24 h alte Einzelkolonie wurde von einer TSA-Agarplatte mit Hilfe einer sterilen Impföse abgenommen und in 5 ml BHI-Nährlösung eingerührt. Anschließend wurde die Nährlösung für 20 h bei 37 °C in einem Schüttelinkubator bebrütet. Nach der Bebrütung wurden 1,5 ml der Bakterienlösung mit einer Pipette in ein Eppendorfgefäß überführt und 3 min bei 13200 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und verworfen. Das Pellet wurde unter einem Abzug mit 1 ml TEN-Puffer und 3,7 % Formaldehyd mit der Pipette resuspendiert, in ein weiteres Eppendorfgefäß überführt und durch Schütteln gut durchmischt. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für 1 h.

- Herstellung der Agaroseblöckchen

Anschließend wurden die Proben für 2 min bei 13200 rpm erneut zentrifugiert, und der Überstand wurde verworfen. Es folgten mehrere Waschschrte, bei denen die

Größe des Pellets bestimmt wurde. Das Pellet sollte einen Durchmesser von ca. 3 mm haben. Falls es zu groß war, wurde resuspendiertes Material verworfen. Zunächst wurde das Pellet mit 1 ml TEN-Puffer resuspendiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 2 min bei 13200 rpm. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet mit 500 µl TEN-Puffer erneut resuspendiert und für 2 min zentrifugiert. Nachdem der Überstand entfernt war, wurde das gewaschene Pellet in 115 µl Zellsuspensionspuffer resuspendiert.

Zur Herstellung der Agaroseblöckchen wurde die Agarose (Embedding Agarose) durch Erhitzen verflüssigt und bei 55 °C in einem Thermoheizblock bereitgehalten. Zu dem bereits für mindestens 1 min auf 55 °C vorgewärmten, resuspendierten Pellet wurden 125 ml vorgewärmte Agarose und 10 µl Lysozymbilösung (25 mg/ml) gegeben und luftblasenfrei durchmischt. Das Gemisch aus Zellen, Zellsuspensionspuffer, Agarose und Lysozym konnte dann in die Gießformen gefüllt werden. Die Aushärtung erfolgte für 10 min bei 4 °C im Kühlschrank.

- Lyse der Zellwand und Deproteinisierung

Nachdem die Agaroseblöckchen ausgehärtet waren, wurden sie in 1,5 ml EC-Puffer mit 60 µl Lysozymbilösung (Endkonzentration 1 mg/ml) gegeben und bei 37 °C für mindestens vier Stunden im Thermoheizblock inkubiert. Anschließend wurde der Überstand mit der Pipette abgesaugt, und die Agaroseblöckchen wurden mit EC-Puffer gewaschen. Danach erfolgte eine Inkubation über Nacht in 1 ml Proteinase K Puffer mit 40 µl Proteinase K bei 55 °C im Thermoheizblock.

Am nächsten Tag wurden die Agaroseblöckchen in 10 ml gekühltem TE-Puffer für 30 min auf einem Schüttler gewaschen und anschließend mit einem Skalpell halbiert. Die eine Hälfte wurde als Rückstellprobe in TE-Puffer im Kühlschrank gelagert, die andere Hälfte wurde weiter verarbeitet. Es folgten zwei weitere Waschvorgänge für jeweils 30 min in 1 ml TE-Puffer. Zum Abschluss wurden die halben Agaroseblöckchen in 1 ml des 10fach verdünnten TE-Puffers für 30 min gewaschen.

- Restriktionsverdau

Zunächst wurde laut Herstellerangaben die Restriktase-Lösung hergestellt, in der anschließend die Agaroseblöckchen inkubiert wurden. Zu jedem halben Agaroseblöckchen wurden 100 µl dieser Lösung, bestehend aus dem Enzym *Sma*I (Konzentration 25 U pro Agaroseblöckchen) und Y<sup>+</sup>Tango-Puffer, gegeben. Die

Inkubation erfolgte für 6 h (über Nacht) bei 25 °C im Thermoheizblock. Nach der Restriktion wurde der Puffer entfernt und durch 1 ml TE-Puffer ersetzt. Darin wurden die Agaroseblöckchen im Kühlschrank bei 6 °C bis zur Bestückung eines Elektrophoresegels aufbewahrt.

- Pulsfeld-Gelelektrophorese

Für die Herstellung eines Elektrophoresegels wurden 1,1 g Agarose (PeqGold) abgewogen und in 110 ml des 2fach verdünnten TBE-Puffers in der Mikrowelle erhitzt, bis sich die Agarose vollständig verflüssigt hatte. Anschließend wurden 6 ml der Agarose in ein Kunststoffröhrchen abgefüllt und bei 55 °C im Thermoheizblock aufbewahrt. Die restliche Agarose wurde in den Gel-Laufblock des Chef-DRIII Gerätes gegossen. Anschließend wurde das Gel für 20 min im Kühlschrank ausgehärtet, bevor die beiden Größenstandards und die Agaroseblöckchen mit der enzymatisch verdauten DNA in die Geltaschen gegeben wurden.

Um Isolate auf verschiedenen PFGE-Gelen miteinander vergleichen zu können, musste eine Normierung durchgeführt werden, durch die die bestehenden Unterschiede im Laufverhalten der Gele ausgeglichen wurde. Dazu wurde ein molekularer Größenstandard verwendet, der bei jedem Gel als Referenz mitlief. Dessen spezifisches Bandenmuster und die Größe der Banden waren bekannt. Als Größenstandard wurde die durch das Restriktionsenzym *Sma*I geschnittene DNA von *Staphylococcus aureus* NCTC 8325 (National Collection of Type Cultures, England) verwendet, und jedem Gel in doppelter Ausführung beigefügt. Zur Herstellung des Größenstandards wurden alle Schritte der PFGE mit einer Kolonie dieses Stamms wie beschrieben durchgeführt. Die Agaroseblöckchen des Größenstandards wurden, genau wie die Agaroseblöckchen der Enterokokkenisolate, in die Geltaschen der Gele gegeben, welche anschließend mit den zuvor abgenommenen 6 ml Agarose luftblasenfrei verschlossen wurden. Für die PFGE wurden 2 l TBE-Puffer (0,5x) in das Chef DRIII PFGE-Gerät gefüllt und das hergestellte Gel in die Vorrichtung eingesetzt. Die PFGE wurde mit folgenden Parametern durchgeführt:

<b>Laufzeit:</b> .....	<b>21 h</b>
<b>Pulszeit:</b> .....	<b>linear von 1 s auf 20 s ansteigend</b>
<b>Spannung:</b> .....	<b>6 V/cm</b>
<b>Bepulswinkel:</b> .....	<b>120 °</b>
<b>Temperatur:</b> .....	<b>14 °C</b>

- Färbung und Dokumentation

Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 20 min in Ethidiumbromid-Lösung (Konzentration 1 µg/ml) gefärbt, kurz in Laufpuffer gewaschen und anschließend photographisch in der Geldokumentationseinheit dokumentiert.

### 3.2.1.7 Genotypisierung

Die Analyse der Restriktionsmuster erfolgte mit Hilfe der Computersoftware GelCompar II, Version 4.5 (Applied Maths, Belgien). Dabei wurden zunächst alle Dateien der PFGE-Gele in das Computerprogramm eingespeist und anschließend laut Programmanleitung des Herstellers verarbeitet (z. B. Normierung oder Bandenerkennung). Am Ende dieser Arbeitsschritte war für jedes VREf-Isolat ein spezifisches Bandenmuster in digitaler Form vorhanden, welche für die anschließende Verwandtschaftsanalyse benötigt wurden.

Insgesamt wurden ca. 1500 VREf mit Hilfe der PFGE genotypisiert. Darunter befanden sich auch Mehrfachisolate (genetisch identische Isolate). Nach Abzug dieser Mehrfachisolate konnten die restlichen 475 VREf weiterführend charakterisiert werden. Von diesen 475 VREf stammten 196 VREf von Patienten, 146 aus Abwasser und 133 aus Oberflächenwasser.

Zur Analyse der Restriktionsmuster wurde ein Dendrogramm (Baumdiagramm) erstellt, unter Verwendung des Dendrogrammtyps UPGMA (unweighted pair group method using average linkages, eine hierarchische Methode zur Clusterbildung) zusammen mit dem bandenbasierten Dice-Algorithmus. Dieses Dendrogramm, bestehend aus PFGE-Mustern von VREf, stellte die Verwandtschaften der Isolate untereinander dar (siehe 8.1 Anhang, Tab. A1). Pro Herkunftsbereich (Patient, Abwasser oder Oberflächenwasser) wurden nur unterschiedliche PFGE-Muster von VREf einbezogen, weswegen sich die ursprüngliche Gesamtanzahl von 475 VREf auf 294 reduzierte. Von den 294 Isolaten des Dendrogramms stammten 106 VREf von Patienten, 103 aus Oberflächenwasser und die restlichen 85 aus Abwasser.

Bei einem Verwandtschaftsgrad von 70 % wurden die VREf zur Benennung eingeteilt (Obergruppen A bis M). Ab einem Verwandtschaftsgrad von 80 % oder mehr wurden die VREf-Isolate als eng verwandt angesehen und in einer Gruppe zusammengefasst (Gruppenunterteilung der Obergruppen durch Zahlen). Eine festgelegte Prozentzahl, ab der zwei Isolate miteinander (eng) verwandt sind, ist aufgrund unterschiedlicher Versuchsbedingungen sowohl national als auch international nicht

festgelegt. Die 80 %-Grenze der eigenen Untersuchungen korrelierte mit der optischen Einteilung der Isolate nach den festgelegten Kriterien der Anzahl der Bandenunterschiede [180]. Laut Tenover *et. al.* [180] sind Isolate mit einem Bandenunterschied von sieben oder mehr Banden als nicht mehr verwandt anzusehen. Bis zu einem Bandenunterschied von sechs Banden, sind Isolate entweder als eng verwandt (bis drei Bandenunterschiede) oder als entfernt verwandt (bis sechs Bandenunterschiede) anzusehen. Basierend auf dieser Studie wurde somit die Grenze zwischen verwandt und nicht verwandt auf 80 % gesetzt.

### **3.2.2 Untersuchungen zur Keimzahlreduktion von VRE durch Elektroimpulsbehandlung in Verbindung mit thermischem Einfluss**

Ziel des Forschungsvorhabens waren Untersuchungen zur Keimzahlreduktion von VRE durch ein innovatives Verfahren auf der Basis der Elektroimpulstechnologie. Dabei wurde die Abtötung von klinisch relevanten Vancomycin-resistenten *Enterococcus faecium* (VREf) durch die Behandlung mit gepulsten elektrischen Feldern in einer Pilotanlage untersucht, mit dem Hintergrund, eine wirkungsvolle Methode zur Desinfektion von bakteriell belastetem Abwasser zu entwickeln.

#### 3.2.2.1 Probenentnahme

Zur Durchführung der Versuche an der Elektroimpulsanlage wurde Abwasser benötigt. Als Entnahmestelle wurde der Kanal auf dem Gelände der Universitätsmedizin Mainz in der Nähe der Chirurgie (Bau 505) gewählt (Abb. 11). Zur Entnahme wurde eine Tauchpumpe in den Abwasserkanal hinunter gelassen, die das Abwasser in Kunststofffässer pumpt. Die Entnahmemenge lag bei ca. 70 l Abwasser (mit Ausnahme der Versuche der Keimzahlreduktion durch rein thermischen Einfluss, dort 3 l). Die Leitfähigkeit des Abwassers variierte je nach Versuchstag zwischen 1,3 mS/cm und 2,1 mS/cm.

#### 3.2.2.2 Keimzahlreduktion durch rein thermische Behandlung

In der Elektroimpulsanlage wurden drei VREf (VRE 1, VRE 2 und VRE 7) untersucht. Zusätzlich zu den resistenten Enterokokken wurde auch der Vancomycin-sensible Referenzstamm *Enterococcus faecium* ATCC 6057 in der Anlage getestet. Da die elektrische Impulsbehandlung von Flüssigkeiten in der Elektroimpulsanlage als Nebeneffekt unumgänglich zu einer Erwärmung der behandelten Flüssigkeit führte,

wurde zuvor von allen Enterokokken eine Abtötungskurve und eine spezifische Absterbetemperatur ( $T_a$ ) im Labor unter rein thermischem Einfluss (also ohne elektrisches Feld) ermittelt.

Das Abwasser wurde vor den Laborversuchen in der Elektroimpulsanlage bei sehr hohem Energieeintrag behandelt, um alle lebensfähigen Bakterien, vor allem die Enterokokken, abzutöten (siehe Kapitel 3.2.2.3 Abtötung der lebensfähigen Bakterien im Abwasser). Anschließend wurde das behandelte Abwasser bis zu Beginn der Versuche bei 6 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

Die VREf wurden auf zwei Caso-Agarplatten überimpft und für 48 h bei 37 °C im Brutschrank bebrütet. Anschließend wurde eine Keimsuspension in steriler NaCl-Lösung (BioMerieux, Frankreich) auf McFarland-Standard 0,5 (ca.  $10^8$  Zellen/ml) im Densimeter eingestellt. Von dem behandelten Abwasser wurden 500 ml im Messkolben abgemessen, mit einer Konzentration von  $10^6$  Zellen/ml der Keimsuspension beimpft und zu je 20 ml in kleine Glasflaschen abgefüllt. Jede Versuchsflasche mit Keimsuspension wurde anschließend in einem Wasserbad auf einem Magnetrührer mit Heizelement unter Rühren erhitzt. Die Temperaturspanne lag dabei zwischen 37° C und 72 °C. Als Kontrolle dienten zwei Flaschen, die bei Raumtemperatur aufbewahrt wurden. Die erste Kontrolle wurde zu Beginn direkt weiter verarbeitet. Um auszuschließen, dass die Bakterien in dem Abwasser durch bakterizide Stoffe im Wachstum beeinträchtigt wurden, wurde die zweite Kontrolle erst zum Schluss weiter verarbeitet.

Die Bedingungen der Laborversuche wurden nah an die Bedingungen der Elektroimpulsanlage angepasst, um die Ergebnisse gut miteinander vergleichen zu können. Da in der Elektroimpulsanlage die Keimsuspension während der Behandlung sekundenschnell erhitzt wurde, wurde auch in den Laborversuchen darauf geachtet, dass die Versuchsflaschen möglichst schnell die jeweilige Endtemperatur erreichten. Die Verweildauer der Versuchsflaschen im Wasserbad wurde durch Erhöhung der Heizleistung aneinander angeglichen. Nach Erreichen der Endtemperatur, gemessen durch ein digitales Thermometer, wurden die Flaschen aus dem Wasserbad genommen und für ca. 1 min bei Raumtemperatur aufbewahrt. Danach wurden sie bis zur weiteren Verarbeitung im Kühlschrank aufbewahrt. Die Minute bei Raumtemperatur wurde analog zu den Versuchen an der

Elektroimpulsanlage gewählt, da dort die Keimsuspension nach der Behandlung erst durch einen Schlauch abfließen muss, bevor sie gekühlt werden kann.

Um die Keimzahl der behandelten Keimsuspensionen zu ermitteln, wurden die abgekühlten Keimsuspensionen in dezimalen Verdünnungsreihen in steriler NaCl-Lösung (bis zur Verdünnung  $10^{-6}$ ) auf Slanetz-Bartley-Agar und Enterococcosel-Agar ausplattiert und bei  $37\text{ °C}$  für 48 h bebrütet (siehe Kapitel 3.2.1.2 Keimzahlbestimmung durch Kultivierungsmethoden). Der Referenzstamm ATCC 6057 (*Enterococcus faecium*) wurde nur auf Slanetz-Bartley-Agar ausplattiert, da wegen fehlender Resistenz gegen Vancomycin kein Wachstum auf Enterococcosel-Nährboden möglich war. Nach der Bebrütung wurden die gewachsenen Kolonien auf den Nährböden ausgezählt, und anhand der Verdünnung pro Milliliter hochgerechnet. Danach wurde aus der Keimzahl der Logarithmus zur Basis 10 der gezählten Keimzahlen ermittelt, die Differenz zum Ausgangswert berechnet und als Keimzahlreduktion gegen die Temperatur aufgetragen. Als Absterbetemperatur ( $T_a$ ) wurde die Temperatur bezeichnet, bei der das hitzebedingte Absterben gerade einsetzte. Zur Bestimmung dieses Temperaturpunkts wurde deshalb in den Ergebnis-Graphiken rechnerisch eine Gerade in den Bereich mit den Abtötungswerten gelegt. Der Schnittpunkt dieser Geraden mit der X-Achse (Temperatur) wurde als Absterbetemperatur verwendet.

### 3.2.2.3 Keimzahlreduktion durch Elektroimpulsbehandlung in Verbindung mit thermischem Einfluss

Drei klinisch relevante VREf von Patienten (VRE 1, VRE 2 und VRE 7) sowie der Vancomycin-sensible Referenzstamm ATCC 6057 (*Enterococcus faecium*) wurden in der Elektroimpulsanlage gepulsten elektrischen Feldern ausgesetzt. Als Versuchsmedium diente Abwasser (ca. 70 l), das zu Beginn eines Versuchs aus dem Kanal der Universitätsmedizin Mainz entnommen und in ein Kunststofffass abgefüllt wurde. Da sich zu Beginn eines Versuchs immer Luft in den Schläuchen der Elektroimpulsanlage befand, wurde das Abwasser zunächst im Kreislauf durch die Anlage gepumpt (ohne Elektroimpulsbehandlung und bei einer Pumpleistung von 53,3 l pro Stunde). Während dieser Kreislaufphase wurden die Leitfähigkeit und die Temperatur des Abwassers gemessen.

Zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl des Abwassers wurde eine Probe entnommen und in einer dezimalen Verdünnungsreihe in steriler NaCl-Lösung auf Nährböden ausplattiert (siehe Kapitel 3.2.1.2 Keimzahlbestimmung). Danach wurde mit der



Elektroimpulsbehandlung begonnen, um alle lebensfähigen Bakterien aus der Abwasserprobe zu entfernen.

### Abtötung der lebensfähigen Bakterien im Abwasser

Um ohne störende Begleitflora im Abwasser die Elektroimpulsversuche mit den VREf durchführen zu können, wurde vor den Versuchen das Abwasser behandelt. Dazu wurde zunächst die Anlage hochgefahren und die Hochspannungsvorrichtung eingeschaltet. Anschließend wurde die Feldstärke anhand eines Oszilloskops bei eingeschalteter Hochspannung bestimmt und gegebenenfalls anhand des Drucks in der Funkenstrecke der Anlage auf einen optimalen Bereich von ca. 80 kV/cm eingestellt. Die Behandlung des Abwassers sollte möglichst im optimalen Abtötungsbereich stattfinden (also bei möglichst hohen Temperaturen), um die Begleitflora abzutöten. Dies wurde durch eine hohe Elektroimpulsenergie pro Volumeneinheit Abwasser erzielt. Diese Energie wurde in Form von Wärme an das Abwasser (als Nebeneffekt) abgegeben. Geregelt wurde die Höhe dieser spezifischen Energie durch die Stromstärke (Abb. 10) im Bedienelement. Da es in der Anlage ab Temperaturen von über 75 °C zu Siedeverzug und somit Luftblasen oder Lichtbögen kommen kann, wurden die Vorbereitungsversuche bei geringfügig niedrigeren Temperaturen durchgeführt (ca. 70-74 °C). Die ins Wasser eingebrachte spezifische Energie führte je nach Höhe zur Erwärmung des Abwassers um ein bestimmtes Maß ( $\Delta T$ ). Deshalb wurden durch unterschiedliche Abwassertemperaturen (im Winter z. B. 9 °C und im Sommer z. B. 21 °C) auch unterschiedliche Energiewerte nötig (zwischen 190 J/ml und 220 J/ml), um die benötigten Temperaturen von über 70 °C zu erreichen.

Wenn die Anlage für einige Minuten konstant bei den eingestellten Werten arbeitete, und die Temperatur des behandelten Abwassers 70 °C erreicht hatte, wurde der Auslaufschlauch in ein sauberes Kunststofffass umgehängt, um das entkeimte Abwasser für den anschließenden Versuch aufzufangen. Um zu Überprüfen ob sich noch lebensfähige Bakterien in dem behandelten Abwasser befanden, wurde während der Entkeimung eine Probe entnommen. Anschließend wurde im Labor mit einer dezimalen Verdünnungsreihe in steriler NaCl-Lösung die Keimzahl des behandelten Abwassers mittels Ausplattieren auf Nährböden bestimmt (siehe Kapitel 3.2.1.2 Keimzahlbestimmung durch Kultivierungsmethoden). Als Nährböden für die Keimzahlbestimmung dienten Caso-Agar (universeller Agar), Slanetz-Bartley-Agar (für Enterokokken), Enterococcusel-Agar (für VRE). Bei allen Versuchen

konnten keine lebensfähigen Bakterien, vor allem keine Enterokokken bzw. VRE, in dem behandelten Abwasser nachgewiesen werden.

### Elektroimpulsbehandlung mit unterschiedlichen Einlaufftemperaturen

Mit dem vorbehandelten Abwasser wurden anschließend die Elektroimpulsversuche mit den Enterokokken durchgeführt. Ein Versuchsansatz wurde überwiegend bei zwei verschiedenen Einlaufftemperaturen getestet. Dazu wurden die hohen Temperaturen der zuvor erfolgten Behandlung genutzt, um einen Versuch mit hohen Einlaufftemperaturen durchzuführen. Da die Temperatur des vorbereiteten Abwassers ca. 60–70 °C betrug, musste es erst auf 40 °C abkühlen, bevor das Enterokokken-Isolat in das Abwasser gegeben werden konnte.

Zur Vorbereitung der Bakteriensuspension wurde das jeweilige Isolat nach 24 h Anzucht bei 37 °C auf Columbia-Blutagarplatten in eine sterile NaCl-Lösung eingerührt und im Densimeter auf 0,5 McFarland-Standard (ca.  $10^8$  Zellen/ml) eingestellt. Anschließend wurden mit dieser Keimsuspension 25 Caso-Agarplatten durch einen sterilen Tupfer mit einem Netzausstrich beimpft und bei 37 °C für 48 h bebrütet. Nach der Bebrütung wurde sterile NaCl-Lösung auf die Platten gegeben, um die Bakterienzellen mit einem Spatel von der Platte lösen zu können. Mit dieser hochkonzentrierten Bakteriensuspension wurde das Abwasser für die Elektroimpulsversuche beimpft. Die Bakterienmenge der Suspension war ausreichend, um ca. 70 l Abwasser mit einer Konzentration von ca.  $10^6$  KBE/ml zu beimpfen.

Nach kräftigem Umrühren und der Leitfähigkeitsmessung wurde das Abwasser/Keimgemisch für 10 min ohne Bepulsung im Kreislauf durch die Elektroimpulsanlage gepumpt, damit eine gleichmäßige Durchmischung stattfand. Um die Keimzahlreduktion nach der Elektroimpulsbehandlung messen zu können, wurde als Ausgangskeimzahl zu diesem Zeitpunkt eine Probe aus dem Auslaufschlauch genommen. Eine zweite Probe diente als Kontrolle, ob die Keimzahl im Abwasser über die Versuchsdauer von alleine abnimmt (z. B. wegen bakteriziden Stoffen im Abwasser), oder ob eine Reduktion allein auf die Elektroimpulsbehandlung zurückzuführen ist. Diese Probe wurde zuletzt, nach allen anderen Proben, angelegt. Von den Proben wurden im Labor mit dezimalen Verdünnungsreihen in steriler NaCl-Lösung die Keimzahlen mittels Ausplattieren auf Nährböden bestimmt (siehe Kapitel 3.2.1.2 Keimzahlbestimmung durch Kultivierungsmethoden). Als Nährböden für die Keimzahlbestimmung dienten Caso-Agar (universeller Agar), Slanetz-Bartley-Agar (für Enterokokken) und Enterococcosel-Agar (für VRE). Über den gesamten

Versuchszeitraum der eigenen Untersuchungen war die Keimzahl der zweiten Probe nur einmal nicht identisch mit dem Vorwert. Dieser Versuch wurde gestrichen.

Nach Entnahme der Kontrollproben wurde mit der Elektroimpulsbehandlung begonnen. Dazu wurde die Anlage hochgefahren, die Hochspannung eingeschaltet und die Feldstärke auf dem Oszilloskop abgelesen. Gegebenenfalls wurde die Feldstärke durch Regelung des Drucks in der Funkenstrecke auf 80 kV/cm eingestellt. Anschließend wurde die Höhe der Zündspannung ermittelt, womit die Einstellungen für die spezifischen Energiewerte der Versuche berechnet werden konnten (siehe Kapitel 3.1.5 Die Elektroimpulsanlage). Um das behandelte Abwasser aufzufangen, wurde der Auslaufschlauch in ein leeres Fass umgehängt.

Die Elektroimpulsbehandlung erfolgte mit spezifischen Energiemengen zwischen 60 und 210 Joule pro Milliliter (mehrere Werte pro Versuchsansatz, meistens ca. 20 Joule/ml aufsteigend). Ein- und Auslauftemperaturen wurden für jeden Energiewert notiert. Die spezifischen Energiewerte wurden nacheinander an der Anlage durch Regelung der Stromstärke eingestellt (aufsteigend). Die Proben zur Berechnung der Keimzahlreduktion wurden erst entnommen, nachdem sich die Auslauftemperatur für mindestens 2 min konstant auf einem Niveau eingependelt hatte. Sie wurden in sterile Glasflaschen abgefüllt und bis zu Beginn der Keimzahlbestimmung im Kühlschrank aufbewahrt. Anschließend wurden die entnommenen Proben in dezimalen Verdünnungsreihen auf Slanetz-Bartley-Agar und Enterococcosel-Agar mit Vancomycin ausplattiert (siehe Kapitel 3.2.1.2 Keimzahlbestimmung durch Kultivierungsmethoden). Nach 48 h Bebrütungszeit wurden die Keimzahlen durch Zählen der gewachsenen Kolonien ermittelt. Danach wurde aus der Keimzahl der Logarithmus zur Basis 10 der gezählten Keimzahlen gebildet, die Differenz zum Ausgangswert durch Subtraktion berechnet und graphisch als Keimzahlreduktion nach der Elektroimpulsbehandlung gegen die Temperatur aufgetragen (siehe auch Kapitel 8.2 Anhang, Tabellen A2 – A21).

Der Rest des unbehandelten Abwasser/Keimgemischs wurde für den zweiten Versuchstag mit kälteren Einlauftemperaturen verwendet. Damit sich keine Kontaminationen in der Anlage bilden, wurde die Anlage nach jedem Versuch zunächst mit Desinfektionslösung gespült und anschließend mit Leitungswasser gereinigt. Am nächsten Tag folgte der identische Versuchsablauf mit dem abgekühlten Abwasser/Keimgemisch.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Isolierung und Charakterisierung von VRE aus Patienten- und Umweltproben**

Die Eigenschaft der Enterokokken sich Resistenzen gegen Antibiotika schnell aneignen zu können und diese zu verbreiten, macht sie zu wichtigen Erregern von nosokomialen Infektionen. Das Vorkommen von Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) beschränkt sich nicht nur auf das Krankenhausumfeld und Patienten, sondern auch in der gesunden Bevölkerung, in Tieren, in ungeklärtem und geklärtem Abwasser und in Oberflächenwasser können VRE nachgewiesen werden. Diese Dissertation beschäftigte sich über einen Zeitraum von fünf Jahren (2004 bis 2008) mit der Untersuchung über das Vorkommen, die Charakterisierung und die Genotypisierung von VRE, speziell Vancomycin-resistente *Enterococcus faecium* (VREf), in Umweltwasserproben, wie Abwasser und Oberflächenwasser, in Mainz und Umgebung. Außerdem sollte die Frage geklärt werden, ob VREf aus der aquatischen Umwelt genetische Verwandtschaften zu klinischen Isolaten von Patienten zeigen.

#### **4.1.1 Vorkommen von VRE in Umweltwasserproben**

Das Vorkommen von VRE in verschiedenen Wasserproben der aquatischen Umwelt wurde überprüft, um zu erfahren, ob überhaupt, und wenn ja in welchem Umfang, VRE in diesen Wasserproben zu finden sind. Über einen Zeitraum von zwei bzw. vier Jahren wurden Wasserproben untersucht. Dazu zählten Abwasserproben der Universitätsmedizin Mainz genauso wie Abwasser (ungeklärt und geklärt) der Kläranlage Mainz und verschiedene Oberflächenwasserproben aus den Flüssen Rhein und Main.

Da bei VRE, gerade in Oberflächenwasser, sehr geringe Keimzahlen zu erwarten waren, wurden VRE in den Wasserproben durch selektive Nährbouillons mit Vancomycin vor der Isolierung angereichert.

## 4.1.1.1 Wasserproben aus dem Umfeld der Kläranlage

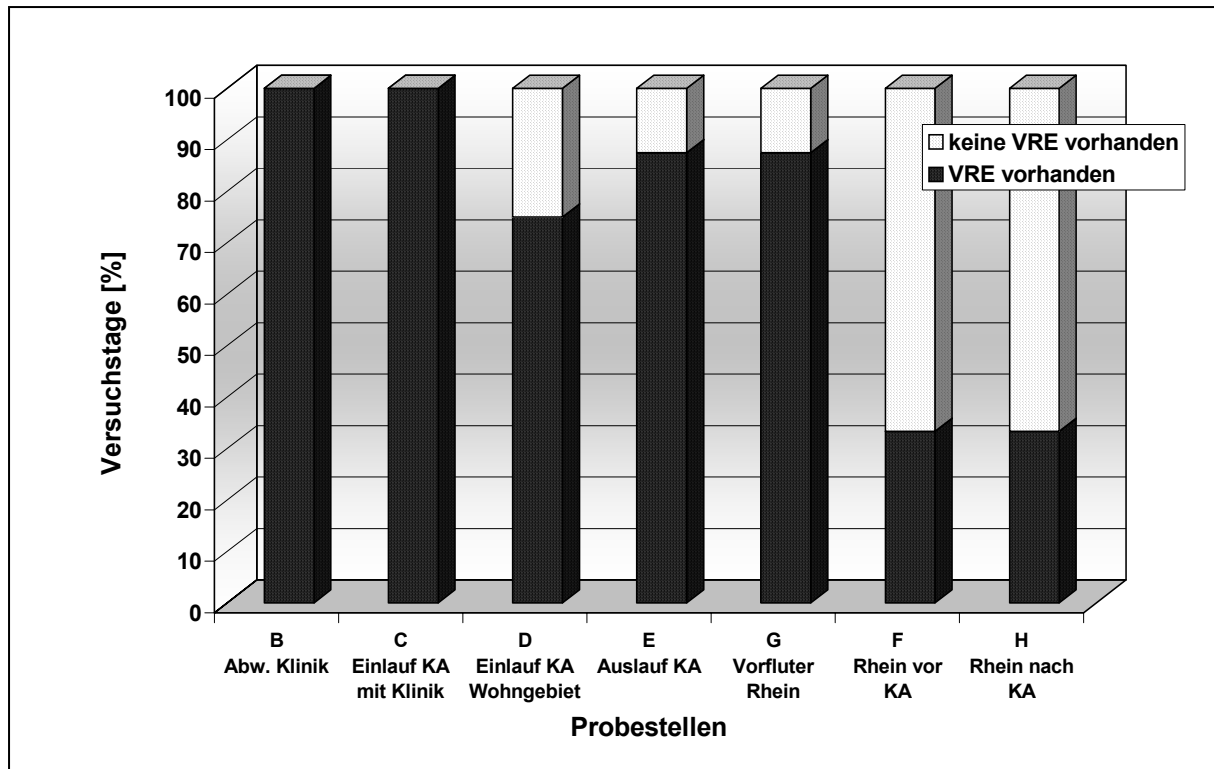
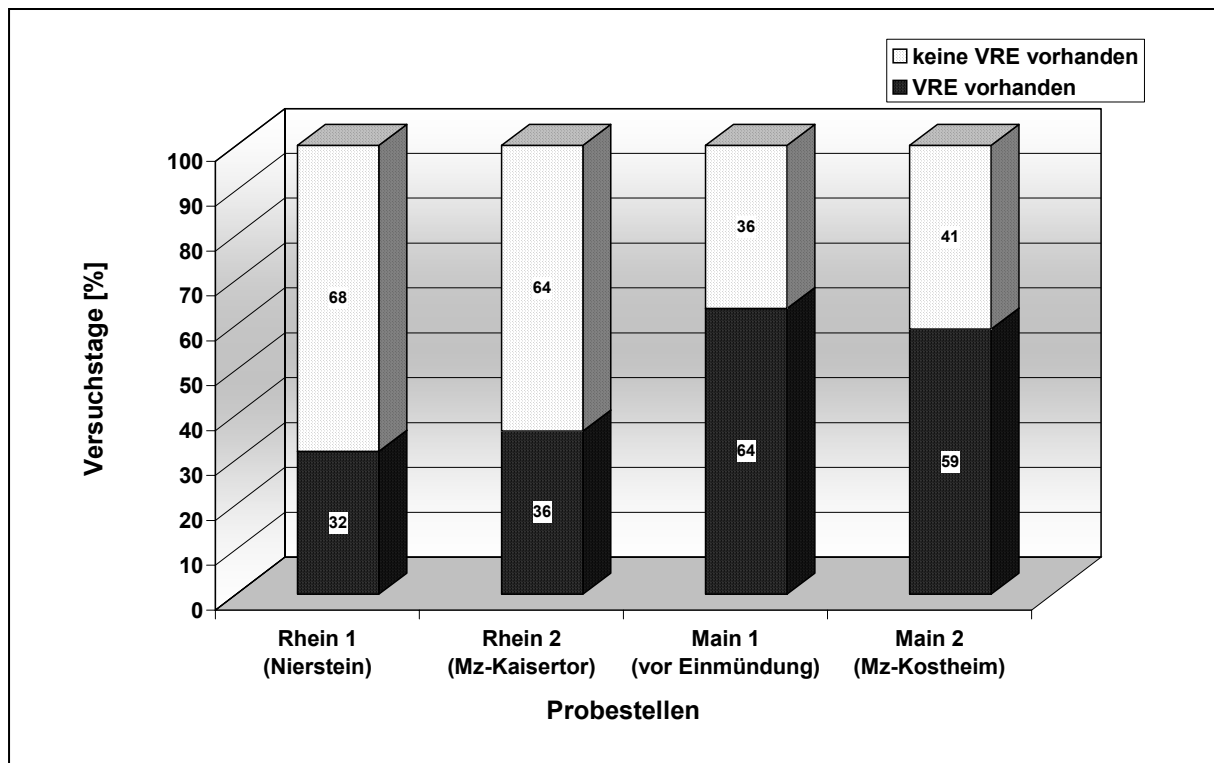


Abbildung 13: Vorkommen von Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) in verschiedenen Wasserproben aus dem Umfeld der Kläranlage (KA) in Mainz im Versuchszeitraum von 2004 bis 2006 (Daten aus acht Versuchstagen, Rheinstellen = sechs Versuchstage).

Abb. 13 gibt Aufschluss über das Vorkommen von VRE in ungeklärtem und geklärtem Abwasser, sowie in Oberflächenwasser im Bereich der Kläranlage in Mainz im Versuchszeitraum 2004 bis 2006. Im Abwasser der Universitätsmedizin Mainz (Stelle B) und im Abwasser aus dem Einlauf der Kläranlage, an den das Klinikum angeschlossen ist (Stelle C), konnten an allen Versuchstagen VRE nachgewiesen und isoliert werden. Ein mit 75 % des positiven Vorkommens geringeres Ergebnis wurde durch Abwasser aus dem Einlauf der Kläranlage, an den mehrere Mainzer Vororte angeschlossen sind (Stelle D), erzielt. Das geklärte Abwasser verließ über den Auslauf (Stelle E) die Kläranlage und wurde von dort aus in den Rhein geleitet (Vorfluter, Stelle G). Auch hier konnten an sieben von acht Versuchstagen VRE isoliert werden (88 %). Ein mit 33 % geringeres Vorkommen an VRE wurde in den beiden weiteren Oberflächenwasserproben des Rheins verzeichnet. Generell konnten VRE somit an allen Probestellen im Umfeld der Kläranlage in Mainz, mit Unterschieden in der Häufigkeit des Auftretens, nachgewiesen werden.

4.1.1.2 Oberflächenwasserproben aus Rhein und Main



**Abbildung 14: Vorkommen von Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) in verschiedenen Oberflächenwasserproben aus den beiden Flüssen Rhein und Main in der Umgebung von Mainz im Versuchszeitraum von 2004 bis 2008 (Daten aus 22 Versuchstagen).**

Abb. 14 gibt Aufschluss über das Vorkommen von VRE in Oberflächenwasserproben aus Rhein und Main in der Umgebung von Mainz über einen Versuchszeitraum von vier Jahren (2004 bis 2008). An allen Stellen des Rheins und des Mains konnten VRE, mit unterschiedlicher Häufigkeit des Auftretens, in den Wasserproben nachgewiesen und isoliert werden.

VRE waren in den Wasserproben der beiden Probestellen des Rheins bei ca. einem Drittel aller Versuchstage (32 bis 36 %) vorhanden, in den Wasserproben des Mains bei ca. zwei Drittel aller Versuchstage (59 bis 64 %).

Die Werte der beiden Rheinstellen (Rhein 1 und 2) lagen in derselben Größenordnung wie die Werte der beiden weiteren Probestellen des Rheins im Bereich vor und nach der Kläranlage (Stelle F und Stelle H, Abb. 13).

#### 4.1.2 Keimzahlen von Enterokokken und VRE im Umfeld der Kläranlage

Nachdem das Vorkommen von VRE in den Proben der aquatischen Umwelt bestätigt war, sollte die Frage geklärt werden, in welcher Anzahl sensible Enterokokken und VRE in den Bereichen rund um die Kläranlage vorkommen. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die Anzahl der VRE durch die Kläranlage stärker dezimiert wird als die Anzahl der sensiblen Enterokokken, bzw. ob der Reinigungsprozess der Kläranlage vielleicht die Anzahl der VRE selektiv fördert.

##### 4.1.2.1 Keimzahlen der Enterokokken

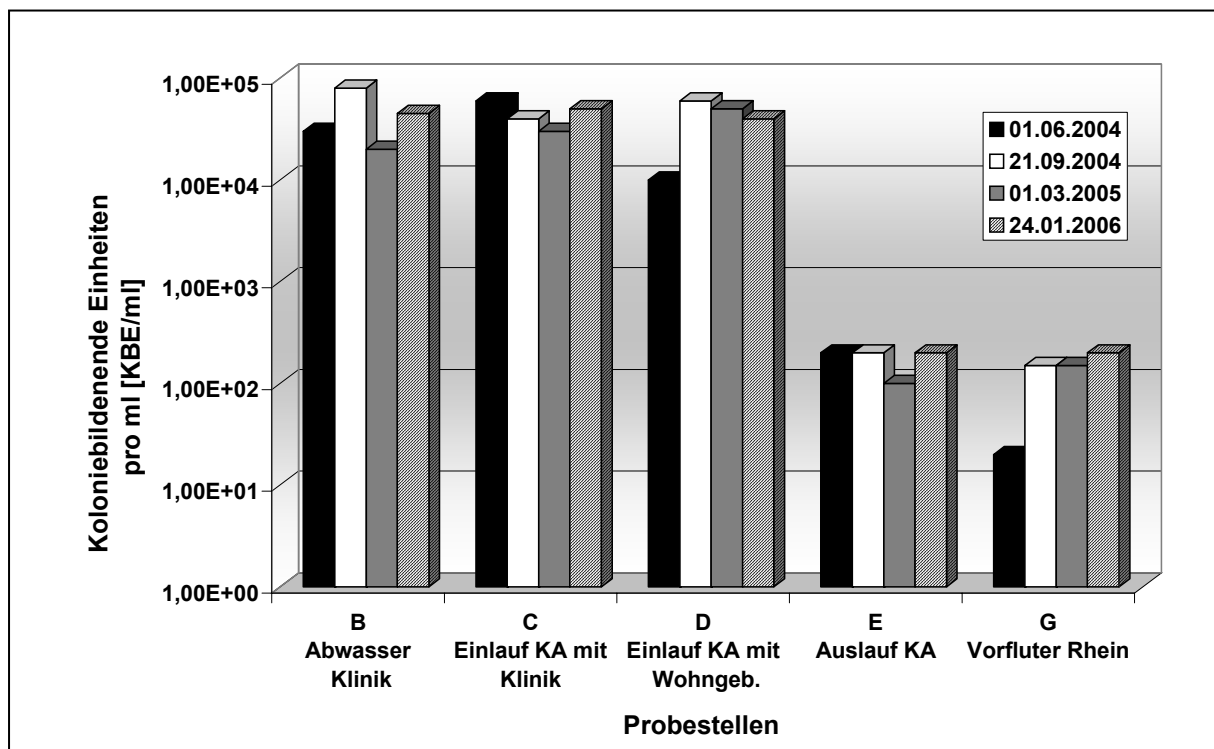


Abbildung 15: Enterokokken-Keimzahlen an fünf verschiedenen Probestellen aus dem Umfeld der Kläranlage (KA) Mainz zwischen Juni 2004 und Januar 2006.

In Abb. 15 sind die Keimzahlen von Enterokokken von vier verschiedenen Probetagen und von verschiedenen (Ab-) Wasserproben aus dem Umfeld der Kläranlage in Mainz dargestellt. Das Abwasser der Universitätsmedizin Mainz (Stelle B) fließt über den Einlauf (Stelle C) in die Kläranlage. Das Abwasser aus einem Wohngebiet fließt über einen zweiten Einlauf (Stelle D) in die Kläranlage. Das Abwasser dieser drei Probestellen lag bei Betrachtung der Enterokokken-Keimzahl an allen vier Probetagen in der gleichen Größenordnung zwischen  $10^4$  und  $10^5$  koloniebildenden Einheiten pro Milliliter (KBE/ml). Durch den Reinigungsprozess der Kläranlage wurde die Keimzahl der Enterokokken in den Proben um ca. 2 Logstufen

auf ca.  $10^2$  KBE/ml reduziert (Stelle E, Auslauf). Auch im Oberflächenwasser des Rheins (Stelle G), direkt am Auslauf des gereinigten Wassers aus der Kläranlage, wurden Enterokokken-Keimzahlen in der gleichen Größenordnung ermittelt (KBE/ml um  $10^1$  im Juni 2004 und um  $10^2$  an den restlichen drei Probetagen).

