

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ. Prof. Dr. Dr. h.c. Erwin Märtlbauer

Untersuchung auf antimikrobielle Resistenzen
und Vorkommen von Extended-Spectrum-Beta-Lactamasen
bei Shigatoxin-Gen tragenden *Escherichia coli*

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

von
Nathalie Drees
aus
Rheine

München
2012

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

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Märtlbauer
Korreferent:	Priv.-Doz. Dr. Rinder

Tag der Promotion: 21. Juli 2012

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VII
1. EINLEITUNG.....	1
2. LITERATURÜBERSICHT	2
2.1 Antimikrobiell wirksame Substanzen	2
2.1.1 Einteilung von antimikrobiell wirksamen Substanzen	2
2.1.2 Anwendung antimikrobiell wirksamer Substanzen	6
2.2 Resistenzen gegenüber antimikrobiell wirksamen Substanzen	8
2.2.1 Definition Resistenz.....	8
2.2.2 Resistenzenstehung und –entwicklung.....	9
2.2.3 Wichtige Resistenzmechanismen mit Fokus auf β -Lactamasen	11
2.3 Extended-Spectrum-Beta-Lactamasen (ESBL).....	17
2.3.1 Einteilung von ESBL	17
2.3.2 Vorkommen und Verbreitung	20
2.3.3 Bedeutung für Mensch und Tier	24
2.3.4 Charakterisierungsmethoden von ESBL	26
2.4 Shigatoxin-Gen tragende <i>Escherichia coli</i>	28
2.4.2 Virulenzgene.....	29
2.4.3 Vorkommen und Bedeutung beim Menschen.....	30
2.4.4 Vorkommen und Bedeutung bei Wiederkäuern.....	31
2.4.5 Aktuelle Resistenzlage.....	32
2.5 Nachweismethoden	34
2.5.1 Bouillon-Mikrodilution	34
2.5.2 Polymerase-Kettenreaktion	35

3.	MATERIAL UND METHODEN.....	36
3.1	Material.....	36
3.1.1	Anzahl und Herkunft der untersuchten Proben.....	36
3.1.2	Qualitätskontroll- und Referenzstämme	38
3.1.3	Bouillon-Mikrotiterplatte für die Empfindlichkeitsbestimmung	38
3.1.4	Materialien für die genotypische Identifizierung.....	39
3.1.5	Bouillon-Mikrotiterplatte für die phänotypische Identifizierung	41
3.2	Methoden.....	43
3.2.1	Empfindlichkeitsbestimmung mittels Mikrodilution	43
3.2.1.1	Anzucht der Bakterienstämme	43
3.2.1.2	Herstellen des Inokulums.....	43
3.2.1.3	Inokulation und Inkubation.....	45
3.2.1.4	Auswertung	45
3.2.2	Genotypische Identifizierung von ESBL-Bildnern.....	47
3.2.2.1	DNA Extraktion	47
3.2.2.2	Polymerase-Kettenreaktion	47
3.2.2.3	Agarosegel-Elektrophorese	49
3.2.2.4	Sequenzanalyse	49
3.2.3	Phänotypische Identifizierung von ESBL-Bildnern	50
3.2.3.1	Bouillon-Mikrodilution	50
3.2.3.2	Auswertung	50
4.	ERGEBNISSE	53
4.1	Ergebnisse der Empfindlichkeitsbestimmung	53
4.2	Ergebnisse der genotypischen Identifizierung von ESBL-Bildnern.....	60
4.3	Ergebnisse der phänotypischen Identifizierung von ESBL-Bildnern.....	61
4.4	Vergleichende Darstellung der Ergebnisse	65

5.	DISKUSSION	67
6.	ZUSAMMENFASSUNG.....	80
7.	SUMMARY.....	82
8.	LITERATURVERZEICHNIS	84
9.	TABELLENVERZEICHNIS.....	108
10.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	110
11.	ANHANG	111
12.	DANKSAGUNG.....	118

Abkürzungsverzeichnis

AB	Antibiotika
AMP	Ampicillin
APB	Aminophenyborat
ATCC	American Type Culture Collection
BAP	Blut-Agar-Platte
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
<i>bla</i>	β -Lactamase-Gen
bp	Basenpaare
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
CAMHB	Kationen-adjustierte Mueller-Hinton-Bouillon
CASO	Caseinpepton-Sojamehlpepton
CAZ	Ceftazidim
CEP	Cefepim
CHL	Chloramphenicol
CIP	Ciprofloxacin
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
COL	Colistin
COX	Cefoxitin
CTX	Cefotaxim
CTX-M	Cefotaximase Munich β -lactamase
DART	Deutsche Antibiotika-Resistenzstrategie
DNA	Deoxyribonucleinsäure
dNTP	di-Nukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFSA	European Food Safety Authority
ESBL	Extended-Spectrum Beta-Lactamasen
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FFN	Florfenicol

FLI	Friedrich-Loeffler-Institut
GEN	Gentamicin
HC	hämorrhagische Kolistis
HUS	Hämolytisch-urämisches Syndrom
IRT	Inhibitor-resistente TEM
KbE	Kolonie bildende Einheiten
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KPC	<i>K. pneumoniae</i> -Carbapenemasen
MBL	Metallo- β -Lactamasen
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MTP	Mikrotiterplatte
n	Anzahl der Proben
NAL	Nalidixinsäure
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCTC	National Collection of Type Cultures
PC	Plate-Count
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RKI	Robert Koch Institut
SHV	sulfhydryl variable β -lactamase
SMX	Sulfamethoxazole
STEC	Shigatoxin-Gen tragende <i>E. coli</i>
Stx	Shiga-Toxin
<i>stx</i>	Shigatoxin-Gen
TEM	Temoniera β -lactamase
TET	Tetrazyklin
TRI	Trimethoprim
WHO	World Health Organization

1. Einleitung

Shigatoxin bildende *Escherichia coli* (STEC) sind weltweit verbreitete Zoonoseerreger, die bei einer Infektion des Menschen mit schwerwiegenden Komplikationen, wie der hämorrhagischen Kolitis oder dem hämolytisch-urämischem Syndrom einhergehen können. Die Übertragung kann direkt oder auch indirekt über kontaminierte Lebensmittel erfolgen, wobei Wiederkäuer allgemein hin als Reservoir für STEC gelten. Des Weiteren könnten Lebensmittel liefernde Tiere, wie Wiederkäuer, als mögliche Übertragungsquelle verschiedener Resistenzen angesehen werden, die sowohl in der Human- als auch in der Tiermedizin von Bedeutung wären. Insbesondere die Resistenzen gegenüber den Cephalosporinen der 3. und 4. Generation, die durch Extended-Spectrum-Beta-Lactamasen (ESBL) bildende Erreger verursacht werden, können zu erschwerten Behandlungsbedingungen und Therapieversagen führen. Diese ESBL-Bildner sind aktuell verstärkt in das Bewusstsein der Öffentlichkeit gerückt und stellen Verbrauchersicherheit und den allgemeinen Umgang mit antimikrobiell wirksamen Substanzen in der Human- und vor allem in der Veterinärmedizin in Frage.

In der vorliegenden Arbeit sollen daher Resistenzhäufigkeiten gegenüber verschiedenen antimikrobiell wirksamen Substanzen und im speziellen von Resistenzen gegenüber β -Lactamantibiotika bei STEC Isolaten untersucht werden. Zum Einen sollte untersucht werden, inwiefern Unterschiede hinsichtlich der Resistenzhäufigkeiten bei Keimen von domestizierten Nutzwiederkäuern im Vergleich zu Isolaten aus frei lebenden Wildwiederkäuern bestehen und ob durch diese Tierarten ein erhöhtes Risiko für eine Übertragung resistenter Erreger zu vermuten ist. Zum Anderen sollte speziell im Hinblick auf die Gruppe der häufig verwendeten β -Lactamantibiotika gezeigt werden, ob bereits in-vitro Unempfindlichkeiten im erweiterten Wirkungsspektrum der Cephalosporine der 3. und 4. Generation bestehen und ob die entsprechenden ESBL-Gene vorhanden sind, die eine speziesübergreifende Übertragung auf andere Pathogene ermöglichen könnten.

2. Literaturübersicht

2.1 Antimikrobiell wirksame Substanzen

Antimikrobiell wirksame Substanzen gehören mitunter zu den wichtigsten Arzneimitteln und sind zum unverzichtbaren Bestandteil der Therapie von bakteriellen Infektionskrankheiten geworden. Unter dem Begriff Antibiotika (AB) werden die Stoffe verstanden, die ursprünglich von Mikroorganismen produziert und gewonnen wurden und in der Lage sind, das Bakterienwachstum zu hemmen oder abtötend zu wirken, möglichst ohne den Wirtsorganismus zu schädigen. Heute werden die synthetischen und halb-synthetischen Wirkstoffe (Chemotherapeutika) zusammen mit den Antibiotika unter dem Begriff Antiinfektiva geführt und bilden somit die Gruppe der antimikrobiell wirksamen Substanzen. Oftmals wird der Begriff Antibiotika stellvertretend für alle antimikrobiell wirksamen Stoffe verwendet (MUTSCHLER ET AL., 2008; LÜLLMANN ET AL., 2010).

2.1.1 Einteilung von antimikrobiell wirksamen Substanzen

Die Einteilung antimikrobieller Wirkstoffe kann anhand verschiedener Gesichtspunkte erfolgen. Zum einen lassen sich diese Stoffe nach ihrer Wirkungsweise unterscheiden, d.h., danach ob sie in der Lage sind, Bakterien effektiv abzutöten (bakterizid), oder ob sie diese in ihrem Wachstum lediglich hemmen (bakteriostatisch). Zum anderen werden die verschiedenen Wirkstoffe nach ihrem Angriffspunkt in der Bakterienzelle oder aber nach ihrem Wirkungsspektrum, ausgehend von ihrer Wirkung gegen grampositive und/oder gramnegative Bakterien, in Breitband- oder Schmalspektrum-AB unterteilt. In Bezug auf den Wirkmechanismus in der Zelle werden folgende Angriffspunkt unterschieden: die Hemmung der Zellwandsynthese, die Störung der Zytoplasmamembranpermeabilität, die Blockade der Proteinsynthese oder die Unterdrückung der Nucleinsäuresynthese. Im Allgemeinen erfolgt eine Einteilung der einzelnen antimikrobiellen Wirkstoffe in chemisch-strukturelle Wirkstoffklassen (Tabelle 1) (GIGUÈRE, 2006; KROKER, 2010). Im Folgenden soll, im Hinblick auf den Fokus der vorliegenden Arbeit, auf die Wirkstoffklasse der β -Lactam-Antibiotika näher eingegangen werden.

Tabelle 1: Einteilung wichtiger antimikrobiell wirksamer Substanzen in verschiedene Wirkstoffklassen aufgrund ihrer Wirkungsmechanismen
(nach TENOVER, 2006; KROKER, 2010)

Wirkstoffklassen	Wirkungsmechanismen in der Bakterienzelle	Wirkungsweise	Antimikrobielle Substanzen (Beispiele)
β-Lactam-Antibiotika	Hemmung der Zellwandsynthese (Synthesestörung des Peptidoglykangerüsts mit Zellyse, Bindung an „Penicillin-bindende Proteine“)	bakterizid	Penicillin-G, Ampicillin, Amoxicillin, Cefalexin, Ceftiofur, Cefquinom, Cefotaxim, Ceftazidim, Imipenem
Aminoglycoside	Störung/Fehlsteuerung der Proteinsynthese (Interaktion mit der 30S-Untereinheit des Ribosoms, Verursachen von Ablesefehlern an der mRNA, Entstehung von Non-sense-Proteinen)	bakterizid	Streptomycin, Kanamycin, Gentamicin
Fluorchinolone/ Gyrasehemmer	Hemmung der DNA-Gyrase/Topoisomerase (Nucleinsäure-Funktionshemmung, Hemmung des DNA- Supercoilings)	bakterizid	Enrofloxacin, Ciprofloxacin, Marbofloxacin, Nalidixinsäure
Polypeptid-AB	Permeabilitätsstörung der Zellmembran (Zellysis durch Interaktion mit der Lipidregion der Zellmembran)	bakterizid	Polymyxin B, Colistin
Sulfonamide, Diaminopyrimidine	Hemmung der Folsäure-Synthese (Störung durch Substratkonkurrenz der Synthetase)	bakteriostatisch	Sulfamethoxazole (Einzelwirkstoff), Kombination Sulfonamid mit Trimethoprim
Tetrazykline	Hemmung der Proteinsynthese (Angriff auf 30S-Untereinheit des Ribosoms durch Hemmung des Andockens des t-RNA-Aminosäurekomplexes)	bakteriostatisch	(Chlor-)Tetrazyklin, Doxycyclin
Fenicole	Hemmung der Proteinsynthese (Interferenz mit der Peptidyltransferase und ihrer Substrate)	bakteriostatisch	Chloramphenicol, Florfenicol

Die Gruppe der β -Lactam-AB setzt sich aus Abkömmlingen der 6-Aminopenicillansäure und der 7-Aminocephalosporansäure zusammen. Dazu gehören die Penicilline, die Cephalosporine, die Carbapeneme und die Monobactame. Der namensgebende vier-gliedrige β -Lactamring ist das antibakteriell aktive Zentrum (Abbildung 1). Bei Penicillinen und Carbapenemen ist ein fünfgliedriger (Thiazolidinring) und bei Cephalosporinen ein sechsgliedriger (Thiazinring) Heterocyclus ankondensiert, wohingegen die Monobactame keinen weiteren anellierten Ring besitzen (KONG ET AL., 2009; KROKER 2010).

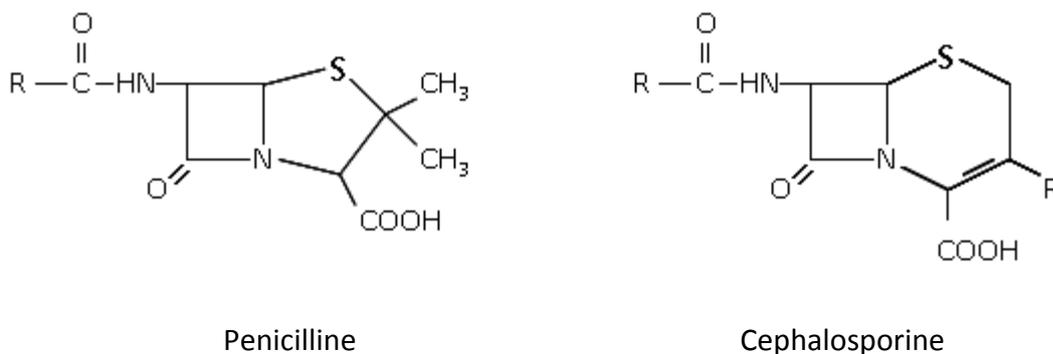


Abbildung 1: Grundgerüst der Penicilline und Cephalosporine (nach BLUMBERG UND STROMINGER, 1974; BABIC ET AL., 2006)

Allen gemeinsam ist der Wirkungsmechanismus der Zellwandsynthesehemmung. Dabei werden die beim letzten Peptidoglykan-Syntheseschritt beteiligten Transpeptidasen (auch Penicillin-binding-Protein (PBP) genannt) durch die Spaltung des β -Lactamringes acetyliert und dadurch irreversibel blockiert. Eine Öffnung der Peptidoglykanstränge während der Zellteilung führt anschließend aufgrund der osmotischen Verhältnisse zur Bakteriolyse. Daher wirken β -Lactam-AB nur auf proliferierende Bakterien bakterizid und sind für Mensch und Tier gering toxisch und gut verträglich (TIPPER UND STROMINGER, 1965; BOYD, 1981; KONG ET AL., 2009).

Die Einteilung der Penicilline (Tabelle 2) erfolgt gemäß der evolutionären Weiterentwicklungen der natürlich vorkommenden „Urpenicilline“, der Benzylpenicilline (Penicillin G) aus den Schimmelpilzen *Penicillium (P.) notatum* und *P. chrysogenum*. Die Benzylpenicilline weisen insgesamt ein enges Wirkungsspektrum im Bereich der grampositiven Bakterien sowie eine schlechte Resorbierbarkeit auf. Im Gegensatz zu den Benzylpenicillinen zeigen deren halbsynthetischen Nachfolger eine höhere Säurestabilität (wie z. B. die Phenoxypenicilline), eine zusätzlich erhöhte β -Lactamase-Stabilität (wie z. B. die Isoxazolympenicilline) oder ein erweitertes Erregerspektrum (wie z. B. Aminopenicilline) (WISE, 1982; LÜLLMANN ET AL., 2010).

Die Cephalosporine werden nach ihrem Wirkungsspektrum und nach ihrer Stabilität gegenüber β -Lactamasen in die Untergruppen der Cephalosporine der 1. bis 4. Generation eingeteilt. Das Wirkungsspektrum variiert substanzabhängig, wobei die Cephalosporine der 1. und 2. Generation eine stärkere Wirksamkeit gegenüber grampositiven Bakterien besitzen. Die Cephalosporine der 3. und 4. Generation dagegen decken ein weites Erregerspektrum inklusive gramnegativer Keime ab und weisen eine deutlich erhöhte β -Lactamase-stabilität auf. In der Veterinärmedizin kommen u.a. folgende β -Lactam-AB häufig zur Anwendung: Benzylpenicillin, Cloxacillin, Ampicillin/Amoxicillin, Cefalexin (1. Generation), Ceftiofur (3. Generation) oder Cefquinom (4. Generation) (WISE, 1982; KROKER, 2010).

Tabelle 2: Einteilung der β -Lactam-Antibiotika (nach KROKER, 2010)

β-Lactam-Klasse	Wirkstoffvertreter (Beispiele)
Penicilline:	
Benzylpenicilline	Benzylpenicillin (G), Procain-Benzylpenicillin
Phenoxypenicilline	Propicillin, Phenoxymethylpenicillin
Isoxazolympenicilline	Oxacillin, Cloxacillin
Aminopenicilline	Amoxicillin, Ampicillin
Cephalosporine:	
1. Generation	Cefazolin, Cefalexin, Cefalothin
2. Generation	Cefuroxim, Cefotiam, Cephamycine (Cefoxitin)
3. Generation	Cefotaxim, Cefovecin, Ceftazidim, Ceftiofur
4. Generation	Cefepim, Cefpirom, Cefquinom
Carbapeneme:	Meropenem, Imipenem
Monobactame:	Aztreonam

2.1.2 Anwendung antimikrobiell wirksamer Substanzen

Antimikrobielle Wirkstoffe nehmen sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin einen großen Stellenwert ein und sind nach wie vor unverzichtbar bei der Bekämpfung von Infektionskrankheiten. Der Verkehr mit Arzneimitteln, einschließlich der Tierarzneimittel, wird im Arzneimittelgesetz geregelt, in dem sich grundlegende Vorgaben für die Abgabe und die Anwendung von Antibiotika finden lassen (ANONYMUS, 2011A).

Die Anwendung antimikrobieller Substanzen kann aus verschiedenen Gesichtspunkten heraus erfolgen. Dazu zählt die therapeutische Behandlung von bereits diagnostizierten Infektionskrankheiten, als auch die prophylaktische und metaphylaktische Behandlung im chirurgischen oder bestandspezifischen Bereich. Das Spektrum der eingesetzten Substanzen umfasst dabei für Human- und Veterinärmedizin überwiegend dieselben Wirkstoffklassen. Sowohl für die Human- als auch die Veterinärmedizin wurden die Penicilline und Cephalosporine in den nach Relevanz gestaffelten Rankinglisten als „Critically Important Antimicrobials“ eingestuft (ANONYMUS, 2008), woraus sich auch entsprechende Risiken im Hinblick auf eine Resistenzbildung und die daraus resultierende zukünftige Therapierbarkeit ergeben (SCHWARZ ET AL., 2001).

Da bisher noch keine Daten zu Verbrauchsmengen von antimikrobiellen Wirkstoffen, entsprechend der neuen Abgabemengenerfassung vorliegen, die durch das Deutsche Institut für Medizinische Dokumentation und Information (DIMDI) erfasst werden (BUNDESANZEIGER, 2010; GERMAP, 2011), wurden bisher nur Mengenschätzungen der Antibiotika-Verkaufszahlen veröffentlicht. Im Jahr 2005 wurden dementsprechend 784,4 Tonnen Antibiotika verbraucht, von denen der Großteil (95,0 %) im Nutztier-Bereich zum Einsatz kam. Dabei stellten die meist vertretenen Wirkstoffklassen die Tetracykline mit 44,6 %, die β -Lactam-AB mit 25,4 % und die Sulfonamide mit 12,5 % (SCHNEIDERREIT, 2006; GERMAP, 2008). Im Vergleich zu anderen europäischen Staaten rangiert Deutschland in Bezug auf die verwendeten Mengen an antimikrobiell wirksamen Substanzen pro kg/Biomasse im mittleren Bereich (Abbildung 2) (GRAVE ET AL., 2010).

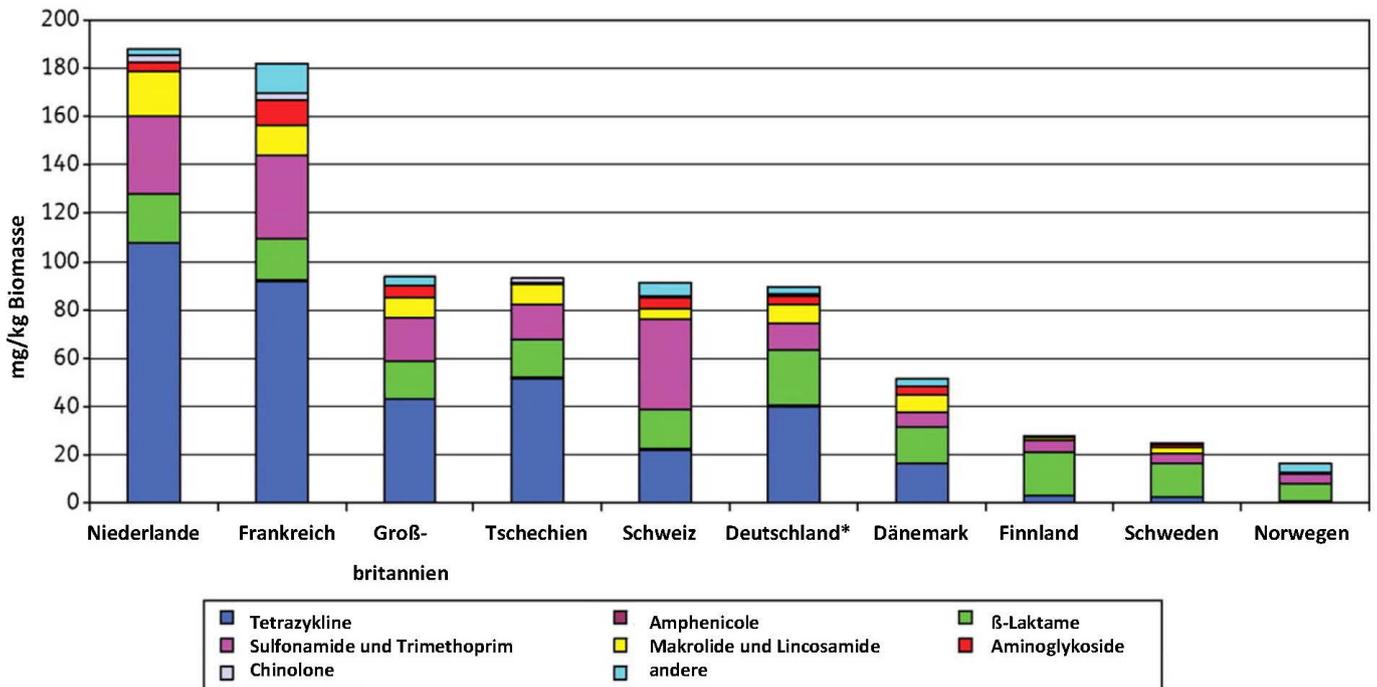


Abbildung 2: Verbrauch antimikrobiell wirksamer Substanzen in mg/kg Biomasse von Schwein, Rind und Geflügel in 2007 bzw. 2005* (nach GRAVE ET AL., 2010)

Im Bereich des Wirtschaftsgeflügels konnte beispielsweise in einer vom Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen durchgeführten Evaluierung des Antibiotikaeinsatzes in der Hähnchenhaltung ermittelt werden, dass 91,6 % der Hähnchen während der Mast mit durchschnittlich drei Wirkstoffen antibiotisch behandelt werden (ANONYMUS, 2011B).

Obwohl bereits Leitlinien für den sorgfältigen Umgang mit antimikrobiell wirksamen Arzneimitteln herausgegeben wurden (BTK, 2010), ist die Umsetzung oftmals noch unzureichend. So bergen nicht indikationsgerechte Einsätze von Antibiotika, subtherapeutische Dosen und die Notwendigkeit des ökonomischen Handelns im Bereich der Nutztierhaltung, v. a. im Wirtschaftsgeflügel- und Schweinehaltungsbereich, die Gefahr eines verstärkten Selektionsdruckes auf die entsprechenden Infektionserreger und damit eine Erhöhung der Resistenzbildung. Um dem entgegen zu wirken wurde 2011 die Deutsche Resistenzstrategie vom Bundesministerium für Gesundheit veröffentlicht, die Maßnahmen beschreibt, die den Hauptursachen der Resistenzentwicklung systematisch entgegenwirken sollen (ANONYMUS, 2011A).

2.2 Resistenzen gegenüber antimikrobiell wirksamen Substanzen

2.2.1 Definition Resistenz

Eine Resistenz gegenüber einem antimikrobiellen Wirkstoff liegt dann vor, wenn sich die zu behandelnden Infektionserreger dem Einfluss der angewendeten antimikrobiellen Wirkstoffe entziehen und somit mit hoher Wahrscheinlichkeit ein klinischer Therapieerfolg ausbleibt. Dies bedeutet, dass ein Bakterium resistent ist, wenn für dieses die minimale Hemmkonzentration (MHK) höher liegt als die höchste in vivo erreichbare, jedoch nicht-toxische Antibiotikakonzentration (SCHWARZ UND CHASLUS-DANCLA, 2001; BOERLIN UND WHITE, 2006).

Die Ursachen für bakterielle Resistenzen sind vielfältig. Einige Bakterienspezies besitzen eine primäre „natürliche“ Resistenz gegenüber antimikrobiellen Substanzen, meist wenn die Angriffspunkte dieser Substanzen von Natur aus gar nicht in den Bakterienzellen vorhanden oder aber unzugänglich sind. Natürliche Resistenzen zeigen beispielsweise gramnegative Bakterien gegenüber Benzylpenicillin, da die äußere Zellwand nicht von den Benzylpenicillinen passiert werden kann. Im Gegensatz dazu können vormals empfindliche Bakterien zusätzliche Resistenzeigenschaften hinzugewinnen, so dass diese sekundären „erworbenen“ bzw. „übertragbaren“ Resistenzen ihnen einen Selektionsvorteil verschaffen. Diese erworbenen Resistenzen können über Mutationen des eigenen Genkomplexes stattfinden oder als Fremdgen über mobile Elemente wie z.B. Plasmide aufgenommen und dann expremiert werden. Beispiele für erworbene Resistenzen stellen die Tetrazyklin-Resistenzen, wie auch β -Lactamasen und speziell die Extended-Spectrum- β -Lactamasen (ESBL) dar (BRADFORD, 2001; SCHWARZ UND CHASLUS-DANCLA, 2001; MCDERMOTT ET AL., 2003; BOERLIN UND WHITE, 2006).

Werden Resistenzen gegenüber mehreren Wirkstoffen durch den selben genetischen Hintergrund über dieselben Resistenzgene vermittelt, handelt es sich um Kreuzresistenzen. Werden allerdings Resistenzen gegenüber mehreren antimikrobiellen Wirkstoffen durch verschiedene Gene ausgebildet, handelt es sich um Parallelresistenzen. Diese Gene sind jedoch häufig auf dem gleichen mobilen Element verankert wie beispielsweise die Resistenzgene gegenüber Chloramphenicol, Kanamycin, Streptomycin, Sulfonamiden und Tetrazyklinen von *Escherichia (E.) coli* auf dem Plasmid IR 72 (WERCKENTHIN ET AL., 2005; KROKER, 2010).

2.2.2 Resistenzentstehung und –entwicklung

Resistenzen entstehen entweder zufällig oder forciert bei entsprechendem Selektionsdruck durch den Einsatz von antimikrobiellen Wirkstoffen. Sie dienen den Mikroorganismen als Überlebensmechanismus in der sie umgebenden Umwelt. Anhand der Geschwindigkeit der Resistenzentwicklung kann man zwischen One-step und Multi-step Resistenzen unterscheiden. Die One-step Resistenzen treten relativ schnell nach Therapiebeginn auf bzw. nach ein- bis viermaliger Exposition des Keimes mit demselben antimikrobiellen Wirkstoff (z.B. Streptomycin). Die Multi-step Resistenzen entwickeln sich dagegen langsam und stufenweise, sodass mehrere Mutationsschritte erforderlich sind, bevor eine Resistenz entsteht (z.B. Tetrazykline, Sulfonamide) (MUTSCHLER ET AL., 2008; KROKER, 2010).

Die chromosomal liegenden Resistenzen können nur vertikal auf die jeweiligen Tochterzellen der nächsten Generation übertragen werden. Hingegen können auf mobilen Elementen gelagerte Resistenzgene sowohl vertikal, als auch horizontal und sogar spezieübergreifend weitergegeben werden (ALEKSHUN UND LEVY, 2007; KAPPSTEIN, 2009). Daher stellen besonders diese extrachromosomal gelegenen Resistenzgene ein zunehmend wachsendes Problem sowohl in der Human-, als auch in der Veterinärmedizin dar. Innerhalb des Bakteriums können zudem die Resistenzgene zwischen chromosomaler und extrachromosomaler DNA ausgetauscht werden (SCHWARZ UND CHASLUS-DANCLA, 2001).

Die horizontale Übertragung der extrachromosomal gelegenen DNA erfolgt anhand von Plasmiden, Transposons, Integrons, Genkassetten und/oder sogenannten „genomischen Inseln“ entweder über Konjugation zweier Bakterien, Transformation frei vorhandener DNA oder Bakteriophagen-basierter Transduktion. Dabei stellt die Konjugation in Form einer Übertragung von einem Spender-Bakterium auf einen Empfänger die häufigste und effizienteste Methode dar, um auch größere Genelemente, wie Resistenz tragende Plasmide von einem Bakterium zum nächsten zu übertragen (BENNETT, 2008; HIRSCH-KAUFFMANN ET AL., 2009). Plasmide sind zirkuläre doppelsträngige DNA-Fragmente, die bisher in vielen bakteriellen Spezies (Kommensalen und pathogenen Erregern) beschrieben worden sind. Sie replizieren unabhängig vom bakteriellen Chromosom und haben die Fähigkeit, entweder selbst in Form von konjugativen Plasmiden oder gemeinsam mit einem selbstübertragbaren Plasmid von einem Bakterium auf das nächste transferiert zu werden (HARBOTTLE ET AL., 2006; BENNETT, 2008). Plasmide variieren in ihrer Größe und können unabhängig in der Bakterienzelle koexistieren. Sie tragen keine essentiell zum Überleben notwendigen Informationen, können jedoch unter spezifischen Bedingungen einen selektiven Vorteil verschaffen (SCHWARZ UND CHASLUS-DANCLA, 2001; BENNETT, 2008). Plasmide können bis zu zehn verschiedene Resistenz- sowie Virulenzgene tragen und sind auch für die Verbreitung von Transposons sog. „springenden Genen“, Integrons und/oder Genkassetten verantwortlich, die keine eigene Replikation betreiben (HARBOTTLE ET AL., 2006; CARATTOLI, 2008).

Ein zusätzlich begünstigender Faktor für die Resistenzbildung stellt die räumliche Nähe der Erreger in polymikrobiellen Umgebungen, wie den mukosalen Oberflächen von Respirations- und Intestinaltrakt wie auch auf der Haut von Mensch und Tier dar, die dementsprechend einen relativ großen Genpool für weitere Rekombinationsmöglichkeiten zur Verfügung stellen. Historisch gesehen entwickelten sich die jeweiligen Resistenzen gegen antimikrobielle Substanzen stets in zeitlicher Abhängigkeit zu deren Entdeckung und Verwendung, da die Anwendung von antimikrobiell wirksamen Substanzen den Selektionsdruck auf die Erregerpopulation erhöht und damit der Resistenzentwicklung Vorschub leistet (SCHWARZ UND CHASLUS-DANCLA, 2001) (Tabelle 3).

Tabelle 3: Zeitlicher Überblick über Entdeckung und klinische Anwendung antimikrobieller Wirkstoffe und Entstehung erster Resistenzen (EMEA, 1999)

Wirkstoff	Entdeckung	klinische Anwendung	Resistenzen
Penicillin	1940	1943	1940
Streptomycin	1944	1947	1947, 1956
Tetrazyklin	1948	1952	1956
Erythromycin	1952	1955	1956
Vancomycin	1956	1972	1987
Nalidixinsäure	1960	1962	1966
Gentamicin	1963	1967	1970
Cephalosporine der 3.Gen.	f. A.	f. A.	1980, 1985
Fluorquinolone	1978	1982	1985

f. A.= fehlende Angabe

2.2.3 Wichtige Resistenzmechanismen mit Fokus auf β -Lactamasen

Der Resistenzbildung von Bakterien gegenüber antimikrobiell wirksamen Substanzen können verschiedene Mechanismen zugrunde liegen. Durch die Bildung spezifischer Enzyme sind manche Bakterien in der Lage, die antimikrobiellen Wirkstoffe beispielsweise durch Acetylierung (z. B. Acetyltransferasen) oder Hydrolyse (z. B. β -Lactamasen) zu inaktivieren. Diese Mechanismen werden sehr häufig gegenüber Aminoglycosiden oder β -Lactam-AB beobachtet (DAVIES UND WRIGHT, 1997; JACOBY UND MUNOZ-PRICE, 2005; WRIGHT, 2005). Ein weiterer Mechanismus zur Resistenzbildung erfolgt durch eine mangelnde Akkumulation des antimikrobiellen Wirkstoffes in der Zielzelle. Dies kann einerseits durch eine verminderte Aufnahme (z. B. Porinverlust bei Penicillinen) oder andererseits durch eine vermehrte Abgabe des Antibiotikums mittels Transportsystemen (z. B. Efflux-Pumpen bei Tetrazyklinen) erfolgen (KUMAR UND SCHWEIZER, 2005). Zusätzlich kann auch eine Veränderung der Zellmembranpermeabilität eine Aufnahme in die Bakterienzelle verhindern. Diese Mechanismen finden z. B. Anwendung in Bezug auf Tetrazykline oder auch Cephalosporine. Aufgrund einer chemischen Modifikation (z. B. Methylierung der 23S rRNA) sind manche Bakterien in der Lage, die AB-Zielstruktur so zu verändern, dass dadurch eine Bindung des Antibiotikums und damit auch eine Wirkung ausbleibt. Neben der Kompensation eines Wirkstoff-induzierten

Stoffwechseldefektes kann auch eine Mutation mit daraus folgender Änderung der AB-Zielstruktur erfolgen. Beispiele für Resistenzen aufgrund von veränderten Zielstrukturen findet man u. a. bei Aminoglycosiden, Sulfonamiden, β -Lactam-AB oder Makroliden (SCHWARZ UND CHASLUS-DANCLA, 2001; WRIGHT, 2005).

Die Resistenz gegenüber β -Lactam-AB kann durch mehrere der oben genannten Resistenzmechanismen erfolgen. Diese können einzeln oder auch in Kombination auftreten und sich dadurch noch gegenseitig verstärken. So bilden manche Bakterien wie z. B. Streptokokken Penicillin bindende Proteine (PBP) in der Zellwand mit geringer Affinität für β -Lactam-AB aus. Einige *Enterobacteriaceae* verzichten gänzlich auf entsprechende negativ-geladene Außenmembranproteine (outer membrane proteins - OMP), die zum Eindringen der Antibiotika in die Zelle nötig sind. Beides bewirkt eine verminderte Aufnahme der β -Lactam-AB und somit deren Wirkungsabschwächung (BRADFORD, 2001; MCDERMOTT ET AL., 2003; WITTE UND MIELKE, 2003). Den wichtigsten Resistenzmechanismus gegenüber β -Lactam-AB stellt allerdings die enzymatische Hydrolyse durch β -Lactamasen dar (Abbildung 3). Dabei kommen β -Lactamasen sowohl in grampositiven, als auch in gramnegativen Erregern vor und sind in der Lage, den β -Lactam-Ring hydrolytisch zu spalten und somit die β -Lactam-AB zu inaktivieren. Sie werden allgemein anhand ihres aktiven Zentrums in Serin- β -Lactamasen oder Metallo-Zink- β -Lactamasen unterteilt (WRIGHT, 2005; BABIC ET AL., 2006).

