

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

Untersuchungen zur Selektion von Resistenzgenen in  
bayerischen Schweinehaltungsbetrieben und zur Übertragung  
antibiotikaresistenter *E. coli* zwischen Tier und Mensch

von Rupert Bassitta  
aus Rosenheim

München 2016

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen  
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:  
Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger

Mitbetreuung durch: Priv.-Doz. Dr. Christina Hölzel

Angefertigt am: Lehrstuhl für Tierhygiene  
Wissenschaftszentrum für Ernährung, Landnutzung und Umwelt  
der Technischen Universität München

Mentor: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Dr. h. c. Johann Bauer

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger

Korreferent/en: Priv.-Doz. Dr. Karin Schwaiger  
Univ.-Prof. Dr. Dr. Michael H. Erhard  
Univ.-Prof. Dr. Mathias Ritzmann  
Univ.-Prof. Dr. Rolf Mansfeld

Tag der Promotion: 06.02.2016

Im Gedenken an meine Mutter

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
<b>1</b>	<b>Antibiotika und Grundlagen der bakteriellen Antibiotikaresistenz .....</b>	<b>3</b>
1.1	Begriffsklärung und geschichtliche Einordnung der Antibiotika.....	3
1.2	Einsatz und Bedeutung von Antibiotika in der Veterinärmedizin.....	5
1.3	Bakterielle Antibiotikaresistenz .....	9
1.3.1	Membran- / Proteinbasierte Mechanismen der Antibiotikaresistenz .....	9
1.3.2	Genetische Ebene der Antibiotikaresistenz .....	10
1.3.2.1	Mutation .....	11
1.3.2.2	Gentransfer .....	12
1.3.3	Tetrazykline: Wirkung und Resistenzmechanismen .....	17
1.3.3.1	Efflux am Beispiel von <i>tet(A)</i> .....	19
1.3.3.2	Ribosomaler Schutz am Beispiel von <i>tet(M)</i> .....	20
1.3.3.3	Enzymatische Inaktivierung .....	21
1.3.4	Sulfonamide: Wirkung und Resistenzmechanismen .....	21
1.3.5	Quartäre Ammoniumverbindungen: Wirkung und Resistenzmechanismen .....	23
<b>2</b>	<b>Gesellschaftliche Relevanz der Antibiotikaresistenz .....</b>	<b>25</b>
2.1	Gründe für die zunehmende Ausbreitung von Resistenzen .....	25
2.2	Bedeutung und Folgen.....	27
2.3	Aktuelle Entwicklungen und Maßnahmen .....	29
<b>3</b>	<b>Schweineproduktion und -haltung in Deutschland (Bayern).....</b>	<b>32</b>
3.1	Zahlen und Fakten .....	32
3.2	Konsequenzen der Intensivierung in der Schweinehaltung für Tier, Mensch und Umwelt.....	34
<b>4</b>	<b><i>Escherichia coli</i> .....</b>	<b>36</b>
4.1	Allgemeines und Taxonomie.....	36
4.2	<i>E. coli</i> als Markerorganismus .....	38
4.3	<i>E. coli</i> als Krankheitserreger .....	38
4.3.1	<i>E. coli</i> -Erkrankungen beim Menschen .....	38
4.3.2	<i>E. coli</i> -Erkrankungen beim Schwein.....	39

---

<b>III</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>41</b>
<b>1</b>	<b>Material .....</b>	<b>41</b>
1.1	Arbeitsmaterial .....	41
1.1.1	Technische Geräte .....	41
1.1.2	Gebrauchsmaterial .....	42
1.1.3	Verbrauchsmaterial .....	43
1.1.4	Nährböden .....	44
1.1.5	Flüssige Nährmedien .....	45
1.1.6	Lösungen .....	45
1.1.7	Chemikalien und Reagenzien .....	46
1.1.8	Software .....	47
1.1.9	Primer .....	48
1.1.10	Referenzstämme .....	49
1.2	Probenmaterial .....	49
1.2.1	Allgemein .....	49
1.2.2	Datenschutz .....	50
1.2.3	Struktur der untersuchten Betriebe .....	50
1.2.4	Beprobungszeitpunkte .....	52
1.2.5	Arzneimittel-Datenerfassung .....	53
1.2.6	Probengewinnung .....	54
1.2.7	Lagerung und Transport des Probenmaterials .....	56
1.2.8	Isolate für die Untersuchung von Verwandtschaftsverhältnissen von <i>E. coli</i> bei Schwein und Mensch .....	56
<b>2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>57</b>
2.1	Mikrobiologisch-kulturelle Untersuchungen .....	57
2.1.1	Probenvorbereitung .....	57
2.1.2	Keimzahlbestimmung, Keimidentifizierung und Keimisolierung .....	57
2.1.2.1	MALDI-TOF MS .....	58
2.1.3	Cryokonservierung .....	60
2.1.4	Prüfung der phänotypischen Antibiotikaresistenz .....	60
2.2	Molekularbiologische Untersuchungen .....	62
2.2.1	Molekularbiologische Methoden zur Charakterisierung einzelner <i>E. coli</i> -Isolate .....	62
2.2.1.1	DNA-Extraktion mittels Chelex® 100-Methode .....	63

---

2.2.1.2	Qualitativer Antibiotikaresistenzgen-Nachweis .....	64
2.2.1.3	ERIC-PCR .....	65
2.2.1.4	MLST-PCR.....	68
2.2.1.5	Gelelektrophorese.....	70
2.2.1.6	GelCompar® II.....	72
2.2.2	qPCR zur Quantifizierung von Antibiotikaresistenzgenen .....	73
2.2.2.1	Kobaltbestrahlung.....	74
2.2.2.2	Standardherstellung .....	74
2.2.2.3	DNA-Extraktion mittels PowerSoil®-DNA Isolation Kit.....	75
2.2.2.4	Durchführung der qPCR zum Antibiotikaresistenzgen-Nachweis.....	78
2.2.3	Sequenzierung .....	79
2.3	Ablauf der Methodenvalidierung .....	82
2.3.1	Optimierung der qPCR-Bedingungen .....	82
2.3.2	„Matrixversuch“ im Vorfeld der Herstellung der qPCR-Standards .....	83
2.4	Datenanalyse.....	84
2.4.1	Trendanalysen von Tetrazyklinresistenzgenen.....	84
<b>IV</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>85</b>
<b>1</b>	<b>Methodenvalidierung.....</b>	<b>85</b>
1.1	Validierung ERIC-PCR .....	85
1.2	Validierung qPCR .....	87
1.2.1	Cut-off .....	87
1.2.2	Limit of quantification / Limit of detection.....	88
1.2.3	Error und Effizienz der qPCR .....	89
1.2.4	„Matrixversuch“ .....	90
1.2.5	Resistenzgen-Nachweis.....	92
<b>2</b>	<b>„Screening“-Teil der Studie .....</b>	<b>94</b>
2.2	Probenrücklauf .....	94
2.3	Quantifizierung von Antibiotikaresistenzgenen .....	94
2.3.1	Gesamtgehalte in Abhängigkeit von beprobter Matrix und Probenahmezeitpunkt .....	95
2.3.1.1	Molekularbiologisch bestimmte „Gesamtkeimzahl“ (16S-rDNA) .....	95
2.3.1.2	Resistenzgen-Gehalte – absolute Konzentrationen .....	97
2.3.1.3	Resistenzgene in Abhängigkeit vom Beprobungszeitpunkt .....	98
2.3.1.4	Resistenzgen-Gehalte – relative Abundanzen .....	100

---

2.3.2	Selektion .....	104
2.3.2.1	Tetrazyklinresistenzgene .....	105
2.3.2.2	Sulfonamidresistenzgen <i>sul</i> (II).....	107
<b>3</b>	<b>„Tracking“-Teil der Studie .....</b>	<b>109</b>
3.1	Antibiotikaeinsatz.....	109
3.1.1	Betrieb A6 .....	109
3.1.2	Betrieb A21 .....	112
3.1.3	Betrieb E5 .....	112
3.1.4	Betriebe H18 und J20 .....	115
3.1.5	Betrieb M13.....	116
3.2	Quantifizierung von Antibiotikaresistenzgenen .....	116
3.2.1	Selektion .....	117
3.2.1.1	Tetrazyklinresistenzgene .....	117
3.2.1.2	Sulfonamidresistenzgene .....	135
3.2.2	Co-Selektion .....	138
3.3	Genotypische Ähnlichkeit der Indikatorspezies <i>E. coli</i> zwischen Landwirten, dessen Familienmitgliedern und Schweinen.....	142
3.3.1	ERIC-PCR .....	142
3.3.1.1	Betrieb A6 .....	143
3.3.1.2	Betrieb A21 .....	146
3.3.1.3	Betrieb E5 .....	149
3.3.1.4	Betrieb J20.....	152
3.3.2	MLST-PCR.....	155
3.3.2.1	Charakterisierung der Resistenzmuster der <i>E. coli</i> -MLST- Isolat-Paare .....	159
3.4	Resistenzstatus der <i>E. coli</i> -Isolate vom Schwein zum Zeitpunkt der Schlachtung .....	162
3.4.1	Phänotypische Resistenz .....	163
3.4.1.1	Resistenzvorkommen und MHK-Verteilungen.....	163
3.4.1.2	Rückverfolgung resistenter Isolate zum Hof .....	167
3.4.2	Genotypische Resistenz.....	170
3.4.2.1	Resistenzvorkommen .....	170
<b>V</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>173</b>
<b>1</b>	<b>Methodendiskussion.....</b>	<b>173</b>

---

1.1	Untersuchungsmaterial .....	173
1.2	Prüfung der phänotypischen Resistenz.....	174
1.3	ERIC- und MLST-PCR .....	176
1.3.1	„Matrixversuch“ .....	178
1.4	Resistenzgen-Nachweis .....	180
<b>2</b>	<b>Ergebnisdiskussion.....</b>	<b>181</b>
2.1	„Screening“-Teil der Studie .....	181
2.1.1	Quantifizierung von Antibiotikaresistenzgenen .....	181
2.1.1.1	Molekularbiologisch bestimmte „Gesamtkeimzahl“ (16S-rDNA) ....	181
2.1.1.2	Resistenzgen-Gehalte – relative Abundanzen .....	182
2.1.1.3	Absolute Resistenzgen-Gehalte in Abhängigkeit vom Beprobungszeitpunkt.....	185
2.1.1.4	Selektion .....	186
2.2	„Tracking“-Teil der Studie .....	188
2.2.1	Antibiotikaeinsatz.....	188
2.2.2	Quantifizierung von Antibiotikaresistenzgenen .....	190
2.2.2.1	Selektion .....	190
2.2.2.2	Co-Selektion .....	204
2.2.3	Genotypische Ähnlichkeit der Indikatorspezies <i>E. coli</i> zwischen Landwirten, dessen Familienmitgliedern und Schweinen.....	206
2.2.3.1	ERIC-PCR .....	206
2.2.3.2	MLST-Charakterisierung .....	209
2.2.4	Resistenzstatus der <i>E. coli</i> -Isolate vom Schwein zum Zeitpunkt der Schlachtung .....	215
2.2.4.1	Phänotypische Resistenz .....	216
2.2.4.2	Genotypische Resistenz.....	219
2.2.4.3	Rückverfolgung resistenter Isolate zum Betrieb .....	222
<b>VI</b>	<b>SCHLUSSFOLGERUNGEN .....</b>	<b>225</b>
<b>VII</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>227</b>
<b>VIII</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>229</b>
<b>IX</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>231</b>
<b>X</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>259</b>

---

<b>XI</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>328</b>
<b>XII</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>332</b>
<b>XIII</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>339</b>
<b>XIV</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>342</b>

## I EINLEITUNG

Seit spätestens Mitte des 20. Jahrhunderts gelten Antibiotika als das wichtigste Instrument zur Behandlung von Infektionskrankheiten. Dies trifft gleichermaßen auf die Human- und die Veterinärmedizin zu: Der Einsatz antimikrobiell wirksamer Substanzen kann im Falle bakteriell bedingter Infektionen die Gesundung von Mensch und Tier herbeiführen, dämmt Zoonosen ein, leistet in der landwirtschaftlichen Nutztierhaltung einen wichtigen und unverzichtbaren Beitrag zur Gesunderhaltung von Tieren und Tierbeständen und bewirkt nicht zuletzt auch die Vermeidung wirtschaftlicher Schäden. Durch frequenten und unsachgemäßen Einsatz entwickelten sich im Laufe der Zeit jedoch mehr und mehr Resistenzen gegen diese Gruppe von Medikamenten.

Mittlerweile scheint die Problematik der Antibiotikaresistenzen im Zentrum der Gesellschaft angekommen zu sein. Besonders deutlich wird dies angesichts der Tatsache, dass die Weltgesundheitsorganisation (WHO) davor warnt, wir steuerten, sollten nicht augenblicklich Maßnahmen ergriffen werden, auf ein „post-antibiotisches Zeitalter“ zu, in dem einfache Infektionskrankheiten wieder zum Tode führen könnten (WHO 2014). Besondere Bedeutung wird in diesem Zusammenhang auch der Anwendung von Antibiotika in der landwirtschaftlichen Nutztierhaltung beigemessen; sie wird als wichtiger Faktor für die zunehmende Entstehung und Verbreitung resistenter Keime diskutiert. Die European Food Safety Agency (EFSA) benennt, neben Konsumenten tierischer Lebensmittel, Personen, die engen und häufigen Kontakt zu Tieren respektive mit resistenten Bakterien kontaminierten tierischen Ausscheidungen haben (also Landwirte, Familienmitglieder oder auch Tierärzte), als gefährdet für die Aufnahme von resistenten Keimen und Resistenzgenen (EFSA 2015).

In Deutschland besitzt die Schweinefleischproduktion einen enormen Stellenwert, hier wurden nach Angaben des Statistischen Bundesamtes im Jahr 2014 rund 60 Millionen Schweine geschlachtet. Die Tatsache, dass ein Großteil dieser Tiere auch hierzulande gehalten und etwaig mit Antibiotika behandelt wird, lässt Schweinehaltungsbetriebe als potenziellen „Hotspot“ für die Entstehung und Ausbreitung von Antibiotikaresistenz erscheinen.

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen des vom Bayerischen Staatsministerium für Umwelt und Verbraucherschutz (StMUV) unter der Kennnummer Az. StMUG: 47a-G7131-2011/27-22 geförderten Projektes „Antibiotikaeinsatz in der bayerischen Schweinehaltungspraxis: Konsequenzen für Mensch, Tier und Umwelt (ABYS)“. Kooperativ von der Technischen Universität München (TUM) und dem Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) durchgeführt, verfolgt die Studie einen interdisziplinären Ansatz bei der Betrachtung der komplexen Zusammenhänge zwischen Tiergesundheit, Arzneimitteleinsatz sowie Resistenzbildung, um mit den erhobenen Daten letztlich eine Grundlage für eine objektive Diskussion zum Antibiotikaeinsatz in der Nutztierhaltung zu liefern.

Ziel der Arbeit war es einerseits, in einem bayernweiten „Screening“ unter Berücksichtigung des Antibiotikaeinsatzes und der Art der Haltungsform den Resistenzstatus von wirtschaftseigenen Düngemitteln konventioneller und ökologischer Schweinehaltungsbetriebe ( $n = 58$ ) zu ermitteln, um so den quantitativen Eintrag von Antibiotikaresistenzgenen in die Umwelt abschätzen zu können. Vor dem Hintergrund einer objektiven Risikobeurteilung hinsichtlich der Gefahr der Resistenzentstehung und -ausbreitung im Stall wurden andererseits im sog. „Tracking“-Teil in sechs exemplarisch ausgewählten Betrieben unter Praxisbedingungen Schweine und Personen beprobt – teils über den gesamten Lebenszeitraum der Schweine. Dabei wurde der Frage nachgegangen, ob der Einsatz von Antibiotika im Betrieb selektiven Einfluss auf den quantitativen Gehalt verschiedener Antibiotikaresistenzgene in den Faeces von Tier und Mensch hat. Zudem wurde mittels molekularbiologischer Verwandtschaftsanalysen der Indikatorsspezies *Escherichia coli* geprüft, ob sich der Kontakt zu Schweinen auf das Vorkommen antibiotikaresistenter Bakterien beim Landwirt sowie Kontaktpersonen des Landwirtes auswirkt. Im Hinblick auf eine potenzielle Gefährdung des Verbrauchers, mit resistenten Keimen in Kontakt zu kommen, wurde der Resistenzstatus der beobachteten Schweine bis zum Schlachtplatz verfolgt, womit ein essentielles Bindeglied zur Risikobewertung hergestellt wird.

Die Abschätzung von Risikofaktoren der Resistenzselektion sowie der Übertragung von resistenten Keimen bzw. Resistenzgenen zwischen Tier und Mensch soll dem Gesundheitsschutz von Landwirt und Allgemeinbevölkerung, die mit landwirtschaftlichen Nutztieren und deren Produkten in Kontakt kommt, dienen.

## II LITERATURÜBERSICHT

### 1 Antibiotika und Grundlagen der bakteriellen Antibiotikaresistenz

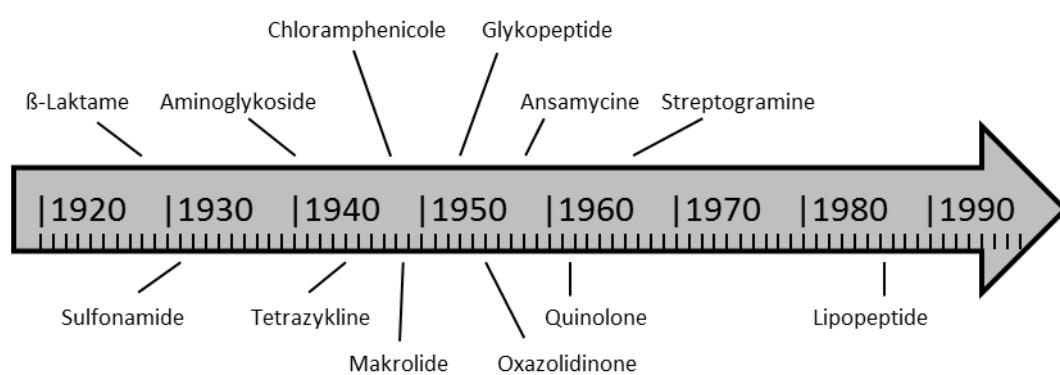
#### 1.1 Begriffsklärung und geschichtliche Einordnung der Antibiotika

Grundsätzlich wird unter dem Begriff „antimikrobieller Wirkstoff“ eine natürliche oder synthetische chemische Substanz verstanden, die Mikroorganismen abtötet oder deren Wachstum hemmt (Madigan et al. 2013). Tötet der Wirkstoff die Mikroorganismen ab, wird die Nachsilbe *-cid* verwendet, wobei die Vorsilbe den Typ des Mikroorganismus angibt. So werden beispielsweise Substanzen, die Bakterien abtöten, als bakterizide Wirkstoffe bezeichnet. Wird hingegen nur das Wachstum gehemmt, so trägt der Mikroorganismus-Typ die Nachsilbe *-statisch* (Madigan et al. 2013). Als „Antibiotika“ wurden ursprünglich *per definitionem* antimikrobielle Wirkstoffe zusammengefasst, die natürlich vorkommen und von vielen Pilzen und Bakterien als sekundäre Metaboliten gebildet werden, etwa um andere Mikroorganismen zu hemmen oder abzutöten (Groß 2013, Madigan et al. 2013). Analog zu den von der Bundestierärztekammer (BTK) veröffentlichten „Leitlinien für den sorgfältigen Umgang mit antibakteriell wirksamen Tierarzneimitteln“ wird aus Gründen der sprachlichen Vereinfachung in dieser Arbeit einheitlich der Begriff „Antibiotika“ verwendet, er soll hier für alle, also auch für die synthetischen, antibakteriell wirksamen Stoffe stehen (BTK 2015).

Unmittelbar verknüpft mit dem Begriff Antibiotikum ist der deutsche Arzt und Forscher Paul Ehrlich, gelang es ihm doch im Jahr 1909 bei der Suche nach einer geeigneten therapeutischen Maßnahme zur Bekämpfung der durch das Bakterium *Treponema pallidum* hervorgerufenen Syphilis, mit dem Arsphenamin das erste synthetische Antibiotikum der Geschichte herzustellen (Ehrlich et al. 1910). Bekanntestes Beispiel für ein natürliches Antibiotikum dürfte aber das vom Schimmelpilz *Penicillium notatum* produzierte Penicillin sein, dessen antibiotische Wirksamkeit von Alexander Fleming erforscht wurde und dessen Entdeckung bis heute einen Meilenstein in der Geschichte der Medizin darstellt (Fleming 1929). Wird solch ein natürlich vorkommendes Antibiotikum chemisch verändert, beispielsweise, um dessen Wirksamkeit zu erhöhen, so spricht man von „semisynthetischen Antibiotika“ (Kalant 1965). Bis zum Jahr 2007 betrug der

Anteil der in der Klinik eingesetzten Antibiotika natürlichen Ursprungs und deren semisynthetischer Derivate mehr als zwei Drittel (Newman et al. 2007). Dem gegenüber steht die Gruppe der „synthetischen Antibiotika“, die, wie der Name sagt, aus chemischer Synthese gewonnen und oftmals als „Chemotherapeutika“ bezeichnet werden (Estler et al. 2007). Als Vorreiter bei der Entwicklung eines der ersten rein synthetischen Antibiotika gelten Josef Klarer und Fritz Mietzsch sowie Gerhard Domagk, der letztlich die besondere Wirksamkeit von Sulfamidochrysoidin (Handelsname Prontosil®) gegen bestimmte bakterielle Erreger entdeckte (Domagk 1935).

Ohne Zweifel haben Antibiotika die Medizin revolutioniert, durch ihre Entdeckung und breite Anwendung wurden unzählige Leben gerettet: So sank z. B. die Rate der durch Infektionskrankheiten verursachten Todesfälle beim Menschen von 797 pro Hunderttausend im Jahr 1900 auf nur noch 36 pro Hunderttausend in den 1980ern (Walsh et al. 2005). In Anlehnung an Lewis (2012) soll Abbildung 1 verdeutlichen, dass die meisten Antibiotika zwischen den 1940er und den 1960er Jahren entdeckt wurden, weswegen diese Zeit in der medizinischen Forschung auch als „goldene Ära“ bezeichnet wird (Wright 2007, Lewis 2012). Quelle der zu jener Zeit entdeckten Antibiotika war eine relativ geringe Anzahl taxonomischer Bakterien-Gruppen aus ökologischen Nischen, vorwiegend Isolate der Gattung *Actinomyces* aus Bodenproben (Fischbach et al. 2009, Aminov 2010).



**Abbildung 1: Entdeckungszeitpunkte verschiedener Antibiotikaklassen, modifiziert nach Lewis (2012)**

Als während der Jahre 1970 bis 1980 die Entwicklung neuer Wirkstoffklassen stagnierte und das Problem der Resistenzentwicklung immer größere Kreise zu ziehen begann, konzentrierten sich Forschung und Industrie darauf, die Wirksamkeit bereits existierender Antibiotika durch chemische Modifikationen zu erhöhen, was sich letztlich in verbesserter antimikrobieller Aktivität, geringerer Sensitivität gegenüber den Resistenzmechanismen und geringerer Toxizität der Wirkstoffe äußerte (Chopra et al. 2002, Wright 2007). Deutlich wird die Bedeutung solcher chemischen Veränderungen an der Tatsache, dass, sieht man von der Einführung der Carbapeneme 1985 ab, alle zwischen den frühen 1960er Jahren und dem Jahr 2000 für klinische Zwecke zugelassenen Wirkstoffe synthetische Derivate bereits bestehender Antibiotikagerüste waren; bis heute stellt diese Herangehensweise die vorherrschende Methode bei der Entwicklung „neuer“ Antibiotika dar (Fischbach et al. 2009). Ein anschauliches Beispiel für diesen Prozess sind die Cephalosporine, die 2013 in der Humanmedizin zusammen mit den Oral- und Aminopenicillinen 51 % aller verordneten Antibiotikatagesdosen ausmachten: Über die Jahre wurden vier unterschiedliche Generationen entwickelt, die sich durch immer weiter verbesserte Wirkung gegenüber Gram-negativen Keimen und erhöhte  $\beta$ -Laktamase-Stabilität auszeichnen und denen ab der dritten Generation eine wichtige Rolle als Reserve-Breitbandantibiotikum unter anderem für nosokomiale Infektionen zukommt (Estler et al. 2007, Schwabe et al. 2014).

## 1.2 Einsatz und Bedeutung von Antibiotika in der Veterinärmedizin

Grundsätzlich dienen Antibiotika in der Veterinärmedizin aufgrund ihrer spezifischen Wirkungsweise als Therapeutika zur Behandlung von bakteriellen Infektionskrankheiten und leisten, wie bereits einleitend erwähnt, somit einen wichtigen und unverzichtbaren Beitrag zur Gesunderhaltung von Tieren und Tierbeständen. Letztlich zielt dies auf Nutztierebene darauf ab, aus gesunden Tieren unbedenkliche Lebensmittel zu erzeugen. Nach Angaben des Bundesverbandes für Tiergesundheit e.V. betrug der Anteil der Antiinfektiva an allen im Jahr 2013 in Deutschland verkauften Tierarzneimittel 24 %, bei einem Gesamtwert von 178 Millionen Euro (<http://www.bft-online.de><sup>1</sup>, letzter Zugriff am 30.09.2015).

---

<sup>1</sup> [http://www.bft-online.de/fileadmin/bft/bft-special/2014-62/Torte\\_TAM\\_2013.jpg](http://www.bft-online.de/fileadmin/bft/bft-special/2014-62/Torte_TAM_2013.jpg)

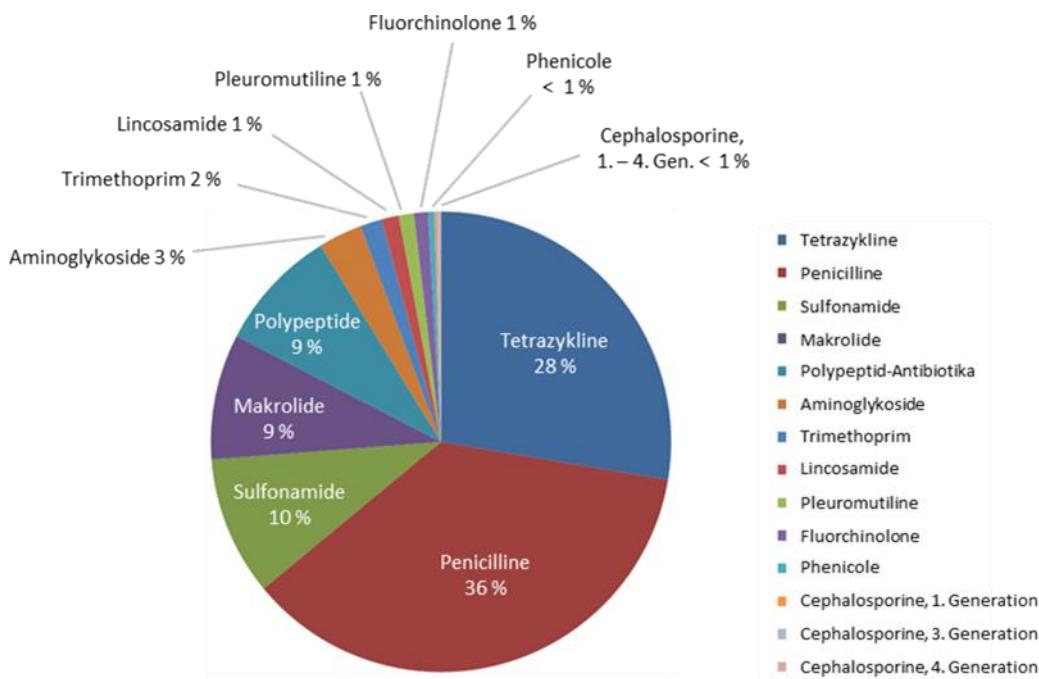
Die Leitlinien für den sorgfältigen Umgang mit antibakteriell wirksamen Tierarzneimitteln erlauben unter gewissen Voraussetzungen (vgl. Punkt 3 der Leitlinien: „Der Einsatz von Antibiotika erfordert immer eine Diagnose [...]“) den Einsatz zu metaphylaktischen Zwecken (BTK 2015). Prophylaktische Antibiotikagaben bei gesunden Tieren sind grundsätzlich zu vermeiden; in begründeten Ausnahmefällen ist die prophylaktische Verabreichung von Antibiotika allerdings vertretbar, beispielsweise bei immunsupprimierten Patienten oder in Verbindung mit einer Operation (BTK 2015). Eine wiederholt durchgeführte oder längerfristige Anwendung von Antibiotika bei Tiergruppen, beispielsweise in bestimmten Alters- und Produktionsabschnitten oder bei der Einstallung, ist nur dann zulässig, wenn – neben der klinischen Diagnose – regelmäßige Untersuchungen zur Resistenzsituation durchgeführt werden, z. B. durch Antibiogramm nach Erregerisolierung (BTK 2015).

Als erstes Land verbot im Jahr 1986 Schweden die Anwendung von Antibiotika zum Zwecke der Wachstumsförderung, andere Ländern zogen nach, z. B. Dänemark mit einem 1995 erlassenen Bann gegenüber dem Glykopeptid-Antibiotikum Avoparcin (Aarestrup 2003, Dibner et al. 2005). 1999 wurde die Anwendung einzelner auch in der Humanmedizin gebräuchlicher Wirkstoffe (z. B. Tylosin oder Spiramycin) von der EU-Kommission zu wachstumsfördernden Zwecken untersagt, ehe letztlich der Einsatz von Antibiotika als leistungsfördernde Zusatzstoffe, nicht zuletzt auf Drängen der World Health Organization (WHO), zum 01. Januar 2006 in der gesamten Europäischen Union verboten wurde (VO(EG)\_1831 2003, Dibner et al. 2005). Dagegen wird die Verabreichung von Antibiotika zur Wachstumsförderung in anderen Ländern wie z. B. den USA weiterhin angewandt, obwohl die Food and Drug Administration (FDA) im Dezember 2013 Landwirte darum bat, freiwillig darauf zu verzichten (FDA 2013).

Schätzungen zufolge wurden in Dänemark in den vergangenen Jahren in der Veterinärmedizin mehr als doppelt so viele Tonnen (t) Antibiotika wie für die Humanmedizin verbraucht (Aarestrup et al. 2010, WHO 2012). Für das Jahr 2014 wurde die von pharmazeutischen Unternehmen und Großhändlern an Tierärzte mit angemeldeter Hausapotheke in Deutschland abgegebene Menge an Antibiotika vom Deutschen Institut für Medizinische Dokumentation und Information (DIMDI) mit 1.238 t beziffert. Das entspricht einem Rückgang von 468 t im

Vergleich zum Jahr 2011 als die Daten erstmals erfasst worden waren (BVL 2015).

Abbildung 2 zeigt eine prozentuale Übersicht der einzelnen im Jahr 2014 abgegebenen Wirkstoffe (BVL 2015). Offensichtlich wird dabei, dass vorwiegend ältere Wirkstoffklassen wie Penicilline (450 t), Tetrazykline (342 t) und Sulfonamide (121 t) – mit zusammengerechnet knapp drei Viertel aller abgegebenen Wirkstoffe – die Hauptabgabemengen bilden.



**Abbildung 2: Prozentuale Übersicht der im Jahr 2014 an Tierärzte abgegebenen Menge an antimikrobiellen Wirkstoffen**

Die von der WHO und der Weltorganisation für Tiergesundheit (OIE) als Wirkstoffe mit besonderer Bedeutung für die Therapie beim Menschen („critically important antimicrobials“) eingestuften Wirkstoffklassen der Fluorchinolone und der Cephalosporine der 3. und 4. Generation wurden mit insgesamt 16,0 t zwar nur in geringen Mengen abgegeben (Collignon et al. 2009). Verglichen mit den Abgabemengen aus 2011 stieg die Menge der Fluorchinolone jedoch um 4,1 t (dies entspricht einem Zuwachs von 50 % in den vergangenen vier Jahren), die der Cephalosporine der 3. Generation um 0,2 t. Bezugnehmend auf die Fluorchinolone erscheint dieser Sachverhalt bemerkenswert, einerseits wegen ihrer enormen Bedeutung bei der Behandlung von Atemwegs- und Harnwegsinfektionen sowie schweren Infektionen durch *Campylobacter* spp. in der Humanmedizin, andererseits weil Resistenzen gegenüber dieser

Wirkstoffklasse regelmäßig bei Isolaten aus Lebensmittel liefernden Tieren nachgewiesen werden (Engberg et al. 2001, Sousa et al. 2012, Garcia-Migura et al. 2014).

Der Anteil der Präparate, die für mindestens eine Lebensmittel liefernde Tierart zugelassen sind, betrug im Jahr 2013 mit 1.444 t mehr als 99 % aller abgegebenen Wirkstoffe (BVL 2014), was die besondere Bedeutung hervorhebt, die dem Tierarzt in der Kette der Lebensmittelproduktion und im Verbraucherschutz zukommt. Die gemeldeten Wirkstoffmengen lassen sich jedoch nicht einzelnen Tierarten zuordnen, da der Großteil der Wirkstoffe für die Anwendung bei verschiedenen Tierarten zugelassen ist. Auch unterschiedliche Dosierungen der Wirkstoffe bleiben in dieser Datenerfassung unberücksichtigt, wodurch beispielsweise potenziell resistenzselektierende Unterdosierungen unbemerkt bleiben. Dies führt dazu, dass sich letztlich keine Aussage über Ursachen und Zusammenhänge treffen lässt, die die vermeintliche These stützen, der hohe Antibiotika-Verbrauch in der Veterinärmedizin wäre eine Hauptursache gestiegener Antibiotikaresistenzraten in der Humanmedizin.

Die European Medicines Agency (EMA) beziffert in ihrem vierten Report der European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption (ESVAC) die Zahl der verkauften Antibiotika für Lebensmittel liefernde Tiere für das Jahr 2012 in Deutschland mit 1.707,5 t (EMA 2014). Bereits korrigiert um einen Faktor, der die unterschiedliche Bevölkerungsdichte berücksichtigt, stellt diese für die Bundesrepublik erfasste Menge im Vergleich zu 25 anderen Staaten der europäischen Wirtschaftszone hinter Zypern, Italien, Ungarn und Spanien den fünfgrößten Wert dar; auch hier setzt sich der Großteil der erfassten Wirkstoffe wieder aus Tetrazyklinen, Penicillinen und Sulfonamiden zusammen (EMA 2014).

Betrachtet man nur die Einsatzmengen von Antibiotika bei der Tierart Schwein, so wurden laut Angaben der Pilot-Studie „VetCAB-Pilot“ mengenmäßig am meisten Tetrazykline eingesetzt, gefolgt von Beta-Laktamen und Sulfonamiden, während Fenicole, Lincosamide und Cephalosporine kaum ins Gewicht fallen (Van Rennings et al. 2013).

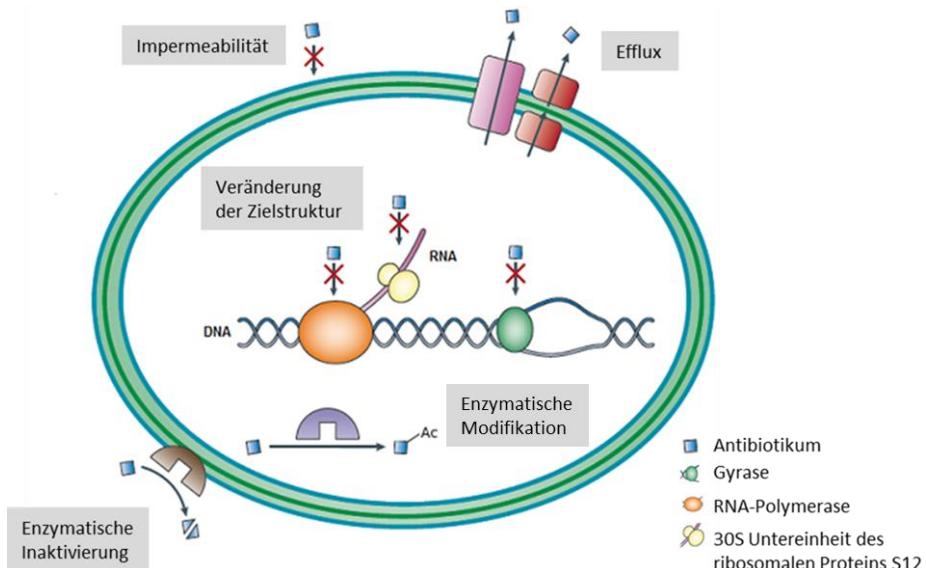
### 1.3 Bakterielle Antibiotikaresistenz

Trotz aller Euphorie gelangte man schon während der „golden“ Ära zu der Erkenntnis, dass die Anwendung von antibiotischen Wirkstoffen auch eine Kehrseite aufweist: Die Entwicklung von Antibiotikaresistenzen. Vereinfacht gesagt versteht man darunter das unverminderte Wachstum von Mikroorganismen während sie toxischen Konzentrationen an Antibiotika ausgesetzt sind (Wright 2007).