#### 4.1.2.2 Keimzahlen der VRE

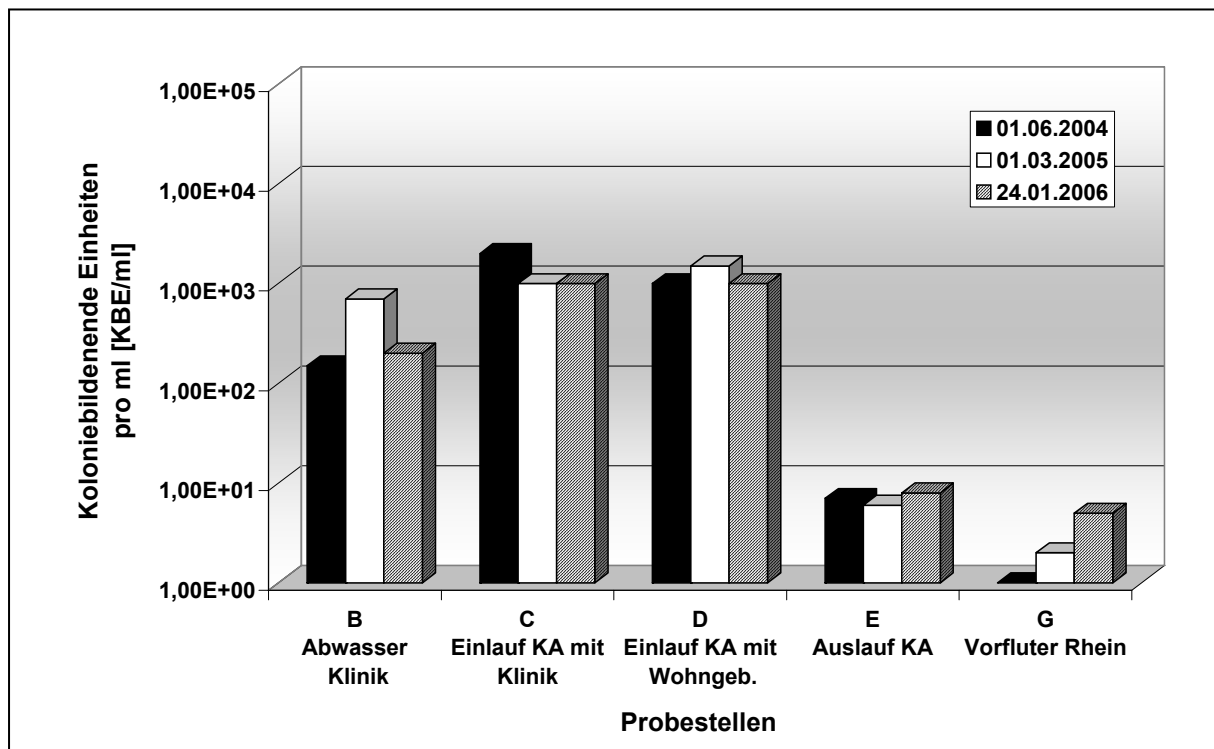


Abbildung 16: VRE-Keimzahlen an fünf verschiedenen Probestellen aus dem Umfeld der Kläranlage (KA) Mainz zwischen Juni 2004 und Januar 2006.

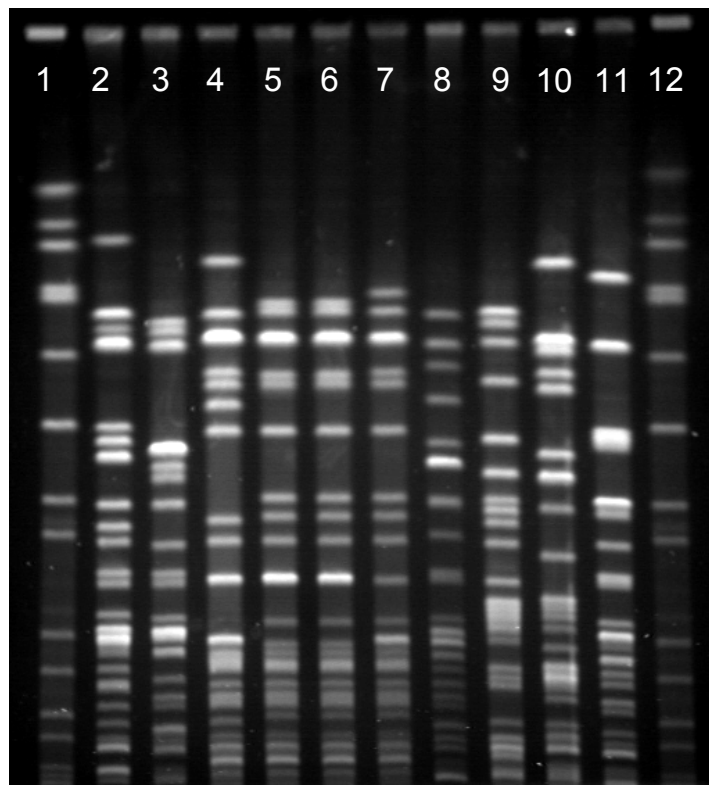
Abb. 16 zeigt die VRE-Keimzahlen von drei verschiedenen Probetagen und von verschiedenen Probestellen aus dem Umfeld der Kläranlage Mainz. Im Vergleich zu den Enterokokken-Keimzahlen (Abb. 15) waren die Keimzahlen der VRE in den Proben um ca. 1,5 (an den Stellen E und G) bis 2 (an den Stellen B, C und D) Logstufen niedriger. An den drei Abwasser-Probestellen, bestehend aus dem Abwasser der Universitätsmedizin Mainz und den beiden Einläufen der Kläranlage, waren die VRE-Keimzahlen am höchsten. In dem Abwasser der Universitätsmedizin Mainz (Stelle B) lagen die VRE-Keimzahlen niedriger als an den Stellen C und D (zwischen  $1,5 \times 10^2$  und  $7 \times 10^2$  KBE/ml an Stelle B, im Vergleich zu  $1 \times 10^3$  und  $2 \times 10^3$  KBE/ml an den Stellen C und D). Durch den Reinigungsprozess der Kläranlage wurde die Zahl der VRE, wie die der Enterokokken, ebenfalls reduziert (auf ca.  $10^0$  bis  $10^1$  KBE/ml).



#### 4.1.3 Genotypisierung durch Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

Eine Charakterisierung der Vancomycin-resistenten *Enterococcus faecium* (VREf) von Patienten und aus der aquatischen Umwelt erfolgte u. a. durch Genotypisierung mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) und einer anschließenden Verwandtschaftsanalyse. Bei der PFGE handelt es sich um ein molekularbiologisches Verfahren, mit dessen Hilfe ein spezifisches Bandenmuster der DNA pro Isolat (siehe Abb. 17) sichtbar gemacht wird und somit Aussagen über Verwandtschaften zwischen verschiedenen Isolaten getroffen werden können.

**Abbildung 17: Beispielhafte Darstellung eines PFGE-Gels mit zehn untersuchten VRE-Isolaten (Lauflinien 2 bis 11). Gellaufrichtung von oben nach unten. Der Größenstandard NCTC 8325 befindet sich in Lauflinien 1 und 12.**



Anhand der spezifischen Bandenmuster wurden genetische Vergleiche durchgeführt und in einem Baumdiagramm (Dendrogramm) graphisch dargestellt.

##### 4.1.3.1 Verfahrenstestung der PFGE

Die PFGE zählt noch heute zum „Goldstandard“ unter den molekularbiologischen Typisierungsmethoden, wenn es um die Analyse von Enterokokken geht. Doch bevor eine Analyse der isolierten VREf stattfand, sollte die Frage geklärt werden, ob die durchgeführte PFGE auch wirklich den Anforderungen, die an ein Typisierungsverfahren gestellt werden, entspricht [206].

Laut Witte *et al.* sollen die für die Typisierung verwendeten Merkmale bei fast allen Isolaten der jeweiligen Erregerspezies nachweisbar sein, um eine hohe Typisierbarkeit (95 %) zu gewährleisten.

Die PFGE wurde während dieser Dissertation bei insgesamt ca. 1700 Enterokokken-Isolaten (darunter ca. 1500 VRE), ausschließlich *E. faecium* und *E. faecalis*, als Typisierungsmethode angewendet. Bei allen Isolaten (100 %) konnte durch die PFGE das spezifische Bandenmuster bildlich dargestellt werden, welches für die Verwandtschaftsanalyse benötigt wurde.

Neben der Typisierbarkeit müssen die Ergebnisse der Typisierung bei wiederholten, unabhängigen Versuchsansätzen seriell reproduzierbar sein [206]. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der PFGE wurde bei insgesamt 262 VRE-Isolaten eine wiederholte PFGE durchgeführt.

Das spezifische Bandenmuster der getesteten VRE ließ sich zu 98,5 % (bei 258 Isolaten) reproduzieren. Bei 92 % der Isolate (241 Stück) trat keine Veränderung im Bandenmuster durch die wiederholte PFGE auf. Bei 7 % der Wiederholungen (17 Isolate) war das erhaltene Bandenmuster leicht unterschiedlich (eine Bande Unterschied bei 5 % der Isolate; zwei Banden Unterschied bei 1,5 % der Isolate), aber dennoch eng verwandt mit dem ursprünglichen Muster [180]. Lediglich bei 1,5 % (4 Isolate) zeigte sich nach der Wiederholung ein Unterschied von mehr als zwei Banden im Vergleich zum ursprünglichen Muster.

Laut Witte *et al.* [206] müssen die Merkmale, die für eine Typisierung herangezogen werden, im Verlauf eines Ausbruchs ausreichend stabil sein. Die Wiederholungen der PFGE bei 262 VRE-Isolaten, die für die Überprüfung der Reproduzierbarkeit herangezogen wurden, wurden zur Überprüfung der Stabilität zeitlich aufgeschlüsselt. Die meisten Wiederholungen fanden innerhalb eines Jahres statt (115 Wiederholungen). Dabei wurde das gleiche PFGE-Muster wie vor der Wiederholung (bei 96,5 %, entspricht 111 Isolaten), bzw. ein eng verwandtes PFGE-Muster mit ein bis zwei Banden Unterschied (bei 3,5 %, entspricht 4 Isolaten) erzielt. Selbst nach 5 Jahren konnte eine PFGE wiederholt werden, ohne dass sich signifikante Änderungen des PFGE-Musters ergaben.

Um eine aussagekräftige Typisierung durchführen zu können, muss das Typisierungsverfahren innerhalb der Speziespopulation zur Unterscheidung einer ausreichenden „Typenanzahl“ führen. Dabei sollte der Anteil des häufigsten „Typs“ 5 % der Isolate einer Speziespopulation nicht übersteigen [206]. Diese Voraussetzung wurde ebenfalls überprüft. Tab. 6 gibt die Häufigkeit des Auftretens verschiedener PFGE-Typen in Patienten- und Umweltproben an.

Isolat	Häufigkeit	Prozentualer Anteil [%]
VRE 1	46	9,68
VRE 2	18	3,8
VRE 7	16	3,4
6 weitere VRE	6-8	zw. 1,2 und 1,7
Alle restlichen VRE	< 5	< 1,06

**Tabelle 6: Häufigkeit (Probenanzahl) des Auftretens von spezifischen Bandenmustern nach der PFGE mit 475 VRE-Isolaten.**

Mit in die Berechnung wurden sowohl Isolate von Patienten als auch Isolate aus der aquatischen Umwelt einbezogen, wie Abwasser oder Oberflächenwasser. Das PFGE-Muster von VRE 1 ist in dem Untersuchungszeitraum (2004 bis 2009) insgesamt 46-mal bei VRE von unterschiedlichen Isolationsorten aufgetreten. Dies entsprach einem Anteil von 9,68 % an den 475 untersuchten VRE-Isolaten (Tab. 6). VRE 1 trat somit in dem untersuchten Zeitraum am häufigsten auf. Anzumerken ist hierbei, dass der, durch mehrere VRE, verursachte Ausbruch auf den Hämatologiestationen im Jahre 2004 u. a. durch VRE 1 verursacht wurde. Dieser VRE-Typ war zu diesem Zeitpunkt sehr häufig bei Patienten und an weiteren verschiedenen Orten aufgetreten.

Das mit einem prozentualen Anteil von 3,8 % zweithäufigste Isolat war VRE 2 (ein VRE, der Ende 2004 bzw. Anfang 2005 ebenfalls im Rahmen eines Ausbruchs isoliert wurde). Ähnlich häufig war VRE 7 (prozentualer Anteil 3,4 %) aufgetreten. Mit Ausnahme von sechs weiteren VRE (prozentualer Anteil zwischen 1,2 und 1,7 %) nahmen alle weiteren VRE einen Anteil von maximal 1,06 % an der Gesamtzahl in Anspruch. Der prozentuale Anteil aller aufgetretenen Isolate lag somit, mit Ausnahme von VRE 1, unterhalb der in der Literatur angegebenen 5 % Grenze.

Den Anforderungen, die an ein Typisierungsverfahren gestellt werden, hat die in dieser Dissertation durchgeführte PFGE standgehalten. Deshalb handelte es sich um ein geeignetes Verfahren zur Typisierung von VRE, mit dem aussagekräftige Verwandtschaftsanalysen durchgeführt werden konnten.

#### 4.1.4 Isolierte Vancomycin-resistente *Enterococcus faecium* (VREf) von Patienten und aus Umweltwasserproben

Über einen Zeitraum von mehreren Jahren wurden Vancomycin-resistente *Enterococcus faecium* (VREf) aus Proben verschiedener Herkunft isoliert und per Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) genotypisiert. Neben Patientenproben wurden auch Proben aus der aquatischen Umwelt (aus Abwasser und Oberflächenwasser) entnommen. Von insgesamt ca. 1500 VREf wurde eine PFGE durchgeführt, um das jeweilige Bandenmuster der Isolate darzustellen. Nach Abzug aller Doppel- bzw. Mehrfachisolate wurden die restlichen VREf aus allen drei Herkunftsbereichen (Patienten, Abwasser und Oberflächenwasser) zusammen weiterführend charakterisiert.

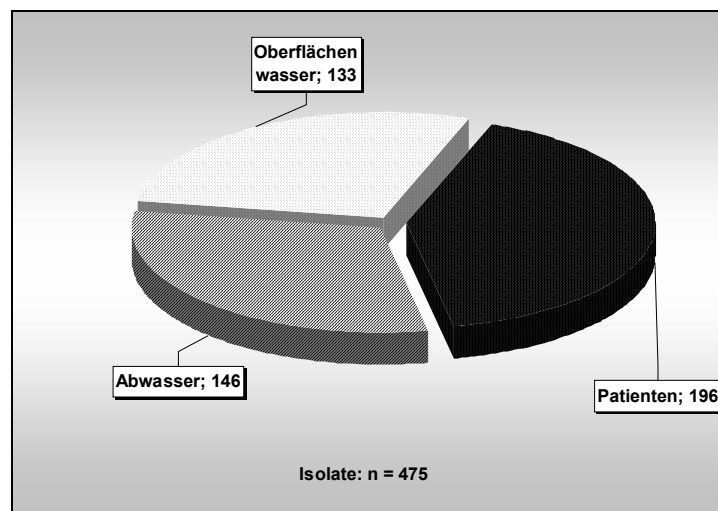


Abbildung 18: Verteilung der Anzahl aller isolierten VREf-Isolate auf die drei Herkunftsbereiche.

Wie aus Abb. 18 ersichtlich, konnte aus allen drei Herkunftsbereichen eine hohe Anzahl von VREf isoliert werden. Von den insgesamt 475 VREf-Isolaten stammten 196 von Patienten, 146 aus Abwasser und 133 aus Oberflächenwasser aus den Flüssen Rhein und Main.

Nach Auswertung der PFGE-Muster dieser VREf befanden sich unter den 196 Isolaten von Patienten 106 unterschiedliche (Tab. 7).

	HERKUNFTSBEREICH			gesamt
	Patienten	Abwasser	Oberflächenwasser	
VREf-Isolate/PFGE-Muster	196	146	133	475
Davon unterschiedliche	106	85	103	294

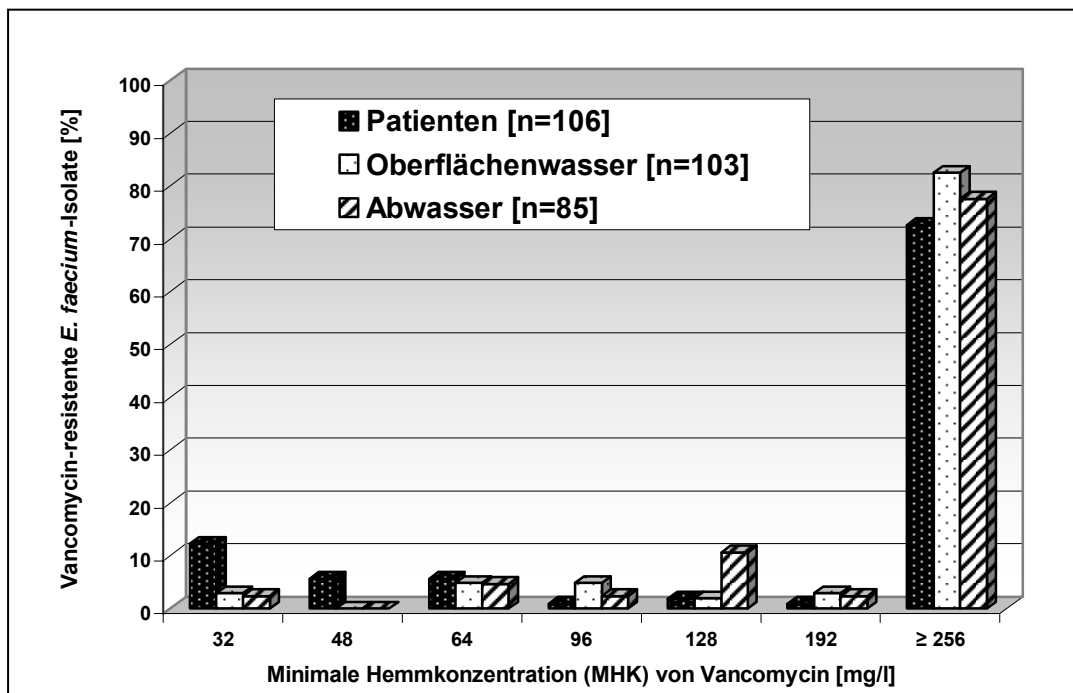
Tabelle 7: Überblick über die Anzahl der isolierten und unterschiedlichen VREf-Isolate aus den drei Herkunftsbereichen (Patienten, Abwasser und Oberflächenwasser).

Unter den insgesamt 146 Isolaten aus Abwasser befanden sich 85 Isolate mit unterschiedlichem PFGE-Muster. Aus Oberflächenwasser wurden insgesamt 103 unterschiedliche VREf isoliert. Von Interesse für die weiterführende Analyse war nun die Gesamtanzahl der VREf-Isolate mit unterschiedlichen PFGE-Mustern aus allen drei Herkunftsbereichen zusammen, nämlich insgesamt 294. Diese Isolate wurden zunächst auf ihre Antibiotikaresistenz hin untersucht.

#### 4.1.4.1 Antibiotikaresistenz

Für die Vancomycin-Resistenz sind unterschiedliche Resistenzgene verantwortlich, die entweder im Chromosom oder auf einem Plasmid eines Bakteriums vorliegen. Je nach genetischer Voraussetzung kann dabei die Höhe der Vancomycin-Resistenz von Isolat zu Isolat variieren und eine Kreuzresistenz gegenüber Teicoplanin vorliegen.

#### Vancomycin-Resistenz

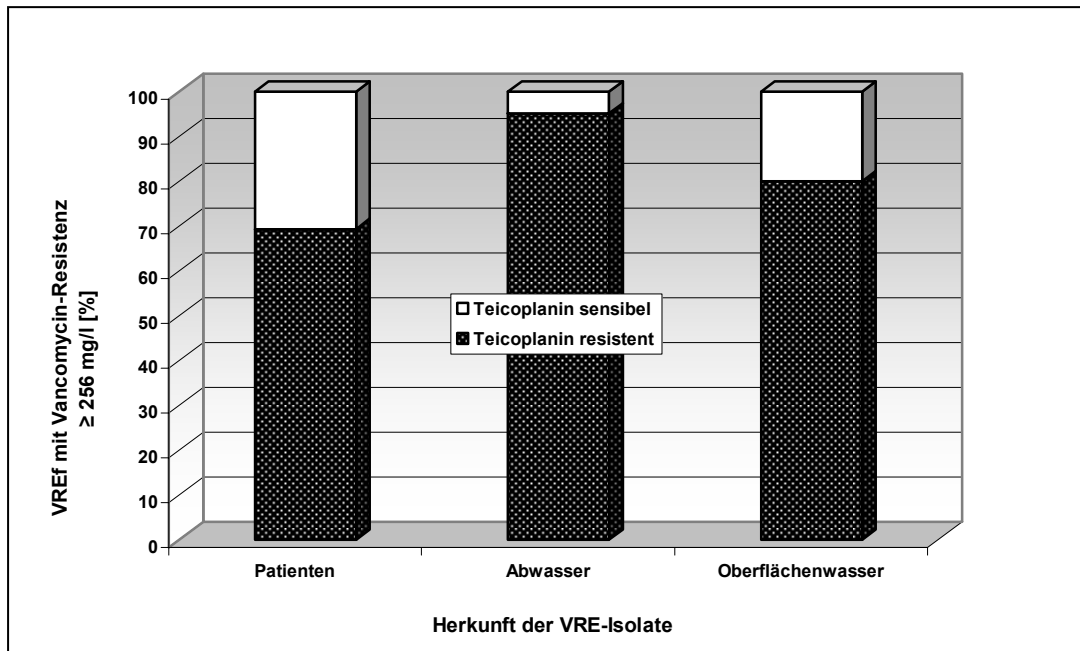


**Abbildung 19: Höhe der Vancomycin-Resistenz von 294 Vancomycin-resistenten *Enterococcus faecium* (VREf) unterschiedlicher Herkunft.**

Von 294 VREf verschiedener Herkunftsbereiche wurde die Höhe der Vancomycin-Resistenz mit Hilfe des Epsilometertests bestimmt. 106 VREf-Isolate stammten von Patienten der Hämatologiestationen der Universitätsmedizin Mainz, 103 VREf-Isolate aus Oberflächenwasser des Rheins und des Mains und 85 VREf-Isolate aus

Abwasser. Unabhängig von der Isolationsquelle war die Mehrheit aller VREf-Isolate hoch resistent gegen Vancomycin (Abb. 19). In allen drei Bereichen zeigten jeweils mehr als 70 % der VREf eine Resistenz gegen Vancomycin von 256 mg/l oder mehr. Die restlichen Resistenzhöhen waren mengenmäßig nahezu gleichmäßig bei den Isolaten aufgetreten (bei maximal 12,3 % aller Isolate oder weniger).

### Teicoplanin-Resistenz

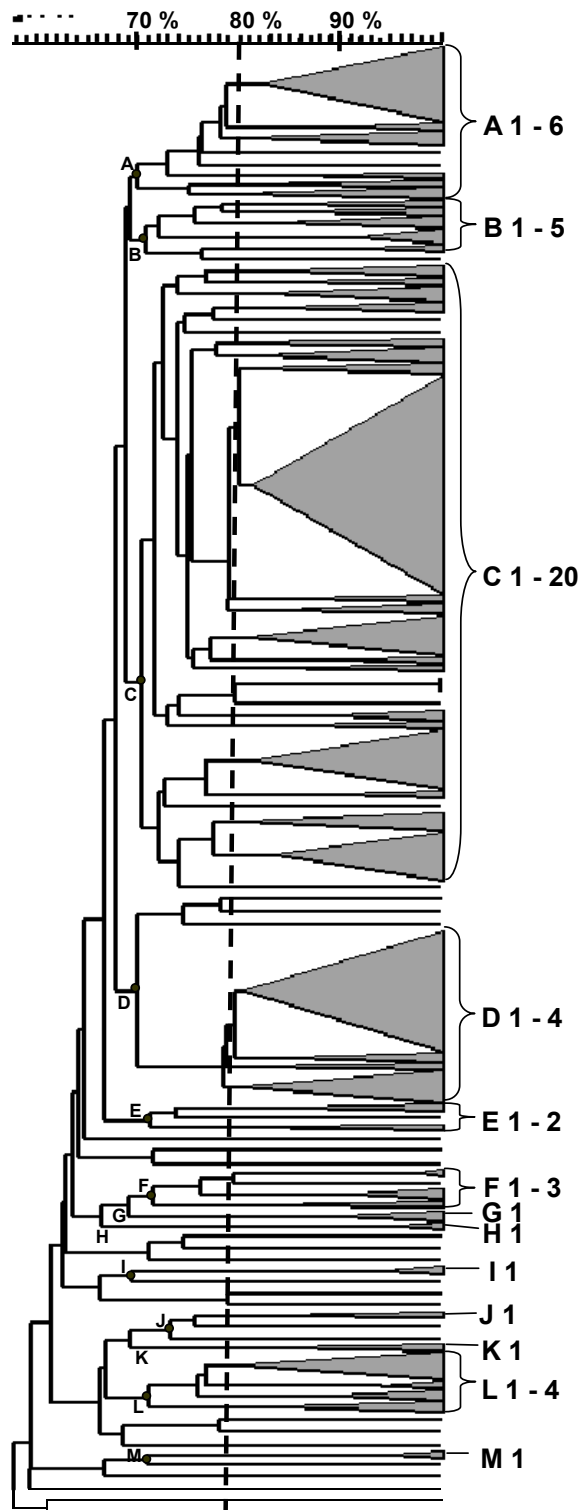


**Abbildung 20:** Resistenz gegen das Antibiotikum Teicoplanin von Vancomycin-resistenten *Enterococcus faecium* (VREf) mit einer Vancomycin-Resistenz von  $\geq 256$  mg/l. VREf von Patienten (n = 66), aus Oberflächenwasser (n = 68) und aus Abwasser (n = 56).

Das Ergebnis der Resistenztestung gegen das Glykopeptid-Antibiotikum Teicoplanin von 190 VREf-Isolaten mit einer Vancomycin-Resistenz von  $\geq 256$  mg/l ist in Abbildung 20 dargestellt. Bei einer Vancomycin-Resistenz in Höhe von  $\geq 256$  mg/l war die Mehrzahl der Isolate aus den verschiedenen Isolationsquellen auch gegen das Antibiotikum Teicoplanin resistent. Unter den VREf von Patienten waren 69 % (45 von 66 Isolaten) resistent gegen Teicoplanin. VREf aus den Umweltproben waren zu einem Anteil von 95 % (52 von 56 Isolaten aus Abwasser) bzw. 80 % (55 von 68 Isolaten aus Oberflächenwasser) resistent gegen Teicoplanin.

4.1.4.2 Verwandtschaftsanalyse der Vancomycin-resistenten *Enterococcus faecium*

Die 294 Vancomycin-resistenten *Enterococcus faecium* (VREf) von Patienten, aus Abwasser und aus Oberflächenwasser wurden nach der Untersuchung des Resistenzverhaltens einer Verwandtschaftsanalyse durch Vergleich der PFGE-Bandenmuster unterzogen. Der Verwandtschaftsgrad der VREf wurde in einem Dendrogramm (Abb. 21) dargestellt (siehe auch Kapitel 8.1 Anhang, Tab. A1).



**Abbildung 21: Verwandtschaftsanalyse der 294 VREf.** Das Dendrogramm wurde mit dem Computerprogramm GelComparII unter Verwendung der UPGMA-Methode und des Dice-Algorithmus erstellt. Bei einer Ähnlichkeit von 80 % (gestrichelte Linie) oder mehr wurden die Isolate aufgrund ihres hohen Verwandtschaftsgrades in einer Gruppe zusammengefasst.

Von den 294 VREf stammten 106 von Patienten, 103 aus Oberflächenwasser und die restlichen 85 aus Abwasserproben (Abb. 21).

Isolate mit einer Ähnlichkeit von  $\geq 80\%$  wurden aufgrund ihres hohen Verwandtschaftsgrads in einer Dendrogrammgruppe zusammengefasst, woraus sich insgesamt 50 Dendrogrammgruppen (Gruppe A 1 bis Gruppe M 1), bestehend aus je zwei oder mehr Isolaten, ergaben. 32 VREf konnte kein weiteres Isolat mit einer Ähnlichkeit von 80 % oder mehr zugeordnet werden, weshalb diese Isolate keiner Dendrogrammgruppe angehörten.

Die Gruppengröße variierte zwischen 2 und 54 VREf, erkennbar an den grau unterlegten Dreiecken des Dendrogramms. In Tab. A1 im Anhang (Kapitel 8.1) ist die genaue Zusammensetzung der Dendrogrammgruppen detailliert aufgeführt.

Der größte Teil der Dendrogrammgruppen (42 Stück) besaß eine geringe Gruppengröße bestehend aus 4 oder weniger VREf. Die Größe von fünf weiteren Dendrogrammgruppen variierte zwischen 7 und 15 VREf, während drei Dendrogrammgruppen mit 19 bis 54 VREf die größten Gruppen bildeten. Die im Rahmen von zwei Ausbrüchen isolierten VREf befanden sich in den Dendrogrammgruppen C 8 (VRE 2) und C 20 (VRE 1).

Die hohe Zahl an Dendrogrammgruppen und die Vielschichtigkeit der VREf brachte eine hohe Diversität zum Ausdruck.

### 4.1.4.3 Zeitliche Persistenz der Dendrogrammgruppen

Die Verwandtschaftsanalyse führte zu einer Vielzahl von Dendrogrammgruppen mit untereinander eng verwandten VREf. Weiterführend sollte nun die Frage geklärt werden, ob Isolate dieser Dendrogrammgruppen über mehrere Jahre existierten, oder ob diese Isolate nur in einem bestimmten Jahr auftraten. Dazu wurde das zeitliche Auftreten der VREf pro Gruppe untersucht. Die Untersuchung (Tab. 8) erfolgte anhand der sieben größten Dendrogrammgruppen (Gruppen mit acht oder mehr unterschiedlichen PFGE-Mustern).

Da mehrere VREf das gleiche PFGE-Bandenmuster aufweisen können (und somit klonal identisch wären), unterscheidet sich die Anzahl der VREf pro Gruppe von der Anzahl der unterschiedlichen PFGE-Muster (vergleiche Anhang).



Gruppe	Anzahl versch. PFGE-Muster	Anzahl VREf	2004	2005	2006	2007	2008	2009
C 8	50	54	+	+	+	+	+	+
D 1	29	30			+	+	+	
A 1	17	19	+	+	+	+	+	
C 17	12	15		+	+			
C 20	10	12	+	+	+			
C 11	10	10	+	+	+	+		
D 4	8	8				+	+	+

**Tabelle 8: Zeitliches Auftreten von VREf der sieben größten Dendrogrammgruppen zwischen 2004 und 2009.** + = VREf wurde in diesem Jahr isoliert.

In Tabelle 8 ist das Auftreten von VREf der sieben größten Dendrogrammgruppen in den Jahren zwischen 2004 und 2009 zeitlich aufgelistet (+). Die Isolate der größten Gruppe (Gruppe C 8) waren durchgehend über den gesamten Zeitraum aufgetreten. Unter den Isolaten dieser Gruppe befand sich auch VRE 2, ein Isolat, das im Rahmen eines Ausbruchs in der Universitätsmedizin Mainz im Jahre 2005 isoliert wurde. VRE 1, isoliert während eines Ausbruchs im Jahr 2004, befand sich in Dendrogrammgruppe C 20.

Die VREf der zweitgrößten Gruppe (Gruppe D 1) konnten dagegen nur über einen Zeitraum von drei Jahren (2006 bis 2008) isoliert werden. Das zeitliche Auftreten der anderen VREf der weiteren Gruppen verhielt sich ähnlich. Mit Ausnahme der VREf von Gruppe C 8, traten die VREf zu einem bestimmten Zeitpunkt auf, konnten danach für eine bestimmte Zeit wiederholt isoliert werden, bevor sie drei bis vier Jahre später nicht mehr aufzufinden waren. Das zeitliche Auftreten der VREf war geprägt von einer Dynamik, wodurch sich Veränderungen in der Population mit zeitlichem Wechsel ergaben. Diese Dynamik stand in keinem Zusammenhang zur Gruppengröße. So konnten VREf der zweitgrößten Gruppe D 1 nur innerhalb von drei Jahren isoliert werden, während VREf aus wesentlich kleineren Gruppen (z. B. Gruppe C 11) über einen längeren Zeitraum gefunden werden konnten.

4.1.4.4 Zeitliche Persistenz innerhalb der Dendrogrammgruppen

Bezüglich der Dynamik des zeitlichen Auftretens sollte nun weiterführend untersucht werden, ob einzelne VREf der Dendrogrammgruppen über den gesamten Untersuchungszeitraum immer wieder auftraten, oder ob sich die Dendrogrammgruppen vielmehr nur aus miteinander eng verwandten Isolaten zusammensetzten (Tab. 9). Letzteres hätte zum Anstieg der Variabilität innerhalb der Dendrogrammgruppe geführt. Beispielhaft dargestellt wurde dies, anhand der größten Dendrogrammgruppe (Gruppe C 8).

Muster	2004	2005	2006	2007	2008	2009
1	+					
2	+	+				
3	+	+				
4	+	+				
5		+				
6		+				
7		+	+			
8		+				
9		+				
10		+				
11		+				
12		+				
13		+				
14			+			
15			+			
16			+	+	+	
17			+			
18			+			
19			+	+		
20			+			
21			+			
22			+			
23			+		+	
24			+			
25			+			
26				+	+	+
27				+		
28				+		
29				+		
30				+		
31				+		
32				+		
33				+		
34				+		
35				+		
36					+	
37					+	
38					+	
39					+	
40					+	
41					+	
42					+	+
43					+	
44					+	
45					+	+
46					+	
47					+	
48						+
49						+
50						+

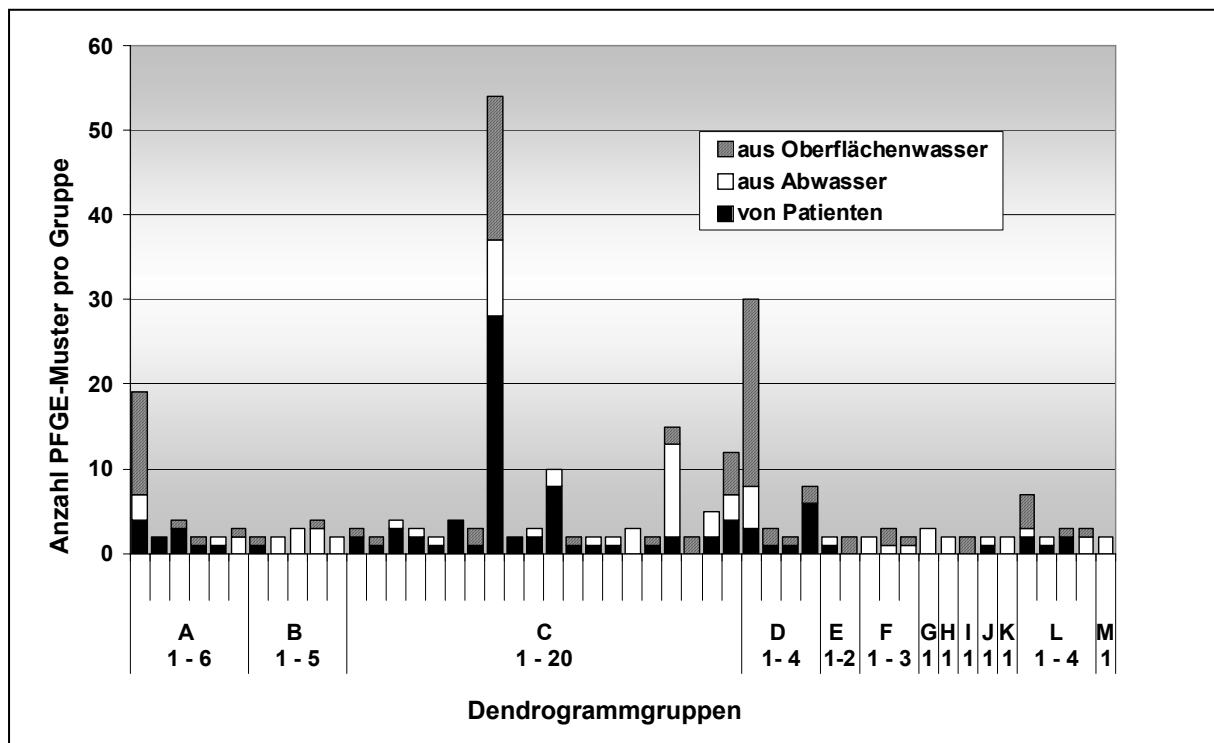
**Tabelle 9: Zeitliches Auftreten der PFGE-Muster von VREf der Dendrogrammgruppe C 8 zwischen 2004 und 2009. + = Isolationszeitpunkt des Isolats mit diesem PFGE-Muster.**

Bei Dendrogrammgruppe C 8 handelte es sich nicht nur um die größte Gruppe bestehend aus den meisten VREf, sondern die VREf dieser Gruppe konnten auch über den gesamten Zeitraum von 2004 bis 2009 isoliert werden. Diese Tatsachen stellten eine gute Grundlage zur Verdeutlichung der Entwicklung innerhalb der Dendrogrammgruppen dar.

Tabelle 9 zeigt, dass keines der Isolate bzw. PFGE-Muster länger als drei Jahre hintereinander nachgewiesen werden konnte. Ein Großteil wurde nur innerhalb eines einzigen Jahres isoliert. Somit setzte sich diese Gruppe nicht aus Isolaten zusammen, die jedes Jahr immer wieder auftraten und über einen langen Zeitraum verbreitet waren, sondern aus einer Vielzahl von Isolaten, die nur über einen kürzeren Zeitraum auftraten (aber untereinander eng verwandt waren). Eine klare Tendenz zur Weiterentwicklung oder Veränderung der Gruppenzusammensetzung war zu erkennen. Dieser Trend war nicht nur auf diese Dendrogrammgruppe C 8 beschränkt, sondern traf auch auf die anderen der sieben größten Dendrogrammgruppen zu. Die Zahl der aufgetretenen, unterschiedlichen VREf einer Gruppe stieg mit jedem Jahr weiter an, so dass die Diversität einen steigenden Trend zeigte. Die Diversität pro Jahr betrachtet blieb auf relativ gleichem Niveau, da Isolate in bestimmten Jahren auftraten während andere wieder verschwanden.

#### 4.1.4.5 Zusammensetzung der Dendrogrammgruppen

In den bisher dargestellten Ergebnissen wurde das zeitliche Auftreten der VREf innerhalb der Dendrogrammgruppen untersucht. Neben der zeitlichen Entwicklung ist auch die Zusammensetzung der Gruppen aus Isolaten unterschiedlicher Herkunft von Interesse. Die Verwandtschaftsanalyse wurde mit VREf-Isolaten aus drei verschiedenen Herkunftsbereichen durchgeführt. Weiterführend sollte die Frage geklärt werden, ob VREf der drei Herkunftsbereiche miteinander eng verwandt sind, also derselben Dendrogrammgruppe zugeordnet wurden, oder ob diese VREf untereinander nur geringe Ähnlichkeit besitzen. Dies würde für Gruppen sprechen, die nur aus VREf eines einzigen Herkunftsbereiches (z. B. von Patienten) bestehen.



**Abbildung 22: Zusammensetzung der 50 Dendrogrammgruppen, bestehend aus insgesamt 262 VREf von Patienten, aus Abwasser und aus Oberflächenwasser.**

Die Zusammensetzung der 50 Dendrogrammgruppen aus VREf der drei Herkunftsbereiche (Patienten, Abwasser und Oberflächenwasser) ist in Abb. 22 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass sich VREf eines bestimmten Herkunftsbereichs nicht grundlegend von VREf aus anderen Herkunftsbereichen unterschieden, sondern dass die Verteilung breit gefächert war. Ersichtlich wird dies daraus, dass die Mehrheit der Dendrogrammgruppen aus VREf aus mindestens zwei der drei Herkunftsbereiche bestand.

Die Minderheit der Dendrogrammgruppen (14 Stück) bestand aus VREf nur eines Herkunftsbereichs (3 Gruppen bestanden nur aus VREf von Patienten, 9 Gruppen nur aus VREf aus Abwasser und 2 Gruppen nur aus VREf aus Oberflächenwasser). Bei diesen 14 Dendrogrammgruppen handelte es sich um sehr kleine Gruppen aus meistens zwei oder drei, einmal auch vier, verschiedenen VREf. Ab einer Größe der Dendrogrammgruppen von mehr als vier VREf war die Zusammensetzung nicht mehr auf nur einen Herkunftsbereich beschränkt (Tab. 10).

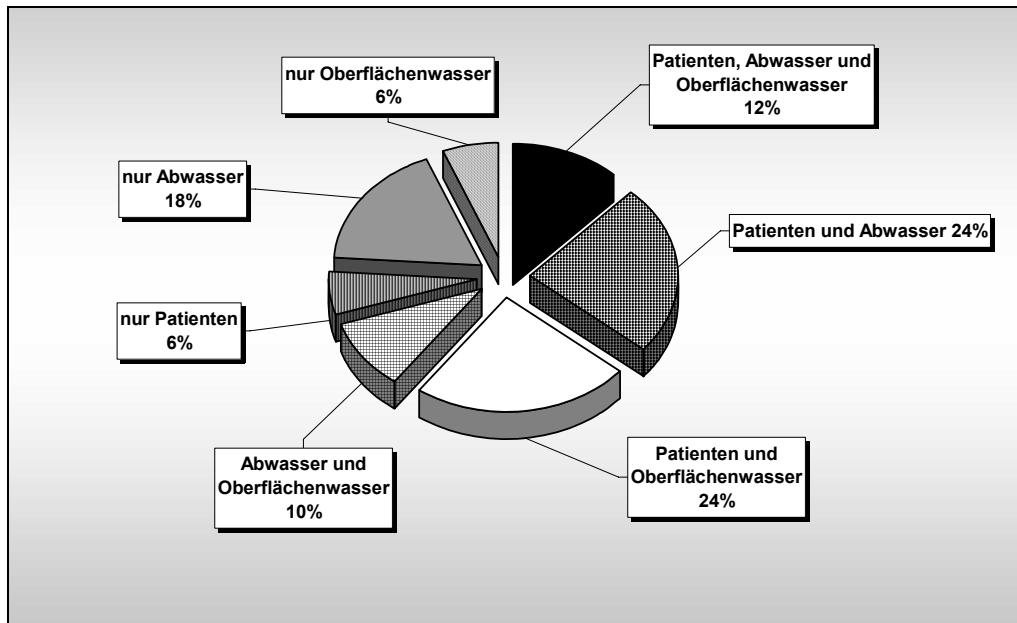
Anzahl unterschiedlicher VREf (PFGE-Muster) pro Gruppe	Anzahl der Herkunftsbereiche		
	1	2	3
1 bis 3	46	25	
4	1	1	1
> 4 bis 50		3	5

**Tabelle 10: Anzahl der Dendrogrammgruppen, abhängig von der Gruppengröße und der Zusammensetzung aus VREf der drei Herkunftsbereiche (Patienten, Abwasser und Oberflächenwasser).**

Tab. 10 stellt die Verbindung zwischen der Gruppengröße und der Anzahl der verschiedenen Herkunftsbereiche, aus denen die VREf stammen, dar. Neben den VREf der 50 Dendrogrammgruppen (mit zwei oder mehr VREf), sind auch die 32 einzelnen VREf mit einbezogen, denen kein weiteres Isolat mit einer Ähnlichkeit von 80 % oder mehr zugeordnet werden konnte. Ca. zwei Drittel der insgesamt 71 kleinen Gruppen, bestehend aus ein bis drei unterschiedlichen VREf, bestand aus VREf aus nur einem Herkunftsbereich. Das weitere Drittel setzte sich aus Isolaten aus zwei Herkunftsbereichen zusammen.

Die insgesamt drei Gruppen mit einer Gruppengröße von vier unterschiedlichen VREf setzten sich aus VREf sowohl aus einem, aus zwei als auch aus drei Herkunftsbereichen zusammen. Gruppen ab einer Größe von mehr als vier unterschiedlichen VREf (acht Gruppen) bestanden aus VREf aus mindestens zwei der drei Herkunftsbereiche. Die fünf mengenmäßig größten Gruppen mit zehn oder mehr unterschiedlichen VREf waren zusammengesetzt aus VREf-Isolaten aus allen drei Herkunftsbereichen (Patienten, Abwasser und Oberflächenwasser). Dies zeigt, dass sich Dendrogrammgruppen mit einer hohen Anzahl an verschiedenen VREf (hohe Diversität) immer aus VREf aus mehreren Herkunftsbereichen zusammensetzten.