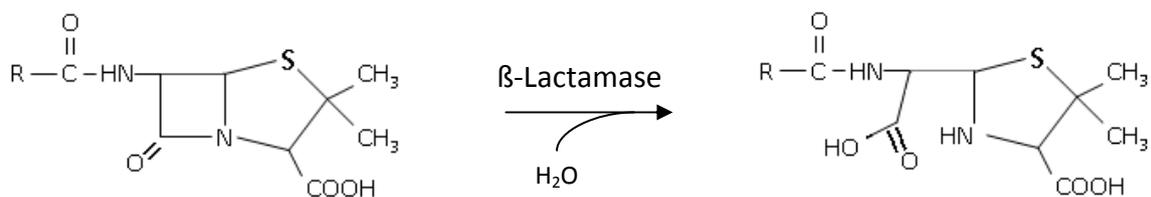


Abbildung 3: Wirkungsweise der bakteriellen β -Lactamasen auf β -Lactam-Antibiotika (nach MUTSCHLER ET AL., 2008)

Mittlerweile sind ca. 1000 verschiedene β -Lactamase-Sequenzen bekannt (BUSH UND FISHER, 2011), sodass die jeweils unterschiedlichen β -Lactamasen ein unterschiedlich weites Spektrum an Substraten hydrolysieren und dementsprechend als Penicillinasen, Cephalosporinasen, Carbapenemasen oder aber als „Breitspektrum“- β -Lactamasen bezeichnet werden (SIROT, 1995; SMET ET AL., 2010). Die namentliche Bezeichnung der zu einzelnen Gruppen bzw. „Familien“ zusammengefassten β -Lactamasen wurde meist in Anlehnung an Orte oder Patientennamen der Erstidentifizierung angelehnt sowie auch nach strukturellen Eigenschaften der Enzyme.

Üblicherweise erfolgt eine Klassen-Einteilung der einzelnen β -Lactamasen, da diese sich molekularbiologisch wie auch funktionell voneinander unterscheiden lassen. Im molekularen Schema nach Ambler werden alle β -Lactamasen entsprechend ihrer Aminosäuresequenz in die Ambler-Klassen A, B, C und D eingeteilt (AMBLER, 1980; JACOBY UND MUNOZ-PRICE, 2005). Bei den Ambler-Klassen A, C und D handelt es sich um Serin- β -Lactamasen, wohingegen die Ambler-Klasse B die Gruppe der Metallo- β -Lactamasen (MBL) mit einem Zinkion im aktiven Zentrum umfasst.

Die Ambler-Klasse A beinhaltet größtenteils Plasmid-kodierte β -Lactamasen, die sowohl in grampositiven (z. B. Staphylokokken), als auch in gramnegativen Bakterien (z. B. *E. coli*, *Klebsiella (K.) pneumoniae*) vorkommen. Diese Klasse beinhaltet auch „Breitspektrum“- β -Lactamasen (z. B. β -Lactamase TEM-1, β -Lactamase SHV-1, *K. pneumoniae*-Carbapenemasen (KPC), oder auch die TEM-, SHV und CTX-M -ESBL) (PATERSON UND BONOMO, 2005; BEBRONE ET AL., 2010).

Die Enzyme der Ambler-Klasse B sind die Metallo- β -Lactamasen, die statt Serin ein- oder zweiwertige Zinkionen in ihrem aktiven Zentrum tragen. Sie weisen ein breites Substratspektrum auf, das Penicilline, Cephalosporine und auch Carbapeneme („Carbapenemasen“) beinhaltet. Die MBL lassen sich nur durch chelatisierende Agenzien (z. B. EDTA) in ihrer Wirkung hemmen (BEBRONE, 2007). In dieser Klasse befinden sich beispielsweise β -Lactamasen wie die „hochresistente“ Neu-Delhi-Metallo- β -Lactamase-1 (NDM-1), die erstmals 2008 in Indien entdeckt wurde und in der Lage ist, sowohl Penicilline, Cephalosporine als auch Carbapeneme zu hydrolysieren (YONG ET AL., 2009).

Zu der Ambler-Klasse C gehören einige der wichtigsten chromosomal kodierten β -Lactamasen, die bei bestimmten *Enterobacteriaceae* von Natur aus vorkommen (AmpC), deren Gen jedoch an sich reprimiert ist (WITTE UND MIELKE, 2003). Das AmpC ist z. T. induzierbar (z. B. bei vielen *Enterobacter* spp.) (LIVERMORE UND BROWN, 2001) oder kann aufgrund einer Mutation des regulatorischen Systems vermehrt exprimiert werden (BEBRONE ET AL., 2010). AmpC β -Lactamasen sind weit verbreitet und können sowohl primär chromosomal, wie auch sekundär plasmid-kodiert (häufig bei *E. coli*, *K. pneumoniae*) vorliegen. Sie haben ein erweitertes Substratspektrum in Bezug auf die meisten Penicilline, Cephalosporine der 3. Generation, Cephamycine sowie z. T. auch gegen Aztreonam (Monobactam), können aber Cephalosporine der 4. Generation nicht inaktivieren. AmpC sind nicht durch den β -Lactamase-Inhibitor Clavulansäure oder EDTA hemmbar. Eine häufig auftretende AmpC- β -Lactamase ist z. B. die CMY-2 (JACOBY, 2009).

In der Ambler-Klasse D befinden sich u. a. die OXA-ESBL, die oft bei *Pseudomonas aeruginosa* vorkommen (PFALLER UND SEGRETI, 2006) oder auch die OXA-Carbapenemasen (wie z. B. die OXA-48). Die OXA- β -Lactamasen zeigen charakteristischerweise Resistenzen gegenüber Oxacillin oder auch Cloxacillin und lassen z. T. nicht durch Inhibitoren hemmen.

Eine zweite Einteilung wurden von BUSH ET AL. (1995) erstmals 1995 vorgenommen, welche die β -Lactamasen in vier Gruppen mit einer Vielzahl von Untergruppen, anhand ihrer Funktion und Substratbindung einordneten (Tabelle 4). So enthält die Gruppe 1 die Breitspektrum- β -Lactamasen mit fehlender Hemmbarkeit durch Clavulansäure während dagegen in der Gruppe 2 die durch Clavulansäure hemmbaren β -Lactamasen enthalten sind. Zu der Gruppe 3 gehören die Metallo-Zink- β -Lactamasen und zu der Gruppe 4 die noch unbekanntes bzw. undifferenzierten β -Lactamasen. Diese Einteilung besitzt eher klinische Relevanz und wird daher mittlerweile häufiger genutzt (BUSH ET AL., 1995; WRIGHT, 2005; BUSH UND JACOBY, 2010).

Tabelle 4: Einteilung der β -Lactamasen in Bush-Jacoby-Gruppen (nach BUSH ET AL., 1995; BUSH UND JACOBY, 2010) und Ambler-Klassen (nach AMBLER, 1980)

Bush-Jacoby-Gruppe	Ambler-Klasse	Charakteristische Substrate	hemmbar durch		Beispiele für β -Lactamasen
			Clavulan-säure	EDTA	
1	C	Cephalosporine, Cephamycine	Nein	Nein	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	C	Cephalosporine	Nein	Nein	GC1, CMY-37
2a	A	Penicilline	Ja	Nein	PC1
2b	A	Penicilline, frühe Cephalosporine	Ja	Nein	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Breitspektrum-Cephalosporine, Monobactame	Ja	Nein	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	A	Penicilline	Nein	Nein	TEM-30, SHV-10, IRT
2ber	A	Breitspektrum-Cephalosporine, Monobactame	Nein	Nein	TEM-50
2c	A	Carbenicillin	Ja	Nein	PSE-1, CARB-3
2ce	A	Carbenicillin, Cefepime	Ja	Nein	RTG-4
2d	D	Cloxacillin	Variabel	Nein	OXA-1, OXA-10
2de	D	Breitspektrum-Cephalosporine	Variabel	Nein	OXA-11, OXA-15
2df	D	Carbapeneme	Variabel	Nein	OXA-23, OXA-48
2e	A	Breitspektrum-Cephalosporine, kein Aztreonam	Ja	Nein	CepA
2e	A	Carbapeneme	Variabel	Nein	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	B	Carbapeneme, keine Monobactame	Nein	Ja	MP-1, VIM-1, CcrA, IND-1, IMP-1, NDM-1,
3b	B	Carbapeneme	Nein	Ja	CphA, Sfh-1
4	-	Unbekannt	-	-	

EDTA- Ethylendiamintetraacetat

Um dem Problem der β -Lactamase-Hydrolyse entgegen zu wirken, werden oftmals zusätzlich zu den β -Lactamase-empfindlichen β -Lactam-AB Inhibitorsubstanzen wie Clavulansäure, Tazobactam oder Sulbactam, verabreicht (Abbildung 4). Diese Inhibitoren sind allgemein im Gegensatz zu β -Lactam-AB selbst nicht antibakteriell wirksam. Der Kontakt der Inhibitoren mit den β -Lactamasen der Bakterien bewirkt eine Öffnung des Inhibitor- β -Lactam-Ringes und eine irreversible Bindung von Enzym und Inhibitor (BABIC ET AL., 2006; DRAWZ UND BONOMO, 2010; LÜLLMANN ET AL., 2010). Insbesondere die β -Lactamasen der Ambler-Klasse A, mit Ausnahme der *K. pneumonia*-Carbapenemasen, können durch Inhibitoren wirkungsvoll inaktiviert werden. Die Inhibitoren haben jedoch nur wenig Effekt in Bezug auf β -Lactamasen der Ambler-Klassen C und D. Die Metallo-Zink β -Lactamasen der Ambler-Klasse B können nicht durch die hier beschriebenen Inhibitoren gehemmt werden (BEBRONE ET AL., 2010).

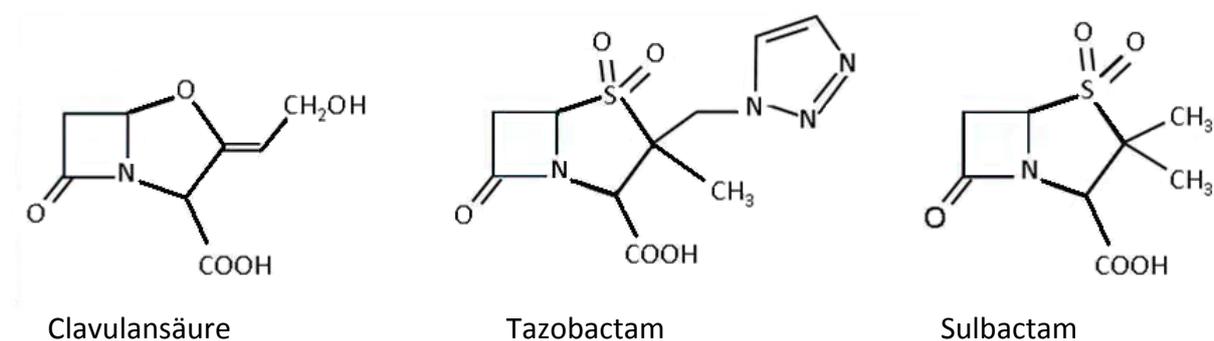


Abbildung 4: Grundgerüst der β -Lactamase-Inhibitoren (nach BABIC ET AL., 2006; DRAWZ UND BONOMO, 2010)

2.3 Extended-Spectrum-Beta-Lactamasen (ESBL)

Da es keine explizite Definition für den Begriff Extended-Spectrum- β -Lactamasen (früher „extended-broad-spectrum β -Lactamase“) gibt, werden diese allgemein hin als β -Lactamasen mit erweitertem Wirkspektrum beschrieben. Sie sind in der Lage Resistenzen gegenüber Penicillinen, Cephalosporinen der 2., 3. und 4. Generation sowie Monobactamen (Aztreonam) zu vermitteln, bisher jedoch nicht gegenüber Carbapenemen oder Cephamycinen. ESBL kommen bei verschiedenen *Enterobacteriaceae* vor und lassen sich durch die Inhibitor-substanz Clavulansäure hemmen (PATERSON UND BONOMO, 2005). Der Begriff wird bereits aufgrund der großen Variationsbreite der bekannten ESBL ausgedehnt, um einige Ausnahmen und auch grenzwertige β -Lactamasen miteinzubeziehen. Daher sollten die im Nachfolgenden beschriebenen „Enzym-Familien“-Bezeichnungen (z. B. CTX-M-ESBL) begleitend verwendet werden, um die jeweilige Familienzugehörigkeit eindeutig abzugrenzen (LIVERMORE, 2008).

2.3.1 Einteilung von ESBL

Zu den am häufigsten auftretenden ESBL-Varianten bzw. Familien bei *Enterobacteriaceae* gehören die SHV, TEM und CTX-M- β -Lactamasen. Die SHV- und TEM-ESBL sind durch Veränderungen der Aminosäuresequenzen aufgrund von Punktmutationen aus ihren phylogenetischen Vorgängern (SHV-1, TEM-1 bzw. TEM-2) hervorgegangen, die als β -Lactamase-Bildner bereits verbreitet waren, aber aufgrund ihres engen Wirkungsspektrums nicht zu den ESBL gehören (WITTE UND MIELKE, 2003). Aufgrund von Sequenzierungen ist bekannt, dass die *bla*SHV-Gene (sulfhydrylvariable-Gene) ursprünglich chromosomal bei *K. pneumoniae* vorlagen, bevor diese dann auf mobile Elemente übergingen und somit ein speziesübergreifender horizontaler Transfer über Plasmide ermöglicht wurde (STURENBURG UND MACK, 2003). Die TEM, deren Ursprung nicht weiter beschrieben ist, wurden nach der griechischen Patientin Temoneira benannt, bei der diese β -Lactamase-Bildner erstmals isoliert wurden (DATTA UND KONTOMICHALOU, 1965). Die „parentalen“ β -Lactamasen (SHV-1, TEM-1 bzw. TEM-2) sind bereits seit den 60er Jahren bekannt und wurden als „broad-spectrum“- β -Lactamasen bezeichnet, da diese in der Lage sind, Penicilline und auch z. T Cephalosporine der 1. Generation zu hydrolysieren (BRADFORD, 2001; WITTE UND MIELKE, 2003).

Die Punktmutationen führten durch einen Aminosäureaustausch insbesondere zu einer Änderung der β -Lactam-Bindungsstelle und dadurch zu einer Erweiterung des hydrolysierbaren Substratspektrums (BARTHELEMY ET AL., 1988; SIROT, 1995). Aufgrund der unterschiedlichen Austauschpositionen in der Gensequenz sind somit die Unterschiede im phänotypischen Substratspektrum und in der Potenz der gebildeten β -Lactamasen zu erklären. Insbesondere die Aminosäure-Position 164 für TEM, die Position 179 für SHV und für beide die Position 238 ermöglichen den ESBL, auch Cephalosporine der 3. Generation wie Ceftazidim zu hydrolysieren und ihr Substratspektrum zu erweitern (HULETSKY ET AL., 1993; WITTE UND MIELKE, 2003; BUSH, 2008).

Einzelmutationen der „parentalen“ SHV-1, TEM-1 bzw. TEM-2 können sowohl stille Mutationen ohne Strukturänderung bewirken (wie z. B. bei TEM-1_a, TEM-1_b oder TEM-1_c) als auch neue β -Laktamasen entstehen lassen. Diese gering veränderten β -Lactamasen bewirken oftmals nur einen geringen Anstieg der Hydrolysefähigkeiten. Die so entstandenen β -Lactamase-Bildner erscheinen in Empfindlichkeitsuntersuchungen oft noch als sensibel für Cephalosporine und sind somit „borderline“-ESBLs (z. B. TEM-12). Die meisten gefundenen SHV- oder TEM-Derivate zeigen allerdings zwei oder mehr wirksame Mutationen in ihrem Genom (WITTE UND MIELKE, 2003; LIVERMORE, 2008). Die bisher bekannten und neu hinzukommenden Derivate der ESBL werden stetig zusammengetragen und online zur Verfügung gestellt (<http://www.lahey.org/studie>).

Die Gruppe der CTX-M (Cefotaximase Munich) ESBL wurde erstmals 1989 in Deutschland nachgewiesen (BAUERNFEIND ET AL., 1990). Es handelt sich dabei um Plasmid gebundene, erworbene Resistenzen, von denen alle bisher bekannten Derivate zu den ESBL gehören (RAWAT UND NAIR, 2010). Ursprünglich waren die *bla*CTX-M chromosomal gelegene Gene der Gattung *Kluyvera* (PODSCHUN, 2012), die daraufhin auf mobile Elemente übergegangen sind und sich auch unter anderen *Enterobacteriaceae* verbreiten konnten (LIVERMORE, 2008; PFEIFER ET AL., 2010; RAWAT UND NAIR, 2010). Auch die Zahl der nachgewiesenen CTX-M Varianten nimmt stetig zu. Es sind zur Zeit etwa 120 verschiedene CTX-M Subtypen bekannt, die mittlerweile weltweit nachgewiesen werden und deshalb auch als „CTX-M-Pandemie“ bezeichnet werden (CANTON UND COQUE, 2006). CTX-M-15 ist dabei die in Europa am häufigsten nachgewiesene Variante bei *E. coli* Isolaten humanen Ursprungs (insbesondere *E. coli* ST131) (LIVERMORE, 2008; PFEIFER ET AL., 2010).

Aufgrund der heterogenen genetischen Variabilität werden die CTX-M-ESBL anhand von Strukturähnlichkeiten in fünf Unterruppen unterteilt: CTX-M_{-group1}, CTX-M_{-group2}, CTX-M_{-group8}, CTX-M_{-group9} und CTX-M_{-group 25/26}. Die CTX-M zeigen eine hohe Substrataffinität gegenüber Cefotaxim (Cepalosporin der 3. Generation), jedoch im Gegensatz zu anderen ESBL eine eher geringe Hydrolyseaktivität gegenüber Ceftazidim (Cephalosporin der 3. Generation) (BONNET, 2004).

Wie bereits erwähnt sind ESBL-Gene überwiegend Plasmid kodiert, wobei ein Plasmid mehrere β -Lactamase-Gene tragen kann (z. B. *bla*TEM-1 und *bla*CTX-M-15). Zusätzlich können auf einem solchen Plasmid noch weitere Gensequenzen enthalten sein, die gegenüber weiteren Antibiotika wie beispielsweise Aminoglycoside, Chloramphenicol, Sulfonamide, Trimethoprim oder auch Tetrazyklin Resistenzen vermitteln (BONNET, 2004; ROSSOLINI ET AL., 2008). Die Mobilisation der β -Lactamase Gene (*bla*-Gene) wird dabei über Klasse 1-Integrone vermittelt (GNIADKOWSKI, 2008).

Die SHV, TEM und CTX-M ESBL werden in die Ambler-Klasse A der Serin- β -Lactamasen bzw. in die Bush-Untergruppe 2be (e = extended spectrum) eingeteilt (siehe Tabelle 4). Jedoch gibt es neben diesen noch weitere ESBL-„Familien“, wie OXA, VEB, PER, GES, BES, BEL, SFO und TLA. Diese gehören zu den „minor“-ESBL-„Familien“, da sie entweder erst sehr selten oder nur lokal isoliert auftretend nachgewiesen wurden (PATERSON UND BONOMO, 2005; NAAS ET AL., 2008). Weitere Sonderformen stellen die Inhibitor-resistenten TEM (IRT) dar, die aufgrund ihrer evolutionären Mutationen nicht mehr durch Inhibitoren wie z. B. Clavulansäure hemmbar sind, aber immer noch relativ sensibel gegenüber Cephalosporinen reagieren. Sie treten seit den 1990er Jahren vor allem in klinischen Isolaten auf. Es sind bisher ca. 20 verschiedene IRT bekannt (NICOLAS-CHANOINE, 1997; PATERSON UND BONOMO, 2005). Ebenfalls wurden β -Lactamasen mit einer Kombination aus erweitertem Substratspektrum und Inhibitor-Resistenz in geringem Maße nachgewiesen und werden als „complex mutant“ TEM β -Lactamase (CMT) bezeichnet (CANTON ET AL., 2008). Zusätzlich zu den ESBL gibt es noch weitere Gruppen von β -Lactamasen, die in der Lage sind, ein erweitertes phänotypisch ähnliches Wirkungsspektrum zu inaktivieren. Zu diesen gehören u. a. die AmpC- β -Lactamasen, die Zink-Metallo- β -Lactamasen oder die KPC, die phänotypisch den ESBL ähnlich sind und die Identifizierung erschweren (PFEIFER ET AL., 2010).

2.3.2 Vorkommen und Verbreitung

Die ersten ESBL mit erweitertem Resistenzspektrum wurden in den 1980er Jahren entdeckt (KNOTHE ET AL., 1983). Viele ESBL bildende Erreger gehören zur Familie der *Enterobacteriaceae* und insbesondere *K. pneumoniae* und *E. coli* wurden vielfach als ESBL-Träger beschrieben. Des Weiteren können ESBL bei *K. oxytoca*, *Salmonella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Providencia* spp., *Serratia* spp. oder auch *Pseudomonas* spp. vorkommen (PFALLER UND SEGRETI, 2006; RKI, 2007; PFEIFER ET AL., 2010). ESBL bildende Bakterien (v. a. SHV- und TEM-Derivate) traten in den 1990er Jahren insbesondere als nosokomiale Infektionserreger in Intensivstationen beim Menschen auf. Dort besiedelten sie häufig Harnwege, Wunden oder Atemwege. Mittlerweile ist die Gruppe der CTX-M die am weitesten verbreitete ESBL in *Enterobacteriaceae* humanen Ursprungs weltweit (LIVERMORE, 2008; PFEIFER ET AL., 2010). ESBL wurden ebenfalls in vielen weiteren Matrices, wie Lebensmittel liefernden Tieren, Lebensmitteln, Begleittieren und gesunden Individuen nachgewiesen. Außerdem zeigten sich ESBL Isolate häufig als mehrfachresistent gegenüber weiteren Antibiotika (COQUE ET AL., 2008; IROHA ET AL., 2008).

Bezüglich des Vorkommens von ESBL beim Menschen gibt es trotz zahlreicher Nachweise keine eindeutigen Prävalenzen. VALVERDE ET AL. (2004) konnten jedoch steigende Nachweisraten bezüglich des Vorkommens von ESBL in der Bevölkerung feststellen. Bei einer vergleichenden Untersuchung wurde ein Anstieg der ESBL-Nachweise bei humanmedizinischen Patienten von 0,6 % in 1991 auf 7,0 % in 2003 ermittelt. Zusätzlich gelangen ESBL-Nachweise in der gesunden Normalbevölkerung bei 3,7 % (VALVERDE ET AL., 2004) bzw. 6,6 % (VINUE ET AL., 2009) und in China sogar bei 50,5 % der untersuchten Isolate (LI ET AL., 2011A). Auch die jährlich veröffentlichten Berichte des European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) über die aktuelle Resistenzlage humanmedizinischer Isolate im europäischen Vergleich konnten steigende Nachweisraten in der Humanmedizin registrieren. Im aktuellen EARS-Net Surveillance Report 2010 (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network) wurden im Durchschnitt 8,5 % der humanmedizinischen *E. coli* Isolate in Europa als resistent gegenüber Cephalosporinen der 3. Generation eingestuft, von denen 65-100 % als ESBL identifiziert wurden (ECDC, 2011).

In Deutschland waren 8,4 % der klinischen *E. coli* Isolate resistent gegenüber Cephalosporinen der 3. Generation. Die geringsten ESBL-Nachweise wurden in den skandinavischen Ländern, wie Schweden, Norwegen, und Finnland erzielt, wohingegen die höchsten ESBL-Nachweisraten in Italien, Ungarn und Rumänien mit mehr als 20,0 % erfolgten (COQUE ET AL., 2008; ECDC, 2011) (Abbildung 5).

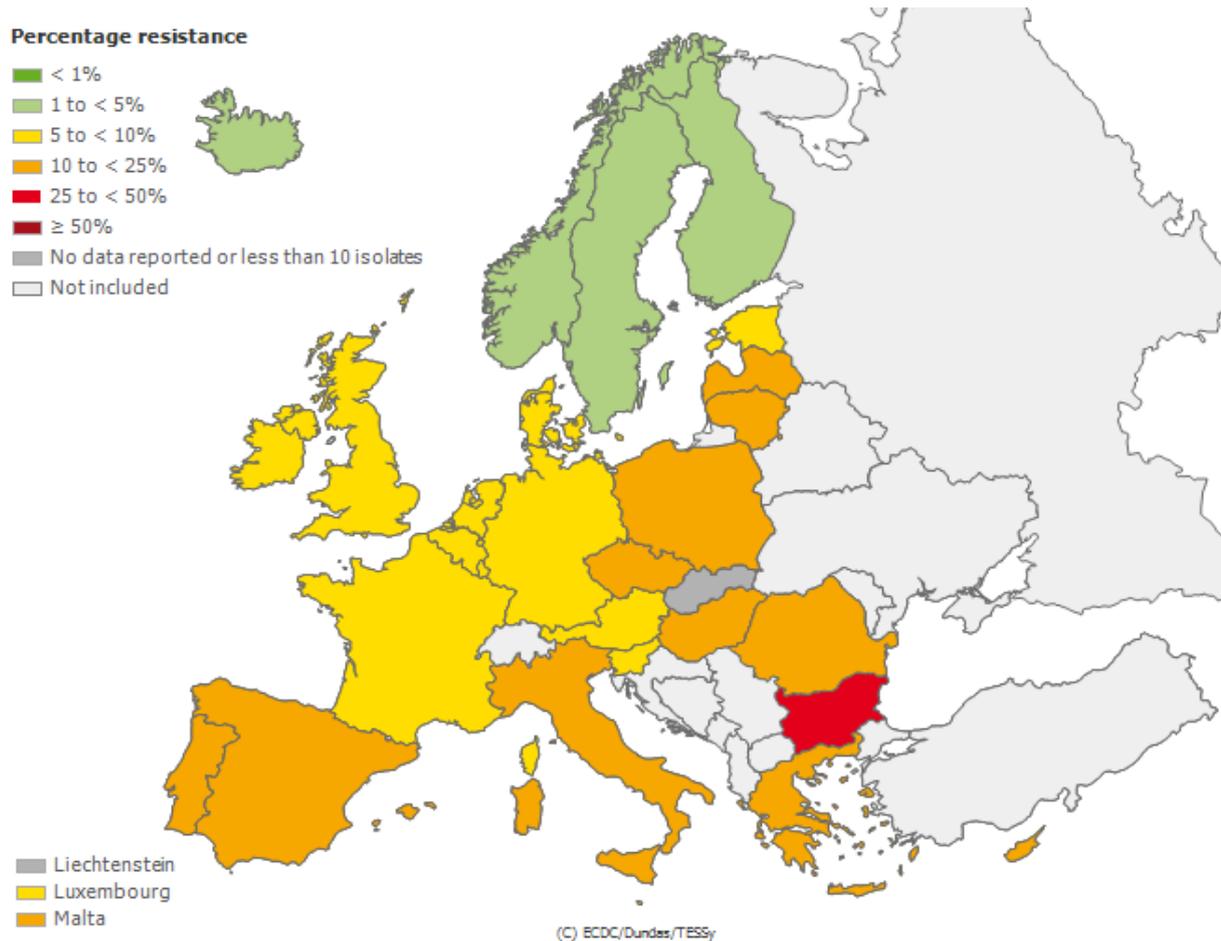


Abbildung 5: Verteilung der resistenten (+ intermediären) *E. coli* Isolate gegenüber Cephalosporinen der 3. Generation in 2010 (ECDC, 2012)

Im „GERMAP“ Antibiotika-Resistenz Bericht 2010, der vom Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) herausgegeben wurde, wurde für Deutschland ein Anstieg der ESBL bildenden Stämme von 1,0 % auf 9,9 % seit 1995 verzeichnet (GERMAP, 2011).

Auch im Bereich der Lebensmittel-liefernden Tiere sind Unterschiede in Bezug auf ESBL-Nachweisraten vorhanden. So konnten im europäischen Vergleich durch die ECDC in durchschnittlich 1,6 % der bovinen *E. coli* Isolate, in 2,3 % der porcinen Isolate und bei 8,5 % der Geflügelisolate eine Resistenz gegenüber Cefotaxim ermittelt werden (EFSA, 2011A). In Deutschland wurde innerhalb einer Prävalenzstudie, die Teil der nationalen GermVet (von der Zulassungsbehörde BVL aufgelegtes Monitoringprogramm zur Einschätzung der Resistenzlage) Studie 2005/2006 war, ein Vorkommen ESBL-produzierender *E. coli* bei erkrankten Nutztieren von 1,7 % nachgewiesen. Das ESBL-Vorkommen innerhalb der Tierart Rind lag bei insgesamt 3,0 %, davon lag der Anteil der ESBL bildenden *E. coli* aus Enteritiden höher als bei Isolaten, die aus Mastitiden nachgewiesen wurden (BÜCHTER, 2010). In den aktuellen Untersuchungen des deutschen Resistenz-Forschungsverbundes „RESET“ wurde das Vorkommen von ESBL in Nutztierbeständen untersucht. Entsprechend der vorläufig veröffentlichten Ergebnisse waren 67,0 % der untersuchten Rinderbestände, 88,0 % der untersuchten Schweinebestände und 100 % der untersuchten Geflügelbestände ESBL-verdächtig. Die ESBL-verdächtigen *E. coli* wurden sowohl im Stall, auf dem Boden, in der Stallumgebung als auch in der Gülle nachgewiesen, jedoch bisher noch nicht bestätigt. Die endgültigen Ergebnisse sowie Aussagen über Einzeltiernachweise stehen noch aus (ANYNOMUS, 2012).

Im europäischen Vergleich wurden ähnlich hohe Prävalenzen ermittelt. So konnten in Dänemark für *E. coli* beispielsweise 10,0 % der bovinen, 11,0 % der porcinen und 27,0 % der Isolate aus Wirtschaftsgeflügel als resistent gegenüber Cephalosporinen der 3. Generation ermittelt werden (DANMAP, 2011). Während des Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring (SWARM) 2010 zeigten 34,0 % der untersuchten Geflügelisolate eine verringerte Empfindlichkeit gegenüber Cephalosporinen der 3. Generation, von denen 6,0 % als ESBL und 28,0 % als AmpC (CMY-2) identifiziert werden konnten (SWARM, 2011). Im niederländischen Resistenzmonitoring (MARAN) waren 1,5 % der Isolate aus Milchkühen, 2,3 % der Kälberisolate, 3,7 % der Schweineisolate und 17,9 % der untersuchten Geflügelisolate resistent gegenüber Cefotaxim/Ceftazidim (MARAN, 2011). Insgesamt sind aktuell die häufigsten nachgewiesenen ESBL-Gene aus tierischen *E. coli* und *Salmonella* spp. Isolaten *bla*CTX-M-1, *bla*CTX-M-14 gefolgt von *bla*TEM-52 und *bla*SHV-12 (CARATTOLI, 2008).

Bezüglich der ESBL-Nachweisraten bei Lebensmitteln tierischen Ursprungs zeigten im Rahmen des nationalen Zoonosen-Stichprobenplans 2009 des Bundesinstitutes für Risikobewertung (BfR) in Deutschland 3,0 % der *E. coli* Isolate aus Kalbfleisch, 2,2 % der Isolate aus Schweinefleisch und 6,2 % der Isolate aus Hähnchenfleisch Resistenzen gegen mindestens ein Cephalosporin der 3. Generation (BfR, 2010). Anderweitige Quellen berichten über z. T. hohe Nachweisraten von ESBL bildenden *E. coli* in Lebensmitteln (BERGENHOLTZ ET AL., 2009; DIERIKX ET AL., 2010; OVERDEVEST ET AL., 2011). Dies ist besonders im Nutztier-Bereich der Fall, wo bei 26,0 % der untersuchten Lebensmittel tierischen Ursprungs aus Rind und Geflügel ESBL-Bildner identifiziert worden sind (JOUINI ET AL., 2007). Das niederländische Resistenzmonitoring wies Resistenzraten gegenüber Cephalosporinen der 3. Generation in Höhe von 21,3 % bei Geflügelfleisch, 7,7 % in Rindfleisch und 1,3 % in Schweinefleisch nach (MARAN, 2011). LEVERSTEIN VAN HALL ET AL. (2011) konnten in bis zu 94,0 % der Geflügelfleischisolate aus dem niederländischen Einzelhandel phänotypische ESBL-Resistenzmuster aufzeigen. In weiterführenden Untersuchungen auf Gen-, Plasmid- und Stammebene konnten die für Geflügel typischen ESBL-TEM-52 und CTX-M-1 sowohl in Geflügel-, als auch in entsprechenden humanen Isolaten nachgewiesen werden, sodass eine Übertragung über die Lebensmittelkette zu vermuten ist (LEVERSTEIN-VAN HALL ET AL., 2011). Somit könnte Wirtschaftsgeflügel ein mögliches Reservoir für ESBL bildende *E. coli* sein. Ein weiteres Anzeichen auf eine hohe Durchseuchung im Bereich Geflügelfleisch zeigt die Stichprobenuntersuchung des Bundes für Umwelt und Naturschutz Deutschland (BUND) im Januar 2012, die in 55,0 % der untersuchten Geflügelprodukte aus Supermarktketten ESBL nachweisen konnten (BIRKEL, 2012).

Neben den Nutztieren konnten auch wild lebende Tiere bereits als Träger von ESBL bildenden *E. coli* identifiziert werden. POETA ET AL. (2009) konnten in 10,9 % der untersuchten Schwarzwild-Proben aus Portugal entsprechende Resistenzen nachweisen. Hingegen zeigten Untersuchungen bei Schwarzwild-Proben aus Tschechien und der Slowakei eine Nachweisrate von 2,0 % ESBL-Bildnern, sowie keinen Nachweis von ESBL-Trägern bei den untersuchten Rotwild- (*Cervus elaphus*) oder Reh-Proben (*Capreolus capreolus*) (LITERAK ET AL., 2010). In den Wildtier-Untersuchungen von COSTA ET AL., 2006 konnte insgesamt in neun Isolaten das Vorliegen von ESBL nachgewiesen werden, von denen u. a. zwei Isolate aus Wildwiederkäuern stammten. Diese ESBL bildenden Isolate trugen das *bla*TEM-52 Gen,

zeigten jedoch keine weiteren Unempfindlichkeiten gegenüber anderen antimikrobiell wirksamen Substanzen (COSTA ET AL., 2006). Neben dem ESBL Nachweis bei lebenden Nutz- und Wildtieren sowie aus Lebensmitteln tierischen Ursprungs konnten auch bereits auf pflanzlichen Lebensmitteln Erreger mit Resistenzgenen gegenüber Cephalosporinen nachgewiesen werden (RUIMY ET AL., 2010).

2.3.3 Bedeutung für Mensch und Tier

Die Probleme für Human- und Tiermedizin entfalten sich in der Regel, sobald Infektionen mit ESBL bildenden Erregern auftreten, die nicht mehr im normalen Rahmen der Behandlungsmöglichkeiten therapiert werden können. Die Infektion mit ESBL-tragenden *E. coli* führt besonders bei Intensivpatienten häufig zu Komplikationen im Krankheitsverlauf in Form von längerer Infektionsdauer, Therapieversagen oder sogar zu einer höheren Mortalitätsrate, verglichen zu Infektionen mit Nicht-ESBL-Bildnern (KANG ET AL., 2004; PATERSON ET AL., 2004; MELZER UND PETERSEN, 2007; TUMBARELLO ET AL., 2007; SCHULTSZ UND GEERLINGS, 2012).