Bereits Fleming selbst soll davor gewarnt haben, dass zu geringe Dosen sowie eine zu kurze Anwendungsdauer zu potenziellen Resistenzen gegenüber Penicillin führen könnten (Aminov 2010). In einer Studie mit *Balantidium coli* keimte der Verdacht auf, dass Resistenz gegenüber Penicillin auf enzymatische Inaktivierung zurückzuführen ist – und zwar noch bevor das Medikament überhaupt als Therapeutikum auf dem Markt war (Abraham et al. 1940, Davies et al. 2010). Einer der ersten Berichte über Antibiotikaresistenzen bei Lebensmittel liefernden Tieren datiert aus dem Jahr 1951 und beschreibt Resistenzen in Truthühnern nach experimenteller Fütterung von Streptomycin (Starr et al. 1951).

#### 1.3.1 Membran- / Proteinbasierte Mechanismen der Antibiotikaresistenz

Bakterien können sich durch verschiedene Abwehrstrategien vor der Wirkung von Antibiotika schützen. Abbildung 3 zeigt gängige Grundmechanismen der Antibiotikaresistenz Gram-negativer Bakterien (Allen et al. 2010).



**Abbildung 3: Resistenzmechanismen Gram-negativer Bakterien (modifiziert nach Allen et al. 2010)**

Ein gängiges Muster, mit dem sich Bakterien gegenüber antibiotisch wirksamen Substanzen zur Wehr setzen, ist die Verminderung der Antibiotikakonzentration innerhalb der Zelle. Erreicht wird dies einerseits durch Barrieren wie die äußere Membran Gram-negativer Bakterien mit ihren Lipopolysacchariden, die für hydrophobe Antibiotika impermeabel sind (Delcour 2009). Im direkten Gegensatz zu dieser verminderten Aufnahme steht die erhöhte Ausschleusung (Efflux), bei der das Antibiotikum durch energieabhängige Transportsysteme aus dem Zellinneren abtransportiert wird, wobei dieser Vorgang entweder spezifisch gegen ein Antibiotikum gerichtet ist oder mehrere Wirkstoffklassen umfasst; man spricht dann von sog. „Multidrug efflux pumps“ (Nikaido 1998). Bei letzteren ist die Menge an ausgeschleustem Antibiotikum in der Regel niedriger als bei gezieltem Efflux (Nikaido 1998).

Darüber hinaus schützen sich Bakterien durch Änderungen an der Zielstruktur des eingesetzten Antibiotikums, konkret wird dies beispielsweise durch Ummodellierung von Bindungsstellen ermöglicht (Allen et al. 2010). Die ursprüngliche Funktion des Proteins bleibt dabei erhalten, durch die strukturelle Veränderung kann das Antibiotikum jedoch nicht mehr angreifen. Im Falle von Resistenz gegenüber Fluorchinolonen greift die Strukturveränderung an der Gyrase, bei Rifampicin-Resistenz an der  $\beta$ -Untereinheit der RNA-Polymerase, bei Resistenz gegenüber Streptomycin an der 30S-Untereinheit des ribosomalen Proteins S12 (Allen et al. 2010).

Die hydrolytische Wirkungsweise der in den 1940er Jahren entdeckten und bis heute klinisch hochrelevanten  $\beta$ -Laktamasen sollen an dieser Stelle ein Beispiel für die enzymatische Inaktivierung (braun in Abbildung 3) darstellen, mit der sich Bakterien vor Antibiotika schützen (Philippon et al. 1989). Des Weiteren kann durch enzymatische Modifikation eine Inaktivierung des eingesetzten Wirkstoffes herbeigeführt werden: In Abbildung 3 ist dies dargestellt anhand einer Acetyltransferase (lila), die durch kovalentes Anhängen einer Acetyl (Ac)-Gruppe das Aminoglykosid-Antibiotikum unwirksam macht (Allen et al. 2010).

### 1.3.2 Genetische Ebene der Antibiotikaresistenz

Betrachtet man die Mechanismen der Antibiotikaresistenzen vom molekularbiologischen Standpunkt aus, so gibt es auf der einen Seite Organismen, die aufgrund ihrer genetischen Eigenschaften von Natur aus resistent gegenüber

einem oder mehreren Wirkstoffen sind, man spricht dann von „intrinsischer Resistenz“. Als Beispiel können Mykoplasmen herangezogen werden, die in ihrer Zellwand kein Peptidoglykan besitzen und die deshalb natürlicherweise gegen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika wie Penicillin resistent sind (Bryan 1988, Bébér et al. 2005). Auf der anderen Seite steht die erworbene Resistenz, die sich entweder *de novo* aus der Mutation bestehender Gene oder durch den Erwerb von Resistenzgenen aus einem anderen Organismus ergibt (Tenover 2006).

### 1.3.2.1 Mutation

Mutationen – darunter fallen z. B. Punktmutationen, Deletionen und Substitutionen – bewirken durch Veränderungen der Basensequenz Änderungen der vom betroffenen Gen kodierten Proteinstrukturen, wobei dies vor dem Hintergrund der von Francis Crick aufgestellten „Wobble Hypothese“ im Regelfall folgenlos bleibt (Crick 1966, Madigan et al. 2013). Einzelne Mutationen können jedoch auch dazu führen, dass Resistzenzen entstehen: Spontanmutationen in Genen, die entweder für die Zielstruktur antimykobakterieller Wirkstoffe kodieren oder für Enzyme, die bei der Inaktivierung dieser Medikamente involviert sind, zeichnen für Resistzenzen bei *Mycobacterium tuberculosis* verantwortlich (Ramaswamy et al. 1998). Wie das Beispiel einer *E. coli*-Mutante<sup>2</sup> zeigt, in der durch Insertion im Bereich eines *ampC*-Promotors erheblich höhere Mengen an  $\beta$ -Laktamase produziert werden, kann durch Mutation auch die Menge an Zielprotein dahingehend beeinflusst werden, dass dies Einfluss auf das Resistenzverhalten hat (Jaurin et al. 1983, Bryan 1988). Zusätzlich zu solchen Einzelmutationen kommt es vor, dass durch das Zusammenwirken mehrerer, sukzessive entstandener Mutationen in einzelnen Resistenzgenen und einer zusätzlichen Mutation, die durch Inaktivierung eines Transkriptions-Repressors zu einer Überexpression von Effluxpumpen führt, die klinische Resistenzsituation massiv verschärft wird, wie dies beispielsweise bei Fluorchinolonen der Fall sein kann (Normark et al. 2002).

Mutationen, die in Antibiotikaresistenz münden, betreffen häufig Gene, die für Proteine kodieren, die essentielle Funktionen in der Zelle übernehmen (Normark et al. 2002). Bietet die Mutation dem Organismus Schutz vor einem bestimmten Antibiotikum, ohne die ursprüngliche Funktion des betroffenen Proteins zu beein-

---

<sup>2</sup> Im Folgenden wird entgegen der nach Duden gebräuchlichen Durchkopplung aus typografischen Gründen die Schreibweise „*E. coli*...“ favorisiert

trächtigen, stellt das für das Bakterium einen Fitnessvorteil dar – dies kann im Falle positiver Selektion zur Fixierung der Mutation führen (Normark et al. 2002).

### 1.3.2.2 Gentransfer

Während Mutationen im Wesentlichen nur einen geringen Anteil am Erwerb neuer Funktionen innerhalb einer Zelle haben, wird der Rekombination eine deutlich größere Bedeutung im Hinblick auf die funktionale Vielfalt eines Organismus beigemessen. Vertikal können Mutationen nur durch die Weitergabe von DNA von der Mutter- auf die Tochterzelle übertragen werden (vertikaler Gentransfer). Demgegenüber stellt der horizontale Gentransfer den Erwerb von genetischem Material durch andere Organismen dar (Madigan et al. 2013). Heute schätzt man, dass zwischen 12 % und 20 % des Genoms von *E. coli* aus horizontalem Transfer stammen (Medigue et al. 1991, Ochman et al. 2000, Madigan et al. 2013). Bei den meisten Fällen von erworbener Antibiotikaresistenz handelt es sich höchstwahrscheinlich um durch Transfer erworbene Resistenzen (Aminov et al. 2007). Im Hinblick auf die enorm schnelle Ausbildung und Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in taxonomisch unterschiedlichste Gattungen von konsensalen und pathogenen Bakterien wird dem horizontalen Gentransfer erhebliche Bedeutung beigemessen, wie durch sequenzbasierte Genomanalysen belegt wird: Er ist es, der dafür sorgt, dass sich Bakterienpopulationen durch den Erwerb von ökologisch relevanten (Resistenz)Genen innerhalb kurzer Zeit an veränderte Umweltbedingungen, wie sie etwa durch die Wirkung von Antibiotika entstehen, anpassen können; letztlich stellt dies wiederum nichts anderes als einen Fitnessvorteil dar (O'Brien 2002, Hartmann 2005, Aminov et al. 2007, Barlow 2009).

Genetische Mechanismen, die den Erwerb und Austausch von Antibiotikaresistenzgenen bei Prokaryoten beeinflussen, sind Transduktion, Transformation sowie Konjugation.

#### Transduktion

Hierbei wird DNA von Bakteriophagen, einer Gruppe von Viren, die spezifische Bakteriengattungen als Wirtszellen infizieren, von einer Zelle zur anderen übertragen (Lennox 1955). Während im sog. lytischen Zyklus der Phage den Replikationsapparat der Wirtszelle zur Vermehrung von Viruspartikeln benutzt (diese geht infolgedessen zugrunde), wird im lysogenen Zyklus genetisches

Material des Phagen temporär in das Genom des bakteriellen Wirtes eingebaut und von diesem als Teil des „eigenen“ Chromosoms repliziert, ohne dass dies mit einer Zellschädigung oder der Formierung von Viruspartikeln einhergeht (Penadés et al. 2015). Das Auftreten von Bakteriophagen ist dabei so verbreitet, dass sie zum genetischen Transfer in der Natur wesentlich beitragen und somit eine wichtige Rolle spielen, was die mikrobielle Diversität, Ökologie und Virulenz angeht (Madigan et al. 2013). Eine Veröffentlichung von 2013 zeigt ebendies anschaulich: Das Genom von Phagen, die aus Mäusen isoliert wurden, welche zuvor mit Ciprofloxacin respektive Ampicillin behandelt worden waren, war mit Genen angereichert, die durch verschiedene Mechanismen nicht nur Resistenz gegenüber den verabreichten Wirkstoffen sondern auch gegen andere, nicht-verwandte Wirkstoffe vermittelten. Außerdem konnten die Autoren der Studie im Experiment demonstrieren, dass naive Bakterien unmittelbar nach Infektion durch Phagen aus den behandelten Mäusen höhere Resistenzraten gegenüber dem den Mäusen verabreichten Antibiotikum aufwiesen als zuvor (Modi et al. 2013).

### Transformation

Als Transformation wird ein Vorgang bezeichnet, bei dem freie DNA aus der Umwelt, zum Beispiel nach bakterieller Zelllysis, von einer kompetenten Empfängerzelle aufgenommen wird, wodurch genetische Veränderungen stattfinden (Madigan et al. 2013). Bereits Mitte des 19. Jahrhunderts wurde in Studien, auf denen die späteren Beweise beruhen, dass es sich bei der DNA um das genetische Material handelt, die Fähigkeit von Mikroben nachgewiesen, DNA aus der Umwelt aufzunehmen und in ihr Genom zu integrieren (Avery et al. 1944). Frederick Griffith leistete dabei mit seinen Experimenten mit *Streptococcus pneumoniae* (Pneumococcus) am Mausmodell entscheidende Vorarbeiten (Griffith 1928).

Bei weitem nicht alle Bakterien sind zur natürlichen Transformation befähigt. Während *Acinetobacter* spp., *Bacillus* spp. und *Haemophilus* spp. leicht transformieren und auf diese Weise ihre Diversität und Fitness in Bakteriengemeinschaften erhöhen, können dies viele Gram-negative Bakterien nicht, oder wie im Falle von *E. coli* nur unter bestimmten Voraussetzungen, etwa nach Behandlung mit hohen Konzentrationen von Kalziumionen und anschließender Kühlung oder durch Elektroporation. Die nach derartiger Behandlung mögliche Einbringung von DNA in *E. coli* ist heutzutage ein

wichtiges Instrument der Biotechnologie (Cohen et al. 1972, Cosloy et al. 1973, Madigan et al. 2013).

### Konjugation und mobile genetische Elemente

Eine weitere Form des Genaustauschs zwischen Bakterien stellt der konjugative Transfer von DNA-Fragmenten durch direkten Kontakt zwischen einer Donor-Zelle und einer Empfänger-Zelle dar (Jacob et al. 1958). Konjugation geschieht über direkten Zell-Zell-Kontakt: Durch Ausbildung von Pili bzw. Poren entsteht eine Cytoplasma-Brücke, die die Passage von Plasmiden und mobilen genetischen Elementen ermöglicht (Aminov et al. 2007, Huddleston 2014). Durch die Tatsache, dass diese Art des Genaustausches im Falle der „Broad host range plasmids“ sowohl zwischen eng verwandten, als auch zwischen Bakterien unterschiedlicher Gattung stattfinden kann, wird der Konjugation eine besondere Bedeutung beim horizontalen Gentransfer beigemessen (Datta et al. 1972, Clewell et al. 1995, Jain et al. 2013).

Der Begriff Plasmid wurde im Jahr 1952 von Lederberg geprägt, es handelt sich dabei um extrachromosomal, sich selbst replizierende DNA-Elemente, die für gewöhnlich Gene enthalten, die nicht für essentielle Zellfunktionen kodieren (Lederberg 1952, Frost et al. 2005). Plasmide liegen klassischerweise als ringförmige, doppelsträngige DNA-Moleküle vor, sie existieren jedoch auch in linearer Form (Hinnebusch et al. 1993). Konjugative Plasmide sind befähigt, Kopien ihrer selbst in neue Wirtszellen zu transferieren; im Falle von *E. coli* geschieht das durch das sog. F-Plasmid, Plasmide anderer Gram-negativer Keime benutzen Mechanismen, die dem des F-Plasmids ähneln (Madigan et al. 2013). Zudem existieren nicht-konjugative Plasmide, die nur in Anwesenheit von konjugativen Plasmiden und Transposons mobilisiert bzw. co-transferiert werden können (Salyers et al. 1995, Zechner et al. 2000). Tragen Plasmide den gleichen Replikationsmechanismus in sich, so nimmt man an, dass dies eine Co-Existenz in der gleichen Zelle erschwert, man spricht von Inkompatibilität (englisch „incompatibility“). Dieses Phänomen ist die Grundlage der heute verbreiteten Einteilung verschiedener Plasmide nach Inc-Gruppen (Frost et al. 2005).

Unstrittig ist, dass Plasmide eine gewichtige Rolle bei der weltweiten Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen spielen, da Bakterien bei der Konjugation unterschiedlichste auf Plasmiden verankerte Resistenzgene aufnehmen können,

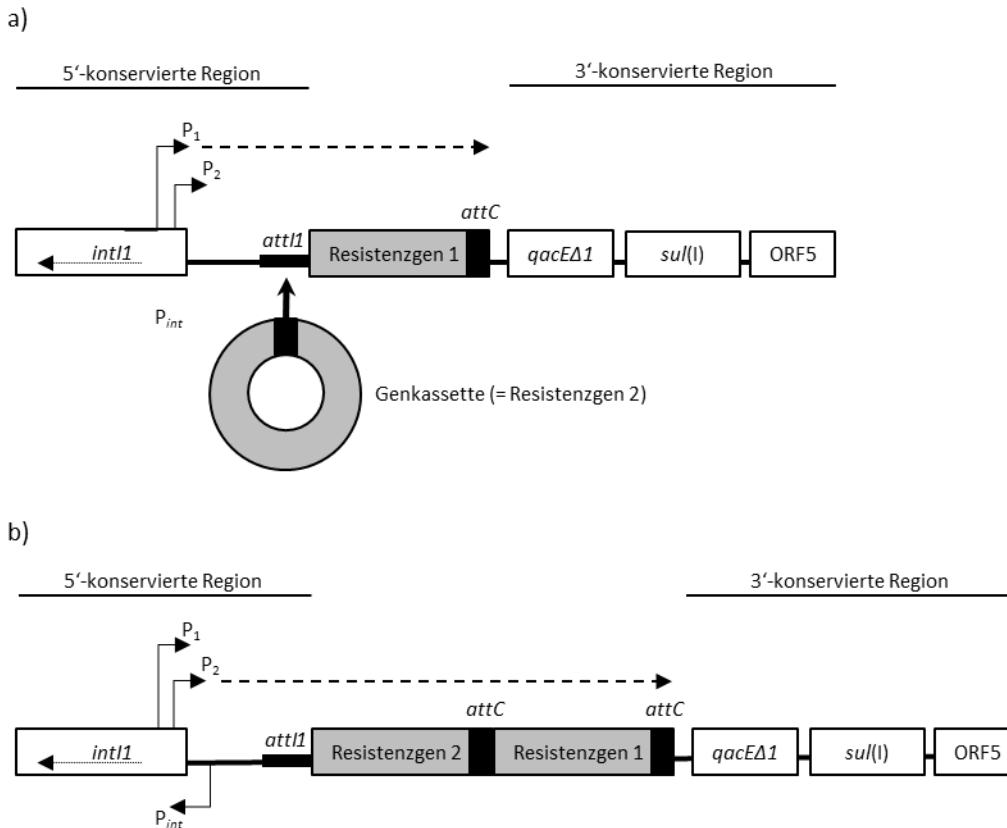
wie zahlreiche Beispiele aus der Literatur belegen (Wiener et al. 1999, Guiyoule et al. 2001, Wang et al. 2003, Ho et al. 2013). *E. coli* und Enterokokken aus dem Magen-Darm-Trakt dienen beispielsweise als Reservoir für zahlreiche auf Plasmiden verankerte Antibiotikaresistenzgene (Levy et al. 2004). Darüber hinaus stellen insbesondere Multiresistenzplasmide, also Plasmide, deren Gene Resistenz gegen mehrere verschiedene antibiotische Wirkstoffe kodieren, eine gesteigerte Gefahr hinsichtlich der Verbreitung von Resistzenzen dar, wie ein Fall aus Norwegen zeigt, in dem vom Transfer eines solchen Plasmids zwischen Bakterien von Rind und Menschen berichtet wird (Oppegaard et al. 2001).

Eine besondere Rolle bei der Übertragung von Antibiotikaresistzenzen kommt auch anderen, von Madigan et al. (2013) wie im Folgenden charakterisierten, mobilen genetischen Elementen zu: Transposons (Tn) und Insertionssequenzen (IS) haben als gemeinsames Strukturmerkmal ein Gen, das für das Enzym Transposase kodiert, durch welches der Transpositionsvorgang, das „Springen“ von einem Ort zum anderen innerhalb von DNA-Molekülen, zum Beispiel innerhalb eines Chromosoms oder aber von Chromosom zu Plasmid, katalysiert wird. Dies geschieht, indem kurze Wiederholungssequenzen an den Enden des Transposons bzw. der IS erkannt werden und das betreffende Element gezielt ausgeschnitten wird. Dabei besitzen weder Transposon noch IS einen eigenen Replikationsapparat, sondern werden erst dann repliziert, wenn das DNA-Molekül der Wirtszelle, in die sie integriert sind, repliziert wird. Während Insertionssequenzen im Üblichen eine Länge von 1000 Nucleotiden und als einziges das für die Transposase kodierende Gen besitzen, sind Transposons größer und beinhalten mehrere Gene, die sich von Transposon zu Transposon unterscheiden. Oft handelt es sich dabei um Antibiotikaresistenzgene, im Falle von Tn5 beispielsweise die Gene *kan*, *str* und *ble*, die Resistenz gegen Kanamycin (sowie Neomycin), Streptomycin bzw. Bleomycin vermitteln, im Falle von Tn10 um das Tetrazyklinresistenzgene *tet(A)* (Jorgensen et al. 1979, Bertrand et al. 1983, Madigan et al. 2013). Dieser Sachverhalt bedingt einerseits die Nutzbarkeit von Transposons als selektive Marker bei Klonierungsexperimenten, andererseits tragen Transposons beim Springen in Phagen oder Bakterienzellen auch zu einer Ausbreitung von Resistzenzen bei (Herrero et al. 1990, Frost et al. 2005).

Bei sog. (Gen-)Kassetten handelt es sich um eine weitere Art mobiler DNA-Segmente. Sie bestehen aus einer kurzen, meist für Resistenzgene kodierenden

Sequenz ohne Promotor, sowie der Integrase-Erkennungsstelle *attC*, können zwar übergangsweise frei in der Zelle zirkulieren, sind aber fast immer assoziiert mit Integrons (Stokes et al. 1989, Collis et al. 1992, Hansson et al. 1997). Abhängig von der Aminosäuresequenz der Integrase lassen sich Integrons in unterschiedliche Klassen eingruppieren: Ist die Integrase *intII* vorhanden, so wird das Integron den „Klasse-1-Integrons“ zugeordnet, Gleches gilt für *intI2* („Klasse-2-Integrons“) und *intI3* („Klasse-3-Integrons“), allesamt dafür bekannt, viele Gene für Antibiotika- bzw. gesteigerte Desinfektionsmitteltoleranz zu tragen und mit mobilen bzw. potenziell mobilen genetischen Elementen assoziiert zu sein (Recchia et al. 1995, Partridge et al. 2009). Integrons – selbst sind sie unbeweglich – finden sich auf den Chromosomen vieler verschiedener Bakterienarten, oft auch auf Plasmiden und Transposons, was evolutionär betrachtet äußerst frequenten horizontalen Genaustausch widerspiegelt (Boucher et al. 2007).

Schematisch stellt Abbildung 4 die Integration einer solchen Gen-Kassette in ein Klasse-1-Integron dar: Neben einer Aufnahmestelle für Kassetten (*attI*-Stelle), besitzt diese Integron-Klasse in seiner 5'-konservierten Region auch immer ein *IntI*-Gen, das für das Enzym Integrase kodiert, welche sich für den eigentlichen Einbau der Kassetten verantwortlich zeichnet (Carattoli 2001). Im Integron werden so einerseits Gene gesammelt, andererseits werden Promotoren (P in Abbildung 4) bereitgestellt, die dafür sorgen, dass die Gene der Kassetten nach dem Einbau exprimiert werden können (Madigan et al. 2013). Die 3'-konservierte Region der Klasse-1-Integrons kodiert für das Sulfonamidresistenzgen *sul(I)* und enthält zudem das Gen *qacEΔI*, das mit Toleranz gegenüber quartären Ammoniumverbindungen assoziiert wird, sowie den open reading frame (ORF) 5, welches für ein Protein unbekannter Funktion kodiert (Stokes et al. 1989, Recchia et al. 1995, Carattoli 2001).



**Abbildung 4: Aufbau Klasse-1-Integron sowie schematische Darstellung der Aufnahme einer Gen-Kassette (modifiziert nach Carattoli 2001)**

Wenn mehrere Gen-Kassetten gebündelt in einem Integron vereint sind, werden weiter vom Promotor entfernte Gene schwächer exprimiert als näher gelegene, wobei die Integrase die Aneinanderreihung der eingebauten Gene verändern kann (Fluit et al. 2004).

### 1.3.3 Tetrazykline: Wirkung und Resistenzmechanismen

Bei den Tetrazyklinen handelt es sich um Breitband-Antibiotika, wirksam gegen eine Vielzahl an Gram-positiven wie Gram-negativen Bakterien, darüber hinaus auch gegen Organismen wie Mykoplasmen, Chlamydien, Rickettsien und andere (Chopra et al. 2001). In den späten 1940er Jahren wurde erstmals Chlortetrazyklin aus *Streptomyces aureofaciens* isoliert (Duggar 1948). Interessanterweise konnten Spuren dieser Wirkstoffklasse jedoch schon in menschlichen Skelettteilen nachgewiesen werden, deren Ursprünge sich bis 350 – 550 n. Chr. zurückdatieren lassen (Bassett et al. 1980). Die Grundstruktur bildet ein Naphtacen-Ring-System, das unterschiedlich substituiert ist, je nachdem ob es sich um natürlich gewonnene

oder halbsynthetische Antibiotika dieser Wirkstoffklasse handelt (Dürckheimer 1975). Die bakteriostatische Wirkungsweise von Tetrazyklinen beruht auf reversibler Inhibition der Proteinbiosynthese in den Bakterien: Durch Komplexbildung mit Magnesium an der 30S Untereinheit des Ribosoms wird die Anlagerung der Aminoacyl-tRNA an die Akzeptorstelle und damit die Verlängerung der Peptidkette bei der Translation unterbunden (Goldman et al. 1983). Die intensive Nutzung dieser Wirkstoffklasse in Human- wie Veterinärmedizin (vgl. Punkt 1.2) ist unter anderem auf ein geringes Maß an Nebenwirkungen zurückzuführen, welches sich aus der Selektivität für bakterielle gegenüber eukaryotischen Ribosomen ergibt (Chopra et al. 2001).

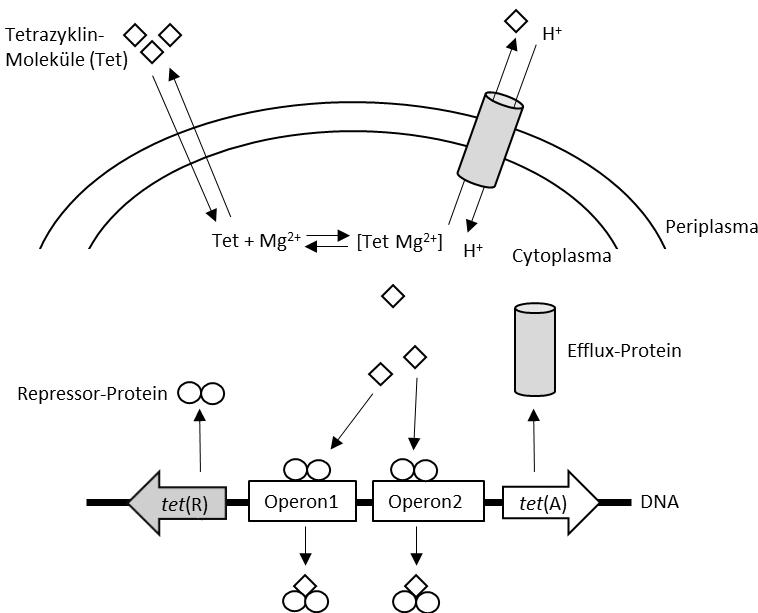
Resistenzen gegenüber Tetrazyklinen sind mittlerweile weitverbreitet, zugeschrieben wird dieser Sachverhalt vor allem dem Austausch von mobilen genetischen Elementen. Im Wesentlichen wird Resistenz durch drei unterschiedliche Mechanismen vermittelt, von denen Effluxproteine am häufigsten vorkommen, gefolgt von ribosomalen Schutzproteinen sowie enzymatischer Inaktivierung des Tetrazyklins (Roberts 2005). Tabelle 1 ordnet alle bis dato bekannten Tetrazyklinresistenzgene ihrem Wirkungsmechanismus zu, darunter auch das Gen *tet(U)*, dessen Mechanismus trotz Sequenzanalysen bisher ungeklärt ist.

**Tabelle 1: Übersicht über Tetrazyklinresistenzgene und deren Wirkungsmechanismus (<http://faculty.washington.edu/marilynr/tetweb1.pdf>, Stand 06.08.2015; letzter Zugriff am 30.09.2015)**

Efflux	Ribosomaler Schutz	Enzymatische Inaktivierung	Unbekannt
<i>tet(A), tet(B), tet(C), tet(D), tet(E)</i>	<i>tet(M), tet(O), tet(S)</i>	<i>tet(X)</i>	<i>tet(U)</i>
<i>tet(G), tet(H), tet(J), tet(V), tet(Y)</i>	<i>tet(W), tet(32)</i>	<i>tet(37)</i>	
<i>tet(Z), tet(30), tet(31), tet(33), tet(47)</i>	<i>tet(Q), tet(T), tet(36)</i>	<i>tet(34)</i>	
<i>tet(35)</i>	<i>otr(A), tetB(P), tet</i>		
<i>tet(39), tet(41)</i>	<i>tet(44)</i>		
<i>tet(K), tet(L), tet(38), tet(45)</i>			
<i>tetA(P), tet(40)</i>			
<i>otr(B), otr(C)</i>			
<i>tcr</i>			
<i>tet(42)</i>			
<i>tet(43)</i>			
<i>tetAB(46)</i>			

### 1.3.3.1 Efflux am Beispiel von *tet*(A)

Für die Ausschleusung von Tetrazyklinen aus dem Inneren der Bakterienzelle zeichnen im Falle von *tet*(A) energieabhängige, Membran-durchspannende Antiporter verantwortlich, die letzten Endes dafür sorgen, dass intrazellulär zu wenig Wirkstoff vorhanden ist, als dass dieser die Proteinbiosynthese am Ribosom inhibieren könnte (Roberts 2005). Hillen und Berens (2002) erläutern, dass die Expression dieser Transporterproteine durch ein Repressor-Promotor-System reguliert wird, bestehend aus Genen für ein Repressorprotein, das Effluxprotein sowie zwei Operator-Sequenzen einer zentralen Kontrollregion (vgl. Abbildung 5): Befinden sich keine Tetrazyklin-Moleküle im Zytoplasma der bakterielle Zelle, werden die Operatoren vom Repressorprotein, vorliegend als Dimer, blockiert – sowohl das Effluxprotein als auch das Repressorprotein werden in diesem Zustand an ihrer Transkription gehindert. Sobald nun Tetrazyklin ins Zellinnere diffundiert, bildet es einen Komplex mit bivalenten Metallionen (z. B. Magnesium) und wird in dieser Form an das Repressorprotein gebunden, und zwar noch bevor die proteinsyntheseinhibierende Wirkung am Ribosom entfaltet werden kann. Diese Bindung an das Repressorprotein geht mit dessen Konformationsänderung einher, was wiederum zur Folge hat, dass es sich vom Operator ablöst. Infolgedessen wird die Transkription der Gene für das Efflux- sowie das Repressorprotein initiiert und der oben angesprochene Antiporter in die Zellmembran eingebaut, welcher nun die Tetrazyklin-Magnesium-Komplexe aus der Zelle abtransportiert und dabei gleichzeitig ein Proton ins Cytosol schleust (Hillen et al. 2002). Eine strenge Regulation des beschriebenen Systems ist dabei essentiell, da eine dauerhafte Produktion des Effluxproteins in einem ständigen Protonenaustausch und damit einem Zusammenbruch des Membranpotenzials münden würde, was letztlich den Tod der Zelle zur Folge hätte (Eckert et al. 1989).



**Abbildung 5: Regulation der Genexpression des Tetrazyklin-Effluxproteins *tet(A)* (nach Hillen und Berens 2002)**

Während die meisten der für die Kodierung von Effluxproteinen verantwortlichen Tetrazyklinresistenzgene nur Resistenz gegenüber Tetrazyklin und Doxycyclin vermitteln, wird durch das unter Gram-negativen Bakterien am weitesten verbreitete Efflux-Gen *tet(B)* darüber hinaus auch Minocyclin aus der Zelle abzutransportiert (Roberts 2011).

### 1.3.3.2 Ribosomaler Schutz am Beispiel von *tet(M)*

Durch Interaktion mit der Zielstruktur des angreifenden Antibiotikums, dem Ribosom, vermitteln für Schutzproteine kodierende Gene wie beispielsweise *tet(M)* oder *tet(O)* Resistenz gegenüber Tetrazyklin, Doxycyclin und Minocyclin. Das Gen *tet(M)* ist das am weitesten verbreitete Tetrazyklinresistenzgen überhaupt, es wurde bislang in mindestens 71 verschiedenen Genera nachgewiesen (Roberts 2011). Bei ribosomalen Schutzproteinen handelt es sich um lösliche cytoplasmatische Polypeptide mit einem Molekulargewicht von ca. 72,5 kDa; die entsprechenden Gene finden sich oftmals auf mobilen genetischen Elementen wieder (Taylor et al. 1996, Chopra et al. 2001). Sie weisen Sequenzähnlichkeiten zu den ribosomalen Elongationsfaktoren EF-G und EF-Tu auf und werden den GTPasen zugeordnet (Leipe et al. 2002). In einem dementsprechend GTP-abhängigen Prozess wird die Freisetzung des Tetrazyklins aus seiner Bindungsstelle am Ribosom katalysiert (Burdett 1996). Lange ging man davon aus, dass der der Resistenz zugrunde liegende Mechanismus auf einer

durch die Schutzproteine indirekt ausgelösten Konformationsänderung der Tetrazyklin-Bindungsstelle am Ribosom beruht (Connell et al. 2003, Roberts 2005). Neuere Forschungsergebnisse deuten jedoch vielmehr auf einen direkten Mechanismus von *tet*(M) hin: Durch dessen Einwirkung wird die Bindungsstelle für das Antibiotikum dahingehend verändert, dass es einerseits zu einer aktiven Entfernung des Tetrazyklins vom Ribosom kommt. Andererseits bewirkt diese Veränderung, dass einem der regulären Elongation dienenden Komplex aus dem Elongsationsfaktor EF-Tu, GTP und Aminoacyl-tRNA der Vorzug gegenüber einem sich wiederannähernden Tetrazyklin-Molekül gegeben wird (Dönhöfer et al. 2012).

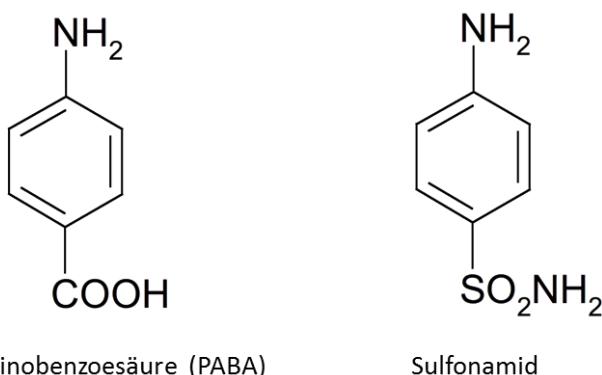
### 1.3.3.3 Enzymatische Inaktivierung

Wie in Tabelle 1 aufgelistet, sind mit *tet*(X), *tet*(34) und *tet*(37) bisher nur drei Tetrazyklinresistenzgene bekannt, deren Mechanismus auf enzymatischer Inaktivierung des Wirkstoffes beruht. Es handelt sich um Gene, die für NADP-abhängige Monooxygenasen kodieren, die wiederum in sauerstoffabhängigen Prozessen die Inaktivierung des Antibiotikums durch Anhängen einer Hydroxyl-Gruppe bewirken und so, im Falle von *tet*(X), Resistenz gegenüber Tetrazyklin, Doxycyclin, Minocyclin und Tigecyclin vermitteln (Yang et al. 2004, Roberts 2011).

### 1.3.4 Sulfonamide: Wirkung und Resistenzmechanismen

Die Wirkstoffklasse der Sulfonamide gehört zu den ältesten Vertretern unter den Antibiotika (vgl. Punkt 1.1). Trotzdem ist ihr Einsatz, zu Synergismuszwecken und Vorbeugung von Resistenzentwicklung meist in Kombination mit der bakteriostatisch wirkenden Substanz Trimethoprim, in der Veterinärmedizin nach wie vor stark verbreitet, beispielsweise bei der Therapie von Durchfällen in der Nutztierhaltung (Perreten et al. 2003). Es handelt sich bei allen Sulfonamiden um sog. Antimetaboliten der para-Aminobenzoësäure (PABA), welche wiederum einen essentiellen Baustein für alle Mikroorganismen darstellt, die Folsäure selbst synthetisieren (Estler et al. 2007). Indem Sulfonamid als Struktur-Analogon (vgl. Abbildung 6) PABA als Substrat des Enzyms Dihydropteroatsynthase (DHPS) verdrängt, blockiert es kompetitiv die Folsäuresynthese, was bei den betroffenen Bakterien zunächst in einem Mangel an Folsäure resultiert, sekundär

jedoch auch in einem Mangel an Zellbestandteilen, zu deren Synthese Folsäure benötigt wird (z. B. Aminosäuren wie Serin oder auch Nukleotide) (Estler et al. 2007). Die Bakterien werden also nicht direkt abgetötet, sondern an ihrer Vermehrung gehindert, wodurch sich für Sulfonamide eine bakteriostatische Wirkung ergibt. Diese wird, wie bereits erwähnt, verstärkt, wenn gleichzeitig Trimethoprim zum Einsatz kommt, welches die Dihydrofolatreduktase (DHFR) hemmt (Dauber-Osguthorpe et al. 1988). Da die Zellen von Säugetieren Folsäure nicht selbst synthetisieren können und folglich auf die Aufnahme aus der Umwelt angewiesen sind, wirken Sulfonamide sehr selektiv auf prokaryotische Zellen (Sköld 2001).



**Abbildung 6: Chemische Strukturformeln von PABA (Metabolit) und Sulfonamid (Antimetabolit)**

Resistenzen sind, ähnlich wie gegen Tetrazykline, auch gegen Sulfonamide mittlerweile weitverbreitet und können einer Mutation des für die DHPS kodierenden Gens *folP* entspringen (Swedberg et al. 1993, Vedantam et al. 1998). In den meisten Fällen wird Sulfonamidresistenz aber von auf mobilen genetischen Elementen gelegenen *sul*-Genen vermittelt: Bis dato wurden davon die drei Varianten *sul(I)*, *sul(II)* und *sul(III)* beschrieben, die allesamt für alternative Versionen der DHPS mit niedrigerer Affinität gegenüber den Sulfonamiden als Substrat kodieren (Swedberg et al. 1980, Rådström et al. 1988, Sundström et al. 1988, Perreten et al. 2003).