Die folgende Abbildung 23 stellt den prozentualen Anteil der 262 VREf-Isolate der 50 Dendrogrammgruppen an den drei Herkunftsbereichen dar:



**Abbildung 23: Zusammensetzung der 50 Dendrogrammgruppen.**

Von den insgesamt 50 Dendrogrammgruppen der Verwandtschaftsanalyse setzten sich 12 % (6 Stück) aus Isolaten von Patienten, aus Abwasser und aus Oberflächenwasser zusammen (Abb. 23). Jeweils 24 % der Gruppen (12 Stück) setzten sich aus VREf von Patienten und aus Abwasser bzw. von Patienten und aus Oberflächenwasser zusammen. Somit bestand der größte Teil der 50 Dendrogrammgruppen, nämlich 60 %, neben VREf von Patienten noch aus VREf aus Abwasser bzw. aus Oberflächenwasser.

Eine Verwandtschaft der Isolate aus Abwasser und aus Oberflächenwasser bestand bei 10 % der Dendrogrammgruppen (5 Stück). Nur insgesamt 30 % der Gruppen (15 Stück) enthielten VREf aus lediglich einem der drei Herkunftsbereiche.

#### 4.1.4.6 Auftreten von spezifischen PFGE-Mustern bei VREf verschiedener Herkunft

Aus den bisherigen Ergebnissen wird deutlich, dass sich die Mehrheit der Dendrogrammgruppen aus VREf mehrerer Herkunftsbereiche zusammensetzte. Weiterführend stellte sich nun die Frage, ob diese Isolate verschiedener Herkunftsbereiche nur nah verwandt waren (und deshalb derselben Dendrogrammgruppe zugeordnet wurden), oder ob diese Isolate genetisch identisch waren. Deshalb wurde in folgender Tabelle 11 das Vorkommen von bestimmten, spezifischen PFGE-Mustern in verschiedenen Bereichen (Patienten, Abwasser, Oberflächenwasser) aufgeführt:

Dendrogrammgruppe (Muster)	Quelle	2004	2005	2006	2007	2008
A 1 (1)	P		+		+	
	A	+	+	+		
	O	+	+	+	+	
C 8 (2)	P	+	+			
	A		+			
	O					
C 8 (3)	P	+	+			
	A	+	+			
	O	+	+			
C 8 (4)	P	+	+			
	A	+	+			
	O					
C 8 (16)	P				+	
	A					
	O			+	+	+
C 8 (26)	P				+	+
	A				+	+
	O					
C 9 (1)	P		+			
	A	+				
	O					
C 11 (1)	P		+	+		
	A		+	+		
	O					
C 14 (1)	P			+		
	A			+		
	O					
C 17 (1)	P			+		
	A			+		
	O			+		
C 20 (1)	P	+	+			
	A	+	+			
	O		+			
C 20 (2)	P	+				
	A	+				
	O					

**Tabelle 11: Vorkommen von spezifischen PFGE-Mustern bei VREf von Patienten (P), aus Abwasser (A) und aus Oberflächenwasser (O).**

VREf aus den drei unterschiedlichen Herkunftsbereichen waren im Versuchszeitraum von 2004 bis 2008 nicht immer nur nah miteinander verwandt. In einigen Fällen konnten auch VREf mit identischen PFGE-Mustern aus mehreren Bereichen isoliert werden (Tab. 11). Für die aufgeführten zwölf PFGE-Muster gelang der Nachweis neben VREf von Patienten auch bei VREf aus Abwasser bzw. Oberflächenwasser.

Ein Zusammenhang bezüglich des Auftretens von VREf mit identischen PFGE-Mustern zwischen verschiedenen Herkunftsbereichen war somit erkennbar, aber dieser Zusammenhang konnte nicht immer zeitlich oder örtlich begründet werden. D. h. es war kein klarer Verbreitungsweg z. B. von Patienten über das Abwasser in das Oberflächenwasser erkennbar. Teilweise traten PFGE-Muster im gleichen Jahr in allen drei Bereichen auf (Muster 3 aus Gruppe C 8 oder Muster 1 aus Gruppe C 17), teilweise aber auch zuerst im Oberflächenwasser und später erst bei Patienten (Muster 16 aus Gruppe C 8).

Unter den aufgeführten PFGE-Mustern befanden sich auch die beiden PFGE-Muster der beiden VREf, die während zwei Ausbrüchen in den Jahren 2004 und 2005 isoliert wurden. Das PFGE-Muster des ersten Ausbruchs-VREf (VRE 1) befindet sich in Gruppe C 20 (Muster 1). Das PFGE-Muster des zweiten Ausbruchs-VREf (VRE 2) ist das PFGE-Muster 3 der Dendrogrammgruppe C 8. Diese beiden PFGE-Muster wurden bei VREf in den beiden Jahren 2004 und 2005 sowohl bei Patienten, als auch in Abwasser, nachgewiesen. Während VRE 2 auch in diesen beiden Jahren in Oberflächenwasser gefunden wurde, wurde VRE 1 lediglich im Jahr 2005 in Oberflächenwasserproben gefunden.

#### 4.1.4.7 Eintrag von VREf in die aquatische Umwelt

Klonal identische VREf konnten sowohl bei Patienten, als auch in Abwasser und Oberflächenwasser nachgewiesen werden. Dabei wurden bei den Herkunftsbereichen „Abwasser“ und „Oberflächenwasser“ mehrere Probeentnahmestellen zusammengefasst und nicht getrennt nach Orten betrachtet. Die Verbreitungswege von VREf sollten näher untersucht werden, weswegen die Bereiche „Abwasser“ und „Oberflächenwasser“ nach einzelnen Probestellen aufgeschlüsselt wurden (Tab. 12).

Im Jahr 2004 verursachten VRE auf den Hämatologiestationen der Universitätsmedizin Mainz einen Ausbruch unter den Patienten. Ausbrüche in Kliniken sind meistens polyklonal, d. h. sie werden von mehreren klonalen VRE verursacht, die aber eng miteinander verwandt sind [3, 23, 92, 94, 197]. Ein klonales Isolat dieses Ausbruchs wurde mittels PFGE genotypisiert und als VRE 1 (Muster 1 der Dendrogrammgruppe C 20) bezeichnet.



		Probenherkunft							
		P	B	C	D	E	F	G	H
2004	VRE 1	25x	2x	1x	-	2x	-	-	-
	VRE 2	4x	1x	1x	-	-	-	1x	-
	Probenanzahl gesamt	39*	3	4	5	4	2	3	2
2005	VRE 1	3x	1x	2x	1x	1x	-	1x	-
	VRE 2	3x	-	1x	-	1x	-	1x	1x
	Probenanzahl gesamt	34*	2	3	2	3	3	4	3
2006	VRE 1	-	-	-	-	-	-	-	-
	VRE 2	-	-	-	-	-	-	-	-
	Probenanzahl gesamt	30*	3	1	1	1	1	1	1

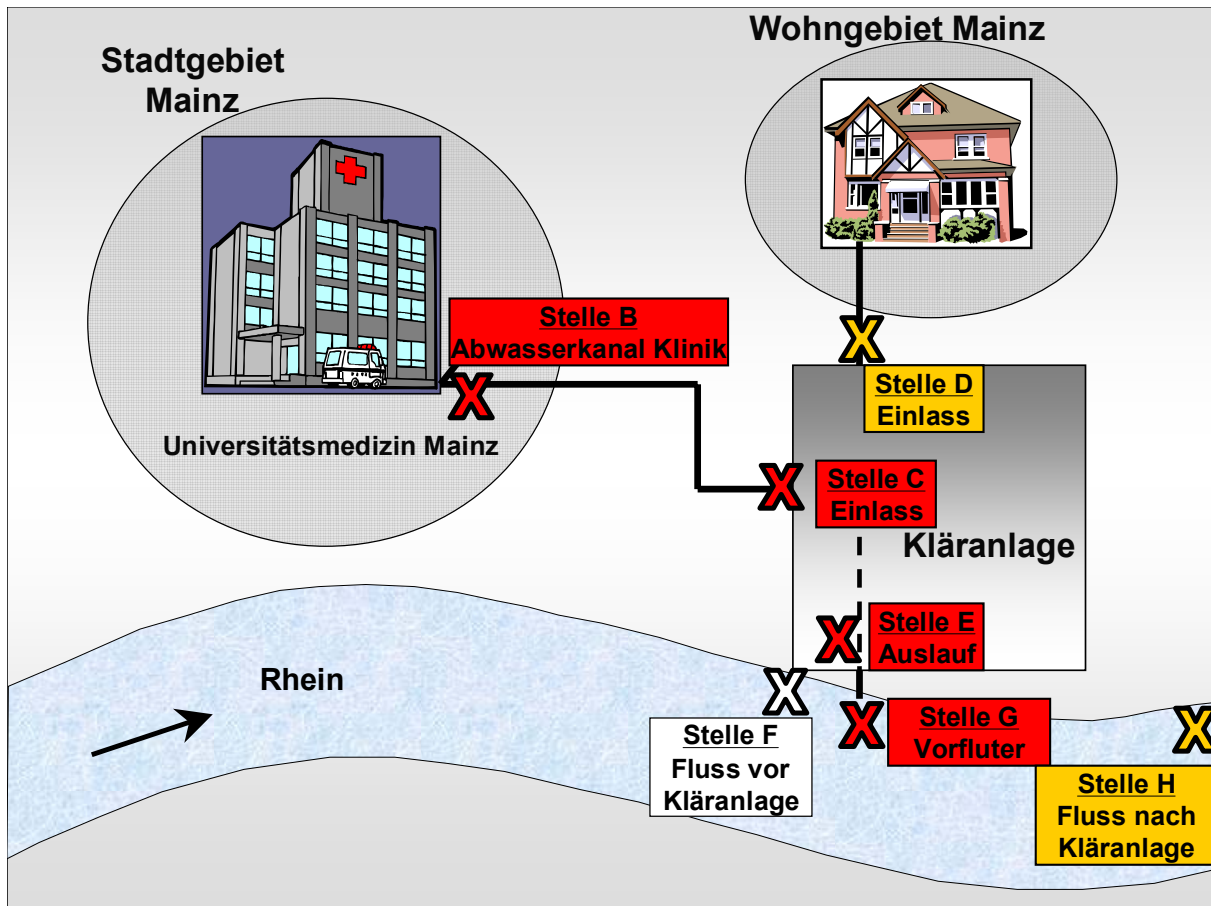
**Tabelle 12: Häufigkeit des Auftretens von VREf in den Jahren 2004 bis 2006.**  
P = Patienten, B = Abwasser Klinikum, C = Abwasser aus dem Einlauf der Kläranlage (mit Klinik), D = Abwasser aus dem Einlauf der Kläranlage (mit Wohngebiet), E = geklärtes Abwasser aus dem Auslauf der Kläranlage, F = Rhein vor der Kläranlage, G = Rhein am Kläranlagenauslauf und H = Rhein nach der Kläranlage.\* = VRE-positive Patienten.

Bei 25 von insgesamt 39 VRE-positiv getesteten Patienten konnte das PFGE-Muster von VRE 1 nachgewiesen werden (Tab. 12). Ebenfalls im selben Jahr konnten weitere klonale Isolate mit identischem PFGE-Muster aus dem Abwasser des Klinikums (Stelle B), aus dem Einlauf der Kläranlage, an den das Klinikum angeschlossen ist, und aus dem Auslauf der Kläranlage (Stelle E) isoliert werden. Lediglich im Rhein konnte dieser VREf in 2004 nicht nachgewiesen werden (Stellen F, G und H). Im Jahr 2005 waren weit weniger Patienten mit VRE 1 besiedelt (drei Patienten von insgesamt 34 VRE-positiven Patienten). Trotzdem konnten klonale Isolate an allen Probestellen in der Umwelt in diesem Jahr (bis auf die Stellen F und H im Rhein) nachgewiesen werden. Im Jahr 2006 konnte dieser VREf weder bei Patienten noch in der aquatischen Umwelt nachgewiesen werden, obwohl auch in diesem Jahr 30 Patienten VRE-positiv getestet wurden.

Auch VRE 2 (Muster 3 aus Dendrogrammgruppe C 8) wurde Ende 2004/Anfang 2005 im Rahmen eines Ausbruchs isoliert. In Analabstrichen von 4 Patienten konnten im Jahr 2004 klonale Isolate dieses VREf nachgewiesen werden. Im selben Jahr wurde VRE 2 auch aus dem Abwasser der Klinik (Stelle B), dem Abwasser des Einlaufs in die Kläranlage (Stelle C) und dem Rhein an Stelle G (am Auslauf der Kläranlage) isoliert. Im Jahr 2005 waren noch drei Patienten mit diesem VREf besiedelt. Auch in diesem Jahr konnten VREf mit diesem PFGE-Muster sowohl in der Kläranlage (Stellen C und E) als auch an den Probestellen am Rhein (Stellen G und

H) isoliert werden. Im Jahr 2006 konnte VRE 2, wie VRE 1 auch, bei keinem Patienten und an keiner Probestelle in der Umwelt mehr nachgewiesen werden.

Folgende Abbildung 24 verdeutlicht das Auftreten dieser beiden VREf entlang des Pfades der aquatischen Umwelt von dem Klinikum über die Kläranlage bis hin in den Rhein:



**Abbildung 24: Probestellen in der aquatischen Umwelt (X) an denen die beiden AusbruchsvREf (VRE 1 und VRE 2) in den Jahren 2004 und 2005 entlang des Abwasser-Pfades zwischen Klinikum und Rhein isoliert wurden.** rot = beide VREf konnten an dieser Stelle isoliert werden, orange = einer der beiden VREf konnte an dieser Stelle isoliert werden, weiß = keiner dieser beiden VREf konnte an dieser Stelle isoliert werden.

Die Isolierungsorte in der aquatischen Umwelt (entlang des Wegs vom Abwasser des Klinikums, über die Kläranlage in Mainz, bis hin in das Oberflächenwasser des Rheins) der beiden VREf aus den Jahren 2004 und 2005 ist in Abbildung 24 dargestellt. Beide VREf konnten innerhalb dieser beiden Jahre sowohl bei Patienten als auch in ungeklärtem Abwasser (Stellen B und C), geklärtem Abwasser (Stelle E) und Oberflächenwasser (Stelle G) nachgewiesen werden. Auch im Abwasser des Einlaufs der Kläranlage, an den das Klinikum nicht angeschlossen ist (Stelle D), konnte einer der beiden VRE isoliert werden, genauso wie an Probestelle H im Rhein (Rhein hinter dem Kläranlagenauslauf). Lediglich an Probestelle F (Rhein vor dem

Kläranlagenauslauf) konnte während dieser beiden Jahre keiner der beiden VREf isoliert werden.

Zusammenfassend waren somit für beide VREf die Patienten im Krankenhausumfeld eine „Eintragsquelle“ in die aquatische Umwelt, und es war eine anschließende weitere Verbreitung entlang des Abwasserpfades bis hin zum Oberflächenwasser erkennbar. Solange Patienten von diesen beiden VREf besiedelt waren, waren sie auch in der aquatischen Umwelt nachweisbar. Sobald jedoch an der Eintragsquelle keine Patienten mit diesen VREf-Typen mehr auftraten, konnten sie auch in der aquatischen Umwelt nicht mehr nachgewiesen werden. Für alle weiteren untersuchten VREf konnte in dieser Form keine klare Eintragsquelle bzw. Verbreitung über den Abwasserweg in einen zeitlichen und örtlichen Zusammenhang gebracht werden. Somit waren VREf in der aquatischen Umwelt zwar zahlreich nachweisbar, ein Eintrag aus den Krankenhäusern durch die Patienten und eine Verbreitung in die Umwelt war allerdings nur in Ausbruchssituationen nachweisbar.

## **4.2 Untersuchungen zur Keimzahlreduktion von VRE durch Elektroimpulsbehandlung in Verbindung mit thermischem Einfluss**

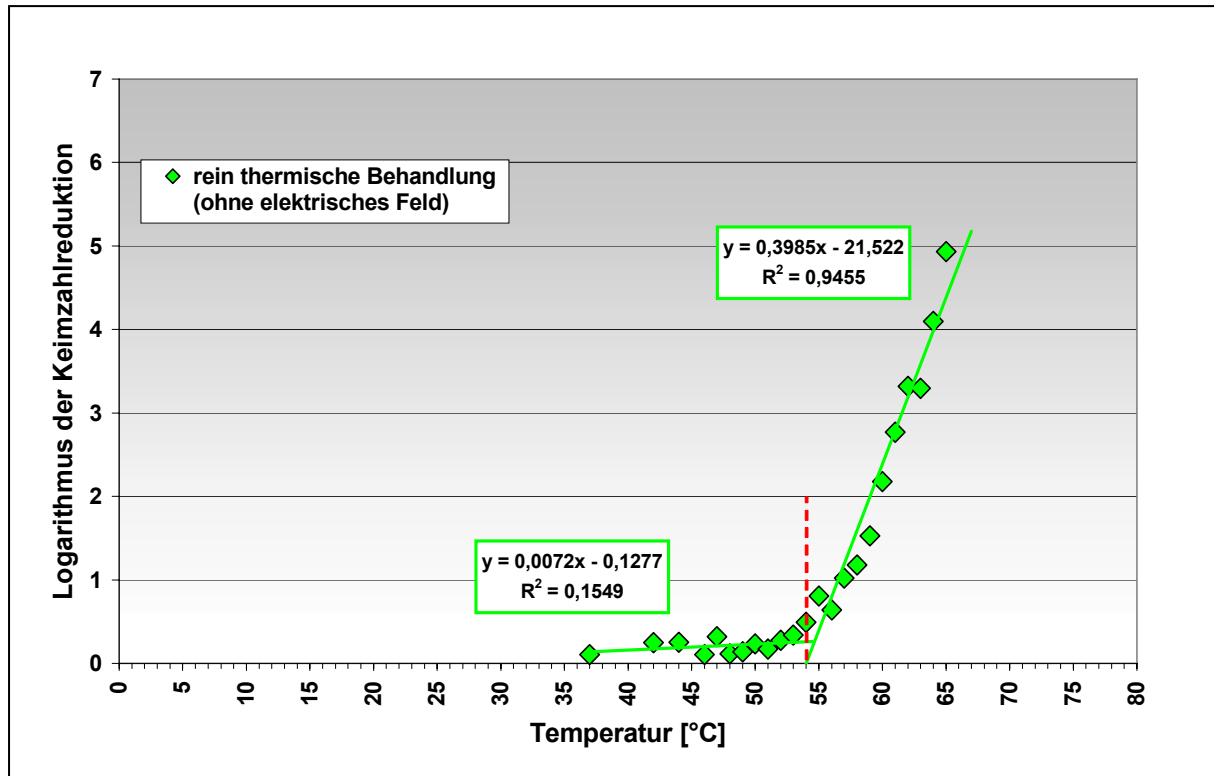
Bakteriell belastetes Abwasser stellt sich hinsichtlich der Emission von Pathogenen in die Umwelt immer mehr als hygienisches Problemabwasser heraus. Das Klinikabwasser der Universitätsmedizin Mainz konnte als eine Eintragsquelle antibiotikaresistenter Keime in die aquatische Umwelt bis hin in das Oberflächenwasser des Rheins ausgemacht werden. Ziel muss es daher sein, möglichst früh und dezentral eine effiziente Hygienisierung einzuführen, damit die Übertragung von klinisch relevanten Keimen über den Wasserweg unterbrochen werden kann, falls dies nötig erscheint. In diesem Teil der Dissertation wurde deshalb untersucht, inwieweit eine Pilotanlage auf Basis der Elektroimpulstechnologie in der Lage ist, zur Desinfektion von mit Vancomycin-resistenten *Enterococcus faecium* (VREf) hoch belastetem Klinikabwasser beizutragen. Unter diesen VREf befanden sich zwei VREf, die in den Jahren 2004 und 2005 im Rahmen von zwei Ausbrüchen auf den Hämatologiestationen der Universitätsmedizin Mainz isoliert wurden (VRE 1 und VRE 2). Zusätzlich zu den VREf wurde auch der Vancomycin-sensible *Enterococcus faecium* Referenzstamm ATCC 6057 auf das Abtötungsverhalten durch das elektrische Feld in der Elektroimpulsanlage getestet.

### **4.2.1 Keimzahlreduktion durch rein thermische Behandlung**

Die elektrische Impulsbehandlung von Flüssigkeiten in der Pilotanlage führte als Nebeneffekt zwangsläufig zu einer Erwärmung der behandelten Flüssigkeit, was nicht umgangen werden konnte. Aufgrund dieser Tatsache wurden von allen VREf eine Abtötungskurve und die spezifische Absterbetemperatur ( $T_a$ ) im Labor unter rein thermischem Einfluss (also ohne elektrisches Feld) ermittelt. Bei der Absterbetemperatur handelt es sich um die Temperatur, bei der das Absterben durch Hitze gerade einsetzt. Ermittelt wurde dieser Temperaturpunkt als Schnittpunkt der Abtötungs-Gerade mit der x-Achse ( $y = 0$ ). Die Ergebnisse der Keimzahlreduktion bei rein thermischer Behandlung wurden benötigt, um die Abtötungsleistung der Elektroimpulsbehandlung, losgelöst von etwaigen Temperatureinflüssen, beurteilen zu können.

#### 4.2.1.1 Höchste Absterbetemperatur

Die Keimzahlreduktion unter rein thermischem Einfluss (Hitzeeinwirkungsdauer = 1 Minute, siehe Kapitel 3.2.2.2 Keimzahlreduktion durch rein thermische Behandlung) sowie die Absterbetemperatur ( $T_a$ ) wurden für den Referenzstamm ATCC 6057 (*Enterococcus faecium*) ermittelt und sind in Abb. 25 dargestellt:



**Abbildung 25:** Auftragung des Logarithmus (zur Basis 10) der Keimzahlreduktion gegen die Temperatur [°C] für den Vancomycin-sensiblen *Enterococcus faecium* ATCC 6057 auf Slanetz-Bartley-Agar bei rein thermischer Behandlung (grüne Werte). Rot-gestrichelte Linie: Temperaturpunkt zu Beginn der Abtötung durch Hitze (Absterbetemperatur,  $T_a$ ).

Für den Vancomycin-sensiblen *Enterococcus faecium* Referenzstamm ATCC 6057 wurde eine Abtötungskurve und die daraus resultierende Absterbetemperatur ( $T_a$ ) von 54 °C in Abwasser ermittelt (Abb. 25). Unter allen getesteten Enterokokken besaß dieser Referenzstamm die höchste aller ermittelten Absterbetemperaturen.

#### 4.2.1.2 Niedrigste Absterbetemperatur

Neben dem Referenzstamm ATCC 6057 wurde auch für die drei Vancomycin-resistenten, klinisch relevanten Enterokokken jeweils die Keimzahlreduktion unter rein thermischem Einfluss und die daraus resultierende Absterbetemperatur ermittelt (Hitzeeinwirkungsdauer = 1 Minute, siehe Kapitel 3.2.2.2 Keimzahlreduktion durch rein thermische Behandlung). Das Ergebnis von VRE 2 ist in Abb. 26 dargestellt. Es handelte sich um die niedrigste Absterbetemperatur aller getesteten VREf.

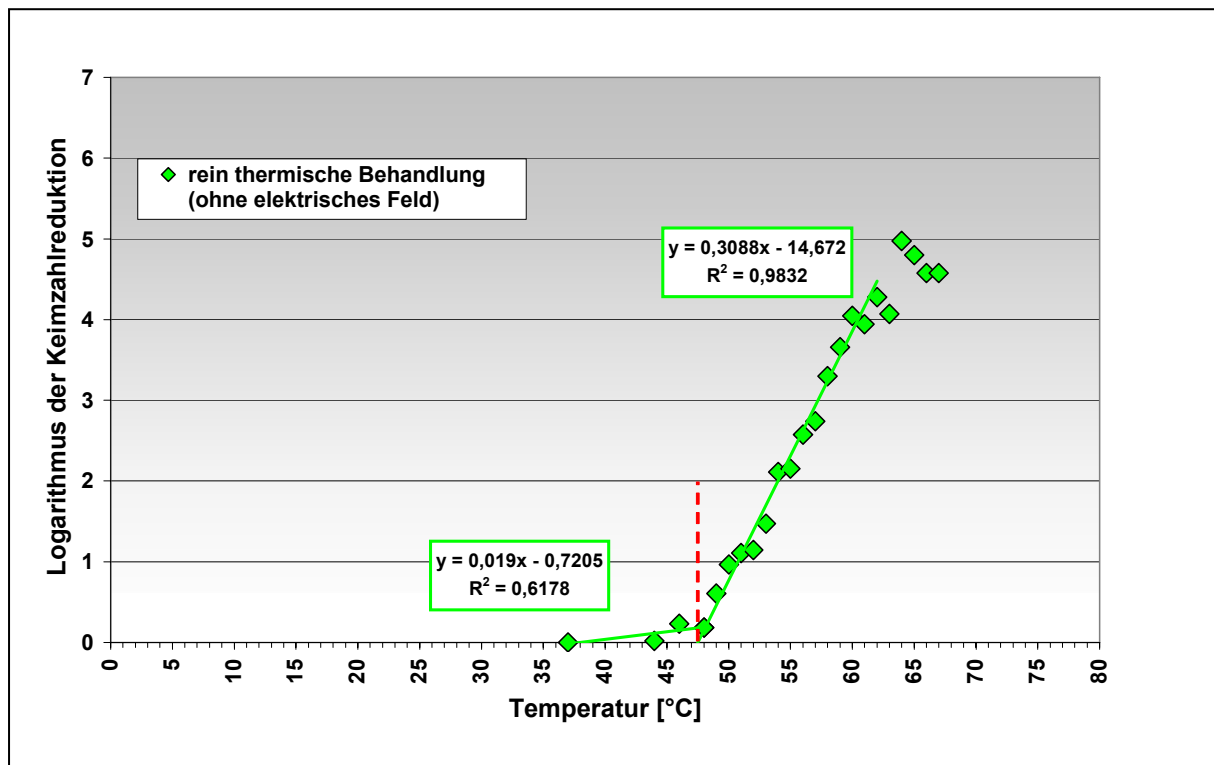


Abbildung 26: Auftragung des Logarithmus (zur Basis 10) der Keimzahlreduktion gegen die Temperatur [°C] für den Vancomycin-resistenten *Enterococcus faecium* „VRE 2“ auf Slanetz-Bartley-Agar bei rein thermischer Behandlung (grüne Werte). Rot-gestrichelte Linie: Temperaturpunkt zu Beginn der Abtötung durch Hitze (Absterbetemperatur,  $T_a$ ).

VRE 2 wurde von Patienten zur Zeit eines Ausbruchs in der Universitätsmedizin Mainz Ende 2004 bzw. Anfang 2005 isoliert. Für diesen VRE wurde eine Absterbetemperatur  $T_a$  von 47,5 °C (Abb. 26) ermittelt. Es handelte sich dabei um die niedrigste Absterbetemperatur unter den insgesamt drei getesteten VREf. Für die weiteren zwei VREf (VRE 1 und VRE 7) wurden Absterbetemperaturen von 53°C bzw. 49,1°C ermittelt (Tab. 13).

#### 4.2.1.3 Zusammenfassung der Absterbetemperaturen aller getesteten Isolate

Die Ergebnisse der rein thermischen Behandlung aller getesteten Enterokokken sind in der folgenden Tabelle 13 zusammenfassend aufgelistet.

Stamm	Absterbetemperatur $T_a$ [°C]	Gleichung der Absterbe-Geraden	Herkunft
ATCC 6057	54,0	$y = 0,3985x - 21,522$	Referenzkeim
VRE 1	53,0	$y = 0,4407x - 23,357$	Patient
VRE 2	47,5	$y = 0,3088x - 14,672$	Patient
VRE 7	49,1	$y = 0,3195x - 15,701$	Patient

Tabelle 13: Zusammenfassung der Absterbetemperaturen ( $T_a$ ) der (Vancomycin-resistenten) Enterokokken. Aufgeführt sind außerdem die jeweilige Geradengleichung der Absterbekurve und die Herkunft der Stämme.

Der temperaturresistenteste Stamm war der Vancomycin-sensible Referenzstamm ATCC 6057 (Tab. 13). Mit 54 °C lag dessen Absterbetemperatur um 6 °C höher als die des temperatursensibelsten Stamms (VRE 2), der schon bei 47,5 °C begann abzusterben. Die mit 53,0 °C zweithöchste Temperaturresistenz zeigte VRE 1. VRE 7 begann bei 49,1 °C abzusterben. Dieses Isolat stammte ebenfalls von einem Patienten, jedoch nicht aus einer Ausbruchssituation.

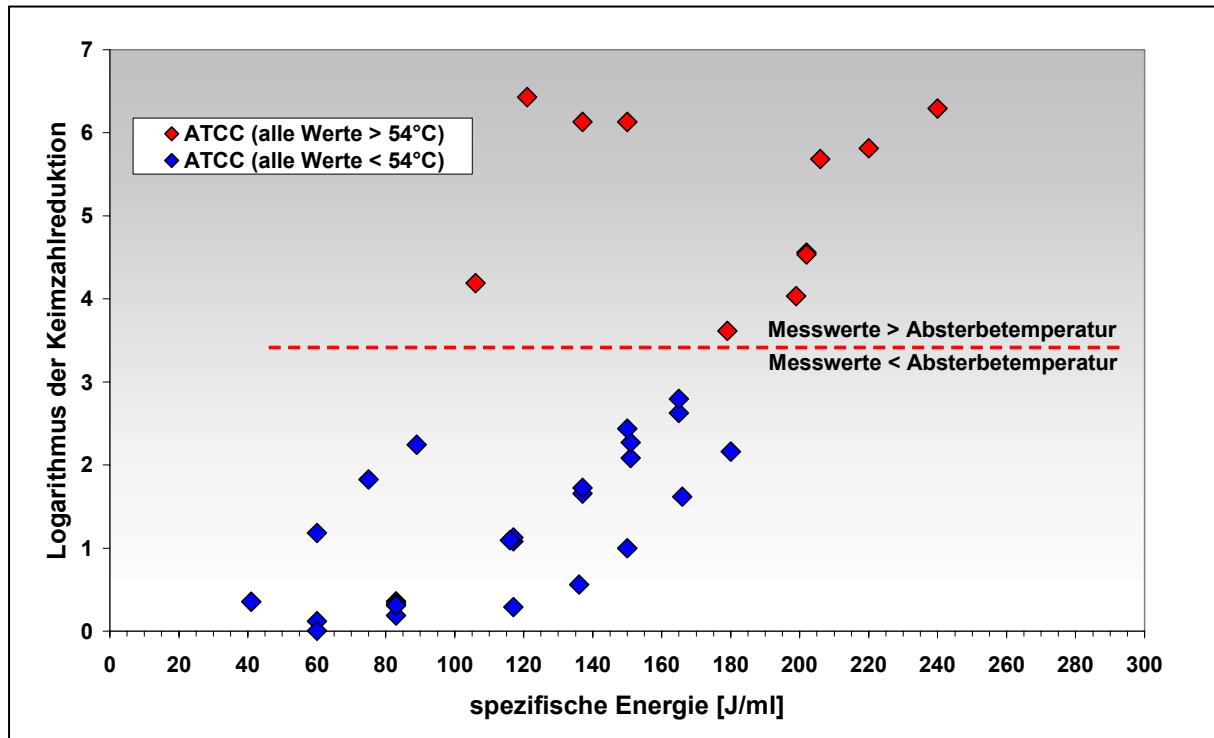
### **4.2.2 Wirkungsweise des elektrischen Feldes**

Die auf ihr Abtötungsverhalten durch rein thermische Behandlung (also ohne elektrisches Feld) untersuchten Enterokokken zeigten unterschiedliche Reaktionen in Bezug auf den temperaturbedingten Beginn der Abtötung bei steigenden Temperaturen. Um nun die Leistung der Elektroimpulsanlage in Bezug auf die Keimzahlreduktion (Abtötung) der Enterokokken durch das gepulste elektrische Feld beurteilen zu können, wurde untersucht, in welcher Art und Weise das elektrische Feld zur Abtötung beiträgt. Dazu wurde der Fokus überwiegend auf den Bereich unterhalb der jeweiligen Absterbetemperatur gelegt, um den alleinigen Einfluss des elektrischen Feldes auf die Keimzahlreduktion untersuchen zu können. Denn in Temperaturbereichen oberhalb der Absterbetemperatur findet zusätzlich eine Keimzahlreduktion durch Hitze statt. Untersucht wurden zwei verschiedene Einflussfaktoren, die sich auf die Keimzahlreduktion der Enterokokken auswirken könnten.

#### 4.2.2.1 Einfluss der spezifischen Energie

Bei der Elektroimpulsbehandlung wurde pro elektrischem Puls eine bestimmte definierte Energiemenge in das Abwasser abgegeben. Bei der sog. „spezifischen Energie“ handelte es sich um einen errechneten Mittelwert, der in eine definierte Menge Abwasser abgegeben wurde. Sie sorgte gleichzeitig auch für eine Erwärmung des Abwassers. Die spezifische Energiemenge wurde dabei durch bestimmte Faktoren beeinflusst. Dazu zählten u. a. Messgrößen wie die Kapazität des Generators, die Zündspannung der Anlage und die Impulsanzahl.

Um zu testen, inwiefern die durch die Elektroimpulsbehandlung in das Abwasser abgegebene spezifische Energie einen Einfluss auf die Abtötung ausübte, wurde die berechnete Abtötung gegen die spezifische Energie aufgetragen. Der Einfluss der spezifischen Energie wurde anhand des Referenzstammes *Enterococcus faecium* (ATCC 6057) charakterisiert (Abb. 27):



**Abbildung 27: Einfluss der spezifischen Energie [J/ml] auf die Keimzahlreduktion (Logarithmus zur Basis 10) von Referenzstamm ATCC 6057 (*E. faecium*).** Werte mit einer Auslauf­temperatur unterhalb von 54 °C sind blau, Werte über 54 °C sind rot eingezeichnet (begrenzt durch die rote, gestrichelte Linie).

In Abb. 27 ist der Logarithmus zur Basis 10 der Keimzahlreduktion des Referenzstamms ATCC 6057 über der spezifischen Energie aufgetragen (vier Versuchsreihen, siehe Kapitel 3.2.2.3 und 8.2.4 Anhang, Tab. A18 - A21). Da durch die Elektroimpulsbehandlung des Abwassers unterschiedliche Temperaturen erzielt wurden, sind die erhaltenen Messwerte unterteilt in Werte unterhalb (blaue Werte), und Werte oberhalb (rote Werte) der für diesen Stamm spezifischen Absterbetemperatur (54 °C, siehe Kapitel 4.2.1 Keimzahlreduktion durch rein thermische Behandlung).

Im Gegensatz zur rein thermischen Behandlung wurde bei der Behandlung durch elektrische Pulse (in Verbindung mit Temperatur) auch unterhalb der Absterbetemperatur von 54 °C eine abtötende Wirkung erzielt. Insgesamt bestand dabei aber kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Abtötung und der durch die Elektroimpulsanlage ins Abwasser abgegebenen spezifischen Energie, denn die Werte zeigten eine große Streuung. So wurde z. B. dieselbe Höhe der Abtötung durch unterschiedlich große spezifische Energien erreicht bzw. konnte die Bepulsung mit einer bestimmten spezifischen Energie eine unterschiedlich hohe Abtötung erzielen (beispielhaft wurde bei 150 J/ml eine Abtötung von 1, 2 und 6 Logstufen



erreicht). Andererseits waren bei den Werten unterhalb der Absterbetemperatur von 54 °C (blau) drei verschiedene Kurven erkennbar. Dies deutet auf einen gewissen Zusammenhang der Abtötung gegenüber der spezifischen Energie hin, allerdings muss neben der spezifischen Energie noch mindestens ein weiterer Faktor Einfluss auf die Abtötung nehmen. Um dieses Ergebnis näher zu untersuchen, wurde der Einfluss der Temperatur (Prozesstemperatur) weiterführend charakterisiert.

#### 4.2.2.2 Einfluss der Temperatur vor und nach der Elektroimpulsbehandlung

Um den Temperatureinfluss zu untersuchen, wurden sowohl der Einfluss von unterschiedlichen Einlauftemperaturen (Temperatur des Abwassers vor der Elektroimpulsbehandlung) als auch der Einfluss von unterschiedlichen Auslauftemperaturen (Temperatur des Abwassers nach der Elektroimpulsbehandlung) untersucht. Die in Abb. 27 dargestellten Werte des Referenzstamms ATCC 6057 wurden nach Temperaturen des Abwassers zu Versuchsbeginn (Einlauftemperaturen) weiter aufgeschlüsselt (Abb. 28):

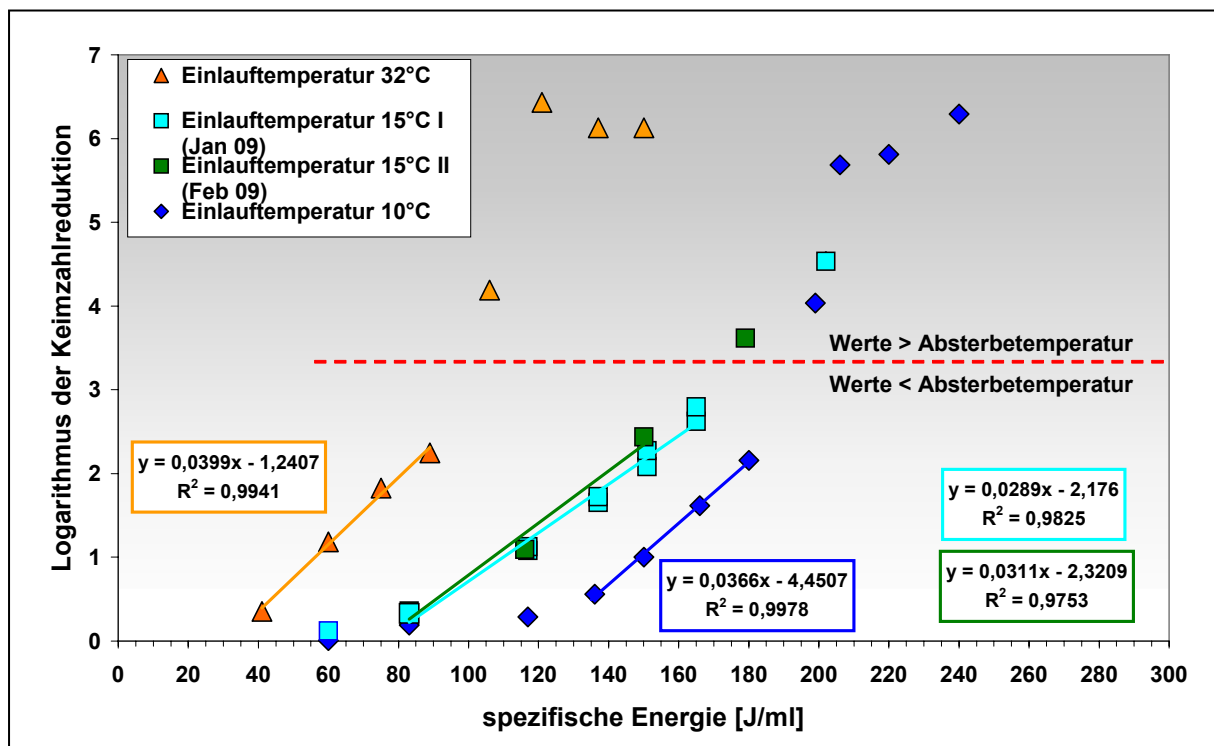
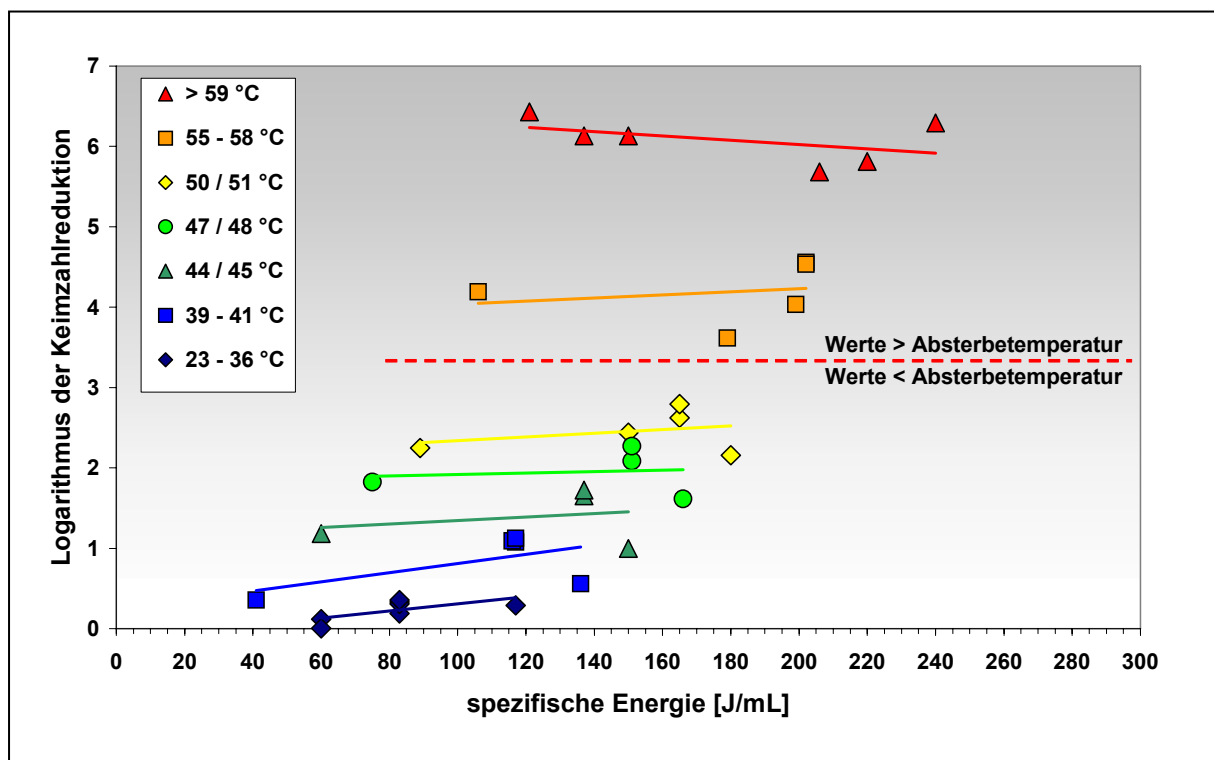


Abbildung 28: Einfluss der Einlauftemperaturen auf die Keimzahlreduktion (Logarithmus zur Basis 10) von Referenzstamm ATCC 6057 (*E. faecium*). Alle Messwerte sind nach der Einlauftemperatur des Abwassers farblich gekennzeichnet und unterteilt in Werte mit einer Endtemperatur unterhalb von 54 °C und oberhalb von 54 °C (begrenzt durch die rote, gestrichelte Linie).

In Abb. 28 ist zu erkennen, dass mit steigender Einlauf­temperatur eine Verschiebung der Abtötungskurve in den Bereich von geringerer spezifischer Energie erfolgte. Die Steigungen der Geraden gleichen sich (sie liegen im Bereich zwischen 0,0289 und 0,0399). Ein direkter Zusammenhang der Abtötung mit der Einlauf­temperatur war allerdings nicht erkennbar. Die Ergebnisse sind gut reproduzierbar, wie die beiden sich deckenden 15 °C -Kurven von Januar und Februar 2009 beweisen.