Gerade bei nosokomialen Ausbrüchen können die Bakterienstämme im Krankenhaus leicht von Patient zu Patient, aber auch von Ort zu Ort verbreiten werden (ARPIN ET AL., 2003; BUSH, 2008; GERMAP, 2011). So erkrankten beispielsweise 2011 während eines ESBL-*K. pneumoniae*-Ausbruches 25 Säuglinge der neonatologischen Intensivstation in Bremen von denen mindestens drei verstarben (STAUCH, 2011). Die Komplikationen bei Infektionen mit ESBL-Bildnern werden u. a. auf eine insgesamt steigende Prävalenz (inklusive gastrointestinaler Kolonisierung) (PATERSON, 2006; COQUE ET AL., 2008) und auf unzureichende Initialtherapien zurückgeführt (PATERSON, 2006), insbesondere bei Patienten mit unbekanntem ESBL-Status, wenn keine entsprechend angepasste Medikation stattfinden konnte. Als Mittel der Wahl bei humanen ESBL-Infektionen gelten zurzeit die Wirkstoffvertreter aus der Gruppe der Carbapeneme (PATERSON, 2006; RAWAT UND NAIR, 2010), die für die Veterinärmedizin nicht zur Verfügung stehen. Allerdings treten mittlerweile auch gelegentliche Resistenzen gegenüber den Carbapenemen auf, sodass die Gruppe der β -Lactam-Antibiotika stufenweise ihre Wirkung zu verlieren droht (WITTE UND MIELKE, 2003; SCHULTSZ UND GEERLINGS, 2012) (Abbildung 6).

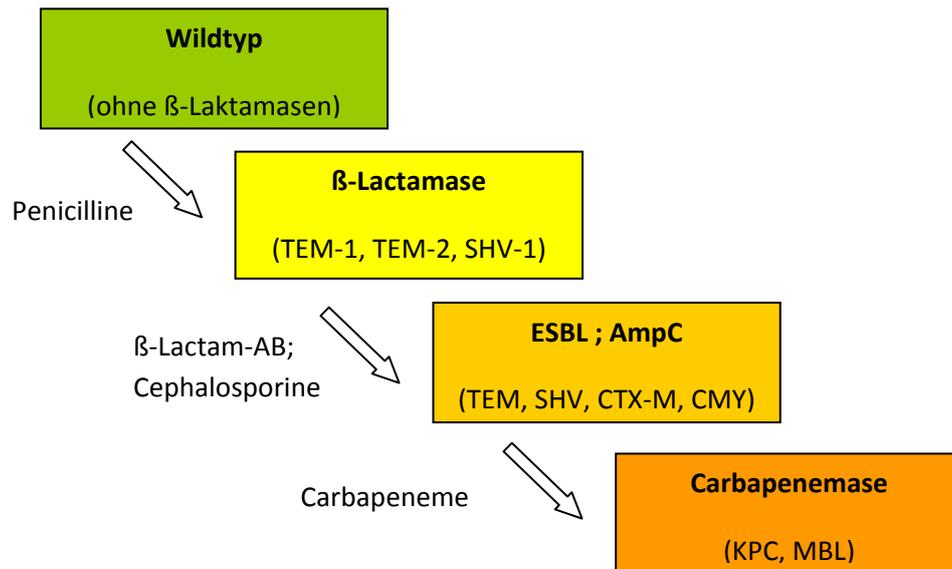


Abbildung 6: Evolution der β -Lactamase Resistenz bei gramnegativen Bakterien (ICAAC, 2011)

Eine weitere Schwierigkeit besteht im Zusammenhang mit dem Nachweis der ESBL, da einige ESBL-Bildner in den in-vitro Empfindlichkeitstestungen als noch sensibel eingestuft werden, jedoch im Gewebe eine klinische Resistenz zeigen können (LIVERMORE UND BROWN, 2001). Außerdem variieren Geschwindigkeit bzw. Sensitivität der Nachweistests und sind somit schlecht vergleichbar (TZELEPI ET AL., 2000; STÜRENBURG ET AL., 2004), sodass diese „versteckten Resistenzen“ den klinischen Erfolg herab setzen könnten (MOLAND ET AL., 1998). Des Weiteren erschwert das zusätzliche Auftreten weiterer Resistenzgene gegenüber anderen Wirkstoffklassen die Therapiemöglichkeiten bzw. Aussichten auf Genesung des Patienten (SCHULTSZ UND GEERLINGS, 2012).

2.3.4 Charakterisierungsmethoden von ESBL

Die Charakterisierung von ESBL erfolgt phänotypisch und/oder genotypisch. Die phänotypischen Untersuchungsmethoden basieren auf der Untersuchung der Unempfindlichkeit gegenüber antimikrobiellen Substanzen mit erweitertem Wirkungsspektrum, sowie der Hemmbarkeit durch einen Inhibitor. Die meisten Methoden beruhen auf Empfindlichkeitstestungen von Cephalosporinen und werden anhand von Dilutions- bzw. Diffusionsverfahren routinemäßig durchgeführt (Rki, 2007; MACK, 2009). Aufgrund unterschiedlich ausgeprägter Hydrolyseaktivitäten gegenüber verschiedenen antimikrobiell wirksamen Substanzen und dem potenziellen Auftreten von ESBL-Bildnern im klinisch empfindlichen Bereich, wird in der Regel nicht nur anhand der Kategorien sensibel, intermediär oder resistent eine Zuordnung zu den ESBL vorgenommen. Es gibt keine einheitlichen Regelungen wie der endgültige Nachweis eines ESBL-Bildners zu erfolgen hat, insbesondere da auch die Definition eines ESBL unterschiedlich weit gefasst wird. Bei den phänotypischen ESBL-Nachweisen wird häufig ein vorgeschaltetes Screening durchgeführt, um die Nachweisrate zu erhöhen (EFSA, 2011A).

Für das Screening auf ESBL werden bei *E. coli* regelmäßig folgende Cephalosporine herangezogen: Cefotaxim, Ceftazidim, Cefpodoxim, Ceftriaxon, Aztreonam, z. T. Cefepim oder auch Cefoxitin für den AmpC-Nachweis. Die phänotypische Bestätigung erfolgt meistens durch einen Vergleich von Ceftazidim und Cefotaxim mit einer Kombination aus dem Einzelwirkstoff zusammen mit einem Inhibitor (z. B. Clavulansäure) (DRIEUX ET AL., 2008). Es sollten mindestens diese beiden Cephalosporine für die Bestätigung herangezogen werden, da die meisten ESBL eine dieser beiden Substanzen hydrolysieren können (MACK, 2009). Die messbare Wachstumshemmung sollte für eine eindeutige Zuordnung als ESBL mindestens drei MHK-Konzentrationsstufen (Bouillondilution) bzw. mehr als 5 mm Durchmesser (Agardiffusion) betragen. Optional sollte bereits während der Erregerisolation eine Anreicherung mit gering konzentrierten Cephalosporinen erfolgen (CLSI, 2008; EFSA, 2011A). Andererseits konnte in neueren Untersuchungen festgestellt werden, dass die Bestätigung mit der alleinigen Verwendung von Ceftazidim und Cefotaxim nicht ausreichend ist, um alle ESBL sicher identifizieren zu können.

Die Sensitivität kann hingegen durch den zusätzlichen Einsatz von Cefepim (4. Generation-Cephalosporin) erhöht werden. Gerade beim Vorliegen multipler β -Lactamasen, die sich gegenseitig überdecken, sollte Cefepim zusätzlich verwendet werden, da es dank seiner stabileren Struktur zuverlässiger durch ESBL hydrolysiert wird (TZELEPI ET AL., 2000; STÜRENBURG ET AL., 2004; DRIEUX ET AL., 2008; MOHANTY ET AL., 2010). Andere Resistenzmechanismen wie IRT, eine Überproduktion der „Breitspektrum“ Nicht-ESBL oder auch Cephalosporinasen können eine ESBL „vortäuschen“, bzw. zeigen identische phänotypische Resistenzmuster; daher ist es evtl. nötig andere Resistenzmöglichkeiten vorher auszuschließen (KPC, AmpC, MBL) (DRIEUX ET AL., 2008). Gerade beim Vorliegen eines AmpC-Hyperproduzenten zusätzlich zu einer ESBL kann möglicherweise ein entsprechendes Resistenzmuster verdeckt werden (MACK, 2009).

Die genotypischen Charakterisierungsmethoden für ESBL basieren auf dem spezifischen Nachweis von *bla*-Genen. Daher ist es möglich, die ESBL ihren „Familien“ zuzuordnen, unabhängig von der Expression oder sich evtl. unterscheidenden Grenzwerten, besonders da die phänotypischen Verfahren zum Nachweis noch immer mit Sensitivitäts- und Spezifitätsproblemen behaftet sind (MACK, 2009). Der Gennachweis wird meistens über verschiedene PCR-Verfahren, DNA-Microarrays und im Anschluß über Sequenzierung geführt (DRIEUX ET AL., 2008). SPARBIER ET AL. (2012) beschrieben zusätzlich die Möglichkeit der β -Lactamase-Identifizierung mittels MALDI-TOF. Der Nachweis eines *bla*SHV bzw. *bla*TEM sollte durch Sequenzierung noch weiter von den Breitspektrum-Derivaten (SHV-1, TEM-1 und TEM-2) abgegrenzt werden. Bei einem Nachweis eines *bla*CTX-M erfolgt in der Regel eine Einteilung in eine der fünf phylogenetischen Untergruppen: CTX-M-group 1,2,8,9,25/26 (WITTE UND MIELKE, 2003; BONNET, 2004).

2.4 Shigatoxin-Gen tragende *Escherichia coli*

Escherichia coli gehören mit einer Keimzahl zwischen 10^4 und 10^9 Kolonie bildenden Einheiten (KbE) pro g zu der normalen Darmflora von Mensch und Tier. Zusätzlich sind *E. coli* in der Lage spezifische Pathogenitätsfaktoren aufzunehmen und als fakultativ bzw. obligat pathogene Erreger intestinale und extraintestinale Erkrankungen auszulösen. Die durch diese pathogenen *E. coli* hervorgerufenen Krankheitsbilder äußern sich meistens als intestinale Erkrankungen, Harnwegsinfektionen oder Meningitiden/Sepsis. Die intestinalen Pathotypen werden unterschieden in die enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC), die enteropathogenen *E. coli* (EPEC), die enterotoxischen *E. coli* (ETEC), die enteroaggregativen *E. coli* (EAEC), die enteroinvasiven *E. coli* (EIEC) und die diffus adhärenenten *E. coli* (DAEC). Die extraintestinalen Pathotypen wiederum unterteilen sich in die uropathogenen *E. coli* (UPEC), die ursächlich für Harnwegsinfektionen verantwortlich sind und die Meningitis-assoziierten *E. coli* (MNEC), die Septiken oder Meningitiden verursachen. Als rein tierassoziierte Form wurden des Weiteren aviäre pathogene *E. coli* (APEC) beschrieben, die ebenfalls extraintestinale Erkrankungen hervorrufen (NATARO UND KAPER, 1998; KAPER ET AL., 2004).

Der Pathotyp EHEC entspricht dabei der klinisch apparenten Infektion mit Shigatoxin bildenden *E. coli* beim Menschen. Diese enteropathogenen *E. coli* wurden erstmals Ende der 1970er Jahre entdeckt. Sie bildeten ein Toxin, das eine strukturelle Verwandtschaft mit dem Shigatoxin (Stx) von *Shigella dysenteriae* Typ 1 aufwies bzw. in der Lage war, eine zytotoxische Wirkung auf Verozellen auszuüben (KONOWALCHUK ET AL., 1977; O'BRIEN ET AL., 1982). Daher wurden in der Nomenklatur sowohl die Bezeichnungen Shigatoxin bildende *E. coli* als auch Verotoxin bildende *E. coli* synonym für diese Erreger verwendet (ACHESON, 1998). Im folgenden wird die Bezeichnung Shigatoxin-Gen tragende *E. coli* (STEC) verwendet, wenn die Expression der Toxine nicht weiter untersucht wurde und nur ein *stx*-Gennachweis erfolgt ist. Im Hinblick auf epidemiologische Zusammenhänge werden die pathogenen *E. coli* anhand ihrer Oberflächen-Antigenstruktur in verschiedene Serogruppen unterteilt. Die weltweit am häufigsten isolierte EHEC-Serogruppe ist O157. Weitere häufig isolierte Serogruppen in Deutschland sind die Serogruppen O26, O91, O103 und O145 (KARCH ET AL., 2005; RKI, 2011B).

2.4.2 Virulenzgene

Die STEC werden durch den Nachweis der Virulenzgene von anderen *E. coli* abgegrenzt, wobei vor allem die Toxin-kodierenden Gene für *stx1* und *stx2* detektiert werden. Innerhalb der beiden *stx*-Hauptgruppen werden zudem verschiedene Varianten unterschieden: bei *stx1* werden *stx1a*, *stx1c* und *stx1d* gefunden, wohingegen *stx2* in die Subtypen *stx2a*, *stx2b*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f* und *stx2g* unterteilt werden kann (MELTON-CELSA ET AL., 2007; FENG ET AL., 2011). Die Übertragung der Phagen kodierten *stx*-Gene kann sowohl vertikal als auch horizontal erfolgen und die Gene können auch auf andere Pathotypen von *E. coli* übergehen. Andererseits wurde auch beschrieben, dass STEC ihre Toxin tragenden Gene während einer Infektion relativ schnell wieder verlieren können (MELLMANN ET AL., 2005; BIELASZEWSKA ET AL., 2007). Neben den *stx*-Genen werden noch weitere Virulenzgene wie beispielsweise das *eae*-Gen (Intimin) oder das *hlyA*-Gen (HämolysinA), etc. unterschieden, deren Anwesenheit die Infektion und das damit verbundene Krankheitsbild beeinflussen können (GYLES, 2007).

Strukturell setzen sich die Stx-Toxine aus einer A- und fünf B-Untereinheiten zusammen. Dabei vermittelt die B-Untereinheit die Endozytose des Toxins durch eine spezifische Bindung an die Globotriaosylceramid (Gb3)-Glycolipid-Rezeptoren der Zelloberfläche, wohingegen die A-Einheit an den Ribosomen als N-Glycosidase agiert, die einen Adenin-Rest der 28S-Untereinheit der rRNA spaltet und somit die Protein-Synthese der Zellen hemmt und damit die Apoptose induziert (MELTON-CELSA ET AL., 2007). Das Stx2 weist meist eine höhere Virulenz auf und ist demzufolge häufiger bei schwerwiegenden Krankheitsverläufen anzutreffen (BOERLIN ET AL., 1999; LEFEBVRE ET AL., 2009). Die STEC sowie deren Toxine sind hitzelabil und können daher durch eine thermische Behandlung zerstört werden. Die Empfehlung lautet daher, entsprechende Lebensmittel boviner Herkunft während der Zubereitung für mind. 2 min auf 70 °C zu erhitzen (EC, 2003; WHO, 2011).

2.4.3 Vorkommen und Bedeutung beim Menschen

Da die pathogenen *E. coli* und insbesondere die EHEC eine große Rolle als Lebensmittelinfektionserreger spielen, sind derzeit sämtliche intestinal-pathogenen *E. coli* nach dem Infektionsschutzgesetz (IfSG) meldepflichtig (ANONYMUS (2000)). Als EHEC werden die Shiga-toxin-Gen tragenden *E. coli* bezeichnet, die beim Menschen mit klinisch sichtbaren Krankheitsbildern assoziiert sind. Wenn jedoch keine nachweisliche Infektion vorliegt, werden sie als STEC bezeichnet. Obwohl nicht zwangsläufig alle STEC zu einer klinisch manifesten Erkrankung führen müssen, werden sie dennoch als potentiell gefährlich angesehen (RKI, 2011B). Die ersten Erkrankungsfälle beim Menschen, die auf enteropathogene *E. coli* des Serotyps O157:H7 zurückgeführt werden konnten, wurden 1982 in den USA nachgewiesen, wobei die Fälle nach dem Verzehr von ungenügend erhitztem Rindfleisch auftraten (RILEY ET AL., 1983). Die Übertragung der STEC erfolgt direkt oder indirekt fäkal-oral, wobei insbesondere bei Risikogruppen bereits eine geringe Dosis von < 100 Zellen für eine Infektion ausreichend sein können. Die Transmission kann daher von Mensch zu Mensch, über kontaminierte Lebensmittel und Trinkwasser oder auch über engen Kontakt zu Tieren (z. B. im Stall, Streichelzoo) erfolgen (KARMALI, 2004; RKI, 2011B).

Die Infektion mit EHEC kann zum Einen klinisch inapparent verlaufen, wobei eine symptomlose Ausscheidung über mehrere Monate möglich ist (GAREIS ET AL., 2000) und kann Andererseits auch als klinisch manifeste, mit Enteritits und Vomitibus einhergehende hämorrhagische Kolitis (HC) in Erscheinung treten (RKI, 2011B). In 5-10 % der klinisch apparenten EHEC-Infektionen verursachen die aktiven Shigatoxine das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS), das vor allem durch die Trias eines akuten Nierenversagens, einer Thrombozytopenie und einer mikroangiopathischen hämolytischen Anämie gekennzeichnet ist (KARMALI, 2004). HUS geht in der Akutphase mit einer Letalität von ungefähr 2 % einher und kann ebenfalls als Komplikation einer EHEC-assoziierten Harnwegsinfektion vorkommen (TARR ET AL., 1996). HUS tritt häufig bei Säuglingen, Kleinkindern und älteren Personen auf (RKI, 2011B), kann jedoch alle demographischen Altersstufen erfassen (RKI, 2011A).

Infektionen mit EHEC werden vornehmlich symptomatisch behandelt, da antibiotische Anwendungen die zusätzliche Bildung der phagenkodierten Stx-Toxine induzieren können und daher nicht empfohlen werden (SERNA UND BOEDEKER, 2008; DGI, 2011; SMITH ET AL., 2012).

Dennoch besteht in manchen Fällen die Notwendigkeit einer antibiotischen Therapie wie beispielsweise während des Ausbruchsgeschehen in Deutschland 2011. Der Effekt einer antimikrobiellen Therapie zeigte bei den dort beteiligten STEC-Stämmen Unterschiede hinsichtlich der eingesetzten Wirkstoffe. So konnte festgestellt werden, dass Ciprofloxacin die Stx-Produktion verstärkte, während einige Antibiotika wie beispielsweise Meropenem, Rifaximin oder Tigecyclin die Phagenproduktion und damit den Stx-Titer reduzierte (BIELASZEWSKA ET AL., 2012). Das Vorkommen von EHEC-Infektionen lag nach Angaben des RKI 2010 bei insgesamt 918 Fällen und 2011 bei insgesamt 4.903 gemeldeten Fällen, wobei die Daten aus dem Jahr 2011 ein größeres Ausbruchsgeschehen (BIELASZEWSKA ET AL., 2011; BUCHHOLZ ET AL., 2011; RKI, 2011A) und die Daten aus 2010 ein „durchschnittliches“ Vorkommen in Deutschland widerspiegeln (RKI, 2012).

2.4.4 Vorkommen und Bedeutung bei Wiederkäuern

STEC konnten bisher aus vielen verschiedenen Tierarten isoliert werden. So konnten beispielsweise BEUTIN ET AL. (1993) bei 208 von 720 untersuchten *E. coli* Isolaten von gesunden Rindern, Schafen, Ziegen, Schweinen als auch bei Hunden und Katzen *stx*-Gene nachgewiesen. Die häufigsten Nachweise kamen bei Wiederkäuerisolaten vor (Schaf 66,6 %, Ziege 56,1 %, Rind 21,1 %). Auch SCHROEDER ET AL. (2002) fanden die höchsten STEC Nachweisraten beim Rind (34,0 %), gefolgt von 27,0 % STEC aus humanen Isolaten, 14,0 % aus nicht-Lebensmittel liefernden Tieren und 12,0 % bei Schweineisolaten. In einer Studie von BLANCO ET AL. (1997) wurde das Vorkommen von STEC in gesunden Wiederkäuerbeständen untersucht; hier ergaben 35,0 % der untersuchten Kühe und 37,0 % der untersuchten Kälber STEC-positive Resultate. Die Prävalenzangaben variieren zwischen 0 %-70 % (BONARDI ET AL., 2001). Bei Prävalenzstudien in Bezug auf Wildwiederkäuer konnten u.a. in 7,8 % bzw. 23,9 % der Isolate STEC gefunden werden (SANCHEZ ET AL., 2009; BARDIAU ET AL., 2010). Bei Untersuchungen von EGGERT ET AL. (2012) ergab sich ein Vorkommen von 42,0 %, während die Arbeitsgruppe von LEHMANN ET AL. (2006) ein Vorkommen von 51,8 % STEC bei einheimischen Wildwiederkäuern feststellte. Da Wiederkäuer im Allgemeinen klinisch inapparente Träger von STEC sein können (WIELER UND BAUERFEIND, 2003) bzw. nur in seltenen Fällen in Verbindung mit Kälberdurchfall gebracht werden (WIELER ET AL., 1996; NAYLOR ET AL., 2005)

gelten Wiederkäuer insgesamt als das natürliche Reservoir für STEC (BEUTIN ET AL., 1993; HUSSEIN, 2007; FLI, 2011). Die Ausscheidungsdauer der STEC variiert stark und ist sowohl vom einzelnen Individuum als auch vom Alter abhängig. So kann die Ausscheidung von STEC von einer Woche über mehrere Monate andauern (GRAUKE ET AL., 2002; BÜLTE, 2004), wobei Jungtiere insgesamt eine längere und höhere Ausscheidungsrate aufwiesen, als adulte (CRAY UND MOON, 1995; HEUVELINK ET AL., 1998). Die Haltungsform scheint nach Ansicht des Friedrich-Loeffler-Institutes (FLI) dabei keinen Einfluss auf das Vorkommen von STEC zu haben (FLI, 2011).

2.4.5 Aktuelle Resistenzlage

Obwohl STEC insgesamt eine geringe Resistenzrate aufweisen (15,5 %) (BETTELHEIM ET AL., 2003), werden regelmäßig resistente Isolate detektiert (ZHAO ET AL., 2001; MORA ET AL., 2005). So zeigten in der Untersuchung von BUVENS ET AL. (2010) 33,8 % aller untersuchten STEC Isolate humanen Ursprungs mindestens eine Unempfindlichkeit gegenüber einer der getesteten antimikrobiell wirksamen Substanzen. Die häufigsten Resistenzen konnten gegenüber Streptomycin (27,8 %), Sulfonamiden (26,8 %), Tetrazyklin (19,5%) und Ampicillin (14,2 %) ermittelt werden und eine Co-Resistenz aller vier Wirkstoffe trat in 19,5 % der Fälle auf. Außerdem konnten bei weiteren Empfindlichkeitstestungen bei STEC auch aus Isolaten bovinen Ursprungs Resistenzen gegenüber Streptomycin (17,1 %), Sulfonamiden (15,7 %), Ampicillin (7,1 %), Tetrazyklin (5,7 %) und Trimethoprim (4,3 %) nachgewiesen werden (BUVENS ET AL., 2010). Ähnliche Resistenzmuster ergaben sich in einer von LEE ET AL. (2012) durchgeführten Studie, bei der 52,0 % der bovinen STEC Isolate Resistenzen gegenüber mindestens einem antimikrobiellen Wirkstoff zeigten und 39,0 % der untersuchten STEC unempfindlich gegenüber mehreren Wirkstoffen waren. Die höchsten Resistenzraten wurden dabei gegenüber Tetracylin (39,0 %), Streptomycin (35,0 %) und Ampicillin (22,0 %) ermittelt (LEE ET AL., 2012). In der Untersuchung von MORA ET AL. (2005) zeigten 41,0 % aller untersuchten non O157-STECS (sowohl human- als auch veterinärmedizinische Isolate) mindestens eine Unempfindlichkeit gegenüber einem antimikrobiellem Wirkstoff, wobei 92,0 % der resistenten Isolate Mehrfachresistenzen aufwiesen. Das häufigste Resistenzmuster war hier Sulfisoxazole–Tetrazyklin–Streptomycin.

Bezüglich eines Zusammenhangs zwischen den *stx*-Genen und den vorliegenden Resistenzmustern variieren die Ergebnisse. So konnten z.T. keine Unterschiede zwischen *stx1* und/oder *stx2* beherbergenden Isolaten und einem Resistenzaufkommen nachgewiesen werden (BUVENS ET AL., 2010; LEE ET AL., 2012). Andererseits zeigten unterschiedliche Untersuchungen ein signifikant höheres Auftreten von Resistenzen bei STEC, die das *stx1*-Gen tragen (SCHMIDT ET AL., 1998; MORA ET AL., 2005).

Das Vorkommen von ESBL bildenden STEC wurde erstmals 2004 bei einem neun-jährigen Mädchen mit Enteritis beschrieben (ISHII ET AL., 2005). Weitere Nachweise von ESBL bei STEC erfolgten bisher eher sporadisch (KON ET AL., 2005; BUVENS ET AL., 2010). Ein größeres Ausbruchsgeschehen mit einem als ESBL identifizierten EHEC ereignete sich im Jahr 2011 in Deutschland, bei dem 855 Fälle von HUS und 2.987 Fälle akuter Gastroenteritis auftraten (FRANK ET AL., 2011; RKI, 2011A). Weitere Nachweise von ESBL bei STEC gelangen vom Kalb (VALAT ET AL., 2012) sowie aus bovinen Nebenprodukten (LEE ET AL., 2012) (Tabelle 5).

Tabelle 5: Bisherige ESBL-Nachweise aus STEC Isolaten verschiedenen Ursprungs

Probenmaterial	Serotyp	Virulenzgene	ESBL-Gen	Quelle
Humane Stuhlprobe	O26:H11	<i>stx1, eae, hlyA</i>	<i>bla</i> CTX-M-18	ISHII ET AL. 2005
Humane Stuhlprobe	O26:H11	f. A.	<i>bla</i> CTX-M-3	KON ET AL. 2005
Humane Stuhlprobe	O26:H-	f. A.	<i>bla</i> TEM-52	BUVENS ET AL. 2010
Humane Stuhlprobe	O104:H4	<i>stx2</i>	<i>bla</i> CTX-M-15, <i>bla</i> TEM-1	FRANK ET AL. 2011
Bovine Kotprobe	O111:H8	<i>stx1, eae</i>	<i>bla</i> CTX-M-15, <i>bla</i> TEM-1	VALAT ET AL. 2012
Abomasum Rind	f. A.	<i>stx1</i>	f. A	LEE ET AL. 2012

f. A.= fehlende Angabe

2.5 Nachweismethoden

2.5.1 Bouillon-Mikrodilution

Die Bouillon-Mikrodilution ist eine phänotypische Methode der in-vitro-Empfindlichkeitstestung von bakteriellen Erregern gegenüber verschiedenen antimikrobiell wirksamen Substanzen. Dabei wird mittels Wirkstoff-Verdünnungsreihen auf einer Mikrotiterplatte die minimale Hemmkonzentration (MHK) ermittelt. Die MHK entspricht der Konzentration, bei der in vitro kein Erregerwachstum in Form von sichtbarer Trübung mehr nachzuweisen ist (WIEGAND ET AL., 2008; RODLOFF, 2009).

Für die Durchführung der MHK-Bestimmung mittels Mikrodilution empfiehlt die Arbeitsgruppe "Antibiotikaresistenz" der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V (DVG), standardisierte Arbeitsanweisungen, wie die des Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), im Sinne einer international anerkannten Vorschrift zu verwenden (SCHWARZ ET AL., 2003; LUHOFER ET AL., 2004). Die Interpretation der Ergebnisse wiederum ist abhängig von unterschiedlich definierten Grenzwerten. Die klinischen Grenzwerte („clinical breakpoints“) ermöglichen eine Aussage über die therapeutische Wirksamkeit eines Antibiotikums gegenüber dem Zielbakterium. Anhand dieser Grenzwerte lassen sich die untersuchten Mikroorganismen in Bezug auf die Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Wirkstoffen in die Kategorien „resistent“, „intermediär“ oder „sensibel“ einteilen. Die epidemiologischen Grenzwerte („epidemiological cut-off values“) hingegen zeigen frühzeitige Resistenzentwicklungen an und werden im Resistenzmonitoring eingesetzt. Anhand dieser Werte werden die Mikroorganismen in die Kategorien „wildtype“ bzw. bei Überschreitung in die Kategorie „non-wildtype“ eingeteilt (KAHLMETER ET AL., 2003; SCHWARZ ET AL., 2010).

Für Europa hat zwar das European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) sowohl klinische als auch epidemiologische Grenzwerte herausgegeben (KAHLMETER ET AL., 2003), jedoch sollten die Durchführungsvorschriften sowie die Ergebniskriterien einheitlich verwendet bzw. die Herstellervorgaben kommerzieller Testkits eingehalten werden. Daher bietet sich für die MHK-Bestimmung mittels Mikrodilution insgesamt das CLSI-Dokument M31-A3 (CLSI, 2008) an, zumal darin nicht nur Durchführungsvorschriften, sondern auch spezifische für die Tiermedizin ausgelegte Grenzwerte enthalten sind (SCHWARZ ET AL., 2010).

2.5.2 Polymerase-Kettenreaktion

Für den genotypischen Nachweis der ESBL-Gene gilt als Goldstandard die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit sich daran anschließender Sequenzierung der *bla*-Gene. Insbesondere die Unterscheidung der SHV- und TEM-Derivate erfordert die Sequenzierung, da die phylogenetischen non-ESBL-Vorgänger (SHV-1, TEM-1) in der PCR immer miterfasst und im Nachhinein abgegrenzt werden müssen. Bisher wurden zahlreiche unterschiedliche PCR-Protokolle zur Identifizierung von ESBL-Genen als Singleplex- oder Multiplex-PCR entwickelt, die aufgrund der Größe des Amplifikates die Punktmutationen an mehreren Aminosäurepositionen erfassen (HOFFMANN ET AL., 2006; JOUINI ET AL., 2007; MONSTEIN ET AL., 2007; DALLEMNE ET AL., 2010).

Insbesondere für die Identifizierung der *bla*-CTX-M-Gene wurden aufgrund der hohen genetischen Heterogenität zusätzlich zu den ESBL-Familien detektierenden Protokollen CTX-M-Gruppenspezifische (CTX-M-group 1,2,8,9,25/26) konventionelle (PITOUT ET AL., 2004; WOODFORD ET AL., 2006), aber auch Real-Time TaqMan multiplex PCR-Protokolle entwickelt (BIRKETT ET AL., 2007). Neben den häufig verwendeten PCR-Verfahren ist auch die ESBL-Gendetektion mittels verschiedener Microarrays beschrieben (LEE ET AL., 2002; LEINBERGER ET AL., 2010).

3. Material und Methoden

3.1 Material

Nachfolgend werden die wichtigsten Materialien beschrieben. Alle weiteren verwendeten Materialien sowie Geräte sind in den Tabellen 21 und 22 im Anhang aufgelistet.

3.1.1 Anzahl und Herkunft der untersuchten Proben

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 235 STEC Isolate untersucht. Diese Isolate wurden aus 144 Tieren bzw. 32 Lebensmitteln (Tabelle 6) gewonnen und stammten aus der institutseigenen Stammsammlung sowie aus der Stammsammlung des Bayerischen Landesamts für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) in Oberschleißheim. Sie wurden in der Zeit von Februar 2006 bis Juli 2011 in Deutschland und in der Schweiz isoliert. Es handelt sich um Reinkulturen, bei denen bereits im Vorfeld anhand molekulargenetischer Methoden das *stx1* und/oder das *stx2*-Gen nachgewiesen wurde. Insgesamt waren 46 Isolate Träger des *stx1*, 161 des *stx2* und 28 Isolate positiv für *stx1* und *stx2*. Die Aufbewahrung erfolgte in Microbank™ Kryoröhrchen (Mast Diagnostica, Reinfeld, Deutschland) bei -80 °C.

Die STEC Isolate wurden aus verschiedenen Geweben von Wildwiederkäuern, Mastrindern und -kälbern, kleinen Wiederkäuern sowie aus verschiedenen Lebensmitteln tierischen Ursprungs gewonnen. Bei dem Probenmaterial der Wildwiederkäuer handelte es sich größtenteils um Kotproben und vereinzelt auch Lymphknoten und Tonsillen von Rothirschen und Rehen aus dem Nationalpark Bayerischer Wald in Deutschland. Die Isolate der domestizierten Wiederkäuer stammten maßgeblich aus Kotproben von Rindern und Kälbern sowie zum Teil von Schafen und Ziegen aus unterschiedlichen bayerischen oder schweizerischen Betrieben. Bei den übrigen Proben handelte es sich jeweils um Lebensmittel (Fleischerzeugnisse) vom Rind/Kalb bzw. vom Reh/Hirsch. Eine genaue Aufstellung der Herkunft aller Proben ist im Anhang Tabelle 23 zu finden. Es konnten nicht zu allen Proben Informationen bezüglich erfolgter antimikrobieller Vorbehandlungen der betreffenden Tiere eingeholt werden.

Tabelle 6: Untersuchte STEC Isolate von Wild- und Hauswiederkäuern sowie von Fleischerzeugnissen

Tierart	Anzahl der Tiere	Anzahl der Isolate
<u>Wildwiederkäuer</u>	<u>59</u>	<u>109</u>
<i>Reh</i>	41	68
<i>Rothirsch</i>	16	38
<i>Wisent</i>	1	2
<i>Damwild</i>	1	1
<u>Hauswiederkäuer</u>	<u>85</u>	<u>92</u>
<i>Mastrind/-kalb</i>	50	54
<i>Schaf</i>	25	27
<i>Ziege</i>	10	11
<u>Fleischerzeugnisse</u>	<u>32</u>	<u>34</u>
<i>Mastrind/-kalb</i>	9	9
<i>Schaf</i>	2	2
<i>Reh</i>	11	13
<i>Rothirsch</i>	10	10
Insgesamt	176	235

3.1.2 Qualitätskontroll- und Referenzstämme

Um die Qualität und Zuverlässigkeit der Testdurchführung zu kontrollieren, wurden die vom Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) empfohlenen Referenzstämme während jeder Testdurchführung mitgeführt (CLSI, 2008) (Tabelle 7). Diese Referenzstämme haben definierte Resistenzeigenschaften und stammen aus wissenschaftlich anerkannten Quellen, wie der American Type Culture Collection (ATCC®) und der National Collection of Type Cultures (NCTC®).

Tabelle 7: Verwendete Qualitätskontroll- und Referenzstämme

Bezeichnung	ESBL-Gen	Verwendung
<i>E. coli</i> ATCC® 25922	kein ESBL-Gen	Qualitäts- und Negativkontrolle
<i>K. pneumoniae</i> ATCC® 700603	<i>bla</i> SHV-18	Qualitäts- und Positivkontrolle
<i>E. coli</i> NCTC® 13351	<i>bla</i> TEM-3	Positivkontrolle
<i>E. coli</i> NCTC® 13452	<i>bla</i> CTX-M-3	Positivkontrolle

ATCC- American Type Culture Collection; NCTC- National Collection of Type Cultures

3.1.3 Bouillon-Mikrotiterplatte für die Empfindlichkeitsbestimmung

Für die Empfindlichkeitsbestimmung mittels Bouillon-Mikrodilutions-Methode wurden die VetMIC™GN-mo (Version 4) Mikrotiterplatten (MTP) des Nationalen Veterinärinstituts Schweden (SVA, Uppsala, Schweden) verwendet (Abbildung 7). Diese ist konzipiert, um eine Empfindlichkeitsüberprüfung gegenüber verschiedenen antimikrobiellen Wirkstoffen bei gramnegativen Bakterien durchzuführen. Alle antimikrobiellen Wirkstoffe sind in vertikal aufsteigenden Verdünnungsreihen (1:2) angeordnet. Die MTP waren vakuumverpackt und wurden bis zu ihrer Verwendung bei Raumtemperatur (+18 bis +20 °C) gelagert.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AMP 128	CIP 1	NAL 128	GEN 16	STR 256	TET 128	FFN 32	SMX 1024	TRI 16	CHL 64	CTX 2	CAZ 16
B	64	0,5	64	8	128	64	16	512	8	32	1	8
C	32	0,25	32	4	64	32	8	256	4	16	0,5	4
D	16	0,12	16	2	32	16	4	128	2	8	0,25	2
E	8	0,06	8	1	16	8	COL 4	96	1	4	0,12	1
F	4	0,03	4	0,5	8	4	2	32	0,5	2	0,06	0,5
G	2	0,016	2	0,25	4	2	1	16	0,25	KAN 16	0,03	0,25
H	1	0,008	1	0,12	2	1	0,5	8	0,12	8	0,016	WK

Abbildung 7: Layout der VetMIC™GN-mo-MTP (Version 4)

(Konzentrationen der antimikrobiellen Wirkstoffe aufsteigend von Reihe H bis A in µg/ml)

AMP, Ampicillin; CIP, Ciprofloxacin; NAL, Nalidixinsäure; GEN, Gentamicin; STR, Streptomycin; TET, Tetrazyklin; FFN, Florfenicol; COL, Colistin; SMX, Sulfamethoxazole; TRI, Trimethoprim; CHL, Chloramphenicol; KAN, Kanamycin; CTX, Cefotaxim; CAZ, Ceftazidim; WK, Wachstumskontrolle

3.1.4 Materialien für die genotypische Identifizierung

Für die genotypische ESBL Detektion mittels konventioneller PCR wurde der peqGOLD PCR-Master-Mix-S (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) verwendet, der ein zwei-fach konzentriertes, gebrauchsfertiges Gemisch aus Taq-DNA-Polymerase, dNTPs und Reaktionspuffer (Tris-HCl, KCl, Tween, MgCl₂) darstellt (Tabelle 8). Durchgeführt wurde die PCR auf einem iCycler Thermocycler der Firma BioRad, München, Deutschland.