*sul(I)*-Gene sind für gewöhnlich in der 3'-konservierten Region von Klasse-1-Integrons lokalisiert (vgl. Abbildung 4) und dadurch bedingt an andere Resistenzgene gekoppelt; auch auf Transposons, beispielsweise solchen der unter Gram-negativen Bakterien sehr weit verbreiteten Tn21 Gruppe, sind *sul(I)*-Gene häufig zu finden (Grinsted et al. 1990, Carattoli 2001). *sul(II)* hingegen ist meist

auf *incQ*-Plasmiden sowie Plasmiden des Typs pBP1 lokalisiert (van Treeck et al. 1981, Sköld 2001). Beide Gene wurden in Gram-negativen *E. coli*-Isolaten klinischen Ursprungs zu etwa gleichen Anteilen nachgewiesen und sind in 57 % ihrer DNA-Sequenz identisch (Rådström et al. 1991, Perreten et al. 2003). *sul*(III) wurde in der Literatur erstmalig im Jahr 2003 eingehender charakterisiert: Nachdem in einer Vorläuferstudie nur 70 % der Sulfonamidresistenz in Bakterienisolaten aus Schweinen durch die Anwesenheit von *sul*(I) und *sul*(II) erklärt werden konnten, gelang es Forschern in der Schweiz in einem enterotoxischen *E. coli*-Stamm, isoliert aus einem an Durchfall erkrankten Schwein, das bis dahin unbekannte Gen als Ursache für die Sulfonamidresistenz in den restlichen der zuvor erwähnten Bakterienisolaten zu benennen (Lanz et al. 2003, Perreten et al. 2003). *sul*(III) kodiert dabei, ähnlich wie die anderen beiden *sul*-Gene, für ein der DHPS ähnelndes Protein und steht in Anbetracht der Tatsache, dass es auf verschiedenen Plasmiden unterschiedlicher Klonlinien von *E. coli* detektiert wurde, im Verdacht, sich rasch in Bakterienpopulationen ausbreiten zu können (Perreten et al. 2003). Vor dem Hintergrund, dass durch das Ausbringen von Gülle der Transfer und Austausch von Resistenzgenen mit Bodenbakterien stattfinden kann, ließen sich in einer aktuellen Studie aus China messbare Anstiege an *sul*-Gehalten in zuvor mit Schweinegülle gedüngten Bodenproben messen (Smalla et al. 2000, Wang et al. 2014).

### **1.3.5 Quartäre Ammoniumverbindungen: Wirkung und Resistenzmechanismen**

Bei quartären Ammoniumverbindungen, im Englischen „quaternary ammonium compounds“, kurz QACs, handelt es sich um Desinfektionsmittel mit der chemischen Struktur  $N^+ R_1R_2R_3R_4 X^-$ , wobei an Stelle des R ein Wasserstoff-Atom, eine einfache Alkyl-Gruppe oder eine durch andere funktionelle Gruppen substituierte Alkylgruppe stehen kann und das  $X^-$  ein Anion zum positiv geladenen Stickstoff-Atom symbolisiert (Buffet-Bataillon et al. 2012). Das germizide Potential von QACs mit mindestens einer (zwischen 8 und 18 Kohlenstoff-Atome) langen Alkylgruppe wurde bereits 1916 beschrieben (Jacobs 1916). Seither finden sie Verwendung in zahlreichen öffentlichen wie industriellen Bereichen, wie beispielsweise der Herstellung von Kosmetik- und Medizinprodukten, in Krankenhäusern, der Lebensmittelverarbeitung, der Desinfektion von landwirtschaftlichen Gebäuden sowie bei der Aufbereitung von

Wasser (Holah et al. 2002, Paulson 2002, Buffet-Bataillon et al. 2012). Auch in der Veterinärmedizin spielen auf QACs basierende Desinfektionsmittel eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von Infektionskrankheiten (Ortega Morente et al. 2013). Eine bakteriostatische Wirkung von QACs in niedrigen Konzentrationen wurde bereits in den 70er-Jahren beschrieben (Maxcy et al. 1971). QACs wirken durch ihre oberflächenaktiven Eigenschaften als kationische Tenside und besitzen antimikrobielle Aktivität: Durch Interaktionen mit Phospholipiden und Proteinen auf den Oberflächen von Bakterien kommt es zu Membranschäden und letztlich zum Austritt zellulärer Bestandteile, sowohl bei Gram-positiven wie auch bei Gram-negativen Bakterien (Gilbert et al. 2005, Ioannou et al. 2007).

Das Phänomen gesteigerter Toleranz zeigt sich auch bei den QACs, konkret wird diese von *qac*-Genen (bisher bekannt sind *qacA*, *qacB*, *qacC*, *qacD*, *qacE*, *qacF*, *qacG*, *qacH*, *qacI*, *qacJ*, *qacK*, *qacZ*) vermittelt, die allesamt für Proteine kodieren, die Bestandteil von Multidrug-Pumpen mit relativ niedriger Spezifität sind und die in verschiedensten Gram-positiven wie Gram-negativen Bakterien-Isolaten nachgewiesen werden konnten (Chuanchuen et al. 2007, Bischoff et al. 2012, Jaglic et al. 2012). Dass sich hinter *qac*-mediierter „Resistenz“ ein Efflux-basiertes System verbirgt, wurde erstmals Mitte der 1980er Jahre beobachtet (Jones et al. 1985). Später wurde konkretisiert, dass es sich um einen Energie-abhängigen Vorgang handelt, bei dem, ähnlich wie bei *tet(A)* und *tet(B)*, die antimikrobiell wirksame Substanz im Austausch gegen Protonen aus der Zelle geschleust wird (Tennent et al. 1989, Rouch et al. 1990, Littlejohn et al. 1992).

In der Literatur finden sich Hinweise auf eine Korrelation zwischen Antibiotika und QACs: Ortega Morente et al. (2013) kommen anhand von Beispielen aus der Literatur zu dem Schluss, dass der Gebrauch solcher Biozide zu Desinfektionszwecken in Krankenhäusern oder bei Operationen am Nutztier für Penicillin-resistente Staphylokokken selektieren könnte und umgekehrt (Russell 2000, Hassan et al. 2006). Südamerikanische Forscher stellten den Beweis an, dass *qacC* auch erhöhte Toleranz gegenüber einer Reihe an  $\beta$ -Laktam-Antibiotika vermittelt (Fuentes et al. 2005). Die Korrelation zwischen QAC-Toleranz und Antibiotika-Resistenz kann aber auch auf den Fakt zurückgeführt werden, dass die vermittelnden Gene für gewöhnlich eng miteinander verbunden sind: In Gram-negativen Bakterien sind *qac*-Gene typischerweise auf Plasmiden zu

finden, auf denen wiederum auch eine Vielzahl von anderen Resistenzgenen verankert ist (Jaglic et al. 2012, Zhao et al. 2012). Dies gilt auch für *qacE* und seine attenuierte Variante *qacEΔ1* (Wang et al. 2008, Jaglic et al. 2012). Im Fall von *qacEΔ1* ist die Verbindung zur Antibiotikaresistenz zurückzuführen auf die hohe Prävalenz von Klasse-1-Integrone (vgl. Abschnitt 1.3.2.2): Eine aktuelle Studie zeigt, dass in allen untersuchten Schweinegülle- und mit Gülle behandelten Bodenproben Plasmide nachgewiesen werden konnten, die Klasse-1-Integrone beherbergten, auf denen wiederum *qacEΔ1* verankert war (Jechalke et al. 2014).

## 2 Gesellschaftliche Relevanz der Antibiotikaresistenz

### 2.1 Gründe für die zunehmende Ausbreitung von Resistzenzen

Allgemein betrachtet beruht die Verbreitung von Resistzenzen gegenüber antibiotischen Wirkstoffen auf zwei Grundlagen: Zum einen dem Vorhandensein von resistenten Bakterien bzw. von übertragbaren Resistenzgenen und zum anderen dem durch den Antibiotikaeinsatz zugunsten dieser Keime ausgeübten Selektionsdruck. Grundsätzlich handelt es sich bei der Entwicklung von Antibiotikaresistzenzen durchaus um ein natürliches Phänomen, schon immer mussten sich Bakterienpopulationen z. B. gegen Pilze behaupten. In Anbetracht der enormen Zahl von ca.  $5 \times 10^{30}$  Bakterien auf der Erde, deren kurzer Generationszeit und einer typischerweise vorherrschenden Häufigkeit von einer Genmutation je  $10^7$  Bakterien erscheint es wenig verwunderlich, dass es einige wenige Bakterien in einer Population gibt, die zufällig weniger empfindlich gegenüber einem bestimmten Antibiotikum sind. Durch diese schnelle genetische Anpassung an veränderte Umweltbedingungen – in diesem Fall das „Ausgesetztsein“ gegenüber einem antibiotischen Wirkstoff – verschaffen sie sich einen Selektionsvorteil gegenüber den für das Antibiotikum empfänglichen Bakterien der gleichen Population (Whitman et al. 1998, O'Brien 2002, Walsh et al. 2005).

Die Gründe, die das Auftreten und die beschleunigte Verbreitung von Antibiotikaresistzenzen begünstigen, im Folgenden überwiegend einer Veröffentlichung von Davies et al. (2010) entnommen, sind dabei durchaus vielschichtig, wobei die Hauptursachen unstrittig menschengemacht sind: Seit Beginn der „goldenene Ära“, der Entdeckung immer neuer Antibiotika ab den

1940er Jahren, hat sich durch Produktion, klinischen Gebrauch und Entsorgung eine beträchtliche Masse an teilweise umweltstabilen antimikrobiellen Medikamenten auf der Erde verteilt, weswegen seitdem ein hoher Selektionsdruck für resistenter Stämme in allen Bereichen unserer Umwelt vorherrscht. Davies' These, dass alleine durch pharmazeutische Unternehmen in den letzten 50 Jahren mehrere Millionen Tonnen an antibiotischen Verbindungen in die Biosphäre gelangten, wird unterstützt von verschiedenen Studien: Etwa wurde gezeigt, dass Abwässer einer indischen Fabrik, in der Antibiotika hergestellt werden, bedenklich hohe Rückstände an Antibiotika enthielten (Larsson et al. 2007). In einer weiteren Publikation wurden aus dem Umfeld einer ähnlichen Fabrik 93 fakultativ pathogene Bakterienstämme isoliert, von denen sich – unter Einbeziehung der intrinsischen Resistenzen – 86 % resistent gegenüber 20 oder mehr Antibiotika zeigten (Marathe et al. 2013). Davies et al. (2010) führen als weitere anthropogene Ursachen für die allgegenwärtige Verbreitung von Antibiotika in unserer Umwelt den Einsatz antimikrobieller Wirkstoffe als Wachstumsförderer bzw. den Einsatz zu therapeutischen und prophylaktischen Zwecken in der Human-, Klein- und Nutztiermedizin sowie in der Aquakultur, den Gebrauch von Bioziden in Handpflege- und Haushaltsartikeln sowie den Umgang mit Antibiotika in der Forschung und Industrie auf.

Generell lassen sich in der Literatur zahlreiche Anmerkungen finden, die vor allem den exzessiven Gebrauch von Antibiotika in unserer heutigen Gesellschaft als Ursache der momentanen Krise ansehen (Neu 1992, Levy 1998, Singer et al. 2003). Die Leitlinien für den sorgfältigen Umgang mit antibakteriell wirksamen Tierarzneimitteln unterstreichen die Aussage, dass prinzipiell jeder Einsatz von Antibiotika zur Entwicklung von Resistenzen führen kann und das Risiko der Resistenzentwicklung bei ungezieltem Einsatz, subtherapeutischer Dosierung sowie verlängerter, wiederholter und bestandsweiser Anwendung steigt (BTK 2015). Literaturangaben besagen, dass der Veterinärmedizin eine entscheidende Rolle in der Problematik der Antibiotikaresistenzen beikommt (Mateu et al. 2001). Die WHO benennt neben dem unsachgemäßen Einsatz von antimikrobiellen Medikamenten in Human- und Veterinärmedizin sowie der landwirtschaftlichen Nutztierhaltung ungenügende Präventions- und Eindämmungsmaßnahmen gegenüber Infektionen als die Hauptursachen für die weitreichende Verbreitung von Antibiotikaresistenzen (WHO 2014).

## 2.2 Bedeutung und Folgen

Die Folgen von Antibiotikaresistenzen sind mindestens so vielschichtig wie die Gründe dafür. Sie betreffen Mensch, Tier und Umwelt und stellen somit ein globales Problem dar. Alarmierend sind die Mortalitätsraten von Infektionen, denen multiresistente Keime ursächlich zugrunde liegen: Jedes Jahr sterben nach Angaben der Joint Working Group des European Centre for Disease Prevention and Control und der EMA in der EU ca. 25.000 Menschen an schweren Infektionen mit resistenten Bakterien, die in einer Gesundheitseinrichtung erworben wurden (ECDC/EMA 2009). In den USA stellt sich die Situation mit 63.000 durch nosokomiale bakterielle Infektionen verstorbenen Patienten jährlich noch schlimmer dar (Aminov 2010). Neben der Gefahr, sich im Krankenhaus mit multiresistenten und dementsprechend nur schwer therapierten Keimen wie Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) oder Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) zu infizieren, steht dabei sowohl für Mensch als auch Tier die Gefahr im Vordergrund, dass sich einfache Infektionskrankheiten, die zuvor über Jahrzehnte therapiert waren, nicht mehr erfolgreich behandeln lassen. Auch auf die Wirtschaft haben Antibiotikaresistenzen negative Auswirkungen: Von der WHO werden die Kosten, die jedes Jahr durch Infektionen mit multiresistenten Bakterien verursacht werden, für das amerikanische Gesundheitssystem mit Werten zwischen 21 und 34 Milliarden Dollar beziffert, für die EU belaufen sich die Schätzungen von Mehrkosten und verringelter Produktivität auf mindestens 1,5 Milliarden Euro jährlich (ECDC/EMA 2009, WHO 2014).

Durch klassische, resistent gewordene Zoonose-Erreger, wie nicht-typoidale *Salmonella*-Serovare sowie *Campylobacter* spp. ergeben sich vermehrt Gesundheitsrisiken für den Verbraucher. In der Literatur wurde bereits in den 1960er Jahren davor gewarnt, dass mobile Resistenzelemente von Enterobacteriaceae tierischen Ursprungs auf menschliche Pathogene übergehen könnten (Anderson 1968). Darüber hinaus existieren zahlreiche Berichte, in denen resistente Isolate der genannten Gattungen aus Lebensmittel liefernden Tieren nachgewiesen wurden (Threlfall et al. 2000, Gebreyes et al. 2002, Cortés et al. 2010). Auch für die Übertragung resisternter Stämme bzw. mobiler genetischer Resistenzelemente vom tierischen Lebensmittel (Smith et al. 1999, Antunes et al. 2003) bzw. vom Nutztier selbst auf den Menschen (Holmberg et al. 1984, Fey et

al. 2000, Sundsfjord et al. 2001) gibt es Belege in der Literatur. Die Ausbreitung von Resistenzen scheint fallweise durchaus mit dem Einsatz von Antibiotika in der Veterinärmedizin verknüpft zu sein, wie folgende Beispiele belegen (Mølbak 2004): Waren Fluorchinolone in den USA von 1986 an beim Menschen im Einsatz, bei Tieren jedoch nicht bis zum Jahr 1995, traten Resistenz gegenüber dieser Wirkstoffklasse dort in *Campylobacter* spp. so lange nicht auf, bis die Wirkstoffklasse für den tiermedizinischen Gebrauch zugelassen wurde (Gupta et al. 2004). Ähnliches stellte man auch in den Niederlanden und Spanien fest (Endtz et al. 1991, Engberg et al. 2001). Mølbak (2004) fasst die Folgen antibiotikaresistenter Pathogene in der Lebensmittelkette zusammen und nennt als Konsequenzen für das globale Gesundheitswesen eine geringere Effektivität bei vormalen wirksamen empirischen Antibiotika-Behandlungen, das Erreichen von Grenzen bei der Auswahl geeigneter Medikamente nach mikrobiologischer Diagnose des jeweiligen Erregers sowie eine mögliche Co-Selektion von Virulenzfaktoren (Mølbak 2004).

Kurz sei an dieser Stelle auch auf die Bedeutung der Umwelt im Zusammenhang mit Antibiotikaresistenzen eingegangen, da diese ein erhebliches Reservoir für resistente Organismen bzw. resistenzassoziierte Gene darstellt: Gerard D. Wright (2007) prägte hierfür den Begriff „environmental antibiotic resistome“, welches eine Unterkategorie des „antibiotic resistome“ darstellt, das aus sämtlichen Antibiotikaresistenzgenen, egal ob in Pathogenen, umweltassoziierten Bakterien, Kommensalen verschiedener Organismen oder anderen antibiotikaproduzierenden Lebewesen und Pflanzen, besteht. Bereits erwähnt wurde, dass die meisten Antibiotika, die heute zu Behandlungszwecken eingesetzt werden, ihren Ursprung in umweltassoziierten Mikroorganismen haben (Fischbach et al. 2009, Martinez 2009). Gleichzeitig wird mittlerweile davon ausgegangen, dass die meisten Antibiotikaresistenzgene ihren Ursprung ebenfalls in der Natur haben – nicht zuletzt in den Antibiotika-produzierenden Mikroorganismen bzw. deren mikrobiellen Umfeld (Martínez 2008, Perry et al. 2013). Verwiesen sei hier auf eine Studie, in der 480 Bakterienisolate aus Bodenproben urbanen und landwirtschaftlichen Ursprungs Resistenzen gegen insgesamt 21 verschiedene Antibiotika zeigten, wobei – wiederum inklusive der intrinsischen Resistenz – alle Stämme multiresistent waren; dies verdeutlicht anschaulich das massive Resistenz-Vorkommen in unserer Umwelt (D'Costa et al.

2006). Auch neuere Untersuchungen belegen dies (Walsh et al. 2013).

In ähnlicher Weise stellt die Kontamination von Wasser und Gewässern durch den Einsatz von Antibiotika in der Landwirtschaft und in Aquakulturen ein nicht unerhebliches Problem dar (Wright 2010): Durch Abwässer sowie Düngung werden konstant sowohl apathogene als auch pathogene bzw. potenziell pathogene Bakterien menschlichen und tierischen Ursprungs in die Umwelt (zurück)überführt (Hirsch et al. 1999, Baquero et al. 2008, Heuer et al. 2011). Für den Fall, dass diese Keime Antibiotikaresistenzgene in sich tragen, besteht die Gefahr, dass letztere sich auf Bakteriengemeinschaften im Boden – gerade bei diesen spielt die Aufnahme von Genmaterial durch Transformation eine übergeordnete Rolle – und im Wasser ausbreiten können; auch Kläranlagen bieten resistenten Organismen aufgrund der hohen Bakteriendichte optimale Voraussetzungen zur Übertragung und Neukombination von Resistenzgenen (Feuerpfeil et al. 1999, Alonso et al. 2001). Dies, sowie der bereits angesprochene Eintrag von (co-)selektierenden Faktoren anthropogenen Ursprungs (Antibiotika- und Schwermetallrückstände aus industrieller Produktion, Detergentien, Desinfektionsmittel usw.), führt wiederum dazu, dass nicht-pathogene Bakterien als eine Art Reservoir für Resistenzgene dienen (Baquero et al. 2008). Die Entdeckung, dass sich CTX-M Extended-spectrum  $\beta$ -Laktamasen höchstwahrscheinlich aus chromosomal Genen der ubiquitär in Gewässern und im Boden vorkommenden und auch als Krankheitserreger bekannten Gattung *Kluyvera* entwickelt haben, zeigt anschaulich, dass ein klinisch äußerst relevanter Resistenzfaktor seinen Ursprung wohl in der Umwelt hatte (Poirel et al. 2002, Carter et al. 2005, Wright 2010).

### **2.3 Aktuelle Entwicklungen und Maßnahmen**

Blickt man auf die Vielzahl an wissenschaftlichen Veröffentlichungen, Forschungsprogrammen und Reporten diverser internationaler Organisationen (WHO, EFSA, OIE), scheint das Problem der zunehmenden Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen mittlerweile im Bewusstsein verankert. Die WHO spricht von einer zunehmenden, ernsten Bedrohung für das öffentliche Gesundheitswesen und fordert Gegenmaßnahmen seitens aller öffentlichen Sektoren sowie der Gesellschaft (WHO 2014). Unter dem Aspekt „One World, One Health“ wird versucht, die verschiedenen in die Thematik involvierten Bereiche, vorwiegend Human- und Veterinärmedizin sowie die Umwelt, zu verknüpfen und gemeinsame

Lösungsansätze zu entwickeln, um der Entstehung einer „post-antibiotischen Ära“ vorzubeugen (Schwabe 1984, Zinsstag et al. 2011, Ferguson 2013).

Auch in Deutschland gibt es seit einiger Zeit nicht mehr nur Bestrebungen sondern vielmehr konkrete Maßnahmen und Programme, die auf den Kampf gegen antimikrobielle Resistenzen abzielen. Erwähnt sei an dieser Stelle die Bundesinitiative „Deutsche Antibiotika-Resistenzstrategie (DART) 2020“, die als Ziel die Reduzierung und Verminderung der Ausbreitung von Antibiotika-Resistenzen in Deutschland ausgegeben hat. Vom Bundesministerium für Gesundheit wurde im März 2015 ein „10-Punkte-Plan zur Bekämpfung resisterter Erreger“ vorgelegt (<https://www.bundesgesundheitsministerium.de><sup>3</sup>, letzter Zugriff am 30.09.2015). Im Hinblick auf die selektive Wirkung von Antibiotika kommt hierbei auch der Reduktion der Verbrauchsmengen Bedeutung zu. Um letztere besser zu überwachen, gibt es die vom Bundesministerium für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) ausgewertete Datenerhebung zur Antibiotikaabgabe in der Tiermedizin (s. Punkt 1.2). Auch wurde die Pilot-Studie „VetCAB-Pilot“ durchgeführt; sie stellt eine Verbrauchsmengenerfassung von Antibiotika in der Nutztierhaltung dar (Van Rennings et al. 2013).

Als wichtiges Instrument gilt das 16. Gesetz zur Änderung des Arzneimittelgesetzes (AMG), kurz 16. AMG-Novelle, das zum 1. April 2014 in Kraft trat. Ziel der Gesetzesänderung ist es, den Einsatz von Antibiotika in der Nutztierhaltung zu minimieren, um so einen Beitrag zum gesundheitlichen Verbraucherschutz zu leisten (AMG 2014). In § 56a AMG wird die Verschreibung, Abgabe und Anwendung von Arzneimitteln durch Tierärzte geregelt: Durch Ermächtigungen durch das BVL ist unter anderem rechtlich verankert, dass der Tierarzt in bestimmten Fällen zur Erstellung eines Testes zur Bestimmung der Empfindlichkeit von Erregern (= Antibiogramm) verpflichtet ist, dass bestimmte Parameter der Packungsbeilage von Antibiotika verbindlich beachtet werden müssen oder dass bestimmte Arzneimittel nur durch den Tierarzt selbst angewendet werden dürfen. Der Aufbau einer bundesweiten Datenbank, die Transparenz über den Einsatz von Antibiotika in Mastbestrieben schafft, soll unterstützend auf die Bekämpfung von Antibiotikaresistenzen hinwirken:

---

<sup>3</sup> <https://www.bundesgesundheitsministerium.de/ministerium/meldungen/2015/10-punkte-plan-zu-antibiotika-resistenzen.html>

Tierhalter, die Rinder, Schweine, Hühner und Puten zu Mastzwecken gewerblich halten, müssen nach § 58c AMG halbjährlich der zuständigen Behörde Daten melden, die zur Berechnung der betrieblichen Therapiehäufigkeit von Antibiotika erforderlich sind. Jedoch gelten nach § 2 der Tierarzneimittel-Mitteilungendurchführungsverordnung, kurz TAMMitDurchfV, Ausnahmen dieser Meldepflicht für Kleinbestände, so z. B. für Betriebe die durchschnittlich pro Kalenderhalbjahr nicht mehr als 250 zur Mast bestimmte Schweine halten. Die Therapiehäufigkeit dient als Kenngröße zur Beschreibung des Antibiotikaeinsatzes in landwirtschaftlichen Betrieben und gibt an, „an wie vielen Tagen ein Tier im Bestand im Durchschnitt mit einem Wirkstoff behandelt wird, d. h. wie viele Einzelgaben ein Tier im Bestand im Durchschnitt erhält“ (Van Rennings et al. 2013).

Insofern die Therapiehäufigkeit einzelner Betriebe höher liegt als die im bundesweit erhobenen Kennzahlen 1 bzw. 2 zur Therapiehäufigkeit, müssen vom Tierhalter in Zusammenarbeit mit seinem Tierarzt die Ursachen hierfür ermittelt und Maßnahmen ergriffen bzw. dokumentiert werden, die zur Reduktion der Antibiotikaverwendung führen (§§ 58c und 58d AMG). Darunter fallen z. B. Impfungen oder die Beachtung von allgemein anerkannten Leitlinien über die Anwendung von Arzneimitteln, die antibakteriell wirksame Mittel oder Teile davon enthalten. In § 58d AMG wird des Weiteren geregelt, dass die zuständige Behörde bei Betrieben im Falle einer Überschreitung der bundesweiten Kennzahlen konkrete Maßnahmen zur Verbesserung der Hygiene, Gesundheitsvorsorge oder sonstiger Haltungsbedingungen anordnen kann, wenn sich dies positiv auf die Reduzierung des Antibiotikaeinsatzes auswirkt – im Extremfall wäre hier das Ruhenlassen der Tierhaltung denkbar.

Das im Jahr 1995 von der dänischen Regierung eingeführte Monitoringprogramm DANMAP (Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme) zeigt, welche Erfolge sich durch gezielte staatliche Maßnahmen im Kampf gegen die Entstehung von Antibiotikaresistenzen erzielen lassen: Während die Anzahl der produzierten Schweine von knapp über 20 Millionen im Jahr 1995 bis auf ca. 30 Millionen in 2011 kontinuierlich stieg, ging im gleichen Zeitraum der Einsatz von Antibiotika pro kg produzierten Fleisches um 60 % zurück, ohne dass dies Auswirkungen auf die Produktivität, die Wurfgröße oder die täglichen Gewichtszunahmen gehabt hätte (Aarestrup et al. 2010, Aarestrup 2012).

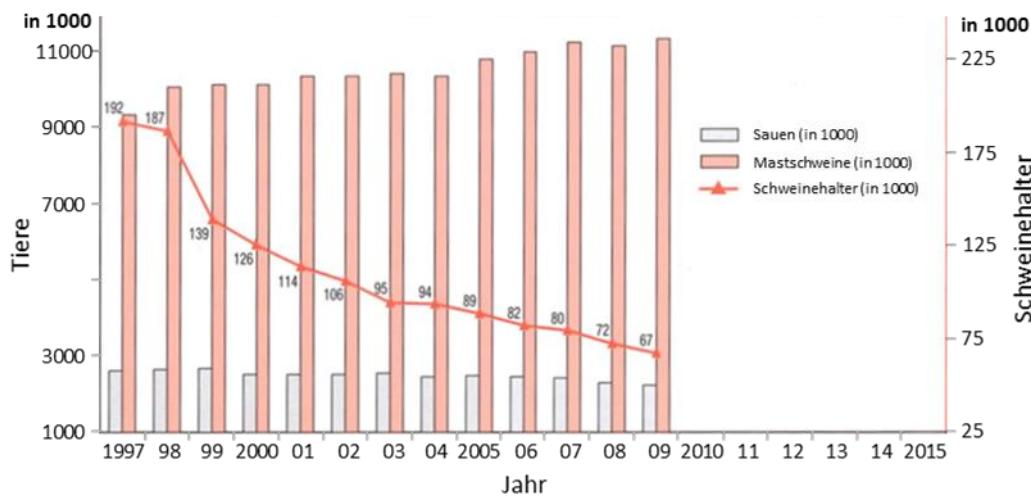
### 3 Schweineproduktion und -haltung in Deutschland (Bayern)

#### 3.1 Zahlen und Fakten

Zwischen den Jahren 1990 und 2009 stieg der durchschnittliche Fleischkonsum weltweit um fast 60 % an, die Food and Agriculture Organization der Vereinten Nationen (FAO) beziffert die jährliche Produktion von Fleisch mit 308,2 Millionen t, wovon der größte Anteil (114,2 Millionen t) auf die Tierart Schwein entfiel (Anonymous 2014, Henchion et al. 2014). Hierzulande gilt Ähnliches: Die Fleischproduktion stellt, wirtschaftlich gesehen, nach der Milchproduktion den zweitwichtigsten Zweig der tierisch erzeugten Produkte dar (Anonymous 2013). Mit derzeit jährlich um die 59 Millionen geschlachteten Schweinen aus dem In- und Ausland – davon entfielen im Jahr 2014 nach Angaben des Bayerischen Staatsministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten (StMELF) 5,09 Millionen Schlachtungen auf den Freistaat Bayern – belegt Deutschland nach Angaben der Agrarmarkt Informations-GmbH im europäischen Vergleich in dieser Kategorie die Spaltenposition (<https://www.destatis.de><sup>4</sup>, letzter Zugriff am 30.09.2015). Obwohl seit 1997 die Anzahl der gewerblich gehaltenen Mastschweinen in Deutschland insgesamt (bei etwa gleichbleibender Zahl an Sauen) nahezu konstant anstieg, kam es zu einer entgegengesetzten Entwicklung bei der Zahl der Schweinehaltungsbetriebe, wie Abbildung 7 verdeutlicht: Während es im Jahr 1997 noch 192.000 Betrieben waren, ging die Zahl bis zum Jahr 2009 auf 67.000 zurück, was gleichbedeutend mit einem enormen Anstieg der pro Betrieb gehaltenen Mastschweine ist. Nach Angaben des Statistischen Bundesamtes, das halbjährlich eine Viehbestandserhebung in Deutschland durchführt, setzt sich dieser Trend aktuell fort: Zum 3. Mai 2014 wurden in Deutschland durchschnittlich 1.087 Schweine insgesamt bzw. 469 Mastschweine mit mindestens 50 kg Lebendgewicht pro Betrieb gehalten (<https://www.destatis.de><sup>5</sup>, letzter Zugriff am 30.09.2015).

<sup>4</sup> <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/Wirtschaftsbereiche/LandForstwirtschaftFischerei/TierundtierischeErzeugung/Tabellen/AnzahlSchlachtungen.html>

<sup>5</sup> <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/Wirtschaftsbereiche/LandForstwirtschaftFischerei/TierundtierischeErzeugung/Tabellen/BetriebeSchweineBestand.html>



**Abbildung 7: Entwicklung der Anzahl an Schweinehaltungsbetrieben in Deutschland, verglichen mit der Anzahl gehaltener Mastschweine und Sauen (1997 - 2009), modifiziert nach Anonymous (2013)**

Trotz steigender Nachfrage und dem Wunsch der Verbraucher nach ökologisch erzeugten Produkten denen eine artgerechte Tierhaltung zugrunde liegt, stellt Bio-Schweinefleisch, nicht zuletzt aufgrund höherer Produktionskosten und Ladenpreise, nach wie vor ein Nischenprodukt dar (Löser et al. 2004, Werner et al. 2008). Im Jahr 2011 betrug die Zahl der aus Biohaltung stammenden Schweine laut Agrarmarkt Informations-GmbH in Deutschland nur 0,7 %; in anderen europäischen Ländern lagen die Werte für das Jahr 2006 zwischen 0,13 % (Finnland) und 1,63 % (Österreich) ebenfalls in sehr niedrigen Bereichen (Früh et al. 2011). Löser et al. (2004) bezifferten die durchschnittliche Größe der von ihnen untersuchten ökologischen Schweinehaltungsbetriebe ( $n = 73$ ) mit 125 Mastplätzen, wobei auf wenige große Mäster in Mecklenburg-Vorpommern viele kleine Mäster in Süddeutschland kamen. Ähnlich umfangreiche, deutschlandweite Vergleichsstudien zur ökologischen Schweinehaltung fehlen bisher, jedoch ist davon auszugehen, dass Betriebe dieser Produktionsrichtung nach wie vor eher kleinstrukturiert sind.

Der bayerische Anteil am gesamtdeutschen Schweinebestand beträgt laut StMELF derzeit rund 12 %; alleine im zweiten Halbjahr 2014 wurden in Bayern 81.500 Mastschweine mehr gehalten als noch in der ersten Jahreshälfte. 2014 wurden in Bayern rund 642.000 t Schweinefleisch erzeugt: Bei einem durchschnittlichen Schweinefleischverbrauch von 53 kg je Einwohner entspricht dies einem Selbstversorgungsgrad von 96 % und verdeutlicht den hohen

Stellenwert der Schweinehaltung in Bayern (<http://www.stmelf.bayern.de><sup>6</sup>, letzter Zugriff am 30.09.2015).

### **3.2 Konsequenzen der Intensivierung in der Schweinehaltung für Tier, Mensch und Umwelt**

Die oben angesprochene, zunehmende Intensivierung der Schweinemasthaltung in den vergangenen 20 Jahren kann das Auftreten von Krankheiten begünstigen (dies inkludiert vorwiegend Krankheiten des Respirationstraktes, des Herz-Kreislaufapparates, des Bewegungsapparates sowie Verhaltensstörungen), was wiederum verzögerte Gewichtszunahmen, verstärkte Anwendung von Arzneimitteln, dadurch höhere Behandlungskosten durch den Tierarzt bedeutet und letztlich wirtschaftliche Verluste nach sich ziehen kann (Albrecht et al. 1999, Littmann et al. 2000, Brambilla et al. 2004, Ilea 2009). So bedingen zu große Tiergruppen respektive ein zu geringes Platzangebot ein erhöhtes Risiko von Verletzungen und Krankheiten (Salak-Johnson et al. 2007, Street et al. 2008). Zu den bedeutendsten Bestandsproblemen in der Schweinemast zählen Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes (Littmann et al. 2000).

Damit einher geht ein beträchtlicher Antibiotikaeinsatz: In der „VetCAB-Pilot“-Studie wurde 2011 ermittelt, dass von allen eingesetzten antibiotischen Wirkstoffen bei den Nutztierarten Rind, Schwein und Geflügel mengenmäßig knapp 80 % auf den Einsatz beim Schwein entfallen; dies verdeutlicht, dass der Einsatz von Antibiotika in der Schweinehaltung einen besonders hohen Stellenwert besitzt (Van Rennings et al. 2013). Neben der Selektion resistenter Bakterien im Körper der Tiere birgt dieser Sachverhalt auch noch eine Gefahr für die Umwelt von Schweinehaltenden Betrieben: Beispiele aus der Literatur zeigen, dass ein Großteil der bei der Behandlung von Nutztieren eingesetzten Antibiotika unverändert bzw. als Metaboliten mit dem Kot und Urin ausgeschieden wird (Elmund et al. 1971, Feinman 1978, Alcock et al. 1999, Sarmah et al. 2006). Werden diese Ausscheidungen als wirtschaftseigene Düngemittel über Gülle oder Mist in die Umwelt ausgebracht, können antibiotikaresistente Bakterien in die Umwelt eingetragen werden (Feuerpfeil et al. 1999). Weitere Aspekte zu dieser Problematik finden sich in Kapitel 2.2.

Dass der Einsatz von Antibiotika in der Schweinehaltung auch unmittelbare

---

<sup>6</sup> <http://www.stmelf.bayern.de/landwirtschaft/tier/000878/index.php>

Konsequenzen für den Menschen haben kann, zeigt eine epidemiologische Studie von Hummel et. al.: Ab Anfang der 1980er Jahre wurde in der Deutschen Demokratischen Republik das Antibiotikum Nourseothricin, ein Streptothricin-Antibiotikum, ausschließlich beim Schwein zu Zwecken der Wachstumsförderung eingesetzt (Bradler et al. 1963, Hummel et al. 1986). Während es bis dahin nur vereinzelte Nachweise zu Streptothricin-resistenten *E. coli*-Stämmen gegeben hatte, tauchten ab 1984 plötzlich in *E. coli*-Isolaten aus mit Nourseothricin behandelten Tieren Plasmide auf, die Resistenzen gegen genau diesen Wirkstoff vermittelten (Tschäpe et al. 1984, Witte et al. 1984). Die gleiche Plasmid-vermittelte Resistenz wiesen Hummel et al. (1986) danach auch in *E. coli*-Isolaten der Angestellten dieser Schweinehaltungsbetriebe sowie in Isolaten ihrer Familienmitglieder nach. In gesunden Personen, die zwar keinen direkten Kontakt zu den Schweinen hatten, jedoch in der gleichen Region, in der sich die Betriebe befanden, lebten, trugen noch 16 % der Isolate das entsprechende Plasmid. In der Literatur lassen sich einige weitere Belege für die Besiedlung von *E. coli*-Isolaten tierischen Ursprungs beim Menschen finden (Linton et al. 1977, Marshall et al. 1990). Andere Veröffentlichungen zeigen, dass es, wie im Falle des Tetrazyklinresistenzgens *tet(W)*, durch horizontalen Gentransfer zum Austausch von Resistenzgenen zwischen tierischer und menschlicher Darm-Mikrobiota kommen kann (Barbosa et al. 1999, Kazimierczak et al. 2006). Auch lassen sich Fallberichte finden, in denen ein direkter Zusammenhang zwischen Resistenzen in Nutztieren sowie klinischen Infektionen beim Menschen hergestellt wird, wie das Beispiel von zwei an Endocarditis leidenden Patienten aus Dänemark zeigt, aus denen Gentamicin-resistente *Enterococcus faecalis* porcinen Ursprungs isoliert wurden (Larsen et al. 2010). Abbildung 8 gibt einen Überblick über verschiedene potenzielle Übertragungsmöglichkeiten von bakteriellen Resistenzen, wobei als Grundlage ein Informationsblatt der Federation of Veterinarians of Europe (FVE) diente (<http://www.fve.org><sup>7</sup>, letzter Zugriff am 30.09.2015).