Je nach Höhe des Eintrags der spezifischen Energie bei der Elektroimpuls­behandlung in das Abwasser wurde dieses um eine bestimmte Temperaturdifferenz (abhängig von der Leitfähigkeit des Abwassers, der abgegebenen Wärmemenge pro Impuls und der Impulsanzahl) erwärmt. Jedem in Abb. 28 dargestellten Wert konnte somit eine Auslauf­temperatur zugeordnet werden. Um dies darzustellen, wurde weiterhin der Logarithmus zur Basis 10 der Keimzahlreduktion des Referenzstamms ATCC 6057 (Abb. 29) gegen die spezifische Energie aufgetragen und zusätzlich aufgeschlüsselt nach den jeweiligen Auslauf­temperaturen des Abwassers nach der Elektroimpuls­behandlung.



**Abbildung 29:** Einfluss der spezifischen Energie [J/ml] auf die Keimzahlreduktion (Logarithmus zur Basis 10) von Referenzstamm ATCC 6057 (*E. faecium*). Alle Auslauf­temperaturen sind farblich markiert und unterteilt in Temperaturwerte oberhalb und unterhalb der Absterbetemperatur unter rein thermischem Einfluss (54 °C, rot-gestrichelte Linie).

Die verschiedenen Auslauftemperaturen des Abwassers (mit unterschiedlichen Einlauftemperaturen) wurden durch Bepulsung mit unterschiedlich hoher spezifischer Energie erzielt (Abb. 27, 28 und 29). Die Keimzahlreduktion des ATCC-Stamms war abhängig von der Auslauftemperatur des Abwassers aus der Anlage bzw. von der Temperatur, die durch die Elektroimpulsbehandlung im Reaktor erzielt wurde (Abb. 29). Denn gleiche bzw. ähnliche Temperaturwerte des Auslaufs resultierten in bestimmten, für die jeweilige Auslauftemperatur spezifischen, Keimzahlreduktionen. Dies ist erkennbar an den waagerechten, auf einer Höhe der Keimzahlreduktion liegenden Werten eines bestimmten Temperaturbereiches (bei Auslauftemperaturen von z. B. 47/48 °C wurde immer eine Abtötung von ca. 2 Logstufen erreicht). Für das Erreichen der unterschiedlichen Auslauftemperaturen wurden unterschiedliche spezifische Energiemengen benötigt (bei den Werten von 47/48 °C Auslauftemperatur wurden spezifische Energien zwischen 75 und 170 Joule pro Milliliter eingesetzt). Bei steigender Auslauftemperatur war somit eine Verschiebung in den Bereich höherer Keimzahlreduktion zu erkennen, was eine Abhängigkeit der Keimzahlreduktion von der Prozesstemperatur (hier die Auslauftemperatur) verdeutlicht. Eine Erhöhung der spezifischen Energiemenge trug nur zur Temperaturerhöhung des Abwassers bei, da mit dem elektrischen Puls Energie in Form von Wärme in das Abwasser abgegeben wurde. Die Wirkungsweise des elektrischen Feldes beruht somit auf einer gesteigerten Temperaturempfindlichkeit, ohne die eine Abtötung bei Temperaturen unterhalb der Absterbetemperatur gar nicht gegeben wäre.

### **4.2.3 Keimzahlreduktion durch Elektroimpulsbehandlung in Verbindung mit thermischem Einfluss**

Nachdem für alle Enterokokken eine jeweils spezifische Absterbetemperatur bei rein thermischer Behandlung ermittelt war, wurden diese Isolate der Elektroimpulsbehandlung unterzogen. Da durch die Bepulsung die Abwassermatrix unumgänglich erhitzt wurde, wurden die erhaltenen Ergebnisse im direkten Vergleich zur rein thermischen Behandlung dargestellt. Dazu wurde aufgrund der erwiesenen Temperaturempfindlichkeit unter Anwesenheit eines elektrischen Feldes die Auftragung der Keimzahlreduktion (Abtötung) gegen die Auslauftemperatur gewählt.

#### 4.2.3.1 Keimzahlreduktion durch Elektroimpulsbehandlung von Referenzstamm ATCC 6057

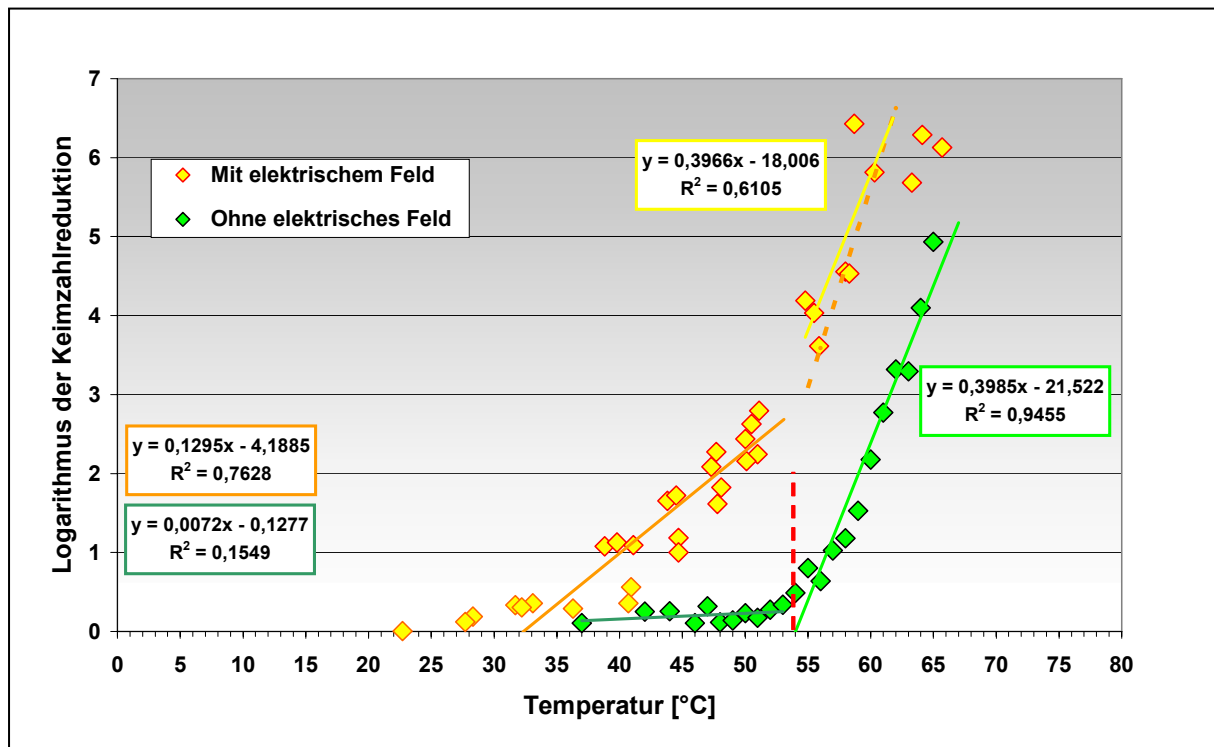
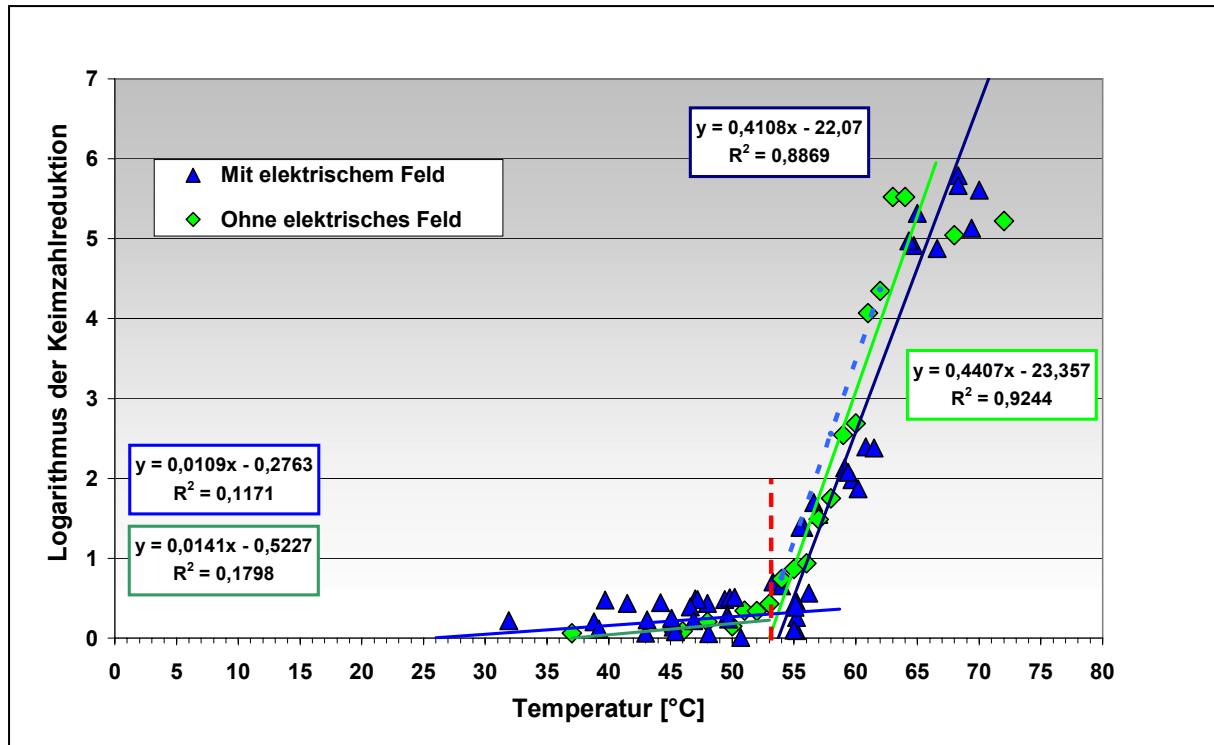


Abbildung 30: Keimzahlreduktion (Logarithmus zur Basis 10) des ATCC-Stamms 6057 (*E. faecium*) bei Abwesenheit (rein thermische Behandlung, grüne Werte) und Anwesenheit (Elektroimpulsbehandlung, gelbe Werte) eines elektrischen Feldes. Rot-gestrichelte Linie: Absterbetemperatur durch rein thermische Behandlung (54 °C).

In Abb. 30 ist im direkten Vergleich die Keimzahlreduktion als Logarithmus zur Basis 10 des *Enterococcus faecium* Referenzstamms ATCC 6057 zwischen rein thermischer Behandlung (grüne Werte) und der Elektroimpulsbehandlung (gelbe Werte) in der Elektroimpulsanlage dargestellt (vier Versuchsreihen, siehe Kapitel 3.2.2.3 und 8.2.4 Anhang, Tabellen A18 – A21). Gegenüber der rein thermischen Behandlung war ein deutlicher Unterschied in der Höhe der Abtötung bei Behandlung durch ein gepulstes elektrisches Feld zu erkennen. Bei gleichen Temperaturwerten war die Abtötung durch die Elektroimpulsbehandlung deutlich höher als bei rein thermischer Behandlung. Ab einer Temperatur von ca. 32 °C begann der Referenzstamm unter Anwesenheit eines elektrischen Feldes bereits abzusterben. Bei Erreichen der Absterbetemperatur (54 °C) des Referenzstammes, an der unter rein thermischer Behandlung gerade die Abtötung durch Hitze einsetzt, war unter Einwirken des elektrischen Feldes bereits eine Abtötung von ca. drei Logstufen zu verzeichnen. Oberhalb einer Temperatur von 54 °C lagen die Werte der Keimzahlreduktion nahezu auf der berechneten Geraden, die durch die Addition der

Geraden der Elektroimpulsbehandlung unterhalb von 54 °C und thermischer Behandlung oberhalb von 54 °C errechnet wurde (orange-gestrichelte Linie).

#### 4.2.3.2 Keimzahlreduktion durch Elektroimpulsbehandlung von VRE 1



**Abbildung 31: Keimzahlreduktion (Logarithmus zur Basis 10) des Vancomycin-resistenten *Enterococcus faecium* „VRE 1“ bei Abwesenheit (rein thermischer Behandlung, grüne Werte) und Anwesenheit (Elektroimpulsbehandlung, blaue Werte) eines elektrischen Feldes. Rot-gestrichelte Linie: Absterbetemperatur durch rein thermische Behandlung (53 °C).**

In Abb. 31 ist im direkten Vergleich die Abtötung als Logarithmus zur Basis 10 des Vancomycin-resistenten *Enterococcus faecium* „VRE 1“ zwischen rein thermischer Behandlung (grüne Werte) und der Behandlung durch elektrische Impulse (blaue Werte) in der Elektroimpulsanlage dargestellt (fünf Versuchsreihen, siehe Kapitel 3.2.2.3 und 8.2.1 Anhang, Tabellen A2 – A11). Gegenüber der rein thermischen Behandlung war kein Unterschied in der Abtötung bei Anwesenheit eines gepulsten elektrischen Feldes zu erkennen. Bei gleich bleibender Temperatur war die Abtötung unter Elektroimpulsbehandlung nahezu identisch mit den Werten der Keimzahlreduktion ohne Elektroimpulsbehandlung. Die maximale Keimzahlreduktion betrug dabei maximal eine halbe Logstufe. Oberhalb einer Temperatur von 53 °C (ermittelte Absterbetemperatur von VRE 1) waren die erhaltenen Werte ebenfalls identisch mit den Werten bei rein thermischer Behandlung.

## 4.2.3.3 Keimzahlreduktion durch Elektroimpulsbehandlung von VRE 2

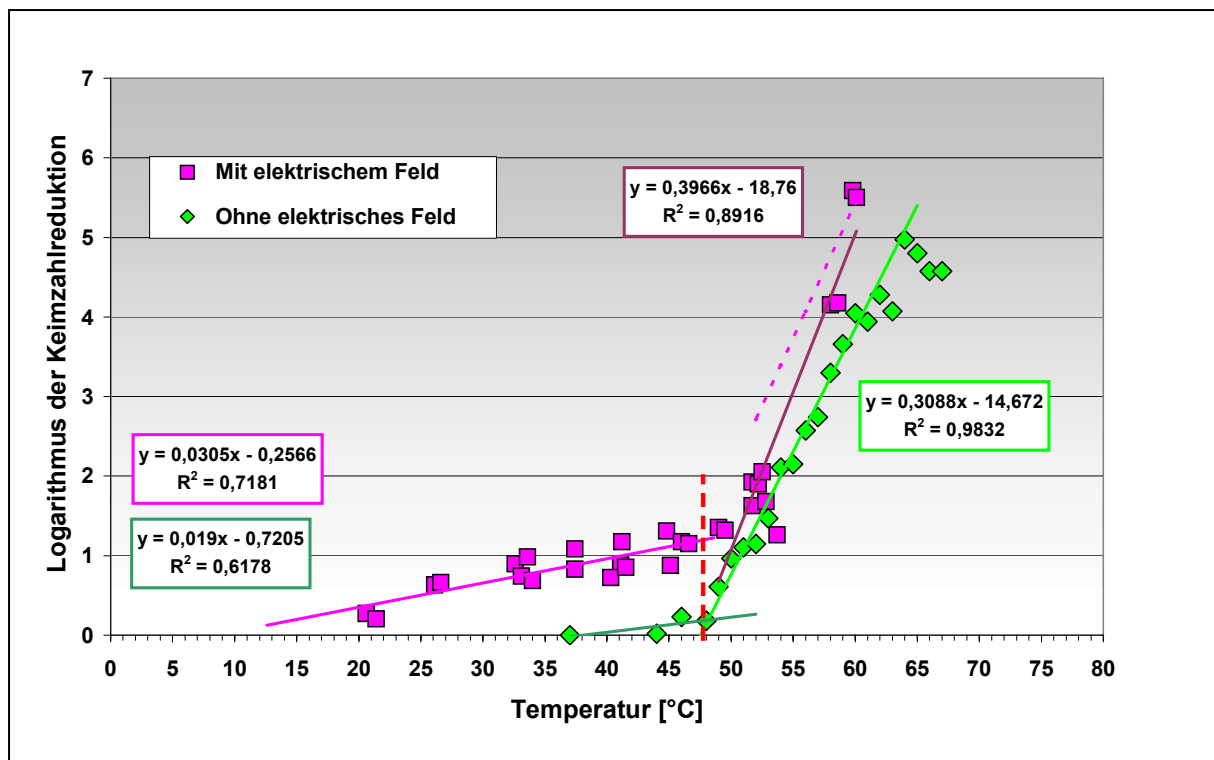
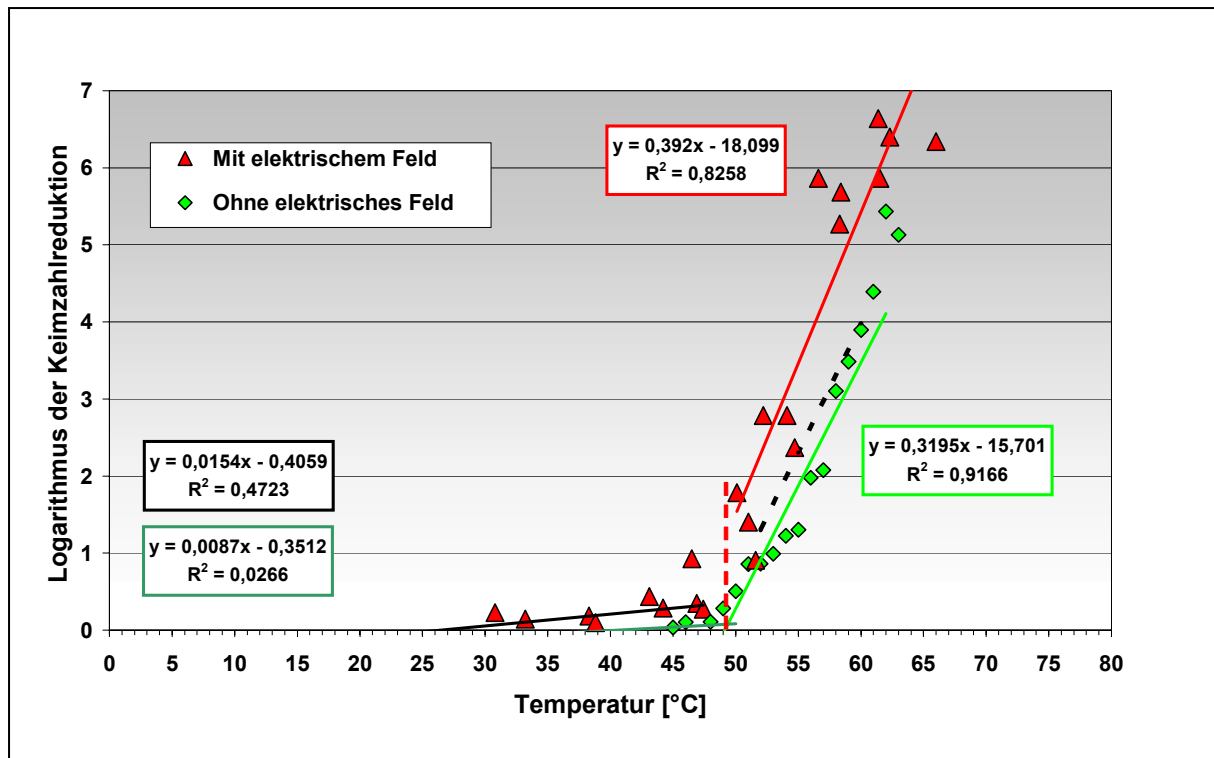


Abbildung 32: Keimzahlreduktion (Logarithmus zur Basis 10) des Vancomycin-resistenten *Enterococcus faecium* „VRE 2“ bei Abwesenheit (rein thermischer Behandlung, grüne Werte) und Anwesenheit (Elektroimpulsbehandlung, magenta-farbene Werte) eines elektrischen Feldes. Rot-gestrichelte Linie: Absterbetemperatur durch rein thermische Behandlung (47,5 °C).

In Abb. 32 ist im direkten Vergleich die Abtötung als Logarithmus zur Basis 10 des Vancomycin-resistenten *Enterococcus faecium* „VRE 2“ zwischen rein thermischer Behandlung (grüne Werte) und der Behandlung durch elektrische Impulse (magenta-farbene Werte) in der Elektroimpulsanlage dargestellt (drei Versuchsreihen, siehe Kapitel 3.2.2.3 und 8.2.2 Anhang, Tabellen A12 – A14). Gegenüber der rein thermischen Behandlung war bei der Elektroimpulsbehandlung, bei Temperaturen unterhalb der Absterbetemperatur von VRE 2 von 47,5 °C, ein Unterschied in der Höhe der Abtötung zu erkennen. Mit Elektroimpulsbehandlung lag die Abtötung bei Temperaturen zwischen 40 °C und 48 °C ca. eine Logstufe höher als ohne Elektroimpulsbehandlung. Oberhalb einer Temperatur von 48 °C lagen die erhaltenen Messwerte knapp oberhalb der Geraden durch rein thermische Behandlung bzw. knapp unterhalb der berechneten Geraden (magenta-gestrichelte Linie), die durch die Addition der Geraden der Elektroimpulsbehandlung unterhalb von 47,5 °C und thermischer Behandlung oberhalb von 47,5 °C berechnet wurde.

## 4.2.3.4 Keimzahlreduktion durch Elektroimpulsbehandlung von VRE 7



**Abbildung 33: Keimzahlreduktion (Logarithmus zur Basis 10) des Vancomycin-resistenten *Enterococcus faecium* „VRE 7“ bei Abwesenheit (rein thermischer Behandlung, grüne Werte) und Anwesenheit (Elektroimpulsbehandlung, rote Werte) eines elektrischen Feldes. Rot-gestrichelte Linie: Absterbetemperatur durch rein thermische Behandlung (49,1 °C).**

In Abb. 33 ist im direkten Vergleich die Abtötung als Logarithmus zur Basis 10 des Vancomycin-resistenten *Enterococcus faecium*-Isolats „VRE 7“ zwischen rein thermischer Behandlung (grüne Werte) und der Behandlung durch ein gepulstes elektrisches Feld (rote Werte) in der Elektroimpulsanlage dargestellt (drei Versuchsreihen, siehe Kapitel 3.2.2.3 und 8.2.3 Anhang, Tabellen A15 – A17). Gegenüber der rein thermischen Behandlung war bei Temperaturen unterhalb der Absterbetemperatur von VRE 7 (49,1 °C) kein Unterschied in der Höhe der Abtötung bei der Elektroimpulsbehandlung zu erkennen. Die berechnete Gerade unterhalb der Absterbetemperatur aus den erhaltenen Werten mit dem elektrischen Feld (schwarze Linie) lag nur knapp über der Geraden der rein thermischen Behandlung (dunkel grüne Linie). Unterhalb der Absterbetemperatur von 49,1 °C zeigte dieser VREf somit keine Abtötung durch Elektroimpulsbehandlung. Ab einer Temperatur von ca. 43 °C war eine Verschiebung der Werte in den Bereich höherer Abtötung zu erkennen. Die Gerade unter Einwirkung eines elektrischen Feldes (rote Linie) lag oberhalb der Geraden durch rein thermische Behandlung (grüne Linie) und auch oberhalb der

berechneten Gerade, die durch Addition der Geraden von Elektroimpulsbehandlung und thermischer Behandlung (grün-gestrichelte Linie) erstellt wurde.

4.2.3.5 Zusammenfassung:

Zusammenfassend für alle getesteten (resistenten) Enterokokken-Isolate stellt die folgende Tabelle (Tab. 14) die Geradengleichungen unterhalb und oberhalb der jeweiligen spezifischen Absterbetemperaturen ( $T_a$ ) sowohl bei Vorhandensein eines elektrischen Feldes als auch unter dessen Abwesenheit (rein thermische Behandlung) dar.

Ohne elektrisches Feld					Mit elektrischem Feld	
Stamm	Gleichung ( $<T_a$ )	$T_a$ [°C]			Gleichung ( $<T_a$ )	
ATCC	$y = \underline{0,0072}x - 0,1277$	54,0	=>		$y = \underline{0,1295}x - 4,1885$	
VRE 1	$y = \underline{0,0141}x - 0,5227$	53,0	=>		$y = \underline{0,0109}x - 0,2763$	
VRE 2	$y = \underline{0,0188}x - 0,7247$	47,5	=>		$y = \underline{0,0305}x - 0,2566$	
VRE 7	$y = \underline{0,0087}x - 0,3512$	49,1	=>		$y = \underline{0,0154}x - 0,4129$	

**Tabelle 14: Vergleich der Keimzahlreduktionen unter Anwesenheit eines elektrischen Feldes im Vergleich zu rein thermischer Behandlung (ohne elektrisches Feld) zwischen den untersuchten Enterokokken-Isolaten.** Angegeben sind die jeweiligen Geradengleichungen unterhalb der jeweiligen Absterbetemperatur ( $T_a$ ). Die Steigung der Geraden ist durch Unterstreichung optisch hervorgehoben.

Zum Vergleich der Wirkung des elektrischen Feldes auf die Keimzahlreduktionen der Isolate untereinander wurde als Maßstab die jeweilige Änderung der Steigung der Geraden unterhalb der jeweiligen Absterbetemperatur  $T_a$  herangezogen (Tab. 14). Diese Änderung der Steigung ließ direkte Rückschlüsse auf die Keimzahlreduktion zu. Je größer die Änderung der Steigung, desto höher die Keimzahlreduktion. Diese Darstellung ermöglichte den Vergleich der Reaktionen auf das Vorhandensein eines gepulsten elektrischen Feldes zwischen den Enterokokken.

Den größten Einfluss der Elektroimpulsbehandlung auf die Keimzahlreduktion bzw. die größte Reaktion auf das elektrische Feld resultierte aus den Werten des Vancomycin-sensiblen Referenzstamms ATCC 6057. Hier erhöhte sich die Steigung der Geraden von 0,0072 (ohne elektrisches Feld) auf 0,1295 (mit elektrischem Feld). Bei Bepulsung mit 166 J/ml spezifischer Energie wurde eine Abtötung von ca. 2,5 Logstufen erzielt (Abb. 30). Unter den VRE war keine Erhöhung der Steigung in dieser Größenordnung zu verzeichnen. Sie zeigten insgesamt eine nur geringe Reaktion in Bezug auf die Abtötung durch das elektrische Feld. Die größte Erhöhung



der Steigung, von 0,0188 (ohne elektrisches Feld) auf 0,0305 (mit elektrischem Feld), wurde mit VRE 2 erzielt.

### **4.2.4 Einfluss des Nährbodens auf die Keimzahlreduktion**

Bei der Berechnung der Keimzahl einer Bakteriensuspension durch Ausplattieren kann der verwendete Nährboden entscheidenden Einfluss auf das Wachstum der Bakterien nehmen. Um eine Aussage über diesen Einfluss auf die Keimzahlreduktion in Abwesenheit und Anwesenheit eines gepulsten elektrischen Feldes treffen zu können, wurde das Wachstum der getesteten VRE auf einem Vancomycin-haltigen Nährboden (Enterococcosel-Agar) verglichen mit dem Wachstum auf einem selektiven Enterokokken-Agar (Slanetz-Bartley-Agar).

#### **4.2.4.1 Rein thermische Behandlung**

Neben der Keimzahlbestimmung durch Ausplattieren auf Slanetz-Bartley-Agar wurde auch eine Keimzahlbestimmung durch Ausplattieren auf Enterococcosel-Agar unter rein thermischem Einfluss untersucht (siehe Kapitel 3.2.2.3 Keimzahlreduktion durch Elektroimpulsbehandlung in Verbindung mit thermischem Einfluss). Anschließend wurde die berechnete Keimzahlreduktion auf Enterococcosel-Agar im direkten Vergleich zu den Ergebnissen auf Slanetz-Bartley-Agar dargestellt. Die Unterschiede zwischen den beiden Nährböden wurden in Abb. 34 für den Vancomycin-resistenten *Enterococcus faecium* 1 (VRE 1) und in Abb. 35 für VRE 2 dargestellt.

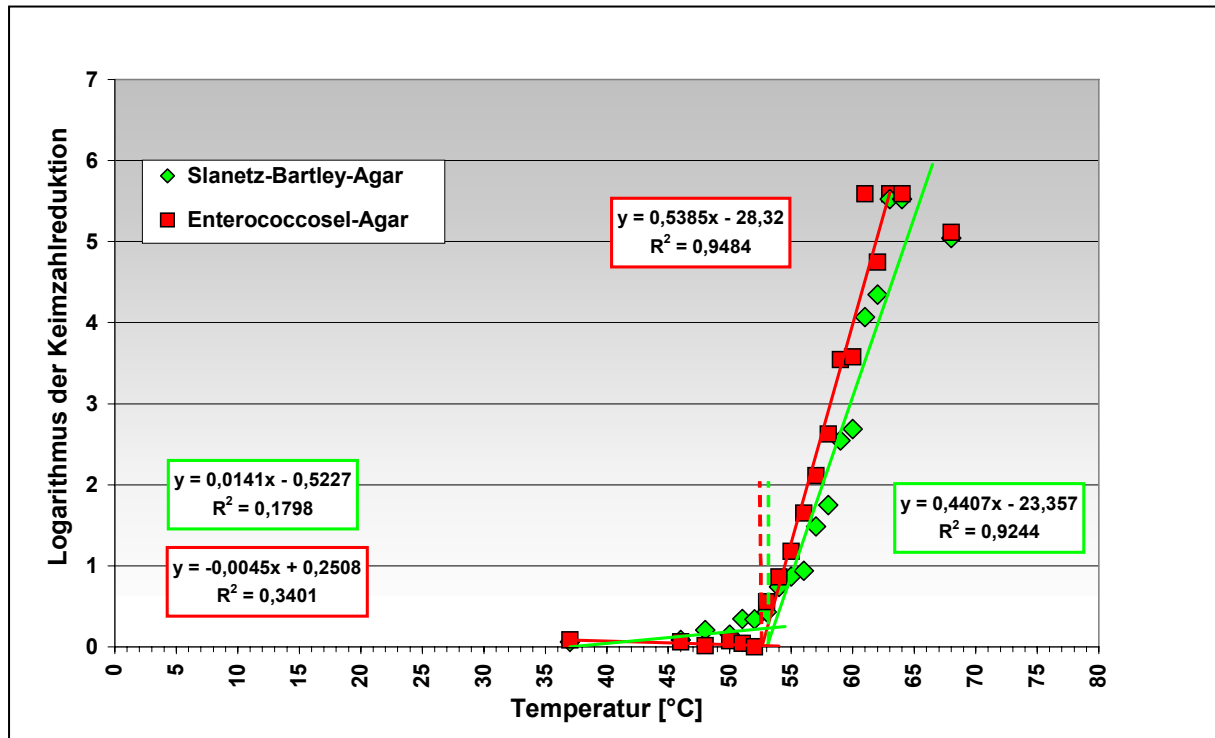


Abbildung 34: Auftragung des Logarithmus zur Basis 10 der Keimzahlreduktion gegen die Temperatur [°C] für VRE 1 (*E. faecium*) auf Slanetz-Bartley-Agar (grün) und auf Enterococcosel-Agar mit Vancomycin (rot) bei rein thermischer Behandlung. Grün-gestrichelte Linie: Absterbetemperatur auf Slanetz-Bartley-Agar. Rot-gestrichelte Linie: Absterbetemperatur auf Enterococcosel-Agar.

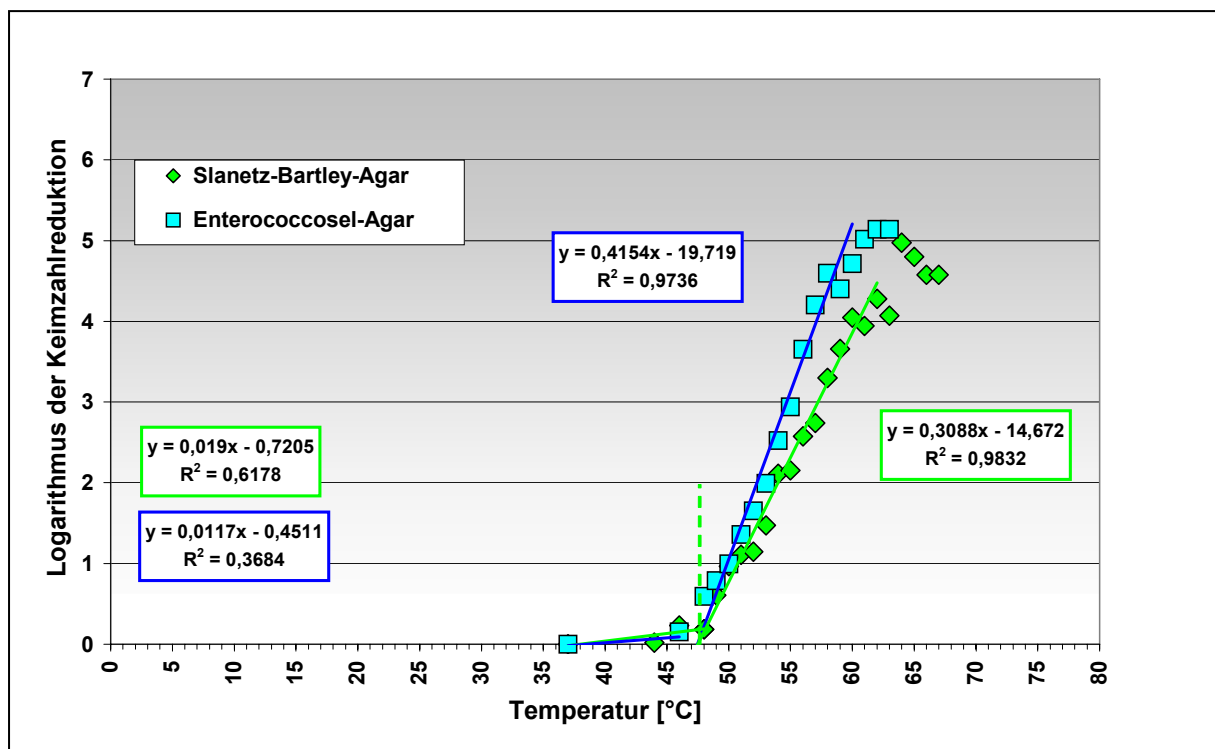


Abbildung 35: Auftragung des Logarithmus zur Basis 10 der Keimzahlreduktion gegen die Temperatur [°C] für VRE 2 (*E. faecium*) auf Slanetz-Bartley-Agar (grün) und auf Enterococcosel-Agar mit Vancomycin (blau) bei rein thermischer Behandlung. Grün-gestrichelte Linie: Absterbetemperatur (auf beiden Nährböden identisch).

Für die in der Elektroimpulsanlage untersuchten VRE wurden zunächst die Keimzahlreduktion als Logarithmus zur Basis 10 und die Absterbetemperatur ( $T_a$ ) unter rein thermischem Einfluss auf je zwei verschiedenen Nährböden ermittelt (Abb. 34 und Abb. 35). Bei der Absterbetemperatur handelte es sich um die Temperatur, bei der das Absterben durch Hitze gerade einsetzt (Schnittpunkt der steigenden Gerade mit der x-Achse bei  $y = 0$ ). Sie wurde für jeden VRE und für jeden Nährboden getrennt ermittelt, um zu testen, ob die Absterbetemperatur abhängig vom verwendeten Nährboden ist.

Für VRE 1 wurde eine Absterbetemperatur von 53 °C nach Keimzahlbestimmung durch Ausplattieren auf Slanetz-Bartley-Agar ermittelt (Abb. 34). Die ermittelte Absterbetemperatur auf dem Vancomycin-haltigen Nährboden (Enterococcosel-Agar) lag mit 52,6 °C nur minimal niedriger. Bei VRE 2 ergaben sich keine Unterschiede in der Absterbetemperatur zwischen den beiden getesteten Nährböden (Abb. 35). Hier wurde in beiden Fällen eine Absterbetemperatur von 47,5 °C ermittelt. Lediglich die Abtötungsgeraden auf Enterococcosel-Agar nahmen in Bereichen von höheren Temperaturen ( $> T_a$ ) einen steileren Verlauf. Getestet wurden die Absterbetemperaturen auf den beiden Nährböden noch für einen weiteren VRE (VRE 7, Tab. 15).

Slanetz-Bartley-Agar			
Stamm	Gleichung ( $<T_a$ )	$T_a$ [°C]	Gleichung ( $>T_a$ )
VRE 1	$y = 0,0141x - 0,5227$	53	$y = 0,4407x - 23,357$
VRE 2	$y = 0,0188x - 0,7247$	47,5	$y = 0,3088x - 14,672$
VRE 7	$y = 0,0087x - 0,3512$	49,1	$y = 0,3195x - 15,701$

Enterococcosel-Agar			
Stamm	Gleichung ( $<T_a$ )	$T_a$ [°C]	Gleichung ( $>T_a$ )
VRE 1	$y = -0,0045x + 0,2508$	52,6	$y = 0,5385x - 28,32$
VRE 2	$y = 0,0117x - 0,4511$	47,5	$y = 0,4154x - 19,719$
VRE 7	$y = 0,0041x - 0,1096$	49,1	$y = 0,4042x - 19,902$

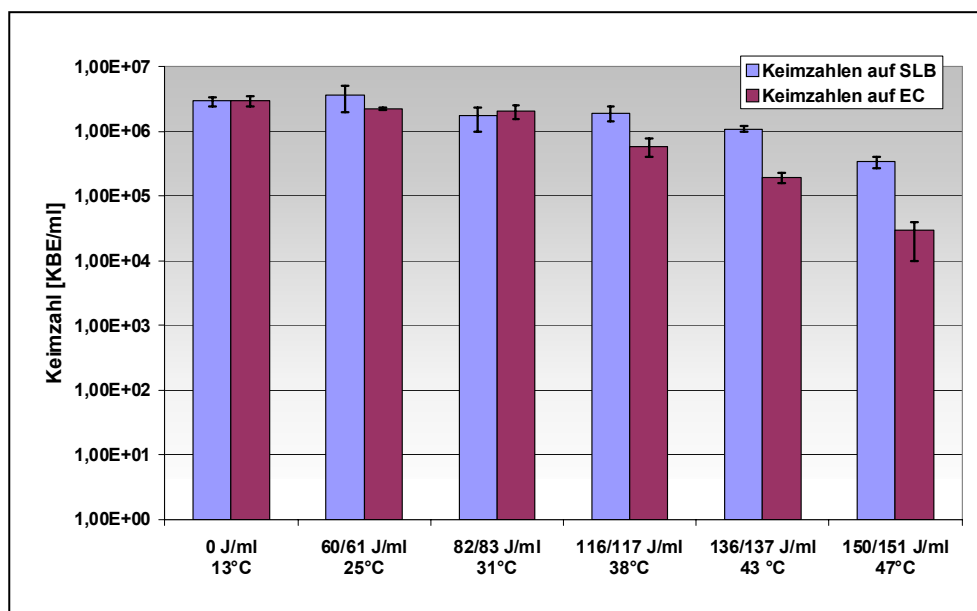
**Tabelle 15: Zusammenfassung der rein thermischen Behandlung (dargestellt durch die Geradengleichungen der Abtötungsgeraden unterhalb und oberhalb der ermittelten Absterbetemperatur) von drei VRE auf zwei Nährböden (Slanetz-Bartley-Agar und Enterococcosel-Agar mit Vancomycin).  $T_a$  = Absterbetemperatur.**

Für VRE 7 wurde auf beiden Nährböden eine Absterbetemperatur von 49,1 °C berechnet. Der Nährboden mit Vancomycin (Enterococcosel-Agar) hatte somit bei den getesteten VRE keinen Einfluss auf die Absterbetemperatur bei rein thermischer Behandlung im Vergleich zu dem Nährboden ohne Antibiotikum (Slanetz-Bartley

Agar). Für den Referenzstamm ATCC 6057 entfiel die Untersuchung mit dem Vancomycin-haltigen Enterococcosel Nährboden, da es sich bei diesem Referenzstamm um einen Vancomycin-sensiblen *Enterococcus faecium* handelt.

#### 4.2.4.2 Elektroimpulsbehandlung in Verbindung mit thermischem Einfluss

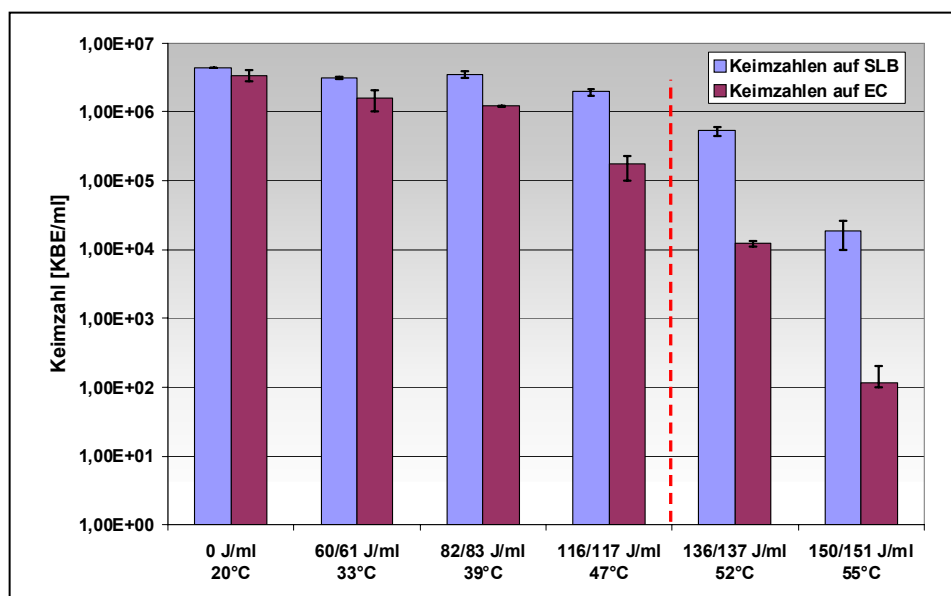
Bei rein thermischer Behandlung der VRE hatte der Nährboden keinen Einfluss auf das Wachstum bzw. die Abtötung durch Hitze. Mit der nachfolgenden Untersuchung in der Elektroimpulsanlage sollte getestet werden, ob unter Anwesenheit eines gepulsten elektrischen Feldes (in Verbindung mit Temperatur) ein Unterschied im Wachstum bzw. der Keimzahlreduktion zwischen den genannten beiden Nährböden auftritt. Dies wurde vorwiegend bei Temperaturen unterhalb der Absterbetemperatur getestet, um den alleinigen Effekt des elektrischen Feldes zu beurteilen zu können.



**Abbildung 36: Keimzahlen [KBE/ml] von VRE 7 nach der Elektroimpulsbehandlung.** Die spezifische Energie [J/ml] und erreichten Temperaturen (Auslauf) der Elektroimpulsbehandlung sind für zwei verschiedene Nährböden (SLB = Slanetz-Bartley-Agar; EC = Enterococcosel-Agar) angegeben.

Anhand von VRE 7 wurde untersucht, ob sich das gepulste elektrische Feld der Elektroimpulsanlage auf das Wachstum auf unterschiedlichen Nährböden auswirkte. Zwei Versuchsreihen mit unterschiedlichen Einlaufftemperaturen des Abwassers vor der Elektroimpulsbehandlung (13 °C (Abb. 36) und 20 °C (Abb. 37)) gaben darüber Aufschluss. Bei Bepulsung mit steigender spezifischer Energie und somit gleichzeitig

steigender Temperatur wurde das Wachstum von VRE 7 auf beiden Nährböden reduziert (Abb. 36, siehe auch Kapitel 8.2.3 Anhang, Tabelle A16). Dabei ergab sich eine Reduktion der Keimzahl auf Slanetz-Bartley-Agar um maximal ca. eine Logstufe und auf Enterococcosel-Agar um maximal ca. zwei Logstufen. Durch die Elektroimpulsbehandlung wurde somit das Wachstum von VRE 7 auf Enterococcosel Agar stärker gehemmt als das Wachstum auf Slanetz-Bartley-Agar. Dieser Effekt wurde erst ab einer Bepulsung mit einer spezifischen Energie von 116/117 Joule pro Milliliter bzw. ab einer Temperatur von 38 °C deutlich, denn dort vergrößerte sich der Unterschied in den Keimzahlen. Unterhalb dieser Werte waren die Keimzahlen der beiden Nährböden annähernd gleich. Die nachfolgende Abb. 37 zeigt die gleiche Versuchsreihe, jedoch mit einer höheren Einlauftemperatur des Abwassers vor der Elektroimpulsbehandlung (20 °C).