Tabelle 8: Zusammensetzung des gebrauchsfertigen *peqGOLD PCR-Master-Mix-S*

2xPCR-Master-Mix S	Konzentration (2-fach)
Taq-DNA-Polymerase	0,05 u/μl
dNTPs	0,4 mM
Reaktionspuffer:	
Tris-HCl (pH 8.8)	20 mM
KCl	100 mM
MgCl ₂	3 mM
Tween 20	0,02 %

Tabelle 9 zeigt die SHV, TEM und CTX-M Primer (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland), die zum Screening auf das Vorhandensein von ESBL-Genen verwendet wurden. Aufgrund der Heterogenität der *bla*CTX-M-Sequenzen wurden folgende Wobble-Basen eingesetzt: Y= C oder T; R= A oder G und V= A, G oder C.

Tabelle 9: Primer-Sequenzen für die Amplifikation der ESBL-Gene und die Sequenzanalyse

ESBL-Gen	Primer	Sequenz (5'—3')	Amplifikat	Quelle
<i>bla</i> SHV	SHV hm_F	TTC GCC TGT GTA TTA TCT CCC	850 bp	HOFFMANN ET AL. (2006)
	SHV hm_R	TTA GCG TTG CCA GTG YTC GAT		
<i>bla</i> TEM	TEM hm_F	CGT GTC GCC CTT ATT CCC TT	842 bp	HOFFMANN ET AL. 2006
	TEM hm_R	TTA CCA ATG CTT AAT CAG TG		
<i>bla</i> CTX-M	CTX-M hm_F	ATG TGC AGY ACC AGT AAR GT	511 bp	HOFFMANN ET AL. 2006
	CTX-M hm_R	CCG CTG CCG GTY TTA TCV CC		
<i>bla</i> TEM- Sequenzanalyse	TEM ol_F	GCG GAA CCC CTA TTT G	964 bp	OLESEN ET AL. (2004)
	TEM ol_B	ACC AAT GCT TAA TCA GTG AG		

3.1.5 Bouillon-Mikrotiterplatte für die phänotypische Identifizierung

Für die phänotypische Identifizierung von ESBL-Bildnern wurde größtenteils die kommerziell erhältliche Mikrotiterplatte MICRONAUT-S β -Lactamase VI (Merlin Diagnostika GmbH, Bornheim, Deutschland) verwendet (Abbildung 8). Da während der Dauer der Untersuchung das Plattenlayout seitens des Herstellers zugunsten einer besseren Identifizierung von non-ESBL- β -Lactamasen (AmpC etc.) geändert wurde, kam zu Beginn dieser Arbeit noch das Vorgängermodell MICRONAUT-S β -Lactamase V zum Einsatz. Diese MTP unterschied sich von der in Abbildung 8 dargestellten Belegung in so weit, als das noch keine Wirkstoffe in Kombination mit 3-Aminophenylborat (3-APB) vorhanden waren. Stattdessen befanden sich die Wirkstoffe Cefpodoxim, Cefpodoxim/Clavulansäure und Piperacillin/Tazobactam im Layout (Abbildung 13). Alle sonstigen Wirkstoffe und deren Konzentrationen waren identisch.

Die MTP waren bis zu ihrer Verwendung einzeln vakuumverpackt und wurden bei Raumtemperatur (+18 bis +20 °C) gelagert. Die lyophilisierten antimikrobiellen Wirkstoffe waren ebenfalls in aufsteigenden Verdünnungsreihen (1:2) angeordnet. Die Zahlen beschreiben die Konzentration der antimikrobiellen Wirkstoffe in $\mu\text{g/ml}$, wobei die Inhibitorsubstanz Clavulansäure gleichbleibend in einer Konzentration von 4 $\mu\text{g/ml}$ zugesetzt war. Die grau hinterlegten Spalten waren für die vorliegende Untersuchung nur zweitrangig, da es sich hierbei um phänotypische Bestätigungsreaktionen für das Vorliegen von Zink-Metallo-Lactamasen (EDTA-Zusatz), AmpC-Cephalosporinasen bzw. Carbapenemasen (3-APB-Zusatz) handelt, deren Nachweis lediglich dem Ausschluss von Fehlinterpretationen dienen sollte.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CEP 32	CMC 32/4	CAZ 32	CZC 32/4	CZB 32	CTX 32	C/C 32/4	CTB 32/34	MER 128	MEE 32	MEB 32	COX 64
B	16	16/4	16	16/4	16	16	16/4	16/4	64	16	16	32
C	8	8/4	8	8/4	8	8	8/4	8/4	32	8	8	16
D	4	4/4	4	4/4	4	4	4/4	4/4	16	4	4	8
E	2	2/4	2	2/4	2	2	2/4	2/4	8	2	2	4
F	1	1/4	1	1/4	1	1	1/4	1/4	4	1	1	GC/B
G	0,5	0,5/4	0,5	0,5/4	0,5	0,5	0,5/4	0,5/4	2	0,5	0,5	GC/E
H	0,25	0,25/4	0,25	0,25/4	0,25	0,25	0,25/4	0,25/4	1	0,25	0,25	GC

Abbildung 8: Layout der MICRONAUT-S β -Lactamase VI Mikrotiterplatte

(Konzentrationen der antimikrobiellen Wirkstoffe aufsteigend von Reihe H bis A in $\mu\text{g/ml}$)

CEP, Cefepim; CMC, Cefepim/Clavulansäure; CAZ, Ceftazidim; CZC, Ceftazidim/Clavulansäure; CZB, Ceftazidim +350 $\mu\text{g/ml}$ 3-APB; CTX, Cefotaxim; C/C, Cefotaxim/Clavulansäure; CTB, Cefotaxim +350 $\mu\text{g/ml}$ 3-APB; MER, Meropenem; MEE, Meropenem + 0,4 mM EDTA; MEB, Meropenem + 350 $\mu\text{g/ml}$ 3-APB; COX, Cefoxitin; GC/B, Wachstumskontrolle + 350 $\mu\text{g/ml}$ 3-APB; GC/E, Wachstumskontrolle + 0,4 mM EDTA; GC, Wachstumskontrolle

3.2 Methoden

3.2.1 Empfindlichkeitsbestimmung mittels Mikrodilution

Die Empfindlichkeitstestung erfolgte mittels Bouillon-Mikrodilution gemäß den Vorgaben des CLSI Dokument M31-A3 (CLSI, 2008), sowie nach den Angaben des Herstellers der VetMIC™GN-mo MTP. Der Ablauf der Empfindlichkeitsbestimmung ist in Abbildung 9 dargestellt.

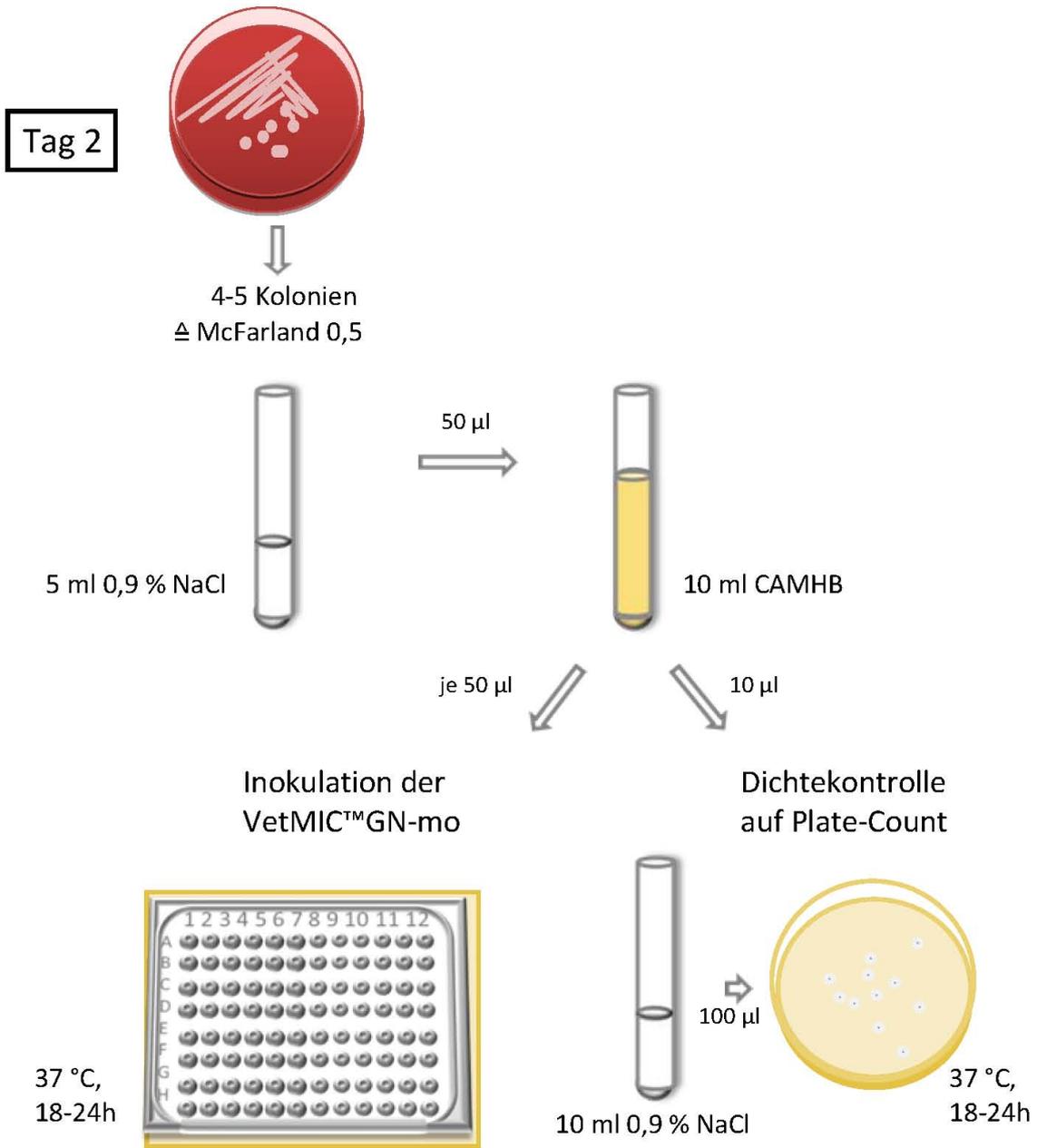
3.2.1.1 Anzucht der Bakterienstämme

Die zu untersuchenden STEC Isolate wurden jeweils am Vortag aus der Mikrobank entnommen und mittels 3-Ösenausstrich auf einer Blutagarplatte (BAP) (Oxoid, Cambridge, Großbritannien) ohne weitere Zusätze ausgestrichen. Die BAP wurden anschließend unter aeroben Bedingungen bei +37 °C für 18 ± 2 Stunden bebrütet. Die unter Punkt 3.1.2 beschriebenen Qualitätskontrollstämme *E. coli* ATCC® 25922 und *K. pneumoniae* ATCC® 700603 wurden unter denselben Bedingungen angezüchtet und bei jedem Untersuchungsdurchgang mitgeführt.

3.2.1.2 Herstellen des Inokulums

Das Inokulum zur Beimpfung der Mikrotiterplatten VetMIC™GN-mo wurde gemäß den Vorgaben des Herstellers und denen des CLSI Dokument M31-A3 hergestellt. Dafür wurde eine Trübung entsprechend eines McFarland-Standards 0,5 mit einer Bakteriendichte von ca. $1 \text{ bis } 4 \times 10^8$ KbE/ml erzeugt. Dies wurde erreicht, indem jeweils 4-5 morphologisch einheitliche Kolonien von der BAP abgenommen und in 5 ml einer sterilen 0,9 % NaCl-Lösung suspendiert wurden. Durch photometrische Bestimmung der optischen Dichte bei 600nm (OD 600) wurde, zusätzlich zum visuellen Abgleich, die geforderte Trübung überprüft und gegebenenfalls vor Einsatz angepasst. Anschließend wurden 50 µl in 10 ml Kationen adjustierte Müller-Hinton-Bouillon (CAMHB) überführt und durch Schütteln mittels Vortex gründlich durchmischt. Das CLSI Dokument M31-A3 empfiehlt CAMHB mit einem angepassten Gehalt von 20-25 mg/l Ca^{2+} und 10-12,5 mg/l Mg^{2+} als Wachstumsnährlösung zu verwenden.

Tag 1 Ausstrich auf Blut-Agar Platte; Inkubation bei 37 °C für 18-24h



Tag 3 Auswertung der Mikrotiter- und Plate-Countplatte

Abbildung 9: Durchführungsschema der Empfindlichkeitsbestimmung mittels Bouillon-Mikrodilution

CAMHB- Kationen-adjustierte Mueller-Hinton-Bouillon

3.2.1.3 Inokulation und Inkubation

Um unerwünschtes weiteres Bakterienwachstum zu vermeiden, wurde das Inokulum zügig innerhalb von 15 min nach Herstellung verwendet. Dazu wurde das Inokulum nach Abflammen der Öffnung des Reagenzgefäßes in ein steriles Mehrkanal-Plastikreservoir überführt und anschließend luftblasenfrei in einer Menge von 50 µl pro Kavität in die Mikrotiterplatte pipettiert. Jede Kavität sollte dadurch mit der geforderten Bakteriendichte von 5×10^5 KbE/ml beimpft werden. Abschließend wurden die MTP mit einer unperforierten Klebefolie verschlossen und in Stapeln zu je 4 Stück bei +37 °C für 18-24 Stunden unter aeroben Bedingungen bebrütet. Die Qualitätskontrolle erfolgte durch Inokulation einer Kontroll-MTP mit dem Bakterienstamm *E. coli* ATCC® 25922. Zur Reinheits- und Dichtekontrolle wurden zusätzlich jeweils 10 µl jedes Inokulums in 10 ml 0,9 % NaCl-Lösung suspendiert und anschließend 100 µl auf einem Plate-Count-Agar ausgespatelt und ebenfalls bei +37 °C für 18-24 Stunden aerob bebrütet. Die Mikrotiterplatten VetMIC™GN-mo wurden nur dann ausgewertet, wenn auf den Kontroll-Plate-Count-Agar-Platten zwischen 20 und 80 reine Kolonien gewachsen waren, was einer Dichte von $2 - 8 \times 10^5$ KbE/ml entspricht.

3.2.1.4 Auswertung

Die Auswertung der VetMIC™GN-mo MTP erfolgte visuell, indem der Boden der Kavitäten auf Wachstum überprüft wurde. Bakterienwachstum zeigte sich durch „Knopfbildung“ bzw. durch eine deutliche Trübung und wurde stets mit der integrierten Wachstumskontrolle auf der MTP verglichen. Die Konzentration der antimikrobiellen Wirkstoffe (µg/ml), bei der kein Wachstum mehr zu erkennen war, wurde als MHK gewertet. Für Wirkstoffe der Klasse der Sulfonamide entsprach die Konzentration dem MHK-Wert, bei der 80 % des Bakterienwachstums gehemmt wurden, da aus dem nicht-selektiven Medium antagonistische Substanzen übertragen werden können, die ein minimales Wachstum ermöglichen, das nicht auf Resistenzbildung zurückzuführen ist. Für den Fall, dass der MHK-Wert unter- oder oberhalb der getesteten Konzentrationsbereiche lag, wurde die niedrigste auf der MTP befindliche Konzentration als MHK gewertet bzw. die nächst höhere Verdünnungsstufe der höchsten Konzentration gewählt.

Dies bedeutet, dass sich der „wahre“ MHK-Wert zwischen dem abgelesenen Wert und der nächst niedrigeren Konzentration befand. Anschließend wurden anhand der in Tabelle 10 dargestellten klinischen Grenzwerte für *Enterobacteriaceae* alle STEC Isolate in die klinisch relevanten Kategorien sensibel oder resistent für den jeweiligen Wirkstoff eingeteilt.

Tabelle 10: Klinische MHK-Grenzwerte zur Bewertung der Empfindlichkeit nach CLSI Dokument M31-A3 und M100-S21 (CLSI, 2008, 2011)

Antimikrobieller Wirkstoff	MHK-Grenzwert [in µg/ml]	
	Sensibel	Resistent
Ampicillin	≤8	≥32
Ciprofloxacin	≤1	≥4
Nalidixinsäure	≤16	≥32
Gentamicin	≤4	≥16
Streptomycin*	≤16	≥32
Tetrazyklin	≤4	≥16
Florfenicol*	≤16	≥32
Colistin*	≤2	≥4
Sulfamethoxazole/Sulfonamide	≤256	≥512
Trimethoprim	≤8	≥16
Chloramphenicol	≤8	≥32
Kanamycin	≤16	≥64
Cefotaxim	≤1	≥4
Ceftazidim	≤4	≥16

*keine CLSI Grenzwerte definiert, entnommen aus DANMAP (2011)

3.2.2 Genotypische Identifizierung von ESBL-Bildnern

Alle STEC Isolate wurden einzeln auf das Vorhandensein der ESBL-Gene *bla*SHV, *bla*TEM und *bla*CTX-M mittels konventioneller PCR untersucht. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden die Extraktion der DNA, das Erstellen des Master-Mixes und die eigentliche Detektion jeweils unter verschiedenen sterilen Werkbänken bzw. räumlich voneinander getrennt durchgeführt.

3.2.2.1 DNA Extraktion

Die DNA Extraktion erfolgte mittels thermischer Lyse. Dabei wurde mit einer sterilen Pipettenspitze eine kleine Bakterienmenge von einer mit STEC Isolaten beimpften und 18-20 Stunden bei +37 °C bebrüteten Caseinpepton-Sojamehlpepton (CASO) Agarplatte (Oxoid) entnommen und anschließend in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 100 µl DNase freiem Wasser (Eppendorf) suspendiert. Nachfolgend wurde die Probe für 10 min bei +99 °C in einem Thermomixer (Eppendorf) gekocht. Die entstandenen Zelltrümmer wurden durch anschließendes Zentrifugieren bei 15 000 x g für 3 min separiert und der Überstand sofort verwendet oder für eine spätere Verwendung als PCR Template bei -20 °C eingefroren.

3.2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion

Das Template wurde einem vorgelegten Reaktionsgemisch, bestehend aus peqGOLD PCR-Master-Mix-S, den entsprechenden Primern und zugehörigem DNase freiem Wasser zugefügt. Der PCR-Reaktions-Ansatz wurde in einem Gesamtvolumen von 25 µl nach folgendem Schema pipettiert (Tabelle 11). Die Primer wurden dabei in einer Endkonzentration von 200 nmol/l dem Reaktionsgemisch zugesetzt.

Tabelle 11: PCR-Ansatz zur Amplifikation der ESBL-Gene

Komponenten	Volumen
PeqGOLD MasterMix-S (2x konzentriert)	12,5 µl
DNase freies Wasser	9,0 µl
Primer forward und reverse (s.Tab.9)	2,5 µl
Templat	1,0 µl
Insgesamt	25,0 µl

Die Amplifikation der PCR-Produkte wurde anschließend in einem iCycler (BioRad) mit dem in Tabelle 12 dargestellten Protokoll durchgeführt. Für die ESBL-Gene *blaSHV* und *blaTEM* wurde eine Annealingtemperatur von +57 °C und für das ESBL-Gen *blaCTX-M* eine solche von +55 °C gewählt. Bei jedem PCR-Durchlauf wurden jeweils eine entsprechende Positivkontrolle (Tabelle 7) sowie eine Negativkontrolle mitgeführt. Die Negativkontrolle bestand aus ddH₂O anstelle eines DNA-Templates und diente der Reinheitskontrolle. Nach Beendigung des Programms wurden die amplifizierten Proben bis zur weiteren Untersuchung bei -20 °C eingefroren.

Tabelle 12: PCR-Protokoll zur Amplifikation der ESBL-Gene

Zyklen	Phase	Temperatur	Zeit
1x	Initialdenaturierung	95 °C	10 min
35x	Denaturierung	95 °C	1 min
	Annealing (<i>blaCTX-M/blaSHV,TEM</i>)	55/57 °C	1 min
	Elongation	72 °C	2 min
1x	Finalelongation	72 °C	15 min

3.2.2.3 Agarosegel-Elektrophorese

Um das Vorhandensein und die entsprechende Größe der erzeugten Amplifikate zu überprüfen, wurde nach der konventionellen PCR eine Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei wurden die Amplifikate mit 5x Nucleic Acid Sample Loading Buffer (BioRad) vermischt und davon je 4 µl in die Geltaschen eines 1 % Agarosegels einpipettiert. Dieses Gel wurde angefertigt, indem 0,3 g Certified™ Molecular Biology Agarose (BioRad) mit 1,5 ml 10x TBE-Puffer (BioRad) ad 30 ml Aqua bidest. unter Wärmezufuhr vermischt wurde. Als Längenstandard wurden 3 µl des EZ Load™ 100 bp Molecular Ruler (BioRad) verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 120 V für 50 min. Durch Färbung in einer Ethidiumbromidlösung (0,5 µl/ml) für 15 min und anschließendem Entwässern für weitere 15 min konnten die Amplifikate mittels UV Licht im Molecular Imager® Gel Doc™ (BioRad) als Bande visualisiert und mit der Quantity One Analysis Software (BioRad) dokumentiert werden.

3.2.2.4 Sequenzanalyse

Um genaue Aussagen bezüglich der Gensequenzen und möglicher Punktmutationen zu erhalten, wurden die in der PCR detektierten Amplifikate anschließend einer Sequenzanalyse unterzogen. Dafür wurden PCR-Amplifikate entsprechend des bereits beschriebenen PCR-Protokolls unter Zuhilfenahme der Sequenzierprimer nach OLESEN ET AL. (2004) hergestellt. Die Aufreinigung sowie die DNA-Sequenzanalyse wurde durch die Firma Eurofins MWG Operon, durchgeführt. Die Auswertung der übermittelten Daten erfolgte über eine BLAST® - Analyse (Basic Local Alignment Search Tool) mit sich anschließendem Abgleich gegen die Nukleotid-Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI).

3.2.3 Phänotypische Identifizierung von ESBL-Bildnern

3.2.3.1 Bouillon-Mikrodilution

Die Schritte für die Anzucht der Bakterienstämme, das Herstellen des Inokulums bis hin zur Inkubation der für die phänotypische Identifizierung verwendeten MICRONAUT-S β -Lactamase-Mikrotiterplatten erfolgten wie in 3.2.1 bereits für die Empfindlichkeitsbestimmung beschrieben (entsprechend der Vorgaben des (CLSI, 2008)). Lediglich die vom Hersteller der MICRONAUT-S β -Lactamase-Platten geforderten Abweichungen wurden eingehalten. So wurden von der NaCl-Suspension 50 μ l in 11 ml CAMHB anstatt in 10 ml CAMHB überführt, so dass die Mikrotiterplatten mit einem Volumen von insgesamt 100 μ l pro Kavität beschickt werden konnten. Als Qualitäts- und Positivkontrolle wurde der Bakterienstamm *K. pneumoniae* ATCC® 700603 (*bla*SHV-18) mitgeführt.

3.2.3.2 Auswertung

Die Auswertung der MICRONAUT-S β -Lactamase-Platten erfolgte ebenfalls durch die Beurteilung des stattgefundenen Wachstums. Eine MTP konnte ausgewertet werden, wenn ein deutliches Wachstum in den Kontrollkavitäten zu sehen war und die durchgeführten Dichtekontrollen der geforderten Einsaatdichte entsprachen. Übereinstimmend mit der in 3.2.1.4 beschriebenen Auswertung, entspricht auch für die Micronaut-S β -Lactamase-Platten die niedrigste Konzentration des Antibiotikums, bei der kein Wachstum festgestellt werden kann, dem gemessenen MHK-Wert.

Aufgrund der unterschiedlichen möglichen ESBL-Expressionsraten der ESBL-Subtypen und der damit verbundenen voneinander abweichenden Resistenzmuster und Hydrolyseaktivitäten, wurde anhand der absoluten MHK-Werte ein erstes Screening durchgeführt. Laut Herstellerangaben der MICRONAUT-S β -Lactamase-MTP kann ein allgemeiner Verdacht auf einen ESBL-Bildner geäußert werden, wenn das Wachstum der getesteten Isolate bei den Cephalosporinen der 3. Generation und 4. Generation Ceftazidim, Cefotaxim, Cefepim einen Grenzwerte $> 1 \mu\text{g/ml}$ oder für Cefpodoxim $> 4 \mu\text{g/ml}$ erreichte.

Tabelle 13: ESBL-Screening Grenzwerte

Antibiotikum	MHK-Ergebnis
Ceftazidim	> 1 µg/ml und/oder
Cefotaxim	> 1 µg/ml und/oder
Cefepim	> 1 µg/ml und/oder
Cefpodoxim	> 4 µg/ml

Zur phänotypischen Bestätigung eines ESBL bildenden Isolates muss jedoch zusätzlich ein Unterschied von mindestens drei Titerstufen (MHK-Quotient ≥ 8) zwischen den oben genannten Einzelsubstanzen und einer Substanz-Inhibitor-Kombination zu sehen sein (Tabelle 14). Der hier verwendete Serin-Lactamase-Inhibitor Clavulansäure in einer Konzentration von 4 µg/ml sollte demzufolge eine Reduktion des MHK-Wertes um mindestens drei Verdünnungsstufen verursachen, wenn es sich um einen ESBL-Bildner handelt.

Tabelle 14: Bestätigung eines ESBL-Bildners mittels MICRONAUT-S β -Lactamase-MTP

Antibiotikum/Inhibitor	MHK-Ergebnis
Ceftazidim	X µg/ml
Ceftazidim/Clavulansäure	X \leq 3 Titerstufen und/oder
Cefotaxim	X µg/ml
Cefotaxim/Clavulansäure	X \leq 3 Titerstufen und/oder
Cefepim	X µg/ml
Cefepim/Clavulansäure	X \leq 3 Titerstufen

X= ermittelter MHK-Wert

Da auch AmpC- β -Lactamasen eine Cephalosporin-Hydrolyseaktivität besitzen und für entsprechende Resistenzbildung verantwortlich sein können, werden diese standardmäßig auf den MICRONAUT-S β -Lactamase MTP mitüberprüft. Diese zeigen häufig eine zusätzliche Resistenz gegenüber Cefoxitin und lassen sich typischerweise weder durch Clavulansäure noch durch EDTA hemmen. Daher erfolgt der Nachweis über eine sichtbare Hemmung mit 3-Aminophenylborat (3-APB). Dazu wurde analog zur Auswertung des ESBL-Vorkommens eine Mindest-Reduktion des MHK-Wertes von Ceftazidim/Cefotaxim um den Faktor 8 im Vergleich zur jeweiligen Kombination mit dem Inhibitor 3-APB als positiv für AmpC gewertet. Auch wenn der Nachweis von AmpC nicht Gegenstand der vorliegenden Untersuchung ist, wurde dennoch eine Auswertung entsprechend der Vorgaben des Herstellers vorgenommen, um eine sichere Unterscheidung der sichtbaren Resistenzmuster bezüglich ESBL, AmpC und ESBL + AmpC vornehmen zu können. Des Weiteren konnte das Auftreten von Carbapenemasen durch eine fehlende Hydrolyse von Meropenem ausgeschlossen werden.

4. Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Empfindlichkeitsbestimmung

Es wurden alle 235 STEC Isolate auf ihre Empfindlichkeit gegenüber den 14 ausgewählten Wirkstoffen Ampicillin (AMP), Ciprofloxacin (CIP), Nalidixinsäure (NAL), Gentamicin (GEN), Tetrazyklin (TET), Streptomycin (STR), Sulfamethoxazole (SMX), Trimethoprim (TRI), Florfenicol (FFN), Colistin (COL), Kanamycin (KAN), Chloramphenicol (CHL), Cefotaxim (CTX) und Ceftazidim (CAZ) hin untersucht (Abbildung 10). Die Auswertung der Empfindlichkeitstestung erfolgte nach Überprüfung der Qualitäts- und Reinheitskontrollen anhand der im CLSI- Dokument M31-A3 (CLSI, 2008) sowie im Supplement M100-S21 (CLSI, 2011) angegebenen Grenzwerte. In Anlehnung an anerkannte Resistenzstudien (DANMAP, 2011; SWARM, 2011) wurden für die Wirkstoffe Florfenicol, Streptomycin und Colistin anderweitig gebräuchliche Grenzwerte zur Auswertung herangezogen, da für diese Wirkstoffe keine Grenzwerte in den CLSI-Dokumenten definiert sind. Anhand der Grenzwerte wurden die untersuchten Isolate in die Kategorien „sensibel“, „intermediär“ oder „resistent“ eingeteilt. Da die als „intermediär“ definierten Isolate bereits eine verringerte in vivo Empfindlichkeit aufweisen, wurden für Kanamycin diese in der Beurteilung den „resistenten“ Isolaten zugeordnet.

Es konnten insgesamt gegen 10 der 14 oben aufgeführten Wirkstoffe Resistenzen festgestellt werden (Tabelle 15). Dabei traten die häufigsten Resistenzen gegen die Wirkstoffe Streptomycin (14,0 %), Sulfamethoxazole (11,9 %) und Tetrazyklin (9,8 %) auf. Gegen Trimethoprim (6,0 %), Ampicillin (4,3 %), Chloramphenicol (3,4 %), Florfenicol (3,4 %), Kanamycin (3,4 %), Gentamicin (1,7 %) und Colistin (0,4 %) waren dagegen nur wenige STEC Isolate resistent (Abbildung 11).

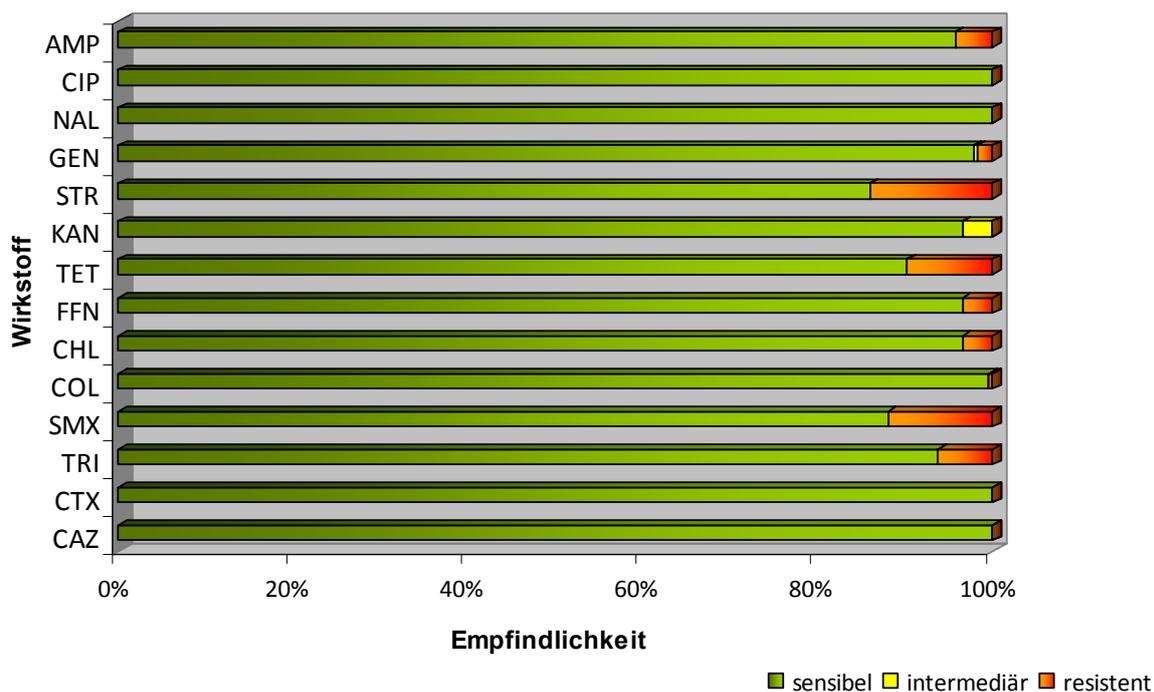


Abbildung 10: Ergebnisse der Empfindlichkeitstestung aller 235 untersuchten STEC Isolate mittels Mikrodilution

AMP, Ampicillin; CIP, Ciprofloxacin; NAL, Nalidixinsäure; GEN, Gentamicin; STR, Streptomycin; TET, Tetrazyklin; FFN, Florfenicol; COL, Colistin; SMX, Sulfamethoxazole; TRI, Trimethoprim; CHL, Chloramphenicol; KAN, Kanamycin; CTX, Cefotaxim; CAZ, Ceftazidim

Von den 235 untersuchten STEC Isolaten waren 33 (14,0 %) unempfindlich gegen den Wirkstoff Streptomycin, wobei 23 dieser Isolate aus bovinen Kotproben, 5 aus Schafkotproben und 1 Isolat aus Ziegenkot stammten. Des Weiteren konnten 3 Isolate aus Lebensmitteln und 1 Isolat vom Reh als resistent gegenüber Streptomycin eingeordnet werden. Damit besteht eine nachgewiesene Unempfindlichkeit gegenüber Streptomycin von 42,6 % aller untersuchten Isolate aus bovinen Kotproben (23/54), 18,5 % aller ovinen Kotprobenisolate (5/27), 9,1 % der Isolate aus caprinen Kotproben (1/11), 1,5 % der Isolate aus Rehproben (1/68) und 8,8 % der aus Lebensmitteln gewonnenen Isolate (3/34).

Gegen Sulfamethoxazole, als Stellvertreter der Sulfonamide, waren 28 der 235 (11,9 %) Isolate resistent. Davon stammten 24 Isolate aus Rinderkotproben, 1 Isolat aus Ziegenkot sowie 3 Isolate aus Lebensmitteln. Somit weisen 44,4 % der Isolate aus bovinen Kotproben (24/54), 9,1 % derjenigen aus caprinen Kotproben (1/11) und 8,8 % aller Lebensmittelisolate (3/34) eine Resistenz gegenüber Sulfonamiden auf.

Bei dem Wirkstoff Tetrazyklin konnten bei 23 der 235 (9,8 %) Isolate Resistenzen festgestellt werden. Diese verteilen sich auf 19 Isolate von Kot aus Rindern, sowie 1 Isolat aus Ziegenkot und 3 Isolate von Lebensmitteln tierischer Herkunft. Somit zeigten 35,2 % der bovinen Kotisolate (19/54), 9,1 % der caprinen Kotisolate (1/11) und 8,8 % der Lebensmittelisolate (3/34) entsprechende Tetrazyklinresistenzen. Des Weiteren erwiesen sich gegen Trimethoprim 14 der 235 STEC Isolate (6,0 %) als unempfindlich, von denen 12 aus Rinderkotproben und 2 aus Lebensmittelproben stammten. Dementsprechend waren 22,2 % aller untersuchten STEC Isolate aus Rinderkotproben (12/54) und 5,9 % der untersuchten Lebensmittelisolate (2/34) gegen den antimikrobiellen Wirkstoff Trimethoprim resistent.

Von den 10 der 235 STEC Isolate (4,3 %), die das β -Lactam-Antibiotikum Ampicillin hydrolysieren konnten, stammten 9 Isolate vom Rind sowie 1 Isolat von einem Lebensmittel vom Kalb. 16,7 % aller untersuchter bovinen Kotisolate (9/54) und 2,9 % der untersuchten Lebensmittelisolate (1/34) zeigten sich folglich als resistent gegenüber Ampicillin. Weniger häufig waren dagegen Resistenzen gegenüber Chloramphenicol, Florfenicol und Kanamycin nachzuweisen. Gegenüber diesen antimikrobiellen Wirkstoffen waren jeweils 8 der 235 (3,4 %) STEC Isolate resistent. Bei den gegenüber Chloramphenicol und Florfenicol unempfindlichen Isolaten handelt es sich um dieselben 8 Isolate, die entsprechende Resistenzen zeigten. Von diesen waren 7 Isolate aus Rinderkotproben und 1 Isolat aus einem Lebensmittel. Daraus ergibt sich für die Klasse der Amphenicole, dass in 13,0 % aller untersuchten bovinen Kotproben (7/54) und in 2,9 % aller untersuchter Lebensmittelproben (1/34) eine entsprechende Unempfindlichkeit nachgewiesen werden konnte. Bei dem Wirkstoff Kanamycin wurden 8 der 235 (3,4 %) Isolate als „intermediär“ ermittelt, jedoch in der Statistik als resistent aufgenommen, da der festgelegte Grenzwert außerhalb des Messbereiches auf der MTP liegt (siehe dazu Abbildung 7 und Tabelle 15). Von diesen 8 Isolaten stammten 6 STEC Isolate aus Rinderkot und 2 Isolate aus Lebensmitteln tierischer Herkunft, sodass 11,1 % aller untersuchten Kotisolate boviner Herkunft (6/54) und 5,9 % aller untersuchten Lebensmittelisolate (2/34) als unwirksam gegenüber Kanamycin anzusehen waren.