---

<sup>7</sup> <http://www.fve.org/news/publications/pdf/antibioen.pdf>

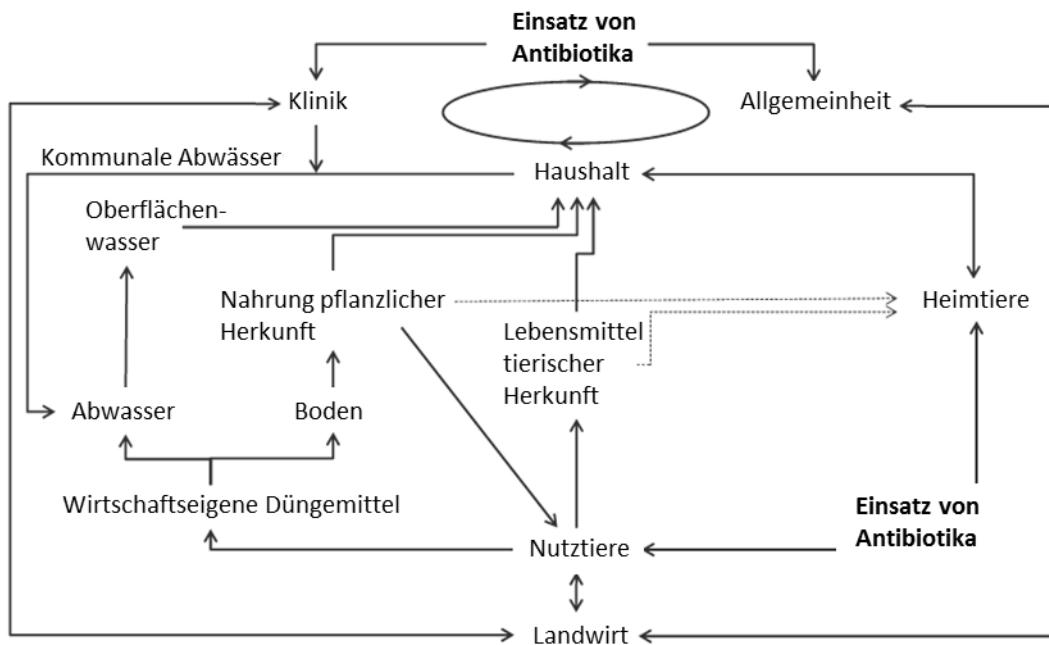


Abbildung 8: Potenzielle Übertragungswege von bakteriellen Resistzenzen (modifiziert nach <http://www.fve.org/news/publications/pdf/antibioen.pdf>, letzter Zugriff am 30.09.2015)

Zusammenfassend scheint also klar, dass sich nicht nur antibiotikaresistente Bakterienstämme ausbreiten, sondern auch, dass ein Transfer von Resistenzgenen zwischen Bakterien vom Tier und vom Menschen stattfindet (van den Bogaard et al. 2000). Allerdings ist die quantitative Einordnung dieses Phänomens und insbesondere seiner Bedeutung für ein eventuelles Therapieversagen in der Humanmedizin bei weitem nicht abgeschlossen.

## 4 *Escherichia coli*

## 4.1 Allgemeines und Taxonomie

Die Erstbeschreibung von *Bacterium coli commune* erfolgte durch den deutschen Kinderarzt Theodor Escherich, der diese Bakterienspezies aus dem Stuhl von Säuglingen isolierte (Escherich 1886). 1919 wurde ihm zu Ehren der Name *Escherichia coli*, kurz *E. coli*, eingeführt (Bülte et al. 2014).

Die im Folgenden beschriebene taxonomische Einordnung wurde anhand der am Ende des Absatzes angegebenen Referenzen vorgenommen: *E. coli* gehört zur Gattung *Escherichia*, die zusammen mit anderen Genera, beispielsweise *Edwardsiella*, *Shigella*, *Salmonella* und *Citrobacter* der Familie der

Enterobacteriaceae zugeordnet wird, wobei sich dieser Name vom Wort *enteron* (altgriechisch ἔντερον, Darm) ableitet, da die meisten Vertreter dieser Familie Darmbewohner sind. Systematisch handelt es sich bei den Enterobacteriaceae um die einzige Familie der Ordnung Enterobacterales, die wiederum der Klasse der Gammaproteobacteria zugeordnet werden. Letztere unterscheiden sich von den Alpha-, Beta- und Delta- und Epsilonproteobacteria in der Zusammensetzung ihrer ribosomalen Einheit und bilden zusammengenommen mit diesen die Abteilung der Proteobacteria. Die Proteobacteria repräsentieren die größte phylogenetische Gruppe innerhalb der Domäne der Bacteria. (Garrity et al. 2007, Cullimore 2010). Abbildung 9 fasst die Systematik von *E. coli* zusammen.

Domäne: Bacteria

Abteilung: Proteobacteria

Klasse: Gammaproteobacteria

Ordnung: Enterobacterales

Familie: Enterobacteriaceae

Gattung: *Escherichia*

Art: *Escherichia coli*

#### **Abbildung 9: Systematische Einordnung von *Escherichia coli***

Bei *E. coli* handelt es sich um Gram-negative, fakultativ anaerobe, sporenlose, Oxidase-negative, Katalase-positive, stäbchenförmige Bakterien von ca. 1,1 - 1,5 µm x 2,0 – 6,0 µm (Breite x Länge) Größe, deren natürliches Habitat der Dickdarm des Menschen und warmblütiger Tiere ist, mit den bekanntesten Ausnahmen von Meerschweinchen und Chinchilla (Berger et al. 1994, Dahme et al. 2007). Auch bei den meisten Vögeln, mit gewissen Ausnahmen bei den Psittaciden, finden sich Stämme dieser Spezies (Bülte et al. 2014). Es existieren begeißelte und damit bewegliche Stämme, ebenso wie unbewegliche. Des Weiteren kann häufig eine Kapselbildung beobachtet werden. Mit einem Wachstumsoptimum von 37 °C wird *E. coli* der Klasse der mesophilen Bakterien zugerechnet (Berger et al. 1994). Eine Einteilung in verschiedene Serovare ergibt sich gemäß dem modifizierten Kaufmann-Schema anhand ihrer 186 Oberflächen (O)-, ca. 100 Kapsel (K)- und 56 Geißel (H)-Antigenen (Ørskov et al. 1984, Gyles 2007).

## 4.2 *E. coli* als Markerorganismus

Mit Keimzahlen von  $10^4$  –  $10^9$  KbE/g Faeces stellen *E. coli*-Stämme bei Eubiose maximal 1 % der Darmflora und werden somit der Begleitflora zugeordnet (Bülte et al. 2014). Mossel prägte den Begriff des „Markerorganismus“, der die beiden Funktionen „Index“ und „Indikator“ aufweisen kann, wobei „Indexorganismen“ direkt oder indirekt entweder mit der Gefährdung der Gesundheit oder mit der Anwesenheit der Krankheitserreger in Verbindung stehen und „Indikatororganismen“ auf mögliche Verunreinigungen, ineffiziente Behandlung eines Lebensmittels oder ungenügende Desinfektion des Wassers hinweisen (Mossel 1983). *E. coli* fungiert außerhalb des Magen-Darm-Traktes somit einerseits als Indikatororganismus, der unzureichende Hygiene bei der Gewinnung, Verarbeitung und Distribution von Lebensmitteln anzeigt. Gleichzeitig erfüllt *E. coli* aber auch eine Indexfunktion: Sein Auftreten kann bei einem Nachweis in Lebensmitteln eine fäkale Kontamination anzeigen und damit als Hinweis auf das mögliche Vorhandensein von gesundheitlich bedenklichen Stämmen der eigenen Spezies gewertet werden – gleichzeitig aber aufgrund der gleichen ökologischen Herkunft auch auf die Anwesenheit anderer intestinal vorkommender, gesundheitlich bedenklicher Mikroorganismen wie beispielsweise Salmonellen, Shigellen, Yersinien und *Campylobacter* spp. hindeuten (Bülte et al. 2014).

## 4.3 *E. coli* als Krankheitserreger

### 4.3.1 *E. coli*-Erkrankungen beim Menschen

Neben ihrer Rolle als Darm-Kommensalen können einige *E. coli*-Stämme auch als fakultativ pathogene Krankheitserreger in Erscheinung treten, beispielsweise bei Immunsuppression des Wirtes oder bei Störungen der normalen gastrointestinalen Barriere-Funktion (Kaper et al. 2004). So kommt es unter bestimmten Umständen neben Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes auch zu extraintestinalen Infektionen der Harnwege sowie zu septikämischen Erkrankungen und Meningitiden (Nataro et al. 1998).

Daneben existieren jedoch auch obligat pathogene *E. coli*-Stämme, die sich anhand ihrer unterschiedlichen Virulenzprofile (Toxine und Adhäsionsfaktoren) und der damit einhergehenden klinischen Symptomatik in unterschiedliche „Pathogruppen“ unterteilen lassen, und denen eine wichtige Rolle als

Infektionserreger in Human- und Veterinärmedizin sowie im Lebensmittelbereich zukommt (Bülte et al. 2014). Nach Angaben des Robert Koch-Instituts (RKI) lag im Jahr 2013 die Zahl der Neuerkrankungen beim Menschen in der Meldekategorie „darmpathogene *E. coli*“ bei 7.838 Fällen und damit höher als in allen Vorjahren seit 2001 (RKI 2014). Eine übliche Form der Klassifizierung geht auf Nataro und Kaper zurück und teilt pathogene Stämme anhand ihrer Virulenzfaktoren in enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC), enteropathogene *E. coli* (EPEC), enterotoxische *E. coli* (ETEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC) ein (Nataro et al. 1998). Auch werden in der Literatur Shiga-Toxin-bildende *E. coli* (STEC),nekrotoxische *E. coli* (NTEC), diffus adhärente *E. coli* (DAEC) und uropathogene *E. coli* (UPEC) genannt (Selbitz et al. 2010). Von veterinärmedizinischer Bedeutung sind in erster Linie ETEC, da sie bei verschiedenen Tierarten für die Neugeborenendiarrhoe verantwortlich zeichnen (s. Abschnitt 4.3.2). Generell besitzen EHEC-Stämme, wie sie von Rindern häufig symptomlos ausgeschieden werden, zoonotisches Potential für den Menschen (Selbitz et al. 2010). Auch Übertragungen durch pflanzliche Lebensmittel sind bekannt: Als Beispiel für die gesellschaftliche Relevanz von EHEC sei angeführt, dass es im Frühsommer 2011 in Deutschland zu einem gehäuften Auftreten von Erkrankungsfällen ( $n > 4000$ ) mit dem hämolytisch-urämischen Syndrom (HUS) und blutigen Durchfällen kam, die im Zusammenhang mit einer Infektion durch den *E. coli*-Serotyp O104:H4 standen, ausgelöst durch mit Keimen belastete Bockshornkleesamen aus Ägypten (BfR 2011). Durch nachfolgende Genom-Sequenzierungen wurde der entsprechende Erreger als enteroaggregativer hämorrhagischer *E. coli* (EAHEC) eingestuft (Mellmann et al. 2011, Bülte et al. 2014).

Ein Großteil der determinierenden Virulenzgene ist in Pathogenitätsinseln im Chromosom und / oder auf Plasmiden organisiert (Nataro et al. 1998). Das Beispiel des *E. coli*-Serovars O104:H4 sowie Erkenntnisse aus der Literatur lassen den Schluss zu, dass durch Genaustausch mobiler Elemente auch in Zukunft mit der Entstehung neuer Pathovarietäten zu rechnen sein wird (Escobar-Páramo et al. 2004).

#### **4.3.2 *E. coli*-Erkrankungen beim Schwein**

Vorab sei erwähnt, dass beim Überblick über die nachfolgenden Krankheitsbilder bewusst auf detaillierte Angaben zu Ätiologie, Pathogenese, klinischem Bild,

Diagnostik sowie Therapie und Prophylaxe verzichtet wurde, hier sei auf entsprechende Fachliteratur verwiesen.

Fasst man alle Durchfallerkrankungen, an denen *E. coli* beteiligt ist, unter dem Begriff „Kolienteritis“ (Synonym: Koliruhr) zusammen, entsteht ein Krankheitskomplex, der weltweit für ca. 50 % der Todesfälle von Saug- und Absatzferkeln verantwortlich zeichnet (Waldmann et al. 2004). Wie bereits angedeutet kommt enterotoxischen *E. coli*-Stämmen (ETEC) als Erreger der Neugeborendiarrhoe eine übergeordnete Bedeutung zu, jedoch können Ferkel auch in der dritten bis vierten Lebenswoche sowie nach dem Absetzen erkranken (Eich et al. 1998). Infektionsquellen sind meist feuchte, kotverschmutzte Liegeflächen und Tränken und lassen sich auf Mängel in der Stallhygiene zurückführen (Waldmann et al. 2004).

Bei Absatzferkeln kann die Koliruhr auch vergesellschaftet mit der Kolienterotoxämie (Ödemkrankheit) auftreten. Während die Morbidität dieses Krankheitsbilds niedrig ist, kann die Letalitätsrate nach Literaturangaben bis zu 90 % betragen (Sojka 1965).

Weitere *E. coli*-Infektionen beim Schwein entstehen häufig fakultativ: Fehlerhafte Haltungsbedingungen, wie zu hohe Besatzdichte, mangelhaftes Fütterungsregime oder ein Mangel an Beschäftigungsmaterial, begünstigen die Problematik des Schwanzbeißens, infolgedessen es wiederum häufig zur Besiedlung offener Wunden durch *E. coli*-Stämme aus der Umgebung kommt. Da *E. coli* in feuchtem Milieu eine hohe Tenazität aufweisen, ist unter anderem eine gute Stallhygiene ein wichtiger Faktor im Hinblick auf die Vermeidung von verkomplizierenden Infektionen, bei denen *E. coli* als fakultativ pathogener Erreger auftritt (Kastrationswunden, Polyarthritis bei Saugferkeln, Infektionen des Harn- und Genitaltraktes) (Waldmann et al. 2004).

Aszendierende Infektionen der Blase während Geburt oder Puerperium können die Genese des Mastitis-Metritis-Agalaktie-Syndroms (MMA-Syndrom) bei Sauen begünstigen, ebenso können sich *E. coli* und andere Enterobakterien intrauterin oder auf galaktogenem Weg manifestieren und so zu den typischen Symptomen (keine Milchsekretion innerhalb von 24 bis 48 Stunden post partum, Fieber, gestörtes Allgemeinbefinden, Mastitis, Scheidenausfluss) dieses Krankheitskomplexes führen (Selbitz et al. 2010).

## III MATERIAL UND METHODEN

### 1 Material

#### 1.1 Arbeitsmaterial

##### 1.1.1 Technische Geräte

Analysenwaagen	Sartorius, Research und LC4200
Brutschrank	Memmert, U40 und 500
Bunsenbrenner	Usbeck, 1040/1 Nr.92.03c451
Elektrophoresekammer	Peqlab 40-1214
Flockeis-Automat	Scotsman, AF80
Gefrierschrank –70 °C	Heraeus, Hera freeze
Gefriertruhe –20 °C	Bosch, automatic
Horizontalschüttler	Heidolph Titramax 1000
Kolonienzählgerät	Schütt Labortechnik, 30808002
Kühlschrank	Privileg, Öko Energiesparer
Laborschüttler	Scientific Industries, Vortex-Genie 2, SI-0256; IKA-Labortechnik, KS 250
LightCycler® 480 Instrument II	Roche, 5015278001
Magnetrührer	Heidolph, MR3001K
MALDI-TOF Massenspektrometer	Bruker Microflex™ LT
Micronaut® Sprint	Merlin Diagnostic, ST-6001-001
Mikrowelle	Alaska
Mikrozentrifuge	Hettich Zentrifugen, 2;
NanoDrop®	Eppendorf, MiniSpin
Photometer	VWR Galaxy 16 DH
Spannungsgerät für	Peqlab, ND-1000
Gelelektrophorese	Shimadzu Corporation, Typ UV 1202
Sterilbank	BIO-RAD, Power Pac Junior
Thermocycler T3000	Antair BSK (Typ BSK/6)
Thermomixer	Biometra, 050-724
UV-Geldokumentation	Eppendorf, Comfort 535502652
	Intas Science Imaging Instruments

UV-Gerät	Vilber Loumart, CN-UV/WL 983506
Waage	Ohaus, PRO SPU402
Zentrifuge	Heraeus, Biogue 28RS 1800 94
	Hearaeus, Megafuge 1.0R Sepatech
	Hermle Labortechnik, Hermle Z 383;
	Hettich Zentrifugen, Rotanta 460R

### 1.1.2 Gebrauchsmaterial

Aufbewahrungsboxen	VWR, 479-0310
Becherglas, 10 ml	Fisher Scientific, 11942213
Bunsenbrenner	Usbeck, Typ 1040/1
Drigalski-Spatel, Glas	VWR, 231-2183
Erlenmeyerkolben, 50 ml	Fisher Scientific, 11912233
Finnpipette 1-5 ml	Labsystems, 000662 4500
Gestell für Reaktionsgefäße	VWR, 700-2832
Glaspipette, 10 ml	Brand, 27077
Henkellocheisen Ø 20 mm	
IsoFreeze PCR-Rack	Kisker Biotech, KR-96 imd KR-20W
Kämme für Gelelektrophorese	Peqlab, 40-1214-24D
Kühl-Akku	Real
McFarland Standard	bioMérieux, SA 818531501
Mehrkanal-Pipette	Transferpette® S-8 30 – 300 µl
Metalllöffel	
Metallösen	
Metallspatel	
MSP 96 ground steel target	Bruker, 224990
PerfectBlue™ Gelsystem Mini L	Peqlab, 40-1214
für Gelelektrophorese	
Pipette Eppendorf Research 10 µl	VWR, 613-3588
Pipette Eppendorf Research 100 µl	VWR, 613-3588
Pipette Eppendorf Research 1000 µl	VWR, 613-3587
Pipettus accu-jet®	Brand, 26300
Reagenzglashalter	VWR, 212-6122
Reagenzgläser steril	Schott Duran, 212-1116
Schlachtmesser, 16 cm Klingenlänge	Giesser, 4025-16

Skalpellgriff	Vedena, CV 105-004
Vortex-Adapter	MO BIO, 13000-V1-15
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik (GFL)

### 1.1.3 Verbrauchsmaterial

1-Kanal-Reservoirs	Sekisui Virotech, M/R-4-510-350
Abdeckfolie	Merlin, B4-003-100
Allzweckbeutel (1 l, 3 l, 6 l)	Rossmann
Baktolin Waschlotion	Bode, 974122
BBL <sup>TM</sup> Crystal <sup>TM</sup> Enteric/Nonfermenter	Becton Dickinson, 245000
ID Kit	
Bindfaden	Real
Cryoboxen	Wagner und Munz, 301001WE-1
Cryoröhrchen	VWR, 479-0821
DNAExitusPlus IF <sup>TM</sup>	Applichem, A7409
Einmalösen	VWR, 631-2211
Einsätze für Cryoboxen	Wagner und Munz. 302019-30
Einwegösen	VWR 612-9354
Einweg-Overall Proshield 10	DuPont, S10 CHF5S WU 00
Filterpapier	
Finntips 1-5 ml	VWR, 612H6391
GenElute <sup>TM</sup> PCR Clean Up Kit	Sigma-Aldrich, NA 1020-1KT
Kotröhrchen	Henry Schein, 760-466
Latexhandschuhe	Blossom, BM 12226-PF-VE
LightCycler <sup>®</sup> 480 96-well-Platten	Roche, 4729692001
LightCycler <sup>®</sup> 480 Abdeckfolie	Roche, 04729757001
Multiply <sup>®</sup> $\mu$ -Strips	Sarstedt 72.991.002
Müllsäcke, 120 l	Real
Nitrilhandschuhe	Kimberly-Clark, 52001M
Objektträger mit Matrand	Henry Schein, 9002573
Petrischalen, 92 x 16 mm	Sarstedt, 82.1472
Pipettenspitzen für Mikronaut Sprint	Sekisui Virotech, M/ST3-001-500
Pipettenspitzen mit Filter 10 $\mu$ l	Sarstedt, 70.1115.410
Pipettenspitzen mit Filter 100 $\mu$ l	Sarstedt, 70.760.412
Pipettenspitzen mit Filter 1000 $\mu$ l	Sarstedt, 70.762.411

Polypropylenrörchen 15 ml	Greiner Bio One, 188271
Polypropylenrörchen 50 ml	Greiner Bio One, 227261
PowerSoil®-DNA Isolation Kit	MO BIO, 12888-100
Probenbecher PP, 160 ml	Semadeni, 4438
QIAquick Gel Extraction Kit	Quiagen, 28704
Resistenztest-Panels	Sekisui Virotech, M/ES-LGL-GNP
	Sekisui Virotech, M/ES-LGL-GN
Multiply® Pro Tube 0,5 ml	Sarstedt, 72.735.002
Safe Seal MicoTube 1,5 ml	Sarstedt, 72.706.400
Safe Seal MicoTube 2,0 ml	Sarstedt, 72.695.400
Safe Sept Hautdesinfektion Pumpspray	Henry Schein, 9006271
Skalpellklingen, Größe 21	Braun, 8112301
Viehmarkierstift	MS Schippers, 304397
Wattestäbchen, steril	VWR, 1158270
Weithalsflaschen, 1 l	VWR, 215-5634
Zahnstocher	Real

#### 1.1.4 Nährböden

##### Blutagar

60 g Blutagar-Basis Nr. 2	Oxoid, CM271
100 ml defibriniertes Schafblut	Fiebig, 1000100
1,5 l dest. H <sub>2</sub> O	

##### CHROMagar™ ESBL Fertigplatten

Mast Diagnostica, 201470

##### Fluorocult ECD-Agar

53,1 g Fluorocult ECD-Agar	Merck, 1.04038
1 l dest. H <sub>2</sub> O	

##### Gassner-Agar

77 g Gassner-Agar	Merck, 1.01282
1 l dest. H <sub>2</sub> O	

##### Platecountagar (Normalagar)

60 g Blutagar-Basis Nr.2	Oxoid, CM271
1,5 l dest. H <sub>2</sub> O	

### 1.1.5 Flüssige Nährmedien

#### Müller-Hinton-II-Bouillon (kationen-adjustiert) (CAMHB)

22 g Müller-Hinton-II-Broth Becton Dickinson, 212322  
1 l dest. H<sub>2</sub>O

#### Nutrient Broth für Cryokonservierung

12,5 g Nutrient Broth No. 2 Oxoid, CM67  
75 g Glycerol (15 %) Applichem, A3552  
500 ml bidest. H<sub>2</sub>O

#### Standard-I-Nährbouillon

25 g Standard-I-Nährboullion Merck, 1.07882  
1 l dest. H<sub>2</sub>O

### 1.1.6 Lösungen

#### Chelex® 100 (5 %ig)

50 g Chelex® 100 Sigma-Aldrich, C7901  
1 l bidest H<sub>2</sub>O

#### Ladepuffer für Agaorsegelektrophorese

3 g Ficoll 400 Merck, 341691  
1 ml Na<sub>2</sub>EDTA pH 8 (0,5 M) Merck, 1.08454  
0,25 ml Bromphenolblau (4%) Merck, 1.08122  
10 ml dest. H<sub>2</sub>O

#### NaCl-Lösung, gepuffert

7,65 g NaCl Merck, 1.06400  
0,724 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> Merck, 1.06586  
0,21 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> Merck, 1.04873  
1 l dest. H<sub>2</sub>O

#### NaCl-Lösung, 0,9 %

9 g NaCl Merck, 1.06400  
1 l dest. H<sub>2</sub>O

#### Phosphate buffered saline-Lösung (PBS)

9,55 g PBS-Puffer Applichem, A0964,9050  
1 l dest. H<sub>2</sub>O

**TBE-Puffer (10x)**

108 g Tris(hydroxymethyl)- aminomethan (Tris)	Applichem, A1379
55 g Borsäure	Applichem, A3581
40 ml Na <sub>2</sub> EDTA pH 8 (0,5 M)	Applichem, A3234
960 ml dest. H <sub>2</sub> O	

**TE-Puffer**

1,21 g Tris(hydroxymethyl)- aminomethan (Tris)	Applichem, A1379
0,37 ml Na <sub>2</sub> EDTA pH 8 (0,5 M)	Applichem, A3234
1 l dest. H <sub>2</sub> O	

**TE-Puffer**

14 mg Zimtsäure	Sigma-Aldrich, 476870
500 µl Acetonitril	Fluka, 34967
25 µl Trifluoressigsäure	Fluka, 74564
475 µl dest. H <sub>2</sub> O	

**1.1.7 Chemikalien und Reagenzien**

100 Basenpaar (bp) DNA-Ladder (nach Herstellerangaben pro Ansatz)

1 µl DNA Ladder	New England Biolabs, N3231
1 µl 6x Gel Loading Dye, blue	New England Biolabs, N3231
4 µl Nuklease-freies H <sub>2</sub> O	Promega, P1193

Agarose

Genaxxon, M 3044.0500

Bacterial Test Standard

Bruker. 255343

Chelex® 100

Sigma-Aldrich, C7901

Desoxynukleotidtriphosphat

Quiagen, 201901

(dNTP)Mix [10 mM]

VWR, 1.00983.2511

Ethanol

Sigma, E8751

Ethidiumbromid

Hot Start Polymerase 5 U/µl

Hot Start Polymerase 5 U/µl

Quiagen, 203205

(inkl. PCR-Puffer [10x] und

MgCl<sub>2</sub> [25mM])

Glycerol

Applichem, A3552

Glycerol

GoTaq® Green Master Mix

Promega, M7123

---

Isopropanol	VWR, 1.09634.2511
Kovacs Indol-Reagenz	Merck, 1.09293
LightCycler® 480 SYBR Green I Master	Roche, 4887352001
Lysozym	Sigma-Aldrich, L6876
Nuklease-freies H <sub>2</sub> O	Promega, P1193
Oxidase-Reagenz	Sigma, T3134
Primer	Metabion
Proteinase K	Genaxxon, M3036
Salzsäure (HCl)	Merck, 1.09057

### 1.1.8 Software

GelCompar® II	Applied Maths
Intas GDS Version 3.01	Intas
LightCycler® 480 Instrument II,	Roche, 5015278001
Softwareversion 1.5.0 SP3	
MALDI Biotyper Software	Bruker
“R” Version 3.2.0	The R Foundation for Statistical Computing
SigmaPlot 12.0	Sigma

### 1.1.9 Primer

**Tabelle 2: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Primer sowie deren Sequenzen und Referenzangaben**

Nr.	Primer FW / RV	Zielgen	Sequenz (Richtung 5' - 3')	Referenz
1	adkF adkR	Adenylyl-Kinase	ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG CCGTCAACTTTCGCGTATT	<a href="http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/">http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/</a>
2	AMPC FW AMPC RV	Chromosomal kodiertes <i>ampC</i>	GATCGTTCTGCCGCTGTG GGGCAGCAAATGTGGAGCAA	(Corvec et al. 2007)
3	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> FW <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> RV	Konservierte <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> -Region	ATGTGCAGYACCAGTAARGT TGGGTRAARTARGTSACCAGA	(Pagani et al. 2003)
4	Com1 R789	16S-rRNA-Gene	CAGCAGCCGCGGTAATAC ATCCTGTTGMMTMCCCVCRC	(Schwieger et al. 1998) (Dorn-In et al. 2015)
5	ERIC 1 FW ERIC 2 RV	ERIC	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	(Versalovic et al. 1991) (Chia et al. 2005)
6	fumCF fumCR	Fumarat-Hydratase	TCACAGGTCGCCAGCGCTTC GTACGCAGCAGAAAAAGATT	<a href="http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/">http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/</a>
7	gyrBF gyrBR	DNA-Gyrase	TCGGCGACACGGATGACGGC ATCAGGCCTTCACGCGCATC	<a href="http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/">http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/</a>
8	icdF icdR	Isocitrat/Isopropylmalat-Dehydrogenase	ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGG CACA GGACGCAGCAGGATCTGTT	<a href="http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/">http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/</a>
9	mdhF mdhR	Malat-Dehydrogenase	ATGAAAGTCGCAGTCCTCGCGCTG CTGGCG TTAACGAACTCCTGCCAGAGCGA TATCTTCTT	<a href="http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/">http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/</a>
10	purAF purAR	Adenylosuccinat-Dehydrogenase	CGCGCTGATGAAAGAGATGA CATACGGTAAGGCCACGCAGA	<a href="http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/">http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/</a>
11	<i>qacE</i> 1 FW <i>qacE</i> 1 RV	<i>qacE</i> / <i>qacE</i> 1	CGCATTATTTCTCTGGTT CCCGACCAGACTGCATAAGC	(Jechalke et al. 2014)
12	<i>qacE</i> 1 FW <i>qacE</i> 1 RV	<i>qacE</i> 1	GGCTTACTAAGCTGCC AGCCCCATACCTACAAAGCC	(Bischoff et al. 2012)
13	recAF recAR	ATP/GTP-Bindungsstelle	CGCATTGCTTACCTGACC TCGTCGAAATCTACGGACCGGA	<a href="http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/">http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/</a>
14	<i>str</i> (A) FW <i>str</i> (A) RV	<i>str</i> (A)	CCTGGTGATAACGGCAATT CCAATCGCAGATAGAAGGC	(Lanz et al. 2003)
15	<i>str</i> (B) FW <i>str</i> (B) RV	<i>str</i> (B)	ATCGTAAGGGATTGAAACC GGATCGTAGAACATATTGGC	(Lanz et al. 2003)
16	<i>sul</i> (I) FW <i>sul</i> (I) RV	<i>sul</i> (I)	TTCGGCATTCTGAATCTCAC ATGATCTAACCTCGGTCTC	(Maynard et al. 2003)
17	<i>sul</i> (II) FW <i>sul</i> (II) RV	<i>sul</i> (II)	CGGCATCGTCAACATAACC GTGTGCGGATGAAGTCAG	(Maynard et al. 2003)
18	<i>tet</i> (A) FW <i>tet</i> (A) RV	<i>tet</i> (A)	GTGAAACCCAACATACCCCC GAAGGCAAGCAGGATGTAG	(Maynard et al. 2003)
19	<i>tet</i> (B) FW <i>tet</i> (B) RV	<i>tet</i> (B)	TACGTGAATTATTGCTTCGG ATACAGCATCAAAGCGCAC	(Aminov et al. 2002)

20	<i>tet(M)</i> FW <i>tet(M)</i> RV	<i>tet(M)</i>	ACAGAAAGCTTATTATATAAC TGGCGTGTCTATGATGTTCAC	(Aminov et al. 2001)
----	--------------------------------------	---------------	--	----------------------

### 1.1.10 Referenzstämme

**Tabelle 3: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Referenzstämme und ihrer Bezugsquellen**

Zielgen der Primer	Referenzstamm	Bezugsquelle
Chromosomal kodiertes <i>ampC</i>	<i>Escherichia coli</i> K12 Wildtyp DSM 498	Leibniz-Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	<i>Escherichia coli</i> GNS-2601	Nationales Referenzzentrum für Gram-negative Krankenhauserreger
ERIC	<i>Escherichia coli</i> A6-S20-1T8 Eco5	Diese Arbeit
<i>qacE</i> / <i>qacEΔ1</i>	<i>Escherichia coli</i> 1/05 Eco4-O-L	Lehrstuhl für Tierhygiene, TUM
<i>str(A)</i>	<i>Salmonella</i> Typhimurium DT120	B. Malorny; BfR
<i>str(B)</i>	<i>Salmonella</i> Typhimurium DT120	B. Malorny; BfR
<i>sul(I)</i>	<i>Salmonella</i> Typhimurium DT104	B. Malorny; BfR
<i>sul(II)</i>	<i>Salmonella</i> Typhimurium DT12	B. Malorny; BfR
<i>tet(A)</i>	<i>Salmonella</i> [4,5,12:i:-]	B. Malorny; BfR
<i>tet(B)</i> / 16S-rRNA-Gen	<i>Escherichia coli</i> 2638	C. Hölzel; Lehrstuhl für Tierhygiene
<i>tet(M)</i>	<i>Bacillus cereus</i> R89	Y. Agersø; Dänemark
Positivkontrolle (Mikrodilution)	<i>Escherichia coli</i> DSM 1103	Leibniz-Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

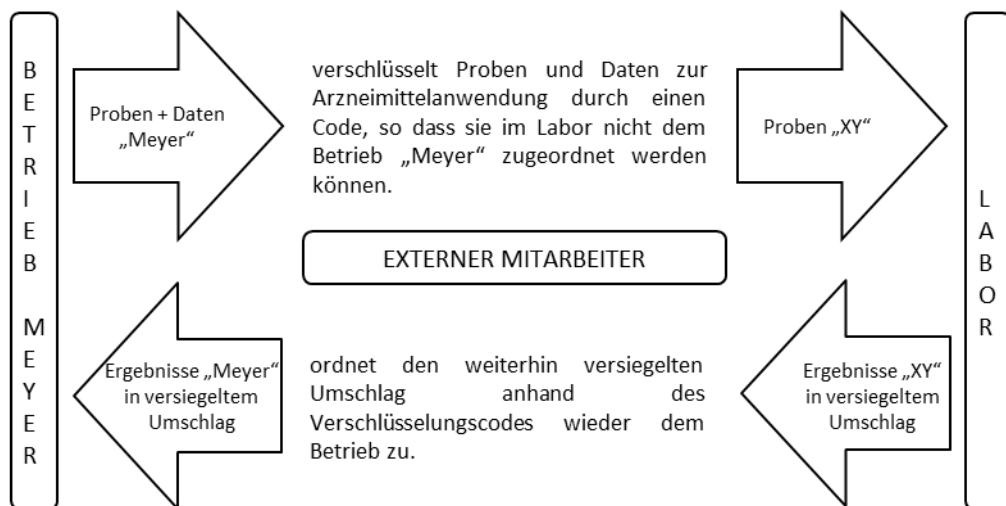
## 1.2 Probenmaterial

### 1.2.1 Allgemein

Das dieser Arbeit übergeordnete Forschungsprojekt „ABYS“ gliedert sich in die drei Module „Antibiotikaeinsatz“, „Ausscheidung“ und „Futtermittel“, wobei das Hauptaugenmerkt dieser Arbeit auf das Modul „Ausscheidung“ gerichtet ist. Als Untersuchungsmaterial dienten unterschiedliche Probenmatrices: Für den sog. „Screening“-Teil des Projektes wurden zwischen dem 05.03.2013 und dem 19.11.2014 Gülle-, Jauche- und Festmistproben von insgesamt 58 Schweinehaltungsbetrieben in Bayern gewonnen. Im sog. „Tracking“-Teil bestand das im Zeitraum vom 02.05.2013 bis zum 08.12.2014 gezogene Probenmaterial aus Faeces, Hals- und Bauchfleischstücken von Schweinen sowie Stuhlproben von Menschen von sechs unterschiedlichen exemplarisch ausgewählten Betrieben.

### 1.2.2 Datenschutz

Aus Gründen des Datenschutzes wurde ein Konzept zur Pseudonymisierung (vgl. Abbildung 10) der Betriebsdaten erstellt. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass vom Laborpersonal keine unmittelbaren Rückschlüsse auf einzelne Personen der teilnehmenden Betriebe gezogen werden konnten. Im Gegensatz zur Anonymisierung bleiben die Bezüge der erhobenen Datensätze hierbei durch Verwendung eines betriebsspezifischen Codes erhalten.



**Abbildung 10: Schema Proben- / Datenfluss am Beispiel des fiktiven Betriebs „Meyer“**

### 1.2.3 Struktur der untersuchten Betriebe

Insgesamt wurden 35 konventionelle und 23 ökologische Schweinehaltungen beprobt. Die Besatzzahl variierte zwischen 41 im kleinsten und 2800 Tieren im größten Betrieb. In 36 Betrieben wurden weniger als 1000, in 22 Betrieben mehr als 1000 Tiere gehalten. Hinsichtlich der Stallorganisation lag das Augenmerk der Studie auf Mast- und „Kombi“-Betrieben, die neben der Ferkelerzeugung auch Mast betreiben. En détail handelte es sich bei den teilnehmenden Betrieben um einen reinen Ferkelerzeuger, drei Ferkelerzeuger mit anschließender Aufzucht, 39 reine Mast- sowie 15 „Kombi“-Betriebe.

Die sechs „Tracking“-Betriebe – alle nahmen auch am „Screening“ teil – trugen die Betriebscodes A6, A21, E5, H18, J20 und M13, wobei es sich bei H18 und J20 um ökologische und bei den anderen um konventionelle Schweinehaltungsbetriebe handelte. Tabelle 4 liefert Hintergrundinformationen zu den einzelnen „Tracking“-Betrieben und ordnet die beprobt Personen ein.