**Abbildung 37: Keimzahlen [KBE/ml] von VRE 7 nach der Elektroimpulsbehandlung.** Die spezifische Energie [J/ml] und erreichten Temperaturen (Auslauf) der Elektroimpulsbehandlung sind für zwei verschiedene Nährböden (SLB = Slanetz-Bartley; EC = Enterococcosel) angegeben. Die Absterbetemperatur von VRE 7 lag bei 49,1 °C auf beiden Nährböden. Rot-gestrichelte Linie: Werte rechts davon liegen oberhalb der Absterbetemperatur von VRE 7.

Bei höheren Einlauftemperaturen (20 °C statt 13 °C), aber gleicher spezifischer Energie der Elektroimpulsbehandlung, ergaben sich auch höhere Auslauftemperaturen (Abb. 37, siehe auch Kapitel 8.2.3, Tabelle A17). Somit wurden die letzten beiden Werte (136/137 und 150/151 J/ml) in den Temperaturbereich oberhalb der Absterbetemperatur von VRE 7 (> 49,1 °C) verschoben. Im direkten Vergleich mit

Abb. 36 ist zu erkennen, dass der Unterschied des Wachstums auf den beiden Nährböden nun deutlich größer ist. Bei der höheren Einlauftemperatur wurde das Wachstum auf Slanetz-Bartley-Agar um maximal ca. 2 Logstufen reduziert (bei einer spez. Energie von 150/151 J/ml), während die Reduktion auf Enterococcosel-Agar mehr als vier Logstufen maximal betrug. Da die Elektroimpulsbehandlung der beiden Versuchsreihen mit Einlauftemperaturen von 13 °C und 20 °C mit denselben spezifischen Energiewerten durchgeführt wurde, ist der Unterschied in der Reduktion des Wachstums zwischen den beiden Versuchsreihen auf die Temperatur zurückzuführen. VRE 7 zeigte somit als Reaktion auf das gepulste elektrische Feld der Elektroimpulsbehandlung eine Temperaturempfindlichkeit, die bei Abwesenheit des elektrischen Feldes nicht auftrat. Weiteren Aufschluss über den zusätzlichen Einfluss des verwendeten Nährbodens auf das Wachstum von VRE 7 gibt die nachfolgende Tab. 16, die auf die mögliche Ursache des Unterschieds, nämlich subletal beschädigte Bakterienzellen, eingeht. Eine subletale Schädigung ist laut Dutreux [45] definiert als die Differenz der Reduktion (log10) der Keimzahl auf einem Agar mit höherem Salzgehalt (hier dargestellt mit Vancomycin im Enterococcosel-Agar statt Salz) und der Reduktion (log10) auf einem Agar ohne Salzgehalt (hier Slanetz-Bartley-Agar).

<b>Spezifische Energie [J/ml]</b>	<b>60/61</b>	<b>82/83</b>	<b>116/117</b>	<b>136/137</b>	<b>150/151</b>	
<b>Einlauftemperatur</b>	<b>13 °C</b>	0,22	- 0,6	0,52	0,75	1,08
	<b>20 °C</b>	0,18	0,35	0,93	1,54	2,09

**Tabelle 16: Verhältnis der Keimzahlen zwischen zwei Nährböden bei VRE 7 [45].** Verhältnis = log10 der Keimzahlreduktion auf Enterococcosel Agar – log10 der Keimzahlreduktion auf Slanetz-Bartley Agar. Aufgeführt sind fünf spezifische Energiewerte der Bepulsung bei Einlauftemperaturen von 13 °C und 20 °C.

Positive Zahlen in Tab. 16 verdeutlichen, dass das Wachstum auf dem Vancomycin-haltigen Nährboden Enterococcosel stärker gehemmt wurde als das Wachstum auf dem antibiotikafreien Nährboden Slanetz-Bartley. Je höher die positive Zahl, desto stärker waren auch die Unterschiede im Wachstum auf den Nährböden. Bis auf einen Wert (82/83 J/ml und 13 °C) waren keine negativen Zahlen zu verzeichnen. Bei höheren Energiewerten bzw. Temperaturen vergrößerte sich der Unterschied in den Keimzahlen zwischen den beiden Nährböden immer weiter (Maximalverhältnis von 2,09 bei einer Einlauftemperatur von 20 °C und Bepulsung mit einer spezifischen Energie von 150 bzw. 151 Joule/ml). Das Wachstum auf Enterococcosel-Agar wurde stärker gehemmt als auf Slanetz-Bartley-Agar. Somit hatte der verwendete

Nährboden einen Einfluss auf das Wachstum bzw. die Abtötung nach der Elektroimpulsbehandlung von „VRE 7“ und das überwiegend bei höheren spezifischen Energie-Werten bzw. Temperaturen. Um zu testen, ob sich dieser Einfluss des Nährbodens auch bei anderen VRE auswirkt, wurden deren Keimzahlen nach Elektroimpulsbehandlung in gleicher Form miteinander verglichen (Tab. 17). Dafür wurden nur Versuche mit einbezogen, die bei ähnlichen Einlauftemperaturen durchgeführt wurden. In Tab. 17 wurden die Verhältnisse der Keimzahlen zwischen den beiden Nährböden nach der Elektroimpulsbehandlung für die drei getesteten VRE zusammengefasst (siehe auch Kapitel 8.2 Anhang, Tabellen A4, A14 und A16).

Spezifische Energie [J/ml]	60/61	82/83	116/117	136/137	150/151	166/167
Temperaturerhöhung $\Delta T$ [°C]	12	17	23	28	33	37
VRE 7, (13 °C Einlauf)	0,22	- 0,6	0,52	0,75	1,08	1,72
VRE 1, (14 °C Einlauf)	0,26	0,03	0,26	0,21	0,54	0,57
VRE 2, (9 °C Einlauf)	- 0,04	- 0,11	- 0,28	- 0,04	0,14	0,20

**Tabelle 17: Verhältnis der Keimzahlen zwischen zwei Nährböden [45] für drei verschiedene VREf (VRE 1, VRE 2 und VRE 7) bei unterschiedlichen Einlauftemperaturen.** Verhältnis =  $\log_{10}$  der Keimzahlreduktion auf Enterococcosel Agar –  $\log_{10}$  der Keimzahlreduktion auf Slanetz-Bartley Agar. Aufgeführt sind sechs spezifische Energiewerte der Bepulsung und die Temperaturerhöhung des Abwassers durch die Bepulsung ( $\Delta T$ ).

Nach Bepulsung mit unterschiedlichen spezifischen Energiewerten wurden die Keimzahlen auf den beiden Nährböden ermittelt. Da sich durch die Behandlung das Abwasser erwärmte, wurde die Differenz der Temperaturerhöhung ( $\Delta T$ ) ebenfalls angegeben. Dabei handelte es sich um einen berechneten Mittelwert der einzelnen Versuche. Die Temperaturerhöhung der Versuche war konstant, und wich nie mehr als 1,5 °C von dem berechneten Mittelwert  $\Delta T$  ab.

Für VRE 7 wurde das Verhältnis der Keimzahlen bereits in Tab. 16 demonstriert. Tabelle 17 erlaubte nun den direkten Vergleich zwischen den getesteten VREf. Im Vergleich zwischen VRE 7 und VRE 1 war zu erkennen, dass bei VRE 7 das Wachstum auf Enterococcosel-Agar stärker (ab 116 J/ml) gehemmt wurde als auf Slanetz-Bartley-Agar. Dies wurde deutlich an den größeren Zahlenwerten, über die Versuchsdauer gesehen. Während bei VRE 1 Höchstwerte zwischen 0,5 und 0,6 erreicht wurden, stieg das Verhältnis bei VRE 7 auf über 1,7 an. Die Temperaturwerte unterschieden sich nur um 1 °C. Ein deutlicher Unterschied im Wachstum auf den beiden Nährböden war bei VRE 2 (Einlauftemperatur 9 °C) nicht zu erkennen.

Die bei vier spezifischen Energiewerten negativen Werte stiegen insgesamt über die Dauer des Versuchs lediglich auf maximal 0,2 an. Zusammenfassend ist somit anzumerken, dass ein Einfluss des Nährbodens auf die Höhe der Keimzahlen nach der Elektroimpulsbehandlung gemessen werden konnte. Die Höhe der Auswirkung des Nährbodens auf die Keimzahlen war von VRE zu VRE verschieden. Der antibiotikahaltige Enterococcosel-Agar führte entweder zu keiner erhöhten Reduktion der Keimzahlen (wie bei VRE 2), zu einer leicht erhöhten Reduktion der Keimzahlen (wie bei VRE 1), oder aber zu deutlich reduzierten Keimzahlen (wie bei VRE 7).



## 5 Diskussion

### 5.1 Isolierung und Charakterisierung von VRE aus Patienten- und Umweltproben

Unter den Enterokokken ist speziell die Art *Enterococcus faecium* prädestiniert, Resistenzen zu erwerben und diese zu verbreiten. Aufgrund eingeschränkter Therapiemöglichkeiten bei multiresistenten Enterokokken, z. B. Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE), ergeben sich Probleme im klinischen Umfeld [182, 197]. Sensible Enterokokken und VRE sind auch in Abwasserproben vorhanden. Aufgrund der gegebenen regionalen Unterschiede ergeben sich schwankende Ergebnisse in Bezug auf das Vorkommen und die Zahl von VRE [28, 73, 131, 151].

Diese Arbeit beschäftigte sich mit der Untersuchung über das Vorkommen und die Charakterisierung von VRE in Umweltwasserproben wie Abwasser und Oberflächenwasser in Mainz und Umgebung. Dabei sollte die Frage geklärt werden, ob unter den isolierten VRE genetische Verwandtschaften zu klinischen Isolaten von Patienten der Universitätsmedizin Mainz zu finden sind. Bisher existieren zwar viele Studien über das Vorkommen von VRE bei Patienten und auch über das Vorkommen in Abwasser oder Oberflächenwasser, aber nicht in gemeinsamer Betrachtung. Untersuchungen über die Verknüpfung dieser Bereiche sind bis heute sehr rar [97, 131]. Die Wege der Verbreitung resistenter Bakterien sind nur teilweise verstanden und beschränken sich größtenteils auf Untersuchungen in Kliniken. Welche Rolle die aquatische Umwelt spielt, ist nur punktuell untersucht. Die eigenen Untersuchungen dieser Arbeit erlaubten genau diese, bislang kaum untersuchte Verknüpfung zwischen VRE von Patienten und VRE aus der aquatischen Umwelt.

Über einen Versuchszeitraum von fünf Jahren (2004 bis 2008) wurden Proben entlang des Wegs vom Abwasser (des Krankenhauses) über eine Kläranlage bis hin zum Oberflächenwasser genommen und auf das Vorkommen von VRE hin untersucht. Studien anderer Autoren über das Vorkommen von VRE wurden dagegen lediglich stichprobenartig durchgeführt, was nur eine momentane Situationsanalyse erlaubte.

### **5.1.1 Vorkommen von VRE in Umweltwasserproben**

Da sich in Bezug auf das Vorhandensein und die Menge von VRE in Umweltproben sehr große Unterschiede zwischen einzelnen Ländern, aber auch innerhalb eines Landes (regionale Unterschiede) ergeben können [19, 28, 73, 103, 131, 151], wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst das Vorkommen von VRE in Abwasser und in Oberflächenwasser in Mainz untersucht (Kapitel 4.1.1 Vorkommen von VRE in Umweltwasserproben). Es handelte sich dabei um eine qualitative Untersuchung, die aufgrund der verwendeten Anreicherungen keinerlei Rückschlüsse auf die Quantität, also die Keimzahlen, zuließ.

Im Abwasser aus der Universitätsmedizin Mainz und im Abwasser aus dem Einlauf der Kläranlage, in den auch das Klinikabwasser fließt, konnte an allen Versuchstagen VRE nachgewiesen und isoliert werden (Abb. 13). Im Abwasser aus dem Einlauf der Kläranlage, in den das Abwasser von mehreren Mainzer Vororten fließt, wurden VRE an 75 % der Versuchstage nachgewiesen. Ein hohes Vorkommen von VRE in Abwasserproben ist nicht ungewöhnlich. VRE sind vor allem in Europa, auch außerhalb von Krankenhäusern, in ungeklärtem Abwasser zu finden [72]. Dies wurde für Länder wie Spanien, England, Portugal, Griechenland und Schweden bestätigt [19, 97, 131].

Nachdem das Abwasser die Kläranlage durchlaufen hat, wird das geklärte Abwasser über den Auslauf in den Vorfluter des Rheins geleitet. Das Vorkommen von VRE im Kläranlagenauslauf wurde an sieben von acht Versuchstagen (88 %) bestätigt (Abb. 13). VRE konnten somit durch die Kläranlage nicht zurückgehalten werden und gelangten in das Oberflächenwasser. Das Vorkommen von VRE in geklärtem Abwasser bzw. Vorflutern wurde für viele Länder Europas, mit teils schwankenden Ergebnissen, nachgewiesen [19, 28, 72, 97, 131].

Das Vorkommen von VRE in Oberflächenwasser ist dagegen wegen der höheren Reinheitsstufe wesentlich geringer als in Abwasser. Dies bestätigen sowohl die Ergebnisse der Probestellen am Rhein (vor und nach dem Vorfluter der Kläranlage) als auch der weiteren vier Probestellen an Rhein und Main, dargestellt in Abb. 13 und Abb. 14. VRE traten in den Mainproben wesentlich häufiger auf als in den Rheinproben. Dies deutet auf eine höhere fäkale Verunreinigung des Mains hin [19, 151].

Das Vorkommen von VRE in Oberflächengewässern wurde in Ländern wie Spanien, Schweden und England untersucht und bestätigt [19, 72, 103]. Es zeigten sich

schwankende Ergebnisse in Bezug auf die Häufigkeit des Auftretens. Der Grund hierfür ist, neben regionalen Gegebenheiten, wahrscheinlich auch in unterschiedlichen Analysemethoden bzw. verwendeten Vancomycinkonzentrationen zur Isolierung in den einzelnen Studien zu suchen. Somit ist ein direkter Vergleich der prozentualen Werte nicht möglich, sondern lediglich eine positiv/negativ Aussage vertretbar.

Im Gegensatz zu den meisten Studien wurde in den eigenen Untersuchungen das Vorkommen von VRE mit Hilfe von Anreicherungen untersucht. Diese Anreicherungen ermöglichten auch bei geringen Keimzahlen einen Nachweis der VRE. Dies führte zu einer höheren Ausbeute an VRE, als es mit den in der Literatur häufig erwähnten Methoden (z. B. Ausplattieren auf Nährböden) der Fall gewesen wäre [56, 151].

Aufgrund der eigenen Ergebnisse wird deutlich, dass VRE im Abwasser von Krankenhäusern, genauso wie im kommunalen und geklärten Abwasser bis hin zum Oberflächenwasser (der beiden Flüsse Rhein und Main) in unterschiedlicher Häufigkeit vorhanden waren und auch isoliert werden konnten. Der Grund des weit verbreiteten Auftretens von VRE in Deutschland und weiteren Ländern Europas auch bei gesunden Menschen und Nutztieren außerhalb des klinischen Umfeldes wird u. a. auf die Resistenzentwicklung gegen Vancomycin durch den Einsatz des Wachstumsbeschleunigers Avoparcin in der kommerziellen Nutztierhaltung ab Beginn der 70er Jahre zurückgeführt [22, 91, 198].

Neben den Untersuchungen zur zeitlichen Häufigkeit des Vorkommens von VRE in Wasserproben wurden auch die Keimzahlen von Enterokokken und VRE bestimmt (Kapitel 4.1.2 Keimzahlen von Enterokokken und VRE im Umfeld der Kläranlage). Dies erlaubte auch eine mengenmäßige Aussage über das Vorkommen in Abwasser und Oberflächenwasser. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die Anzahl der VRE durch die Kläranlage stärker dezimiert wird als die Anzahl der Enterokokken bzw. ob der Reinigungsprozess der Kläranlage VRE selektiv fördert.

Das untersuchte, ungeklärte Abwasser lag bezüglich der Keimzahl der Enterokokken an allen vier Probetagen stabil in der gleichen Größenordnung zwischen  $10^4$  und  $10^5$  KBE/ml (Tab. 18). Mit dem Durchlaufen der Kläranlage wurde die Keimzahl um ca. 2 Logstufen auf ca.  $10^2$  KBE/ml reduziert.

Für ungeklärtes Abwasser wurden in wissenschaftlichen Studien (Tab. 18) aus Europa Enterokokken-Keimzahlen in einer ähnlichen Größenordnung ermittelt ( $10^3$  bis  $10^4$  KBE/ml). Auch für geklärtes Abwasser bzw. Oberflächenwasser wurden ähnliche Werte (ca.  $10^2$  in geklärtem Abwasser und ca.  $10^1$  in Oberflächenwasser) ermittelt.

	Keimzahlen [KBE/ml]					
	Eigene Ergebnisse	Iversen 2002 [72]	Kühn 2003 [101]	Blanch 2003 [19]	Martins Da Costa 2006 [118]	Caplin 2008 [28]
Land	D	S	S/Sp/E	S/Sp/E	P	E
<b>Klinikabwasser:</b>	$10^4 - 10^5$	$10^3-10^4$	$10^3-10^4$	$10^3$	n. u.	$10^4$
<b>Ungeklärtes Abwasser</b>	$10^4 - 10^5$	$10^3-10^4$	$10^3-10^4$	$10^4$	$10^3-10^5$	$10^4$
<b>Geklärtes Abwasser/Vorfluter</b>	$10^1 - 10^2$	$10^1-10^2$	$10^1-10^2$	$10^1-10^3$	$10^0-10^4$	$10^3$
<b>Oberflächenwasser</b>	$10^1 - 10^2$	$10^1-10^2$	$10^0-10^1$	$\leq 10^0-10^1$	n. u.	n. n.

**Tabelle 18: Keimzahlen von Enterokokken [KBE/ml] in Wasserproben aus verschiedenen Ländern Europas im Vergleich zu den eigenen Ergebnissen.** D = Deutschland, S = Schweden, Sp = Spanien, E = England, P = Portugal; n. u. = nicht untersucht; n. n. = nicht nachgewiesen.

Die Zahl der Enterokokken in den Wasserproben der eigenen Untersuchungen lag um ca. 1,5 bis 2 Zehnerpotenzen über der Zahl der VRE (Abb. 16). Die VRE erreichten maximale Keimzahlen von ca.  $10^3$  KBE/ml in ungeklärtem Abwasser. Bei Durchlaufen der Kläranlage wurde die Zahl der VRE, wie die aller Enterokokken, ebenfalls reduziert (auf ca.  $10^0$  bis  $10^1$  KBE/ml). Ein identisches Ergebnis in Bezug auf die Reduktion der Keimzahlen der VRE geht aus einer Studie [19] hervor. Dort wurde durch den Reinigungsprozess der Kläranlage ebenfalls eine Reduktion der VRE um 2 Logstufen (von  $10^3$  auf  $10^1$  KBE/ml) erreicht.

Ob und wie viele VRE in Oberflächenwasser zu finden sind, hängt auch stark von dem jeweiligen Untersuchungsort (regionale Unterschiede) bzw. vom Land ab. Je nach Studie, Land oder Region gibt es beträchtliche Unterschiede im Nachweis von VRE in Oberflächenwasserproben. Während es viele Berichte gibt, in denen bereits VRE aus Oberflächenwasser isoliert werden konnten [28, 81, 159, 176], gibt es auch viele Länder bzw. Studien bei denen keine VRE in wissenschaftlichen Untersuchungen nachgewiesen werden konnten [4, 131].

Die Menge der (sensiblen) Enterokokken als auch die der VRE konnte durch den Reinigungsprozess der Kläranlage zwar reduziert, aber nicht vollständig eliminiert

werden. Ein gewisser Anteil der Enterokokken und VRE wurde somit nach Durchlaufen der Kläranlage in das Oberflächenwasser des Rheins abgegeben, woraus ein gewisses Gefährdungspotential für den Menschen, durch Wiederaufnahme über die Nahrungskette, nicht auszuschließen ist [19, 50, 103, 131, 174]. Die Kläranlage fungiert somit als Reservoir von potentiell gefährlichen Bakterien [50], die in die aquatische Umwelt abgegeben werden. Eine Selektion bezüglich von (sensiblen) Enterokokken oder VRE konnte dabei nicht festgestellt werden.

### **5.1.2 Genotypisierung durch Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)**

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Isolierung und Charakterisierung von Vancomycin-resistenten *Enterococcus faecium* (VREf) sowohl aus Patientenproben der Universitätsmedizin Mainz als auch aus Abwasser und Oberflächenwasser. Um genetische Verwandtschaften der Isolate untereinander ermitteln zu können, wurde das Verfahren der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) angewendet. Die Typisierung mittels PFGE muss verschiedenen Anforderungen genügen [206], um ein entsprechend aussagekräftiges und reproduzierbares Ergebnis zu erhalten. Deshalb wurde in den eigenen Untersuchungen zunächst getestet, ob es sich bei der angewandten PFGE um ein geeignetes Verfahren zur Genotypisierung von VREf handelt. Aus insgesamt 1500 getesteten VREf konnten spezifische Bandenmuster erstellt werden, welche in wiederholten, unabhängigen Versuchsansätzen (auch nach mehreren Jahren noch) reproduzierbar waren. Anschließend wurden insgesamt 294 VREf, 106 von Patienten, 85 aus Abwasser und 103 aus Oberflächenwasser weiterführend charakterisiert (Tab. 7).

Bei der PFGE war eine ausreichende Typenanzahl zur aussagekräftigen Analyse ebenfalls gegeben, weshalb die in dieser Arbeit durchgeführte PFGE den Anforderungen an ein Typisierungsverfahren standgehalten hat (Kapitel 4.1.3 Genotypisierung durch Pulsfeld-Gelelektrophorese).

In vielen Studien wurde bereits über die PFGE als ein geeignetes molekularbiologisches Typisierungsverfahren für Enterokokken berichtet. Nach wie vor ist die PFGE der „Goldstandard“ unter den Typisierungsverfahren, weil sie im Vergleich mit anderen Typisierungsverfahren sehr diskriminatorisch ist [11, 16, 195, 198, 204].

### 5.1.2.1 Antibiotikaresistenz

Zur Charakterisierung der 294 VREf gehörte auch die Untersuchung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) von Vancomycin (Abb. 19). Je nach genetischer Voraussetzung kann die Höhe der Vancomycin-Resistenz von Isolat zu Isolat variieren und eine Kreuzresistenz gegen Teicoplanin vorliegen. Bei einer MHK von 32 mg/l oder mehr werden Enterokokken als „resistent“ gegen Vancomycin bezeichnet, weshalb in den Ergebnissen nur MHK-Werte ab 32 mg/l dargestellt wurden (CLSI-Richtlinien). Der größte Teil aller getesteten VREf, unabhängig davon, ob sie von Patienten, aus Abwasser oder aus Oberflächenwasser stammten, waren hoch resistent gegen Vancomycin. Jeweils mehr als 70 % der VREf besaß eine Resistenz gegen Vancomycin von 256 mg/l oder mehr. Die Resistenzhöhen der weiteren Isolate waren nahezu gleichmäßig verteilt. VREf von Patienten unterschieden sich bezüglich ihrer Resistenz nicht von VREf aus Abwasser und Oberflächenwasser. Die wenigen VREf mit einer niedrigen Resistenz (z. B. 32 mg/l) könnten zwar das *VanB*-Gen besitzen [38, 198], allerdings ist die Klassifikation der Antibiotikaresistenz eher durch die Sequenz der jeweiligen Gene, als durch die Höhe der MHK sicher zu ermitteln, da sich die MHK-Werte teilweise überlappen (Tab. 2).

Das Auftreten von hoch resistenten VRE wurde bereits in Untersuchungen bestätigt. Laut einer Studie zeigten lediglich 2,8 % der VRE eine niedrige Resistenz von 32-64 mg/l [103]. Der größte Teil aller Isolate dieser Studie (78,7 %) war ebenfalls hoch resistent gegen Vancomycin (über 128 mg/l). In einer weiteren Studie zeigten alle Klinik- und Abwasserisolate eine Resistenz von über 128 mg/l gegen Vancomycin [174]. Eine solch hohe Resistenz lässt auf das (wahrscheinliche) Vorhandensein des Resistenzgens *VanA* schließen, was, gerade unter klinischen VRE, weit verbreitet ist [38, 97, 103, 130, 198]. Da bei Vorhandensein des *VanA*-Gens auch gleichzeitig eine Kreuzresistenz gegen Teicoplanin ausgebildet ist, wurde in den eigenen Untersuchungen von allen VREf mit einer Resistenz gegen Vancomycin von  $\geq 256$  mg/l untersucht, ob sie ebenfalls eine Resistenz gegen Teicoplanin besitzen. Die Mehrheit (zwischen 69 % und 95 %) aller VREf von Patienten, aus Abwasser und aus Oberflächenwasser zeigte neben der hohen Vancomycin-Resistenz auch eine Resistenz gegen Teicoplanin (Abb. 20). Dies deutet auf eine Resistenz hin, die bei der Mehrzahl aller hochresistenten VREf auf dem *VanA*-Gen basiert. Dieses Gen ist unter den Enterokokken in Europa bereits sehr weit verbreitet [18, 21, 60, 103, 198, 208]. Für Umweltisolate (Isolate aus Klinikabwasser und kommunalem

Abwasser verschiedener Länder) wurde das Vorhandensein des *VanA*-Gens in ähnlich hoher Prozentzahl (bei 79 % der VRE) bestätigt, während bei 21 % das *VanB*-Gen nachgewiesen wurde [103]. Untersuchungen mit einem Ergebnis in gleicher Höhe (68 % der VRE von Abwasser und Patienten mit *VanA*-Gen) wurden für Isolate aus Griechenland bestätigt [97].

Die restlichen Teicoplanin-sensiblen Isolate müssen nicht zwangsläufig das *VanB*-Gen besitzen, welches zwar eine Vancomycin-, aber keine Teicoplanin-Resistenz zur Folge hätte. Bei Vorhandensein des *VanA*-Gens kann, unter bestimmten Umständen, auch eine Heteroresistenz gegenüber Teicoplanin vorliegen, wie Studien aus Asien beweisen [141]. Dabei kann die Teicoplanin-Resistenz z. B. durch einen Defekt (Punktmutation) im *VanA*-Operon oder der Schädigung der Schlüsselproteine nicht auftreten. Dies hätte zur Folge, dass die Isolate bei gleichzeitiger Verbindung mit einer Vancomycin-High-level-Resistenz gegen Teicoplanin sensibel sind [48, 65, 95, 126, 133].

### 5.1.2.2 Genotypisierung

Nach durchgeführter PFGE und anschließender Resistenztestung wurden die 294 VREf von Patienten (106), aus Abwasser (85) und aus Oberflächenwasser (103) einer Verwandtschaftsanalyse unterzogen, um mehr über genetische Verwandtschaften von Isolaten aus unterschiedlichen Herkunftsbereichen zu erfahren (Abb. 21).

Obwohl die PFGE ein diskriminatorisches Mittel zur Genotypisierung von Enterokokken darstellt, existiert für die Auswertung von Verwandtschaftsanalysen bislang kein nationaler oder internationaler Standard der festlegt, ab welchem Verwandtschaftsgrad Isolate (eng) verwandt oder nicht verwandt sind. Die gewählten Methoden zur Genotypisierung (z. B. die Arbeitsschritte der PFGE) basieren ebenfalls auf keinem einheitlich festgelegten Standard, was Vergleiche zwischen wissenschaftlichen Studien erschwert oder sogar unmöglich macht. Bei den eigenen Untersuchungen wurde festgelegt, dass Isolate mit einem Verwandtschaftsgrad von 80 % oder mehr als eng verwandt anzusehen sind. Die 80 %-Grenze korrelierte mit der optischen Einteilung der Isolate nach den festgelegten Kriterien der Anzahl der Bandenunterschiede gemäß Tenover *et. al.* [180]. Laut dieser Studie sind Isolate mit einem Bandenunterschied von sieben oder mehr Banden als nicht mehr verwandt anzusehen. Bis zu einem Bandenunterschied von sechs Banden sind Isolate

entweder als eng verwandt (bis drei Bandenunterschiede) oder als entfernt verwandt (vier bis sechs Bandenunterschiede) anzusehen.

Es existieren zwei Studien [123, 183], die dieses Problem der fehlenden Standards auch erkannten und ebenfalls die prozentuale Grenze mit gleicher Argumentation gezogen haben (bei 80 % bzw. 82 %).

Das nach diesen Kriterien ausgewertete Dendrogramm (Kapitel 4.1.4.2 Verwandtschaftsanalyse der Vancomycin-resistenten *Enterococcus faecium*, Abb. 21 und Kapitel 8.1 Anhang, Tab. A1) aus 294 VREf beinhaltete 50 Gruppen. Weiteren 32 einzelnen Isolaten konnte kein weiteres Isolat mit einer Ähnlichkeit von 80 % oder mehr zugeordnet werden, weshalb diese Isolate somit auch keiner Gruppe zugeordnet wurden. Diese große Zahl an verschiedenen Dendrogrammgruppen und die Vielschichtigkeit der VREf brachte die sehr hohe Diversität (Vielfältigkeit) der Population zum Ausdruck.

Eine hohe Diversität wurde auch in anderen Studien bestätigt. Demnach ist die Diversität nicht nur unter sensiblen Enterokokken [19], sondern auch unter Gentamycin-resistenten Enterokokken [152] aus verschiedensten Abwasserproben sehr hoch. Aber auch VRE aus verschiedenen Umwelthabitaten zeigen eine hohe Variabilität in Bezug auf ihre genetischen Gegebenheiten. Dies beweist eine Studie aus Schweden, in der das Vorkommen und die Diversität von VRE in klinischen Proben (Patienten), in Abwasser und in Oberflächenwasser untersucht wurden [72]. Dabei wurde sowohl ein hohes Vorkommen von VRE in den untersuchten Proben als auch eine hohe Diversität unter den Isolaten festgestellt. Daraufhin folgten zahlreiche Studien, die dieses Ergebnis ebenfalls bestätigten. Eine hohe Diversität zwischen VRE-Isolaten zeigte sich dabei nicht nur bei Isolaten von Patienten [92, 130, 133, 197], sondern auch bei Isolaten aus verschiedensten Abwasserproben (Krankenhausabwasser und kommunales Abwasser) und Oberflächenwasserproben in verschiedenen Ländern Europas [28, 97, 103, 131, 174]. Eine hohe Diversität unter den VRE deutet darauf hin, dass diese Vielfalt eher durch horizontalen Gentransfer zwischen sensiblen, genetisch verschiedenen Enterokokken als durch Austausch von bereits resistenten Isolaten zwischen den unterschiedlichen Habitaten herrührt [97].

Nachdem verschiedene Dendrogrammgruppen mit eng verwandten VREf gebildet waren, konnte weiterführend die zeitliche Persistenz untersucht werden (Tab. 8). Da die Isolierung der VREf über mehrere Jahre durchgeführt wurde, sollte dabei nun die



Frage geklärt werden, ob Isolate dieser Dendrogrammgruppen über einen längeren Zeitraum auftraten, oder ob z. B. alle Isolate einer Dendrogrammgruppe nur in einem bestimmten Jahr isoliert wurden. Dies wurde anhand der sieben größten Gruppen untersucht.

Bezüglich der zeitlichen Persistenz konnte kein Zusammenhang mit der Gruppengröße nachgewiesen werden. Einzig VREf der größten Gruppe wurden über den gesamten Zeitraum der fünf Jahre isoliert, während dagegen VREf der zweitgrößten Gruppe nur über einen Zeitraum von drei Jahren nachgewiesen werden konnten. Das zeitliche Auftreten dieser VREf und somit auch das zeitliche Auftreten der Dendrogrammgruppe, in die sie eingeordnet wurden, war von einer Dynamik geprägt, da VREf nur für einen begrenzten Zeitraum auftraten. Diese Dynamik setzte sich auch bei Betrachten von einzelnen Isolaten innerhalb der Dendrogrammgruppen weiter fort (Tab. 9). Diesbezüglich zeigte sich bei allen Dendrogrammgruppen ein ähnliches Ergebnis. Kein VREf konnte länger als drei aufeinander folgende Jahre in den Proben nachgewiesen werden. Die meisten VREf traten nur innerhalb eines einzigen Jahres auf. Somit setzten sich die Gruppen nicht aus VREf zusammen, die jedes Jahr auftraten und über einen langen Zeitraum verbreitet waren, sondern aus einer Vielzahl von unterschiedlichen VREf, die nur über einen kurzfristigeren Zeitraum auftraten, aber untereinander eng verwandt waren. Ein ähnliches Ergebnis bestätigte auch eine Studie [131], in der ebenfalls von der einjährigen Persistenz von spezifischen PFGE-Typen berichtet wurde.

Mit zunehmender Anzahl der unterschiedlichen VREf in den Dendrogrammgruppen stieg die totale Variabilität und somit die Diversität weiter an, und eine Dynamik bzw. Tendenz zur Weiterentwicklung war erkennbar. Somit zeigte sich bezüglich der Population der VREf keine Zusammensetzung aus vorherrschenden Isolaten, sondern eine ständig variierende Population.

Eine solche Dynamik in Bezug auf das zeitliche Auftreten von VREf wurde bislang noch nicht näher untersucht. Somit ist auch nicht bekannt, wie ein solcher Shift, also eine genetische Veränderung der VREf in ihren Habitaten, zustande kommt. Lediglich in einer Studie wurde beobachtet, dass ein bestimmter VRE-Typ Ende 1990 in Krankenhäusern weit verbreitet war, aber später nicht mehr auftrat [197]. Dies könnte ein Hinweis auf diesen Shift unter den VREf sein.

Während diese Dynamik bei VRE bislang nur in dieser Arbeit nachgewiesen wurde, ist sie bei epidemischen Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA)

bereits gut untersucht und nachgewiesen. Stämme, die vorher in Deutschland weit verbreitet waren, wurden nach einigen Jahren nur noch sporadisch oder gar nicht mehr nachgewiesen, was eine wechselnde Zusammensetzung der Population zur Folge hatte [6, 166, 205]. Die Gründe für diese Veränderungen in der Population sind bislang nicht aufgedeckt, werden aber nicht nur in einem sich ändernden Selektionsdruck durch Antibiotika gesehen [205]. Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen zeigen jedoch, dass es eine solche Dynamik in Bezug auf die genetische Veränderung auch in der Population der VRE gibt.

Neben dem zeitlichen Auftreten von VREf wurde auch die Zusammensetzung der Dendrogrammgruppen aus Isolaten verschiedener Habitate (Patienten, Abwasser und Oberflächenwasser) untersucht (Abb. 22). Es sollte die Frage geklärt werden, ob VREf der drei Herkunftsbereiche miteinander eng verwandt sind, oder ob sie untereinander nur wenig Ähnlichkeit besitzen.

VREf aus verschiedenen Herkunftsbereichen unterschieden sich nicht grundlegend voneinander, sondern viele der Dendrogrammgruppen setzten sich aus VREf aus zwei oder drei Herkunftsbereichen zusammen (Abb. 22). 60 % der Gruppen bestand neben VREf von Patienten noch aus VREf aus Abwasser bzw. Oberflächenwasser (Abb. 23). Ab einer Größe der Gruppen von mehr als vier verschiedenen VREf, also bei Gruppen mit hoher Diversität, war die Zusammensetzung aus mindestens zwei Herkunftsbereichen gegeben (Tab. 10). Enge Verwandtschaften zwischen VREf von Patienten und VREf aus der aquatischen Umwelt konnten somit nachgewiesen werden.

Bei weiterführender Analyse wurde ersichtlich, dass nicht nur enge Verwandtschaften zwischen VREf aus den unterschiedlichen Habitaten bestehen, sondern dass auch genetisch identische Isolate in verschiedenen Bereichen vorkamen (Tab. 11). So konnten VREf mit identischem PFGE-Muster sowohl bei Patienten als auch in der aquatischen Umwelt nachgewiesen werden.

Verwandtschaften zwischen VREf aus unterschiedlichen Isolationsquellen wurden in der Literatur erwähnt, allerdings mit sehr schwankenden Ergebnissen. Einige Studien konnten keine Zusammenhänge zwischen Isolaten von Patienten und der aquatischen Umwelt nachweisen. Sogar ein wirtsspezifisches Vorkommen von VRE wurde diskutiert. Laut diesen Studien sind VRE von Patienten, aus Abwasser und von Tieren genetisch verschieden und besitzen nur ein begrenztes Auftreten,

welches sich auf den jeweiligen Isolationsbereich des Wirts („host-specificity“) beschränkt [103, 142, 199]. Andere Autoren konnten keine genetischen Gemeinsamkeiten zwischen VRE von Patienten bzw. Klärschlamm mit VRE aus Nahrungsmittel wie Geflügel feststellen [133, 151], während dagegen in einer anderen Studie bestätigt wurde, dass Isolate aus verschiedenen Isolationsbereichen (z. B. Patienten und Nahrungsmittel) nicht zwangsläufig genetisch verschieden sein müssen [189].

Eine kürzlich veröffentlichte Studie aus Griechenland hielt die Ausbreitung von VRE über den Abwasserweg prinzipiell für möglich, jedoch wurden in dieser Studie keine Patientenisolate untersucht [97]. Eine Studie aus dem Iran die, ähnlich der eigenen Untersuchungen, die Verwandtschaften zwischen VRE von Patienten und VRE aus Abwasser von Kläranlagen untersuchte, konnte keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen den VRE beweisen, obwohl in einem Fall ein VRE-Isolat eines Patienten aus zwei Abwasserproben isoliert werden konnte [174]. Diese beiden Abwasserproben stammten jedoch aus verschiedenen Kläranlagen in Teheran, wodurch kein örtlicher Zusammenhang zu den VRE aus Patientenproben gegeben war. Das Auftreten an verschiedenen Orten zur selben Zeit wurde mit einem ubiquitär verbreiteten VRE-Typ erklärt. Der Vorteil der eigenen Untersuchungen ist dagegen, dass die Probestellen der untersuchten Kläranlage auch das Abwasser der Universitätsmedizin Mainz aufnahmen.

Ein Verbreitungsweg von VRE über den Abwasserweg, durch die Kläranlage bis hin in den Vorfluter bzw. das Oberflächenwasser (mit Patienten aus dem Krankenhaus als Eintragsquelle) wurde in der Literatur lediglich vermutet, konnte allerdings nicht bewiesen werden [19, 28, 72, 103, 131, 174]. Die Autoren sehen die Gefahr bei dieser Art von Ausbreitung in der potentiellen Übertragung der resistenten Enterokokken via Oberflächenwasser bzw. durch den Einsatz von Klärschlamm als Dünger über die Nahrungskette zurück auf den Menschen. Denn nicht nur aus Oberflächenwasser von Flüssen (Süßwasser) konnten bislang VRE isoliert werden, sondern auch in Meerwasser und in Sandproben von Stränden wurden bereits VRE nachgewiesen [81, 146].

Mit den eigenen Ergebnissen gelang genau dieser Nachweis eines Verbreitungswegs von VRE<sub>f</sub> in die aquatische Umwelt, von Patienten der Universitätsmedizin

ausgehend, für zwei verschiedene VREf (VRE 1 und VRE 2). Während des Zeitraums zweier Ausbrüche, in denen viele Patienten von diesen VREf betroffen waren, konnten klonale Isolate dieser VREf auch im Abwasser des Krankenhauses, in der Kläranlage bis hin in das Oberflächenwasser nachgewiesen werden (Tab. 12 und Abb. 24). Diese VREf konnten in der aquatischen Umwelt nicht mehr nachgewiesen werden, nachdem sie auch nicht mehr bei Patienten auftraten. Diese Tatsache spricht ebenso für die Eintragsquelle Patient wie die Tatsache, dass an der Probestelle des Rheins oberhalb des Auslaufs der Kläranlage keiner dieser beiden VREf nachgewiesen wurde, wogegen an den Stellen direkt am Auslauf der Kläranlage in den Rhein und weiter flussabwärts der Nachweis gelang. Der Nachweis von VRE 1 im Einlauf der Kläranlage, an den ein reines Mainzer Wohngebiet angeschlossen ist, ist erklärbar, wenn man bedenkt, dass VRE-besiedelte Patienten keiner Therapie unterzogen werden und trotz Besiedelung aus dem klinischen Umfeld entlassen werden.

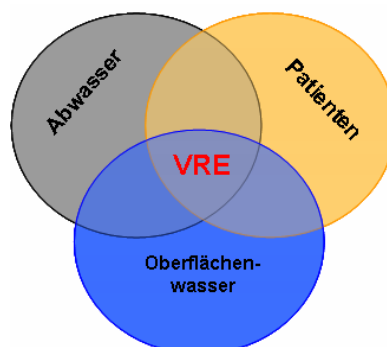
Neben den eigenen Untersuchungen existieren auch Studien, die die Verwandtschaft von VRE-Isolaten zwischen Patienten und der aquatischen Umwelt ebenfalls untersuchten, aber nur vermuten konnten [28, 42, 104, 131]. Die Studie von Caplin *et. al.* fand in Abwasser VRE, die dem klonalen Komplex CC17 zugeordnet werden konnten. Dieser Komplex wird häufig bei VRE von Patienten oder im Krankenhausumfeld gefunden. Dicuonzo *et. al.* konnte ein klonales VRE-Isolat von Patienten auch in einer Abwasserprobe nachweisen. Dieser Nachweis gelang allerdings nur für eine einzige Abwasserprobe und nicht in dem Umfang und der Nachhaltigkeit wie in eigenen Untersuchungen, wo ein örtlicher und zeitlicher Zusammenhang aufgezeigt werden konnte.

Einige Studien sehen in der Eintragsquelle Patient/Krankenhaus eine permanente Gefahr des Eintrags von VRE bzw. genetischen Elementen in die aquatische Umwelt [28, 131]. Dies konnte in den eigenen Untersuchungen allerdings nicht bestätigt werden. Vielmehr scheint der Eintrag von Patienten-VRE in nachweisbaren Mengen auf Zeiten begrenzt zu sein, in denen eine große Anzahl an Patienten von diesen VRE infiziert oder besiedelt ist (z. B. während eines Ausbruchs). Zu diesen Zeiten, wenn auch im Abwasser diese VRE nachweisbar sind, können diese nicht vollständig durch die Kläranlage zurückgehalten werden und gelangen auch in das Oberflächenwasser. In ausbruchsfreien Zeiten ist der Eintrag von VRE durch Patienten über das

Krankenhausabwasser in die aquatische Umwelt deshalb nicht von besonderer Tragweite, da die Multiresistenz der Enterokokken sich nicht nur auf das Krankenhausumfeld alleine beschränkt. Wie die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen zeigen, sind VRE in der aquatischen Umwelt längst weit verbreitet. Sowohl in ungeklärtem Abwasser als auch in geklärtem Abwasser und Oberflächenwasser wurde eine Vielzahl von VREf nachgewiesen. Das Vorkommen von VRE unter der gesunden Bevölkerung in Europa, gerade in Ländern, in denen der Wachstumsbeschleuniger Avoparcin verwendet wurde, ist durchaus üblich [22, 72, 103, 189, 198, 199, 200].