Geringe Resistenzhäufigkeiten wiesen außerdem die untersuchten STEC Isolate gegenüber Gentamicin auf. Lediglich 4 der 235 (1,7 %) Isolate zeigten eine messbare Unempfindlichkeit. Diese 4 Isolate stammten alle aus Rinderkotproben, sodass 7,4 % aller untersuchten Isolate aus bovinen Kotproben (4/54) als resistent gegenüber Gentamicin eingestuft werden konnten. Alle gegenüber Gentamicin unempfindlichen Isolate waren ebenfalls gegenüber den weiteren untersuchten Aminoglycosiden Kanamycin und Streptomycin resistent.

Zusätzlich wies 1 Isolat der 235 (0,4 %) Isolate eine Resistenz gegenüber dem Wirkstoff Colistin auf. Dabei handelte es sich um 1 Isolat aus Rinderkot. Dementsprechend zeigten sich 1,9 % der bovinen Kotproben (1/54) unempfindlich gegen Colistin.

Gegen die untersuchten Vertreter der Wirkstoffgruppen der Cephalosporine und (Fluor-) Chinolone wurden keinerlei Resistenzen ermittelt. Daraus ergibt sich, dass alle Isolate gegenüber Cefotaxim, Ceftazidim und außerdem gegenüber Ciprofloxacin und Nalidixinsäure anhand der CLSI-Auswertung sensibel sind (Tabelle 15). Zusammenfassend zeigten sich 36 der 235 untersuchten STEC Isolate (15,3 %) unempfindlich gegenüber mindestens einen der getesteten Wirkstoffe (Abbildung 11). Von diesen 36 resistenten Isolaten waren 15 Isolate Träger des *stx1*-Genes, 16 Isolate Träger des *stx2*-Genes und 5 Isolate beherbergten sowohl das *stx1* als auch das *stx2*-Gen. Bei den übrigen 199 Isolaten konnten keinerlei Resistenzen festgestellt werden.

Im Einzelnen stammten 31 dieser 36 (86,1 %) resistenten Isolate von landwirtschaftlich genutzten Rindern, 4 der 36 (11,1 %) Isolate von bovinen Lebensmitteln und 1 Isolat (2,7 %) von freilebenden Wildwiederkäuern. Die häufigsten Resistenzen konnten in Kotproben (24/54) sowie Lebensmitteln (4/11) bovinen Ursprungs nachgewiesen werden. Insgesamt entstammten 35 der 36 (97,2 %) resistenten Isolate von wirtschaftlich genutzten Wiederkäuern. Die untersuchte Wildtierpopulation -vorwiegend Rehe und Hirsche- wies daher eine signifikant niedrigere Häufigkeit des Auftretens von Resistenzen ($p < 0,05$, Fisher's exact test) im Gegensatz zu den domestizierten Wiederkäuern auf. In Bezug auf die untersuchten Lebensmittelisolate konnte ebenfalls ein geringeres Auftreten von Resistenzen bei Isolaten von Wildwiederkäuern (0/23) als bei domestizierten bovinen Nutztieren festgestellt werden (4/11).

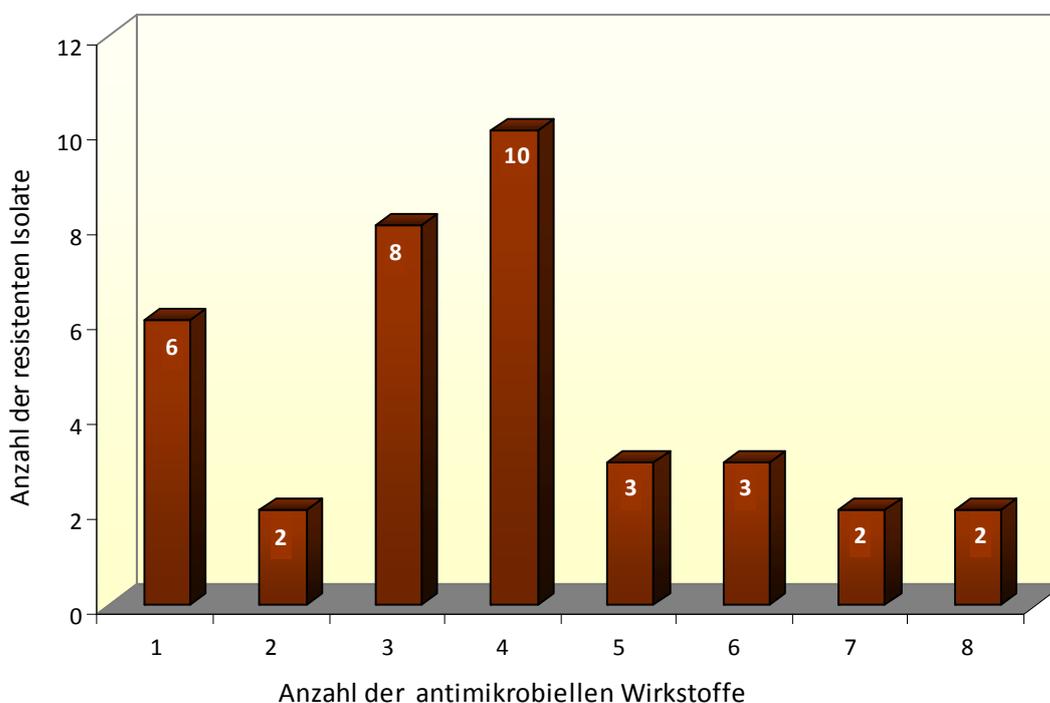


Abbildung 11: Übersicht über die Verteilung der ermittelten Resistenzen der untersuchten STEC Isolate

Bei 30 Isolaten von domestizierten Wiederkäuern konnten Unempfindlichkeiten gegenüber zwei oder mehr antimikrobiellen Wirkstoffen nachgewiesen werden, sodass diese als „mehrfach resistent“ eingeteilt wurden (Tabelle 16).

Dabei wiesen die untersuchten STEC Isolate bis zu 8 Resistenzen nebeneinander auf (Tabelle 24). Am häufigsten wurden gleichzeitig Resistenzen gegenüber 3 bzw. 4 verschiedenen antimikrobiellen Wirkstoffen ausgeprägt (Abbildung 12). Zu diesen Wirkstoffen zählen insbesondere Streptomycin, Tetrazyklin und Sulfamethoxazole. Bei den STEC Isolaten aus Wildwiederkäuern traten hingegen keine Mehrfachresistenzen auf. Von den 30 mehrfachresistenten Isolaten waren 12 Isolate Träger des *stx1*-Genes, 15 Isolate Träger des *stx2*-Genes und 3 Isolate beherbergten sowohl *stx1* als auch *stx2*.

Tabelle 16: Ergebnisse der Empfindlichkeitstestung mittels Mikrodilution bezogen auf die untersuchten Wild- und Hauswiederkäuer sowie Fleischerzeugnisse

Tierart	Anzahl der untersuchten Isolate	Anzahl der sensiblen Isolate [%]	Anteil der resistenten Isolate [%]	Anteil der mehrfach resistenten Isolate [%]
Wildwiederkäuer	109	108 (99,1)	1 (0,9)	0
<i>Reh</i>	68	67 (98,5)	1 (1,5)	0
<i>Rothirsch</i>	38	38 (100)	0	0
<i>Wisent</i>	2	2 (100)	0	0
<i>Damwild</i>	1	1 (100)	0	0
Hauswiederkäuer	92	61 (66,3)	31 (33,7)	26 (28,3)
<i>Mastrind/-kalb</i>	54	29 (53,7)	25 (46,3)	25 (46,3)
<i>Schaf</i>	27	22 (81,5)	5 (18,5)	0
<i>Ziege</i>	11	10 (90,9)	1 (9,1)	1 (9,1)
Fleischerzeugnisse	34	30 (88,2)	4 (11,8)	4 (11,8)
<i>Hauswiederkäuer</i> ¹	11	7 (63,6)	4 (36,4)	4 (36,4)
<i>Wildwiederkäuer</i>	23	23 (100)	0	0
Insgesamt	235	199 (84,7)	36 (15,3)	30 (12,8)

¹Fleischerzeugnisse vom Mastrind/ -kalb und Lamm

4.2 Ergebnisse der genotypischen Identifizierung von ESBL-Bildnern

Alle 235 STEC Isolate wurden mittels konventioneller Singleplex-PCR auf das Vorkommen der ESBL-Gene *blaSHV*, *blaTEM* und *blaCTX-M* untersucht. Die verwendete PCR nach HOFFMANN ET AL. (2006) erlaubt im Sinne einer Screeningmethode eine erste Einteilung der gefundenen Amplifikate in die Obergruppen SHV, TEM oder CTX-M, erfasst jedoch aufgrund der phylogenetischen Verwandtschaft auch die Nicht-ESBL-Gen-Varianten (SHV-1, TEM-1 und TEM-2). Das Vorliegen mindestens eines ESBL-Genes konnte insgesamt bei 4,3 % (10/235) der untersuchten STEC Isolate nachgewiesen werden (Tabelle 17). Alle 10 Isolate wiesen ein 842 bp große Amplifikat für das *blaTEM*-Gen auf. Es konnte in keinem der untersuchten Isolate ein Amplifikat für das *blaSHV*- oder *blaCTX-M*-Gen nachgewiesen werden. Von diesen 10 Isolaten waren 8 Isolate Träger des *stx1*-Genes und 2 Isolate Träger des *stx2*-Genes.

Es stammten 9 der 10 *blaTEM* positiven Isolate von bovinen Kotproben und 1 Isolat von einem Lebensmittel boviner Herkunft. Somit waren 9,8 % (10/92) der untersuchten Isolate von Hauswiederkäuern Träger eines *blaTEM*-Genes. Jedoch konnte kein ESBL-Gen bei einem von Wildwiederkäuern stammenden Isolat nachgewiesen werden. Die Sequenzanalyse ergab einen Nachweis von *blaTEM*-1 bei 8 der 10 getesteten Isolate. Die übrigen beiden Isolate ergaben in der Sequenzanalyse bisher kein auswertbares Resultat.

Tabelle 17: Ergebnisse der Untersuchung von ESBL-Genen in STEC Isolaten

Isolate		<i>blaSHV</i>	<i>blaTEM</i>	<i>blaCTX-M</i>
Herkunft	Anzahl			
Wildwiederkäuer	109	-	-	-
Hauswiederkäuer	92	-	9	-
Lebensmittel	34	-	1	-
Insgesamt	235	-	10	-

4.3 Ergebnisse der phänotypischen Identifizierung von ESBL-Bildnern

Der Nachweis von ESBL-Bildnern wird standardmäßig mittels phänotypischer Identifizierung erreicht. Dazu wurde in dieser Untersuchung eine Mikrodilution zur Bestimmung der MHK-Werte in Bezug auf Cephalosporine unter Verwendung kommerziell erhältlicher MICRONAUT-S β -Lactamase-VI-Mikrodilutionsplatten durchgeführt. Die Auswertung der Mikrodilution erfolgte entsprechend der Vorgaben des Herstellers der MTP wie in 3.2.3.2 bereits beschrieben. Aufgrund der Veränderung des Plattenlayouts zugunsten der AmpC-Detektion durch den Hersteller sind im Folgenden nur die relevanten Wirkstoffe/-Kombinationen, die von jedem Isolat komplett vorliegen dargestellt. Eine gesamte Darstellung der ermittelten MHK-Werte befindet sich im Anhang in Tabelle 25.

Der phänotypische Nachweis von ESBL erfolgte zunächst durch ein Screening anhand absoluter MHK-Werte im niedrigen Hydrolysebereich, wohingegen die Bestätigung der ESBL-Bildung aufgrund einer Reduktion des MHK-Wertes durch einen hinzugefügten Inhibitor erfasst wurde. Es wurden jeweils die MHK-Ergebnisse der Cephalosporine Cefepim, Cefotaxim, Ceftazidim und des Cephامycin-AB Cefoxitin sowie die Kombination mit einem entsprechenden Inhibitor (Clavulansäure) in die Untersuchung miteinbezogen, da sich je nach vorliegendem ESBL-Typ die Hydrolyseaktivitäten und die damit verbundenen Resistenzmuster voneinander unterscheiden können. Meropenem und eine entsprechende Meropenem-Inhibitor-Kombination (EDTA) wurde zur Ausschlussidentifizierung von Carba-penemasen mitgetestet.

Eine allgemeine Übersicht über die Verteilung der gemessenen MHK-Werte aller Isolate auf den MICRONAUT-S-VI-MTP ist in Tabelle 18 dargestellt. Die in dieser Tabelle rot gekennzeichneten vertikal verlaufenden Markierungen geben den Screening-Grenzwert nach Angabe des Herstellers der MTP an. Zur Orientierung zeigen die schwarzen Markierungen die klinischen Grenzwerte des CLSI Dokumentes M100-S21. Diese Grenzwerte wurden jedoch nicht zur Auswertung herangezogen, da ESBL-Bildner auch im klinisch „sensiblen“ Bereich liegen können und somit nicht mit erfasst werden würden.

Tabelle 18: Verteilung der ermittelten MHK-Werte (MICRONAUT-S β -Lactamase-Mikrotiterplatte)

Wirkstoff	Screening Grenzwerte: Hersteller [in $\mu\text{g/ml}$]	Klinische Grenzwerte: CLSI 2011 [in $\mu\text{g/ml}$]	Verteilung [%] der ermittelten MHK-Werte												
			Konzentration der Wirkstoffe [in $\mu\text{g/ml}$]												
			0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	
Cefepim	>1	≥ 32		96,6	2,6	0,0	0,4	0,4	0,0	0,0	0,0				
Cefepim/C				98,7	1,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0				
Cefotaxim	>1	≥ 4		97,4	0,9	1,3	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0				
Cefotaxim/C				98,7	0,0	1,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0				
Ceftazidim	>1	≥ 16		97,9	0,9	0,0	0,4	0,9	0,0	0,0	0,0				
Ceftazidim/C				98,7	0,0	0,0	0,4	0,9	0,0	0,0	0,0				
Cefoxitin*		≥ 32						16,1	74,9	7,7	1,3	0,0	0,0		
Meropenem		≥ 4				99,1	0,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0		
Meropenem/EDTA				100	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0				

Die weiß unterlegten Bereiche zeigen die Wirkstoffkonzentrationen, die auf den Mikrotiterplatten getestet wurden. Die grau unterlegten Bereiche dagegen zeigen die nicht auf den Mikrotiterplatten getesteten Wirkstoffkonzentrationen. Die vertikal verlaufenden, roten Balken zeigen die im ESBL-Screening verwendeten Grenzwerte und die vertikal verlaufenden, schwarzen Balken zeigen vergleichend die festgelegten CLSI Grenzwerte, die in der vorhergehenden Empfindlichkeitseinteilung herangezogen wurden. *COX- im Wechsel des Plattenlayouts von Version V auf VI wurde die niedrigste Verdünnung um eine Stufe angehoben; d.h. sowohl 2 $\mu\text{g/ml}$ als auch 4 $\mu\text{g/ml}$ entsprechen einem fehlenden Wachstum; C= Clavulansäure

In der vorliegenden Arbeit konnte ein phänotypischer Verdacht auf das Vorliegen eines ESBL-Bildners bei insgesamt fünf von 235 (2,1 %) STEC Isolaten geäußert werden. Diese Isolate erreichten in der Mikrodilution MHK-Werte über 1 µg/ml bei den Wirkstoffen Ceftazidim, Cefotaxim bzw. Cefepim. Für den Wirkstoff Ceftazidim waren insgesamt drei Isolate verdächtig. Es wurde bei einem Isolat ein MHK von 2 µg/ml und bei zwei Isolaten ein MHK von 4 µg/ml gemessen. In Bezug auf den Wirkstoff Cefepim wurden zwei Isolate als verdächtig eingestuft (ein Isolat mit 2 µg/ml und ein Isolat mit 4 µg/ml), während nur ein Isolat für Cefotaxim mit einem MHK von 2 µg/ml einen Verdacht auf Resistenzen aufwies. Diese Isolate entstammten alle Kotproben boviner Herkunft.

Für eine Bestätigung des Vorliegens einer ESBL wurde anschließend der Reduktionsfaktor der verdächtigen Isolate ermittelt, der anhand der Wachstumshemmbarkeit durch einen Inhibitor festgestellt wird. Ab einem Faktor ≥ 8 gilt die Inhibition als ausreichend für eine positive Aussage bezüglich des Nachweises eines ESBL-Bildners. Zur Bestimmung dieses Reduktionsfaktors wurde der gemessene MHK-Wert der Einzelsubstanz durch den MHK-Wert der Wirkstoff-Inhibitor-Kombination geteilt. Diese Vorgehensweise entspricht weitestgehend den Vorgaben des CLSI (2008) mit der Ausnahme, dass dort nur eine Bestätigung durch Ceftazidim bzw. Cefotaxim gefordert wird (siehe auch 2.3.4).

In der ESBL-Bestätigungsuntersuchung erreichten zwei STEC Isolate (Faktor 8 bzw. Faktor 16) jeweils eine messbare Hemmung um mindestens drei Verdünnungstufen, sodass diese als ESBL bildende STEC beurteilt wurden. Somit waren nur zwei von 235 (0,9 %) Isolaten nachgewiesene ESBL-Bildner nach Angaben des Herstellers. Es handelt sich dabei um die Isolate, die eine erhöhte Hydrolysefähigkeit in Bezug auf Cefepim besitzen. Aufgrund der relativ niedrigen gemessenen MHK-Werte der ESBL-Bildner ist bereits ersichtlich, dass es sich bei diesen Proben um schwach positive d.h. nicht hochresistente β -Lactamase bildende Isolate handelte. Es konnte nur bei den in Tabelle 19 dargestellten Stämmen eine Hydrolysieraktivität im Bereich der Cephalosporine der 3. bzw. 4. Generation festgestellt werden, die alle Träger des *stx1*-Genes waren. Alle weiteren Isolate erwiesen sich hingegen in der Bestätigungsuntersuchung auf ESBL als negativ.

Tabelle 19: Ergebnisse der phänotypischen Untersuchung der β -Lactamase bildenden STEC Isolate

Probe	MHK-Wert der Einzelsubstanz	MHK-Wert der C-Kombination	Reduktionsfaktor	β -Lactamase
118	CEP: 2 μ g/ml	0,25/4 μ g/ml	8	ESBL
149	CAZ: 4 μ g/ml	2/4 μ g/ml	2	AmpC
	CTX: 2 μ g/ml	1/4 μ g/ml	2	
157	CAZ: 4 μ g/ml	4/4 μ g/ml	1	AmpC
158	CEP: 4 μ g/ml	0,25/4 μ g/ml	16	ESBL
160.	CAZ: 2 μ g/ml	2/4 μ g/ml	1	AmpC

CEP, Cefepim; CAZ, Ceftazidim; CTX, Cefotaxim; C, Clavulansäure

Die übrigen Isolate zeigten keine bzw. nur eine geringe Reduktion der MHK der Wirkstoff-Inhibitor Kombination (Ceftazidim/Clavulansäure) im Vergleich zur Einzelsubstanz und wurden daher als ESBL negativ beurteilt. Es handelte sich dabei um die Isolate mit erhöhter β -Lactamaseaktivität in Bezug auf Ceftazidim. Diese drei phänotypisch verdächtigen, jedoch insgesamt ESBL negativen Isolate zeigten jedoch eine Expression von AmpC- β -Lactamasen. Die charakteristische phänotypische Darstellung von AmpC äußert sich in fehlender Inhibition durch Clavulansäure oder EDTA. Die Bestätigung einer AmpC- β -Lactamase erfolgte anhand einer messbaren Reduktion des MHK-Wertes (mind. drei Verdünnungsstufen) durch die Zugabe von 3-Aminophenylborat. Ein weiterer Hinweis einer AmpC Hydrolyseaktivität ergab sich aufgrund der erhöhten Cefoxitin-Resistenz, die bei diesen drei Isolaten im „intermediären“ Bereich (MHK 16 μ g/ml) lag. Das Cephamycin Cefoxitin wird i.d.R. nur durch AmpC- β -Lactamasen hydrolysiert und ist daher standardmäßig im Resistenzmuster von AmpC zu finden. Insgesamt waren somit 1,3 % aller untersuchten STEC Isolate nachgewiesene AmpC- Bildner. Im Sinne einer Ausschlussdiagnostik wurden auch die MHK-Werte des Carbapenems Meropenem ermittelt, gegen die sich jedoch kein Isolat als resistent erwiesen hat.

4.4 Vergleichende Darstellung der Ergebnisse

Da alle 235 STEC Isolate anhand verschiedener Methoden auf ihre Resistenzeigenschaften und insbesondere auf eine mögliche ESBL-Bildung hin untersucht wurden, werden die ermittelten Daten besonders in Bezug auf eine mögliche β -Lactamaseaktivität im Folgenden gegenübergestellt.

Hinsichtlich der Empfindlichkeitstestung (siehe 4.1) zeigten 4,3 % der STEC Isolate (10/235) eine Resistenz gegenüber dem β -Lactam-Antibiotikum Ampicillin. Diese Isolate lagen mit einem MHK-Wert von $\geq 128 \mu\text{g/ml}$ deutlich über dem Grenzwert ($\geq 32 \mu\text{g/ml}$), sodass auf das Vorliegen einer β -Lactamaseaktivität geschlossen werden konnte. Eine Resistenz gegenüber einem der beiden getesteten Cephalosporine Cefotaxim und Ceftazidim (entsprechend der Grenzwerte des CLSI) konnte jedoch bei keinem Isolat festgestellt werden.

In der spezifischen Untersuchung auf phänotypische ESBL-Bildner mittels MICRONAUT-S β -Lactamase-MTP wurde bei fünf der zehn Ampicillin resistenten STEC Isolate eine erhöhte β -Lactamhydrolysefähigkeit nachgewiesen. Diese wurden zunächst als ESBL-verdächtig eingestuft und anhand der phänotypischen Bestätigung schließlich als zwei ESBL-Bildner und drei AmpC produzierende Isolate identifiziert. Die fünf übrigen Isolate, bei denen sowohl ein *bla*TEM-Gen als auch eine deutliche Ampicillinresistenz nachgewiesen wurde, zeigten jedoch keinerlei Hydrolysefähigkeit im erweiterten Wirkspektrum. Im genotypischen Nachweis mittels PCR konnte übereinstimmend mit den Ergebnissen der Empfindlichkeitsbestimmung bei den zehn Ampicillinresistenten Isolaten ein zur Gruppe der TEM- β -Lactamasen gehörendes Gen identifiziert werden. Anhand der anschließenden Sequenzanalyse konnten diese Gene - so weit möglich - als *bla*TEM1_b (non-ESBL) eingeordnet werden.

Des Weiteren konnte bei allen β -Lactamase bildenden Isolaten das Auftreten von Mehrfachresistenzen in Bezug auf andere Wirkstoffe beobachtet werden (Tabelle 20). Bei allen zehn *bla*TEM-Gen tragenden STEC Isolaten traten zusätzlich Resistenzen gegenüber Sulfonamiden auf sowie bei neun von zehn Isolaten gegenüber Streptomycin. Außerdem zeigten sieben von zehn β -Lactamase bildenden STEC Isolaten Resistenzen gegenüber Tetrazyklin und bei vier der Isolate traten Resistenzen gegenüber Trimethoprim auf.

Des Weiteren zeigten je drei Isolate Resistenzen in Bezug auf Kanamycin und Cefoxitin (intermediär) und wiederum zwei Isolate gegenüber Florfenicol und Chloramphenicol. Eine Gentamicin-Resistenz wurde bei einem Isolat nachgewiesen.

Tabelle 20: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse der Empfindlichkeitstestung, der phänotypischen und genotypischen β -Lactamase Identifizierung

Probe	stx- Gen	Serotyp	Identifizierung		Resistenzmuster
			genotyp.	phänotyp.	
158	1	O86:H-	<i>bla</i> TEM	ESBL	AMP, STR, SMX
131	2	O157:H-	<i>bla</i> TEM-1 _b	-	AMP, STR, SMX, TET
161	1	O40:H19	<i>bla</i> TEM-1 _b	-	AMP, STR, SMX, TET
127	2	O157:H-	<i>bla</i> TEM-1 _b	-	AMP, STR, SMX, TET, KAN
157	1	O8:H19	<i>bla</i> TEM-1 _b	AmpC	AMP, STR, SMX, TET, COX
160	1	O8:H19	<i>bla</i> TEM-1 _b	AmpC	AMP, STR, SMX, TET, COX
212	1	Ont:H29	<i>bla</i> TEM-1 _b	-	AMP, KAN, SMX, TET, TRI,
149	1	Ont:H16	<i>bla</i> TEM	AmpC	AMP, STR, SMX, TET, TRI, COX
118	1	O90:Hnt	<i>bla</i> TEM-1 _b	ESBL	AMP, STR, SMX, FFN, TRI, CHL
128	1	O103:H12	<i>bla</i> TEM-1 _b	-	AMP, STR, SMX, FFN, TRI, CHL, GEN, KAN

AMP, Ampicillin; STR, Streptomycin; SMX, Sulfamethoxazole; TET, Tetrazyklin; KAN, Kanamycin; FFN, Florfenicol; CHL, Chloramphenicol; TRI, Trimethoprim; GEN, Gentamicin; COX, Cefoxitin

Des Weiteren kann in Bezug auf das Auftreten von Resistenzmustern in Zusammenhang mit den Pathogenitätsfaktoren der STEC festgestellt werden, dass acht der zehn *bla*TEM-positiven STEC Isolate Träger des *stx1*-Genes sind und nur zwei Isolate das *stx2*-Gen tragen. Von den fünf in der Mikrodilution als ESBL verdächtig eingestuften STEC Isolaten waren alle Träger des *stx1*-Genes.

5. Diskussion

Der stetige Anstieg von resistenten Bakterien gegen antimikrobiell wirksame Substanzen stellt die Human-, als auch die Veterinärmedizin immer mehr vor das Problem des Therapieversagens bei bakteriellen Infektionskrankheiten. Gerade resistente Bakterien, die über kontaminierte Lebensmittel auf den Menschen übertragen werden, stellen eine große Gefahr da. Shigatoxin-Gen tragende *E. coli* können den Gastrointestinaltrakt von Mensch und Tier kolonisieren und mit schwerwiegenden klinisch manifesten Symptomkomplexen, wie der HC oder auch dem HUS einhergehen. Domestizierte als auch wildlebende Wiederkäuer gelten als natürliches Reservoir für STEC. Obwohl die Infektion mit STEC selbst nicht antibiotisch behandelt wird, war es Ziel dieser Arbeit, Isolate von Wildwiederkäuern, wirtschaftlich genutzten Wiederkäuern sowie Isolate aus Fleischerzeugnissen dieser Tieren auf ihre in-vitro Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen antimikrobiell wirksamen Substanzen aus der Human- und Veterinärmedizin und im speziellen auf das Vorliegen von erweiterten Resistenzen im Bereich der β -Lactam-Antibiotika zu untersuchen, um eine Abschätzung der Resistenzverbreitung, besonders in der Wildtierpopulation, vornehmen zu können. Die aktuelle Untersuchung umfasste daher eine Empfindlichkeitstestung, um das Auftreten von Resistenzen gegenüber verschiedenen Wirkstoffklassen aufzuzeigen und eine gesonderte Untersuchung auf das Vorliegen von Resistenzen gegenüber Cephalosporinen der 3. und 4. Generation, die parallel sowohl phänotypisch als auch genotypisch durchgeführt wurde.

Die 235 untersuchten Shigatoxin-Gen tragenden *E. coli* Isolate wurden mittels der Bouillon-Mikrodilutionsmethode auf die Empfindlichkeit gegenüber 14 verschiedenen Wirkstoffen entsprechend der Richtlinien des CLSI (2011) getestet. Von diesen 235 STEC Isolaten waren insgesamt 199 Isolate empfindlich gegenüber allen getesteten antimikrobiellen Wirkstoffen (84,7 %) und 36 Isolate zeigten eine Resistenz gegenüber mindestens einer antimikrobiell wirksamen Substanz (15,3 %). Das Auftreten von Mehrfachresistenzen (≥ 2 Wirkstoffe) konnte in 30 (12,7 %) der 235 untersuchten STEC Isolate ermittelt werden.

Betrachtet man die Wirkstoffklassen, gegen die die in-vitro Unempfindlichkeiten mittels Mikrodilution aufgezeigt wurden, so konnten die meisten Resistenzen gegenüber Streptomycin mit 14,0 % (33/235), Sulfamethoxazole mit 11,9 % (28/235) sowie Tetrazyklin mit 9,8 % (23/235) ermittelt werden. Geringere Resistenzhäufigkeiten zeigten sich zudem gegenüber Ampicillin, den getesteten Amphenicolen sowie Kanamycin und die niedrigsten gegenüber Gentamicin und Colistin. Insgesamt zeigten sich jedoch keine Resistenzen gegenüber Fluorchinolonen oder Cephalosporinen der 3. Generation.

Die in der Literatur veröffentlichten Angaben über die Resistenzhäufigkeit bei STEC variieren zwar zwischen den einzelnen Studien z. T. erheblich, jedoch werden oftmals ähnlich Resistenzmuster beschrieben. Vergleichsweise geringe Resistenzhäufigkeiten konnten beispielsweise in einer irischen Studie bei bovinen STEC (38/288) ermittelt werden (WALSH ET AL., 2006) sowie auch in einer australischen Studie, in der 200 STEC Isolate unterschiedlicher Herkunft untersucht wurden, von denen 15,5 % der Isolate Resistenzen zeigten (BETTELHEIM ET AL., 2003). Dem gegenüber wurden aber auch bereits weitaus höhere Nachweisraten von Resistenzen bei hauptsächlich bovinen STEC (78,0 %) in den Vereinigten Staaten berichtet (ZHAO ET AL., 2001). Bei einer umfassenden in 2005 erstellten Studie aus Spanien zeigten sich insgesamt 41,0 % der untersuchten STEC aus humanen und bovinen Isolaten als resistent, wobei ähnlich den vorliegenden Untersuchungen die häufigsten Unempfindlichkeiten gegenüber Sulfisoxazole (41/82), Streptomycin (38/82) und Tetrazyklin (36/82) nachgewiesen wurden (MORA ET AL., 2005). Des Weiteren konnte die Arbeitsgruppe von STEPHAN UND SCHUMACHER (2001) häufige Resistenzen gegenüber Streptomycin, Sulfamethoxazole, Tetrazykline und zusätzlich gegenüber Cephalothin bei STEC Isolaten nachweisen. Anderweitige in der Literatur beschriebene Resistenzen traten bei bovinen STEC gegenüber Nalidixinsäure, Sulfonamiden/Trimethoprim oder auch Ampicillin auf (WALSH ET AL., 2006; VON MUFFLING ET AL., 2007). Das Auftreten von Resistenzen gegenüber eben diesen Wirkstoffen könnte durch eine weite Verbreitung und einfache Übertragung der entsprechenden Resistenzgene innerhalb der *E. coli* sowie anderer *Enterobacteriaceae* begründet sein. Zusätzlich würde eine Resistenz gegenüber diesen Wirkstoffen einen Selektionsvorteil für die Mikroorganismen bedeuten, da es sich bei diesen Substanzen um die mengenmäßig am häufigsten angewendeten antimikrobiellen Substanzen im Nutztierbereich handelt (GRAVE ET AL., 2010).

Betrachtet man vergleichend die Wiederkäuergruppen, die in dieser Untersuchung inbegriffen waren, so zeigte sich eine eindeutige Diskrepanz hinsichtlich des Auftretens von Unempfindlichkeiten zwischen den Isolaten, die aus Wildwiederkäuer gewonnen wurden und denen, die von Wiederkäuern aus der Nutztierhaltung stammten. So stammten in der aktuellen Untersuchung 31 der 36 resistenten Isolate aus Kotproben von Nutztieren, vier Proben aus Lebensmitteln boviner Herkunft und nur ein Isolat aus Wildwiederkäuern.

Von den 31 resistenten Isolaten, die aus Kot von wirtschaftlich genutzten Wiederkäuern isoliert wurden, stammten 25 Isolate von der Tierart Rind, fünf Isolate vom Schaf und ein Isolat von der Ziege. Insgesamt zeigten in der vorliegenden Untersuchung 46,3 % der untersuchten bovinen STEC Isolate (25/54) mindestens eine Unempfindlichkeit gegenüber einem der getesteten antimikrobiellen Wirkstoffe, wohingegen die Isolate von Schafen nur zu 18,5 % (5/27) bzw. von Ziegen nur zu 9,1 % (1/11) entsprechende Unempfindlichkeiten aufwiesen. Die 25 als resistent identifizierten Rinderisolate zeigten zudem allesamt Mehrfachresistenzen, wobei das gleichzeitige Auftreten von Resistenzen gegenüber drei bzw. vier Wirkstoffen am häufigsten anzutreffen war. Ähnliche veröffentlichte Untersuchungen konnten ebenfalls hohe Nachweisraten hinsichtlich des Auftretens von antimikrobiellen Resistenzen und auch Mehrfachresistenzen bei wirtschaftlich genutzten Rindern verzeichnen. So konnten bei den von LEE ET AL. (2012) untersuchten bovinen STEC Isolaten bei 12 von 23 (52,2 %) eine Resistenz gegenüber mindestens einem Antibiotikum und bei 9 von 23 (39,1 %) Isolaten eine Resistenz gegenüber zwei oder mehr Wirkstoffen festgestellt werden. In einer in Spanien erstellten Studie wurden bei 207 von 514 (40,3 %) untersuchten STEC Isolaten der Tierart Rind und zusätzlich bei einem von fünf STEC Isolaten vom Schaf Resistenzen nachgewiesen. Insgesamt stellten sich dort mehr als 90 % aller untersuchten STEC zusätzlich als mehrfach resistent dar (MORA ET AL., 2005). In der Schweiz wurde eine Resistenznachweisrate von 34,8 % bei 30 bovinen STEC Isolaten ermittelt, von denen 20 Isolate Mehrfachresistenzen aufwiesen (STEPHAN UND SCHUMACHER, 2001). Die Arbeitsgruppe um VON MÜFFLING ET AL. (2007) ermittelte ähnlich den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung, dass neben den Einfachresistenzen ein gemeinsames Auftreten von Resistenzen gegenüber drei und vier Wirkstoffen häufig zu verzeichnen ist.

Die untersuchten domestizierten Wiederkäuer stammten von betriebswirtschaftlich geführten Nutztierbeständen, in denen entsprechend der geltenden gesetzlichen Rahmenbedingungen im Infektionsfall mit einer Vielzahl verschiedener Wirkstoffe antibiotische Therapien vorgenommen werden können. Folglich erscheint der Aspekt des vorherrschenden Selektionsdruckes durch wiederholte antimikrobielle Pharmakotherapie in der Nutztierhaltung ein ausschlaggebender Faktor hinsichtlich des hohen Auftretens von Unempfindlichkeiten gegenüber antimikrobiell wirksamen Substanzen gerade bei Nutztieren zu sein. Da auch non-STECC vergleichbare Resistenzmuster aufweisen, könnten die vorliegenden Resistenzmechanismen über mobile genetische Elemente im Gastrointestinaltrakt der untersuchten Wiederkäuer von anderen *Enterobacteriaceae* übertragen worden sein. Die häufig auftretenden Mehrfachresistenzen könnten durch eine gemeinsame Übertragung solcher mobilen genetischen Elemente, wie Plasmide oder Integrons, begründet sein.