**Tabelle 4: Hintergrundinformationen zur Betriebsstruktur der sechs „Tracking“-Betriebe**

Betrieb	Art der Haltung	Besatzzahl	Art der Produktion	Herkunft der Masttiere	Belegung	Mastdauer	Eingesetzte Antibiotika <sup>x</sup>	Tierbetreuende Person (P1)	Kontaktperson (P2)
A6	konventionell	500	Mast	Zukauf (eine Herkunft)	Rein-Raus	ca. 109 Tage	<b>Amoxicillin-Trihydrat, Colistinsulfat, Florfenicol, Tylosintartrat</b>	Landwirt	Ehefrau des Landwirtes
A21	konventionell	960	Mast	Zukauf (eine Herkunft)	Rein-Raus	ca. 115 Tage	<b>Colistinsulfat, Tylosin-phosphat</b>	Landwirt	Vater des Landwirtes
E5	konventionell	1333	„Kombi“	kein Zukauf	Rein-Raus	ca. 100 Tage	Amoxicillin-Trihydrat, <b>Colistinsulfat, Enrofloxacin, Gentamicinsulfat, Oxy-tetrazyklin, Sulfadoxin + Trimethoprim, Tetrazyklin-hydrochlorid, Tylosin</b>	Landwirt	Mutter des Landwirtes
H18	ökologisch	41	Mast	Zukauf (eine Herkunft)	Kontinuierlich	ca. 126 Tage	Kein Antibiotikaeinsatz	Landwirt	Ehefrau des Landwirtes
J20	ökologisch	80	Mast	Zukauf (eine Herkunft)	Rein-Raus	ca. 135 Tage	Cefquinomsulfat, Chlortetrazyklinhydrochlorid, Sulfathiazol + Sulfamidin +Trimethoprim	Landwirt	Tochter des Landwirtes
M13	konventionell	978	„Kombi“	kein Zukauf	Kontinuierlich	ca. 100 Tage	<b>Sulfadiazin + Trimethoprim, Amoxicillin-Trihydrat, Benzylpencillin-Benzathin, Benzylpenicillin-Procain, Cefquinomsulfat, Chlortetrazyklinhydrochlorid, Dihydrotrptomycinsulfat, Enrofloxacin, Lincomycin-hydrochlorid-Monohydrat, Spectinomycinsulfat-Tetrahydrat, Sulfadoxin, Tildipirosin</b>	Landwirt	Keine Kontaktperson

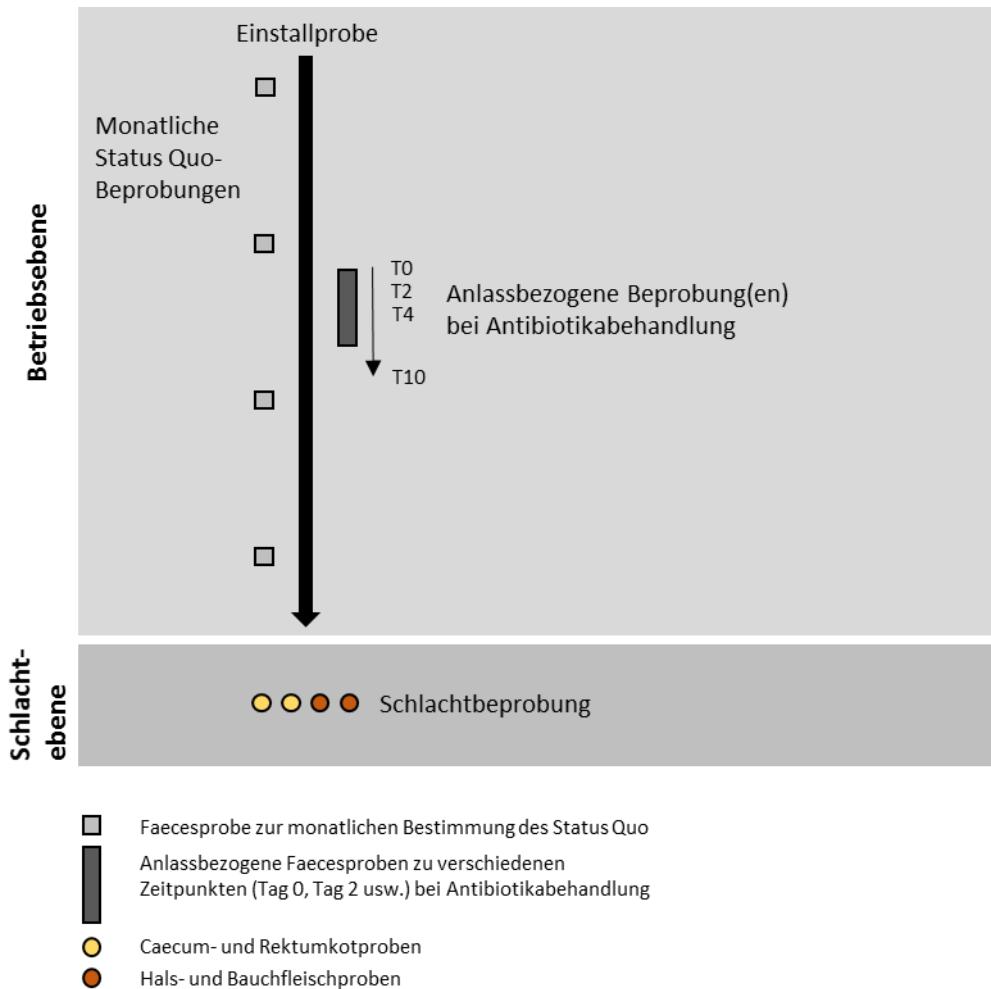
<sup>x</sup> Nur fettgedruckte Wirkstoffe kamen an Studentieren zum Einsatz

#### 1.2.4 Beprobungszeitpunkte

Im „Screening“ wurde ein Beprobungszeitpunkt angestrebt, der möglichst kurz vor erstmaliger Ausbringung der gelagerten wirtschaftseigenen Düngemittel Gülle / Jauch / Festmist im Frühjahr bzw. Herbst lag, um die Belastung der Umwelt durch Antibiotikaresistenzgene möglichst genau abschätzen zu können. In der Praxis ließ sich eine direkt aufeinanderfolgende Beprobung aus diversen Gründen nicht für jeden „Screening“-Betrieb umsetzen, so dass es von einzelnen Betrieben anstatt einer Frühjahrs- und der darauffolgenden Herbstprobe zwei Frühjahrsproben aus den Jahren 2013 und 2014 gab. Alles in allem wurden so im Zeitraum von Frühjahr 2013 bis Herbst 2014 von jedem Betrieb mindestens zwei Proben gewonnen.

Für das „Tracking“ erfolgte die Probenahme deutlich engmaschiger: In jedem Betrieb dienten zehn zufällig ausgewählte Tiere (mindestens) eines Mastdurchgangs als sog. Sentinel-Tiere. Je nach Betrieb wurden die Schweine zu unterschiedlichen Zeitpunkten in die Studie eingeschlossen und erstmals beprobt: Im Falle von Betrieb E5 zum Zeitpunkt des Absetzens von der Muttersau, in Betrieb M13 zum Zeitpunkt des Umsetzens in die Läuferabteile und in den Betrieben mit Zukauf (vgl. Tabelle 4) zum Zeitpunkt des Einstallens. Nachfolgende Beprobungen dieser zehn Sentinel-Tiere erfolgten zum einen monatlich, um über die gesamte Dauer der Mast einen „Status Quo“ hinsichtlich der zu untersuchenden Zielgrößen zu erhalten (diese Proben wurden mit den Angaben zum Monat und zum Jahr benannt, beispielsweise „07-13“ für die Monatsprobe Juli 2013). Darüber hinaus wurden fünf der zehn Sentinel-Schweine (wiederum zufällig ausgewählt) anlassbezogen, also bei jeder Behandlung mit Antibiotika beprobt und zwar möglichst vor / zu Beginn, während sowie nach Ende der Behandlung. Konkret resultierte dies in der Wahl der Beprobungszeitpunkte Tag 0 (T0), Tag 2 (T2), Tag 4 (T4) und Tag 10 (T10) der Behandlung, wobei diese einerseits der jeweiligen Behandlung angepasst wurden (was beispielsweise bei einer länger andauernden Behandlung Beprobungen über Tag 10 hinaus zur Folge hatte), andererseits angemerkt werden muss, dass es unter Praxisbedingungen zum Teil zwangsläufig zu geringgradigen Abweichungen im Beprobungsplan kam. Um die Brücke zum Verbraucher zu schlagen, endete die regelmäßige Beprobung erst auf dem Schlachthof, wo von den Tieren neben Faecesproben aus Rektum und Caecum auch Fleischproben

gewonnen wurden. Abbildung 11 fasst schematisiert den zeitlichen Beprobungsablauf der „Tracking“-Schweine zusammen.



**Abbildung 11: Beprobungsschema „Tracking“-Betrieb**

Zeitgleich zur Beprobung der Schweine, also ebenfalls monatlich sowie bei antibiotischer Behandlung der Tiere, stellten der jeweilige Landwirt des „Tracking“-Betriebs sowie eine Kontaktperson des Landwirtes Stuhlproben zur Verfügung. Aus Gründen der Zumutbarkeit entfiel hierbei in einigen Fällen die T4-Probe.

### 1.2.5 Arzneimittel-Datenerfassung

Um etwaige Zusammenhänge zwischen Art und Menge des Antibiotikaeinsatzes und den Ausscheidungsgehalten zu identifizieren, verpflichteten sich die am Projekt teilnehmenden Betrieben (gegen Aufwandsentschädigung) freiwillig, Antibiotikaanwendungsdaten auf Grundlage der durch den Tierhalter bei Erwerb und Anwendung gemäß § 1 und 2 der Tierhalter-Arzneimittel-

Nachweisverordnung (ANTHV) zu führenden Nachweise zur Verfügung zu stellen (ANTHV 2006). Diese enthalten Angaben zu Anzahl und Art der behandelten Tiere, Art und Menge des verabreichten Arzneimittels, Diagnose, Art und Dauer der Anwendung, Dosis pro Tier und Tag sowie die entsprechenden Wartezeiten.

Konkret erfolgte die Datenerfassung unter Berücksichtigung des Pseudonymisierungs-Konzeptes durch die externen Mitarbeiter anhand der tierärztlichen Anwendungs- und Abgabennachweise sowie ggf. durch das Bestandsbuch. Für die jeweiligen Betriebe wurden die Arzneimittelanwendungen für die Zeiträume erfasst, die den Lagerungszeitraum der anfallenden wirtschaftseigenen Düngemittel einschlossen. Dieser Zeitraum bewegte sich über alle Betriebe hinweg gesehen zwischen April 2012 und November 2014. Alle in den Betrieben eingesetzten Antibiotika wurden einer der in Abbildung 2 aufgeführten Wirkstoffklassen zugeordnet.

Es sei erwähnt, dass bzgl. der „Screening“-Betriebe auf detaillierte Auswertungen zu den oben genannten Punkten (Diagnosen u. ä.) – mit Ausnahme der Einflussgröße „Einsatz / kein Einsatz der entsprechenden Wirkstoffklassen im Lagerungszeitraum der wirtschaftseigenen Düngemittel“ – in der vorliegenden Arbeit verzichtet wurde. Im Rahmen des „ABYS“-Projektes werden die erwähnten Daten zum Antibiotikaeinsatz für das „Screening“ weitestgehend gesondert ausgewertet und auch in Beziehung zur Haltungsumwelt gesetzt sowie gemeinsam mit Erkenntnissen aus dem Futtermittelbereich (Rationsgestaltung, Fütterungsregime) betrachtet – dieser Teil ist Inhalt einer weiteren, agrarwissenschaftlichen Dissertation (in Erstellung).

Detaillierte Auswertungen zum Arzneimittelleinsatz in den „Tracking“-Betrieben finden sich in Tabelle 4 sowie Abschnitt IV3.1.

### **1.2.6 Probengewinnung**

Vor der Gewinnung der Proben wurden alle Behältnisse mit einem jeweilig spezifischen Probencode gekennzeichnet.

Für den „Screening“-Teil des Projektes wurden Weithalsflaschen für die Gülle- und Jaucheproben sowie industriereine Müllsäcke für den Festmist auf postalischem Weg zusammen mit Hinweisen zur Probenahme an die

teilnehmenden Betriebe versendet. Dies geschah aus Gründen des Datenschutzes durch den extern angestellten Mitarbeiter (vgl. Abschnitt 1.2.2). Die Probenahme selbst erfolgte dann durch die Landwirte, wobei der Festmist an zehn unterschiedlichen Stellen unterschiedlicher Tiefe entnommen wurde. Im Anschluss wurde vom Landwirt mit dem externen Mitarbeiter telefonisch ein Termin zur unmittelbaren Abholung vereinbart.

Im „Tracking“ wurden den Landwirten sowie deren Kontaktpersonen vorbereitete Probengefäße, Einmal-Handschuhe und ein Schreiben mit Erläuterungen zur Stuhlprobenahme zur Verfügung gestellt.

Die Gewinnung der Schweinefaecesproben erfolgte vor Ort auf den Betrieben durch den extern angestellten Projektmitarbeiter. Unterstützt wurden sie dabei von Master-Studenten und / oder studentischen Hilfskräften. Durch haltbare Markierungen an den Tieren sowie an deren Ohrmarken war sichergestellt, dass alle Proben stets richtig zugeordnet werden konnten.

Die Schlachtung der in die Studie eingeschlossenen „Tracking“-Tiere fand im Falle der Tiere aus konventioneller Haltung (Betriebe A21, A6, E5, M13) am Schlachthof der Versuchsstation Grub der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) statt. Die Schlachtungen der beiden ökologischen „Tracking“-Betriebe erfolgten an den Schlachthöfen der Herrmannsdorfer Landwerkstätten Glonn GmbH & Co. KG (Betrieb J20) bzw. der Brucker Schlachthof GmbH & Co. KG (Betrieb H18).

Die Sentinel-Tiere wurden bis zur Schlachtreife gemästet. Unter Zuordnung der Schlachtbandnummer wurde nach Entnahme des Magen-Darm-Traktes auf einem zum Schlachtband abgegrenzt lokalisierten Metalltisch zunächst das Rektum ausgestrichen und der Inhalt in einem Kotröhrchen aufgefangen. Zusätzlich wurde der Blindsack des Caecums mitsamt seines Inhaltes ligiert, mit einer Schere abgetrennt und in einem Plastikbeutel verpackt. Der so separierte Blindsack wurde kurze Zeit später durch einen Schnitt mit sterilen Skalpellklingen eröffnet und der Inhalt ebenfalls in ein Kotröhrchen überführt – zur Vermeidung von Kreuz-Kontaminationen geschah dies in einem separaten Raum des Schlachthofgebäudes. In einer räumlich vom eigentlichen Schlachtprozess abgegrenzten Kühlkammer wurde von den Schlachtkörpern der „Tracking“-Tiere jeweils ein Stück Halsfleisch sowie ein Stück Bauchfleisch (Größe

ca. 10 x 15 cm) mit einem Schlachtmesser herausgeschnitten und in einem industriereinen Plastikbeutel verpackt, wobei aus Gründen der Biofilmvermeidung sowie zur Wahrung aerober Verhältnisse darauf geachtet wurde, dass die Hautoberfläche der Probe keinen Kontakt zur Innenfläche des Gefrierbeutels hatte. Handschuhwechsel sowie sachgemäße Reinigung und Desinfektion der Schlachtmesser nach jeder einzelnen Probenahme dienten der Vermeidung von Kontaminationen.

### **1.2.7 Lagerung und Transport des Probenmaterials**

Bis zur Abholung wurden die Gülle-, Jauche- und Festmistproben sowie die humanen Faecesproben in einem Kühlschrank bei 4 – 8 °C auf dem Betrieb aufbewahrt. Der Transport aller Proben in das Untersuchungslabor erfolgte unter Kühlung in einer handelsüblichen Kühlbox bzw. in mit Kühlelementen ausgelegten Transportkisten. Die Transportzeit überschritt dabei in keinem Fall drei Stunden. Die weitere Bearbeitung der Proben wurde unmittelbar nach Ankunft im Untersuchungslabor durchgeführt.

### **1.2.8 Isolate für die Untersuchung von Verwandtschaftsverhältnissen von *E. coli* bei Schwein und Mensch**

Um die genotypische Ähnlichkeit zwischen Keimen von Landwirt bzw. Kontaktperson und Schweinen zu bestimmen, wurden *E. coli*-Isolate aus den Faeces molekularbiologischen Verwandtschaftsanalysen (ERIC-PCR, MLST) unterzogen (s. Abschnitt 2.2.1.3). Diese Untersuchungen wurden exemplarisch in vier der insgesamt sechs „Tracking“-Betriebe durchgeführt, nämlich in den konventionellen Betrieben E5, A21 und A6 sowie im ökologisch wirtschaftenden Betrieb J20. Im Anhang dieser Arbeit finden sich in Tabelle 34, Tabelle 35, Tabelle 36 und Tabelle 37 die Aufstellungen der zur Analyse herangezogenen Isolate inklusive der jeweils untersuchten Probanden und Probenahmezeitpunkte.

## 2 Methoden

### 2.1 Mikrobiologisch-kulturelle Untersuchungen

#### 2.1.1 Probenvorbereitung

Festmist: Um eine gute Durchmischung zu gewährleisten, wurde in Anlehnung an die VO (EG) Nr. 882/2004, Kapitel III, Artikel 11 mit sterilen Instrumenten aus dem Behältnis, in dem der Festmist transportiert und gelagert wurde, von zehn verschiedenen Stellen jeweils eine definierte Menge Material entnommen, dieses anschließend in einen ebenfalls sterilen Plastikbeutel überführt und (manuell) gut durchmischt (VO(EG)\_882 2004). Im Anschluss wurden 10 g des durchmischten Mists in 90 ml physiologischer NaCl-Lösung eingewogen, in einem Glaskolben für 30 min bei 300 rpm auf dem Laborschüttler geschwenkt und aus der so entstandenen Suspension unter regelmäßiger Durchmischung eine Verdünnungsreihe mit Faktor 1:10 erstellt.

Jauche / Gülle / Faeces: Es wurde 1 ml Jauche bzw. Gülle bzw. 1 g Faeces in 9 ml physiologischer NaCl-Lösung suspendiert und daraus wie oben eine 1:10-Verdünnungsreihe erstellt.

Hals- / Bauchfleisch: Von den Fleischstücken wurden mittels eines Henkellocheisens (Öffnung mit einer Fläche von  $3,14 \text{ cm}^2$ ) ca. 0,5 cm hohe, runde Stücke von der Hautoberfläche ausgestanzt, diese anschließend jeweils zusammen mit 10 ml physiologischer NaCl-Lösung in ein 50 ml-Zentrifugenrörchen überführt und für 15 min bei 200 rpm auf einem Laborschüttler geschwenkt. Anschließend wurde von der so entstandenen Spülösung eine Verdünnungsreihe mit dem Faktor 1:10 angelegt.

#### 2.1.2 Keimzahlbestimmung, Keimidentifizierung und Keimisolierung

Als Indikatorsspezies wurden *E. coli*-Isolate herangezogen, zum einen hinsichtlich der phänotypischen Antibiotika-Resistenz, zum anderen zur Erstellung von Resistenzgenprofilen sowie zur Verwandtschaftsanalyse.

Als Anzuchtmedium fungierte der Fluorocult-Agar mit dem Ziel des fluoreszenzoptischen Nachweises von *E. coli*. Die Wirkung dieses Selektiv-Agars beruht darauf, dass zum einen durch Natriumdeoxycholat das Wachstum Gram-positiver Konkurrenzflora gehemmt wird. Zum anderen enthält der Nähragar

4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-Glucuronid (MUG), das von Mikroorganismen, die das Enzym  $\beta$ -D-Glucuronidase produzieren, zu 4-Methylumbelliferon hydrolysiert wird, welches wiederum unter UV-Licht fluoresziert (Heizmann et al. 1988). Die Aktivität von  $\beta$ -D-Glucuronidase ist ein hochspezifisches Charakteristikum der meisten *E. coli*-Stämmen, abgesehen von dem enterohämorrhagischen *E. coli*-Stamm O157:H7 (EHEC).

Von den beschriebenen Verdünnungsreihen des Probenmaterials wurden 0,1 ml der jeweiligen Verdünnungsstufe im Oberflächen-Spatel-Verfahren in Anlehnung an Gedek auf Fluorocult-Agar aufgebracht und 24 Stunden bei 44 °C inkubiert (Gedek 1974).

Von den zuvor markierten, Fluoreszenz erzeugenden Kolonien wurde mit einer Metallöse Keimmaterial abgenommen und mittels Drei-Ösen-Ausstrich auf Gassner-Agar, einem Selektivagar für Enterobacteriaceae übertragen. Gassner-Agar ist ein schwach selektiver Nährboden zur Unterscheidung von Laktose-positiven und Laktose-negativen Keimen (Köhler 1924). Laktose-positive Keime sind im Gegensatz zu Laktose-negativen Keimen in der Lage, Säure aus Laktose zu bilden. Als Indikator enthält der Nähragar Methylblau, Lactose-fermentierende Keime erscheinen daher blau. Außerdem ist im Gassner-Agar Metachromgelb enthalten, welches die Gram-positive Begleitflora hemmt und ebenfalls Indikatorfunktion übernimmt. *E. coli* zeigen auf diesem Nährmedium gutes Wachstum und sind meist Laktose-positiv, wodurch sich der Nährboden blaugrün verfärbt und die Kolonien sich blaugrün mit dunklem Zentrum darstellen.

Nach 48-stündiger Inkubation bei 37 °C wurden die Zielkeime, die zuvor auf Fluorocult-Agar geleuchtet hatten, unter Berücksichtigung von Größe, Form, Farbe, Oberflächenstruktur und Pigmentierung morphologisch beschrieben und biochemisch untersucht (*E. coli* reagieren negativ im Oxidase-Test und meist positiv im Indol-Nachweis mit Kovacs-Reagenz). In Einzelfällen wurde zur Speziesidentifizierung zusätzlich das kommerziell erhältliche BBL<sup>TM</sup> Crystal<sup>TM</sup> Enteric/Nonfermenter ID Kit herangezogen und fragliche Keime erst nach Testung endgültig als *E. coli* akzeptiert bzw. verworfen.

### 2.1.2.1 MALDI-TOF MS

Isolate mit auffälligen Resistenzprofilen (insbesondere Resistenz gegen Cephalosporine der 3. + 4. Generation inklusive ESBL-Phänotyp,

vgl. Punkt V2.2.4.1) sowie die in der MLST-PCR genauer charakterisierten Keime, wurden mittels MALDI-TOF MS („Matrix-assisted Laser Desorption / Ionisation-Time-of-Flight Mass Spectrometry“) einer weiteren Speziesidentifizierung unterzogen. Dabei handelt es sich um eine in den 1980er Jahren entwickelte Methode, die darauf beruht, dass ribosomale Proteine und Peptide einer – zuvor in eine Matrix gebetteten – Bakterienkultur zunächst durch Laserbestrahlung desorbiert, ionisiert und anschließend im elektrischen Feld innerhalb eines Flugrohres beschleunigt werden: Durch die Matrix wird einerseits die Energie des Lasers absorbiert, andererseits werden die notwendigen Protonen zur Ionisierung der Analytenmoleküle bereitgestellt (Freiwald et al. 2009). Die Analyten trennen sich entsprechend ihrer Ladung und Masse auf; die dabei entstehenden speziespezifischen Massenspektren, berechnet anhand der Flugzeiten im Vakuum, werden in ihrer Gesamtheit mit den Spektren einer Referenzdatenbank abgeglichen (Karas et al. 1985, Schubert et al. 2010, Carbonnelle et al. 2011). Dabei wird von der Benutzersoftware automatisiert ein Score zwischen 0,0 und 3,0 berechnet, der die Validität des Differenzierungsergebnisses widerspiegelt – im Allgemeinen wird eine Speziesidentifizierung bei einem Wert von über 2,0 als korrekt erachtet, Werte über 1,7 ermöglichen zumindest eine verlässliche Identifizierung auf Genus-Ebene (Freiwald et al. 2009).

Für den Probenauftrag wurde im Doppelansatz eine kleine Menge einer Bakterienkolonie aus Reinkultur (Normalagar, 24 Stunden bei 37 °C bebrütet) mittels eines autoklavierten Zahnstochers vom Nährboden abgenommen und dünn auf die Analyseposition der metallenen, 96 Proben fassenden, Target-Platte gestrichen. Zusätzlich zu den zu untersuchenden Proben wurde auf jede Target-Platte 1 µl Bacterial Test Standard aufgetragen. Im Anschluss daran erfolgte die Überschichtung der Spots mit 1 µl der Matrix (hier: Zimtsäure), so dass abschließend beide Bestandteile unter Lufttrocknung kokristallisierten konnten.

Die Laser-Bestrahlung sowie die automatisierten Messungen wurden im MALDI-TOF Massenspektrometer der Fa. Bruker Microflex<sup>TM</sup> an der LMU München durchgeführt und die so ermittelten Spektren mit der Referenzdatenbank abgeglichen.

### 2.1.3 Cryokonservierung

Alle ausdifferenzierten Keime wurden auf Blutagar subkultiviert, 24 Stunden bei 37 °C inkubiert und abschließend bei –80 °C cryokonserviert. Als Medium wurde hierfür Nutrient Broth mit cryoprotektivem Glycerinzusatz verwendet.

### 2.1.4 Prüfung der phänotypischen Antibiotikaresistenz

Zur Prüfung der phänotypischen Antibiotikaresistenz einzelner *E. coli*-Isolate wurde die minimale Hemmkonzentration (MHK) bestimmt. Bei der MHK handelt es sich um die niedrigste Konzentration eines antibiotischen Wirkstoffes (mg/l), bei der ein einzelnes Bakterienisolat kein sichtbares Wachstum mehr aufweist (Schwarz et al. 2003). Das Heranziehen von Grenzwerten, sog. Breakpoints, welche beispielsweise durch das European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) festgelegt werden, ermöglicht beim Vergleich dieser MHK eine Einstufung der Isolate als sensibel, intermediär oder resistent. Übliche Maße zur Deskription von MHK-Verteilungen sind der MHK<sub>50</sub>- und der MHK<sub>90</sub>-Wert, die jeweils die Wirkstoffkonzentration darstellen, bei der 50 % bzw. 90 % der Isolate einer Stichprobe in ihrem Wachstum gehemmt werden. Die MHK<sub>50</sub> entspricht dabei dem Median der ermittelten MHK-Werte einer Population: Bei  $n$  getesteten Stämmen mit den aufsteigender Größe nach geordneten MHK-Werten  $y_1, y_2, \dots, y_n$  liegt die MHK<sub>50</sub> an Position  $n \times 0,5$ , wenn es sich bei  $n$  um eine gerade Zahl handelt bzw. bei  $(n + 1) \times 0,5$ , wenn  $n$  eine ungerade Zahl ist (Schwarz et al. 2010). Die MHK<sub>90</sub> berechnet sich auf ähnliche Art und Weise mit dem Faktor  $n \times 0,9$ ; resultiert daraus eine ganze Zahl, entspricht sie der MHK<sub>90</sub>, ist sie keine ganze Zahl, wird der MHK<sub>90</sub> die nächstgrößere ganze Zahl zugewiesen (Schwarz et al. 2010).

Entsprechend dem von EUCAST angewendeten Testverfahren diente die Mikrodilution der MHK-Bestimmung, wobei entsprechend ISO 20776-1:2006 der International Organization for Standardization (ISO) vorgegangen wurde (ISO 2006). Hierbei wurden die zuvor cryokonservierten *E. coli*-Isolate zunächst auf Blutagar ausgestrichen und für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Gleiches gilt für den Referenzstamm *E. coli* DSM 1103, der als Positivkontrolle bei allen Untersuchungen hinsichtlich phänotypischer Antibiotikaresistenz diente. Im Anschluss wurden einige Kolonien dieser Kultur mittels eines sterilen Wattestäbchens in 0,9 %ige NaCl-Lösung überführt, um so ein Inokulum zu

erhalten, das letztlich auf einen Trübungsgrad von McFarland 0,5 eingestellt ist (dies entspricht einer Keimdichte von ca.  $1,5 \times 10^8$  KbE/ml). Von Zeit zu Zeit erfolgte eine photometrische Überprüfung der zuvor visuell abgeschätzten Trübung. Je 50 µl dieser Suspension wurden nun zu zwei Teströhren (jeweils eines für die beiden Resistenztest-Panels GNP und GN) mit jeweils 13 ml Müller-Hinton-Bouillon (CAMHB) hinzugegeben und kurz gemischt. Die Zelldichte dieser Suspension betrug in etwa  $5 \times 10^5$  KbE/ml. Die Befüllung der Kavitäten einer mit Antibiotika vorbeschichteten 96-well-Mikrotiterplatte erfolgte mit je 100 µl der zuvor hergestellten Suspension unter Zuhilfenahme des Micronaut® Sprint Dispensierautomaten. Nach Versiegelung mit industriereiner Klebefolie wurde die Platte fünf Minuten auf einem Horizontalschüttler geschüttelt und für 18 bis 20 Stunden bei 37 °C bebrütet. Zur Reinheitskontrolle wurde von jeder der hergestellten Lösungen ein Kontrollausstrich auf Blutagar angefertigt und unter den gleichen Bedingungen wie die Mikrotiterplatten inkubiert. Die Auswertung erfolgte am nächsten Tag visuell, wobei Trübung Wachstum bei der jeweiligen Antibiotikakonzentration anzeigt, was anhand der Positivkontrolle leicht überprüft werden kann. Die Einordnung der getesteten Isolate als sensibel (S), intermediär (I) oder resistent (R) erfolgte anhand der in Tabelle 5 aufgelisteten Breakpoints. Diese wurden dem zur Fertigstellung dieser Arbeit aktuellen EUCAST-Datenblatt entnommen (<http://www.eucast.org><sup>8</sup>, letzter Zugriff am 30.09.2015). Für drei der untersuchten Wirkstoffe war für *E. coli* kein eigener EUCAST-Breakpoint definiert; in diesem Fall wurden zur Einordnung der Ergebnisse der Mikrodilution epidemiologische Cut-off-Werte (ECOFF), ebenfalls veröffentlicht von EUCAST, herangezogen (<http://mic.eucast.org><sup>9</sup>, letzter Zugriff am 30.09.2015).

<sup>8</sup> [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_5.0\\_Breakpoint\\_Table\\_01.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_5.0_Breakpoint_Table_01.pdf)

<sup>9</sup> <http://mic.eucast.org/Eucast2/SearchController/search.jsp?action=performSearch&BeginIndex=0&Micdif=mic&NumberIndex=50&Antib=-1&Specium=162>

**Tabelle 5: Übersicht der zur Untersuchung auf phänotypische Resistenz verwendeten antimikrobiellen Wirkstoffe**

Wirkstoffgruppe	Wirkstoff	Kürzel	Untersuchter Konzentrationsbereich [mg/l]	Breakpoints [mg/l]	Quelle für Breakpoint
				S (≤)	R (>)
<b>β-Laktame</b>					
Penicilline	Amoxicillin/Clavulansäure	AMC	1/2 - 64/2	8/2	EUCAST
	Ampicillin	AMP	1 - 128	8	EUCAST
	Piperacillin	PIP	1 - 128	8	EUCAST
	Piperacillin/Tazobactam	PIT	1/4 - 128/4	8/4	EUCAST
Cephalosporine	Cefepim	CEP	0,25 - 32	1	EUCAST
	Cefotaxim	CTX	0,25 - 32	1	EUCAST
	Cefoxitin	COX	2 - 16	8	EUCAST
	Cefpodoxim/Clavulansäure	C/V	0,25/4 - 32/4	1/4	EUCAST
Carbapeneme	Cefpodoxim-Proxetil	CPP	0,25 - 32	1	EUCAST
	Ceftazidim	CAZ	0,25 - 32	1	EUCAST
	Cefuroxim	CXM	2 - 16	8	EUCAST
	Ertapenem	ERT	0,25 - 2	0,5	EUCAST
Aminoglykoside	Imipenem	IMP	0,25 - 32	2	EUCAST
	Meropenem	MER	0,25 - 32	2	EUCAST
Fenicole	Amikacin	AMK	4 - 32	8	EUCAST
	Gentamicin	GEN	0,25 - 32	2	EUCAST
	Tobramycin	TOB	0,25 - 32	2	EUCAST
Fluorchinolone	Florfenicol	FLL	0,5 - 64	16*	ECOFF*
	Ciprofloxacin	CIP	0,0625 - 8	0,5	EUCAST
	Enrofloxacin	ENR	0,0625 - 8	0,125*	ECOFF*
Tetrazykline	Levofloxacin	LEV	0,0625 - 8	1	EUCAST
	Doxycyclin	DOX	0,125 - 16	4*	ECOFF*
	Fosfomycin	FOS	16 - 128	32	EUCAST
Andere	Trimethoprim/Sulfa-methoxazol	T/S	0,5/9,5 - 4/76	2	EUCAST
	Aztreonam	AZT	1 - 16	1	EUCAST
	Colistin	COL	1 - 8	2	EUCAST

\* Orientierender „Grenzwert“; hier keine Aussage hinsichtlich Resistenz möglich, sondern lediglich eine orientierende Einschätzung zu verminderter Empfindlichkeit gegen den jeweiligen Wirkstoff!

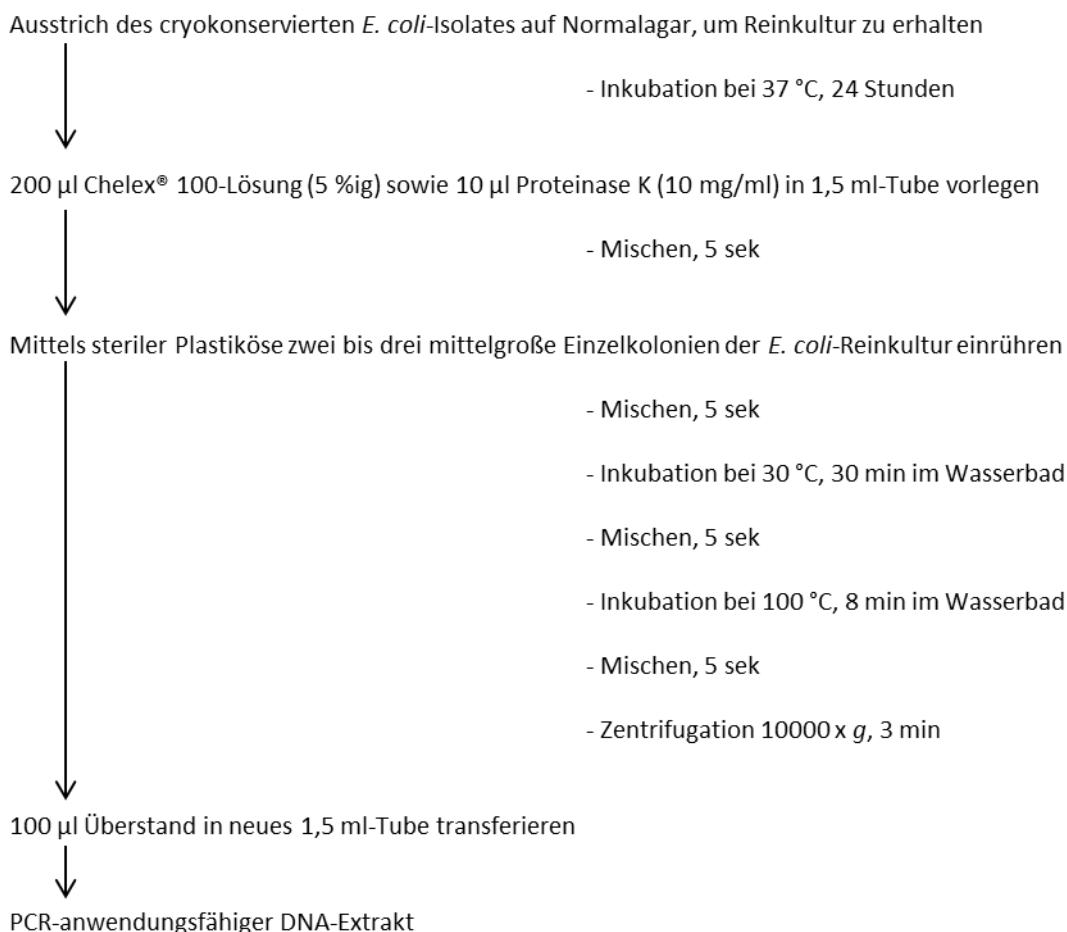
## 2.2 Molekularbiologische Untersuchungen

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden zur Charakterisierung einzelner *E. coli*-Isolate

Die aus den „Screening“- und „Tracking“-Proben gewonnenen Isolate der Indikatorspezies *E. coli* wurden genauer charakterisiert: Neben dem qualitativen Nachweis verschiedener Antibiotikaresistenzgene mittels klassischer Endpunkt-PCR wurden Isolate humanen und porcinen Ursprungs durch den Einsatz spezieller Formen der Polymerasekettenreaktion (ERIC, MLST) auf ihren Verwandtschaftsgrad hin untersucht.