### 5.1.3 Fazit

- Die Kläranlage reduzierte die Anzahl der VRE im Abwasser, jedoch gelangten auch VRE ins Oberflächenwasser.
- Eine hohe Diversität unter den insgesamt 294 Isolaten aus allen drei Bereichen (Patienten, Abwasser und Oberflächenwasser) konnte gezeigt werden.
- Eine Dynamik in Bezug auf das zeitliche Auftreten von VRE war vorhanden.
- Verwandtschaften zwischen Isolaten von Patienten / der aquatischen Umwelt konnten bestätigt werden.
- Der Eintrag von VRE in die aquatische Umwelt (ausgehend von Patienten) war während zwei Ausbruchssituationen nachweisbar.
- Hochresistente VRE waren bei Patienten und in der aquatischen Umwelt nachweisbar. Multiresistenz ist kein Problem des Krankenhauses allein. Hochresistente Bakterien sind auch in der (aquatischen) Umwelt zu finden.



Die Vorgänge der Verbreitung von VRE in der Umwelt bzw. die Gründe für diese in der aquatischen Umwelt weit verbreiteten VRE sind bis heute nicht vollständig aufgedeckt. Wahrscheinlich ist, dass die Verbreitung und die Persistenz der VRE in der aquatischen Umwelt ein komplexes Zusammenspiel einer Vielzahl von Faktoren ist, die wahrscheinlich auch in ihrem gesamten Umfang nie völlig aufgeklärt werden können. Laut Literatur ist die in den eigenen Untersuchungen bewiesene hohe Diversität der VRE ein Hinweis darauf, dass bereits weit verbreitete, sensible Enterokokken die Antibiotikaresistenz durch horizontalen Gentransfer erworben haben [97, 197, 198]. Das Vorhandensein eines Genpools (z. B. für das Resistenzgen *VanA*) in der aquatischen Umwelt wurde bereits bestätigt [61, 62, 197]. Doch parallel zu dieser Theorie konnte in den eigenen Untersuchungen auch die klonale Verbreitung von VRE, also eine Zirkulation von bereits resistenten Enterokokken zwischen verschiedenen Habitaten nachgewiesen werden, was die Komplexität der Verbreitungsmechanismen zusätzlich erhöht. Unabhängig von den Entstehungsmechanismen eines solch verbreiteten Vorkommens von diversen VREf in der Umwelt ist eine (Rück-) Übertragung auf den Menschen, z. B. über die Nahrungskette, nicht auszuschließen.

### **5.2 Untersuchungen zur Keimzahlreduktion von VRE durch Elektroimpulsbehandlung in Verbindung mit Temperatur**

Die generelle Desinfektion von Abwässern in Deutschland ist nicht vorgeschrieben. Besteht jedoch, speziell in Krankenhäusern, die Gefahr durch sehr gefährliche Krankheitserreger (z. B. das Lassa-Virus), muss das Abwasser behandelt werden, um eine Ausbreitung über den Abwasserweg zu verhindern. Dies hat, gerade im Hinblick auf die Trinkwasserversorgung, eine große Bedeutung. Oft wird auf chemische oder physikalische Mittel zurückgegriffen. Ein Nachteil der Desinfektion mit chemischen Verfahren ist allerdings, dass schädliche Nebenprodukte entstehen können, die zu einer zusätzlichen Belastung des Abwassers führen [55, 162]. Eine effektive und nebenproduktfreie Alternative zu solchen Verfahren wird dabei in der Elektroimpulsbehandlung von solch bakteriell belasteten Abwässern gesehen. Auch konnten bislang keine gentoxische Wirkung oder das Auftreten von Resistenzen bei Bakterien durch Behandlung mit gepulsten elektrischen Feldern nachgewiesen werden [5, 63, 145].

### 5.2.1 Beeinflussende Größen des Elektroimpulsverfahrens

Dass sich Bakterien durch gepulste elektrische Felder abtöten lassen, ist seit Jahrzehnten bekannt [68, 153, 191]. Da die Höhe der Abtötung von einer Vielzahl von Faktoren abhängt, ist ein Vergleich der Studien untereinander schwierig. Unterschiede in der Höhe der Abtötung entstehen z. B. je nach Organismus, Zellgröße oder anderen strukturellen Eigenschaften des Bakteriums. Da Bakterienzellen auch in ihren verschiedenen Wachstumsphasen unterschiedlich resistent gegen äußere Einflüsse wie Temperatur oder gepulste elektrische Felder sind, wurden für alle Versuche stets 48 h alte Kolonien verwendet. Diese befinden sich nach dieser Wachstumszeit in der stationären Wachstumsphase und zeigen somit die höchste Resistenz gegen Hitze [31, 44, 68, 84, 117, 138, 204, 209]. Nicht nur die Wachstumsphase, sondern z. B. auch die Temperatur, bei der die Bakterienzellen angezüchtet werden, kann einen entscheidenden Einfluss auf die Abtötung durch Hitze haben [71]. In dieser Studie wurde gezeigt, dass Enterokokken (*Enterococcus faecalis*) wesentlich resistenter gegen Hitze sind, wenn sie in streßauslösenden Temperaturbereichen angezüchtet wurden (unter 15 °C und über 40 °C). In den eigenen Versuchen wurde deshalb eine über alle Versuche konstante Anzuchttemperatur von 37 °C gewählt.

Zu den variablen Faktoren der Elektroimpulsbehandlung zählen auch die Feldstärke, die Pulslänge, die Pulsfrequenz, der pH-Wert, die Leitfähigkeit und die Temperatur des bepulsten Mediums [8, 9, 68, 75, 153, 191, 209, 210]. Während der eigenen Untersuchungen an der Elektroimpulsanlage wurde möglichst unter gleichen Bedingungen gearbeitet, um reproduzierbare und vergleichbare Ergebnisse zu erhalten. Da die Untersuchungen allerdings eine praxisbezogene Orientierung in Bezug auf die Beurteilung der Abtötungsleistung einer Elektroimpulsanlage von bakteriell belastetem Abwasser besaßen, wurde auf eine standardisierte Abwassermatrix verzichtet. Stattdessen wurde auf dem Gelände der Universitätsmedizin Mainz das Abwasser direkt aus dem Kanal entnommen und für die Untersuchungen verwendet. Da sich aus vergleichbaren Versuchen mit unterschiedlichen Abwasserproben jeweils identische Ergebnisse ergaben, wurde davon ausgegangen, dass die (potenzielle) Variabilität in der Zusammensetzung des Abwassers zu vernachlässigen war.

Messbare Größen wie die Leitfähigkeit des Abwassers wurden regelmäßig ermittelt, und Abwasser mit zu hohen Leitfähigkeiten wurde verworfen. Da die Leitfähigkeit von

Flüssigkeiten von der Temperatur abhängt, traten bei dem verwendeten Abwasser zwangsläufig Schwankungen in den Leitfähigkeitswerten auf, da die Elektroimpulsbehandlung gewollt mit unterschiedlichen Temperaturen des Abwassers durchgeführt werden sollte. Bei den Untersuchungen wurde Abwasser mit Leitfähigkeiten zwischen 956 und 2400  $\mu\text{S}/\text{cm}$  verwendet. Aus der wechselnden Leitfähigkeit des Mediums resultierten Änderungen der angelegten Feldstärke bei der Bepulsung. Da die Feldstärke trotz unterschiedlicher Temperaturen und Leitfähigkeiten des Abwassers immer konstant auf 80 kV/cm gehalten wurde, konnten die unterschiedlichen Leitfähigkeiten des Abwassers somit vernachlässigt werden.

Die Höhe der Feldstärke ist einer der wichtigsten Faktoren, die zur Abtötung von Bakterien beitragen. Ausgelöst durch die angelegte Feldstärke lagern sich die Phospholipide in der Doppelschicht der Bakterienmembran um, wodurch sich Poren in der Membran bilden (dielectric breakdown), deren Durchmesser mit steigender Feldstärke wächst [45, 85, 178]. Somit trägt eine Erhöhung der Feldstärke zur gesteigerten Abtötung von Bakterienzellen bei. Dies wurde in vielen Studien bewiesen [8, 9, 68, 75, 153, 191, 209]. Während der Untersuchungen wurde die Feldstärke stets konstant auf hohem Niveau gehalten (80 kV/cm), um eine hohe Schädigung der Enterokokken (Zelldurchmesser  $< 2 \mu\text{m}$ ) zu erzielen.

Ein weiterer Faktor, der zur gesteigerten Abtötung von Bakterien führt, ist die Länge der Pulsdauer. Bei einem länger andauernden Puls, also längerer Wirkzeit des elektrischen Feldes, werden auch mehr Bakterien abgetötet. Für die eigenen Untersuchungen wurde eine Pulsdauer von 1  $\mu\text{s}$  konstant gehalten. In der Literatur werden häufig längere Pulszeiten von bis zu einer Millisekunde verwendet. Allerdings wurde die Kürze der verwendeten Pulsdauer der eigenen Untersuchungen durch die hohe Feldstärke ausgeglichen [156, 209].

### **5.2.2 Keimzahlreduktion durch rein thermische Behandlung**

Teil der eigenen Untersuchungen war die Charakterisierung der Leistung einer Anlage auf Basis der Elektroimpulstechnologie, die zur Abtötung von Pathogenen in bakteriell belastetem Abwasser beitragen sollte. Dabei wurde die Abtötung (Keimzahlreduktion) durch ein gepulstes elektrisches Feld an drei klinisch relevanten Vancomycin-resistenten *Enterococcus faecium* (VREf), die ursprünglich von Patienten stammen, getestet. Darunter befanden sich auch zwei VREf, die im Rahmen von zwei Ausbrüchen isoliert wurden.



Bei der Elektroimpulsbehandlung wurde als Nebeneffekt Energie in Form von Wärme in das behandelte Abwasser abgegeben. Somit erwärmte sich das Abwasser durch die Bepulsung je nach eingetragener Energiemenge um einen bestimmten Temperaturbetrag. Dieser Effekt war bei der getesteten Elektroimpulsanlage unumgänglich. Um trotzdem eine Aussage über die Effizienz der Elektroimpulsanlage in Bezug auf die Keimzahlreduktion der VRE treffen zu können, waren die Vorversuche der rein thermischen Behandlung der VRE notwendig.

Dabei wurde von vier (resistenten) Enterokokken-Isolaten jeweils eine Absterbekurve und die sog. Absterbetemperatur ( $T_a$ ) in Laborversuchen ermittelt. Bei der Absterbetemperatur handelt es sich um den Temperaturpunkt, bei dem die Abtötung durch Hitze gerade einsetzt. Die ermittelten Absterbetemperaturen gaben Anhaltspunkte, in welchem Temperaturbereich die Interpretation der Leistung der Elektroimpulsanlage stattfinden musste. Um einen aussagekräftigen Vergleich zur Elektroimpulsbehandlung ziehen zu können, wurden die rein thermischen Versuche unter möglichst gleichen Bedingungen durchgeführt. Dazu zählte auch die Verwendung von Abwasser, in dem die Enterokokkenisolate thermisch behandelt wurden. Des Weiteren wurde in den Laborversuchen die zeitliche Einwirkung der Temperatur auf die Bakteriensuspension an die der Elektroimpulsanlage bestmöglich angepasst, da an der Anlage das Abwasser im Reaktor durch die Behandlung sekundenschnell erhitzt wurde und anschließend noch ca. 60 Sekunden benötigte, bis es durch die Schlauchsysteme in einer Probenflasche aufgefangen und gekühlt werden konnte.

Für die getesteten drei VREf wurden Absterbetemperaturen zwischen 47,5 °C und 53 °C berechnet (Tab. 13). Die höchste Absterbetemperatur, nämlich 54 °C, wurde für den Vancomycin-sensiblen Referenzstamm ATCC 6057 (*Enterococcus faecium*) ermittelt. Es handelte sich somit um den temperaturresistentesten Stamm unter den getesteten Enterokokken. Dieser Stamm der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) wird auch, festgelegt in der DIN-Norm 58949 (Deutsches Institut für Normung), verwendet als Bioindikator zur Überprüfung von Desinfektions- und Reinigungsautomaten.

Insgesamt ergab sich eine vom jeweiligen Isolat abhängige Absterbetemperatur, die bis zu sieben Grad zwischen den getesteten Enterokokken schwankte. Unterschiede in der Hitzeresistenz zwischen Bakterienstämmen der gleichen Art sind nicht

unüblich. Dies beweisen zwei Studien, die *Staphylococcus aureus*-Stämme auf ihre Hitzeresistenz untersucht haben [31, 148]. Der Effekt der Abtötung von Bakterien durch Hitze wird dabei auf zahlreiche Effekte, die die Zellbestandteile wie Zellmembran, Zellwand und Enzyme und Ribosome betreffen, zurückgeführt [31].

Die Berechnung einer Absterbetemperatur ist in dieser Form in der Literatur nicht üblich. Die meisten Literaturstellen führten Untersuchungen in einer Korrelation aus Temperatur und Zeit durch, um Bakterienstämme und deren Thermotoleranz mit bestehenden genormten Desinfektionsverfahren vergleichen zu können. Bei diesen Untersuchungen wird getestet, wie lange ein Bakterium bei einer bestimmten Temperatur überleben kann. Zusätzlich variieren die Versuchsbedingungen in den Literaturstellen bezüglich der Enterokokken sehr stark (die thermische Behandlung in Abwasser ist in der Literatur nicht erwähnt), wodurch ein direkter Vergleich weiter erschwert wird. Laut zahlreicher Studien waren *Enterococcus faecium*-Stämme (auch Vancomycin-resistente und klinische Isolate) in der Lage, eine Hitzebehandlung von 65 °C über 20 Minuten oder länger zu überleben. Selbst drei Minuten bei 71 °C überstanden einige Isolate mühelos [26, 84, 163]. Bei einer Hitzeeinwirkungsdauer von einer Minute (wie auch in den eigenen Untersuchungen verwendet) erfolgte lediglich eine Keimzahlreduktion von weniger als zwei Logstufen [26]. Allerdings wurden laut Literatur die Enterokokken in einem nährreichen Flüssigmedium (BHI, Brain Heart Infusion) der Hitze ausgesetzt. Dies könnte zu höheren Absterbetemperaturen führen, da die Bakterien optimale Nährbedingungen vorfinden. In den eigenen Untersuchungen wurde nach einer Minute schon eine Keimzahlreduktion von fünf Logstufen bei den getesteten Enterokokken gemessen (Kapitel 4.2.1 Keimzahlreduktion von VRE durch rein thermische Behandlung). Somit scheint Abwasser für die Enterokokken kein optimales Medium zu sein, um den eintretenden Stress durch Hitze zu kompensieren.

Zusätzlich zu den Absterbetemperaturen wurde auch der Einfluss des verwendeten Nährbodens bei der Keimzahlbestimmung nach der Hitzebehandlung untersucht. Dazu wurden die Werte der Keimzahlreduktion auf dem selektiven Enterokokken-Agar (Slanetz-Bartley-Agar) mit den Werten auf dem Vancomycin-haltigen Enterococcosel-Agar verglichen (Kapitel 4.2.4 Einfluss des Nährbodens auf die Keimzahlreduktion).

Die Absterbetemperatur auf Enterococcosel-Agar unterschied sich entweder gar nicht von der auf Slanetz-Bartley-Agar (bei VRE 2 und VRE 7), oder lag maximal um 0,4 °C niedriger (bei VRE 1, Tab. 15). Ein minimaler Unterschied zwischen den beiden Nährböden war in Temperaturbereichen oberhalb der Absterbetemperaturen zu verzeichnen. Dort war ein leicht steilerer Verlauf der Abtötungskurve zu verzeichnen, wodurch bei gleichen Temperaturwerten die Reduktion der Keimzahlen auf dem Vancomycin-haltigen Enterococcosel-Agar um bis zu eine Logstufe höher lag (Abb. 34 und Abb. 35). Aufgrund des bei diesen Temperaturen vorhandenen Hitzestresses, führte der zusätzliche Stressfaktor des antibiotikahaltigen Nährbodens zur zusätzlichen Keimzahlreduktion [26, 45, 71, 163].

### **5.2.3 Wirkungsweise des elektrischen Feldes**

Um die Leistung der Elektroimpulsanlage in Bezug auf die Keimzahlreduktion (Abtötung) der Enterokokken durch das gepulste elektrische Feld beurteilen zu können, wurde untersucht, in welcher Art und Weise das elektrische Feld zur Abtötung beiträgt bzw. welche Parameter bei der Elektroimpulsbehandlung von Bedeutung sind.

#### 5.2.3.1 Spezifische Energie

Untersucht wurde in diesem Zusammenhang zunächst der Einfluss der sog. spezifischen Energie (Kapitel 4.2.2 Wirkungsweise des elektrischen Feldes). Diese spezifische Energie (berechneter Mittelwert pro definierter Volumenmenge) wurde durch mehrere Faktoren, wie z. B. die Zündspannung oder die Kapazität des Generators, beeinflusst. Ein weiterer wichtiger Faktor, der die Höhe der spezifischen Energie beeinflusst und von mehreren Autoren eingehend untersucht wurde, ist die Impulsanzahl. Die Impulsanzahl gibt an, wie oft das gepulste elektrische Feld auf ein bestimmtes, definiertes Volumen des behandelten Abwassers einwirkte. Da erwartet wurde, dass das elektrische Feld zur Keimzahlreduktion von Bakterien beiträgt, würde man somit auch eine steigende Keimzahlreduktion bei mehr elektrischen Impulsen (also einer höheren spezifischen Energie) erwarten [8, 68, 153, 209]. Anhand der eigenen Untersuchungen konnte keine eindeutige Abhängigkeit der Keimzahlreduktion von der spezifischen Energie bestätigt werden (Abb. 27). Unterhalb der Absterbetemperatur des Referenzstamms ATCC 6057 (54 °C) wurde durch das elektrische Feld zwar eine abtötende Wirkung erzielt, jedoch war erkennbar, dass es neben der spezifischen Energie noch mindestens einen weiteren

Faktor, der zur Keimzahlreduktion beiträgt, geben muss. Dies wurde durch das Auftreten von drei verschiedenen Abtötungskurven bei steigender spezifischer Energie anstelle einer einzigen Abtötungskurve, bestehend aus Werten verschiedener Versuchsreihen, offensichtlich.

### 5.2.3.2 Temperatur vor und nach der Elektroimpulsbehandlung

Neben dem Einfluss der spezifischen Energie wurde auch der Einfluss der Einlauftemperatur vor der Elektroimpulsbehandlung auf die Keimzahlreduktion untersucht (Abb. 28). Es war erkennbar, dass bei höheren Einlauftemperaturen die abtötende Wirkung derselben Größenordnung schon mit geringerer zugeführter spezifischer Energie erreicht wurde. Ein direkter Zusammenhang der Abtötung mit der Einlauftemperatur war allerdings nicht erkennbar.

Dass die Temperatur des Mediums vor der Elektroimpulsbehandlung einen weiteren entscheidenden Einfluss auf die Höhe der Keimzahlreduktion ausübt, ist allerdings in Studien bewiesen worden. Bei diesen Untersuchungen wurde bei höheren Einlauftemperaturen auch eine höhere Keimzahlreduktion erzielt, was den synergistischen Effekt der Elektroimpulsbehandlung in Verbindung mit Temperatur bestätigte [8, 9, 46, 68, 75, 138, 209]. In den meisten Studien wurden aber nur Laborversuche mit kleinen Elektroimpulsanlagen durchgeführt, bei denen lediglich kleine Test-Volumina verwendet wurden. Durch eine Kühlung des Behandlungsmediums wurde außerdem verhindert, dass sich das Medium durch die elektrischen Impulse erwärmt. Dies ließ direkte Rückschlüsse auf die Leistung der Elektroimpulsbehandlung und den Einfluss der Einlauftemperatur in Bezug auf die Keimzahlreduktion von Bakterien zu. Im Gegenzug dazu konnte bei den eigenen Untersuchungen diese Temperaturerhöhung des Versuchsmediums an der Elektroimpulsanlage technisch nicht verhindert werden, weswegen sich alle Interpretationen nur auf die Kombination der Wirkung aus elektrischem Feld und Temperaturerhöhung beziehen können. Ein alleiniger Einfluss der Einlauftemperaturen ohne eine danach folgende Temperaturerhöhung konnte aus diesem Grund nicht untersucht bzw. gemessen werden.

Um den Einfluss der Auslauftemperaturen zu untersuchen, wurden die einzelnen Versuchswerte des Referenzstamms ATCC 6057 dementsprechend aufgeteilt (Abb. 29). Die Höhe der Keimzahlreduktion konnte dabei direkt der durch die Bepulsung erreichten Auslauftemperatur zugeordnet werden. Bei steigenden

Auslauftemperaturen stieg auch die Keimzahlreduktion an, wodurch der getestete Referenzstamm somit auf das gepulste elektrische Feld mit einer gesteigerten Temperaturempfindlichkeit - auch unterhalb seiner Absterbetemperatur - reagierte.

Die Auslauftemperatur dieser Elektroimpulsanlage kam zustande durch die Einlauftemperatur des Abwassers vor der elektrischen Bepulung und der durch die Bepulung zugeführten spezifischen Energie in Form von Wärme. Aus diesem Grund spielten die spezifische Energie und die Einlauftemperaturen in den eigenen Untersuchungen zwar eine indirekte Rolle, aber den eigentlichen Einfluss auf die Keimzahlreduktion zeigte die Auslauftemperatur als Funktion der beiden variablen Größen.

Die spezifische Energie und die Einlauftemperatur wurden in der Literatur als Einflussfaktoren auf die Höhe der Keimzahlreduktion beschrieben, allerdings wurden vermutlich durch einen starken und nachhaltigen Einfluss der Auslauftemperatur der untersuchten Anlage deren Effekte einfach überlagert. Ein in dieser Konstellation der Elektroimpulsanlage zwar wahrscheinlich vorhandener Einfluss der Einlauftemperatur auf die Keimzahlreduktion könnte durch die zusätzliche Keimzahlreduktion, verursacht durch die längere Inkubation bei den gemessenen Auslauftemperaturen, nach oben hin verfälscht worden sein. Dabei handelt es sich allerdings lediglich um eine Vermutung, die nur zu bestätigen wäre, wenn unter den gegebenen Bedingungen mit Hilfe einer Kühlung im Reaktor Messungen ohne Erhöhung der Temperatur durchgeführt werden könnten.

Jedoch war die Auslauftemperatur nicht der alleinige Faktor, der die Höhe der Keimzahlreduktion bestimmte. Tatsächlich sorgte nur das synergistische Zusammenwirken des elektrischen Felds in Kombination mit der Temperatur für die abtötende Wirkung. Denn es muss bedacht werden, dass es bei Temperaturen unterhalb von 54 °C (Absterbetemperatur des Referenzstamms), ohne das synergistische Einwirken des elektrischen Feldes, zu keinerlei Keimzahlreduktion gekommen wäre (siehe Kapitel 4.2.1 Keimzahlreduktion von VRE durch rein thermische Behandlung).

Vermutet wird bei der Interpretation der eigenen Ergebnisse, dass die abtötende Wirkung, zeitlich gesehen, zunächst durch das elektrische Feld und anschließend durch thermale Schädigung zustande kam. Denn nach der Bepulung im Reaktor der Elektroimpulsanlage waren die im Abwasser enthaltenen Bakterien noch ca. eine

Minute der Auslauftemperatur ausgesetzt, weil das bepumpte Abwasser zunächst über den Auslaufschlauch die Anlage verlassen musste bevor es gekühlt werden konnte. Die Enterokokken in dem behandelten Abwasser wurden somit zunächst durch das gepulste elektrische Feld abgetötet oder geschädigt. Danach waren sie der relativ hohen Auslauftemperatur für einige Zeit ausgesetzt, was zusätzlich zur Keimzahlreduktion der angeschlagenen Bakterienzellen durch thermale Effekte führte. Dieser zusätzliche thermale Effekt der Auslauftemperaturen wurde in einer Studie bereits bestätigt [210].

Der Grund, warum Bakterienzellen bei höheren Umgebungstemperaturen sensibler auf ein elektrisches Feld reagieren, wird in der Eigenschaft der Zellmembran vermutet. Bei niedrigen Temperaturen besitzen die Phospholipide eine dichte, gelartige Struktur. Bei hohen Temperaturen dagegen sind sie weniger dicht angeordnet, weswegen die Membran eine flüssig-kristalline Struktur annimmt. Dies kann die physikalische Stabilität der Membran beeinflussen [75, 165]. Mit steigender Temperatur wird außerdem das kritische Membranpotenzial um den Faktor 2 herabgesetzt. Somit werden bei höheren Umgebungstemperaturen die Bakterien besser abgetötet als bei niedrigeren Temperaturen [30, 85, 138, 191].

Im Hinblick auf energiesparende Maßnahmen bei der Konstruktion einer solchen Elektroimpulsanlage empfiehlt sich, auf Grund des erwiesenen Synergismus aus dem gepulsten elektrischen Feld und der Temperatur, z. B. eine Wärmerückgewinnung durch Wärmetauscher zu verwenden. Mit Hilfe eines vorgeschalteten Wärmetauschers könnte Energie in Form von Wärme des bepumpten Abwassers zurück gewonnen werden, um das Abwasser vor der Bepulsung zu erwärmen. Somit wäre wesentlich weniger spezifische Energie nötig, um hohe, abtötende Temperaturen nach der Bepulsung zu erreichen, und eine große Effizienz in Bezug auf die hohe Abtötung der Bakterien durch Temperatur bei gleichzeitiger Energiesparung wäre gewährleistet.

#### **5.2.4 Keimzahlreduktion durch Elektroimpulsbehandlung in Verbindung mit thermischem Einfluss**

In der Elektroimpulsanlage wurden neben dem Referenzstamm auch drei klinisch relevante VREf auf ihre Elektrosensibilität getestet. Aufgrund der erwiesenen gesteigerten Temperaturempfindlichkeit nach erfolgter Elektroimpulsbehandlung wurden die Keimzahlreduktionen gegen die Temperatur aufgetragen, um so den direkten Vergleich zur rein thermischen Behandlung ziehen zu können (Kapitel 4.2.3

Keimzahlreduktion durch Elektroimpulsbehandlung in Verbindung mit rein thermischem Einfluss). Die Elektroimpulsbehandlung der (resistenten) Enterokokken in der Pilotanlage führte zu unterschiedlichen Keimzahlreduktionen. Bei dem Referenzstamm wurde unterhalb der spezifischen Absterbetemperatur eine Keimzahlreduktion von ca. 3 Logstufen erzielt (Abb. 30). Oberhalb der Absterbetemperatur wurde die Absterbekurve bei Elektroimpulsbehandlung im Vergleich zur Kurve der rein thermischen Behandlung stark nach oben abgelenkt, was für einen kombinatorischen Effekt aus elektrischem Feld und Temperatur spricht. Es handelte sich einerseits um den temperaturresistentesten Stamm (Tab. 13), aber auch gleichzeitig um den elektrosensibelsten Stamm (Tab. 14). Dies lässt darauf schließen, dass sich die Mechanismen, die der Abtötung durch Elektroimpulsverfahren und Hitze zugrunde liegen, voneinander unterscheiden. Dass Temperaturresistenz nicht mit Elektroresistenz gekoppelt sein muss, wurde bereits in Untersuchungen bestätigt [8, 9, 31].

VRE 1 war das elektroresistenteste Isolat. Eine Keimzahlreduktion durch das gepulste elektrische Feld war unterhalb der Absterbetemperatur nicht messbar (Tab. 14, Abb. 31). Erst oberhalb der Absterbetemperatur von 53 °C wurde eine abtötende Wirkung erzielt. Sie wird auf eine rein thermische Ursache zurückgeführt, da sich diese Werte nicht von den Werten der Absterbekurve bei rein thermischer Behandlung unterschieden (Abb. 31).

Die von Patienten isolierten VREf wurden durch die Elektroimpulsanlage insgesamt um maximal eine Logstufe abgetötet. Dieser geringe Effekt der Elektroimpulsbehandlung ist für den Einsatz der Anlage als wirkungsvolle Abwasserdesinfektion bei moderaten Temperaturen in dieser Form nicht von Nutzen. Ein mit bakteriellen Pathogenen belastetes Abwasser würde sich in der Praxis unter den gegebenen Bedingungen der Elektroimpulsanlage lediglich in Kombination mit hohen Auslauftemperaturen in der Keimzahl wirkungsvoll reduzieren lassen.

### 5.2.4.1 Einfluss des Nährbodens auf die Keimzahlreduktion

Nach erfolgter Elektroimpulsbehandlung ist auch die Art des Nährbodens zur Keimzahlbestimmung der behandelten Probe von Bedeutung. Um dies zu untersuchen, wurden die Werte der Keimzahlreduktion auf dem selektiven Enterokokken-Agar (Slanetz-Bartley-Agar) verglichen mit den Werten auf dem Vancomycin-haltigen Enterococcus-Agar (Kapitel 4.2.4 Einfluss des Nährbodens auf die Keimzahlreduktion). Bei der rein thermischen Behandlung (also ohne

elektrisches Feld) waren keine Unterschiede in der Keimzahlreduktion zwischen beiden Nährböden zu verzeichnen (Tab. 15). Nach der Elektroimpulsbehandlung jedoch wurde ein deutlicher Unterschied der Keimzahlreduktion im Vergleich der beiden Nährböden beobachtet (Tab. 17). Bei Bepulsung mit steigender spezifischer Energie und somit gleichzeitig ansteigender Temperatur wurde das Wachstum von VRE 7 auf beiden Nährböden unterschiedlich stark reduziert (Abb. 36 und Abb. 37). Im Vergleich zu weiteren VREf war dieser Effekt bei VRE 7 am stärksten ausgeprägt. VRE 1 zeigte einen kleineren, aber erkennbaren, Unterschied in Bezug auf das Wachstum auf den beiden Nährböden. VRE 2 zeigte diesbezüglich ein ausgeglichenes Verhältnis im Wachstum (Tab. 17). Bei dem Einfluss des Vancomycin-haltigen Nährbodens handelte es sich somit um eine stammspezifische Einflussgröße.

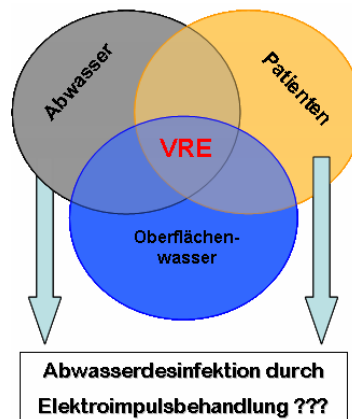
Der synergistische Effekt der Elektroimpulsbehandlung in Kombination mit antibakteriellen Substanzen wurde schon in Literaturstellen erwähnt. Die meisten Untersuchungen beziehen sich auf eine Elektroimpulsbehandlung mit einem Nisin-haltigen Medium [9, 27, 136, 181]. Bei Nisin handelt es sich um ein antibakterielles Protein. Bei diesen Untersuchungen wurde bestätigt, dass die Kombination der Elektroimpulsbehandlung mit Nisin wesentlich höhere Keimzahlreduktionen zur Folge hat als die Elektroimpulsbehandlung oder die Behandlung mit Nisin alleine. Die Parallele zu den eigenen Untersuchungen ist in dem Ersatz von Nisin im behandelten Medium (wie in der Literatur beschrieben) durch Vancomycin (im Vancomycin-haltigen Enterococcus-Agar bei der Keimzahlbestimmung) zu ziehen. Die Mechanismen des Zusammenwirkens von gepulsten elektrischen Feldern und zugesetzten Substanzen sind allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt. Eine Ursache des Unterschiedes im Wachstum auf den beiden Nährböden der eigenen Untersuchungen könnte in subletal geschädigten Bakterienzellen liegen [45]. Dabei handelt es sich um durch das elektrische Feld angeschlagene Zellen, die aber in der Lage sind, unter geeigneten Bedingungen weiter zu wachsen. Dem zusätzlichen Stress durch das Vancomycin konnten diese angeschlagenen Zellen allerdings nicht standhalten, weshalb die Unterschiede in den Keimzahlen deutlich wurden. Bei der Untersuchung der Keimzahlen nach Elektroimpulsbehandlung auf Nährböden mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen, wurden niedrigere Keimzahlen auf dem Nährboden mit der höheren Salzkonzentration ebenfalls auf subletal geschädigte Bakterienzellen zurückgeführt [45]. Um eine gesteigerte Keimzahlreduktion bei



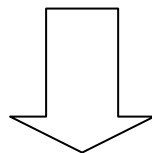
bakteriell stark belastetem Abwasser herbeizuführen, empfiehlt sich daher die Kombination der Elektroimpulsbehandlung mit z. B. antibakteriellen Substanzen.

### 5.2.5 Fazit

#### ❖ Hochresistente VRE bei Patienten und in der (aquatischen) Umwelt



- Unterschiedliche Absterbetemperaturen bei rein thermischer Behandlung konnten gezeigt werden.
- Bei den (resistenten) Enterokokken stand Hitzeresistenz nicht zwangsläufig mit einer Elektroresistenz in Verbindung.
- Die Wirkung des elektrischen Feldes beruhte auf einer Temperaturempfindlichkeit (Abtötung schon bei relativ niedrigeren Temperaturen).
- Hitzeresistentester Referenzstamm reagierte am elektrosensibelsten (zeigte eine hohe Keimzahlreduktion) unter Anwesenheit eines elektrischen Feldes.
- VRE waren resistenter gegenüber der Elektroimpulsbehandlung als der Vancomycin-sensible Referenzstamm.



Die untersuchte Elektroimpulsanlage zeigte in dieser Form keine zufrieden stellenden Resultate in Bezug auf die Abtötung von klinisch relevanten Pathogenen in Abwasser bzw. den Einsatz als wirkungsvolle Abwasserdesinfektion bei moderaten Temperaturen.

## 6 Zusammenfassung

Enterokokken sind Bestandteil der natürlichen Darmflora von Menschen und Tieren. In den letzten Jahren ist allerdings eine Zunahme der Resistenzen bei Enterokokken gegenüber den in der Therapie eingesetzten Antibiotika zu beobachten. Vor allem Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) treten als Erreger von nosokomialen (im Rahmen von medizinischen Maßnahmen erworbenen) Infektionen immer häufiger auf und schränken die Therapiemöglichkeiten deutlich ein. Während das Vorkommen von VRE im Krankenhausumfeld und in Abwasser häufig untersucht und bestätigt wurde, ist wenig über den Eintrag und die Verbreitungsmechanismen von VRE entlang des Abwasserpades in die aquatische Umwelt bekannt. In den eigenen Untersuchungen wurde deshalb versucht, eine Verknüpfung dieser beiden Bereiche zu erstellen, indem das Vorkommen von Vancomycin-resistenten *Enterococcus faecium* (VREf) bei Patienten der Universitätsmedizin Mainz und in der aquatischen Umwelt (Abwasser und Oberflächenwasser) über einen Zeitraum von sechs Jahren (2004 bis 2009) untersucht wurde. Dies ermöglichte auch Aussagen über den zeitlichen Verlauf der VRE-Situation. VREf aus den drei Herkunftsbereichen (Patienten, Abwasser und Oberflächenwasser) wurden durch Genotypisierung mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) auf genetische Verwandtschaften untersucht.

Das weit verbreitete Vorkommen von VREf in den untersuchten Proben konnte sowohl für ungeklärtes und geklärtes Abwasser als auch für Oberflächenwasser bestätigt werden. Der Reinigungsprozess der Kläranlage in Mainz konnte die Zahl der VREf nicht vollständig reduzieren. Somit gelangten VREf auch durch die Kläranlage hindurch in das Oberflächenwasser, was ein potentielles Gesundheitsrisiko für den Menschen darstellt.

In die Verwandtschaftsanalyse wurden 294, zum größten Teil sehr hochresistente VREf von Patienten und aus Abwasser und Oberflächenwasser mit einbezogen. Sie zeigten in Bezug auf ihre genetische Diversität ein breites Spektrum an Variabilität. Ebenso konnte im zeitlichen Auftreten von VREf-Typen eine Dynamik beobachtet werden. So traten bestimmte VREf nur für einen zeitlich begrenzten Zeitraum in der aquatischen Umwelt bzw. bei Patienten auf, wodurch sich Veränderungen in der Population mit zeitlichem Wechsel ergaben.

Enge Verwandtschaften zwischen VREf von Patienten und VREf aus der aquatischen Umwelt konnten nachgewiesen werden. Für zwei VREf gelang sogar der Nachweis des Eintrags in die aquatische Umwelt von Patienten aus dem Krankenhaus als Eintragsquelle ausgehend. Hier zeigte sich ein Handlungsbedarf bezüglich der Desinfektion von solchen Abwässern, besonders während der Zeiten eines Ausbruchs mit nosokomialen Erregern.

Nebenproduktfreie Methoden zur Desinfektion von solchen Abwässern, wie z. B. die Behandlung mit gepulsten elektrischen Feldern, gewinnen gerade in letzter Zeit immer mehr an Bedeutung, um den Eintrag von resistenten Bakterien in die Umwelt zu verhindern. Die Wirkungsweise des elektrischen Feldes und die Effizienz dieser Elektroimpulsanlage bezüglich der Keimzahlreduktion wurden vor dem Hintergrund getestet, ein zukunftsorientiertes Verfahren zur Desinfektion von bakteriell belasteten Abwässern zu entwickeln.

In den eigenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das synergistische Zusammenwirken des elektrischen Feldes und der Prozesstemperatur die Höhe der Keimzahlreduktion beeinflussen. Die untersuchten Enterokokken reagierten während der Elektroimpulsbehandlung empfindlicher auf die Temperatur, was höhere Keimzahlreduktionen zur Folge hatte. Auch die Wahl des Nährbodens zur Keimzahlbestimmung nach der Elektroimpulsbehandlung kann sich, je nach Isolat, auf die Keimzahlen auswirken. So wurden auf einem Vancomycin-haltigen Nährboden bei bestimmten VREf niedrigere Keimzahlen gezählt, als auf einem Nährboden ohne Antibiotikum.

Weiterführend wurde untersucht, inwiefern sich verschiedene klinisch relevante VREf durch ein gepulstes elektrisches Feld abtöten lassen. Dabei wurde eine isolatabhängige Elektroresistenz der VREf gegenüber gepulsten elektrischen Feldern gezeigt. Die untersuchten VREf ließen sich in ihrer Keimzahl, im Gegensatz zu einem Vancomycin-sensiblen Stamm, nicht effizient durch die Elektroimpulsanlage abtöten, was den praktischen Einsatz einer solchen Elektroimpulsanlage als wirkungsvolles Desinfektionsverfahren in Frage stellte.

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] **AARESTRUP, F.M.** (1995)  
Occurrence of glycopeptide resistance among *Enterococcus faecium* isolates from conventional and ecological poultry farms.  
*Microb. Drug Resist.* **1**: 255-257.
- [2] **AARESTRUP, F.M., HASMAN, H., JENSEN, L.B., MORENO, M., Inmaculada HERRERO, A., DOMINGUEZ, L., FINN, M., FRANKLIN, A.** (2002) Antimicrobial resistance among enterococci from pigs in three European countries. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 4127-4129.
- [3] **ABELE-HORN, M., VOGEL, U., KLARE, I., KONSTABEL, C., TRABOLD, R., KURIHARA, R., WITTE, W., KRETH, W., SCHLEGEL, P.G., CLAUS, H.** (2006) Molecular epidemiology of hospital-acquired vancomycin-resistant enterococci. *J. Clin. Microbiol.* **44**: 4009-4013.
- [4] **ABRIOUEL, H., OMAR, N.B., MOLINOS, A.C., LÓPEZ, R.L., GRANDE, M.J., MARTÍNEZ-VIEDMA, P., ORTEGA, E., CAÑAMERO, M.M., GALVEZ, A.** (2008) Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. *Int. J. Food Microbiol.* **123**: 38-49.
- [5] **AGUILAR-ROSAS, S.F., BALLINAS-CASARRUBIAS, M.L., NEVAREZ-MOORILLON, G.V., MARTIN-BELLOSO, O., ORTEGA-RIVAS, E.** (2007) Thermal and pulsed electric fields pasteurization of apple juice: effects on physicochemical properties and flavour compounds. *J. Food Eng.* **83**: 41-46.
- [6] **AMORIM, M.L., FARIA, N.A., OLIVEIRA, D.C., VASCONCELOS, C., CABEDA, J.C., MENDES, A.C., CALADO, E., CASTRO, A.P., RAMOS, M.H., AMORIM, J.M., DE LENCASTRE, H.** (2007) Changes in the clonal nature and antibiotic resistance profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with spread of the EMRSA-15 clone in a tertiary care Portuguese hospital. *J. Clin. Microbiol.* **45**: 2881-2888.
- [7] **ANDREWES, F.W., HORDER, T.J.** (1906).  
A study of the streptococci pathogenic for man. *Lancet* **ii**: 708-713.
- [8] **ARONSSON, K., LINDGREN, M., JOHANSSON, B.R., RÖNNER, U.** (2001) Inactivation of microorganisms using pulsed electric fields: the influence of process parameters on *Escherichia coli*, *Listeria innocua*, *Leuconostoc mesenteroides* and *Saccharomyces cerevisiae*. *In. Food Sci. & Emerg. Techn.* **2**: 41-54.

- [9] **ARONSSON, K., RÖNNER, U.** (2001)  
Influence of pH, water activity and temperature on the inactivation of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* by pulsed electric fields. *In. Food Sci. & Emerg. Techn.* **2**: 105-112.
- [10] **ARONSSON, K., RÖNNER, U., BORCH, E.** (2005)  
Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Saccharomyces cerevisiae* in relation to membrane permeabilization and subsequent leakage of intracellular compounds due to pulsed electric field processing. *Int. J. Food Microbiol.* **99**: 19-32.
- [11] **BARBIER, N., SAULNIER, P., CHACHATRY, E., DUMONTIER, S., ANDREMONT, A.** (1996) Random amplified polymorphic DNA typing versus pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological typing of vancomycin-resistant enterococci. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 1096-1099.
- [12] **BATES, J., JORDENS, J.Z., SELKON, J.B.** (1993)  
Evidence for an animal origin of vancomycin-resistant enterococci. *Lancet* **342**: 490-491.
- [13] **BATES, J., JORDENS, J.Z., GRIFFITHS, D.T.** (1994)  
Farm animals as a putative reservoir for vancomycin-resistant enterococcal infections in man. *J. Antimicrob. Chemother.* **34**: 507-514.
- [14] **BATES, J.** (1997)  
Epidemiology of vancomycin-resistant enterococci in the community and the relevance of farm animals to human infection. *J. Hosp. Infect.* **37**: 89-101.
- [15] **BEARMAN, G.M.L., WENZEL, R.P.** (2005)  
Bacteraemias: a leading cause of death. *Arch. Med. Res.* **36**: 646-659.
- [16] **BEDENDO, J., PIGNATARI, A.C.** (2000)  
Typing of *Enterococcus faecium* by polymerase chain reaction and pulsed field gel electrophoresis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **33**: 1269-1274.
- [17] **BERTRAND, X., MULIN, B., VIEL, J.F., THOUVEREZ, M., TALON, D.** (2000) Common PFGE patterns in antibiotic-resistant *Enterococcus faecalis* from humans and cheeses. *Food Microbiol.* **17**: 543-551.
- [18] **BIAVASCO, F., FOGLIA, G., PAOLETTI, C., ZANDRI, G., MAGI, G., GUAGLIANONE, E., SUNDSFJORD, A., PRUZZO, C., DONELLI, G., FACINELLI, B.** (2007) VanA-type enterococci from humans, animals, and food: species distribution, population structure, Tn1546 typing and location, and virulence determinants. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 3307-3319.
- [19] **BLANCH, A.R., CAPLIN, J.L., IVERSEN, A., KÜHN, I., MANERO, A., TAYLOR, H.D., VILANOVA, X.** (2003) Comparison of enterococcal populations related to urban and hospital wastewater in various climatic and geographic European regions. *J. Appl. Microbiol.* **94**: 994-1002.