Bei vergleichenden Betrachtungen von Empfindlichkeitstestungen ist entscheidend, welche Methoden zur Detektion von antimikrobiellen Resistenzen verwendet wurden. Insbesondere die unterschiedlichen verwendeten Grenzwerte sowohl in der Human- als auch in der Tiermedizin führen zu abweichenden Interpretation und damit zu variierenden Resistenzraten. Auch die Zusammensetzung der untersuchten Probandengruppen könnte einen Einfluss auf die Resistenznachweisrate haben, je nachdem ob klinisch gesunde, erkrankte oder therapierte Individuen beprobt wurden. So wurde von BETTELHEIM ET AL. (2003) ein Unterschied insoweit postuliert, als das Resistenzen bei STECC (15,5 %) seltener auftreten, als bei non-STECC Isolaten (32,9 %). Dies könnte durch einen geringeren Selektionsdruck begründet sein, da bei durch STECC verursachten Infektionen antibiotische Anwendungen nicht empfohlen und seltener durchgeführt werden. Die geringeren Prozentzahlen können aber auch auf insgesamt weniger oder auch aufgrund insgesamt weniger frequenten bzw. intensiven Resistenzuntersuchungen von STECC beruhen.

Andererseits konnte 2009 in einer Arbeitsgruppe dargelegt werden, dass bei einem Vergleich in einer gesunden Kälberpopulation kein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich des Vorliegens von Resistenzen zwischen STECC und non-STECC bestand (GOW UND WALDNER, 2009).

Dies wird von den Autoren durch die unterschiedliche Übertragung der Resistenzgene im Gegensatz zu den Virulenzfaktoren der STEC als mögliche Ursache gesehen. So werden die meisten Resistenzgene häufig plasmidkodiert übertragen und bleiben somit extrachromosomal gelegen, im Gegensatz zu den Übertragungswegen der *stx*-Gene, die über lambdaoide Phagen in das Chromosom eingegliedert werden können und damit unabhängig von einer Plasmidübertragung sind. Infolgedessen konnte in den Untersuchungen von GOW UND WALDNER (2009) ebenso wie in den vorliegenden Untersuchungen dieser Arbeit kein Zusammenhang bezüglich des Auftretens der Virulenzfaktoren der STEC (*stx1* und/oder *stx2*) und dem Auftreten von Resistenzen hergestellt werden. So waren in dieser Arbeit von den 36 resistenten Isolaten 15 Träger des *stx1*-Genes, 16 Träger des *stx2*-Genes und fünf Träger von *stx1* und *stx2*. Gegensätzliche Ergebnisse wurden derweil von SCHMIDT ET AL. (1998) und auch ABMUS (2009) vertreten, die ein gehäuftes Auftreten von Resistenzen bei STEC mit dem *stx1*-Gen zeigen konnten.

Im Gegensatz zu den wirtschaftlich genutzten Hauswiederkäuern konnten die aus Wildwiederkäuern isolierten STEC mit überwiegender Mehrheit (108/109) als empfindlich gegenüber den getesteten antimikrobiell wirksamen Substanzen zugeordnet werden. Nur eine der untersuchten Wildwiederkäuerproben zeigten eine in-vitro Unempfindlichkeit gegenüber dem Wirkstoff Streptomycin, die zudem als schwach resistent eingeordnet wurde, da der gemessene MHK-Wert (32 µg/ml) dem festgelegten Grenzwert entspricht ($R \geq 32 \mu\text{g/ml}$). Über die Resistenzraten von STEC bei Wildwiederkäuern liegen nur wenige Studien vor. So wurde ein annähernd ähnlich geringes Resistenzauftreten in der Untersuchung von ASAKURA ET AL. (1998) beobachtet, die alle untersuchten STEC Isolate aus freilebendem Wild (n=7) als vollständig sensibel gegenüber den getesteten antimikrobiellen Wirkstoffen ermittelten. Bezieht man auch Resistenzuntersuchungen von non-STECS bei Wildwiederkäuern in den Vergleich mit ein, so zeigen verschiedene Studien ebenfalls eher niedrigere Resistenzraten. In der norwegischen Studie von LILLEHAUG ET AL. (2005) waren insgesamt 7,3 % (13/179) der untersuchten Isolate von wild lebenden Tieren der Gruppe *Cervidae* resistent gegenüber mindestens einem antimikrobiellen Wirkstoff, wobei die häufigsten Resistenzen ebenfalls gegenüber Streptomycin gefunden wurden. Von den untersuchten Rothirschen (*Cervus elaphus*) konnte ein Isolat und zwei Isolate von Rehen

(*Capreolus capreolus*) als resistent detektiert werden (LILLEHAUG ET AL., 2005). In einer weiteren Studie konnten bei 9 von 46 Rothirschen und bei einem von 13 Rehen mindestens eine Unempfindlichkeit (Streptomycin, Sulfamethoxazole und Tetrazyklin) nachgewiesen werden (CAPRIOLI ET AL., 1991). Eine vergleichsweise höhere Resistenzrate von 21,6 % konnte dagegen in Belgien in einer Untersuchung bei Rehen und Rothirschen gezeigt werden, die Resistenzen gegen die in Rinderbeständen häufig eingesetzten Substanzen Ceftiofur, Florfenicol und Tetrazyklin sowie gegen die Wirkstoffkombination Amoxicillin/Clavulansäure aufwiesen (BARDIAU ET AL., 2010). Mögliche Ursachen für die nachgewiesenen Resistenzen bei Wildwiederkäuern werden von den Autoren mit einem direkten und/oder indirekten Kontakt zu Rindern und deren Weideflächen begründet. Ein weiterer ursächlicher Faktor könnte einerseits eine Aufnahme von resistenten Erregern oder antimikrobiellen Substanzen über das Futter sein oder aber eine Persistenz von resistenten Erregern in der Umwelt.

So könnte die Ursache für die geringen Resistenzhäufigkeiten der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Wildwiederkäuer darin begründet sein, dass mit großer Wahrscheinlichkeit die freilebenden Wildwiederkäuer im Nationalpark Bayerischer Wald vermutlich zeitlebens keine antibiotische Behandlung erfahren haben und insgesamt nur wenig Kontakt zu Menschen oder anderen wirtschaftlich genutzten Wiederkäuern bekommen. Außerdem darf in der Betrachtung der Empfindlichkeitsbestimmung von Wiederkäuern nicht außer Acht gelassen werden, dass eine solche direkte Übertragung von Resistenzen im Besonderen durch Lebensmittel tierischen Ursprungs erfolgen könnte, wenn diese entsprechende fäkale Kontaminationen aufweisen. In der vorliegenden Untersuchungen zeigten schließlich 11,8 % (4/34) der untersuchten STEC Isolate aus Lebensmittel mindestens eine Unempfindlichkeit gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen, von denen vier Isolate zusätzlich Mehrfachresistenzen aufwiesen. Auch bei diesen vom Rind stammenden Fleischerzeugnissen konnten größtenteils Streptomycinresistenzen aufgezeigt werden, die wahrscheinlich während des Schlachtprozesses verunreinigt wurden. Ähnliche Ergebnisse ermittelten beispielsweise MORA ET AL. (2005) und ZHAO ET AL. (2001); (LI ET AL., 2011B).

Im weiteren Verlauf der vorliegenden Untersuchungen wurden die Resistenzen gegenüber β -Lactam-Antibiotika und im speziellen gegenüber Cephalosporinen der 3. und 4. Generation bei STEC untersucht. Dazu wurden parallel die phänotypischen Resistenzmuster mittels Mikrodilution auf den MICRONAUT-S β -Lactamase-MTP und die genotypische Identifizierung von Resistenzgenen mittels Polymerasekettenreaktion verglichen, da Resistenzgene ohne phänotypische Expression und phänotypische Resistenz ohne genetisches *bla*-Gen vorliegen können.

In der vorhergehenden Empfindlichkeitsüberprüfung entsprechend den CLSI-Grenzwerten konnten insgesamt zehn gegenüber Ampicillin resistente Isolate identifiziert werden, jedoch keine gegenüber den getesteten Cephalosporinen Cefotaxim und Ceftazidim (Cephalosporine der 3. Generation). In den durchgeführten phänotypischen Untersuchungen auf das Vorliegen von ESBL-Bildnern, die i.d.R. diese und weitere Cephalosporine hydrolysieren können, werden mögliche Resistenzen in einem zwei-stufigen Nachweissystem detektiert. Dies besteht aus einem Screening im niedrigen MHK-Werte-Bereich verschiedener Cephalosporine der 3. und 4. Generation und einem Bestätigungsnachweis über die Ermittlung eines Reduktionsfaktors in Anwesenheit eines β -Lactamaseinhibitors.

Anhand der MICRONAUT-S β -Lactamase-MTP konnten insgesamt fünf von 235 STEC Isolaten (2,1 %) als potenzielle ESBL identifiziert werden, die eine verminderte phänotypische in-vitro Empfindlichkeit gegenüber den Cephalosporinen Cefotaxim, Ceftazidim und Cefepim sowie gegenüber dem Cephamycin Cefoxitin ausbildeten. Die gemessenen MHK-Werte wiesen insgesamt eher niedrige Werte auf, die hauptsächlich im Bereich von 2-4 μ g/ml lagen und damit als schwach positiv bzw. ESBL-verdächtig gelten. Da innerhalb des Bestätigungsnachweises zwei der fünf Isolate eine Reduktion in Kombination mit einer Inhibitor-substanz (Clavulansäure) aufwiesen und somit einen Reduktionsfaktor von mindestens 8 erreichten, wurden diese entsprechend den Angaben des Herstellers der Mikrotiterplatten als ESBL eingeordnet. Drei der fünf verdächtigen Isolate zeigten dagegen keine Wachstumsinhibition in Anwesenheit von Clavulansäure oder EDTA, jedoch zusätzliche in-vitro Unempfindlichkeiten gegenüber dem Cephamycin Cefoxitin. Eine Wachstumsinhibition konnte dafür in Anwesenheit von 3-APB gesehen werden. Entsprechend den Angaben des Herstellers der MTP wurden diese Isolate als AmpC bildende STEC eingeordnet.

Auch das CLSI (2008) gibt gesonderte Anleitungen zur Durchführung eines ESBL-Nachweises, unabhängig von der klinischen Einteilung der Empfindlichkeitsprüfungen, an. Bei der Anwendung der CLSI-Vorgaben auf die in dieser Studie untersuchten STEC Isolate wären weder ESBL, noch AmpC-Bildner nachgewiesen worden. Dies lässt sich dadurch erklären, dass das CLSI keine Cephalosporine der 4. Generation (Cefepim) in den Nachweis miteinbezieht und auch keine Abgrenzung anderer β -Lactamasen durchführt, die jedoch sowohl in-vitro, als auch in-vivo zu verminderten Wirksamkeiten von β -Lactamantibiotika führen könnten. Bei den übrigen 230/235 Isolaten konnten keine Hydrolysefähigkeiten im erweiterten Wirkspektrum in der phänotypischen Untersuchung nachgewiesen werden. Da ESBL-Bildner bisher rein phänotypisch definiert werden, nutzen die meisten in der Literatur beschriebenen Arbeitsgruppen aus diesem Grund einen rein phänotypischen Nachweis. Den Umstand der z. T. geringen Sensitivität dieser Nachweismethoden, besonders die von der CLSI empfohlenen Bestätigung mit nur zwei Cephalosporinen, die auch in dieser Untersuchung zu einer Diskrepanz zwischen dem genutzten phänotypischen Nachweis und dem CLSI empfohlenen Nachweis führten, konnten ebenfalls u.a. von STÜRENBURG ET AL. (2004) und TZELEPI ET AL. (2000) gesehen werden.

ESBL-Bildner werden oft zusätzlich über genotypische Nachweismethoden detektiert, die sowohl epidemiologische Nachweise ermöglichen als auch eine klinische Relevanz erlangt haben, da genotypische Methoden schnellere Nachweise erzielen und somit die Möglichkeit einer Risikoabschätzung und Therapieanpassung bereitstellen. In der vorliegenden Untersuchung wurden daher die STEC Isolate mittels PCR auf das Vorliegen der häufigsten bei *E. coli* vorkommenden *bla*-Gene (*bla*SHV, *bla*TEM, *bla*CTX-M) untersucht. Insgesamt konnten bei 10 STEC Isolaten (4,3 %) *bla*-Gene detektiert werden, die zu der Familie der *bla*TEM gehören. Es handelt sich dabei um dieselben Isolate, die in der Empfindlichkeitstestung mittels Mikrodilution als resistent gegenüber Ampicillin ermittelt wurden. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass diese Isolate eine TEM- β -Lactamase exprimieren, die zu einer Resistenz gegenüber Penicillinen führt (≥ 128 $\mu\text{g/ml}$). In der Literatur werden regelmäßig TEM- β -Lactamasen als Resistenzmechanismus gegenüber β -Lactamantibiotika nachgewiesen. So wurde 2002 in Deutschland in der Arbeitsgruppe um MAIDHOF ET AL. (2002) sowie im Jahr 2005 eine Ampicillinresistenz eines EHEC, verursacht durch eine TEM- β -Lactamase (TEM-1), dokumentiert (AHMED ET AL., 2005).

Die Sequenzanalyse der in dieser Untersuchung identifizierten *bla*TEM ergab bei acht Isolaten eine Zugehörigkeit der detektierten β -Lactamasen zu den ESBL-Vorläufer Penicillinasen TEM-1_b. Jedoch konnten bisher zwei dieser zehn *bla*TEM tragenden Isolate nicht eindeutig zugeordnet werden. Es handelt sich bei diesen beiden Isolaten um einen der beiden potenziellen ESBL-Bildner sowie um einen der AmpC-Bildner. Diesbezüglich kann daher keine abschließende Aussage gemacht werden. Betrachtet man vergleichend die durchgeführten Untersuchungen, so ist festzuhalten, dass zehn von 235 Isolaten ein *bla*TEM-Resistenzgen aufweisen und demzufolge eine nachweisbare Ampicillinresistenz ermöglichen. Des Weiteren waren fünf dieser zehn Isolate in der Lage, β -Lactamantibiotika im erweiterten Wirkspektrum der Cephalosporine der 3. und 4. Generation zu hydrolysieren, was für den Umstand spricht, dass zusätzliche Resistenzmechanismen vorliegen müssen. Bei drei Isolaten wurde zusätzlich eine phänotypische Produktion von AmpC detektiert. Bei *E. coli* vorkommende AmpC- β -Lactamasen gehören häufig zu der CMY-Familie und liegen plasmidkodiert vor. Obwohl das phänotypische AmpC-Resistenzmuster, das eine Hydrolysierbarkeit der Cephalosporinen bis zu 3. Generation sowie Cephamycinen ermöglicht und nicht zu inhibieren ist, auch in der vorliegenden Untersuchung aufgezeigt werden konnte, müsste dennoch die vorliegende AmpC-Familie mittels PCR eindeutig abgeklärt werden.

Die beiden als phänotypisch ESBL definierten STEC Isolate zeigen insbesondere eine erhöhte Hydrolysierbarkeit gegenüber dem Wirkstoff Cefepim, einem Cephalosporin der 4. Generation und konnten jeweils um mindestens drei Konzentrationsstufen in Anwesenheit eines Inhibitors in ihrem Wachstum gehemmt werden. Da jedoch eine gemeine TEM-1 Penicillinase keine Resistenz im Spektrum der erweiterten Cephalosporine umfasst, liegen in diesem Fall vermutlich weitere Faktoren vor, die eine entsprechende Resistenz ermöglichen können. Zum einen könnte eine Mutation in der Promotorregion der β -Lactamasen zu einer stark erhöhten Expression geführt haben oder aber eine Veränderung der PBP bzw. der Zellmembran-Porine könnte eine verstärkte β -Lactamasetätigkeit induziert haben. Obwohl anhand der Sequenzanalyse bei den beiden bisher undifferenzierten *bla*TEM ein Basenaustausch gesehen werden konnte, kann gegenwärtig eine Unterscheidung nicht vorgenommen werden, ob es sich hierbei um eine aktive oder stille Mutation handelt.

Die in den phänotypischen und genotypischen Untersuchungen bezüglich einer β -Lactamase-tätigkeit positiv nachgewiesenen STEC Isolate stammten allesamt von domestizierten Wiederkäuern. In keinem aus Wildwiederkäuern stammenden Isolat konnten β -Lactamasen oder Unempfindlichkeiten im erweiterten Wirkungsspektrum nachgewiesen werden.

Das Vorkommen von ESBL bei STEC wurde in der Literatur bisher spärlich thematisiert, sodass bisher wenige Nachweise über ESBL bei bovinen STEC geführt wurden. 2011 wurden sowohl aus STEC Isolaten aus Rinderkot sowie bovinen Nebenprodukten ESBL-Bildner nachgewiesen (LEE ET AL., 2012; VALAT ET AL., 2012). Die häufigsten Nachweise von ESBL bildenden STEC wurden während des EHEC-Ausbruchsgeschehen 2011 in Deutschland gesehen. Der in diesen Fällen verantwortliche EHEC hatte neben den ESBL-Resistenzeigenschaften auch Virulenzeigenschaften der EAEC erworben und somit ein ausgeprägtes pathogenes Potenzial.

Dagegen werden insgesamt ESBL Nachweise bei non-STEAC regelmäßig geführt. Die Nachweisraten für Resistenzen gegenüber Cephalosporinen der 3. und 4. Generation liegen für ESBL in Lebensmitteln oder in Lebensmittel liefernden Tieren der Tierart Rind in Deutschland relativ niedrig mit ca. 1,0-3,0 % (BFR, 2010; EFSA, 2011B). Diese Werte decken sich mit den in dieser Untersuchung festgestellten niedrigen Nachweisraten von Resistenzen gegenüber Cephalosporinen der 3. und 4. Generation bei Wiederkäuern. Im Gegensatz dazu treten ESBL bildende *E. coli* häufiger in Wirtschaftsgeflügelisolaten mit bis zu 34,0 % auf (DANMAP, 2011; LEVERSTEIN-VAN HALL ET AL., 2011; MARAN, 2011). Auf Bestandsebene wurden bis zu 100 % der Geflügelbetriebe mit ESBL bildenden *E. coli* identifiziert (ANYNOMUS, 2012).

Die Unterschiede hinsichtlich der Nachweisraten können durch verschiedene Aspekte zustande gekommen sein. Zum einen sollte berücksichtigt werden, dass verschiedene Arbeitsgruppen den Begriff „ESBL“ abweichend definieren und dementsprechend die zu den ESBL zählenden β -Lactamasen in einem unterschiedlich weit oder auch eng gefassten Rahmen liegen können. Zum anderen werden in den verschiedenen Untersuchungen selten einheitlichen Methoden benutzt, um ESBL-Nachweise zu führen. Dies gilt insbesondere, wenn erst bei eindeutig hoch-resistenten Isolaten eine Überprüfung auf ESBL vorgenommen wird.

Daher entstehen die Nachweisunterschiede bezüglich ESBL in STEC und non-STEC vermutlich ebenso aufgrund der unterschiedlich verwendeten Untersuchungsmethoden. So werden üblicherweise in STEC-Studien erst die *stx*-Virulenzgene nachgewiesen, bevor eine Empfindlichkeitstestung durchgeführt wird, sodass in einem gewissen Maß eine Vorselektionierung stattfindet. Demgegenüber werden in Resistenzuntersuchungen spezielle Anreicherungen mit subtherapeutischen Konzentrationen von Cephalosporinen bereits zur Isolierung genutzt, um alle ESBL-Bildner zu identifizieren, da die entsprechenden Resistenztragenden Plasmide von den Bakterien wieder abgegeben werden können. Erst anschließend erfolgte die Untersuchung auf die *stx*-Gene. Daher liegt die „wahre“ Anzahl an ESBL tragenden STEC vermutlich wesentlich höher, als in den bisher durchgeführten Untersuchungen und müsste in weitergehenden Studien genauer untersucht werden. Folglich sollte eine international einheitliche Richtlinie bezüglich der Durchführung eines ESBL Nachweises ausgearbeitet werden. Diese sollten zum Einen ausreichende Sensitivität aufweisen, um klinisch relevante Unempfindlichkeiten aufzudecken und zum Anderen vom apparativen und finanziellen Aufwand einfach durchführbar sein, um von jeder Untersuchungseinrichtung in der Routine genutzt werden zu können. Ein weiterer Faktor für die unterschiedlichen ESBL Nachweishäufigkeiten besteht darin, dass in manchen Fällen nicht eindeutig verifiziert werden kann, ob es sich bei den ESBL bildenden *E. coli* Nachweisen jeweils um Pathogene handelt, die eine Infektion verursacht haben oder um *E. coli*, die klinisch inapparent kolonisieren. Des Weiteren müsste durch genaue Stammtypisierungen verifiziert werden, ob es sich bei den potenziell pathogenen STEC, die in der Human- und auch Tiermedizin nachgewiesen werden, jeweils um dieselben Stämme handelt oder nur um dieselben Serotypen, um die Übertragungswege und –risiken besser nachverfolgen zu können. Außerdem sollte in den vergleichenden Betrachtungen unterschieden werden, ob Einzeltierisolate zur Untersuchung herangezogen wurden oder ob es sich um Bestandsuntersuchungen handelt, um statistisch einheitliche Aussagen zu erhalten. Dies gilt vor allem auch im Bereich des Wirtschaftsgeflügels, bei dem häufig eher auf Bestandsebene untersucht wird. Die verstärkt auftretenden Nachweise von ESBL im Nutztierbereich sind vermutlich auf die Haltungs- und Behandlungsbedingungen zurückzuführen. So werden bestandsübergreifende antimikrobielle Behandlungen über das Futter oder auch Trinkwasser durchgeführt. Dies kann dazu führen, dass der Selektionsdruck auf die vorherrschende

Bakterienflora der kranken und gesunden Tiere übermäßig steigt und sich somit resistente Erreger bevorzugt im Gastrointestinaltrakt etablieren. Das Risiko derartiger Applikationsformen könnte zum Einen darin gesehen werden, dass es wahrscheinlicher zur Aufnahme von subtherapeutischen Dosen kommt, da erkrankte Individuen weniger Futter aufnehmen oder von den Futterquellen durch gesunde Tiere verdrängt werden. Und zum Anderen werden in hohem Maß unnötige Dosen an gesunde Individuen abgegeben, die wiederum zu Ausscheiden von resistenten Erregern werden können.

Dem Gegenüber sind die fehlenden Resistenzen im erweiterten Resistenzspektrum bei den untersuchten Wildwiederkäuern zu sehen. Da bereits in der Empfindlichkeitstestung 99,1 % aller Wildwiederkäuerisolate sensibel gegenüber den getesteten antimikrobiellen Substanzen waren und weder β -Lactamase-Gene noch Unempfindlichkeiten gegenüber β -Lactamantibiotika wie bspw. Amoxicillin bei diesen Isolaten gefunden werden konnten, erscheint es als nachvollziehbar, dass bei diesen Isolaten keine Resistenzen gegenüber Cephalosporinen der 3. oder 4. Generation vorliegen. Die Gründe für die hohe Sensibilität und das Fehlen von ESBL-Bildnern entsprechen daher denen für die insgesamt niedrigen Resistenzraten bei Wildwiederkäuern. So stellt wahrscheinlich der fehlende Selektionsdruck aufgrund des fehlenden Kontaktes zu Antibiotika oder antibiotisch behandelten Tieren den wichtigsten Faktor dar. Daraus könnte insgesamt geschlussfolgert werden, dass das Auftreten von Resistenzen und speziell von Resistenzen mit erweitertem Wirkungsspektrum die Behandlungs- bzw. Nutzungsintensität antimikrobiell wirksamer Substanzen allgemein abbildet.

Eventuell könnte man das Auftreten von Resistenzen bei Wild auch als allgemeinen Indikator für „antimikrobielle Umweltkontaminationen“ ansehen, da freilebende Wildtiere keinen antimikrobiellen Behandlungen unterzogen werden. Anhand der in dieser Untersuchung gewonnenen Erkenntnis scheinen die STEC bei Wildwiederkäuern bisher keine bzw. nur eine geringe Übertragungsquelle von Resistenzen zu sein, was jedoch zukünftig anhand einer repräsentativen Stichprobe und über einen größeren Zeitraum hinaus erfolgenden Studie untersucht werden sollte. Im Bereich der Lebensmittel liefernden Nutztiere könnte dagegen durchaus ein erhöhtes Risiko für den Eintrag von resistenten Erregern in die Gemeinschaft von Mensch und Tier sowie in die Lebensmittelkette gesehen werden.

Alles in allem erscheint jedoch Bedarf zur Senkung des allgemeinen Einsatzes von ungerichtet eingesetzten antimikrobiell wirksamen Substanzen sowohl in der Human- als auch in der Tiermedizin zu bestehen, da Resistenzen zügig speziesübergreifend übertragen werden können und so pathogene Bakterien sich der gegen sie gerichteten Therapie entziehen könnten. Dennoch sollten Tiergesundheit, Lebensmittelsicherheit und das allgemeine öffentliche Interesse gleichermaßen berücksichtigt werden und übergreifende Maßnahmen zum Schutz vor weiterer Resistenzausbreitung ergriffen werden.

6. Zusammenfassung

Shigatoxin bildende *E. coli* (STEC) können als Bestandteil der normalen Darmflora oder auch als pathogene Erreger bei Mensch und Tier auftreten. Die Infektion mit STEC beim Menschen kann u. a. mit schwerwiegenden Erkrankungen wie der hämorrhagischen Kolitis oder auch dem hämolytisch-urämischem Syndrom einhergehen oder in Einzelfällen sogar zum Tod führen. Als natürliches Reservoir für STEC gelten hauptsächlich Wiederkäuer, insbesondere Rinder, Schaf und Ziege aber auch Wildwiederkäuer, die die STEC entweder direkt oder auch indirekt über Lebensmittel auf den Menschen übertragen können. Obwohl eine antibiotische Behandlung von STEC im Allgemeinen nicht empfohlen wird, werden dennoch mit unterschiedlicher Häufigkeit resistente STEC isoliert, die wiederum eine Gefahr für eine Übertragung von Resistenzen auf den Menschen darstellen.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher vergleichend die Resistenzhäufigkeiten bei insgesamt 235 STEC Isolaten von Nutzwiederkäuern, Wildwiederkäuern und Lebensmitteln gegenüber 14 verschiedenen antimikrobiell wirksamen Substanzen bestimmt. Diese Empfindlichkeitsbestimmung wurde mittels Bouillon-Mikrodilution durchgeführt und ergab einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den Resistenzhäufigkeiten von Hauswiederkäuern mit 33,7 % (31/92) im Gegensatz zu den Wildwiederkäuern mit 0,9 % (1/109). Die häufigsten Resistenzen wurden insgesamt gegenüber Streptomycin, Sulfonamiden und Tetrazyklin nachgewiesen. Von den 36 als resistent nachgewiesenen Isolaten zeigten 30 Isolate zusätzlich das Auftreten von Mehrfachresistenzen. Ein Zusammenhang bezüglich der *stx*-Gene und dem Auftreten von Resistenzen konnte nicht erkannt werden.

Ein weiterer Fokus dieser Studie lag auf dem Nachweis von möglichen ESBL-Bildnern, die Resistenzen im erweiterten Wirkspektrum der β -Lactamantibiotika wie den Cephalosporinen der 3. und 4. Generation zeigen. Dazu wurden die STEC Isolate sowohl phänotypisch mittels Mikrodilution als auch genotypisch mittels PCR untersucht. In diesen Untersuchungen erwiesen sich zehn Isolate als Träger eines *bla*TEM-Genes, von denen bisher alle sequenzierten Isolate nicht zu den ESBL gezählt werden. Im Gegensatz dazu konnte bei fünf (2,1 %) der untersuchten STEC Isolate eine phänotypische Unempfindlichkeit gegenüber Cephalosporinen der 3. und 4. Generation nachgewiesen werden.

Von diesen fünf Isolaten mit erweitertem Wirkspektrum waren drei Isolate zusätzlich zu den *bla*TEM-1_b Genen Träger der AmpC- β -Lactamasen, die ebenfalls Resistenzen gegenüber Cephalosporinen der 3. und 4. Generation aufzeigen, jedoch im Allgemeinen nicht zu den ESBL gezählt werden. Die zusätzlichen Resistenzmechanismen der übrigen beiden *bla*TEM Träger mit erweiterter Hydrolysefähigkeit konnte im Zuge dieser Untersuchung nicht ermittelt werden.

Insgesamt konnten antimikrobielle Unempfindlichkeiten bei STEC Isolaten von Hauswiederkäuern als auch zu einem sehr geringen Teil von Wildwiederkäuern nachgewiesen werden. Wiederkäuer könnten demnach nicht nur als Reservoir für STEC, sondern auch für Resistenzen angesehen werden und damit eine Gefahr der Übertragung auf den Menschen darstellen. Infolgedessen sollte die Resistenzsituation dieser Erreger zukünftig weiter überwacht werden sowie der Einsatz antimikrobiell wirksamer Substanzen im veterinär- und auch humanmedizinischen Bereich auf ein verantwortungsvolles Maß reduziert werden.

7. Summary

Shiga toxin producing *E. coli* (STEC) can occur either as part of the normal intestinal gut flora or as pathogenic agents in animals and humans causing serious disease in humans. The infection with STEC is associated with hemorrhagic colitis and the hemolytic-uremic syndrome and may be fatal in some cases. Ruminants, especially cattle, sheep, and goats as well as wild deer, are considered as natural reservoir. STEC can be transferred to humans either directly or indirectly through contaminated food. Although antibiotic treatment of STEC infection is not recommended generally, resistant STEC are isolated with different frequencies. This may pose a risk for transmission of resistant STEC to humans.

In the present study we determined the frequencies of resistance against 14 different antimicrobial agents of in total 235 STEC isolates from farm cattles, wild ruminants and food products. This susceptibility testing was performed using broth microdilution method. We observed a significant difference ($p < 0,05$) between the frequencies of resistance of domestic ruminants in contrast to wild ruminants with 33.7% (31/92) and 0.9% (1/109) resistant isolates, respectively. Overall, the most frequent resistances were detected against streptomycin, sulfonamides, and tetracycline. Furthermore, 30 of the 36 resistant isolates detected in this study were multi drug resistant against two or more antimicrobial agents. A correlation between the occurrence of *stx*-genes and the emergence of resistance could not be observed.

Another focus of this study was the detection of potential ESBL producing isolates, which show resistance to the enlarged spectrum of β -lactam antibiotics such as cephalosporins of the 3rd and 4th generation. Therefore, all STEC isolates were examined both phenotypically and genotypically using microdilution method and PCR, respectively. Performing a sequential analysis the majority (8/10) of those isolates were non-ESBL *bla*TEM-1_b. However, using microdilution method detectably minor susceptibility to 3rd and 4th generation cephalosporins in five (2.1%) out of the 235 studied STEC isolates was observed. Of these five isolates three isolates were also carriers of additional AmpC β -lactamases, which are also resistant to extended spectrum cephalosporins, but are not considered as ESBL in general.

The additional resistance mechanisms of the two remaining carriers of non-ESBL-TEM with visible phenotypic resistance to extended spectrum β -lactams could not be determined during this analysis.

Overall, antimicrobial susceptibility of STEC isolates could be detected in isolates from domestic ruminants as well as in a very small proportion of wild ruminant isolates. Thus, ruminants might not only be considered as reservoir for STEC, but also as a risk for transmission of multiple drug resistance to humans with special regard to resistance against extended spectrum β -lactams. Consequently, further surveillance should be conducted to monitor the resistance patterns of these pathogens to contribute to a reduction of the associated public health risk by responsible exposure of antimicrobial agents in veterinary and human medicine.

8. Literaturverzeichnis

ACHESON, D.W. (1998). *Nomenclature of enterotoxins*. Lancet; **351**: 1003.

AHMED, A.M., KAWAMOTO, H., INOUE, K., HASHIWATA, Y., SAKAKI, M., SENO, M., SHIMAMOTO, T. (2005). *Genomic analysis of a multidrug-resistant strain of enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7 causing a family outbreak in Japan*. Journal of medical microbiology; **54**: 867-72.

ALEKSHUN, M.N., LEVY, S.B. (2007). *Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance*. Cell; **128**: 1037-50.

AMBLER, R.P. (1980). *The structure of beta-lactamases*. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences; **289**: 321-31.

ANONYMUS (2000). *Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen (Infektionsschutzgesetz)*. Bundesgesetzblatt I S.1045, zul. geänd. d. G. v. 28.07.11 (BGBl. I S.1622).

ANONYMUS (2008). *Joint FAO/WHO/OIE expert meeting on critically important antimicrobials*. Report of a meeting held in FAO, Rome, Italy, 26–30 November 2007: http://www.who.int/foodborne_disease/resources/Report_CIA_Meeting.pdf. Zugriff: 28.02.2012.

ANONYMUS (2011a). *Deutsche Antibiotika-Resistenzstrategie*. Bundesministerium für Gesundheit: http://www.bmelv.de/SharedDocs/Downloads/Broschueren/DART.pdf?__blob=publicationFile. Zugriff: 28.02.2012.

ANONYMUS (2011b). *Überarbeiteter Abschlussbericht Evaluierung des Antibiotikaeinsatzes in der Hähnchenhaltung*. Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein Westfalen: http://www.umwelt.nrw.de/verbraucherschutz/pdf/antibiotika_masthaehnchen_abschlussbericht.pdf. Zugriff: 30.08.2012.

- ANYNOMUS (2012). *ESBL and (fluoro)quinolone resistance in Enterobacteriaceae- Ergänzende Informationen zu vorläufigen Ergebnissen aus dem Forschungsverbund RESET*. Reset-Verbund: http://www.reset-verbund.de/documents/PM_RESET_material_2012-01-25.pdf. Zugriff: 28.02.2012.
- ARPIN, C., DUBOIS, V., COULANGE, L., ANDRE, C., FISCHER, I., NOURY, P., GROBOST, F., BROCHET, J.P., JULLIN, J., DUTILH, B., LARRIBET, G., LAGRANGE, I., QUENTIN, C. (2003). *Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in community and private health care centers*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*; **47**: 3506-14.
- ASAKURA, H., MAKINO, S., SHIRAHATA, T., TSUKAMOTO, T., KURAZONO, H., IKEDA, T., TAKESHI, K. (1998). *Detection and genetical characterization of Shiga toxin-producing Escherichia coli from wild deer*. *Microbiology and immunology*; **42**: 815-22.
- ARMUS, N. (2009). *Antibiotika-Resistenzen bei Verotoxin-Bildenden Escherichia Coli-Stämmen, isoliert aus Kot und Lebensmittelproben der Tierart Rind*. Dissertation. Justus-Liebig-Universität, Giessen.
- BABIC, M., HUJER, A.M., BONOMO, R.A. (2006). *What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases*. *Drug resistance updates*; **9**: 142-56.
- BARDIAU, M., GREGOIRE, F., MUUYLAERT, A., NAHAYO, A., DUPREZ, J.N., MAINIL, J., LINDEN, A. (2010). *Enteropathogenic (EPEC), enterohaemorrhagic (EHEC) and verotoxigenic (VTEC) Escherichia coli in wild cervids*. *Journal of applied microbiology*; **109**: 2214-22.
- BARTHELEMY, M., PEDUZZI, J., BEN YAGHLANE, H., LABIA, R. (1988). *Single amino acid substitution between SHV-1 beta-lactamase and cefotaxime-hydrolyzing SHV-2 enzyme*. *FEBS letters*; **231**: 217-20.
- BAUERNFEIND, A., GRIMM, H., SCHWEIGHART, S. (1990). *A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of Escherichia coli*. *Infection*; **18**: 294-8.
- BEBRONE, C. (2007). *Metallo-beta-lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily*. *Biochemical pharmacology*; **74**: 1686-701.