### 2.2.1.1 DNA-Extraktion mittels Chelex® 100-Methode

Für den qualitativen Nachweis von Genen mittels Endpunkt-PCR via Thermocycler musste zunächst die DNA einzelner *E. coli*-Isolate extrahiert werden. Hierfür wurde auf eine leichte modifizierte Form der Chelex® 100 DNA-Extraktionsmethode zurückgegriffen, dargestellt in Abbildung 12 (Yang et al. 2008).



**Abbildung 12: Ablauf DNA-Extraktion mittels Chelex® 100-Methode**

Der DNA-Extrakt wurde bis zum Zeitpunkt der PCR-Anwendung bei -20 °C gelagert, im Falle des Einsatzes in der ERIC-PCR zuvor noch mittels photometrischer Messung per NanoDrop® auf einen DNA-Gehalt von 15,38 ng/µl eingestellt (die mitgeführten Extraktionsleerwerte blieben unverdünnt).

Bei Chelex® 100 handelt es sich um ein Ionenaustauscherharz, bestehend aus einem Styroldivinylbenzol-Kopolymer mit Methyliminodiacetat-Gruppen an der

Oberfläche (NFSTC 2015). Letztere wirken als Chelat-Bildner und weisen dementsprechend eine hohe Affinität für polyvalente Metallionen auf. Auf diese Weise wird einerseits verhindert, dass  $Mg^{2+}$ -abhängige Nukleasen aktiviert werden, die ansonsten zu einer Degradierung der DNA führen würden (Walsh et al. 1991). Andererseits können solche zweiwertigen Metall-Kationen bei hohen Temperaturen Brüche in der DNA verursachen – Chelex® 100 entfernt diese Ionen aus der Lösung und stabilisiert so zusätzlich die DNA (NFSTC 2015).

### 2.2.1.2 Qualitativer Antibiotikaresistenzgen-Nachweis

*E. coli*-Isolate aus „Screening“ und „Tracking“ wurden mittels klassischer Thermocycler-PCR auf die Anwesenheit verschiedener Resistenzgene – eine Übersicht findet sich in Tabelle 6 – getestet. Die Auswahl dieser Gene orientierte sich dabei einerseits an den quantitativen Untersuchungen von Resistenzgen-Gehalten (vgl. Abschnitt 2.2.2.4), andererseits an der human- bzw. veterinär-medizinischen Relevanz der korrespondierenden Antibiotika.

**Tabelle 6: Zielgene, Fragmentgröße und Annealingtemperatur der für den qualitativen Resistenzgen-Nachweis verwendeten Primer**

Nr.*	Primer FW / RV	Zielgen	Fragmentgröße [bp]	Annealingtemperatur [°C]
2	AMPC FW	Chromosomal kodiertes <i>ampC</i>	271	57
	AMPC RV			
3	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> U FW	Konservierte <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> -Region	593	50
	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> U RV			
12	<i>qacEΔ1</i> FW	<i>qacEΔ1</i>	203	57
	<i>qacEΔ1</i> RV			
14	<i>str(A)</i> FW	<i>str(A)</i>	546	53
	<i>str(A)</i> RV			
15	<i>str(B)</i> FW	<i>str(B)</i>	509	54
	<i>str(B)</i> RV			
16	<i>sul(I)</i> FW	<i>sul(I)</i>	822	53
	<i>sul(I)</i> RV			
17	<i>sul(II)</i> FW	<i>sul(II)</i>	722	59
	<i>sul(II)</i> RV			
18	<i>tet(A)</i> FW	<i>tet(A)</i>	888	55
	<i>tet(A)</i> RV			
19	<i>tet(B)</i> FW	<i>tet(B)</i>	206	60
	<i>tet(B)</i> RV			

\* entspricht Tabelle 2

Zunächst wurde ein Mastermix mit einem Volumen von 24  $\mu$ l hergestellt und für die PCR mit einem  $\mu$ l extrahierter DNA des zu untersuchenden Isolates (Template) vermischt. Tabelle 7 zeigt die Zusammensetzung des PCR-Mastermix,

bei den in Klammern angegebenen Konzentrationen handelt es sich um die Arbeits-, nicht um die Endkonzentrationen der jeweiligen Bestandteile.

**Tabelle 7: Zusammensetzung der Reagenzien beim Resistenzgen-Nachweis mittels Endpunkt-PCR**

Bestandteil	Volumen [µl]
Nuklease-freies Wasser	18,25
10x PCR Puffer	2,5
MgCl <sub>2</sub> (25 µM)	1,5
dNTP Mix (10 µM)	0,5
Primer FW (25 µM)	0,5
Primer RV (25 µM)	0,5
Hotstart Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,25
Template	1,0
Σ	25,0

Die eigentliche PCR erfolgte am Thermocycler T3000 der Fa. Biometra in 0,2 ml-Multiply® µ-Strips. In Anlehnung an Schwaiger et al. (2010) gibt Tabelle 8 einen Überblick über die Amplifikationsbedingungen beim qualitativen Resistenzgen-Nachweis, wobei die Annealingtemperaturen sowie die Hold Time für einzelne Gene modifiziert wurden. Neben den Proben wurden die Positivkontrolle (Chelex-DNA-Extrakt des Gen-tragenden Referenzstammes), Extraktionsleerwerte sowie eine PCR-Negativkontrolle mitgeführt, in der als Template eine äquivalente Menge an Nuklease-freiem Wasser fungierte.

**Tabelle 8: PCR-Protokoll zum qualitativen Resistenzgen-Nachweis**

Programm	Cycles	Target Temperature [°C]	Hold Time [sek]
Pre-Incubation	1	94	300
		94	60
Amplification	35	*	**
		72	***
Final Extension	1	72	300
Cooling	1	4	/

\* s. Tabelle 6

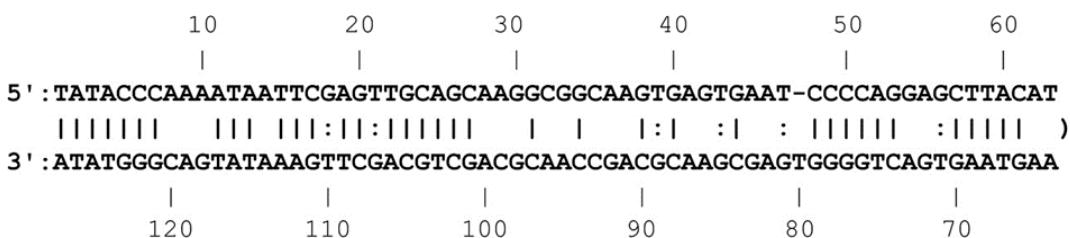
\*\* Primerpaar Nr. 2, 12: 30 sek; Nr. 3: 40 sek; Nr. 14, 15, 16, 17, 18, 19: 60 sek

\*\*\* Primerpaar Nr. 2, 19: 30 sek; Nr. 3, 12: 60 sek; Nr. 14, 15, 16, 17, 18: 90 sek

### 2.2.1.3 ERIC-PCR

Bei der ERIC-PCR handelt es sich um eine spezielle Form der PCR, in der sog. „enterobacterial repetitive intergenic consensus“-Sequenzen detektiert werden können (Versalovic et al. 1991). Es handelt sich bei diesen Sequenzen um

imperfekte Palindrome (ein oder mehrere Nukleotide unterscheiden sich) einer Länge von 127 Basenpaaren (bp), die in unterschiedlicher Kopienzahl repetitiv über das gesamte Genom von Enterobacteriaceae und Vibrionaceae verstreut sind (vgl. Abbildung 13). ERIC-Elemente enthalten hochkonservierte, zentral invertierte Wiederholungssequenzen und sind für gewöhnlich nicht in intergenischen Regionen lokalisiert (Sharples et al. 1990, Hulton et al. 1991, Versalovic et al. 1991). Sie spielen zwar keine direkte Rolle bei Wachstum und Replikation der Zelle, fungieren jedoch als Bindungsstelle für spezifische Proteine, beispielsweise DNA-Polymerase oder DNA-Gyrase (Gilson et al. 1990). Die Anzahl der Nukleotide, die von den ERIC-Sequenzen flankiert werden, variiert (Wilson et al. 2006). So lag die Fragmentlänge solcher ERIC-PCR-Amplikons in *Vibrio cholerae* zwischen 0,18 und 4 kb (Rivera et al. 1995).



**Abbildung 13: 127 bp lange ERIC-Sequenz, dargestellt als Haarnadelstruktur (Wilson et al. 2006)**

Eine Veröffentlichung von Versalovic et al. (1991) beschreibt die Möglichkeit, ein molekularbiologisches „Fingerprinting“ innerhalb des bakteriellen Genoms der Enterobacteriaceae zu etablieren: Spezifische Primer (Sequenzen s. Tabelle 2), die in einer PCR an die beschriebenen repetitiven Sequenzen im Genom von *E. coli* binden, führen zu ERIC-PCR-Amplikons unterschiedlicher Länge, welche nach Agarosegelektrophorese ähnliche, aber letztlich doch unterschiedliche Bandenmuster ergeben und so unter Zuhilfenahme geeigneter Auswertungssysteme Rückschlüsse auf den taxonomischen Verwandtschaftsgrad zulassen.

**Tabelle 9: Zielgene, Fragmentgröße und Annealingtemperatur der für die ERIC-PCR verwendeten Primer**

Nr.*	Primer FW / RV	Zielgen	Fragmentgröße [bp]	Annealingtemperatur [°C]
5	ERIC 1 FW ERIC 2 RV	ERIC	variabel	52

\* entsprechend Tabelle 2

Der Ansatz für die ERIC-PCR besteht aus einem Gesamtvolumen von 25 µl pro Probe. Die genaue Zusammensetzung ist in Tabelle 10 dargestellt; der Hauptunterschied zum oben beschriebenen qualitativen Nachweis von Resistenzgenen besteht in der Verwendung des kommerziell erhältlichen GoTaq® Green Master Mix der Fa. Promega. Dieser enthält neben den für die PCR essentiellen Bestandteilen (Taq DNA Polymerase, dNTPs, MgCl<sub>2</sub> und Reaktionspuffer) auch schon zwei Farbstoffe (blau und gelb), die den nachfolgenden Einsatz eines Ladepuffers („gel loading buffer“, kurz GLB) beim Beladen des Agarosegels überflüssig machen.

**Tabelle 10: Zusammensetzung der Reagenzien für ERIC-PCR**

Bestandteil	Volumen [µl]
Nuklease-freies Wasser	9,50
ERIC 1 FW (50µM)	1,0
ERIC 2 RV (50µM)	1,0
GoTaq® Green Master Mix	12,5
Template-DNA (15,38 ng/µl)	1,0
Σ	25,0

Nach Durchmischung des Ansatzes wurde die ERIC-PCR am Thermocycler in 0,2 ml-Multiply® µ-Strips unter den in Tabelle 11 dargestellten Bedingungen durchgeführt. Zusätzlich zu den zu untersuchenden Proben wurden eine Positivkontrolle (*E. coli*-Stamm A6-S20-1T8 Eco5), der Extraktions-Blank-Wert sowie eine PCR-Negativkontrolle mitgeführt, wobei bei letzterer 1 µl Nuklease-freies Wasser als Template zum Einsatz kam.

**Tabelle 11: PCR-Protokoll zur ERIC-PCR**

Programm	Cycles	Target Temperature [°C]	Hold Time [sek]
Pre-Incubation	1	95	420
Amplification	30	90	30
		52	60
		65	480
Final Extension	1	65	960
Cooling	1	4	/

Dass die Primer während der Amplifikation an eine Vielzahl der repetitiven ERIC-Sequenzen binden sollen und die Amplifikate eine Größe von bis zu 4 kb erreichen können, erklärt die im Protokoll aufgeführte überdurchschnittlich lange Elongations-Phase von acht Minuten.

### 2.2.1.4 MLST-PCR

Exemplarisch wurden einige wenige *E. coli*-Isolate zur genaueren Charakterisierung einer Sequenzierung unterzogen. Aus technischen Gründen wurde in dieser Arbeit auf die sog. MLST-PCR zurückgegriffen (MLST ist die Kurzform von „Multilocus sequence typing“). Dabei handelt es sich um eine molekularbiologische Methode, die zur Charakterisierung und dem Vergleich von Isolaten das Auftreten verschiedener Allele in sieben Housekeeping-Genen (Loci) heranzieht (Spratt et al. 2001). Anhand der Nukleotidsequenz dieser sieben Loci wird das Vorhandensein bzw. die Abwesenheit von Allelen geprüft, wodurch dem jeweiligen Isolat ein Allel-Profil zugeordnet werden kann, das sich letztlich als Fingerabdruck nutzen lässt, um identische Klone zu identifizieren – so werden Isolate dann als identisch betrachtet, wenn sie in sämtlichen Allelen der sieben Housekeeping-Gene übereinstimmen (Feil et al. 2000).

Für die MLST-PCR zur Verwandtschaftsüberprüfung von *E. coli* werden spezielle Primerpaare (s. Tabelle 12) verwendet, die die sieben Housekeeping-Gene flankieren – als Referenz dient die Website <http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/>, eine öffentlich zugängliche Internet-Plattform, die eine zentrale Datenbank für Multilocus-Sequenzen darstellt. Die Größe der amplifizierten Fragmente liegt zwischen 583 und 932 bp, so dass letztlich nur relativ wenig genomisches Material sequenziert werden muss.

**Tabelle 12: Zielgene, Fragmentgröße und Annealingtemperatur der für die MLST-PCR verwendeten Primer**

Nr.*	Primer FW / RV	Zielgen	Fragmentgröße [bp]	Annealingtemperatur [°C]
1	adkF adkR	Adenylat-Kinase	583	54
6	fumCF fumCR	Fumarat-Hydratase	806	54
7	gyrBF gyrBR	DNA-Gyrase	911	60
8	icdF icdR	Isocitrat/Isopropylmalat-Dehydrogenase	878	54
9	mdhF mdhR	Malat-Dehydrogenase	932	60
10	purAF purAR	Adenylosuccinat-Dehydrogenase	816	54
13	recAF recAR	ATP/GTP-Bindungsstelle	780	58

\* entsprechend Tabelle 2

Eine detaillierte Auflistung der Zusammensetzung der Reagenzien für die MLST-PCR zeigt Tabelle 13.

**Tabelle 13: Zusammensetzung der Reagenzien für MLST-PCR**

Bestandteil	Volumen [µl]
Nuklease-freies Wasser	40,75
10x PCR Puffer	5,0
dNTP Mix (10 µM)	1,0
MLST-Primer FW (20µM)	1,0
MLST-Primer RV (20µM)	1,0
Hotstart Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,25
Template-DNA (15,38 ng/µl)	1,0
Σ	50,0

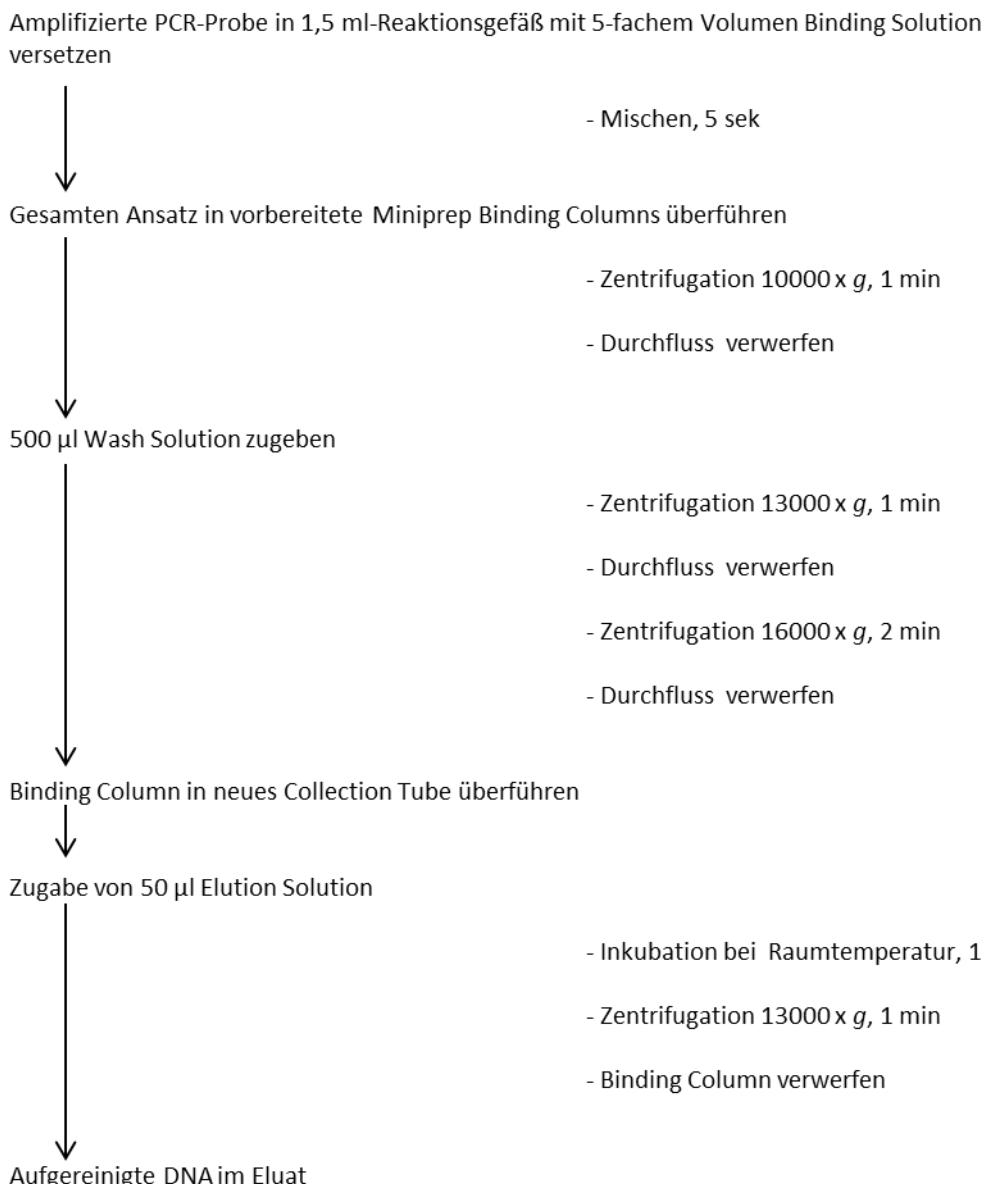
Nach Durchmischung des Mastermix und Zugabe der Template-DNA erfolgte die MLST-PCR am Thermocycler in 0,2 ml-Multiply® µ-Strips. Aufgrund der unterschiedlichen Annealingtemperaturen der MLST-Primer wurden für jedes zu untersuchende *E. coli*-Isolat insgesamt drei PCR-Läufe unter den in Tabelle 14 dargestellten Bedingungen durchgeführt.

**Tabelle 14: PCR-Protokoll zur MLST-PCR**

Programm	Cycles	Target Temperature [°C]	Hold Time [sek]
Pre-Incubation	1	95	600
		95	60
Amplification	35	*	60
		72	120
Final Extension	1	72	300
Cooling	1	4	/

\* s. Tabelle 12

Vor dem Auftragen auf das Agarosegel und als Vorbereitung für die spätere Sequenzierung musste die in der PCR amplifizierte DNA aufgereinigt, d. h. von Primern, Nukleotiden, Enzym und Pufferbestandteilen befreit werden. Hierzu diente das GenElute™ PCR Clean Up Kit der Fa. Aldrich, die Aufreinigung erfolgte dabei nach Herstellerangaben wie in Abbildung 14 dargestellt.



**Abbildung 14: Ablauf der DNA-Aufreinigung mittels GenElute™ PCR Clean Up Kit**

### 2.2.1.5 Gelelektrophorese

Die am Thermocycler amplifizierten Produkte wurden im Anschluss an die PCR mittels horizontaler Gelelektrophorese sichtbar gemacht. Hierzu wurde ein 1 %iges Agarosegel wie folgt hergestellt: 1 g Agarosepulver, vermischt mit 100 ml 0,5 %iger TBS (dreifach gepufferte Salzlösung, bestehend aus 50 mM Tris und 150 mM NaCl, mittels HCl auf einen pH-Wert von 7,6 eingestellt) wurden in der Mikrowelle erhitzt, bis sich die Bestandteile vollständig verflüssigt und vermischt haben. Nach kurzem Abkühlen wurden dem noch flüssigen Gel 3,6 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml), welches mit den Basenpaaren

doppelsträngiger DNA interkaliert und durch Anregung unter UV-Licht sichtbar gemacht werden kann, beigefügt, das Gemisch manuell geschwenkt und anschließend in Plastikformen gegossen, in denen das Gel nach Zugabe eines Kammes, der für die spätere Entstehung der Taschen im Gel verantwortlich zeichnet, ca. 20 min auspolymerisieren konnte. Nach Entfernung des Kammes wurden die Taschen im Falle des qualitativen Resistenzgen-Nachweises mit einer Mixtur aus 8 µl des PCR-Produktes und 2 µl GLB befüllt, wobei die beiden äußersten Taschen jeweils mit 10 µl einer 100-bp-DNA-Ladder beladen wurden, die als Marker des Molekulargewichtes diente. Die Auftrennung in der mit 0,5 %iger TBS als Laufpuffer befüllten Gelkammer erfolgte über 45 min bei einer Spannung von 200 Volt und einer Stärke von 300 mA. In einer mit UV-Licht bestrahlten Photokammer konnten die fluoreszierenden Banden unter Zuhilfenahme der Dokumentationssoftware „Intas GDS“ letztlich sichtbar gemacht werden.

Alle Angaben im oberen Absatz beziehen sich auf den qualitativen Resistenzgen-Nachweis. Für die Gelelektrophorese von PCR-Produkten von ERIC-Isolaten galten folgende Abweichungen: Es wurden immer Gele mit 20 Taschen verwendet, wobei standardisiert die Positionen 1, 10 und 20 mit 10 µl Ladder befüllt wurden. Die restlichen Taschen wurden mit 6,5 µl PCR-Produkt beladen, wobei eine vorherige Mischung mit GLB aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung des in der PCR verwendeten Mastermix entfiel. Position 19 blieb dem amplifizierten „Produkt“ des extrahierten Blank-Wertes vorbehalten, die Position der Positivkontrolle (A6-S20-1T8 Eco5) variierte. Die Auftrennung im Gel erfolgte unter den oben dargestellten Angaben, die Laufzeit lag jedoch zwischen 30 und 40 min und wurde manuell gestoppt, sobald die Ladder die Markierung 4,5 auf der Plastikbegrenzung der Gelkammer erreicht hatte. Der Dokumentationssoftware „Intas GDS“ lagen bei der photographischen Aufnahme der fluoreszierenden Banden nach ERIC- bzw. MLST-PCR folgende Einstellungen zugrunde: Reverse Mode, Exposure Time 0,36 sek, Upper 60, Lower 0, Int. 0. Die beschriebene Vorgehensweise wurde von Lauf zu Lauf streng eingehalten und die eingestellten Werte regelmäßig kontrolliert, um eine gute Vergleichbarkeit der einzelnen Gele zu gewährleisten.

### 2.2.1.6 GelCompar® II

Die Auswertung der in der ERIC-PCR entstandenen Bandenmuster wurde mithilfe der Software GelCompar® II durchgeführt. Diese Databasing-Software der Fa. Applied Maths ermöglicht es dem Benutzer, die in der Gelelektrophorese entstandenen Bandenmuster so zu analysieren, dass letztlich jeder einzelnen Probe eine Art individueller Fingerabdruck zugewiesen wird, der die Grundlage für anschließende Vergleichsanalysen anhand von Clustern bildet.

Die in das Programm eingespeisten Daten bestanden also aus Abbildungen von Bandenmustern auf Agarosegelen. Jeder „Probe“, dies inkludiert neben den eigentlichen DNA-Proben auch einzelne Positiv- und Negativkontrollen sowie die DNA-Ladder, wurde eine Nummer, beginnend mit 00001, zugewiesen. Zur eigentlichen Analyse wurde eine digitale Abbildung des entsprechenden Gels hochgeladen und jede einzelne Probe auf dem Gel definiert. Zum besseren Vergleich verschiedener Gele wurde einerseits die Helligkeit der Banden adjustiert und andererseits eine Normalisierung der jeweiligen Proben zur DNA-Ladder hin durchgeführt. Tabelle 15 listet die in der Software verwendeten Einstellungen auf.

**Tabelle 15: Einstellungen der Software GelCompar® II bei der Einspeisung von ERIC-PCR-Bandenmustern**

Editing normalization	Bands
Linear tone curve; according to 100 bp ladders	Minimum profiling: 5,00 % Gray-zone: 5,00 % Minimum area: 0,00 %

Die Cluster-Analyse zur Bestimmung der Verwandtschaftsverhältnisse einzelner Isolate wurde unter den in Tabelle 16 gezeigten Einstellungen angefertigt. Die „Position tolerance“ wurde automatisch von GelCompar® II kalkuliert, sie stellt ein Maß für die maximal zulässige Längen-Verschiebung zweier Banden dar, so dass diese von der Software noch als übereinstimmend bewertet werden.

**Tabelle 16: Einstellungen der Software GelCompar® II bei der Erstellung von Cluster-Analysen**

Cluster analysis: Similarity matrix	Position tolerance setting	Auto cut-off branches
Band-based: Jaccard	Optimization: 2,50 %	Cut-off: 56 %
DendroGram-type: UPGMA	Position tolerance: 1,87 % Change towards end of fingerprint: 0,00 % Minimum height: 0,00 % Minimum surface: 0,00 % Uncertain bands: include	Quantity of members: at least 5

## 2.2.2 qPCR zur Quantifizierung von Antibiotikaresistenzgenen

Die Gesamt-DNA sowohl der „Screening“- als auch der „Tracking“-Proben wurde per Real-time PCR, auch genannt quantitative PCR (qPCR), hinsichtlich ihres Gehaltes an verschiedenen Antibiotikaresistenzgenen untersucht. Diese Quantifizierung erfolgte unter Zuhilfenahme geeigneter Primer und Standards am LightCycler® 480-Gerät der Fa. Roche.

Das Prinzip dieser spezifischen Art Polymerase-Kettenreaktion beruht auf der Verwendung fluoreszenz-markierter Sonden oder, wie im Falle dieser Arbeit, auf einem interkalierenden Farbstoff (SYBR® Green I). Dieser ist in der Lage, an doppelsträngige DNA zu binden und dann, abhängig von der Menge der während der qPCR amplifizierten, doppelsträngigen DNA, entsprechend starke Fluoreszenzsignale zu emittieren, die während der PCR-Zyklen in Echtzeit nachverfolgt werden können. Die Messung des Signals erfolgt am Ende des jeweiligen Zyklus bei 530 nm.

Es handelt sich hierbei um ein äußerst sensitives System, jedoch ist die Spezifität eher gering, da auch unspezifische PCR-Produkte wie beispielsweise Primer-Dimere detektiert werden können, sobald deren DNA in doppelsträngiger Form vorliegt. Im Anschluss an den letzten regulären Amplifikationszyklus findet deswegen eine sog. Schmelzkurvenanalyse statt, bei der die DNA durch kontinuierliche Temperaturerhöhung langsam aufgeschmolzen wird. Abhängig von seiner Länge und Basenpaarzusammensetzung besitzt dabei jedes Fragment eine spezifische Schmelztemperatur. Im Zuge des Aufschmelzens der PCR-Produkte wird das zuvor eingelagerte SYBR® Green I wieder freigesetzt, dabei wird die Änderung der Fluoreszenzintensität erfasst, so dass letztlich eine Differenzierung bzw. Identifikation der gesuchten Gen-Produkte ermöglicht wird.

### 2.2.2.1 Kobaltbestrahlung

Zur Methodenvalidierung und Herstellung von Standards zur Quantifizierung von Genmaterial in der qPCR mussten die unterschiedlichen Probenmaterialien Gölle / Jauche / Festmist / Faeces analog zu Angaben in der Literatur in einer  $^{60}\text{Co}$ -Bestrahlungsanlage der Fa. Synergy Health Allershausen GmbH behandelt werden, um sie „frei“ von nachweisbarer DNA zu machen (Agersø et al. 2004).

Als Richtwert für die eingesetzte Bestrahlungsdosis der Gölle wurden Werte aus der Literatur herangezogen (Hölzel et al. 2010). Die gemessene Gesamtdosis betrug letztendlich 415 kGy.

### 2.2.2.2 Standardherstellung

Die Herstellung von Standards für die qPCR ermöglicht es, die Gen-Gehalte in den zu untersuchenden Proben absolut zu quantifizieren. Der Standard enthält das zu quantifizierende DNA-Stück, in diesem Fall verschiedene Antibiotikaresistenzgene, in bekannter Konzentration, idealerweise Kopienzahl/g, wobei darauf zu achten ist, dass die gewählten Konzentrationen der Standards die in den Proben ungefähr zu erwartende Menge an Resistenzgenen abdecken. Als Matrix dienten in einem Matrixvorversuch (vgl. Abschnitt 2.3.2) Gölle, Jauche, Festmist sowie Faeces von Schweinen und Menschen. Alle Matrices wurden zuvor analog zu den Angaben in Abschnitt 2.2.2.1 bestrahlt.

Im Anschluss daran wurde die nun „DNA-freie“ Matrix mit bakteriellem Kulturmateriel der unter Punkt 1.1.10 aufgeführten Standardstämme dotiert: Von einer nach dem Einfrieren zweimal passagierten Reinkultur wurde eine Einzelkolonie abgenommen und in 25 ml Nährbouillon in einem Erlenmeyerkolben überimpft und dort 24 Stunden bei 37 °C unter kontinuierlichem Schütteln (200 rpm) bebrütet. Anschließend wurde die Bouillon in 50 ml-Greiner-Röhrchen für zehn Minuten bei ca. 13.000 x g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Bakterien-Pellet in 4 ml bestrahlte Gölle resuspendiert.

Von der so entstandenen Suspension wurde 1 ml in 9 ml physiologischer NaCl-Lösung suspendiert und daraus unter regelmäßiger Durchmischung eine Verdünnungsreihe mit dem Faktor 1:10 von  $10^0$  bis  $10^{-13}$  hergestellt. 0,1 ml der jeweiligen Verdünnungsstufe wurden anschließend im Dreifachansatz auf

Normalagar aufgebracht und 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Letztlich erfolgte die Bestimmung der Keimzahl über die Berechnung des gewichteten Mittels (Farmiloe et al. 1954). Der Keimgehalt deckt sich, nach Berücksichtigung der durch die Extraktionsmethode entstehenden Umrechnungsfaktoren, mit dem Gehalt an Gen-Äquivalenten im Standard-DNA-Extrakt (entspricht 10<sup>0</sup>-Standard).

Zum anderen wurde aus der Matrix-Keim-Suspension im Mehrfach-Ansatz mittels des PowerSoil®-DNA Isolation Kits die DNA extrahiert, gepoolt und dann bei –20 °C zwischengelagert.

Als Standard zur eigentlichen Quantifizierung diente dann eine unmittelbar vor dem PCR-Lauf hergestellte 1:10-Verdünnungsreihe (ein Teil DNA-Extrakt auf neun Teile Nuklease-freies Wasser) des 10<sup>0</sup>-Standards.

### **2.2.2.3 DNA-Extraktion mittels PowerSoil®-DNA Isolation Kit**

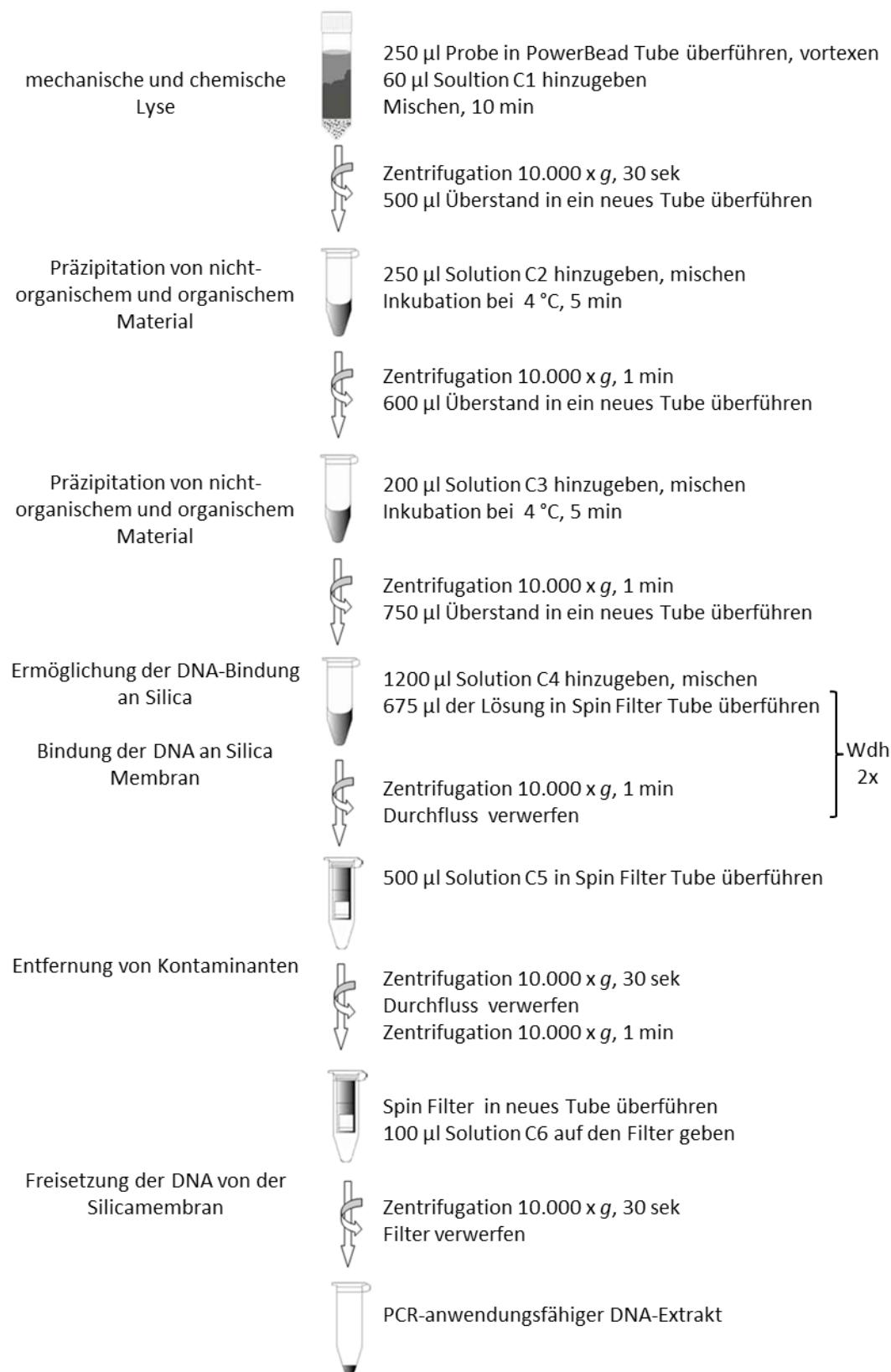
Zur besseren Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Probenmatrices wurden standardisiert 250 µl der Ausgangsprobe eingesetzt. Der flüssige Aggregatzustand war bei Gülle und Jauche von vornherein gegeben. Bei den Faecesproben wurde als Ausgangsmaterial für die Extraktion die in Kapitel 2.1.1 beschriebene Suspension aus 1 g Faeces und 9 ml physiologischer NaCl-Lösung verwendet, bei den Festmist-Proben diente die ebenfalls in Kapitel 2.1.1 erwähnte Schüttel-Suspension aus 10 g Mist und 90 ml NaCl als Ausgangsmaterial. Um später auf die korrekte Konzentration der in der Ausgangsprobe enthaltenen Antibiotika-Resistenzgene rückrechnen zu können, wurden dementsprechende Umrechnungsfaktoren berücksichtigt.

Die DNA-Extraktion der Gülle-, Jauche-, Festmist-, Schweinefaeces und Humanfaecesproben erfolgte analog zu früheren Studien mittels des kommerziell erhältlichen PowerSoil®-DNA Isolation Kits der Fa. MO BIO (Hölzel 2006). Die Zusammensetzung dieses Kits ist in Tabelle 17 abgebildet.

**Tabelle 17: Bestandteile PowerSoil®-DNA Isolation Kit**

Kit-Komponente	Bestandteile (auszugsweise)
PowerBead Tubes (750 µl)	Beads (= Glaskügelchen), Pufferflüssigkeit
Solution C1	SDS und andere Detergentien
Solution C2	1. Präzipitationsreagenz
Solution C3	2. Präzipitationsreagenz
Solution C4	Hochkonzentrierte Salzlösung
Solution C5	Ethanol-basierte Waschlösung
Solution C6	DNA-freier Elutionspuffer
Spin Filters (Einheiten in 2 ml Tubes)	Silica-Membran
Collection Tubes	

Den detaillierten Ablauf der DNA-Extraktion mittels des PowerSoil®-DNA Isolation Kits zeigt Abbildung 15.



**Abbildung 15: Arbeitsablauf PowerSoil®-DNA Isolation Kit**

Alle Proben wurden im Doppelansatz extrahiert, zudem wurde bei jeder Extraktion ein Leerwert mitgeführt, bei dem als Template Nuklease-freies Wasser in gleicher Menge diente. Die fertigen Extrakte wurden bei –20 °C gelagert.