- [20] **BLUHM, H., FREY, W., GUSBETH, C., SACK, M., SCHULTHEISS, C.** (2003) Aufschluss und Abtötung biologischer Zellen mit Hilfe starker gepulster elektrischer Felder. *Nachrichten-Forschungszentrum Karlsruhe* Jahrg. 35 3/2003: 105-110.
- [21] **BONORA, M.G., BORDIN, C., BRAGAGNOLO, L., CIRELLI, L., DE FATIMA, M., GROSSATO, A., LIGOZZI, M., LO CASCIO, G., FONTANA, R.** (2001) Molecular analysis of vanA enterococci isolated from humans and animals in northeastern Italy. *Microb. Drug Resist.* **7**: 247-256.
- [22] **BONTEN, M.J., WILLEMS, R., WEINSTEIN, R.A.** (2001) Vancomycin-resistant enterococci: why are they here, and where do they come from? *Lancet Infect. Dis.* **1**: 314-325.
- [23] **BORGMANN, S., NIKLAS, D.M., KLARE, I., ZABEL, L.T., BUCHENAU, P., AUTENRIETH, I.B., HEEG, P.** (2004) Two episodes of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* outbreaks caused by two genetically different clones in a newborn intensive care unit. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* **207**: 386-389.
- [24] **BORGMANN, S., SCHULTE, B., WOLZ, C., GRUBER, H., WERNER, G., GOERKE, C., KLARE, I., BEYSER, K., HEEG, P., AUTENRIETH, I.B.** (2007) Discrimination between epidemic and non-epidemic glycopeptide-resistant *E. faecium* in a post-outbreak situation. *J. Hosp. Infect.* **67**: 49-55.
- [25] **BOURGEOIS-NICOLAOS, N., MOUBARECK, C., MANGENEY, N., BUTEL, M.J., DOUCET-POPULAIRE, F.** (2006) Comparative study of vanA gene transfer from *Enterococcus faecium* to *Enterococcus faecalis* and to *Enterococcus faecium* in the intestine of mice. *FEMS Microbiol. Lett.* **254**: 27-33.
- [26] **BRADLEY, C.R., FRAISE, A.P.** (1996) Heat and chemical resistance of enterococci. *J. Hosp. Infect.* **34**: 191-196.
- [27] **CALDERÓN-MIRANDA, M.L., BARBOSA-CÁNOVAS, G.V., SWANSON, B.G.** (1999) Inactivation of *Listeria innocua* in skim milk by pulsed electric fields and nisin. *Int. J. Food Microbiol.* **51**: 19-30.
- [28] **CAPLIN, J.L., HANLON, G.W., TAYLOR, H.D.** (2008) Presence of vancomycin and ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* of epidemic clonal complex-17 in wastewaters from the south coast of England. *Environ. Microbiol.* **10**: 885-892.
- [29] **CARVALHO, M. da G., SHEWMAKER, P.L., STEIGERWALT, A.G., MOREY, R.E., SAMPSON, A.J., JOYCE, K., BARRETT, T.J., TEIXEIRA, L.M., FACKLAM, R.R.** (2006) *Enterococcus caccae* sp. nov., isolated from human stools. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 1505-1508.

- [30] **CASTRO, A.J., BARBOSA-CANOVAS, G.V., SWANSON's, B.G.** (1993) Microbial inactivation of foods by pulsed electric fields. *J. Food Proc. Pres.* **17**: 47-73.
- [31] **CEBRIÁN, G., SAGARZAZU, N., PAGÁN, R., CONDÓN, S., MAÑAS, P.** (2007) Heat and pulsed electric field resistance of pigmented and non-pigmented enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* in exponential and stationary phase of growth. *Int. J. Food Microbiol.* **118**: 304-311.
- [32] **COLLINS, M.D., JONES, D., FARROW, J.A.E., KILPPER-BÄLZ, R., SCHLEIFER, K.H.** (1984) *Enterococcus avium* nom. rev., comb. nov.; *E. casseliflavus* norn. rev., comb. nov.; *E. durans* norn. rev., comb. nov.; *E. gallinarum* comb. nov.; and *E. malodoratus* sp. nova. *Int. J. Syst. Bact.* **34**: 220-223.
- [33] **COLLINS, M.D., FARROW, J.A.E., JONES, D.** (1988) *Enterococcus mundtii* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36**: 8-12.
- [34] **COLLINS, M.D., FACKLAM, R.R., FARROW, J.A.E., WILLIAMSON, R.** (1989) *Enterococcus raffinosus* sp. nov., *Enterococcus solitarius* sp. nov. and *Enterococcus pseudoavium* sp. nov. *FEMS Microbiol. Lett.* **57**: 283-288.
- [35] **COLLINS, M.D., RODRIGUES, U.M., PIGOTT, N.E., FACKLAM, R.R.** (1991) *Enterococcus dispar* sp. nov. a new *Enterococcus* species from human sources. *Lett. Appl. Microbiol.* **12**: 95-98.
- [36] **COQUE, T.M., TOMAYKO, J.F., RICKE, S.C., OKHYUSEN, P.C., MURRAY, B.E.** (1996) Vancomycin-resistant enterococci from nosocomial, community, and animal sources in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**: 2605-2609.
- [37] **COQUE, T.M., WILLEMS, R.J.L., FORTUN, J., TOP, J., DIZ, S., LOZA, E., CANTON, R., BAQUERO, F.** (2005) Population structure of *Enterococcus faecium* causing bacteremia in a Spanish university hospital: setting the scene for a future increase in Vancomycin resistance? *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 2693-2700.
- [38] **COURVALIN, P.** (2006) Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clin. Infect. Dis.* **42**: 25-34.
- [39] **DE GRAEF, E.M., DEVRIESE, L.A., VANCANNEYT, M., BAELE, M., COLLINS, M.D., LEFEBVRE, K., SWINGS, J., HAESEBROUCK, F.** (2003) Description of *Enterococcus canis* sp. nov. from dogs and reclassification of *Enterococcus porcinus* Teixeira et al. 2001 as a junior synonym of *Enterococcus villorum* Vancanneyt et al 2001. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 1069-1074.
- [40] **DE VAUX, A., LAGUERRE, G., DIVIÈS, C., PRÉVOST, H.** (1998) *Enterococcus asini* sp. nov. isolated from the caecum of donkeys (*Equus asinus*). *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**: 383-387.

- [41] **DEVRIESE, L.A., CEYSSENS, K., RODRIGUES, U.M., COLLINS, M.D.** (1990) *Enterococcus columbae*, a species from pigeon intestines. *FEMS Microbiol. Lett.* **59**: 247-251.
- [42] **DICUONZO, G., GHERARDI, G., LORINO, G., ANGELETTI, S., BATTISTONI, F., BERTUCCINI, L., Creti, R., DI ROSA, R., VENDITTI, M., BALDASSARRI, L.** (2001) Antibiotic resistance and genotypic characterization by PFGE of clinical and environmental isolates of enterococci. *FEMS Microbiol. Lett.* **201**: 205-211.
- [43] **DIEKEMA, D.J., BOOTS MILLER, B.J., VAUGHN, T.E., WOOLSON, R.F., YANKEY, J.W., ERNST, E.J., FLACH, S.D., WARD, M.M., FRANCISCUS, C.L., PFALLER, M.A., DOEBBELING, B.N.** (2004) Antimicrobial resistance trends and outbreak frequency in United States hospitals. *Clin. Infect. Dis.* **38**: 78-85.
- [44] **DOMIG, K.J., MAYER, H.K., KNEIFEL, W.** (2003) Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp. 2. Pheno- and genotypic criteria. *Int. J. Food Microbiol.* **88**: 165-188.
- [45] **DUTREUX, N., NOTERMANS, S., GÓNGORA-NIETO, M.M., BARBOSA-CÁNOVAS, G.V., SWANSON, B.G.** (2000) Effects of combined exposure of *Micrococcus luteus* to nisin and pulsed electric fields. *Int. J. Food Microbiol.* **60**: 147-152.
- [46] **EL ZAKHEM, H., LANOISELLÉ, J.L., LEOVKA, N.I., NONUS, M., VOROBIEV, E.** (2007) Influence of temperature and surfactant on *Escherichia coli* inactivation in aqueous suspensions treated by moderate pulsed electric fields. *Int. J. Food Microbiol.* **120**: 259-265.
- [47] **ENDTZ, H.P., VAN DEN BRAAK, N., VAN BELKUM, A., KLUYTMANS, J.A.J.W., KOELEMAN, J.G.M., SPANJAARD, L., VOSS, A., WEERSINK, A.J.L., VANDENBROUCKE-GRAULS, C.M.J.E., BUITING, A.G.M., VAN DUIN, A., VERBRUGH, H.A.** (1997) Fecal carriage of Vancomycin-resistant enterococci in hospitalized patients and those living in the community in the Netherlands. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 3026-3031.
- [48] **EOM, J.S., HWANG, I.S., HWANG, B.Y., LEE, J.G., LEE, Y.J., CHEONG, H.J., PARK, Y.H., PARK, S.C., KIM, W.J.** (2004) Emergence of vanA genotype vancomycin-resistant enterococci with low or moderate levels of teicoplanin resistance in Korea. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 1785-1786.
- [49] **FARROW, J.A.E., COLLINS, M.D.** (1985) *Enterococcus hirae*, a new species that includes amino acid assay strain NCDO 1258 and strains causing growth depression in young chickens. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **35**: 73-75.



- [50] **FERREIRA DA SILVA, M., TIAGO, I., VERÍSSIMO, A., BOAVENTURA, R.A., NUNES, O.C., MANAIA, C.M.** (2006)  
Antibiotic resistance of enterococci and related bacteria in an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiol. Ecol.* **55**: 322-329.
- [51] **FISHER, K., PHILLIPS, C.** (2009)  
The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology* **155**: 1749-1757.
- [52] **FORTINA, M.G., RICCI, G., MORA, D., MANACHINI, P.L.** (2004)  
Molecular analysis of artisanal Italian cheeses reveals *Enterococcus italicus* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 1717-1721.
- [53] **FOULQUIÉ MORENO, M.R., SARANTINOPOULOS, P., TSAKALIDOU, E., DE VUYST, L.** (2006) The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.* **106**: 1-24.
- [54] **FRANZ, C.M.A.P., STILES, M.E., SCHLEIFER, K.H., HOLZAPFEL, W.H.** (2003) Enterococci in foods—a conundrum for food safety. *Int. J. Food Microbiol.* **88**: 105-122.
- [55] **GALAPATE, R., BAES, A., OKADA, M.** (2001)  
Transformation of dissolved organic matter during ozonation: effects on trihalomethane formation potential. *Water Res.* **35**: 2201-2206.
- [56] **GAMBAROTTO, K., PLOY, M.-C., TURLURE, P., GRELAUD, C., MARTIN, C., BORDESSOULE, D., DENIS, F.** (2000)  
Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in fecal samples from hospitalized patients and nonhospitalized controls in a cattle-rearing area of France. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 620–624.
- [57] **GAMBAROTTO, K., PLOY, M.-C., DUPRON, F., GIANGIOBBE, M., DENIS, F.** (2001) Occurrence of vancomycin-resistant enterococci in pork and poultry products from a cattle-rearing area of France. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 2354-2355.
- [58] **GARCÍA, D., GÓMEZ, N., MAÑAS, P., RASO, J., PAGÁN, R.** (2007)  
Pulsed electric fields cause bacterial envelopes permeabilization depending on the treatment intensity, the treatment medium pH and the microorganism investigated. *Int. J. Food Microbiol.* **113**: 219-227.
- [59] **GILMORE, M.** (2002).  
The enterococci: pathogenesis, molecular biology and antibiotic resistance. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- [60] **GOOSENS, H., JABES, D., ROSSI, R., LAMMENS, C., PRIVITERA, G., COURVALIN, P.** (2003)  
European survey of vancomycin-resistant enterococci in at-risk hospital wards and in vitro susceptibility testing of ramoplanin against these isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**: 5-12.

- [61] **GUARDABASSI, L., PERICHON, B., VAN HEIJENOORT, J., BLANOT, D., COURVALIN, P.** (2005)  
Glycopeptide resistance vanA operons in *Paenibacillus* strains isolated from soil. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 4227-4233.
- [62] **GUARDABASSI, L., AGERSO, Y.** (2006)  
Genes homologous to glycopeptide resistance vanA are widespread in soil microbial communities. *FEMS Microbiol. Lett.* **259**: 221-225.
- [63] **GUSBETH, C., FREY, W., VOLKMANN, H., SCHWARTZ, T., BLUHM, H.** (2009)  
Pulsed electric field treatment for bacteria reduction and its impact on hospital wastewater. *Chemosphere* **75**: 228-233.
- [64] **HAMILTON, W.A., SALE, A.J.H.** (1967)  
Effects of high electric fields on microorganisms. II. Mechanism of action of the lethal effect. *Biochim. Biophys. Acta.* **148**: 789-800.
- [65] **HASHIMOTO, Y., TANIMOTO, K., OZAWA, Y., MURATA, T., IKE, Y.** (2000)  
Amino acid substitutions in the VanS sensor of the VanA-type vancomycin-resistant *Enterococcus* strains result in high-level vancomycin resistance and low-level teicoplanin resistance. *FEMS Microbiol. Lett.* **185**: 247-254.
- [66] **HEUER, O.E., PEDERSEN, K., JENSEN, L.B., MADSEN, M., OLSEN, J.E.** (2002)  
Persistence of vancomycin-resistant enterococci (VRE) in broiler houses after the avoparcin ban. *Microb. Drug Resist.* **8**: 355-361.
- [67] **HÜLSHEGER, H., NIEMANN, E.G.** (1980)  
Lethal effects of high-voltage pulses on *E. coli* K12. *Radiat. Environ. Biophys.* **18**: 281-288.
- [68] **HÜLSHEGER, H., POTEL, J., NIEMANN, E.G.** (1981)  
Killing of bacteria with electric pulses of high field strength. *Radiat. Environ. Biophys.* **20**: 53-65.
- [69] **HÜLSHEGER, H., POTEL, J., NIEMANN, E.G.** (1983)  
Electric field effects on bacteria and yeast cells. *Radiat. Environ. Biophys.* **22**: 149-162.
- [70] **HUMMEL, A., HOLZAPFEL, W.H., FRANZ, C.M.** (2007)  
Characterisation and transfer of antibiotic resistance genes from enterococci isolated from food. *Syst. Appl. Microbiol.* **30**: 1-7.
- [71] **IVANOV, I.T., BOYTCHEVA, S., MIHAILOVA, G.** (1999)  
Parallel study of thermal resistance and permeability barrier stability of *Enterococcus faecalis* as affected by salt composition, growth temperature and pre-incubation temperature. *J. Therm. Biol.* **24**: 217-227.
- [72] **IVERSEN, A., KÜHN, I., FRANKLIN, A., MÖLLBY, R.** (2002)  
High prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Swedish sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 2838-2842.

- [73] **IVERSEN, A., KÜHN, I., RAHMAN, M., FRANKLIN, A., BURMAN, L.G., OLSSON-LILJEQUIST, B., TORELL, E., MÖLLBY, R.** (2004) Evidence for transmission between humans and the environment of a nosocomial strain of *Enterococcus faecium*. *Environ. Microbiol.* **6**: 55-59.
- [74] **IWEN, P.C., KELLY, D.M., LINDER, J., HINRICHS, S.H., DOMINGUEZ, E.A., RUPP, M.E., PATIL, K.D.** (1997) Change in prevalence and antibiotic resistance of *Enterococcus* species isolated from blood cultures over an 8-year period. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**: 494-495.
- [75] **JAYARAM, S., CASTLE, G.S., MARGARITIS, A.** (1992) Kinetics of sterilization of *Lactobacillus brevis* cells by the application of high voltage pulses. *Biotechnol. Bioeng.* **40**: 1412-1420.
- [76] **JENNES, W., DICKS, L.M.T., VERWOERD, D.J.** (2000). Enterocin 012, a bacteriocin produced by *Enterococcus gallinarum* isolated from the intestinal tract of ostrich. *J. Appl. Microbiol.* **88**: 349-357.
- [77] **JETT, B.D., HUYCKE, M.M., GILMORE, M.S.** (1994) Virulence of enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.* **7**: 462-478.
- [78] **JOHNSEN, P.J., SIMONSEN, G.S., OLSVIK, O., MIDTVEDT, T., SUNDSFJORD, A.** (2002) Stability, persistence, and evolution of plasmid-encoded VanA glycopeptides resistance in enterococci in the absence of antibiotic selection in vitro and in gnotobiotic mice. *Microb. Drug Resist.* **8**: 161-170.
- [79] **JONES, M.E., DRAGHI, D.C., THORNSBERRY, C., KARLOWSKY, J.A., SAHM, D.F., WENZEL, R.P.** (2004) Emerging resistance among bacterial pathogens in the intensive care unit - a European and North American surveillance study (2000–2002). *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob* **3**: 14-24.
- [80] **JORDENS, J.Z., BATES, J., GRIFFITHS, D.T.** (1994) Faecal carriage and nosocomial spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J. Antimicrob. Chemother.* **34**: 515-528
- [81] **JUNCO, M.T.T., MARTIN, M.G., TOLEDO, L.P., GOMEZ, P.L., BARRASA, J.L.M.** (2001) Identification and antibiotic resistance of faecal enterococci isolated from water samples. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **203**: 363-368.
- [82] **KAWALEC, M., GNIADKOWSKI, M., ZALESKA, M., OZOROWSKI, T., KONOPKA, L., HRYNIEWICZ, W.** (2001) Outbreak of Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* of the phenotype vanB in a hospital in Warsaw, Poland: Probable transmission of the resistance determinants into an endemic Vancomycin-susceptible strain. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 1781-1787.
- [83] **KAYSER, F.H.** (2003) Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *Int. J. Food Microbiol.* **88**: 255-262.

- [84] **KEARNS, A.M., FREEMAN, R., LIGHTFOOT, N.F.** (1995)  
Nosocomial enterococci: resistance to heat and sodium hypochlorite.  
*J. Hosp. Infect.* **30**: 193-199.
- [85] **KINOSITA, K., TSONG, T.Y.** (1977)  
Hemolysis of human erythrocytes by transient electric field.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A.* **74**: 1923–1927.
- [86] **KIRST, H.A., THOMPSON, D.G., NICAS, T.I.** (1998)  
Historical yearly usage of vancomycin.  
*Antimicrob. Agents Chemother.* **42**: 1303-1304.
- [87] **KLARE, I., COLLATZ, E., AL-OBEID, S., WAGNER, J., RODLOFF, A.C., WITTE, W.** (1992) Glycopeptidresistenz bei *Enterococcus faecium* aus Besiedlungen und Infektionen von Patienten aus Intensivstationen Berliner Kliniken und einem Transplantationszentrum. *Zschr. antimikrob. antineoplast. Chemother.* **10**: 45-53.
- [88] **KLARE, I., HEIER, H., CLAUS, H., WITTE, W.** (1993)  
Environmental strains of *Enterococcus faecium* with inducible high-level resistance to glycopeptides. *FEMS Microbiol. Lett.* **106**: 23-30
- [89] **KLARE, I., HEIER, H., CLAUS, H., BÖHME, G., MARIN, S., SELTMANN, G., HAKENBECK, R., ANTANASSOVA, V., WITTE, W.** (1995)  
*Enterococcus faecium* strains with vanA-mediated high-level glycopeptides resistance isolated from animal foodstuffs and fecal samples of humans in the community. *Microb. Drug Resist.* **1**: 265-72.
- [90] **KLARE, I., KONSTABEL, C., BADSTÜBNER, D., WERNER, G., WITTE, W.** (1999) Glycopeptid-resistente Enterokokken in deutschen Krankenhäusern. *Bundesgesundheitsblatt* **42**: 847-853.
- [91] **KLARE, I., KONSTABEL, C., BADSTÜBNER, D., WERNER, G., WITTE, W.** (2003) Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *Int. J. Microbiol.* **88**: 269-290.
- [92] **KLARE, I., KONSTABEL, C., MUELLER-BERTLING, S., WERNER, G., STROMMINGER, B., KETTLITZ, C., BORGMANN, S., SCHULTE, B., JONAS, D., SERR, A., FAHR, A.M., EIGNER, U., WITTE, W.** (2005)  
Spread of ampicillin/vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* of the epidemic-virulent clonal complex-17 carrying the genes esp and hyl in German hospitals. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **24**: 815-825.
- [93] **KLEIN, G., PACK, A., REUTER, G.** (1998)  
Antibiotic resistance patterns of enterococci and occurrence of vancomycin-resistant enterococci in raw minced beef and pork in Germany.  
*Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1825-1830.

- [94] **KNOLL, M., DAESCHLEIN, G., OKPARA-HOFMANN, J., KLARE, I., WILHELMS, D., WOLF, H.H., BORNEFF-LIPP, M.** (2005)  
Outbreak of vancomycin-resistant enterococci (VRE) in a hematological oncology ward and hygienic preventive measures. A long-term study. *Onkologie* **28**: 187-192.
- [95] **KO, K.S., BAEK, J.Y., LEE, J.Y., OH, W.S., PECK, K.R., LEE, N., LEE, W.G., LEE, K., SONG, J.H.** (2005)  
Molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from Korea. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 2303-2306.
- [96] **KOORT, J., COENYE, T., VANDAMME, P., SUKURA, A., BJÖRKROTH, J.** (2004) *Enterococcus hermanniensis* sp. nov., from modified-atmosphere-packaged broiler meat and canine tonsils. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 1823-1827.
- [97] **KOTZAMANIDIS, C., ZDRAGAS, A., KOURELIS, A., MORAITOU, E., PAPA, A., YIANTZI, V., PANTELIDOU, C., YIANGOU, M.** (2009)  
Characterization of vanA-type *Enterococcus faecium* isolates from urban and hospital wastewater and pigs. *J. Appl. Microbiol.* **107**: 997-1005.
- [98] **KRASSOWSKA, W., FILEV, P.D.** (2007)  
Modeling electroporation in a single cell. *Biophys. J.* **92**: 404-417.
- [99] **KRESKEN, M., HAFNER, D. und die STUDIENGRUPPE** (2000)  
Resistenzsituation bei klinisch wichtigen Infektionserregern gegenüber Chemotherapeutika in Mitteleuropa. *Chemother. J.* **2**: 51-86.
- [100] **KÜHN, I., IVERSEN, A., BURMAN, L.G., OLSSON-LILJEQUIST, B., FRANKLIN, A., FINN, M., AARESTRUP, F., SEYFARTH, A.-M., BLANCH, A. R., TAYLOR, H., CAPLIN, J., MORENO, M.A., DOMINGUEZ, L., MÖLLBY, R.** (2000) Epidemiology and ecology of enterococci, with special reference to antibiotic resistant strains, in animals, humans and the environment. Example of an ongoing project within the European research programme. *Int. J. Antimicrob. Agents* **14**: 337-342.
- [101] **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., INMACULADA HERRERO, A., MÖLLBY, R.** (2003)  
Comparison of enterococcal populations in animals, humans, and the environment - a European study. *Int. J. Food Microbiol.* **88**: 133-145.
- [102] **KÜHN, I., IVERSEN, A., MÖLLBY, R.** (2003)  
The PhenePlate™ system for studies of the diversity of enterococcal populations from the food chain and the environment. *Int. J. Food Microbiol.* **88**: 189-196.

- [103] **KÜHN, I., IVERSEN, A., FINN, M., GREKO, C., BURMAN, L.G., BLANCH, A.R., VILANOVA, X., MANERO, A., TAYLOR, H., CAPLIN, J., DOMÍNGUEZ, L., HERRERO, I.A., MORENO, M.A., MÖLLBY, R.** (2005) Occurrence and relatedness of vancomycin-resistant enterococci in animals, humans, and the environment in different European regions. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 5383-5390.
- [104] **KURIYAMA, T., WILLIAMS, D.W., PATEL, M., LEWIS, M.A., JENKINS, L.E., HILL, D.W., HOSEIN, I.K.** (2003) Molecular characterization of clinical and environmental isolates of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from a teaching hospital in Wales. *J. Med. Microbiol.* **52**: 821-827.
- [105] **KUSUDA, R., KAWAI, K., SALATI, F., BANNER, C.R., FRYER, J.L.** (1991) *Enterococcus seriolicida* sp. nov., a fish pathogen. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**: 406-409.
- [106] **LANCEFIELD, R.C.** (1933) A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J. Exp. Med.* **57**: 571-595.
- [107] **LAW-BROWN, J., MEYERS, P.R.** (2003) *Enterococcus phoeniculicola* sp. nov., a novel member of the enterococci isolated from the uropygial gland of the Red-billed Woodhoopoe, *Phoeniculus purpureus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 683-685.
- [108] **LEAVIS, H.L., WILLEMS, R.J.L., TOP, J., SPALBURG, E., MASCINI, E.M., FLUIT, A.C., HOEPELMAN, A., DE NEELING, A.J., BONTEN, M.J.M.** (2003) Epidemic and nonepidemic multidrug-resistant *Enterococcus faecium*. *Emerg. Infect. Dis.* **9**: 1108-1115.
- [109] **LEAVIS, H.L., BONTEN, M.J., WILLEMS, R.J.** (2006) Identification of high-risk enterococcal clonal complexes: global dispersion and antibiotic resistance. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**: 454-460.
- [110] **LECLERCQ, R., DERLOT, E., DUVAL, J., COURVALIN, P.** (1988) Plasmidmediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *New Engl. J. Med.* **319**: 157-161.
- [111] **LECLERCQ, R., COURVALIN, P.** (1997) Resistance to glycopeptides in enterococci. *Clin. Infect. Dis.* **24**: 545-554.
- [112] **LESTER, C.H., FRIMODT-MOLLER, N., SORENSEN, T.L., MONNET, D.L., HAMMERUM, A.M.** (2006) In vivo transfer of the vanA resistance gene from an *Enterococcus faecium* isolate of animal origin to an *E. faecium* isolate of human origin in the intestines of human volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**: 596-599.
- [113] **LIM, S.K., KIM, T.S., LEE, H.S., NAM, H.M., JOO, Y.S., KOH, H.B.** (2006) Persistence of vanA-type *Enterococcus faecium* in Korean livestock after ban on avoparcin. *Microb. Drug Resist.* **12**: 136-139.

- [114] **LIU, D.S., ASTUMIAN, R.D., TSONG, T.Y.** (1990)  
Activation of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> pumping modes of (Na,K)-ATPase by an oscillating electric field. *J. Biol. Chem.* **265**: 7260-7267.
- [115] **LIU, X., YOUSEF, A.E., CHISM, G.W.** (1997)  
Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 by the combination of organic acids and pulsed electric fields. *J. Food Safety* **16**: 287-299.
- [116] **MARTINEZ-MURCIA, A.J., COLLINS, M.D.** (1991)  
*Enterococcus sulfureus*, a new yellow-pigmented *Enterococcus* species. *FEMS Microbiol. Lett.* **80**: 69-74.
- [117] **MARTINEZ, S., LOPEZ, M., BERNARDO, A.** (2003).  
Thermal inactivation of *Enterococcus faecium*: effect of growth temperature and physiological state of microbial cells. *Lett. Appl. Microbiol.* **37**: 475–481.
- [118] **MARTINS DA COSTA, P., VAZ-PIRES, P., BERNARDO, F.** (2006)  
Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. isolated in inflow, effluent and sludge from municipal sewage water treatment plants. *Water Res.* **40**: 1735-1740.
- [119] **MARTONE, W.J.** (1998)  
Spread of Vancomycin-resistant Enterococci: Why did it happen in the United States? *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **19**: 539-545.
- [120] **MAZUREK, B., LUBICKI, P., STARONIEWICZ, Z.** (1995)  
Effect of short HV pulses on bacteria and fungi. *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation* **2**: 418-425.
- [121] **MIRANDA, A.G., SINGH, K.V., MURRAY, B.E.** (1991)  
DNA fingerprinting of *Enterococcus faecium* by pulsed-field gel electrophoresis may be a useful epidemiologic tool. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 2752-2757.
- [122] **MOELLERING, R.C.** (1998)  
Vancomycin-resistant enterococci. *Clin. Infect. Dis.* **26**:1196-1199.
- [123] **MORRISON, D., WOODFORD, N., BARRETT, P., SISSON, P., COOKSON, B.D.** (1999) DNA banding pattern polymorphism in Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and criteria for defining strains. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 1084-1091.
- [124] **MURRAY, B.E.** (1990)  
The life and times of the *Enterococcus*. *Clin. Microbiol. Rev.* **3**: 46-65.
- [125] **MURRAY, B.E.** (2000)  
Vancomycin-resistant enterococcal infections. *N. Engl. J. Med.* **342**: 710-721.

- [126] **NAAS, T., FORTINEAU, N., SNANOUDJ, R., SPICQ, C., DURRBACH, A., NORDMANN, P.** (2005) First nosocomial outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* expressing a vanD-like phenotype associated with a vanA genotype. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 3642-3649.
- [127] **NASER, S.M., VANCANNEYT, M., DE GRAEF, E., DEVRIESE, L.A., SNAUWAERT, C., LEFEBVRE, K., HOSTE, B., SVEC, P., DECOSTERE, A., HAESBROUCK, F., SWINGS, J.** (2005) *Enterococcus canintestini* sp. nov., from faecal samples of healthy dogs. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 2177-2182.
- [128] **NASER, S.M., VANCANNEYT, M., HOSTE, B., SNAUWAERT, C., VANDEMEULEBROECKE, K., SWINGS, J.** (2006) Reclassification of *Enterococcus flavescens* Pompei et al. 1992 as a later synonym of *Enterococcus casseliflavus* (ex Vaughan et al. 1979) Collins et al. 1984 and *Enterococcus saccharominimus* Vancanneyt et al. 2004 as a later synonym of *Enterococcus italicus* Fortina et al. 2004. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 413-416.
- [129] **NEU, J.C., KRASSOWSKA, W.** (1999) Asymptotic model of electroporation. *Phys. Rev. E.* **59**: 3471-3482.
- [130] **NICHOL, K.A., SILL, M., LAING, N.M., JOHNSON, J.L., HOBAN, D.J., ZHANEL, G.G.** (2006) Molecular epidemiology of urinary tract isolates of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from North America. *Int. J. Antimicrob. Agents* **27**: 392-396.
- [131] **NOVAIS, C., COQUE, T.M., FERREIRA, H., SOUSA, J.C., PEIXE, L.** (2005) Environmental contamination with vancomycin-resistant enterococci from hospital sewage in Portugal. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 3364-3368.
- [132] **NOVAIS, C., COQUE, T.M., SOUSA, J.C., PEIXE, L.V.** (2006) Antimicrobial resistance among faecal enterococci from healthy individuals in Portugal. *Clin. Microbiol. Infect.* **12**: 1131-1134.
- [133] **OH, J.Y., AN, S., JIN, J.S., LEE, Y.C., CHO, D.T., LEE, J.C.** (2007) Phenotypic and genotypic differences of the vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from humans and poultry in Korea. *J. Microbiol.* **45**: 466-472.
- [134] **OXOID Handbuch** (2003)  
6. aktualisierte deutsche Auflage , Oxoid GmbH, Wesel
- [135] **PANGALLO, D., DRAHOVSKÁ, H., HARICHOVÁ, J., KARELOVÁ, E., CHOVANOVÁ, K., FERIANC, P., TURNA, J., TIMKO, J.** (2008) Assessment of environmental enterococci: bacterial antagonism, pathogenic capacity and antibiotic resistance. *Antonie Van Leeuwenhoek* **94**: 555-562.



- [136] **POL, I.E., MASTWIJK, H.C., BARTELS, P.V., SMID, E.J.** (2000) Pulsed-electric field treatment enhances the bactericidal action of nisin against *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 428-430.
- [137] **POMPEI, R., BERLUTTI, F., THALLER, M.C., INGIANNI, A., CORTIS, G., DAINELLI, B.** (1992) *Enterococcus flavescens* sp. nov., a new species of enterococci of clinical origin. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**: 365-369.
- [138] **POTHAKAMURY, U.R., VEGA, H., ZHANG, Q., BARBOSA-CANOVAS, G.V., SWANSON, B.G.** (1996) Effect of growth stage and processing temperature on the inactivation of *E. coli* by pulsed electric fields. *J. Food Protect.* **59**: 1167-1171.
- [139] **POURSHAFIE, M.R., TALEBI, M., SAIFI, M., KATOULI, M., ESHRAGHI, S., KÜHN, I., MÖLLBY, R.** (2008) Clonal heterogeneity of clinical isolates of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* with unique vanS. *Trop. Med. Int. Health.* **13**: 722-727.
- [140] **PUÉRTOLAS, E., LÓPEZ, N., CONDÓN, S., RASO, J., ALVAREZ, I.** (2009) Pulsed electric fields inactivation of wine spoilage yeast and bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **130**: 49-55.
- [141] **QU, T.T., ZHANG, J.L., ZHOU, Z.H., WEI, Z.Q., YU, Y.S., CHEN, Y.G., LI, L.J.** (2009) Heteroresistance to teicoplanin in *Enterococcus faecium* harboring the vanA gene. *J. Clin. Microbiol.* **47**: 4194-4196.
- [142] **QUEDNAU, M., AHRNE, S., MOLIN, G.** (1999) Genomic relationships between *Enterococcus faecium* strains from different sources and with different antibiotic resistance profiles evaluated by restriction endonuclease analysis of total chromosomal DNA using EcoRI and PvuII. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1777-1780.
- [143] **REINERT, R.R., CONRADS, G., SCHLAEGER, J.J., WERNER, G., WITTE, W., LÜTTICKEN, R., KLARE, I.** (1999) Survey of antibiotic resistance among enterococci in North Rhine-Westphalia, Germany. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 1638-1641.
- [144] **RIEDER, A., SCHWARTZ, T., SCHÖN-HÖLZ, K., MARTEN, S.M., SÜSS, J., GUSBETH, C., KOHNEN, W., SWOBODA, W., OBST, U., FREY, W.** (2008) Molecular monitoring of inactivation efficiencies of bacteria during pulsed electric field treatment of clinical wastewater. *J. Appl. Microbiol.* **105**: 2035-2045.
- [145] **RIVAS, A., RODRIGO, D., MARTÍNEZ, A., BARBOSA-CÁNOVAS, G.V., RODRIGO, M.** (2006) Effect of PEF and heat pasteurization on the physical-chemical characteristics of blended orange and carrot juice. *LWT-Food Sci. Technol.* **39**: 1163-1170.

- [146] **ROBERTS, M.C., SOGE, O.O., GIARDINO, M.A., MAZENGA, E., MA, G., MESCHKE, J.S.** (2009)  
Vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. in marine environments from the West Coast of the USA. *J. Appl. Microbiol.* **107**: 300-307.
- [147] **RODRIGUES, U., COLLINS, M.D.** (1990)  
Phylogenetic analysis of *Streptococcus saccharolyticus* based on 16S rRNA sequencing. *FEMS Microbiol. Lett.* **71**: 231-234.
- [148] **RODRÍGUEZ-CALLEJA, J.M., CEBRIÁN, G., CONDÓN, S., MAÑAS, P.** (2006)  
Variation in resistance of natural isolates of *Staphylococcus aureus* to heat, pulsed electric field and ultrasound under pressure. *J. Appl. Microbiol.* **100**: 1054-1062.
- [149] **RUOFF, K.L., DE LA MAZA, L., MURTAGH, M.J., SPARGO, J.D., FERRARO, M.J.** (1990)  
Species identities of enterococci isolated from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 435-437.
- [150] **SABIA, C., MANICARDI, G., MESSI, P., DE NIEDERHÄUSERN, S., BONDI, M.** (2002)  
Enterocin 416K1, an antilisterial bacteriocin produced by *Enterococcus casseliflavus* IM 416K1 isolated from Italian sausages. *Int. J. Food Microbiol.* **75**: 163-170.
- [151] **SAHLSTRÖM, L., REHBINDER, V., ALBIHN, A., ASPAN, A., BENGTSSON, B.** (2009)  
Vancomycin resistant enterococci (VRE) in Swedish sewage sludge. *Acta Vet. Scand.* **51**: 24.
- [152] **SAIFI, M., POURSHAFIE, M.R., DALLAL, M.M., KATOULI, M.** (2009)  
Clonal groups of high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecium* isolated from municipal wastewater and clinical samples in Tehran, Iran. *Lett. Appl. Microbiol.* **49**: 160-165.
- [153] **SALE, A.J.H., HAMILTON, W.A.** (1967)  
Effects of high electric fields on microorganisms. I. Killing of bacteria and yeasts. *Biochim. Biophys. Acta.* **148**: 781-788.
- [154] **SALE, A.J., HAMILTON, W.A.** (1968)  
Effects of high electric fields on micro-organisms III. Lysis of erythrocytes and protoplasts. *Biochim. Biophys. Acta.* **163**: 37-43.
- [155] **SCHLEIFER, K.H., KILPPER-BÄLZ, R.** (1984)  
Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* norn. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int. J. Syst. Bact.* **34**: 31-34.
- [156] **SCHOENBACH, K.H., PETERKIN, F.E., ALDEN, R.W., BEEBE, S.J.** (1997)  
The effect of pulsed electric fields on biological cells: experiments and applications. *IEEE (Inst. Electr. Electron. Eng.) Trans. Plasma Sci.* **25**: 284-293.

- [157] **SCHOUTEN, M.A., HOOBKAMP-KONSTANTJE, J.A.A., MEIS, J.F.G., VOSS, A., THE EUROPEAN VRE STUDY GROUP** (2000)  
Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Europe.  
*Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **19**: 816-822.
- [158] **SCHWARTZ, D.C., CANTOR, C.R.** (1984)  
Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell.* **37**: 67-75.
- [159] **SCHWARTZ, T., KOHNEN, W., JANSEN, B., OBST, U.** (2003)  
Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms.  
*FEMS Microbiol. Ecol.* **43**: 325-335.
- [160] **SHANKAR, V., BAGHDAYAN, A.S., HUYCKE, M.M., LINDAHL, G., GILMORE, M.S.** (1999) Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in esp, a gene encoding a novel surface protein.  
*Infect. Immun.* **67**: 193–200.
- [161] **SHERMAN, J.M.** (1937)  
The streptococci. *Bacteriol. Rev.* **1**: 3-97.
- [162] **SIRIVEDHIN, T., GRAY, K.** (2005)  
Comparison of the disinfection by-product formation potentials between a wastewater effluent and surface waters. *Water Res.* **39**: 1025-1036.
- [163] **SÖRQVIST, S.** (2003)  
Heat resistance in liquids of *Enterococcus* spp., *Listeria* spp., *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp.  
*Acta Vet. Scand.* **44**: 1-19.
- [164] **SORUM, M., JOHNSEN, P.J., AASNES, B., ROSVOLL, T., KRUSE, H., SUNDSFJORD, A., SIMONSEN, G.S.** (2006)  
Prevalence, persistence, and molecular characterization of glycopeptideresistant enterococci in Norwegian poultry and poultry farmers 3–8 years after the ban on avoparcin. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 516-521.
- [165] **STANLEY, D.W.** (1991)  
Biological membrane deterioration and associated quality losses in food tissues. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **30**: 487-553.
- [166] **STROMMINGER, B., CUNY, C., WERNER, G., WITTE, W.** (2004)  
Obvious lack of association between dynamics of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in central Europe and agr specificity groups.  
*Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **23**: 15-19.
- [167] **SUKONTASING, S., TANASUPAWAT, S., MOONMANGMEE, S., LEE, J.S., SUZUKI, K.** (2007)  
*Enterococcus camelliae* sp. nov., isolated from fermented tea leaves in Thailand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**: 2151-2154.

- [168] **SUPPOLA, J.P., KOLHO, E., SALMENLINNA, S., TARKKA, E., VUOPIO-VARKILA, J., VAARA, M.** (1999)  
vanA and vanB incorporate into an endemic Ampicillin-resistant Vancomycin-sensitive *Enterococcus faecium* strain: Effect on interpretation of clonality. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 3934-3939.
- [169] **SVEC, P., SEDLACEK, I.** (1999)  
Occurrence of *Enterococcus* spp. in waters. *Folia Microbiol. (Praha)*. **44**: 3-10.
- [170] **SVEC, P., DEVRIESE, L.A., SEDLÁČEK, I., BAELE, M., VANCANNEYT, M., HAESBROUCK, F., SWINGS, J., DOSKAR, J.** (2001)  
*Enterococcus haemoperoxidus* sp. nov. and *Enterococcus moraviensis* sp. nov., isolated from water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 1567-1574.
- [171] **SVEC, P., VANCANNEYT, M., DEVRIESE, L.A., NASER, S.M., SNAUWAERT, C., LEFEBVRE, K., HOSTE, B., SWINGS, J.** (2005)  
*Enterococcus aquimarinus* sp. nov., isolated from sea water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 2183-2187.
- [172] **SVEC, P., VANCANNEYT, M., KOORT, J., NASER, S.M., HOSTE, B., VIHAVAINEN, E., VANDAMME, P., SWINGS, J., BJÖRKROTH, J.** (2005)  
*Enterococcus devriesei* sp. nov., associated with animal sources. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 2479-2484.
- [173] **SVEC, P., VANCANNEYT, M., SEDLÁČEK, I., NASER, S.M., SNAUWAERT, C., LEFEBVRE, K., HOSTE, B., SWINGS, J.** (2006)  
*Enterococcus silesiacus* sp. nov. and *Enterococcus termitis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 577-581.
- [174] **TALEBI, M., RAHIMI, F., KATOULI, M., MÖLLBY, R., POURSHAFIE, M.R.** (2008)  
Epidemiological link between wastewater and human vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates. *Curr. Microbiol.* **56**: 468-473.
- [175] **TANASUPAWAT, S., SUKONTASING, S., LEE, J.S.** (2008)  
*Enterococcus thailandicus* sp. nov., isolated from fermented sausage ('mum') in Thailand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**: 1630-1634.
- [176] **TANSUPHASIRI, U., KHAMINTHAKUL, D., PANDII, W.** (2006)  
Antibiotic resistance of enterococci isolated from frozen foods and environmental water. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* **37**: 162-170.
- [177] **TEISSIE, J., ROLS, M.P.** (1993)  
An experimental evaluation of the critical potential difference inducing cell membrane electropermeabilization. *Biophys. J.* **65**: 409-413.
- [178] **TEISSIE, J., GOLZIO, M., ROLS, M.P.** (2005)  
Mechanisms of cell membrane electropermeabilization: a minireview of our present (lack of ?) knowledge. *Biochim. Biophys. Acta* **1724**: 270-280.