- BEBRONE, C., LASSAUX, P., VERCHEVAL, L., SOHIER, J.S., JEHAES, A., SAUVAGE, E., GALLEN, M. (2010). *Current challenges in antimicrobial chemotherapy: focus on β -lactamase inhibition*. *Drugs*; **70**: 651-79.
- BENNETT, P.M. (2008). *Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria*. *British journal of pharmacology*; **153**: 347-57.
- BERGENHOLTZ, R.D., JORGENSEN, M.S., HANSEN, L.H., JENSEN, L.B., HASMAN, H. (2009). *Characterization of genetic determinants of extended-spectrum cephalosporinases (ESCs) in Escherichia coli isolates from Danish and imported poultry meat*. *Journal of antimicrobial chemotherapy*; **64**: 207-9.
- BETTELHEIM, K.A., HORNITZKY, M.A., DJORDJEVIC, S.P., KUZEVSKI, A. (2003). *Antibiotic resistance among verocytotoxigenic Escherichia coli (VTEC) and non-VTEC isolated from domestic animals and humans*. *Journal of medical microbiology*; **52**: 155-62.
- BEUTIN, L., GEIER, D., STEINRUCK, H., ZIMMERMANN, S., SCHEUTZ, F. (1993). *Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing Escherichia coli in seven different species of healthy domestic animals*. *Journal of clinical microbiology*; **31**: 2483-8.
- BFR (2010). *Wissenschaftliche Bewertung der Ergebnisse des Resistenzmonitorings nach dem Zoonosen-Stichprobenplan 2009*. Stellungnahme Nr. 047/2010 des Bundesinstituts für Risikobewertung vom 1. November 2010: http://www.bfr.bund.de/cm/343/-wissenschaftliche_bewertung_der_ergebnisse_des_resistenzmonitorings_nach_dem_zoonosen_stichprobenplan_2009.pdf. Zugriff: 25.02.2012.
- BIELASZEWSKA, M., PRAGER, R., KOCK, R., MELLMANN, A., ZHANG, W., TSCHAPE, H., TARR, P.I., KARCH, H. (2007). *Shiga toxin gene loss and transfer in vitro and in vivo during enterohemorrhagic Escherichia coli O26 infection in humans*. *Applied and environmental microbiology*; **73**: 3144-50.
- BIELASZEWSKA, M., MELLMANN, A., ZHANG, W., KÖCK, R., FRUTH, A., BAUWENS, A., PETERS, G., KARCH, H. (2011). *Characterisation of the Escherichia coli strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study*. *The Lancet Infectious Diseases*; **11**: 671-76.

- BIELASZEWSKA, M., IDELEVICH, E.A., ZHANG, W., BAUWENS, A., SCHAUMBURG, F., MELLMANN, A., PETERS, G., KARCH, H. (2012). *Epidemic Escherichia coli O104:H4: Effects of antibiotics on Shiga toxin 2 production and bacteriophage induction*. Antimicrobial agents and chemotherapy; **56**: 3277-82.
- BIRKEL, K. (2012). *BUND- Bund für Umwelt und Naturschutz Deutschland-Analyse von Fleischproben auf MRSA und ESBL-produzierende Keime – Fragen und Antworten*. http://www.bund.net/fileadmin/bundnet/pdfs/landwirtschaft/20120108_landwirtschaft_fleischprobenanalyse_fragen_antworten.pdf. Zugriff: 24.01.2012.
- BIRKETT, C.I., LUDLAM, H.A., WOODFORD, N., BROWN, D.F., BROWN, N.M., ROBERTS, M.T., MILNER, N., CURRAN, M.D. (2007). *Real-time TaqMan PCR for rapid detection and typing of genes encoding CTX-M extended-spectrum beta-lactamases*. Journal of medical microbiology; **56**: 52-5.
- BLANCO, M., BLANCO, J.E., BLANCO, J., MORA, A., PRADO, C., ALONSO, M.P., MOURINO, M., MADRID, C., BALSALOBRE, C., JUAREZ, A. (1997). *Distribution and characterization of faecal verotoxin-producing Escherichia coli (VTEC) isolated from healthy cattle*. Veterinary microbiology; **54**: 309-19.
- BLUMBERG, P.M., STROMINGER, J.L. (1974). *Interaction of penicillin with the bacterial cell: penicillin-binding proteins and penicillin-sensitive enzymes*. Bacteriological reviews; **38**: 291-335.
- BOERLIN, P., McEWEN, S.A., BOERLIN-PETZOLD, F., WILSON, J.B., JOHNSON, R.P., GYLES, C.L. (1999). *Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing Escherichia coli and disease in humans*. Journal of clinical microbiology; **37**: 497-503.
- BOERLIN, P., WHITE, D.G. (2006). *Antimicrobial Resistance and its epidemiology*. In: Giguère, S., Prescott, J.F., Baggot, J.D., Walker, R.D., Dowling, P.M. (Hrsg.): Antimicrobial therapy in veterinary medicine, 4. Aufl.: Blackwell Publishing, Iowa, USA: 27-45.

- BONARDI, S., MAGGI, E., PIZZIN, G., MORABITO, S., CAPRIOLI, A. (2001). *Faecal carriage of Verocytotoxin-producing Escherichia coli O157 and carcass contamination in cattle at slaughter in northern Italy*. International journal of food microbiology; **66**: 47-53.
- BONNET, R. (2004). *Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes*. Antimicrobial agents and chemotherapy; **48**: 1-14.
- BOYD, D.B. (1981). *Theoretical studies of beta-lactam antibiotics*. Annals of the New York Academy of Sciences; **367**: 531-44.
- BRADFORD, P.A. (2001). *Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat*. Clinical microbiology reviews; **14**: 933-51.
- BTK (2010). *Leitlinien für den sorgfältigen Umgang mit antibakteriell wirksamen Tierarzneimitteln*. Beilage zum Deutschen Tierärzteblatt der Bundestierärztekammer: 10/2010.
- BUCHHOLZ, U., BERNARD, H., WERBER, D., BOHMER, M.M., REMSCHMIDT, C., WILKING, H., DELERE, Y., AN DER HEIDEN, M., ADLHOCH, C., DREESMAN, J., EHLERS, J., ETHELBERG, S., FABER, M., FRANK, C., FRICKE, G., GREINER, M., HOHLE, M., IVARSSON, S., JARK, U., KIRCHNER, M., KOCH, J., KRAUSE, G., LUBER, P., ROSNER, B., STARK, K., KUHNE, M. (2011). *German outbreak of Escherichia coli O104:H4 associated with sprouts*. The New England journal of medicine; **365**: 1763-70.
- BÜCHTER, B. (2010). *Vorkommen und Charakterisierung von Extended-Spectrum-Beta-Laktamase (ESBL)-produzierenden Escherichia coli bei Lebensmittel liefernden Tieren*. Dissertation, Freie Universität, Berlin.
- BÜLTE, M. (2004). *Vorkommen von enterohämorrhagischen E. coli-Stämmen (EHEC) bei Nutztieren*. Deutsche tierärztliche Wochenschrift; **111**: 314-7.
- BUNDESANZEIGER (2010). *Bekanntmachung gemäß § 2 Absatz 2 Satz 4 der DIMDI-Arzneimittelverordnung (DIMDI-AMV) vom 19. November 2010*. Fundstelle: eBAnz AT122 2010 B1.

- BUSH, K., JACOBY, G.A., MEDEIROS, A.A. (1995). *A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure*. Antimicrobial agents and chemotherapy; **39**: 1211-33.
- BUSH, K. (2008). *Extended-spectrum beta-lactamases in North America, 1987-2006*. Clinical microbiology and infection; **14** Suppl 1: 134-43.
- BUSH, K., JACOBY, G.A. (2010). *Updated functional classification of beta-lactamases*. Antimicrobial agents and chemotherapy; **54**: 969-76.
- BUSH, K., FISHER, J.F. (2011). *Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new beta-lactamases from gram-negative bacteria*. Annual review of microbiology; **65**: 455-78.
- BUVENS, G., BOGAERTS, P., GLUPCZYNSKI, Y., LAUWERS, S., PIERARD, D. (2010). *Antimicrobial resistance testing of verocytotoxin-producing Escherichia coli and first description of TEM-52 extended-spectrum beta-lactamase in serogroup O26*. Antimicrobial agents and chemotherapy; **54**: 4907-9.
- CANTON, R., COQUE, T.M. (2006). *The CTX-M beta-lactamase pandemic*. Current opinion in microbiology; **9**: 466-75.
- CANTON, R., MOROSINI, M.I., DE LA MAZA, O.M., DE LA PEDROSA, E.G. (2008). *IRT and CMT beta-lactamases and inhibitor resistance*. Clinical microbiology and infection; **14** Suppl 1: 53-62.
- CAPRIOLI, A., DONELLI, G., FALBO, V., PASSI, C., PAGANO, A., MANTOVANI, A. (1991). *Antimicrobial resistance and production of toxins in Escherichia coli strains from wild ruminants and the alpine marmot*. Journal of wildlife diseases; **27**: 324-7.
- CARATTOLI, A. (2008). *Animal reservoirs for extended spectrum beta-lactamase producers*. Clinical microbiology and infection; **14** Suppl 1: 117-23.
- CLSI (2008). *Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard - third edition*. Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI document M31-A3. Vol. 28 No. 8.

- CLSI (2011). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-first informational supplement*. Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI document M100-S21. Vol. 31 No.1.
- COQUE, T.M., BAQUERO, F., CANTON, R. (2008). *Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe*. Euro Surveillance; **13**: 19051.
- COSTA, D., POETA, P., SAENZ, Y., VINUE, L., ROJO-BEZARES, B., JOUINI, A., ZARAZAGA, M., RODRIGUES, J., TORRES, C. (2006). *Detection of Escherichia coli harbouring extended-spectrum beta-lactamases of the CTX-M, TEM and SHV classes in faecal samples of wild animals in Portugal*. Journal of antimicrobial chemotherapy; **58**: 1311-2.
- CRAY, W.C., JR., MOON, H.W. (1995). *Experimental infection of calves and adult cattle with Escherichia coli O157:H7*. Applied and environmental microbiology; **61**: 1586-90.
- DALLENNE, C., DA COSTA, A., DECRE, D., FAVIER, C., ARLET, G. (2010). *Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae*. Journal of antimicrobial chemotherapy; **65**: 490-5.
- DANMAP (2011). *DANMAP 2010 - Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark*. http://www.danmap.org/Downloads/~media/Projekt%20sites/Danmap/DANMAP%20reports/Danmap_2010.ashx. Zugriff: 28.02.2012.
- DATTA, N., KONTOMICHALOU, P. (1965). *Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae*. Nature; **208**: 239-41.
- DAVIES, J., WRIGHT, G.D. (1997). *Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics*. Trends in microbiology; **5**: 234-40.
- DGI (2011). *EHEC und Antibiotikabehandlung*. Deutsche Gesellschaft für Infektiologie e.V.: http://www.dgi-net.de/images/stories/DGI-Positionspapier_EHEC_und_Antibiotika_-20110601.pdf. Zugriff: 28.02.2012.

- DIERIKX, C., VAN ESSEN-ZANDBERGEN, A., VELDMAN, K., SMITH, H., MEVIUS, D. (2010). *Increased detection of extended spectrum beta-lactamase producing Salmonella enterica and Escherichia coli isolates from poultry*. Veterinary microbiology; **145**: 273-8.
- DRAWZ, S.M., BONOMO, R.A. (2010). *Three decades of beta-lactamase inhibitors*. Clinical microbiology reviews; **23**: 160-201.
- DRIEUX, L., BROSSIER, F., SOUGAKOFF, W., JARLIER, V. (2008). *Phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide*. Clinical microbiology and infection; **14** Suppl 1: 90-103.
- Ec (2003). *Opinion of the scientific committee on veterinary measures relating to public health on verotoxigenic E. coli (VTEC) in foodstuffs*. European Commission. Health & consumer protection directorate-general: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scv/out-58_en.pdf. Zugriff: 01.03.2012.
- ECDC (2011). *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2010. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)*. European Centre for Disease Prevention and Control: http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1111_SUR_AMR_data.pdf. Zugriff: 28.02.2012.
- ECDC (2012). *The EARS-Net interactive database. Proportion of 3rd gen. cephalosporins (R+I) resistant Escherichia coli isolates in participating countries in 2010*. The report reflects the state of submissions in the European Surveillance System on 2012-02-29: European Centre for Disease Prevention and Control: http://ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net/database/Pages/map_reports.aspx. Zugriff: 29.02.2012.
- EFSA (2011a). *Scientific Opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum β -lactamases and/or AmpC β -lactamases in food and food-producing animals*. EFSA Journal; **9**: 2322.
- EFSA (2011b). *The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in the European Union in 2009*. EFSA Journal; **9**: 2154.

- EGGERT, M., STÜBER, E., HEURICH, M., FREDRIKSSON-AHOMAA, M., BURGOS, Y., BEUTIN, L., MÄRTLBAUER, E. (2012). *Detection and characterisation of Shiga toxin-producing Escherichia coli in faeces and lymphatic tissue of free-ranging deer*. *Epidemiology and infection*; **28**: 1-9.
- EMEA (1999). *Antibiotic resistance in the European Union associated with therapeutic use of veterinary medicines. Report and qualitative risk assessment by the committee for veterinary medicinal products*. The European agency for the evaluation of medicinal products (EMEA): http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2009/10/WC500005166.pdf. Zugriff: 19.03.2012.
- FENG, P.C., JINNEMAN, K., SCHEUTZ, F., MONDAY, S.R. (2011). *Specificity of PCR and serological assays in the detection of Escherichia coli Shiga toxin subtypes*. *Applied and environmental microbiology*; **77**: 6699-702.
- FLI (2011). *Enterohämorrhagische Escherichia coli (EHEC) / Shiga-Toxin produzierende E. coli (STEC)*. Friedrich-Loeffler-Institut: http://www.fli.bund.de/fileadmin/dam_uploads-/images/Presse_Forschung/110607_FLI_EHEC_Information.pdf. Zugriff: 04.02.2012.
- FRANK, C., WERBER, D., CRAMER, J.P., ASKAR, M., FABER, M., AN DER HEIDEN, M., BERNARD, H., FRUTH, A., PRAGER, R., SPODE, A., WADL, M., ZOUFALY, A., JORDAN, S., KEMPER, M.J., FOLLIN, P., MULLER, L., KING, L.A., ROSNER, B., BUCHHOLZ, U., STARK, K., KRAUSE, G. (2011). *Epidemic profile of Shiga-toxin-producing Escherichia coli O104:H4 outbreak in Germany*. *The New England journal of medicine*; **365**: 1771-80.
- GAREIS, M., PICHNER, R., BREY, N., STEINRÜCK, H. (2000). *Nachweis Verotoxin-bildender E.coli (VTEC) bei gesunden Mitarbeitern eines Fleisch verarbeitenden Betriebes*. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*; **43**: 781-87.
- GERMAP (2008). *Antibiotika-Resistenz und –Verbrauch. Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland*. www.bvl.bund.de/germap2008. Zugriff: 28.02.2012.
- GERMAP (2011). *Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland*. www.bvl.bund.de/germap2010. Zugriff: 28.02.2012.

- GIGUÈRE, S. (2006). *Antimicrobial drug action and interaction: an introduction*. In: Giguère, S., Prescott, J.F., Baggot, J.D., Walker, R.D., Dowling, P.M. (Hrsg.): *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*, 4. Aufl.: Blackwell Publishing, Iowa, USA: 3-10.
- GNIADKOWSKI, M. (2008). *Evolution of extended-spectrum beta-lactamases by mutation*. *Clinical microbiology infection*; **14** Suppl 1: 11-32.
- GOW, S.P., WALDNER, C.L. (2009). *Antimicrobial resistance and virulence factors stx1, stx2, and eae in generic Escherichia coli isolates from calves in western Canadian cow-calf herds*. *Microbial drug resistance*; **15**: 61-7.
- GRAUKE, L.J., KUDVA, I.T., YOON, J.W., HUNT, C.W., WILLIAMS, C.J., HOVDE, C.J. (2002). *Gastrointestinal tract location of Escherichia coli O157:H7 in ruminants*. *Applied and environmental microbiology*; **68**: 2269-77.
- GRAVE, K., TORREN-EDO, J., MACKAY, D. (2010). *Comparison of the sales of veterinary antibacterial agents between 10 European countries*. *Journal of antimicrobial chemotherapy*; **65**: 2037-40.
- GYLES, C.L. (2007). *Shiga toxin-producing Escherichia coli: an overview*. *Journal of animal science*; **85**: 45-62.
- HARBOTTLE, H., THAKUR, S., ZHAO, S., WHITE, D.G. (2006). *Genetics of antimicrobial resistance*. *Animal biotechnology*; **17**: 111-24.
- HEUVELINK, A.E., VAN DEN BIGGELAAR, F.L., ZWARTKRUIS-NAHUIS, J., HERBES, R.G., HUYBEN, R., NAGELKERKE, N., MELCHERS, W.J., MONNENS, L.A., DE BOER, E. (1998). *Occurrence of verocytotoxin-producing Escherichia coli O157 on Dutch dairy farms*. *Journal of clinical microbiology*; **36**: 3480-7.
- HIRSCH-KAUFFMANN, M., SCHWEIGER, M., SCHWEIGER, M.-R. (2009). *Mikrobiologie*. In: Hirsch-Kauffmann, M., Schweiger, M., Schweiger, M.-R. (Hrsg.): *Biologie und molekulare Medizin*, 7. Aufl.: Thieme Verlag, Stuttgart: 288-92.

- HOFFMANN, H., STURENBURG, E., HEESEMANN, J., ROGGENKAMP, A. (2006). *Prevalence of extended-spectrum beta-lactamases in isolates of the Enterobacter cloacae complex from German hospitals*. Clinical microbiology and infection; **12**: 322-30.
- HULETSKY, A., KNOX, J.R., LEVESQUE, R.C. (1993). *Role of Ser-238 and Lys-240 in the hydrolysis of third-generation cephalosporins by SHV-type beta-lactamases probed by site-directed mutagenesis and three-dimensional modeling*. Journal of biological chemistry; **268**: 3690-7.
- HUSSEIN, H.S. (2007). *Prevalence and pathogenicity of Shiga toxin-producing Escherichia coli in beef cattle and their products*. Journal of animal science; **85**: 63-72.
- ICAAC (2011). *Bakterielle Infektionen und Antibiotika*. 51. ICAAC- Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 17.-20.09.2011. Chicago, USA. ICAAC Highlights: 5-12.
- IROHA, I.R., OJI, A.E., ESIMONE, C.O. (2008). *Antimicrobial resistance pattern of plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamase producing strains of Escherichia coli*. Scientific Research and Essay; **3**: 215-18.
- ISHII, Y., KIMURA, S., ALBA, J., SHIROTO, K., OTSUKA, M., HASHIZUME, N., TAMURA, K., YAMAGUCHI, K. (2005). *Extended-spectrum beta-lactamase-producing Shiga toxin gene (stx1)-positive Escherichia coli O26:H11: a new concern*. Journal of clinical microbiology; **43**: 1072-5.
- JACOBY, G.A., MUNOZ-PRICE, L.S. (2005). *The new beta-lactamases*. The New England journal of medicine; **352**: 380-91.
- JACOBY, G.A. (2009). *AmpC beta-lactamases*. Clinical microbiology reviews; **22**: 161-82.
- JOUINI, A., VINUE, L., SLAMA, K.B., SAENZ, Y., KLIBI, N., HAMMAMI, S., BOUDABOUS, A., TORRES, C. (2007). *Characterization of CTX-M and SHV extended-spectrum beta-lactamases and associated resistance genes in Escherichia coli strains of food samples in Tunisia*. Journal of antimicrobial chemotherapy; **60**: 1137-41.

- KAHLMETER, G., BROWN, D.F., GOLDSTEIN, F.W., MACGOWAN, A.P., MOUTON, J.W., OSTERLUND, A., RODLOFF, A., STEINBAKK, M., URBASKOVA, P., VATOPOULOS, A. (2003). *European harmonization of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria*. Journal of antimicrobial chemotherapy; **52**: 145-8.
- KANG, C.I., KIM, S.H., PARK, W.B., LEE, K.D., KIM, H.B., KIM, E.C., OH, M.D., CHOE, K.W. (2004). *Bloodstream infections due to extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae: risk factors for mortality and treatment outcome, with special emphasis on antimicrobial therapy*. Antimicrobial agents and chemotherapy; **48**: 4574-81.
- KAPER, J.B., NATARO, J.P., MOBLEY, H.L. (2004). *Pathogenic Escherichia coli*. Nature reviews. Microbiology; **2**: 123-40.
- KAPPSTEIN, I. (2009). *Multiresistente Bakterien*. In: Kappstein, I. (Hrsg.): Nosokomiale Infektionen: Prävention- Labordiagnostik- Antimikrobielle Therapie, 4. Aufl.: Thieme Verlag, Stuttgart: 324-28.
- KARCH, H., TARR, P.I., BIELASZEWSKA, M. (2005). *Enterohaemorrhagic Escherichia coli in human medicine*. International journal of medical microbiology; **295**: 405-18.
- KARMALI, M.A. (2004). *Infection by Shiga toxin-producing Escherichia coli: an overview*. Molecular biotechnology; **26**: 117-22.
- KNOTHE, H., SHAH, P., KRČMERY, V., ANTAL, M., MITSUHASHI, S. (1983). *Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Serratia marcescens*. Infection; **11**: 315-7.
- KON, M., KURAZONO, T., OHSHIMA, M., YAMAGUCHI, M., MORITA, K., WATANABE, N., KANAMORI, M., MATSUSHITA, S. (2005). *[Cefotaxime-resistant shiga toxin-producing Escherichia coli O26: H11 isolated from a patient with diarrhea]*. Kansenshogaku zasshi. The Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases; **79**: 161-8.
- KONG, K.F., SCHNEPER, L., MATHEE, K. (2009). *Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology*. APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica; **118**: 1-36.

- KONOWALCHUK, J., SPEIRS, J.I., STAVRIC, S. (1977). *Vero response to a cytotoxin of Escherichia coli*. Infection and immunity; **18**: 775-9.
- KROKER, R. (2010). *Pharmaka zur Behandlung und Verhütung bakterieller Infektionen*. In: Löscher, W., Ungemach, F., Kroker, R. (Hrsg.): Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren, 8. Aufl.: Enke Verlag, Stuttgart: 249-95.
- KUMAR, A., SCHWEIZER, H.P. (2005). *Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake*. Advanced drug delivery reviews; **57**: 1486-513.
- LEE, J.H., HYEON, J.Y., KIM, Y.G., CHON, J.W., PARK, J.H., PARK, C., CHOI, I.S., KIM, S.K., SEO, K.H. (2012). *Isolation and characterization of shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) in retail edible beef by-products*. Foodborne pathogens and disease; **9**: 145-49.
- LEE, Y., LEE, C.S., KIM, Y.J., CHUN, S., PARK, S., KIM, Y.S., HAN, B.D. (2002). *Development of DNA chip for the simultaneous detection of various beta-lactam antibiotic-resistant genes*. Molecules and cells; **14**: 192-7.
- LEFEBVRE, B., DIARRA, M.S., VINCENT, C., MOISAN, H., MALOUIN, F. (2009). *Relative cytotoxicity of Escherichia coli O157:H7 isolates from beef cattle and humans*. Foodborne pathogens and disease; **6**: 357-64.
- LEINBERGER, D.M., GRIMM, V., RUBTSOVA, M., WEILE, J., SCHROPPEL, K., WICHELHAUS, T.A., KNABBE, C., SCHMID, R.D., BACHMANN, T.T. (2010). *Integrated detection of extended-spectrum-beta-lactam resistance by DNA microarray-based genotyping of TEM, SHV, and CTX-M genes*. Journal of clinical microbiology; **48**: 460-71.
- LEVERSTEIN-VAN HALL, M.A., DIERIKX, C.M., COHEN STUART, J., VOETS, G.M., VAN DEN MUNCKHOF, M.P., VAN ESSEN-ZANDBERGEN, A., PLATTEEL, T., FLUIT, A.C., VAN DE SANDE-BRUIJNSMA, N., SCHARINGA, J., BONTEN, M.J., MEVIUS, D.J. (2011). *Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains*. Clinical Microbiology and Infection; **17**: 873-80.
- LI, B., SUN, J.Y., LIU, Q.Z., HAN, L.Z., HUANG, X.H., NI, Y.X. (2011a). *High prevalence of CTX-M beta-lactamases in faecal Escherichia coli strains from healthy humans in Fuzhou, China*. Scandinavian journal of infectious diseases; **43**: 170-4.

- LI, M.C., WANG, F., LI, F. (2011b). *Identification and molecular characterization of antimicrobial-resistant shiga toxin-producing Escherichia coli isolated from retail meat products*. Foodborne pathogens and disease; **8**: 489-93.
- LILLEHAUG, A., BERGSJO, B., SCHAU, J., BRUHEIM, T., VIKOREN, T., HANDELAND, K. (2005). *Campylobacter spp., Salmonella spp., verocytotoxic Escherichia coli, and antibiotic resistance in indicator organisms in wild cervids*. Acta veterinaria Scandinavica; **46**: 23-32.
- LITERAK, I., DOLEJSKA, M., RADIMERSKY, T., KLIMES, J., FRIEDMAN, M., AARESTRUP, F.M., HASMAN, H., CIZEK, A. (2010). *Antimicrobial-resistant faecal Escherichia coli in wild mammals in central Europe: multiresistant Escherichia coli producing extended-spectrum beta-lactamases in wild boars*. Journal of applied microbiology; **108**: 1702-11.
- LIVERMORE, D.M., BROWN, D.F. (2001). *Detection of beta-lactamase-mediated resistance*. Journal of antimicrobial chemotherapy; **48** Suppl 1: 59-64.
- LIVERMORE, D.M. (2008). *Defining an extended-spectrum beta-lactamase*. Clinical Microbiology and Infection; **14** Suppl 1: 3-10.
- LUHOFFER, G., BÖTTNER, A., HAFEZ, H.M., KASKE, M., KEHRENBERG, C., KIETZMANN, M., KLARMANN, D., KLEIN, G., KRABISCH, P., KUHN, T., RICHTER, A., SIGGE, C., TRAEDE, W., WALDMANN, K.H., WALLMANN, J., WERCKENTHIN, C., SCHWARZ, S. (2004). *Vorschläge der Arbeitsgruppe "Antibiotikaresistenz" für die Belegung von Mikrotiterplatten zur Empfindlichkeitsprüfung von Bakterien gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen in der Routine-diagnostik-Mastitis- und Grosstierlayouts*. Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift; **117**: 245-51.
- LÜLLMANN, H., MOHR, K., HEIN, L. (2010). *Pharmakologie und Toxikologie*. 17. Aufl.: Thieme Verlag, Stuttgart.
- MACK, D. (2009). *Diagnostik von Extended-Spectrum- β -Laktamasen bei Enterobacteriaceae*. In: Neumeister, B., Geiss, H.K., Braun, R.W., Kimmig, P. (Hrsg.): Mikrobiologische Diagnostik, 2. Aufl.: Thieme Verlag, Stuttgart: 280-86.

- MAIDHOF, H., GUERRA, B., ABBAS, S., ELSHEIKHA, H.M., WHITTAM, T.S., BEUTIN, L. (2002). *A multiresistant clone of Shiga toxin-producing Escherichia coli O118:[H16] is spread in cattle and humans over different European countries*. Applied and environmental microbiology; **68**: 5834-42.
- MARAN (2011). *Monitoring of antimicrobial resistance and antibiotic usage in animals in the Netherlands in 2009*. <http://edepot.wur.nl/165958>. Zugriff: 20.02.2012.
- MCDERMOTT, P.F., WALKER, R.D., WHITE, D.G. (2003). *Antimicrobials: modes of action and mechanisms of resistance*. International journal of toxicology; **22**: 135-43.
- MELLMANN, A., BIELASZEWSKA, M., ZIMMERHACKL, L.B., PRAGER, R., HARMSEN, D., TSCHAPE, H., KARCH, H. (2005). *Enterohemorrhagic Escherichia coli in human infection: in vivo evolution of a bacterial pathogen*. Clinical infectious diseases; **41**: 785-92.
- MELTON-CELSA, A., ROBINSON, C., SMITH, M., O'BRIEN, A. (2007). *Shigatoxins (Stxs): multifaceted pathogenicity determinants*. In: Brogden, K.A., Minion, F.C., Cornick, N., Stanton, T.B., Zhang, Q., Nolan, L.K., Wannemuehler, M.J. (Hrsg.): Virulence Mechanisms of bacterial pathogens, 4. Aufl.: ASM Press, Washington D.C.: 239-49.
- MELZER, M., PETERSEN, I. (2007). *Mortality following bacteraemic infection caused by extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing E. coli compared to non-ESBL producing E. coli*. Journal of infection; **55**: 254-9.
- MOHANTY, S., GAIND, R., RANJAN, R., DEB, M. (2010). *Use of the cefepime-clavulanate ESBL Etest for detection of extended-spectrum beta-lactamases in AmpC co-producing bacteria*. Journal of infection in developing countries; **4**: 24-9.
- MOLAND, E.S., SANDERS, C.C., THOMSON, K.S. (1998). *Can results obtained with commercially available MicroScan microdilution panels serve as an indicator of beta-lactamase production among escherichia coli and Klebsiella isolates with hidden resistance to expanded-spectrum cephalosporins and aztreonam?* Journal of clinical microbiology; **36**: 2575-9.

- MONSTEIN, H.J., OSTHOLM-BALKHED, A., NILSSON, M.V., NILSSON, M., DORNBUSCH, K., NILSSON, L.E. (2007). *Multiplex PCR amplification assay for the detection of blaSHV, blaTEM and blaCTX-M genes in Enterobacteriaceae*. APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica; **115**: 1400-8.
- MORA, A., BLANCO, J.E., BLANCO, M., ALONSO, M.P., DHABI, G., ECHEITA, A., GONZALEZ, E.A., BERNARDEZ, M.I., BLANCO, J. (2005). *Antimicrobial resistance of Shiga toxin (verotoxin)-producing Escherichia coli O157:H7 and non-O157 strains isolated from humans, cattle, sheep and food in Spain*. Research in microbiology; **156**: 793-806.
- MUTSCHLER, E., GEISLINGER, G., KROEMER, H.K., RUTH, P., SCHÄFER-KORTING, M. (2008). *Mutschler Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. 9. Aufl.: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
- NAAS, T., POIREL, L., NORDMANN, P. (2008). *Minor extended-spectrum beta-lactamases*. Clinical microbiology and infection; **14** Suppl 1: 42-52.
- NATARO, J.P., KAPER, J.B. (1998). *Diarrheagenic Escherichia coli*. Clinical microbiology reviews; **11**: 142-201.
- NAYLOR, S.W., GALLY, D.L., LOW, J.C. (2005). *Enterohaemorrhagic E. coli in veterinary medicine*. International journal of medical microbiology; **295**: 419-41.
- NICOLAS-CHANOINE, M.H. (1997). *Inhibitor-resistant beta-lactamases*. Journal of antimicrobial chemotherapy; **40**: 1-3.
- O'BRIEN, A.D., LAVECK, G.D., THOMPSON, M.R., FORMAL, S.B. (1982). *Production of Shigella dysenteriae type 1-like cytotoxin by Escherichia coli*. Journal of infectious diseases; **146**: 763-9.
- OLESEN, I., HASMAN, H., AARESTRUP, F.M. (2004). *Prevalence of beta-lactamases among ampicillin-resistant Escherichia coli and Salmonella isolated from food animals in Denmark*. Microbial drug resistance; **10**: 334-40.

- OVERDEVEST, I., WILLEMSSEN, I., RIJNSBURGER, M., EUSTACE, A., XU, L., HAWKEY, P., HECK, M., SAVELKOUL, P., VANDENBROUCKE-GRAULS, C., VAN DER ZWALUW, K., HUIJSDENS, X., KLUYTMANS, J. (2011). *Extended-spectrum beta-lactamase genes of Escherichia coli in chicken meat and humans, The Netherlands*. Emerging infectious diseases; **17**: 1216-22.
- PATERSON, D.L., KO, W.C., VON GOTTEBERG, A., MOHAPATRA, S., CASELLAS, J.M., GOOSSENS, H., MULAZIMOGLU, L., TRENHOLME, G., KLUGMAN, K.P., BONOMO, R.A., RICE, L.B., WAGENER, M.M., MCCORMACK, J.G., YU, V.L. (2004). *Antibiotic therapy for Klebsiella pneumoniae bacteremia: implications of production of extended-spectrum beta-lactamases*. Clinical infectious diseases; **39**: 31-7.
- PATERSON, D.L., BONOMO, R.A. (2005). *Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update*. Clinical microbiology reviews; **18**: 657-86.
- PATERSON, D.L. (2006). *Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae*. American journal of infection control; **34**: 20-8; discussion 64-73.
- PFALLER, M.A., SEGRET, J. (2006). *Overview of the epidemiological profile and laboratory detection of extended-spectrum beta-lactamases*. Clinical infectious diseases; **42** Suppl 4: 153-63.
- PFEIFER, Y., CULLIK, A., WITTE, W. (2010). *Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens*. International journal of medical microbiology; **300**: 371-9.
- PITOUT, J.D., HOSSAIN, A., HANSON, N.D. (2004). *Phenotypic and molecular detection of CTX-M-beta-lactamases produced by Escherichia coli and Klebsiella spp.* Journal of clinical microbiology; **42**: 5715-21.
- PODSCHUN, R. (2012). *Kluyvera, Koserella (Yokenella), Leclerica, Leminorella, Moellerella*. In: Darei, G., Handermann, M., Sonntag, H.-G., Zöller, L. (Hrsg.): Lexikon der Infektionskrankheiten des Menschen, 4. Aufl.: Springer-Verlag, Berlin.

- POETA, P., RADHOUANI, H., PINTO, L., MARTINHO, A., REGO, V., RODRIGUES, R., GONCALVES, A., RODRIGUES, J., ESTEPA, V., TORRES, C., IGREJAS, G. (2009). *Wild boars as reservoirs of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing Escherichia coli of different phylogenetic groups*. Journal of basic microbiology; **49**: 584-8.
- RAWAT, D., NAIR, D. (2010). *Extended-spectrum beta-lactamases in gram negative bacteria*. Journal of global infectious diseases; **2**: 263-74.
- RILEY, L.W., REMIS, R.S., HELGERSON, S.D., MCGEE, H.B., WELLS, J.G., DAVIS, B.R., HEBERT, R.J., OLCOTT, E.S., JOHNSON, L.M., HARGRETT, N.T., BLAKE, P.A., COHEN, M.L. (1983). *Hemorrhagic colitis associated with a rare Escherichia coli serotype*. The New England journal of medicine; **308**: 681-5.
- RKI (2007). *ESBL und AmpC: β -Laktamasen als eine Hauptursache der Cephalosporin-Resistenz bei Enterobakterien*. Epidemiologisches Bulletin; **28**: 247-50.
- RKI (2011a). *Abschließende Darstellung und Bewertung der epidemiologischen Erkenntnisse im EHEC O104:H4 Ausbruch Deutschland 2011*. Robert-Koch-Institut: http://edoc.rki.de/documents/rki_ab/reeFNxULvsdZo/PDF/262b4Pk2TGGs.pdf. Zugriff: 20.02.2012.
- RKI (2011b). *Erkrankungen durch Enterohämorrhagische Escherichia coli (EHEC), RKI-Ratgeber für Ärzte*. Robert Koch-Institut: <http://edoc.rki.de/series/rki-ratgeber-fuer-arzte/2008/PDF/erkrankungen-durch-enterohaemorrhagische-escherichia-coli-%28-ehec%29.pdf>. Zugriff: 20.02.2012.
- RKI (2012). *Aktuelle Statistik meldepflichtiger Infektionskrankheiten, Deutschland*. Epidemiologisches Bulletin; **3**: 24-26.
- RODLOFF, A. (2009). *Antimikrobielle Empfindlichkeitstestung: Grundlagen, Verfahren, Standards*. In: Neumeister, B., Geiss, H.K., Braun, R.W., Kimmig, P. (Hrsg.): Mikrobiologische Diagnostik, 2. Aufl.: Thieme Verlag, Stuttgart: 259-66.
- ROSSOLINI, G.M., D'ANDREA, M.M., MUGNAIOLI, C. (2008). *The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases*. Clinical Microbiology and Infection; **14** Suppl 1: 33-41.