#### 2.2.2.4 Durchführung der qPCR zum Antibiotikaresistenzgen-Nachweis

Um die optimalen Amplifikationsbedingungen zum Nachweis bzw. der späteren Quantifizierung der verschiedenen Antibiotikaresistenzgene bestimmen zu können, wurde im Vorversuch mit DNA-Extrakten der Standardstämme ohne Matrix gearbeitet, um potenziell störende PCR-Inhibitoren, beispielsweise Huminsäuren, außen vor zu lassen.

Der Nachweis der Gene erfolgte mittels qPCR unter Verwendung des LightCycler® 480-Gerätes der Fa. Roche unter Verwendung der in Tabelle 18 aufgelisteten Primer. Letztere wurden mit Nuklease-freiem Wasser zu einer Stocklösung der Konzentration 100 µM vermischt und anschließend bei –20 °C gelagert.

**Tabelle 18: Zielgene, Fragmentgröße und Annealingtemperatur der für die qPCR verwendeten Primer**

Nr.*	Primer FW / RV	Zielgen	Fragmentgröße [bp]	Annealingtemperatur [°C]
4	Com1 R789	16S rDNA	270	59
11	<i>qacE</i> all FW <i>qacE</i> all RV	<i>qacE</i> / <i>qacE</i> Δ1	69	60
16	<i>sul</i> (I) FW <i>sul</i> (I) RV	<i>sul</i> (I)	822	53
17	<i>sul</i> (II) FW <i>sul</i> (II) RV	<i>sul</i> (II)	722	59
18	<i>tet</i> (A) FW <i>tet</i> (A) RV	<i>tet</i> (A)	888	54
19	<i>tet</i> (B) FW <i>tet</i> (B) RV	<i>tet</i> (B)	206	60
20	<i>tet</i> (M) FW <i>tet</i> (M) RV	<i>tet</i> (M)	171	52

\* entsprechend Tabelle 2

Für die qPCR wurde zunächst ein Mastermix erstellt, der folgende Komponenten enthielt: LightCycler® 480 SYBR® Green I Master (enthält FastStart Taq DNA Polymerase, Reaktionspuffer, dNTP-Mix, MgCl<sub>2</sub> und SYBR® Green I Fluoreszenzfarbstoff), den jeweiligen Forward- und Reverse-Primer für das zu amplifizierende Zielgen sowie Nuklease-freies Wasser. Dieser Mastermix wurde

zusammen mit der jeweiligen Probe (= Template), sprich dem PCR-anwendungsfähigen DNA-Extrakt, unter ständiger Kühlung in die Vertiefungen der LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 pipettiert, die Platte für zwei Minuten bei 1.500 x g zentrifugiert und anschließend in den LightCycler® 480 eingebracht. Tabelle 19 zeigt die Zusammensetzung der Reagenzien pro Well.

**Tabelle 19: Zusammensetzung der Reagenzien pro Well in der qPCR**

Bestandteil	Volumen [µl]
Nuklease-freies Wasser	6,0
Primer FW (20µM)	1,0
Primer RV (20µM)	1,0
LightCycler® 480 SYBR® Green I Master	10,0
Template	2,0
Σ	20,0

Die Amplifikationsbedingungen der qPCR sind in Tabelle 20 dargestellt.

**Tabelle 20: qPCR-Protokoll zur Resistenzgenquantifizierung**

Programm	Cycles	Target Temperature [°C]	Hold Time [sek]	Temperature Transition Rate [°C/sek]	Aquisition Mode
Pre-Incubation	1	95	600	4,4	None
		95	10	4,4	None
Amplification	45	*	**	2,2	None
		72	***	4,4	Single
Melting Curve	1	95	5	4,4	None
		65	60	2,2	None
		95	-	-	Continuous
Cooling	1	40	10	2,2	None

\* s. Tabelle 18

\*\* Primerpaar Nr. 11, 19: 5 s; Nr. 4, 16, 17, 18, 20: 10 s

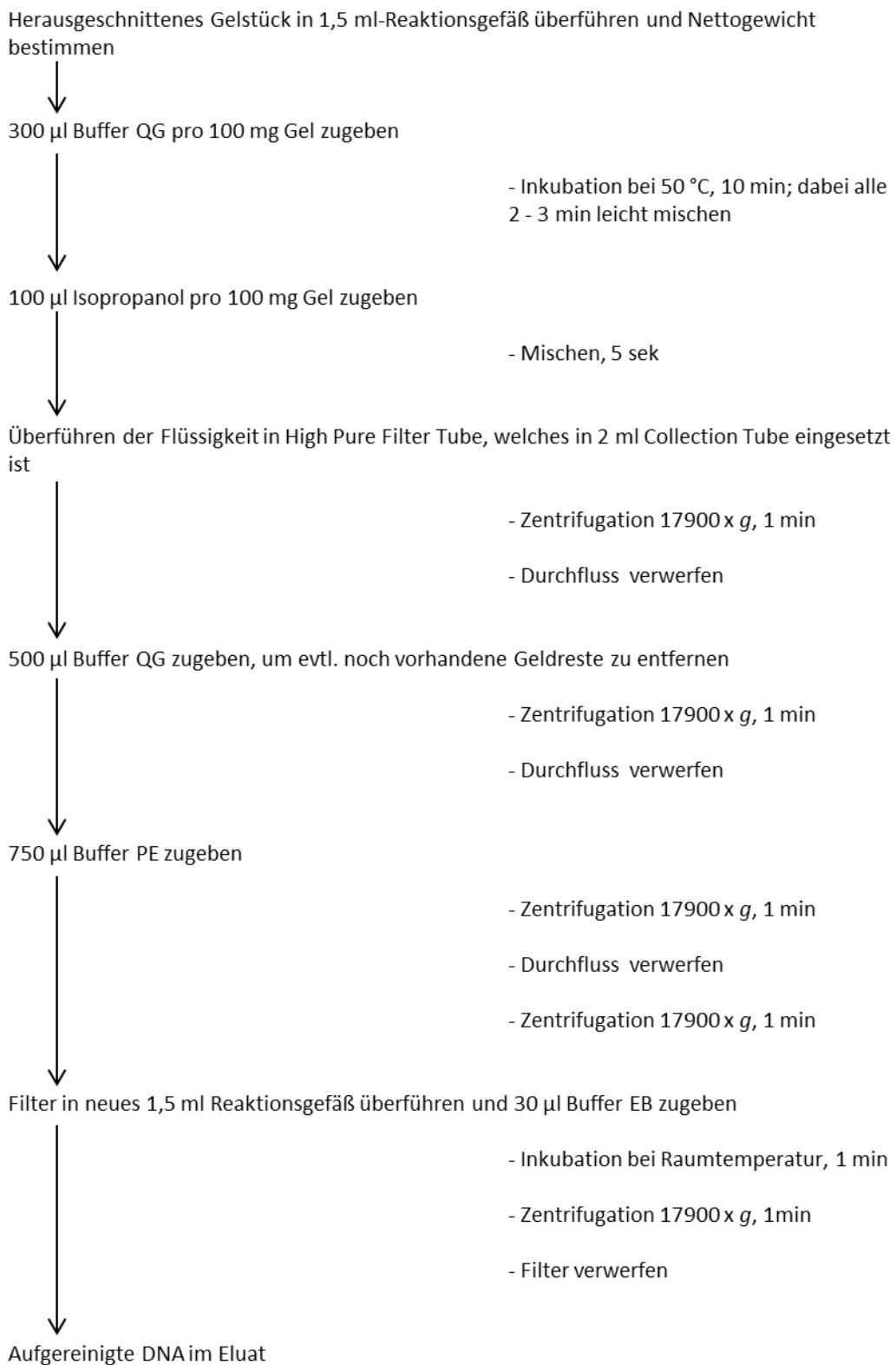
\*\*\* Primerpaar Nr. 11: 6 s; Nr. 19, 20: 8 s; Nr. 4: 14 s; Nr. 16, 17, 18: 30 s

### 2.2.3 Sequenzierung

Zur Identifizierung amplifizierter PCR-Produkte wurden in regelmäßigen Abständen ausgewählte Proben (darunter alle unter Punkt 1.1.10 aufgeführten Referenzstämme) extern bei der Fa. Sequiserve in Vaterstetten sequenziert und die Sequenzdaten online mit dem „Basic local alignment search tool“ BLAST® des National Center for Biotechnology Information (NCBI) analysiert.

Um eine ausreichende Reinheit der DNA der amplifizierten PCR-Produkte für die Sequenzierung zu gewährleisten wurde eine Aufreinigung durchgeführt, wie in Abbildung 14 beschrieben.

Stellten sich amplifizierte PCR-Produkte im Agarosegel in Form von mehreren Einzelbanden dar, wurden letztere zunächst mit einer sterilen Skalpellklinge unter UV-Licht getrennt voneinander ausgeschnitten. Um die PCR-Produkte von den Gelbestandteilen, welche negative Auswirkungen auf die Sequenzierungen haben können, zu trennen, wurden sie im Anschluss unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kits der Fa. Quiagen analog zum in Abbildung 16 dargestellten Verfahren aufgereinigt.



**Abbildung 16: Ablauf Gel-Extraktion mittels QIAquick Gel Extraction Kit**

## 2.3 Ablauf der Methodenvalidierung

### 2.3.1 Optimierung der qPCR-Bedingungen

Durch Modifikation einzelner Reaktionskomponenten und -bedingungen bietet sich dem Benutzer die Möglichkeit, die Effizienz und Reproduzierbarkeit der qPCR an einzelne Zielgene anzupassen und insgesamt zu optimieren.

Der Spielraum für Modifikationen beschränkte sich im Fall dieser Arbeit durch die Verwendung des SYBR® Green I Master im Wesentlichen auf Veränderungen hinsichtlich der Annealingtemperatur der verwendeten Primer und der eingesetzten Menge an Template, da ansonsten schon alle für eine qPCR benötigten Reagenzien im Mastermix enthalten sind.

Zur Beurteilung der Qualität eines PCR-Laufs werden verschiedene Parameter herangezogen. Hauptaugenmerk liegt hierbei auf der Auswertung der Fluoreszenzdaten. Sofern die Reaktionsbedingungen optimiert sind, steigt in der linearen Amplifikationsphase die Fluoreszenz proportional zur Targetmenge an. Ein wichtiges Kriterium ist hierbei der sog. Slope, der sich aus der Steigung  $m$  einer Standardkurve ergibt und letzten Endes ein Maß für Effizienz der Amplifikation darstellt:

$$E = 10^{(-1/m)} - 1$$

Zu dem Zeitpunkt, zu dem pro PCR-Zyklus tatsächlich eine Verdopplung der Amplikate stattfindet, liegt die Effizienz bei 2,000 (das entspricht einem Wert von 100 %), was wiederum einer Steigung von -3,32 entspricht. Generell werden qPCR-Läufe als gut bewertet, wenn die Effizienz einen Wert zwischen 90 % und 110 % aufweist bzw. umgerechnet der Slope zwischen -3,65 und -2,99 liegt. Außerdem sollte der von der Software kalkulierte Error-Wert – er gibt die mittlere quadratische Abweichung der einzelnen Datenpunkte der Standardkurven von der „gefitteten“ Regressionslinie an – < 0,05 betragen.

Ein weiterer Parameter zur qualitativen Beurteilung eines PCR-Protokolls ist der sog. Crossingpoint (CP). Darunter versteht man den Zyklus im qPCR-Lauf einer Quantifizierung, bei dem die Fluoreszenz des amplifizierten Produktes erstmals signifikant die Hintergrund-Fluoreszenz übersteigt.

### 2.3.2 „Matrixversuch“ im Vorfeld der Herstellung der qPCR-Standards

Grundsätzlich wird angestrebt, sog. „matrix-matched“ Standards herzustellen, da diese gewährleisten, dass Proben und Standards in vergleichbarem Maß mit möglichen PCR-Inhibitoren belastet sind, wodurch sich eine möglichst exakte Quantifizierung ergibt.

In einem Vorversuch wurde geprüft, ob, und wenn ja, in welchem Umfang, die im Projekt anfallenden Probenmatrices Gülle, Jauche, Festmist, porcine und humane Faeces Einfluss auf die Amplifizierbarkeit des Resistenzgens *tet*(B) nehmen. Als Dotierungsmaterial und Standard diente eine vorab analog zum unter Punkt 2.2.2.2 beschriebenen Vorgehen angereicherte und in einer Verdünnungsreihe mit dem Faktor 1:10 vorliegende Standard-I-Bouillon, die den *tet*(B)-tragenden Standardstamm *Escherichia coli* 2638 in bekannter Menge enthielt. Je 0,9 ml der fünf zuvor wie unter Abschnitt 2.2.2.1 beschrieben bestrahlten Probenmatrices wurden mit 0,1 ml der jeweiligen Verdünnungsstufe ( $10^{-1}$  bis einschließlich  $10^{-5}$ ) der angereicherten Bouillon dotiert und durchmischt, so dass darin letztlich *E. coli*-Konzentrationen zwischen  $1 \times 10^7$  und  $1 \times 10^3$  KbE/ml vorlagen, was durch Keimzahlbestimmung des Dotierungsmaterials (vgl. Punkt 2.1.2) bestätigt wurde.

Die einzelnen Verdünnungsstufen der angereicherten Matrices sowie der Dotierungsbouillon (inklusive der noch unverdünnten  $10^0$ -Ausgangsbouillon) wurden nun unter Mitführung eines Extraktionsleerwertes im Doppelansatz mittels PowerSoil®-DNA Isolation Kit extrahiert. Anschließend wurde eine qPCR mit den unter Abschnitt 2.2.2.4 aufgeführten Amplifikationsbedingungen durchgeführt, bei der als Standard im Doppelansatz eine 1:10-Verdünnungsreihe des  $10^0$ -Bouillon-Extraktes der angereicherten Bouillon diente und als Template beide Extraktions-Ansätze jeder dotierten Matrix sowie der Verdünnungsreihe der Dotierungsbouillon eingesetzt wurden. Diese PCR wurde direkt im Anschluss noch einmal wiederholt, um eine etwaige Lauf-zu-Lauf-Varianz auszuschließen; die Werte der beiden Läufe wurden dann für die spätere Berechnung der jeweiligen Wiederfindungsraten (WFR) herangezogen, um so letztlich etwaige Korrekturfaktoren möglichst genau zu bestimmen.

## 2.4 Datenanalyse

Die statistische Datenanalyse erfolgte unter Zuhilfenahme der Programme Microsoft Excel 2013, SigmaPlot 12.0 und “R” (<http://www.r-project.org/>). Für die statistische Auswertung der Resistenzgen-Messungen wurden die log-Werte der ermittelten Konzentrationen herangezogen.

### 2.4.1 Trendanalysen von Tetrazyklinresistenzgenen

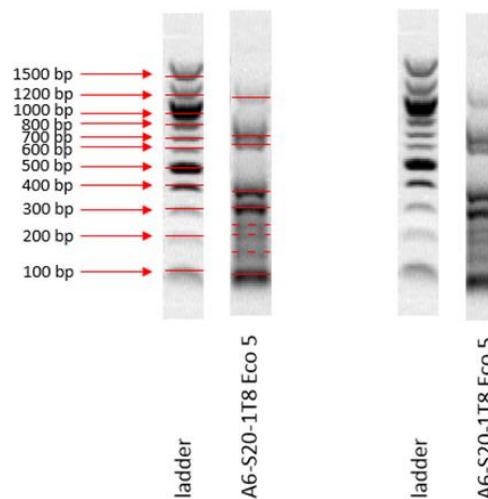
Um langfristige Entwicklungen der Resistenzgenkonzentrationen während und nach Tetrazyklin-Behandlung auch auf Betriebsebene besser nachvollziehen zu können, wurden unter Mithilfe des statistischen Beratungslabors StaBLab des Institutes für Statistik der LMU München mittels des Statistik-Programms „R“ sog. Trendanalysen erstellt. Diese Analysen beruhen auf einem linearen gemischten Modell unter Einbeziehung von linearem bzw. quadratischem Effekt, in ihnen werden die Schweine in Abhängigkeit vom jeweiligen Antibiotikaeinsatz (Faktorvariablen) über die Zeit (Trendvariablen) betrachtet. Solche Trendanalysen wurden exemplarisch am Tetrazyklin-einsetzenden „Tracking“-Betrieb E5 durchgeführt; als Datengrundlage wurden die log-Werte der ermittelten Konzentrationen der drei Tetrazyklinresistenzgene *tet(A)*, *tet(B)* und *tet(M)* in den Faecesproben der Sentinel-Schweine zunächst in einer Excel-Tabelle in Bezug auf den zeitlichen Abstand zu etwaigen Tetrazyklin-Behandlungen auf den Tag genau eingeordnet. In einem nächsten Schritt wurde für jedes einzelne Gen ein Base-Level-Wert berechnet, der sich aus dem Mittelwert aller gemessenen Konzentrationen an Tag 0 einer Behandlung mit Tetrazyklinen ergibt. Zielvariable war letztlich die Differenz zu diesem Base-Level.

## IV ERGEBNISSE

### 1 Methodenvalidierung

#### 1.1 Validierung ERIC-PCR

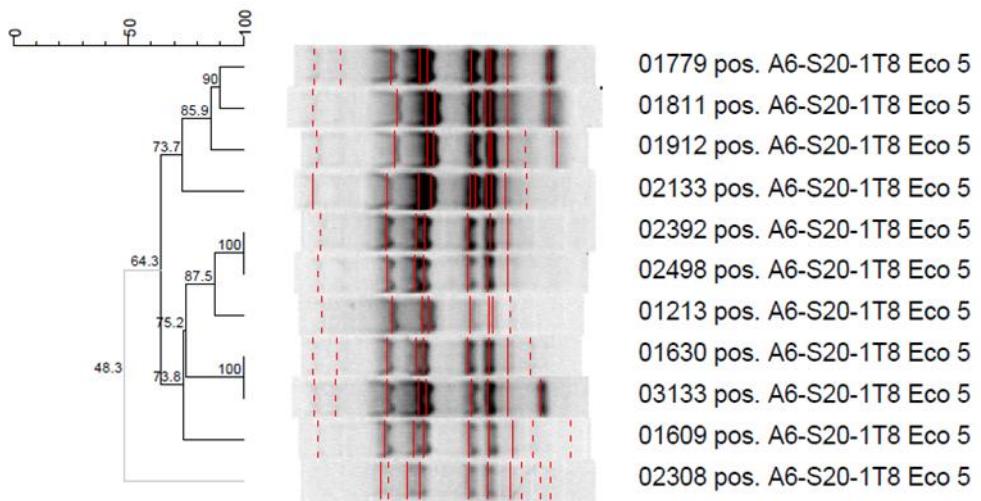
Wichtigste Auswahlkriterien bei der Wahl des als Positivkontrolle dienenden Referenzstammes war eine Vielzahl stabil erscheinender Banden, die im Agarosegel aufgrund ihrer unterschiedlichen Basenpaargröße einen möglichst großen Bereich abdeckten. Verschiedene Isolate der im Projekt gezogenen Proben wurden hinsichtlich des stabilen Auftretens von DNA-Banden getestet, wobei die Wahl im Laufe der Validierung letztlich auf den *E. coli*-Klon „A6-S20-1T18 Eco5“ fiel, da bei diesem dauerhaft dieselben Banden unterschiedlichster Größe (zwischen ca. 100 und ca. 1200 bp) detektiert werden konnten. Links in Abbildung 17 dargestellt sind DNA-Ladder und der Positivklon inklusive der von GelCompar® II erkannten Banden, rechts abgebildet sind DNA-Ladder und Positivklon ohne farbliche Markierung der von der Software detektierten Banden.



**Abbildung 17:** Gelelektrophoretische Trennung der ERIC-PCR-Produkte der Positivkontrolle „A6-S20-1T18 Eco5“; links: von GelCompar® II erkannte Banden markiert (durchgehende Linie: Bande sicher erkannt; gestrichelte Linie: Bande unsicher), rechts: keine Markierung der detektierten Banden

Um einen Überblick über etwaige Instabilität des Bandenmusters der Positivkontrolle „A6-S20-1T18 Eco5“ zu erhalten, wurden die aus den

ERIC-PCR-Läufen resultierenden Bandenmuster des Positivklons noch einmal separat in einem Direktvergleich einer Cluster-Analyse in GelCompar® II unterzogen, wobei dies für die einzelnen „Tracking“-Betriebe getrennt voneinander geschah. Jedes Mal also, wenn ein neues Gel in die Software eingelesen und analysiert wurde, wurde die korrespondierende Positivkontrolle dem Direktvergleich jedes „Tracking“-Betriebs zugefügt. Abbildung 18 zeigt exemplarisch einen solchen Direktvergleich der resultierenden Bandenmuster der Positivkontrolle aus unterschiedlichen ERIC-PCR-Läufen: Im Dendrogramm links werden Übereinstimmungen > 56 % (dies entspricht dem Cut-off-Wert, der sich unter anderem anhand der Übereinstimmungsrate von 208 Wiederholungen der Positiv-Kontrolle ergab) anhand schwarzer Linien gekennzeichnet. Lag der Wiedererkennungswert des Bandenmusters der Positivkontrolle des jeweiligen Laufes unter 56 % (in Abbildung 18 gekennzeichnet durch graue Linien), so wurden die Ergebnisse als ungenügend eingestuft und ERIC-PCR / Gelelektrophorese wiederholt. Im Beispiel aus Abbildung 18 betrifft dies das Gel, das als Positivkontrolle den Klon mit der Nummer 02308 enthielt, da dessen Übereinstimmung mit den anderen Klonen nur 43,8 % beträgt.



**Abbildung 18: Exemplarischer Direktvergleich der gelelektrophoretischen Auf trennung aus unterschiedlichen ERIC-PCR-Läufen resultierender Bandenmuster des Positivklons „A6-S20-1T18 Eco5“ (durchgehende Linie: Bande sicher erkannt; gestrichelte Linie: Bande unsicher)**

Als nicht-assoziierte Kontrolle der Cluster-Analysen wurden exemplarisch *E. coli*-Isolate von Personen verschiedener „Tracking“-Betriebe einer Analyse durch GelCompar® II unterzogen. Hierbei ergaben sich keinerlei Übereinstimmungen oberhalb des Cut-offs (Daten nicht dargestellt).

## 1.2 Validierung qPCR

Die in der qPCR durchgeführten Messungen zum quantitativen Resistenzgen-Nachweis wurden laufbezogen ausgewertet. In der Umsetzung bedeutet dies, dass Proben immer dann gemeinsam innerhalb eines PCR-Laufes untersucht wurden, wenn sie gemeinsam extrahiert wurden und es sich um „zusammengehörige“ Proben handelte, beispielsweise alle Proben, die während eines Behandlungsdurchgangs gewonnen wurden. Für jeden Lauf wurden gesondert die in den folgenden Unterpunkten aufgeführten Validierungskriterien ausgewertet.

### 1.2.1 Cut-off

Als Cut-off wird ein Toleranzwert bezeichnet, der als niedrigster Wert definiert ist, an dem die Konzentration des gesuchten Gens gerade noch mit ausreichender Sicherheit gemessen werden kann. Um sicherzustellen, dass etwaige Kontaminationen während des Extraktionsvorganges der Proben oder unspezifische Signale durch Primer-Dimere die Ergebnisse nicht verfälschen, galt als Cut-off die höchste gemessene Konzentration aller im jeweiligen qPCR-Lauf gemessenen Extraktionskontrollen, multipliziert mit dem Sicherheitsfaktor 2.

Für Proben kalkulierte Gen-Konzentrationen unterhalb des Cut-offs des jeweiligen PCR-Laufes (= des jeweiligen Extraktions-Lots) wurden von der Auswertung ausgeschlossen, da eine Kontamination während des Extraktionsvorgangs nicht auszuschließen war. Wenn möglich, fand eine Wiederholung der DNA-Extraktion der entsprechenden Proben und des PCR-Laufes statt.

Tabelle 21 listet für jedes in der qPCR quantifizierte Resistenzgen minimale, maximale und Medianwerte der Cut-offs aller Lightcycler-Läufe auf.

**Tabelle 21: Minimal-, Maximal- und Medianwerte des Cut-offs [lg copies/g] aller Lightcycler-Läufe (n = 158 pro Gen bzw. n = 39 für *sul*(I)) beim Resistenzgen-Nachweis mittels qPCR**

Resistenzgen	Minimaler Cut-off	Maximaler Cut-off	Cut-off (Median)
<i>tet</i> (A)	0,00	4,42	0,23
<i>tet</i> (B)	0,00	5,10	1,22
<i>tet</i> (M)	0,00	4,63	2,57
<i>sul</i> (I)	0,00	0,00	0,00
<i>sul</i> (II)	0,00	3,81	0,78
<i>qacE</i> / <i>qacEΔ1</i>	0,00	5,28	2,59
16S-rDNA	0,30	5,95	2,99

### 1.2.2 Limit of quantification / Limit of detection

Beim Limit of quantification (LOQ) handelt es sich um den gemessenen Konzentrationswert der letzten (also niedrigsten) für die Berechnung des Slopes herangezogenen Standardkonzentration. Bei den Reihenmessungen wurden bei der Festlegung des LOQs des jeweiligen PCR-Laufes zwei Kriterien herangezogen: Zum einen wurde die letzte einbezogene Standardkurve so ausgewählt, dass ein akzeptabler Slope und damit eine ausreichende Effizienz sichergestellt war (dies vor dem Hintergrund, dass sich bei höherer Verdünnung Pipettierfehler häufen können) und zum anderen, dass alle Proben des jeweiligen Laufes „innerhalb“ der Standardkurven zu liegen kamen. Die Verwendung des LOQ soll letztlich sicherstellen, dass die untersuchten Proben korrekt quantifiziert werden.

Das Limit of detection (LOD) bezeichnet eine gerade noch detektierbare Konzentration und umfasst dabei den Bereich zwischen Cut-off und LOQ. Vereinzelt kam es bei den Reihenmessungen vor, dass Proben zwar augenscheinlich mit Werten > LOQ quantifiziert wurden, ihre Amplifikate sich jedoch in der nach jedem qPCR-Lauf durchgeföhrten Schmelzkurvenanalyse nicht als das gesuchte Produkt erwiesen. In diesem Fall wurde die Probe aus der statistischen Auswertung ausgeschlossen.

In Tabelle 22 finden sich neben den Minimal- und Maximalwerten der LOQs aller Lightcycler-Läufe auch die Durchschnittswerte der LOQs für die einzelnen Resistenzgene.

**Tabelle 22: Minimal-, Maximal- und Medianwerte der LOQs [lg copies/g] aller Lightcycler-Läufe (n = 158 pro Gen bzw. n = 39 für *sul(I)*) beim Resistenzgen-Nachweis mittels qPCR**

Resistenzgen	Minimales LOQ	Maximales LOQ	LOQ (Median)
<i>tet(A)</i>	2,75	5,84	3,81
<i>tet(B)</i>	2,59	5,59	4,10
<i>tet(M)</i>	1,39	3,39	2,76
<i>sul(I)</i>	6,51	7,53	6,52
<i>sul(II)</i>	1,27	4,38	2,48
<i>qacE / qacEΔ1</i>	1,36	4,43	2,63
16S-rDNA	2,48	5,65	3,59

### 1.2.3 Error und Effizienz der qPCR

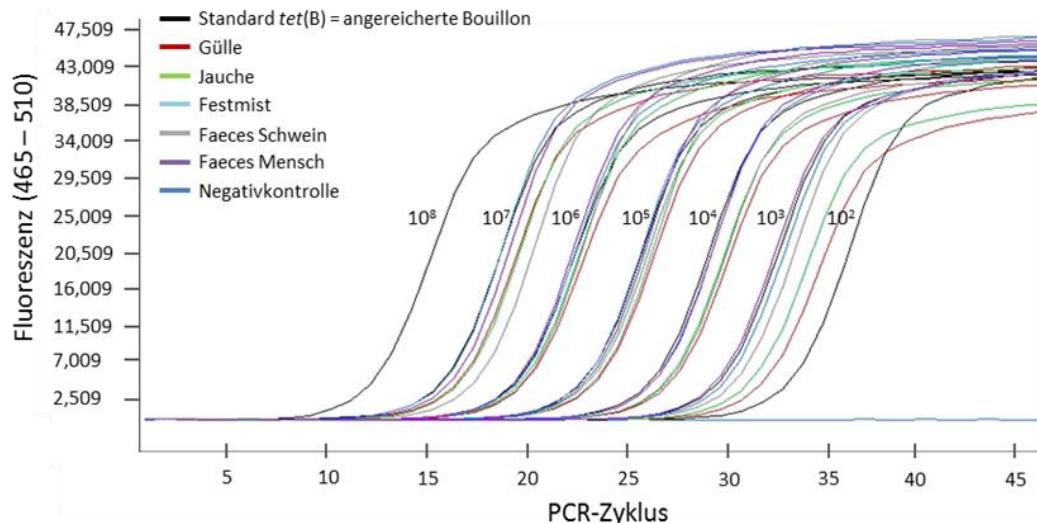
Tabelle 23 zeigt die Durchschnittswerte, die sich über alle Lightcycler-Läufe hinweg für den während der qPCR von der Software berechneten Fehler sowie für die Effizienz beim Nachweis der einzelnen Resistenzgene in den „Screening“- und „Tracking“-Proben ergaben. Demnach ergaben sich für den durchschnittlichen Error Werte zwischen 0,019 (im Falle von *tet(M)*) und 0,027 (*sul(II)* und 16S-rDNA). Die durchschnittliche Effizienz lag für alle getesteten Resistenzgene im angestrebten Bereich (vgl. Abschnitt III2.3.1), wobei sich prozentual gesehen der niedrigste Effizienzwert mit 91,2 % für *tet(A)*, der höchste für *qacE / qacEΔ1* (100,7 %) ergab.

**Tabelle 23: Durchschnittlicher Fehler und durchschnittliche Effizienz [± (Standardabweichung)] aller Lightcycler-Läufe (n = 158 pro Gen bzw. n = 39 für *sul(I)*) beim Resistenzgen-Nachweis mittels qPCR**

Resistenzgen	Error	Effizienz absolut	Effizienz %
<i>tet(A)</i>	<b>0,022</b> (0,01)	<b>1,823</b> (0,05)	<b>91,2</b>
<i>tet(B)</i>	<b>0,021</b> (0,01)	<b>1,969</b> (0,06)	<b>98,5</b>
<i>tet(M)</i>	<b>0,019</b> (0,01)	<b>1,942</b> (0,05)	<b>97,1</b>
<i>sul(I)</i>	<b>0,025</b> (0,01)	<b>1,924</b> (0,01)	<b>96,2</b>
<i>sul(II)</i>	<b>0,027</b> (0,01)	<b>1,989</b> (0,08)	<b>99,5</b>
<i>qacE / qacEΔ1</i>	<b>0,020</b> (0,01)	<b>2,014</b> (0,06)	<b>100,7</b>
16S-rDNA	<b>0,027</b> (0,01)	<b>1,827</b> (0,04)	<b>91,4</b>

### 1.2.4 „Matrixversuch“

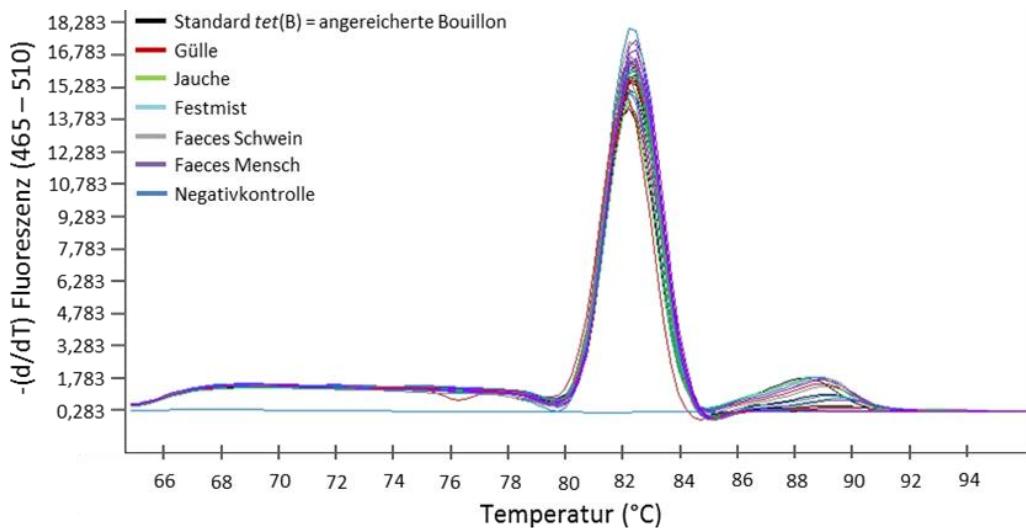
Abbildung 19 zeigt exemplarisch die Amplifikationskurven aus einem der beiden PCR-Läufe zum „Matrixversuch“ – aus Gründen der Übersichtlichkeit wird nur ein PCR-Ansatz dargestellt. En détail finden sich in der Abbildung die Kurven der DNA-Extrakte der *tet(B)*-enthaltenden angereicherten Standard-I-Bouillon, sowie ein Ansatz Extrakte der Verdünnungsstufen  $10^{-1}$  bis  $10^{-5}$  der bestrahlten und mit *E. coli* 2638 dotierten Probenmatrices.



**Abbildung 19:** qPCR-Amplifikation unterschiedlicher Proben des „Matrixversuches“

Schon an den Kurven lässt sich deutlich erkennen, dass sich die Verdünnungsstufen der jeweiligen Extrakte der Probenmatrices in räumlicher Nähe zum Standard, bestehend aus der *tet(B)*-haltigen Dotierungsboilllon, befinden, was darauf schlussfolgern lässt, dass das gesuchte Gen in ähnlichem Maße wie in der Bouillon amplifiziert wurde.

Abbildung 20 zeigt die Schmelzkurven-Analyse der Amplifikate aus Abbildung 19. Abgesehen von der Negativkontrolle, bei der aufgrund der ausgebliebenen Amplifikation von Genmaterial kein Produkt aufgeschmolzen wurde, zeigen alle Proben der qPCR ein einheitliches Muster, was bedeutet, dass stets das gleiche Produkt, im vorliegenden Fall das Resistenzgen *tet(B)* amplifiziert wurde.



**Abbildung 20: Schmelzkurven-Analyse der Amplifikate aus Abbildung 20**

In Tabelle 24 sind die Wiederfindungsraten in Prozent sowie die Standardabweichungen der jeweiligen Verdünnungsstufen der dotierten Extrakte der verschiedenen Matrices aus dem Vorversuch aufgelistet. In der letzten Spalte findet sich zudem die Gesamt-WFR für das jeweilige Untersuchungsmaterial. Die Matrices Gülle, Jauche und Schweinefaeces unterschieden sich hinsichtlich der ermittelten WFR kaum voneinander. Dagegen lag die WFR des Festmistes mit einem Wert von knapp 125 % über dem höchstens zu erwartenden Wert von 100 %. Die WFR in Faeces vom Menschen wurde im Versuch mit knapp 94 % beziffert. Bemerkenswert sind des Weiteren die relativ niedrigen WFR der Matrices Gülle und Schweinefaeces in der höchsten Konzentrationsstufe ( $10^8$  lg copies/g), sie lagen in beiden Fällen unter 40 %.

**Tabelle 24: Wiederfindungsraten [% ± (Standardabweichung)] für *tet(B)* in unterschiedlichen Matrices des „Matrixversuches“; alle Matrices im Doppelansatz in den Konzentrationsstufen  $10^8$  bis  $10^4$  lg copies/g analysiert**

Probenmatrix	<i>tet(B)</i> copies/ml					Mittlere WFR gesamt
	$10^8$	$10^7$	$10^6$	$10^5$	$10^4$	
Gülle	39,1 (23,8)	100,7 (20,8)	84,1 (11,6)	75,6 (8,6)	61,8 (23,2)	<b>72,2</b> (15,6)
Jauche	57,3 (4,6)	87,0 (5,3)	88,4 (10,1)	82,7 (10,9)	71,5 (19,1)	<b>77,4</b> (4,8)
Festmist	113,1 (41,5)	134,2 (42,6)	119,1 (30,7)	153,1 (58,4)	102,9 (15,9)	<b>124,5</b> (13,8)
Faeces Schwein	30,3 (6,7)	84,9 (12,4)	68,5 (7,3)	76,7 (9,6)	71,8 (18,3)	<b>66,4</b> (4,8)
Faeces Mensch	68,4 (8,2)	70,5 (28,4)	90,1 (12,5)	118,6 (34,3)	120,4 (35,7)	<b>93,6</b> (12,9)

### 1.2.5 Resistenzgen-Nachweis

Wie unter Abschnitt III2.2.3 beschrieben, wurden qPCR-Amplifikate aller für die qPCR-Standards verwendeten Referenzstämme (s. Abschnitt III1.1.10) sequenziert. Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden im Anschluss mittels NCBI BLAST® dahingehend überprüft, ob es sich tatsächlich um das gesuchte Gen handelte. Als Quelle der Referenzeinträge für die jeweiligen Gensequenzen diente im Falle der Tetrazyklinresistenzgene eine von Marylin C. Roberts auf der Website der University of Washington (USA) veröffentlichte Liste (<http://faculty.washington.edu/marilynr/tetweb4.pdf>, letztmals geändert im August 2015), im Falle der anderen Gene die Referenzsequenz der NCBI-Gendatenbank.