- [179] **TEIXEIRA, L.M., CARVALHO, M.G., ESPINOLA, M.M., STEIGERWALT, A.G., DOUGLAS, M.P., BRENNER, D.J., FACKLAM, R.R.** (2001) *Enterococcus porcinus* sp. nov. and *Enterococcus ratti* sp. nov., associated with enteric disorders in animals. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 1737-1743.
- [180] **TENOVER, F.C., ARBEIT, R.D., GOERING, R.V., MICKELSEN, P.A., MURRAY, B.E., PERSING, D.H., SWAMINATHAN, B.** (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 2233-2239.
- [181] **TEREBIZNIK, M.R., JAGUS, R.J., CERRUTTI, P., DE HUERGO, M.S., PILOSO, A.M.** (2000) Combined effect of nisin and pulsed electric fields on the inactivation of *Escherichia coli*. *J. Food Prot.* **63**: 741-746.
- [182] **TOP, J., WILLEMS, R., BLOK, H., DE REGT, M., JALINK, K., TROELSTRA, A., GOORHUIS, B., BONTEN, M.** (2007) Ecological replacement of *Enterococcus faecalis* by multiresistant clonal complex 17 *Enterococcus faecium*. *Clin. Microbiol. Infect.* **13**: 316-319.
- [183] **TORELL, E., KÜHN, I., OLSSON-LILJEQUIST, B., HAEGGMAN, S., HOFFMAN, B., LINDAHL, C., BURMAN, L.G.** (2003) Clonality among ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* isolates in Sweden and relationship with ciprofloxacin resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* **9**: 1011-1019.
- [184] **TREITMAN, A.N., YARNOLD, P.R., WARREN, J., NOSKIN, G.A.** (2005) Emerging incidence of *Enterococcus faecium* among hospital isolates (1993 to 2002). *J. Clin. Microbiol.* **43**: 462-463.
- [185] **TSONG, T.Y.** (1991) Electroporation of cell membranes. *Biophys. J.* **60**: 297-306.
- [186] **TYRRELL, G.J., TURNBULL, L., TEIXEIRA, L.M., LEFEBVRE, J., CARVALHO, M.G.S., FACKLAM, R.R., LOVGREN, M.** (2002) *Enterococcus gilvus* sp. nov. and *Enterococcus pallens* sp. nov. isolated from human clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 1140-1145.
- [187] **UTTLEY, A., COLLINS, C., NAIDOO, J., GEORGE, R.** (1988) Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet.* **1**: 57-58.
- [188] **VANCANNEYT, M., SNAUWAERT, C., CLEENWERCK, I., BAELE, M., DESCHEEMAEKER, P., GOOSSENS, H., POT, B., VANDAMME, P., SWINGS, J., HAESBROUCK, F., DEVRIESE, L.A.** (2001) *Enterococcus villorum* sp. nov., an enteroadherent bacterium associated with diarrhoea in piglets. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 393-400.

- [189] **VANCANNEYT, M., LOMBARDI, A., ANDRIGHETTO, C., KNIJFF, E., TORRIANI, S., BJÖRKROTH, K.J., FRANZ, C.M.A.P., FOULQUIÉ MORENO, M.R., REVETS, H., DE VUYST, L., SWINGS, J., KERSTERS, K., DELLAGLIO, F., HOLZAPFEL, W. H.** (2002) Intraspecies genomic groups in *Enterococcus faecium* and their correlation with origin and pathogenicity. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 1381-1391.
- [190] **VANCANNEYT, M., ZAMFIR, M., DEVRIESE, L.A., LEFEBVRE, K., ENGELBEEN, K., VANDEMEULEBROECKE, K., AMAR, M., DE VUYST, L., HAESBROUCK, F., SWINGS, J.** (2004) *Enterococcus saccharominimus* sp. nov., from dairy products. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 2175-2179.
- [191] **VEGA-MERCADO, H., MARTIN-BELLOSO, O., CHANG, F.-J., BARBOSA-CANOVAS, G.V., SWANSON, B.G.** (1996) Inactivation of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* suspended in pea soup using pulsed electric fields. *J. Food Proc. Pres.* **20**: 501-510.
- [192] **VOLKMANN, H., SCHWARTZ, T., BISCHOFF, P., KIRCHEN, S., OBST, U.** (2004) Detection of clinically relevant antibiotic-resistance genes in municipal wastewater using real-time PCR (TaqMan). *J. Microbiol. Methods* **56**: 277-286.
- [193] **WALLRAUCH, C., ELSNER, E., MILATOVIC, D., CREMER, J., BRAVENY, I.** (1997) Antibiotikaresistenz der Enterokokken in Deutschland. *Med. Klin.* **92**: 464-468.
- [194] **WEAVER, J.C., YU, A., CHIZMADZHEV, B.** (1996) Theory of electroporation: A review. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **41**: 135-160.
- [195] **WERNER, G., WILLEMS, R.J.L., HILDEBRANDT, B., KLARE, I., WITTE, W.** (2003) Influence of transferable genetic determinants on the outcome of typing methods commonly used for *Enterococcus faecium*. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 1499-1506.
- [196] **WERNER, G., KLARE, I., WITTE, W.** (2007) The current MLVA typing scheme for *Enterococcus faecium* is less discriminatory than MLST and PFGE for epidemic-virulent, hospital-adapted clonal types. *BMC Microbiol.* **7**: 28.
- [197] **WERNER, G., KLARE, I., FLEIGE, C., WITTE, W.** (2008) Increasing rates of vancomycin resistance among *Enterococcus faecium* isolated from German hospitals between 2004 and 2006 are due to wide clonal dissemination of vancomycin-resistant enterococci and horizontal spread of vanA clusters. *Int. J. Med. Microbiol.* **298**: 515-527.

- [198] **WERNER, G., COQUE, T.M., HAMMERUM, A.M., HOPE, R., HRYNIEWICZ, W., JOHNSON, A., KLARE, I., KRISTINSSON, K.G., LECLERCQ, R., LESTER, C.H., LILLIE, M., NOVAIS, C., OLSSON-LILJEQUIST, B., PEIXE, L.V., SADOWY, E., SIMONSEN, G.S., TOP, J., VUOPIO-VARKILA, J., WILLEMS, R.J., WITTE, W., WOODFORD, N.** (2008) Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Eurosurveillance* **13**: 1-11.
- [199] **WILLEMS, R.J.L., TOP, J., VAN DEN BRAAK, N., VAN BELKUM, A., ENDTZ, H., MEVIUS, D., STOBBERINGH, E., VAN DEN BOGAARD, A., VAN EMBDEN, J.D.A.** (2000) Host specificity of Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J. Infect. Dis.* **182**: 816-823.
- [200] **WILLEMS, R.J., TOP, J., VAN SANTEN, M., ROBINSON, D.A., COQUE, T.M., BAQUERO, F., GRUNDMANN, H., BONTEN, M.J.** (2005) Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. *Emerg. Infect. Dis.* **11**: 821-828.
- [201] **WILLEMS, R.J., BONTEN, M.J.** (2007) Glycopeptide-resistant enterococci: deciphering virulence, resistance and epidemicity. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **20**: 384-390.
- [202] **WILLIAMS, A.M., FARROW, J.A.E., COLLINS, M.D.** (1989) Reverse transcriptase sequencing of 16S ribosomal RNA from *Streptococcus cecorum*. *Lett. Appl. Microbiol.* **8**: 185-189.
- [203] **WITTE, W., KLARE, I.** (1995) Glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* outside hospitals: a commentary. *Microb. Drug Resist.* **1**: 259-264.
- [204] **WITTE, W., WIRTH, R., KLARE, I.** (1999) Enterococci. *Chemotherapy* **45**:135-145.
- [205] **WITTE, W., BRAULKE, C., CUNY, C., HEUCK, D., KRESKEN, M.** (2001) Changing pattern of antibiotic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from German hospitals. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* **22**: 683-686.
- [206] **WITTE, W., STROMMINGER, B., KLARE, I., WERNER, G.** (2004) Bakterielle Erreger von Krankenhausinfektionen mit besonderen Resistenzen und Multiresistenzen. *Bundesgesundheitsbl.–Gesundheitsforsch.–Gesundheitsschutz* **47**: 352-362.
- [207] **WOODFORD, N.** (1998) Glycopeptide-resistant enterococci: a decade of experience. *J. Med. Microbiol.* **47**: 849-862
- [208] **WOODFORD, N.** (2001) Epidemiology of the genetic elements responsible for acquired glycopeptide resistance in enterococci. *Microb. Drug Resist.* **7**: 229-236.

- [209] **WOUTERS, P.C., DUTREUX, N., SMELT, J.P., LELIEVELD, H.L.** (1999)  
Effects of pulsed electric fields on inactivation kinetics of *Listeria innocua*.  
*Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 5364-5371.
- [210] **WOUTERS, P.C., BOS, A.P., UECKERT, J.** (2001)  
Membrane permeabilization in relation to inactivation kinetics of *Lactobacillus*  
species due to pulsed electric fields.  
*Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 3092-3101.
- [211] **ZIMMERMANN, U., PILWAT, G., RIEMANN, F.** (1974)  
Dielectric breakdown of cell membranes. *Biophys. J.* **14**: 881-899.



## 8 Anhang

### 8.1 Verwandtschaftsanalyse der VREf

Dendrogrammgruppe	Isolate insgesamt	Untersch. PFGE-Muster	Isolierungsort der Isolate			Betroffene Patienten	
			Patienten	Abwasser	Oberflächenwasser		
A	1	19	17	4	3	12	5
	2	2	2	2	0	0	2
	3	4	4	3	0	1	6
	4	2	2	1	0	1	1
	5	2	2	1	1	0	1
	6	3	3	0	2	1	0
B	1	2	2	1	0	1	1
	2	2	2	0	2	0	0
	3	3	3	0	3	0	0
	4	4	3	0	3	1	0
	5	2	2	0	2	0	0
C	1	3	3	2	0	1	2
	2	2	2	1	0	1	1
	3	4	3	3	1	0	3
	4	3	3	2	1	0	4
	5	2	2	1	1	0	2
	6	4	4	4	0	0	6
	7	3	3	1	0	2	1
	8	54	50	28	9	17	59
	9	2	2	2	0	0	6
	10	3	3	2	1	0	2
	11	10	10	8	2	0	16
	12	2	2	1	0	1	1
	13	2	2	1	1	0	2
	14	2	1	1	1	0	1
	15	3	3	0	3	0	0
	16	2	2	1	0	1	1
	17	15	12	2	11	2	4
	18	2	2	0	0	2	0
	19	5	5	2	3	0	2
	20	12	10	4	3	5	33
D	1	30	29	3	5	22	3
	2	3	3	1	0	2	1
	3	2	2	1	0	1	2
	4	8	8	6	0	2	9
E	1	2	2	1	1	0	1
	2	2	2	0	0	2	0
F	1	2	2	0	2	0	0
	2	3	2	0	1	2	0
	3	2	2	0	1	1	0
G	1	3	3	0	3	0	0
H	1	2	2	0	2	0	0
I	1	2	2	0	0	2	0

Dendrogrammgruppe	Isolate insgesamt	Untersch. PFGE-Muster	Isolierungsort der Isolate			Betroffene Patienten
			Patienten	Abwasser	Oberflächenwasser	
J	1	2	1	1	0	1
K	1	2	0	2	0	0
L	1	7	2	1	4	3
	2	2	1	1	0	1
	3	3	2	0	1	1
	4	3	3	0	2	0
M	1	2	0	2	0	0
<b>PFGE-Muster außerhalb von Gruppen (einzeln):</b>						
	32	32	10	8	14	12
<b>gesamt</b>	294	273	106	85	103	196

Tab. A1: Verteilung der 294 VREf auf die 50 Dendrogrammgruppen (Gruppe A 1 bis M 1). Isolate in gleichen Dendrogrammgruppen besitzen untereinander eine Ähnlichkeit  $\geq 80\%$ . 32 Isolate konnten keiner Gruppe zugeordnet werden.

## 8.2 Daten der Elektroimpulsversuche

### 8.2.1 VRE 1

Ausgangskeimzahl auf Slanetz-Bartley-Agar (SLB):  $1,22E+07$  KBE/ml

Ausgangskeimzahl auf Enterococcosel-Agar (EC):  $2,03E+07$  KBE/ml

Spezifische Energie [J/ml]	Temp. Einlauf [°C]	Temp. Auslauf [°C]	Stromstärke [mA]	Impulse/Reaktorvolumen	SLB	SLB	EC	EC
					Keimzahl [KBE/ml]	Keimzahlreduktion [Log10]	Keimzahl [KBE/ml]	Keimzahlreduktion [Log10]
117	17	43	70	13,4	$1,06E+07$	$6,11E-02$	$1,00E+07$	$3,06E-01$
137	17	39,7	82	15,7	$4,04E+06$	$4,80E-01$	$4,00E+06$	$7,04E-01$
137	17	41,5	82	15,7	$4,50E+06$	$4,33E-01$	$4,00E+06$	$7,04E-01$
147	17	49,4	88	16,8	$4,00E+06$	$4,84E-01$	$4,00E+06$	$7,04E-01$
147	17	48	88	16,8	$4,50E+06$	$4,33E-01$	$4,00E+06$	$7,04E-01$
160	17	47	96	18,4	$3,91E+06$	$4,94E-01$	$3,00E+06$	$8,29E-01$
160	17	47,2	96	18,4	$4,00E+06$	$4,84E-01$	$3,00E+06$	$8,29E-01$
170	17	49,6	102	19,5	$6,30E+06$	$2,87E-01$	$2,77E+06$	$8,65E-01$
170	17	49,7	102	19,5	$7,00E+06$	$2,41E-01$	$2,70E+06$	$8,76E-01$
184	17	55,8	110	21	$5,00E+05$	$1,39E+00$	$5,00E+05$	$1,61E+00$
184	17	55,5	110	21	$5,00E+05$	$1,39E+00$	$5,00E+05$	$1,61E+00$
207	17	56,6	124	23,6	$2,45E+05$	$1,70E+00$	$3,00E+05$	$1,83E+00$
207	17	57	124	23,6	$3,44E+05$	$1,55E+00$	$3,00E+05$	$1,83E+00$
226	17	60,8	135	25,8	$4,93E+04$	$2,39E+00$	$5,50E+03$	$3,57E+00$
226	17	61,5	135	25,8	$5,07E+04$	$2,38E+00$	$5,50E+03$	$3,57E+00$
251	17	67	150	28,7	$5,50E+01$	$5,35E+00$	$1,00E+01$	$6,31E+00$
251	17	66,4	150	28,7	$4,75E+02$	$4,41E+00$	$2,50E+01$	$5,91E+00$
273	17	69,4	163	31,2	$9,00E+01$	$5,13E+00$	$2,03E+07$	$5,61E+00$
273	17	70	163	31,2	$3,00E+01$	$5,61E+00$	$1,00E+01$	$6,31E+00$

Tab. A2: Versuchsdaten VRE 1 vom 29.03.2007 (Leitfähigkeit des Abwassers:  $1595 \mu\text{S/cm}$ , Druck in der Funkenstrecke: 850 mA, Zündspannung: 49 kV).

**Ausgangskeimzahl auf Slanetz-Bartley-Agar (SLB): 1,86E+06 KBE/ml**

**Ausgangskeimzahl auf Enterococcosel-Agar (EC): 2,38E+06 KBE/ml**

					SLB	SLB	EC	EC
Spezifische Energie [J/ml]	Temp. Einlauf [°C]	Temp. Auslauf [°C]	Stromstärke [mA]	Impulse/Reaktorvolumen	Keimzahl [KBE/ml]	Keimzahlreduktion [Log10]	Keimzahl [KBE/ml]	Keimzahlreduktion [Log10]
61	36,1	47,8	32	5,3	1,99E+06	-2,93E-02	1,94E+06	8,88E-02
61	36	48,1	32	5,3	1,63E+06	5,73E-02	2,42E+06	-7,24E-03
84	35,7	52,2	44	7,3	2,10E+06	-5,27E-02	1,73E+06	1,39E-01
84	35,5	52,7	44	7,3	2,53E+06	-1,34E-01	8,87E+05	4,29E-01
116	35,1	59,7	61	10,1	1,92E+04	1,99E+00	7,10E+01	4,53E+00
116	34,9	60,2	61	10,1	2,50E+04	1,87E+00	1,00E+02	4,38E+00
137	34,8	64,7	72	12	2,25E+01	4,92E+00	9,00E+00	5,42E+00
137	34,7	65	72	12	9,00E+00	5,32E+00	3,00E+00	5,90E+00
150	34,3	68,3	79	13,1	3,00E+00	5,79E+00	5,00E+00	5,68E+00
150	34,3	68,3	79	13,1	4,00E+00	5,67E+00	1,00E+00	6,38E+00

**Tab. A3: Versuchsdaten VRE 1 vom 07.04.2008** (Leitfähigkeit des Abwassers: 1700 µS/cm, Druck in der Funkenstrecke: 850 mA, Zündspannung: 56,3 kV).

**Ausgangskeimzahl auf Slanetz-Bartley-Agar (SLB): 1,67E+06 KBE/ml**

**Ausgangskeimzahl auf Enterococcosel-Agar (EC): 2,19E+06 KBE/ml**

					SLB	SLB	EC	EC
Spezifische Energie [J/ml]	Temp. Einlauf [°C]	Temp. Auslauf [°C]	Stromstärke [mA]	Impulse/Reaktorvolumen	Keimzahl [KBE/ml]	Keimzahlreduktion [Log10]	Keimzahl [KBE/ml]	Keimzahlreduktion [Log10]
60	14	26	37	7,2	2,42E+06	-1,61E-01	1,63E+06	1,28E-01
60	14	26,7	37	7,2	2,31E+06	-1,41E-01	1,79E+06	8,76E-02
83	13,9	31,9	51	9,9	1,01E+06	2,18E-01	2,07E+06	2,45E-02
83	13,8	32	51	9,9	2,10E+06	-9,95E-02	1,56E+06	1,47E-01
117	13,7	38,8	72	14	1,04E+06	2,06E-01	1,30E+06	2,27E-01
117	13,7	39,2	72	14	1,28E+06	1,16E-01	5,30E+05	6,16E-01
137	13,7	43,1	84	16,3	9,85E+05	2,29E-01	9,13E+05	3,80E-01
137	13,7	44,2	84	16,3	5,97E+05	4,47E-01	4,20E+05	7,17E-01
150	13,7	46,6	92	17,9	6,76E+05	3,93E-01	2,60E+05	9,25E-01
150	13,6	46,9	92	17,9	1,01E+06	2,18E-01	3,73E+05	7,69E-01
166	13,6	49,8	102	19,8	5,20E+05	5,07E-01	2,24E+05	9,90E-01
166	13,7	50,2	102	19,8	5,17E+05	5,09E-01	1,53E+05	1,16E+00
187	13,6	53,3	115	22,3	3,32E+05	7,02E-01	3,92E+04	1,75E+00
187	13,6	54	115	22,3	3,70E+05	6,55E-01	4,27E+04	1,71E+00
210	13,6	59,1	129	25,1	1,23E+04	2,13E+00	2,39E+02	3,96E+00
210	13,5	59,4	129	25,1	1,40E+04	2,08E+00	2,69E+02	3,91E+00

**Tab. A4: Versuchsdaten VRE 1 vom 08.04.2008** (Leitfähigkeit des Abwassers: 1200 µS/cm, Druck in der Funkenstrecke: 550 mA, Zündspannung: 48,2 kV).

**Ausgangskeimzahl auf Slanetz-Bartley-Agar (SLB): 2,35E+06 KBE/ml**

**Ausgangskeimzahl auf Enterococcosel-Agar (EC): 3,63E+06 KBE/ml**

					SLB	SLB	EC	EC
Spezifische Energie [J/ml]	Temp. Einlauf [°C]	Temp. Auslauf [°C]	Stromstärke [mA]	Impulse/Reaktorvolumen	Keimzahl [KBE/ml]	Keimzahlreduktion [Log10]	Keimzahl [KBE/ml]	Keimzahlreduktion [Log10]
60	38,9	50,7	31	5,1	2,30E+06	9,34E-03	2,74E+06	1,22E-01
83	38,5	56,2	43	7	6,43E+05	5,63E-01	4,51E+05	9,06E-01
116	38,2	64,3	60	9,8	2,50E+01	4,97E+00	1,35E+01	5,43E+00

**Tab. A5: Versuchsdaten VRE 1 vom 23.04.2008** (Leitfähigkeit des Abwassers: 2200 µS/cm, Druck in der Funkenstrecke: 900 mA, Zündspannung: 57,3 kV).

**Ausgangskeimzahl auf Slanetz-Bartley-Agar (SLB): 2,87E+06 KBE/ml**

**Ausgangskeimzahl auf Enterococcosel-Agar (EC): 4,55E+06 KBE/ml**

					SLB	SLB	EC	EC
Spezifische Energie [J/ml]	Temp. Einlauf [°C]	Temp. Auslauf [°C]	Stromstärke [mA]	Impulse/Reaktorvolumen	Keimzahl [KBE/ml]	Keimzahlreduktion [Log10]	Keimzahl [KBE/ml]	Keimzahlreduktion [Log10]
23	40,9	45,1	14	2,7	1,76E+06	2,12E-01	3,67E+06	9,33E-02
68	40,9	55,2	41	7,8	2,30E+06	9,62E-02	2,05E+06	3,46E-01

**Tab. A6: Versuchsdaten VRE 1 vom 15.10.2008** (Leitfähigkeit des Abwassers: 1880 µS/cm, Druck in der Funkenstrecke: 550 mA, Zündspannung: 48,9 kV).

**Ausgangskeimzahl auf Slanetz-Bartley-Agar (SLB): 2,91E+06 KBE/ml**

**Ausgangskeimzahl auf Enterococcosel-Agar (EC): 4,06E+06 KBE/ml**

					SLB	SLB	EC	EC
Spezifische Energie [J/ml]	Temp. Einlauf [°C]	Temp. Auslauf [°C]	Stromstärke [mA]	Impulse/Reaktorvolumen	Keimzahl [KBE/ml]	Keimzahlreduktion [Log10]	Keimzahl [KBE/ml]	Keimzahlreduktion [Log10]
46	35,9	45,2	28	5,4	1,90E+06	1,85E-01	3,63E+06	4,86E-02
91	35,7	55,2	55	10,5	1,61E+06	2,57E-01	2,90E+06	1,46E-01

**Tab. A7: Versuchsdaten VRE 1 vom 15.10.2008** (Leitfähigkeit des Abwassers: 1697 µS/cm, Druck in der Funkenstrecke: 550 mA, Zündspannung: 48,9 kV).

**Ausgangskeimzahl auf Slanetz-Bartley-Agar (SLB): 4,10E+06 KBE/ml**

**Ausgangskeimzahl auf Enterococcosel-Agar (EC): 3,62E+06 KBE/ml**

					SLB	SLB	EC	EC
Spezifische Energie [J/ml]	Temp. Einlauf [°C]	Temp. Auslauf [°C]	Stromstärke [mA]	Impulse/Reaktorvolumen	Keimzahl [KBE/ml]	Keimzahlreduktion [Log10]	Keimzahl [KBE/ml]	Keimzahlreduktion [Log10]
68	30,1	45,2	41	7,9	2,99E+06	1,37E-01	3,05E+06	7,44E-02
109	30	55,1	66	12,7	1,68E+06	3,87E-01	2,56E+06	1,50E-01

**Tab. A8: Versuchsdaten VRE 1 vom 15.10.2008** (Leitfähigkeit des Abwassers: 1530 µS/cm, Druck in der Funkenstrecke: 550 mA, Zündspannung: 48,8 kV).

**Ausgangskeimzahl auf Slanetz-Bartley-Agar (SLB): 3,00E+06 KBE/ml**

**Ausgangskeimzahl auf Enterococcosel-Agar (EC): 4,20E+06 KBE/ml**

					SLB	SLB	EC	EC
Spezifische Energie [J/ml]	Temp. Einlauf [°C]	Temp. Auslauf [°C]	Stromstärke [mA]	Impulse/Reaktorvolumen	Keimzahl [KBE/ml]	Keimzahlreduktion [Log10]	Keimzahl [KBE/ml]	Keimzahlreduktion [Log10]
90	25,1	45,1	55	10,6	3,13E+06	-1,84E-02	3,53E+06	7,55E-02
129	25,1	55	79	15,2	2,39E+06	9,87E-02	2,22E+06	2,77E-01

**Tab. A9: Versuchsdaten VRE 1 vom 15.10.2008** (Leitfähigkeit des Abwassers: 1501 µS/cm, Druck in der Funkenstrecke: 550 mA, Zündspannung: 48,6 kV).

**Ausgangskeimzahl auf Slanetz-Bartley-Agar (SLB): 3,80E+06 KBE/ml**

**Ausgangskeimzahl auf Enterococcosel-Agar (EC): 4,24E+06 KBE/ml**

					SLB	SLB	EC	EC
Spezifische Energie [J/ml]	Temp. Einlauf [°C]	Temp. Auslauf [°C]	Stromstärke [mA]	Impulse/Reaktorvolumen	Keimzahl [KBE/ml]	Keimzahlreduktion [Log10]	Keimzahl [KBE/ml]	Keimzahlreduktion [Log10]
109	20,6	45,4	66	12,7	3,16E+06	8,01E-02	2,72E+06	1,93E-01
152	20,5	55,2	92	17,7	1,33E+06	4,56E-01	1,15E+06	5,67E-01

**Tab. A10: Versuchsdaten VRE 1 vom 15.10.2008** (Leitfähigkeit des Abwassers: 1439 µS/cm, Druck in der Funkenstrecke: 550 mA, Zündspannung: 48,9 kV).

**Ausgangskeimzahl auf Slanetz-Bartley-Agar (SLB): 3,58E+06 KBE/ml**

**Ausgangskeimzahl auf Enterococcosel-Agar (EC): 3,74E+06 KBE/ml**

					SLB	SLB	EC	EC
Spezifische Energie [J/ml]	Temp. Einlauf [°C]	Temp. Auslauf [°C]	Stromstärke [mA]	Impulse/Reaktorvolumen	Keimzahl [KBE/ml]	Keimzahlreduktion [Log10]	Keimzahl [KBE/ml]	Keimzahlreduktion [Log10]
137	13,5	45,1	84	16,2	2,01E+06	2,51E-01	2,67E+06	1,46E-01
173	13,6	55,1	108	21	1,30E+06	4,40E-01	1,42E+06	4,21E-01

**Tab. A11: Versuchsdaten VRE 1 vom 15.10.2008** (Leitfähigkeit des Abwassers: 1080 µS/cm, Druck in der Funkenstrecke: 550 mA, Zündspannung: 48,3 kV).

## 8.2.2 VRE 2

**Ausgangskeimzahl auf Slanetz-Bartley-Agar (SLB): 3,48E+06 KBE/ml**

**Ausgangskeimzahl auf Enterococcosel-Agar (EC): 5,09E+06 KBE/ml**

					SLB	SLB	EC	EC
Spezifische Energie [J/ml]	Temp. Einlauf [°C]	Temp. Auslauf [°C]	Stromstärke [mA]	Impulse/Reaktorvolumen	Keimzahl [KBE/ml]	Keimzahlreduktion [Log10]	Keimzahl [KBE/ml]	Keimzahlreduktion [Log10]
83	39,4	52,8	42	6,6	7,30E+04	1,68E+00	1,85E+05	1,44E+00
83	39,3	53,7	42	6,6	1,90E+05	1,26E+00	2,40E+05	1,33E+00
117	39	59,8	58	9,1	9,00E+00	5,59E+00	kein Wachstum	-
117	38,8	60,1	58	9,1	1,10E+01	5,50E+00	kein Wachstum	-

**Tab. A12: Versuchsdaten VRE 2 vom 18.09.2007** (Leitfähigkeit des Abwassers: 1240 µS/cm, Druck in der Funkenstrecke: 900 mA, Zündspannung: 59,6 kV).

**Ausgangskeimzahl auf Slanetz-Bartley-Agar (SLB): 2,71E+06 KBE/ml**

**Ausgangskeimzahl auf Enterococcosel-Agar (EC): 1,72E+06 KBE/ml**

					SLB	SLB	EC	EC
Spezifische Energie [J/ml]	Temp. Einlauf [°C]	Temp. Auslauf [°C]	Stromstärke [mA]	Impulse/Reaktorvolumen	Keimzahl [KBE/ml]	Keimzahlreduktion [Log10]	Keimzahl [KBE/ml]	Keimzahlreduktion [Log10]
83	19,3	33,1	43	7	4,90E+05	7,43E-01	7,70E+05	3,49E-01
83	19,4	34	43	7	5,60E+05	6,85E-01	5,50E+05	4,95E-01
117	19,4	40,3	60	9,8	5,10E+05	7,25E-01	2,90E+05	7,73E-01
117	19,4	41,5	60	9,8	3,80E+05	8,53E-01	2,50E+05	8,38E-01
137	19,4	46	71	11,6	1,80E+05	1,18E+00	6,60E+04	1,42E+00
137	19,4	46,6	71	11,6	1,90E+05	1,15E+00	8,10E+04	1,33E+00
151	19,4	49	78	12,8	1,20E+05	1,35E+00	4,10E+04	1,62E+00
151	19,4	49,5	78	12,8	1,30E+05	1,32E+00	3,60E+04	1,68E+00
165	19,4	52,2	85	13,9	3,40E+04	1,90E+00	7,40E+03	2,37E+00
165	19,4	52,5	85	13,9	2,40E+04	2,05E+00	5,00E+03	2,54E+00
203	19,4	58	105	17,2	1,90E+02	4,15E+00	7,60E+01	4,35E+00
203	19,4	58,6	105	17,2	1,80E+02	4,18E+00	5,70E+01	4,48E+00

**Tab. A13: Versuchsdaten VRE 2 vom 19.09.2007** (Leitfähigkeit des Abwassers: 1164 µS/cm, Druck in der Funkenstrecke: 800 mA, Zündspannung: 57,2 kV).

**Ausgangskeimzahl auf Slanetz-Bartley-Agar (SLB): 2,17E+06 KBE/ml**

**Ausgangskeimzahl auf Enterococcosel-Agar (EC): 1,34E+06 KBE/ml**

					SLB	SLB	EC	EC
Spezifische Energie [J/ml]	Temp. Einlauf [°C]	Temp. Auslauf [°C]	Stromstärke [mA]	Impulse/Reaktorvolumen	Keimzahl [KBE/ml]	Keimzahlreduktion [Log10]	Keimzahl [KBE/ml]	Keimzahlreduktion [Log10]
60	9,2	20,6	46	11,1	1,16E+06	2,72E-01	8,70E+05	1,88E-01
60	9,2	21,4	46	11,1	1,35E+06	2,06E-01	8,40E+05	2,03E-01
83	9,2	26,1	64	15,5	5,03E+05	6,35E-01	3,83E+05	5,44E-01
83	9,2	26,6	64	15,5	4,73E+05	6,62E-01	4,00E+05	5,25E-01
116	9,2	32,6	89	21,6	2,75E+05	8,97E-01	2,90E+05	6,65E-01
116	9,2	33,6	89	21,6	2,26E+05	9,82E-01	2,95E+05	6,57E-01
136	9,3	37,4	104	25,3	1,79E+05	1,08E+00	1,63E+05	9,15E-01
136	9,3	37,4	104	25,3	3,19E+05	8,33E-01	1,60E+05	9,23E-01
150	9,3	41,1	115	27,8	2,83E+05	8,85E-01	1,30E+05	1,01E+00
150	9,3	41,2	115	27,8	1,45E+05	1,18E+00	6,25E+04	1,33E+00
166	9,3	44,8	127	30,9	1,06E+05	1,31E+00	3,83E+04	1,54E+00
166	9,3	45,1	127	30,9	2,86E+05	8,80E-01	1,20E+05	1,05E+00
201	9,3	51,7	154	37,5	5,10E+04	1,63E+00	1,10E+04	2,09E+00
201	9,3	51,7	154	37,5	2,59E+04	1,92E+00	6,75E+03	2,30E+00

**Tab. A14: Versuchsdaten VRE 2 vom 19.02.2008** (Leitfähigkeit des Abwassers: 1500 µS/cm, Druck in der Funkenstrecke: 200 mA, Zündspannung: 38,6 kV).

## 8.2.3 VRE 7

**Ausgangskeimzahl auf Slanetz-Bartley-Agar (SLB): 2,61E+06 KBE/ml**

**Ausgangskeimzahl auf Enterococcosel-Agar (EC): 3,12E+06 KBE/ml**

					SLB	SLB	EC	EC
Spezifische Energie [J/ml]	Temp. Einlauf [°C]	Temp. Auslauf [°C]	Stromstärke [mA]	Impulse/Reaktorvolumen	Keimzahl [KBE/ml]	Keimzahlreduktion [Log10]	Keimzahl [KBE/ml]	Keimzahlreduktion [Log10]
40	31,5	39,5	23	4,2	2,72E+06	-1,79E-02	2,36E+06	1,21E-01
61	31	44,2	35	6,4	1,34E+06	2,90E-01	9,10E+05	5,35E-01
75	30,7	47,4	43	7,8	1,39E+06	2,74E-01	2,83E+05	1,04E+00
90	30,5	51	52	9,5	1,03E+05	1,40E+00	1,27E+04	2,39E+00
104	30,2	54,1	60	10,9	4,27E+03	2,79E+00	5,00E+02	3,80E+00
120	30,1	58,3	69	12,5	1,40E+01	5,27E+00	3,00E+00	6,02E+00
137	30	62,3	79	14,3	1,00E+00	6,42E+00	1,00E+00	6,49E+00

**Tab. A15: Versuchsdaten VRE 7 vom 10.03.2009** (Leitfähigkeit des Abwassers: 1818 µS/cm, Druck in der Funkenstrecke: 650 mA, Zündspannung: 51,5 kV).

**Ausgangskeimzahl auf Slanetz-Bartley-Agar (SLB): 2,92E+06 KBE/ml**

**Ausgangskeimzahl auf Enterococcosel-Agar (EC): 2,97E+06 KBE/ml**

					SLB	SLB	EC	EC
Spezifische Energie [J/ml]	Temp. Einlauf [°C]	Temp. Auslauf [°C]	Stromstärke [mA]	Impulse/Reaktorvolumen	Keimzahl [KBE/ml]	Keimzahlreduktion [Log10]	Keimzahl [KBE/ml]	Keimzahlreduktion [Log10]
60	12,6	25,1	38	7,6	3,58E+06	-8,85E-02	2,20E+06	1,30E-01
83	12,6	30,8	52	10,4	1,73E+06	2,27E-01	2,04E+06	1,63E-01
116	12,6	38,3	73	14,6	1,91E+06	1,84E-01	5,87E+05	7,04E-01
136	12,6	43,1	86	17,1	1,07E+06	4,36E-01	1,92E+05	1,19E+00
151	12,6	46,5	95	19	3,44E+05	9,29E-01	2,91E+04	2,01E+00
167	12,6	50,1	105	21	4,77E+04	1,79E+00	9,20E+02	3,51E+00
179	12,6	52,2	113	22,5	4,80E+03	2,78E+00	2,26E+02	4,12E+00
200	12,6	56,6	126	25,1	4,00E+00	5,86E+00	2,00E+00	6,17E+00
222	12,6	61,5	139	27,8	4,00E+00	5,86E+00	4,00E+00	5,87E+00

**Tab. A16: Versuchsdaten VRE 7 vom 11.03.2009** (Leitfähigkeit des Abwassers: 1313 µS/cm, Druck in der Funkenstrecke: 450 mA, Zündspannung: 47,0 kV).

**Ausgangskeimzahl auf Slanetz-Bartley-Agar (SLB): 4,37E+06 KBE/ml**

**Ausgangskeimzahl auf Enterococcosel-Agar (EC): 3,40E+06 KBE/ml**

					SLB	SLB	EC	EC
Spezifische Energie [J/ml]	Temp. Einlauf [°C]	Temp. Auslauf [°C]	Stromstärke [mA]	Impulse/Reaktorvolumen	Keimzahl [KBE/ml]	Keimzahlreduktion [Log10]	Keimzahl [KBE/ml]	Keimzahlreduktion [Log10]
61	20,1	33,2	37	7,1	3,15E+06	1,42E-01	1,61E+06	3,25E-01
82	19,9	38,8	50	9,6	3,49E+06	9,77E-02	1,22E+06	4,45E-01
117	19,9	46,9	71	13,6	1,96E+06	3,48E-01	1,78E+05	1,28E+00
137	19,7	51,6	83	16	5,42E+05	9,06E-01	1,22E+04	2,45E+00
150	19,7	54,7	91	17,5	1,87E+04	2,37E+00	1,17E+02	4,46E+00
166	19,7	58,4	101	19,4	9,00E+00	5,69E+00	2,00E+00	6,23E+00
180	19,7	61,4	109	21	1,00E+00	6,64E+00	kein Wachstum	-
199	19,6	66	121	23,2	2,00E+00	6,34E+00	kein Wachstum	-

**Tab. A17: Versuchsdaten VRE 7 vom 12.03.2009** (Leitfähigkeit des Abwassers: 1640 µS/cm, Druck in der Funkenstrecke: 550 mA, Zündspannung: 48,8 kV).

## 8.2.4 Stamm ATCC 6057

**Ausgangskeimzahl auf Slanetz-Bartley-Agar (SLB): 3,65E+06 KBE/ml**

					SLB	SLB	EC	EC
Spezifische Energie [J/ml]	Temp. Einlauf [°C]	Temp. Auslauf [°C]	Stromstärke [mA]	Impulse/Reaktorvolumen	Keimzahl [KBE/ml]	Keimzahlreduktion [Log10]	Keimzahl [KBE/ml]	Keimzahlreduktion [Log10]
83	15,5	31,7	45	7,7	1,70E+06	3,32E-01	-	-
83	15,5	32,2	45	7,7	1,80E+06	3,07E-01	-	-
117	15,5	38,8	63	10,8	3,04E+05	1,08E+00	-	-
117	15,5	39,8	63	10,8	2,73E+05	1,13E+00	-	-
137	15,4	43,8	74	12,6	8,10E+04	1,65E+00	-	-
137	15,4	44,5	74	12,6	6,90E+04	1,72E+00	-	-
151	15,4	47,3	81	13,8	3,00E+04	2,09E+00	-	-
151	15,3	47,7	81	13,8	1,95E+04	2,27E+00	-	-
165	15,3	50,5	89	15,2	8,66E+03	2,62E+00	-	-
165	15,3	51,1	89	15,2	5,84E+03	2,80E+00	-	-
202	15,3	58	109	18,6	1,01E+02	4,56E+00	-	-
202	15,3	58,3	109	18,6	1,07E+02	4,53E+00	-	-

**Tab. A18: Versuchsdaten Stamm ATCC 6057 vom 17.01.2009** (Leitfähigkeit des Abwassers: 1283 µS/cm, Druck in der Funkenstrecke: 800 mA, Zündspannung: 54,9 kV).



## Ausgangskeimzahl auf Slanetz-Bartley-Agar (SLB): 2,70E+06 KBE/ml

					SLB	SLB	EC	EC
Spezifische Energie [J/ml]	Temp. Einlauf [°C]	Temp. Auslauf [°C]	Stromstärke [mA]	Impulse/Reaktorvolumen	Keimzahl [KBE/ml]	Keimzahlreduktion [Log10]	Keimzahl [KBE/ml]	Keimzahlreduktion [Log10]
41	32,4	40,7	25	4,9	1,19E+06	3,56E-01	-	-
60	31,8	44,7	37	7,2	1,77E+05	1,18E+00	-	-
75	31,4	48,1	46	8,9	4,03E+04	1,83E+00	-	-
89	31,2	51	55	10,7	1,53E+04	2,25E+00	-	-
106	31	54,8	65	12,7	1,74E+02	4,19E+00	-	-
121	30,9	58,7	74	14,4	1,00E+00	6,43E+00	-	-
137	30,8	62,8	84	16,3	2,00E+00	6,13E+00	-	-
150	30,6	65,7	92	17,9	2,00E+00	6,13E+00	-	-

**Tab. A19: Versuchsdaten Stamm ATCC 6057 vom 10.02.2009** (Leitfähigkeit des Abwassers: 1360 µS/cm, Druck in der Funkenstrecke: 550 mA, Zündspannung: 48,2 kV).

## Ausgangskeimzahl auf Slanetz-Bartley-Agar (SLB): 1,95E+06 KBE/ml

					SLB	SLB	EC	EC
Spezifische Energie [J/ml]	Temp. Einlauf [°C]	Temp. Auslauf [°C]	Stromstärke [mA]	Impulse/Reaktorvolumen	Keimzahl [KBE/ml]	Keimzahlreduktion [Log10]	Keimzahl [KBE/ml]	Keimzahlreduktion [Log10]
60	10,4	22,7	39	8,1	1,93E+06	4,48E-03	-	-
83	10,4	28,3	54	11,1	1,26E+06	1,90E-01	-	-
117	10,3	36,3	76	15,7	1,00E+06	2,90E-01	-	-
136	10,3	40,9	89	18,4	5,37E+05	5,60E-01	-	-
150	10,4	44,7	98	20,2	1,95E+05	1,00E+00	-	-
166	10,3	47,8	108	22,3	4,71E+04	1,62E+00	-	-
180	10,4	50,1	117	24,2	1,35E+04	2,16E+00	-	-
199	10,4	55,5	130	26,8	1,80E+02	4,03E+00	-	-
220	10,5	60,3	143	29,6	3,00E+00	5,81E+00	-	-
240	10,5	64,1	156	32,3	1,00E+00	6,29E+00	-	-

**Tab. A20: Versuchsdaten Stamm ATCC 6057 vom 11.02.2009** (Leitfähigkeit des Abwassers: 956 µS/cm, Druck in der Funkenstrecke: 400 mA, Zündspannung: 45,4 kV).

## Ausgangskeimzahl auf Slanetz-Bartley-Agar (SLB): 4,83E+06 KBE/ml

					SLB	SLB	EC	EC
Spezifische Energie [J/ml]	Temp. Einlauf [°C]	Temp. Auslauf [°C]	Stromstärke [mA]	Impulse/Reaktorvolumen	Keimzahl [KBE/ml]	Keimzahlreduktion [Log10]	Keimzahl [KBE/ml]	Keimzahlreduktion [Log10]
60	14,9	27,7	39	8,1	3,66E+06	1,20E-01	-	-
83	14,9	33,1	54	11,1	2,12E+06	3,58E-01	-	-
116	14,8	41,1	76	15,7	3,88E+05	1,10E+00	-	-
150	14,7	50	98	20,2	1,76E+04	2,44E+00	-	-
179	14,7	55,9	117	24,2	1,17E+03	3,62E+00	-	-
206	14,7	63,3	135	27,8	1,00E+01	5,68E+00	-	-

**Tab. A21: Versuchsdaten Stamm ATCC 6057 vom 11.02.2009** (Leitfähigkeit des Abwassers: 1050 µS/cm, Druck in der Funkenstrecke: 400 mA, Zündspannung: 45,3 kV).

## 9 Vorveröffentlichung der Ergebnisse

- **Böhme, C.**, Kohnen, W., Schön-Hölz, K., Künstler, M., Jansen, B. (2005) Vancomycin-resistente Enterokokken: Vorkommen in der aquatischen Umwelt. 57ste Tagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Göttingen, Deutschland, 25.-28. September 2005 (Posterpräsentation).
- Kohnen, W., Schön-Hölz, K., Schwartz, T., Frey, W., **Böhme, C.**, Hoffmann, D., Swoboda, W., Obst, U., Jansen, B. (2007) Vorkommen von Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) in der aquatischen Umwelt während eines epidemischen Eintrages in die Umwelt. 1. Jahrestagung der Gesellschaft für Hygiene, Umweltmedizin und Präventivmedizin (GHUP) und 10. Jahrestagung des Landesinstitutes für den Öffentlichen Gesundheitsdienst NRW, Bielefeld, Deutschland, 22.-24. November 2007 (Abstract).
- Kohnen, W., Schön-Hölz, K., Schwartz, T., **Böhme, C.**, Obst, U., Ullmann, A., Jansen, B. (2007) Occurrence of Vancomycin-resistant Enterococci in the Aquatic Environment during an Outbreak with VRE in a Hematology-Oncology Department. 17th Annual Scientific Meeting of the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA), Baltimore, USA, 14.-17. April 2007 (Posterpräsentation).
- **Böhme, C.**, Kohnen, W., Schön-Hölz, K., Schwartz, T., Obst, U., Jansen, B. (2010) Occurrence of Vancomycin-Resistant Enterococcus faecium (VREF) in patient isolates and aquatic environment during a period between 2004-2009. International Conference on Healthcare-Associated Infections, Atlanta, USA, 18.-22. März 2010 (Abstract).

## **10 Danksagung**

## **11 Lebenslauf**