- RUIMY, R., BRISABOIS, A., BERNEDE, C., SKURNIK, D., BARNAT, S., ARLET, G., MOMCILOVIC, S., ELBAZ, S., MOURY, F., VIBET, M.A., COURVALIN, P., GUILLEMOT, D., ANDREMONT, A. (2010). *Organic and conventional fruits and vegetables contain equivalent counts of Gram-negative bacteria expressing resistance to antibacterial agents*. *Environmental microbiology*; **12**: 608-15.
- SANCHEZ, S., GARCIA-SANCHEZ, A., MARTINEZ, R., BLANCO, J., BLANCO, J.E., BLANCO, M., DAHBI, G., MORA, A., HERMOSO DE MENDOZA, J., ALONSO, J.M., REY, J. (2009). *Detection and characterisation of Shiga toxin-producing Escherichia coli other than Escherichia coli O157:H7 in wild ruminants*. *Veterinary journal*; **180**: 384-8.
- SCHMIDT, H., VON MALDEGHEM, J., FROSCHE, M., KARCH, H. (1998). *Antibiotic susceptibilities of verocytotoxin-producing Escherichia coli O157 and non-O157 strains isolated from patients and healthy subjects in Germany during 1996*. *Journal of antimicrobial chemotherapy*; **42**: 548-50.
- SCHNEIDEREIT, M. (2006). *Antibiotikaeinsatz in der Veterinärmedizin – Situation in Deutschland und anderen europäischen Veredelungsregionen*. Bundesverband für Tiergesundheit (BfT): http://www.bft-online.de/fileadmin/bft/schwerpunktthemen/antibiotikaeinsatz_in_der_veterinaermedizin_folien.pdf. Zugriff: 21.02.2012.
- SCHROEDER, C.M., ZHAO, C., DEBROY, C., TORCOLINI, J., ZHAO, S., WHITE, D.G., WAGNER, D.D., MCDERMOTT, P.F., WALKER, R.D., MENG, J. (2002). *Antimicrobial resistance of Escherichia coli O157 isolated from humans, cattle, swine, and food*. *Applied and environmental microbiology*; **68**: 576-81.
- SCHULTSZ, C., GEERLINGS, S. (2012). *Plasmid-mediated resistance in Enterobacteriaceae: changing landscape and implications for therapy*. *Drugs*; **72**: 1-16.
- SCHWARZ, S., KEHRENBURG, C., WALSH, T.R. (2001). *Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production*. *International journal of antimicrobial agents*; **17**: 431-37.
- SCHWARZ, S., CHASLUS-DANCLA, E. (2001). *Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance*. *Veterinary research*; **32**: 201-25.

- SCHWARZ, S., BÖTTNER, A., HAFEZ, H.M., KEHRENBURG, C., KIETZMANN, M., KLARMANN, D., KLEIN, G., KRABISCH, P., KUHN, T., LUHOFFER, G., RICHTER, A., TRAEGER, W., WALDMANN, K.H., WALLMANN, J., WERCKENTHIN, C. (2003). *Empfindlichkeitsprüfung bakterieller Infektionserreger von Tieren gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen: Methoden zur in-vitro Empfindlichkeitsprüfung und deren Eignung in Hinblick auf die Erarbeitung therapeutisch nutzbarer Ergebnisse*. Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift; **116**: 353-61.
- SCHWARZ, S., SILLEY, P., SIMJEE, S., WOODFORD, N., VAN DUIJKEREN, E., JOHNSON, A.P., GAASTRA, W. (2010). *Editorial: assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals*. Journal of antimicrobial chemotherapy; **65**: 601-4.
- SERNA, A.T., BOEDEKER, E.C. (2008). *Pathogenesis and treatment of Shiga toxin-producing Escherichia coli infections*. Current opinion in gastroenterology; **24**: 38-47.
- SIROT, D. (1995). *Extended-spectrum plasmid-mediated beta-lactamases*. Journal of antimicrobial chemotherapy; **36** Suppl A: 19-34.
- SMET, A., MARTEL, A., PERSOONS, D., DEWULF, J., HEYNDRIKX, M., HERMAN, L., HAESBROUCK, F., BUTAYE, P. (2010). *Broad-spectrum beta-lactamases among Enterobacteriaceae of animal origin: molecular aspects, mobility and impact on public health*. FEMS microbiology reviews; **34**: 295-316.
- SMITH, K.E., WILKER, P.R., REITER, P.L., HEDICAN, E.B., BENDER, J.B., HEDBERG, C.W. (2012). *Antibiotic treatment of Escherichia coli O157 infection and the risk of hemolytic uremic syndrome, Minnesota*. Pediatric infectious disease journal; **31**: 37-41.
- SPARBIER, K., SCHUBERT, S., WELLER, U., BOOGEN, C., KOSTRZEWA, M. (2012). *MALDI-TOF MS based functional assay for the rapid detection of resistance against β -lactam antibiotics*. Journal of clinical microbiology; **50**: 927-37.
- STAUCH, M. (2011). *Ausbruch von ESBL bildenden Klebsiella pneumoniae im Zentrum für Kinderheilkunde Klinikum Bremen Mitte im Jahr 2011*. Senatspressestelle Bremen: http://www.senatspressestelle.bremen.de/sixcms/media.php/13/111220_Bericht_Klinikum.pdf. Zugriff: 20.02.2012.

- STEPHAN, R., SCHUMACHER, S. (2001). *Resistance patterns of non-O157 Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) strains isolated from animals, food and asymptomatic human carriers in Switzerland*. Letters in applied microbiology; **32**: 114-7.
- STURENBURG, E., MACK, D. (2003). *Extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control*. Journal of infection; **47**: 273-95.
- STÜRENBURG, E., SOBOTKA, I., NOOR, D., LAUFS, R., MACK, D. (2004). *Evaluation of a new cefepime-clavulanate ESBL Etest to detect extended-spectrum beta-lactamases in an Enterobacteriaceae strain collection*. Journal of antimicrobial chemotherapy; **54**: 134-8.
- SWARM (2011). *Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring 2010*. The National Veterinary Institute: <http://www.sva.se/upload/Redesign2011/Pdf/Om%20SVA/publikationer/1/Svarm2010.pdf>. Zugriff: 20.02.2012.
- TARR, P.I., FOUSSER, L.S., STAPLETON, A.E., WILSON, R.A., KIM, H.H., VARY, J.C., JR., CLAUSEN, C.R. (1996). *Hemolytic-uremic syndrome in a six-year-old girl after a urinary tract infection with Shiga-toxin-producing Escherichia coli O103:H2*. The New England journal of medicine; **335**: 635-8.
- TENOVER, F.C. (2006). *Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria*. The American journal of medicine; **119**: 3-10; discussion 62-70.
- TIPPER, D.J., STROMINGER, J.L. (1965). *Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America; **54**: 1133-41.
- TUMBARELLO, M., SANGUINETTI, M., MONTUORI, E., TRECARICHI, E.M., POSTERARO, B., FIORI, B., CITTON, R., D'INZEO, T., FADDA, G., CAUDA, R., SPANU, T. (2007). *Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: importance of inadequate initial antimicrobial treatment*. Antimicrobial agents and chemotherapy; **51**: 1987-94.

- TZELEPI, E., GIAKKOUP, P., SOFIANOU, D., LOUKOVA, V., KEMEROGLOU, A., TSAKRIS, A. (2000). *Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of Enterobacter cloacae and Enterobacter aerogenes*. Journal of clinical microbiology; **38**: 542-6.
- VALAT, C., HAENNI, M., SARAS, E., AUVRAY, F., FOREST, K., OSWALD, E., MADEC, J.Y. (2012). *CTX-M-15 extended-spectrum beta-Lactamase in a Shiga toxin-producing Escherichia coli isolate of serotype O111:H8*. Applied and environmental microbiology; **78**: 1308-9.
- VALVERDE, A., COQUE, T.M., SANCHEZ-MORENO, M.P., ROLLAN, A., BAQUERO, F., CANTON, R. (2004). *Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae during nonoutbreak situations in Spain*. Journal of clinical microbiology; **42**: 4769-75.
- VINUE, L., SAENZ, Y., MARTINEZ, S., SOMALO, S., MORENO, M.A., TORRES, C., ZARAZAGA, M. (2009). *Prevalence and diversity of extended-spectrum beta-lactamases in faecal Escherichia coli isolates from healthy humans in Spain*. Clinical microbiology and infection; **15**: 954-7.
- VON MÜFFLING, T., SMAILOVIC, M., NOWAK, B., SAMMET, K., BULTE, M., KLEIN, G. (2007). *Preliminary study of certain serotypes, genetic and antimicrobial resistance profiles of verotoxigenic Escherichia coli (VTEC) isolated in Bosnia and Germany from cattle or pigs and their products*. International journal of food microbiology; **117**: 185-91.
- WALSH, C., DUFFY, G., O'MAHONY, R., FANNING, S., BLAIR, I.S., McDOWELL, D.A. (2006). *Antimicrobial resistance in Irish isolates of verocytotoxigenic Escherichia coli (E. coli)-VTEC*. International journal of food microbiology; **109**: 173-8.
- WERCKENTHIN, C., BÖTTNER, A., HAFEZ, H.M., HARTMANN, K., KASKE, M., KEHREBERG, C., KIETZMANN, M., KLARMANN, D., KLEIN, G., KRABISCH, P., KUHN, T., LUHOFER, G., RICHTER, A., SCHULZ, B., SCHWARZ, S., SIGGE, C., TRAEDE, W., WALDMANN, K.H., WALLMANN, J. (2005). *Kreuzresistenzen gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen in der Veterinärmedizin: Molekulare Grundlagen und praktische Bedeutung für die Empfindlichkeitsprüfung*. Berliner und Münchner tierärztliche Wochenschrift; **118**: 471-80.

- WHO (2011). *Enterohaemorrhagic Escherichia coli (EHEC)*. World Health Organization. Fact sheet N°125 <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/en/>. Zugriff: 20.02. 2012.
- WIEGAND, I., HILPERT, K., HANCOCK, R.E. (2008). *Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances*. Nature protocols; **3**: 163-75.
- WIELER, L.H., VIELER, E., ERPENSTEIN, C., SCHLAPP, T., STEINRUCK, H., BAUERFEIND, R., BYOMI, A., BALJER, G. (1996). *Shiga toxin-producing Escherichia coli strains from bovines: association of adhesion with carriage of eae and other genes*. Journal of clinical microbiology; **34**: 2980-4.
- WIELER, L.H., BAUERFEIND, R. (2003). *STEC as a veterinary problem. Diagnostics and prophylaxis in animals*. Methods in molecular medicine; **73**: 75-89.
- WISE, R. (1982). *Penicillins and cephalosporins: antimicrobial and pharmacological properties*. Lancet; **2**: 140-3.
- WITTE, W., MIELKE, M. (2003). *β -Laktamasen mit breitem Wirkungsspektrum - Grundlagen, Epidemiologie, Schlussfolgerungen für die Prävention*. Bundesgesundheitsblatt – Gesundheitsforschung – Gesundheitsschutz: 46 (10): 881-90.
- WOODFORD, N., FAGAN, E.J., ELLINGTON, M.J. (2006). *Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum (beta)-lactamases*. Journal of antimicrobial chemotherapy; **57**: 154-5.
- WRIGHT, G.D. (2005). *Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification*. Advanced drug delivery reviews; **57**: 1451-70.
- YONG, D., TOLEMAN, M.A., GISKE, C.G., CHO, H.S., SUNDMAN, K., LEE, K., WALSH, T.R. (2009). *Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in Klebsiella pneumoniae sequence type 14 from India*. Antimicrobial agents and chemotherapy; **53**: 5046-54.

ZHAO, S., WHITE, D.G., GE, B., AYERS, S., FRIEDMAN, S., ENGLISH, L., WAGNER, D., GAINES, S., MENG, J. (2001). *Identification and characterization of integron-mediated antibiotic resistance among Shiga toxin-producing Escherichia coli isolates*. Applied and environmental microbiology; **67**: 1558-64.

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	<i>Einteilung wichtiger antimikrobiell wirksamer Substanzen in verschiedene Wirkstoffklassen aufgrund ihrer Wirkungsmechanismen (nach TENOVER, 2006; KROKER, 2010).....</i>	3
Tabelle 2:	<i>Einteilung der β-Lactam-Antibiotika (nach KROKER, 2010).....</i>	5
Tabelle 3:	<i>Zeitlicher Überblick über Entdeckung und klinische Anwendung antimikrobieller Wirkstoffe und Entstehung erster Resistenzen (EMEA, 1999)</i>	11
Tabelle 4:	<i>Einteilung der β-Lactamasen in Bush-Jacoby-Gruppen (nach BUSH ET AL., 1995; BUSH UND JACOBY, 2010) und Ambler-Klassen (nach AMBLER, 1980).....</i>	15
Tabelle 5:	<i>Bisherige ESBL-Nachweise aus STEC Isolaten verschiedenen Ursprungs</i>	33
Tabelle 6:	<i>Untersuchte STEC Isolate von Wild- und Hauswiederkäuern sowie von Fleischerzeugnissen</i>	37
Tabelle 7:	<i>Verwendete Qualitätskontroll- und Referenzstämme.....</i>	38
Tabelle 8:	<i>Zusammensetzung des gebrauchsfertigen peqGOLD PCR-Master-Mix-S</i>	40
Tabelle 9:	<i>Primer-Sequenzen für die Amplifikation der ESBL-Gene und die Sequenzanalyse</i>	40
Tabelle 10:	<i>Klinische MHK-Grenzwerte zur Bewertung der Empfindlichkeit nach CLSI Dokument M31-A3 und M100-S21 (CLSI, 2008, 2011)</i>	46
Tabelle 11:	<i>PCR-Ansatz zur Amplifikation der ESBL-Gene.....</i>	48
Tabelle 12:	<i>PCR-Protokoll zur Amplifikation der ESBL-Gene</i>	48
Tabelle 13:	<i>ESBL-Screening Grenzwerte</i>	51
Tabelle 14:	<i>Bestätigung eines ESBL-Bildners mittels MICRONAUT-S β-Lactamase-MTP....</i>	51
Tabelle 15:	<i>Verteilung der ermittelten MHK-Werte (VetMIC™GN-mo-Mikrotiterplatte)..</i>	57
Tabelle 16:	<i>Ergebnisse der Empfindlichkeitstestung mittels Mikrodilution bezogen auf die untersuchten Wild- und Hauswiederkäuer sowie Fleischerzeugnisse</i>	59
Tabelle 17:	<i>Ergebnisse der Untersuchung von ESBL-Genen in STEC Isolaten.....</i>	60
Tabelle 18:	<i>Verteilung der ermittelten MHK-Werte (MICRONAUT-S β-Lactamase-Mikrotiterplatte).....</i>	62
Tabelle 19:	<i>Ergebnisse der phänotypischen Untersuchung der β-Lactamase bildenden STEC Isolate.....</i>	64

<i>Tabelle 20:</i>	<i>Vergleichende Darstellung der Ergebnisse der Empfindlichkeitstestung, der phänotypischen und genotypischen β-Lactamase Identifizierung</i>	<i>66</i>
<i>Tabelle 21:</i>	<i>Nährmedien und Lösungen</i>	<i>111</i>
<i>Tabelle 22:</i>	<i>Geräte und sonstige Labormaterialien</i>	<i>112</i>
<i>Tabelle 23:</i>	<i>Herkunft der 235 untersuchten STEC Isolate</i>	<i>113</i>
<i>Tabelle 24:</i>	<i>Auflistung der Resistenzmuster der mehrfachresisten Isolate</i>	<i>116</i>
<i>Tabelle 25:</i>	<i>Verteilung aller gemessener MHK-Werte der Micronaut-S β-Lactamase-Mikrotiterplatten</i>	<i>117</i>

10. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Grundgerüst der Penicilline und Cephalosporine (nach BLUMBERG UND STROMINGER, 1974; BABIC ET AL., 2006).....	4
Abbildung 2: Verbrauch antimikrobiell wirksamer Substanzen in mg/kg Biomasse von Schwein, Rind und Geflügel in 2007 bzw. 2005* (nach GRAVE ET AL., 2010).....	7
Abbildung 3: Wirkungsweise der bakteriellen β -Lactamasen auf β -Lactam-Antibiotika (nach MUTSCHLER ET AL., 2008).....	12
Abbildung 4: Grundgerüst der β -Lactamase-Inhibitoren (nach BABIC ET AL., 2006; DRAWZ UND BONOMO, 2010)	16
Abbildung 5: Verteilung der resistenten (+ intermediären) E. coli Isolate gegenüber Cephalosporinen der 3. Generation in 2010 (ECDC, 2012).....	21
Abbildung 6: Evolution der β -Lactamase Resistenz bei gramnegativen Bakterien (nach ICAAC, 2011)	25
Abbildung 7: Layout der VetMIC™GN-mo-MTP (Version 4).....	39
Abbildung 8: Layout der MICRONAUT-S β -Lactamase VI Mikrotiterplatte.....	42
Abbildung 9: Durchführungsschema der Empfindlichkeitsbestimmung mittels Bouillon-Mikrodilution	44
Abbildung 10: Ergebnisse der Empfindlichkeitstestung aller 235 untersuchten STEC Isolate mittels Mikrodilution	54
Abbildung 11: Übersicht über die Verteilung der ermittelten Resistenzen der untersuchten STEC Isolate.....	58
Abbildung 12: Layout der MICRONAUT-S β -Lactamase V	115

11. Anhang

Tabelle 21: Nährmedien und Lösungen

Nährmedien und Lösungen	Herstellung	Firma/Ort
Blutagarplatten (BAP)	Columbia Agar mit Schafblut plus, gebrauchsfertig	Oxoid, Wesel
Caso-Agar	Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar 40 g + Aqua bidest. 1000 ml	Merck, Darmstadt
Plate-Count-Agar	Caseinpepton-Glucose-Hefeextrakt-Agar 22,5 g + Aqua bidest. 1000 ml	Merck, Darmstadt
Kationen adjustierte Mueller-Hinton Bouillon (CAMHB)	Mueller-Hinton Bouillon 21 g + Aqua bidest. 1000 ml + Magnesiumchlorid-Stammlösung 0,6 ml + Calciumchlorid-Stammlösung 1,9 ml	Oxoid, Wesel
Calciumchlorid-Stammlösung (10 mg/ml)	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3,68 g + Aqua bidest. 100 ml	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid-Stammlösung (10 mg/ml)	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 8,36 g + Aqua bidest. 100 ml	Merck, Darmstadt
0,9 % Kochsalzlösung	0,9 g NaCl + Aqua bidest. 100 ml	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromidlösung	25 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) + Aqua bidest. 500 ml	Sigma-Aldrich, Steinheim

Tabelle 22: Geräte und sonstige Labormaterialien

Geräte und sonstige Labormaterialien	Firma/Ort
Sicherheitswerkbank Heraeus® HERAsafe®	Kendro Laboratory Products, Hanau
Dampfsterilisator Varioklav	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Labortiefkühlschrank nunc™	Thermo Scientific, Schwerte
Kühlschrank Profi Line	Liebherr, Biberach an der Riss
Brutschrank Heraeus® Incubator	Kendro Laboratory Products, Hanau
Zentrifuge Heraeus® Biofuge® Pico	Kendro Laboratory Products, Hanau
Mikrowelle Micromaxx®	Medion, Essen
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Vortexer Typ VF2	Janke & Kunkel, Staufen i. Breisgau
Sicherheitsbrenner Gasprofi	WLD-Tech, Göttingen
Präzisionswaage	Sartorius, Göttingen
Elektrophoresekammer Mini-Sub Cell® GT	BioRad, München
PowerPac™ Basic Power Supply	BioRad, München
Mini Gel Tray	BioRad, München
Mini Comb, 15 Zinken	BioRad, München
Gel Caster Operation	BioRad, München
Mehrkanal Reagent Reservoirs Tip-Tub	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
BioPhotometer inkl. Thermodrucker DPU 414	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Eppendorf UVette® 220-1600 nm	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Eppendorf Pipetten Research® (variabel): 0,5–10 µL; 10-100 µL; 100–1.000 µL	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Pipettenspitzen Value Line	Kisker, Steinfurt
0,2 ml, 1,5 ml Tubes	Kisker, Steinfurt
Petrischalen, steril	Greiner Bio One, Frickenhausen
DNase freies Wasser - Molecular Biology Grade Water	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

Tabelle 23: Herkunft der 235 untersuchten STEC Isolate

Nr.	Tierart / Spezies	Probenmaterial	stx-Gen	H
1	Reh	Kot	2	D
2	Reh	Kot	2	D
3	Reh	Kot	2	D
4	Reh	Kot	2	D
5	Reh	Kot	2	D
6	Reh	Kot	2	D
7	Reh	Kot	2	D
8	Reh	Kot	2	D
9	Reh	Kot	2	D
10	Reh	Kot	2	D
11	Reh	Kot	2	D
12	Reh	Kot	2	D
13	Reh	Kot	2	D
14	Reh	Kot	2	D
15	Reh	Kot	2	D
16	Reh	Kot	2	D
17	Reh	Kot	2	D
18	Reh	Kot	2	D
19	Reh	Kot	2	D
20	Reh	Kot	2	D
21	Reh	Kot	2	D
22	Reh	Kot	2	D
23	Reh	Kot	2	D
24	Reh	Kot	2	D
25	Reh	Kot	2	D
26	Reh	Kot	2	D
27	Reh	Kot	2	D
28	Reh	Kot	2	D
29	Reh	Kot	2	D
30	Reh	Kot	2	D
31	Reh	Kot	2	D
32	Reh	Kot	2	D
33	Reh	Kot	1	D
34	Reh	Kot	2	D
35	Reh	Kot	2	D
36	Reh	Kot	2	D
37	Reh	Kot	2	D
38	Reh	Kot	2	D
39	Reh	Kot	2	D
40	Reh	Kot	2	D
41	Reh	Kot	2	D
42	Reh	Kot	2	D
43	Reh	Kot	2	D
44	Reh	Kot	2	D
45	Reh	Kot	2	D
46	Reh	Kot	2	D
47	Reh	Kot	2	D
48	Reh	Kot	2	D
49	Reh	Kot	2	D
50	Reh	Kot	2	D
51	Reh	Kot	2	D
52	Reh	Kot	2	D
53	Reh	Kot	2	D
54	Reh	Kot	2	D
55	Reh	Kot	2	D
56	Reh	Kot	2	D
57	Reh	Kot	2	D
58	Reh	Kot	2	D
59	Reh	Kot	2	D
60	Reh	Kot	2	D
61	Reh	Kot	2	D
62	Reh	Kot	2	D
63	Reh	Kot	2	D
64	Reh	Kot	2	D
65	Reh	Kot	2	D
66	Reh	Kot	2	D
67	Reh	Kot	2	D
68	Reh	Kot	2	D
69	Rothirsch	Tonsille	2	D
70	Rothirsch	Kot	2	D
71	Rothirsch	Kot	2	D
72	Rothirsch	Kot	2	D
73	Rothirsch	Kot	2	D
74	Rothirsch	Kot	2	D
75	Rothirsch	Kot	2	D
76	Rothirsch	Lymphknoten	2	D
77	Rothirsch	Lymphknoten	2	D
78	Rothirsch	Kot	1,2	D
79	Rothirsch	Kot	1,2	D
80	Rothirsch	Lymphknoten	1,2	D
81	Rothirsch	Lymphknoten	1,2	D
82	Rothirsch	Tonsille	2	D
83	Rothirsch	Lymphknoten	2	D
84	Rothirsch	Kot	2	D
85	Rothirsch	Kot	2	D
86	Rothirsch	Kot	2	D
87	Rothirsch	Kot	2	D
88	Rothirsch	Kot	2	D
89	Rothirsch	Kot	2	D
90	Rothirsch	Tonsille	2	D
91	Rothirsch	Kot	2	D
92	Rothirsch	Kot	2	D
93	Rothirsch	Kot	2	D
94	Rothirsch	Kot	2	D
95	Rothirsch	Kot	2	D
96	Rothirsch	Kot	2	D
97	Rothirsch	Kot	2	D
98	Rothirsch	Kot	2	D
99	Rothirsch	Kot	2	D
100	Rothirsch	Lymphknoten	2	D
101	Rothirsch	Kot	2	D
102	Rothirsch	Kot	2	D
103	Rothirsch	Kot	2	D
104	Rothirsch	Lymphknoten	2	D
105	Rothirsch	Kot	2	D
106	Rothirsch	Kot	2	CH
107	Wisent	Kot	2	D
108	Wisent	Kot	2	D
109	Damwild	Kot	2	D
110	Rind	Kot	2	D
111	Kalb	Kot	1	D
112	Rind	Kot	1,2	D
113	Rind	Kot	1	D
114	Rind	Kot	2	D
115	Rind	Kot	2	D
116	Kalb	Kot	2	D
117	Kalb	Kot	2	D
118	Kalb	Kot	1	D
119	Kalb	Nasentupfer	2	D
120	Rind	Kot	2	D
121	Kalb	Kot	1	D

Fortsetzung Tabelle 23

Nr.	Tierart / Spezies	Probenmaterial	stx-Gen	H
122	Kalb	Kot	1	D
123	Kalb	Kot	1,2	D
124	Rind	Kot	2	D
125	Rind	Kot	1	D
126	Rind	Kot	2	D
127	Rind	Kot	2	D
128	Rind	Kot	1	D
129	Rind	Kot	1,2	D
130	Rind	Kot	2	D
131	Rind	Kot	2	D
132	Rind	Kot	1	D
133	Rind	Kot	2	D
134	Rind	Kot	2	D
135	Rind	Kot	2	D
136	Rind	Kot	2	D
137	Rind	Kot	2	D
138	Rind	Kot	2	D
139	Rind	Kot	2	D
140	Rind	Kot	1	D
141	Rind	Kot	1,2	D
142	Rind	Kot	1,2	D
143	Rind	Kot	1	D
144	Rind	Kot	2	D
145	Rind	Kot	1	D
146	Rind	Kot	1	D
147	Rind	Kot	2	D
148	Kalb	Kot	2	D
149	Kalb	Kot	1	D
150	Kalb	Kot	2	D
151	Kalb	Kot	1	D
152	Kalb	Kot	2	D
153	Kalb	Kot	2	D
154	Kalb	Kot	1	D
155	Kalb	Kot	2	D
156	Kalb	Kot	2	D
157	Kalb	Kot	1	D
158	Kalb	Kot	1	D
159	Kalb	Kot	2	D
160	Kalb	Kot	1	D
161	Kalb	Kot	1	D
162	Kalb	Kot	2	D
163	Schaf	Kot	1,2	D
164	Schaf	Kot	1,2	D
165	Schaf	Kot	1	D
166	Schaf	Kot	1,2	D
167	Schaf	Kot	1	D
168	Schaf	Kot	1,2	D
169	Schaf	Kot	1,2	D
170	Schaf	Kot	1,2	D
171	Schaf	Kot	1	D
172	Schaf	Kot	1	D
173	Schaf	Kot	1	D
174	Schaf	Kot	1	D
175	Schaf	Kot	1	D
176	Schaf	Kot	1	D
177	Schaf	Kot	1,2	D
178	Schaf	Kot	1,2	D
179	Schaf	Kot	1,2	D
180	Schaf	Kot	1,2	D

Nr.	Tierart / Spezies	Probenmaterial	stx-Gen	H
181	Schaf	Kot	1	D
182	Schaf	Kot	1,2	D
183	Schaf	Kot	1	D
184	Schaf	Kot	1,2	D
185	Schaf	Kot	2	CH
186	Schaf	Tonsille	2	CH
187	Schaf	Tonsille	1	CH
188	Ziege	Tonsille	1	CH
189	Ziege	Kot	1	CH
190	Ziege	Kot	1	CH
191	Ziege	Kot	1	CH
192	Ziege	Kot	1	CH
193	Ziege	Kot	1	CH
194	Ziege	Kot	2	CH
195	Ziege	Kot	1	CH
196	Ziege	Kot	1	CH
197	Ziege	Kot	1	CH
198	Ziege	Kot	2	D
199	Schaf	Kot	2	D
200	Schaf	Kot	2	D
201	Kalb	Kot	1,2	D
202	Lamm	Fleischerzeugnis	1	D
203	Lamm	Fleischerzeugnis	1,2	D
204	Kalb	Fleischerzeugnis	2	D
205	Kalb	Fleischerzeugnis	1	D
206	Kalb	Fleischerzeugnis	2	D
207	Rind	Fleischerzeugnis	1	D
208	Kalb	Fleischerzeugnis	2	D
209	Rind	Fleischerzeugnis	1,2	D
210	Kalb	Fleischerzeugnis	1	D
211	Kalb	Fleischerzeugnis	2	D
212	Kalb	Fleischerzeugnis	1	D
213	Rothirsch	Fleischerzeugnis	2	D
214	Reh	Fleischerzeugnis	2	D
215	Reh	Fleischerzeugnis	2	D
216	Reh	Fleischerzeugnis	2	D
217	Reh	Fleischerzeugnis	1,2	D
218	Reh	Fleischerzeugnis	1	D
219	Reh	Fleischerzeugnis	2	D
220	Reh	Fleischerzeugnis	2	D
221	Rothirsch	Fleischerzeugnis	2	D
222	Rothirsch	Fleischerzeugnis	2	D
223	Rothirsch	Fleischerzeugnis	2	D
224	Reh	Fleischerzeugnis	1,2	D
225	Reh	Fleischerzeugnis	2	D
226	Reh	Fleischerzeugnis	1,2	D
227	Reh	Fleischerzeugnis	2	D
228	Rothirsch	Fleischerzeugnis	2	D
229	Rothirsch	Fleischerzeugnis	2	D
230	Rothirsch	Fleischerzeugnis	2	D
231	Rothirsch	Fleischerzeugnis	1	D
232	Reh	Fleischerzeugnis	2	D
233	Rothirsch	Fleischerzeugnis	2	D
234	Rothirsch	Fleischerzeugnis	2	D
235	Reh	Fleischerzeugnis	2	D

H-Herkunftsland; D-Deutschland; CH-Schweiz

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CPP 32	C/V 32/4	CAZ 32	CZC 32/4	CTX 32	C/C 32	CEP 32	CMC 32/4	PIT 128/4	MER 128	MEE 32	COX 64
B	16	16/4	16	16/4	16	16/4	16	16/4	64/4	64	16	32
C	8	8/4	8	8/4	8	8/4	8	8/4	32/4	32	8	16
D	4	4/4	4	4/4	4	4/4	4	4/4	16/4	16	4	8
E	2	2/4	2	2/4	2	2/4	2	2/4	8/4	8	2	4
F	1	1/4	1	1/4	1	1/4	1	1/4	4/4	4	1	2
G	0,5	0,5/4	0,5	0,5/4	0,5	0,5/4	0,5	0,5/4	2/4	2	0,5	GC/E
H	0,25	0,25/4	0,25	0,25/4	0,25	0,25/4	0,25	0,25/4	1/4	1	0,25	GC

Abbildung 12: Layout der MICRONAUT-S β -Lactamase V

CPP, Cefpodoxim-Proxetil; C/V, Cefpodoxim/Clavulansäure; CAZ, Ceftazidim; CZC, Ceftazidim/Clavulansäure;
 CTX, Cefotaxim; C/C, Cefotaxim/Clavulansäure; CEP, Cefepim; CMC, Cefepim/Clavulansäure; PIT,
 Piperacillin/Tazobactam; MER, Merepenem; MEE Merepenem + 0,4 mM EDTA; COX, Cefoxitin; GC/E,
 Wachstumskontrolle + 0,4 mM EDTA; GC, Wachstumskontrolle

Tabelle 24: Auflistung der Resistenzmuster der mehrfachresisten Isolate

	Proben-Nr.	Resistenzmuster
2fach:	114	STR, TET
	140	SMX, TRI
3fach:	110	STR, TET, SMX
	117	STR, TET, SMX
	132	STR, TET, SMX
	155	TET, SMX, TRI
	158	AMP, STR, SMX
	194	STR, TET, SMX
	201	STR, TET, SMX
	207	STR, FFN, CHL
4fach:	131	AMP, STR, TET, SMX
	133	STR, TET, SMX, COL
	134	STR, TET, SMX, TRI
	151	STR, TET, SMX, KAN
	152	STR, TET, SMX, TRI
	157	AMP, STR, TET, SMX
5fach:	127	AMP, STR, TET, SMX, KAN
	149	AMP, STR, TET, SMX, TRI
	212	AMP, TET, SMX, TRI, KAN
6fach:	112	STR, TET, SMX, TRI, FFN, CHL
	118	AMP,STR, SMX, TRI, FFN, CHL
	148	STR, TET, SMX, TRI, FFN, CHL
7fach:	123	STR, GEN, SMX, TRI, FFN, CHL, KAN
	150	STR, GEN, SMX, TRI, FFN, CHL, KAN
8fach:	116	STR, GEN, TET, SMX, TRI, FFN, CHL, KAN
	128	AMP, STR, GEN, SMX, TRI, FFN, CHL, KAN

AMP, Ampicillin; STR, Streptomycin; TET, Tetrazyklin; FFN, Florfenicol; SMX, Sulfamethoxazole; TRI, Trimethoprim; CHL, Chloramphenicol; KAN, Kanamycin; GEN, Gentamicin

Tabelle 25: Verteilung aller gemessener MHK-Werte der Micronaut-S β -Lactamase-Mikrotiterplatten

Wirkstoff	Screening Grenzwerte: Hersteller [in $\mu\text{g/ml}$]	Anzahl untersuchter Isolate	Klinische Grenzwerte CLSI 2011 [in $\mu\text{g/ml}$]	Verteilung [%] der ermittelten MHK-Werte											
				Konzentration der Wirkstoffe [in $\mu\text{g/ml}$]											
				0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
Cefepim	>1	235	≥ 32		96,6	2,6	0,0	0,4	0,4	0,0	0,0	0,0			
Cefepim/C		235			98,7	1,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0			
Cefotaxim	>1	235	≥ 4		97,4	0,9	1,3	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0			
Cefotaxim/C		235			98,7	0,0	1,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0			
Cefotaxim/B		147			98,6	1,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0			
Ceftazidim	>1	235	≥ 16		97,9	0,9	0,0	0,4	0,9	0,0	0,0	0,0			
Ceftazidim/C		235			98,7	0,0	0,0	0,4	0,9	0,0	0,0	0,0			
Ceftazidim/B		147			100	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0			
Cefoxitin*		235	≥ 32					16,1	74,9	7,7	1,3	0,0	0,0		
Meropenem		235	≥ 4				99,1	0,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Meropenem/EDTA		235			100	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0			
Meropenem/B		147			100	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0			
Cefpodoxim	>4	89	≥ 8		64,0	34,8	0,0	1,1	0,0	0,0	0,0	0,0			
Cefpodoxim/C		89			91,0	9,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0			
Piperacillin/T		89	$\geq 128/4$				65,2	33,7	0,0	0,0	1,1	0,0	0,0	0,0	

Anmerkung: ein Isolat wurde mit beiden MICRONAUT-Versionen getestet; C, Clavulansäure; B, Borsäure; T, Tazobactam; EDTA, Ethylendiamintetraacetat; *COX- im Wechsel des Plattenlayouts von Version V auf VI wurde die niedrigste Verdünnung um eine Stufe angehoben; d.h. sowohl 2 $\mu\text{g/ml}$ als auch 4 $\mu\text{g/ml}$ entsprechen einem fehlenden Wachstum

12. Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben.

Insbesondere bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Märtlbauer für die Bereitstellung des Dissertationsthemas und die freundliche Aufnahme am Lehrstuhl sowie bei Herrn Prof. Dr. Dr. habil. Gareis für die konstruktive Durchsicht der Arbeit.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Rebecca Bonke für die hervorragende fachliche und engagierte Betreuung, die allzeit gewährte geduldige Unterstützung, die Motivation sowie die letztendlich nötigen Kaffeepausen.

Zusätzlich möchte ich mich herzlich bei Frau Dr. Elisabeth Stüber, Frau Dr. Silke Wacheck und Frau Dr. Brigitte Sperner für ihre kompetente Hilfestellung und fachliche Unterstützung sowie für das unermüdliche Korrekturlesen danken. Vielen Dank auch an alle anderen Mitarbeiter des Lehrstuhls für Lebensmittelsicherheit für die entgegengebrachte Hilfsbereitschaft sowie für die angenehme Atmosphäre.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. Ullrich Busch, Hannah Adam und dem Team des EHEC-Labors des Bayerischen Landesamtes für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit in Oberschleißheim für die Unterstützung und die Bereitstellung von STEC Isolaten.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Dr. Christa Ewers vom Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der FU Berlin und bei Herrn Dr. Harald Hoffmann vom Institut für Labordiagnostik der Asklepios Fachkliniken in Gauting für die nötigen ESBL-Referenzstämme bedanken. Zusätzlich möchte ich mich bei Frau Dr. Marlene Eggert vom Institut für Humangenetik für die Hilfe bei der Sequenzanalyse bedanken sowie bei Frau Dr. Beatriz Guerra vom Bundesinstitut für Risikobewertung, die mir im Namen des EU-SAFEFOODERA Projektes "The role of commensal microflora of animals in the transmission of extended spectrum β -lactamases" die Primersequenzen für die *bla*TEM-Sequenzanalyse zur Verfügung gestellt hat.

Zu guter Letzt möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinen Eltern, meiner ganzen Familie und allen Freunden für ihre liebevolle, ausdauernde und großzügige Unterstützung über all die Jahre hinweg bedanken, ohne die mir das Studium und das Anfertigen der Dissertation nicht möglich gewesen wären.