Tabelle 25 zeigt die Ergebnisse des Abgleiches der ermittelten Sequenzen der mutmaßlichen Resistenzgen-Amplifikate der Referenzstämme mit den entsprechenden Referenzeinträgen aus der Gendatenbank der NCBI – der detaillierte Abgleich der Nukleotidsequenzen findet sich im Anhang der Arbeit. In allen Fällen betrug die Übereinstimmungsrate der Sequenzen zwischen 99 und 100 %. Dabei kam es im Falle der Amplifikate des *tet(A)*- bzw. 16S-rRNA-Referenzstammes zu einer bzw. zwei Basenpaar-Abweichungen, alle anderen Sequenzen erwiesen sich als identisch in sämtlichen Basenpaaren.

**Tabelle 25: Übereinstimmungsraten der ermittelten Gensequenzen der qPCR-Amplifikate mutmaßlicher Resistenzgene mit Referenzeinträgen der NCBI-Gendatenbank**

Präsumtives Zielgen	Referenzstamm	Genbank-Eintrag	Übereinstimmung Nukleotidsequenz
16S-rRNA-Gen		KF756007.1	99 % (268/270 bp)
<i>qacE / qacEΔ1</i>		KM589496.1	100 % (69/69 bp)
<i>sul(I)</i>		KP899803.1	100 % (822/822 bp)
<i>sul(II)</i>	s. Tabelle 3	NG_041603.1	100 % (722/722 bp)
<i>tet(A)</i>		AF542061.1	99 % (887/888 bp)
<i>tet(B)</i>		AF326777.3	100 % (206/206 bp)
<i>tet(M)</i>		AF491293.1	100 % (171/171 bp)

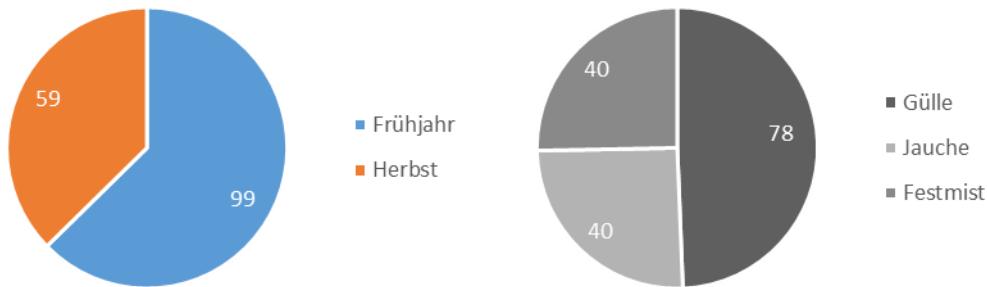
Zusätzlich wurden stichprobenartig auch qPCR-Amplifikate einzelner Feldproben zum Sequenzieren geschickt und die ermittelten Sequenzen anschließend mit denen der Amplifikate der Referenzstämme abgeglichen (auch hier ist jeweils eine detaillierte Gegenüberstellung der Sequenzen im Anhang abgebildet). Dabei war die Sequenz der Amplifikate der Probe „A6-11-13-S13“ (Monatsprobe November 2013 von Sentinel-Schwein Nr. 13 aus Betrieb A6) zu 100 % identisch zu der des *tet(A)*-Standards, die der Probe „A6-11-13-P1“ (gleiche Monatsprobe, gleicher Betrieb, Landwirt) ebenfalls 100 %ig gleich zum verwendeten *tet(B)*-Standard. Auch hinsichtlich *tet(M)* war die Sequenz des PCR-Amplifikates der Probe „E5-P2-3T2“ (eine Faecesprobe des Landwirtes während einer Tetrazyklin-Behandlung der Schweine im Januar 2014) identisch zu der des *tet(M)*-Standards. Auch die Sequenzübereinstimmung der qPCR-Amplifikate der Probe „M13-S1-1T0“ (Schwein Nr. 1, beprobt zu Beginn einer Sulfonamid-Behandlung) und des *sul(I)*-Standards lag bei 100 %. Bzgl. *sul(II)* wurden Amplifikate einer Feldprobe („M13-S4-1T4“, Behandlungsprobe von Schwein Nr. 4 aus Betrieb M13) sequenziert, die letztlich mit 99 % (716/722 bp) Übereinstimmung eine große Ähnlichkeit zur Sequenz der Amplifikate des verwendeten Standards aufwiesen. Selbiges gilt für *qacE / qacEΔ1*, wo sich im Sequenzabgleich zwischen Amplifikaten von Feldprobe („E5-P1-3T12“, Behandlungsprobe aus Betrieb M13, Betriebsleiter) und Standard eine 100 %ige Übereinstimmung ergab.

## 2 „Screening“-Teil der Studie

Im Folgenden sind zunächst verschiedene Ergebnisse aus dem „Screening“-Teil von „ABYS“ aufgeführt. Darunter fällt neben der Betrachtung des Probenrücklaufes die Darstellung der quantitativen Resistenzgenuntersuchungen in den unterschiedlichen Probenmatrices der insgesamt 58 konventionellen bzw. ökologischen Betriebe.

### 2.2 Probenrücklauf

Für das „Screening“ wurden insgesamt 158 Einzelproben gewonnen (99 im Frühjahr 2013 und 2014 und 59 im Herbst 2013 und 2014), darunter 78 Gülleproben, sowie je 40 Jauche- und 40 Festmist-Proben (vgl. Abbildung 21).



**Abbildung 21:** Übersicht der gewonnenen „Screening“-Proben (n = 158), geordnet nach Zeitpunkt (links) bzw. Probenart (rechts)

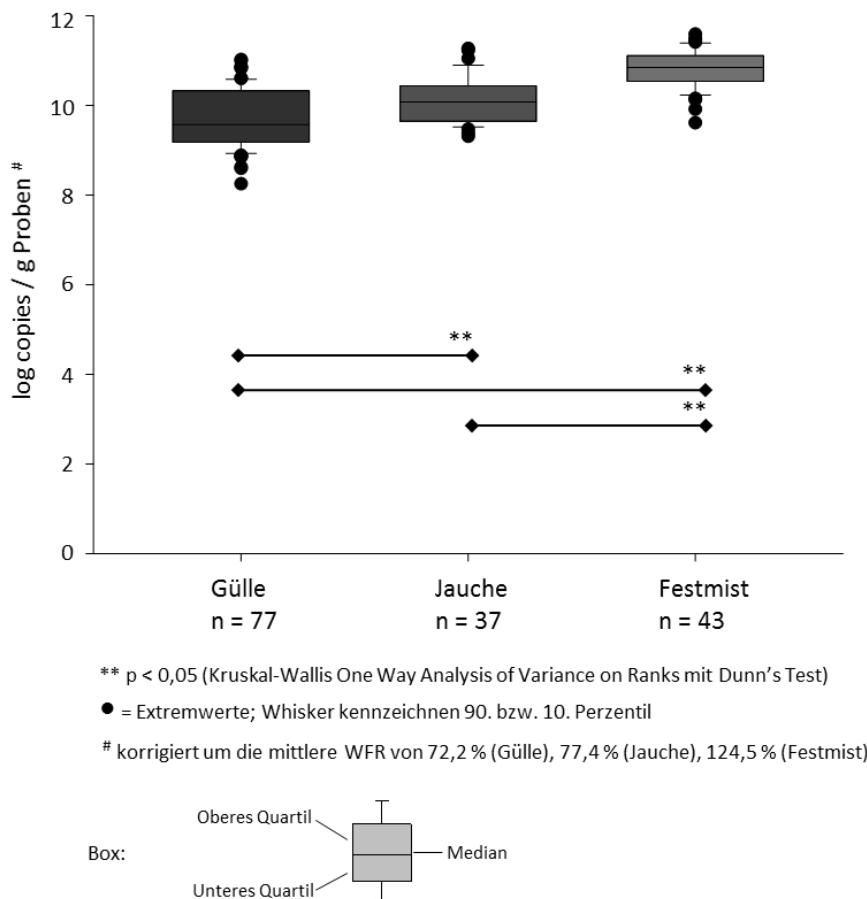
### 2.3 Quantifizierung von Antibiotikaresistenzgenen

Mittels qPCR wurden die DNA-Extrakte der im „Screening“-Teil gewonnenen Gülleproben der konventionellen Schweinehaltungsbetriebe sowie der Jauche- bzw. Festmistproben aus den ökologischen Schweinehaltungen quantitativ auf die Gehalte der Resistenzgene *tet*(A), *tet*(B), *tet*(M), *sul*(II), *qacE* / *qacEΔ1* sowie, zur Bestimmung der molekularbiologischen „Gesamtkeimzahl“-Äquivalente, die Menge an 16S-rDNA (= amplifizierte 16S-rRNA-Gene) hin untersucht. Die nachfolgenden Ergebnisse sind in Säulen- und Boxplot-Diagrammen dargestellt, in denen sich auch die jeweils gültigen Signifikanzniveaus, die Ausreißer-Werte und die angewandten statistischen Testverfahren wiederfinden.

### **2.3.1 Gesamtgehalte in Abhängigkeit von beprobter Matrix und Probenahmezeitpunkt**

#### **2.3.1.1 Molekularbiologisch bestimmte „Gesamtkeimzahl“ (16S-rDNA)**

Bei der quantitativen Erfassung der 16S-rRNA-Gene in den drei unterschiedlichen Arten von Probenmaterial erfolgte eine Korrektur um die mittlere WFR der jeweiligen Matrices um auszuschließen zu können, dass alleine Matrix-Unterschiede für Abweichungen in der detektierten molekularbiologischen „Gesamtkeimzahl“ verantwortlich zeichnen. Im direkten Vergleich der Ergebnisse der molekularbiologisch bestimmten „Gesamtkeimzahl“ anhand von bakterienspezifischen Universal-Primern, die auf die Amplifikation von 16S-rRNA-Genen hochkonservierter Regionen des bakteriellen Genoms abzielen, zeigten sich folgende Tendenzen (vgl. Abbildung 22): Im Festmist (Median bei 10,85 lg copies/g) wurden in der qPCR signifikant höhere Gen-Gehalte gemessen als in Jauche und Gülle. Weiterhin lag der Median der Jaucheproben mit 10,07 lg copies/g 0,5 lg-Stufen über dem der Güllen und war damit im direkten Vergleich ebenfalls signifikant höher. Hinsichtlich des Beprobungszeitpunkts zeigten sich bei keiner der Matrices statistisch relevante Unterschiede zwischen Frühjahrs- und Herbstproben.

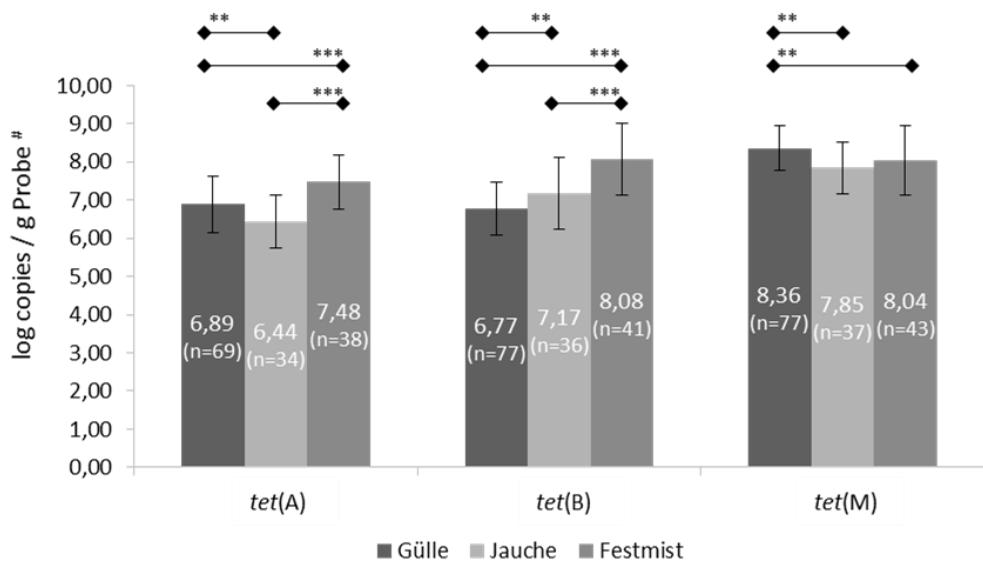


**Abbildung 22: 16S-rRNA-Gen-Gehalte in Gölle-, Jauche- und Festmistproben der „Screening“-Betriebe**

Da sich die drei beprobten Matrices trotz Einbeziehung der WFR in ihrer molekularbiologisch bestimmten „Gesamtkeimzahl“ signifikant voneinander unterschieden, wurden die ebenfalls um die WFR korrigierten Resistenzgen-Gehalte von Gölle-, Jauche- und Festmistproben in Abschnitt 2.3.1.4 ins Verhältnis zu ihrem 16S-rRNA-Gen-Gehalt gesetzt (relative Abundanz). Zusätzlich sind zu Beginn der entsprechenden Abschnitte auch die absolut gemessenen und um die WFR angepassten Gehalte der untersuchten Resistenzgene anhand von Säulendiagrammen dargestellt, einerseits, um den absoluten Austrag bei der Ausbringung als wirtschaftseigene Düngemittel besser einzuschätzen zu können, andererseits, um eine bessere Vergleichbarkeit mit anderen Studien zu gewährleisten. Auch beim Vergleich der Resistenzgen-Gehalte in der jeweils gleichen Matrix in Abhängigkeit vom Beprobungszeitpunkt (Herbst vs. Frühjahr) sind die absoluten und um die WFR korrigierten Konzentrationen angegeben, da hier keine signifikanten Unterschiede in der 16S-rRNA-Genkonzentration zwischen Herbst- und Frühjahrsproben auszumachen waren.

### 2.3.1.2 Resistenzgen-Gehalte – absolute Konzentrationen

Die um die WFR korrigierten Konzentrationen der drei untersuchten Tetrazyklinresistenzgene (Median-Werte) zeigt Abbildung 23. Daran lässt sich vorab zusammenfassend feststellen, dass die durchschnittlich höchsten Konzentrationen in den Matrices Gölle und Jauche beim Gen *tet(M)* gemessen wurden. An zweiter Stelle kommt bei den Gölle *tet(A)*, bei den Jaucheproben *tet(B)* zu liegen. Im Festmist war *tet(B)* das in der höchsten Konzentration detektierte Tetrazyklinresistenz-vermittelnde Gen, knapp vor *tet(M)*. Die mitunter unterschiedliche Anzahl an einbezogenen Proben beruht darauf, dass vereinzelt Proben aufgrund von unspezifischer Amplifikation in der qPCR von der statistischen Auswertung ausgeschlossen werden mussten.

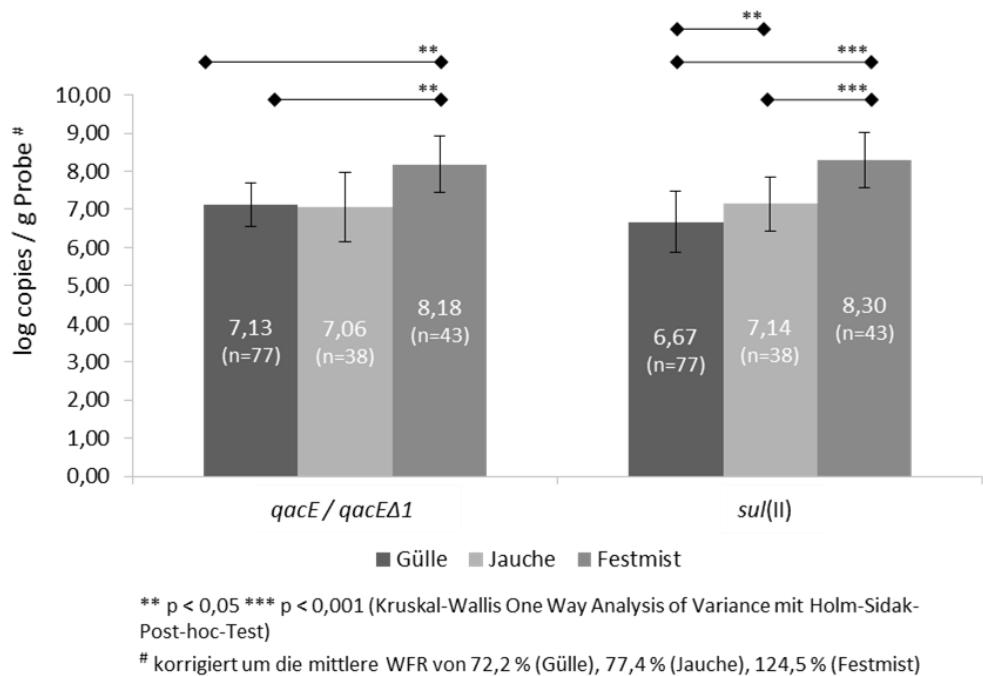


\*\* p < 0,05 \*\*\* p < 0,001 (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance mit Holm-Sidak-Post-hoc-Test)

# korrigiert um die mittlere WFR von 72,2 % (Gölle), 77,4 % (Jauche), 124,5 % (Festmist)

**Abbildung 23: Gehalte der Tetrazyklinresistenzgene *tet(A)*, *tet(B)* und *tet(M)* in Gölle-, Jauche- und Festmistproben der „Screening“-Betriebe**

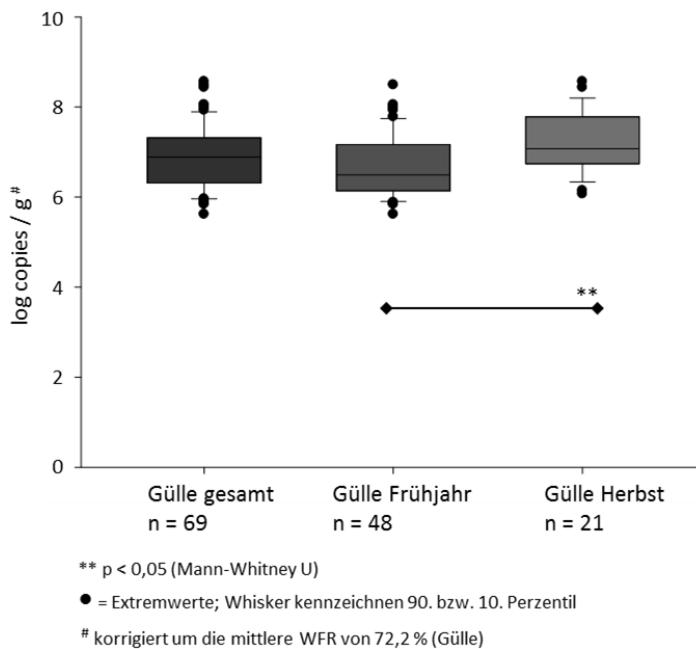
In Abbildung 24 sind die ebenfalls um die WFR korrigierten Gehalte (Median-Werte) von *qacE* / *qacEΔ1* und *sul(II)* dargestellt. Ähnlich wie bei den Tetrazyklinresistenzgenen war auch hier der Festmist die Matrix, in der die höchsten Konzentrationen gemessen wurden. Für *qacE* / *qacEΔ1* lagen die Konzentrationen in Gölle und Jauche etwa gleichauf. Hingegen wurde *sul(II)* in Jauche signifikant häufiger detektiert als in Gölle.



**Abbildung 24: Gehalte der Resistenzgene *qacE* / *qacE $\Delta$ 1* und *sul(II)* in Gölle-, Jauche- und Festmistproben der „Screening“-Betriebe**

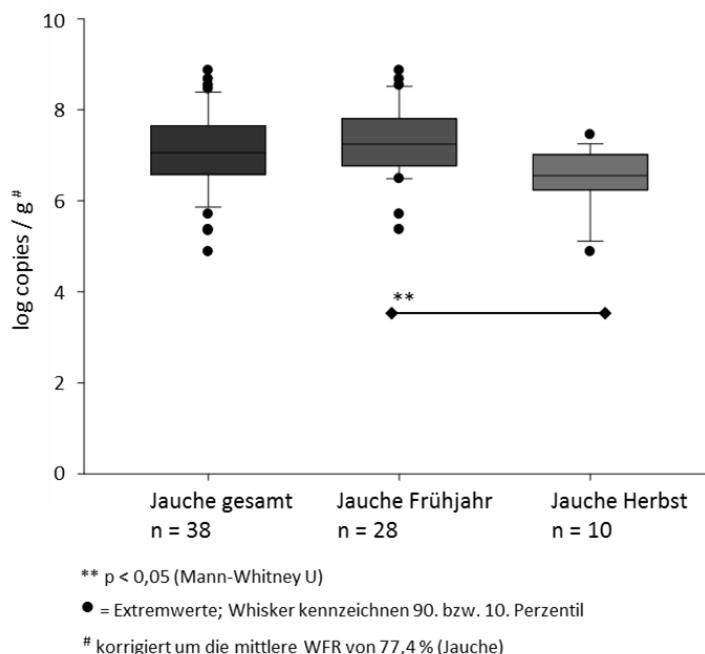
### 2.3.1.3 Resistenzgene in Abhängigkeit vom Beprobungszeitpunkt

Der Zeitpunkt der Probenahme nahm signifikant Einfluss auf die *tet(A)*-Gehalte: In allen drei Probenmatrices war die mittlere um die WFR korrigierte Konzentration dieses Resistenzgens jeweils in den Herbstproben höher angesiedelt als in den Frühjahrsproben. Beispielhaft ist dies exemplarisch anhand der Matrix Gölle in den Boxplots aus Abbildung 25 dargestellt: Das Testverfahren nach Mann Whitney U ergab im Median für die Herbstproben signifikant höhere Werte als für die Frühjahrsproben (7,08 zu 6,49 lg copies/g). Ähnliches gilt für Jauche (Herbst 7,07 lg copies/g, Frühjahr 6,30 lg copies/g), für Festmist war der Unterschied zwischen Herbst- (8,47 lg copies/g) und Frühjahrsproben (7,36 lg copies/g) hochsignifikant (Daten nicht dargestellt). Für *tet(B)* sowie auch für *tet(M)* konnten keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen den Beprobungszeitpunkten festgestellt werden.



**Abbildung 25: *tet(A)*-Gehalte in Gölleproben in Abhängigkeit vom Beprobungszeitpunkt**

Ein signifikanter Unterschied war auch zwischen den *qacE* / *qacEΔ1*-Gehalten der Jaucheproben messbar, die im Frühjahr bzw. im Herbst auf den „Screening“-Betrieben gezogen wurden. Abbildung 26 verdeutlicht, dass die Frühjahrsproben mit einem Median von 7,25 lg copies/g auf einem höheren Niveau angesiedelt waren als die Herbstproben, deren Median 6,55 lg copies/g betrug.



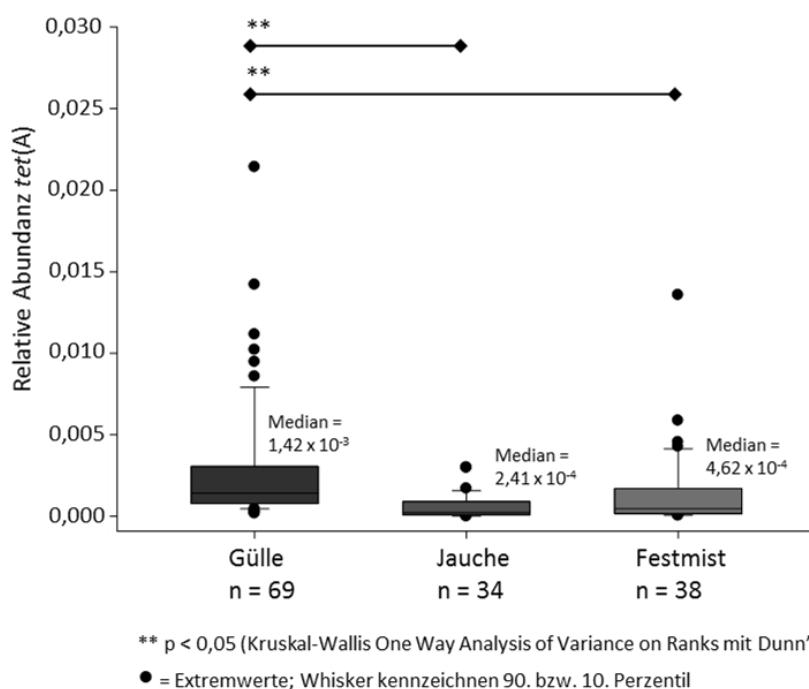
**Abbildung 26: *qacE* / *qacEΔ1*-Gehalte in Jauche in Abhängigkeit vom Beprobungszeitpunkt**

### 2.3.1.4 Resistenzgen-Gehalte – relative Abundanzen

#### *tet(A)*

Die Probenmatrix Gölle wies in signifikantem Maße höhere relative Abundanz von *tet(A)* auf als die Matrices Jauche und Festmist (dargestellt in Abbildung 27).

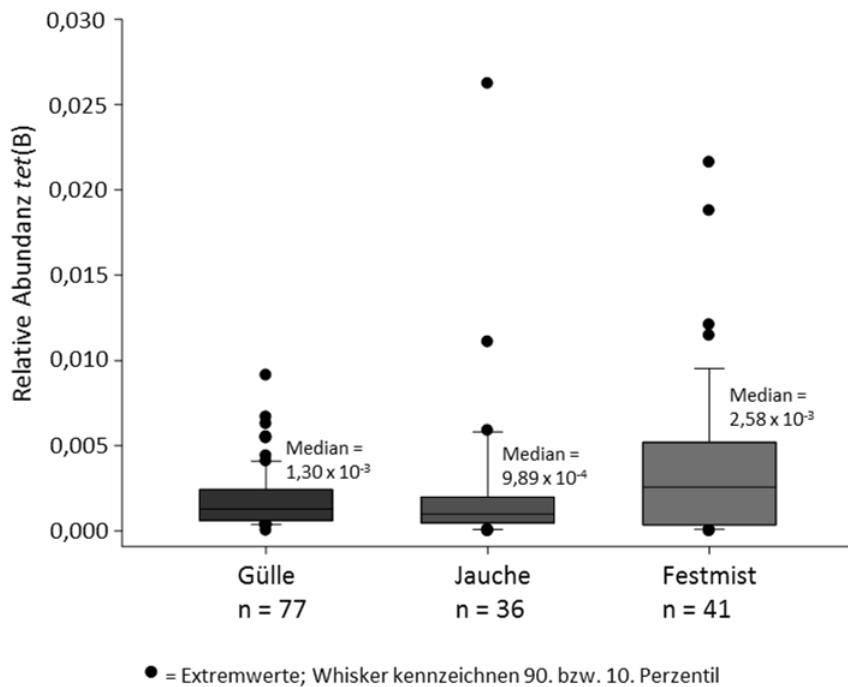
Beim Vergleich der absolut gemessenen und um die WFR korrigierten Konzentrationen wurden beim Festmist die meisten *tet(A)*-Gene gemessen, die Konzentrationen waren mit einem Median von 7,48 lg copies/g signifikant höher als in den untersuchten Gölle- (6,89 lg copies/g) und Jaucheproben (6,44 lg copies/g).



**Abbildung 27: Relative Abundanzen der *tet(A)*-Gehalte in Gölle-, Jauche- und Festmistproben aus dem „Screening“**

#### *tet(B)*

Die relativen Abundanzen der *tet(B)*-Gehalte der untersuchten „Screening“-Proben sind in Abbildung 28 dargestellt. Während hinsichtlich der absolut ermittelten Konzentrationen im Festmist die durchschnittlich höchsten Werte aller beprobten Matrices gemessen wurden – der Median lag bei 8,08 lg copies/g und damit signifikant höher als bei Gölle- (6,78 lg copies/g) und Jaucheproben (7,17 lg copies/g) – ergaben sich bei Betrachtung der relativen Abundanz für *tet(B)* keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den Gen-Gehalten der unterschiedlichen Matrices mehr.

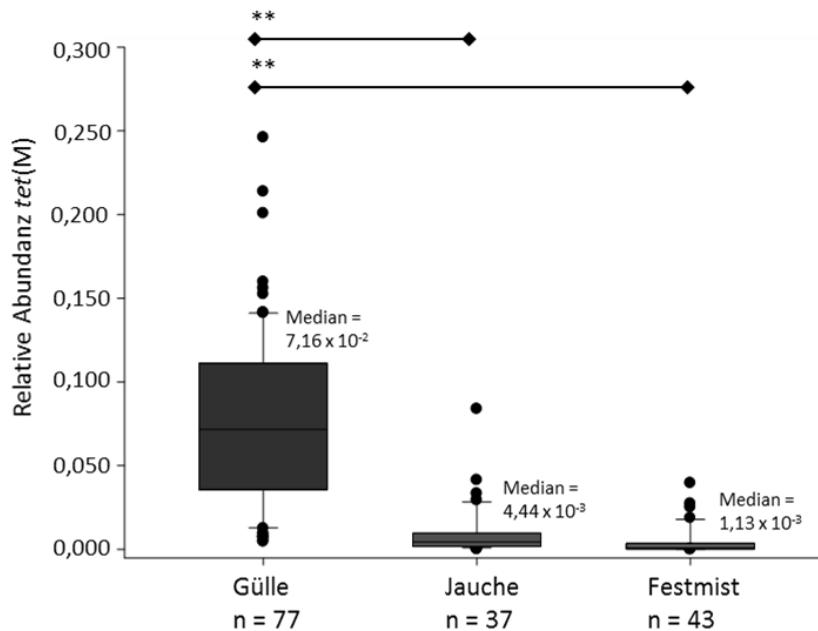


**Abbildung 28: Relative Abundanzen der *tet(B)*-Gehalte in Gölle-, Jauche- und Festmistproben aus dem „Screening“**

#### *tet(M)*

Wie aus Abbildung 29 hervorgeht, wurden *tet(M)*-Gene in den Gölleproben mit signifikant höherer relativer Abundanz detektiert als in den Matrices Jauche und Festmist. Generell war die Abundanz dieses Gens im Vergleich zu den anderen untersuchten Resistenzgenen deutlich höher ausgeprägt, weswegen für das Boxplot-Diagramm aus Abbildung 29 auch eine andere Skalierung gewählt wurde als bei der Darstellung der übrigen relativen Abundanzen.

Dieser Sachverhalt trifft auch auf die absolut gemessenen Konzentrationen zu: Die im Durchschnitt höchsten Konzentrationen des Resistenzgens *tet(M)* wurden in Gölle nachgewiesen, der Median betrug 8,39 lg copies/g (Mittelwert 8,45) und war signifikant erhöht im Vergleich zu den untersuchten Jauche- und Festmistproben, in denen der Median mit 7,85 bzw. 8,06 lg copies/g beziffert wurde.



\*\*  $p < 0,05$  (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks mit Dunn's Test)

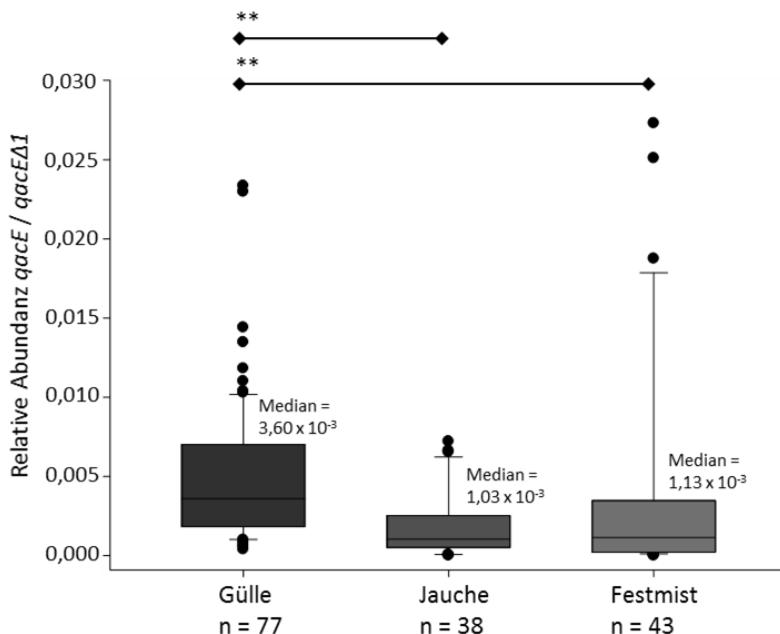
● = Extremwerte; Whisker kennzeichnen 90. bzw. 10. Perzentil

**Abbildung 29: Relative Abundanzen der *tet*(M)-Gehalte in Gölle-, Jauche- und Festmistproben aus dem „Screening“**

#### *qacE / qacEΔ1*

Wie schon bei *tet*(A) und *tet*(M) war die relative Abundanz von *qacE / qacEΔ1* in den Proben der Matrix Gölle signifikant erhöht im Vergleich zu Jauche- und Fesmistproben (s. Abbildung 30).

Betrachtet man hingegen die absolut ermittelten Konzentrationen, so war der höchste Median der drei unterschiedlichen Probenarten dem Festmist zuzuordnen, er betrug 8,18 lg copies/g. Die Gehalte dieser Matrix lagen damit signifikant höher als die gemessenen Konzentrationen in den Gölle- (7,13 lg copies/g) bzw. Jaucheproben (7,06 lg copies/g).



\*\*  $p < 0,05$  (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks mit Dunn's Test)

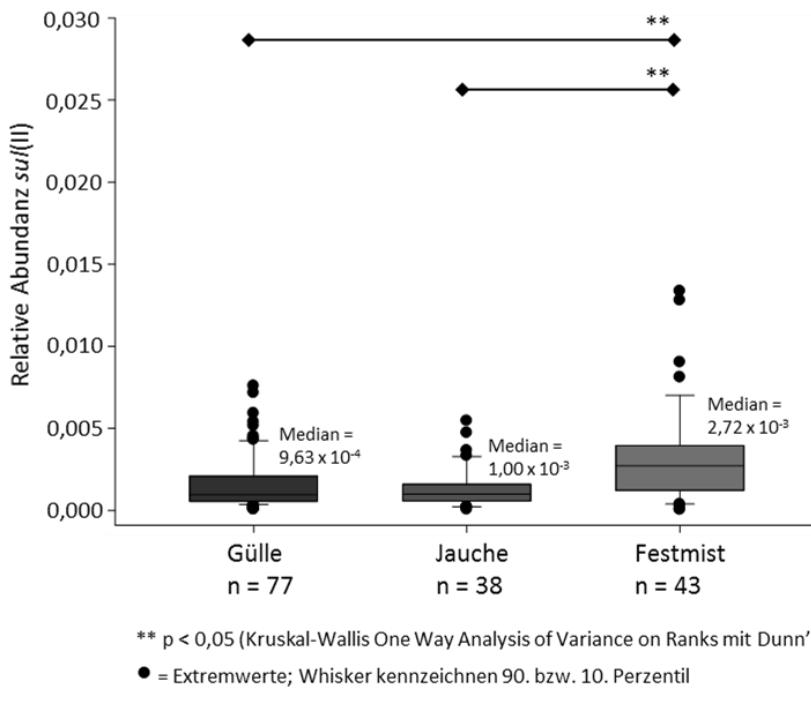
● = Extremwerte; Whisker kennzeichnen 90. bzw. 10. Perzentil

**Abbildung 30: Relative Abundanzen der *qacE* / *qacEΔ1*-Gehalte in Gölle-, Jauche- und Festmistproben aus dem „Screening“**

#### *sul(II)*

Die Ergebnisse der in den „Screening“-Proben untersuchten *sul(II)*-Gehalte wichen von denen der übrigen Resistenzgene ab: Die höchste relative Abundanz wurde hier in den Proben der Matrix Festmist ermittelt, sie lag auf signifikant höherem Niveau als in den Gölle- und Jaucheproben (vgl. Abbildung 31).

Die Bestimmung der absoluten Konzentrationen des Sulfonamidresistenzgens *sul(II)* lieferte ebenfalls die höchsten Werte für die Matrix Festmist, der Median lag hier bei 8,30 lg copies/g. Sie waren damit signifikant höher als in den Gölleproben, aber auch als in den Jauchen, der anderen Probenmatrix ökologischer Betriebe. Der Median der ermittelten Konzentrationen der Letztgenannten lag bei 7,14 lg copies/g, womit diese immer noch höher waren als die *sul(II)*-Gehalte in den Gölleproben (6,67 lg copies/g).



**Abbildung 31: *sul(II)*-Gehalte in Gölle-, Jauche- und Festmistproben aus dem „Screening“**

### 2.3.2 Selektion

Im folgenden Abschnitt dieser Arbeit wurde überprüft, ob der Einsatz der Wirkstoffklassen Tetrazykline und Sulfonamide in den beprobenen „Screening“-Betrieben eine selektierende Wirkung auf die Abundanz der Tetrazyklinresistenzgene *tet(A)*, *tet(B)* und *tet(M)* respektive auf *sul(II)* hatte. Zur Berechnung der folgenden Ergebnisse wurden aufgrund der besseren Vergleichbarkeit der beiden Matrices nur die konventionellen Betriebe repräsentierenden Gölleproben sowie die Jaucheproben der ökologisch wirtschaftenden Betriebe herangezogen. Für die Gesamtheit dieser Proben hatten sich im vorigen Abschnitt signifikante Unterschiede für *tet(A)*, *tet(M)* und *qacE / qacEΔ1* ergeben, nicht aber für *tet(B)* und *sul(II)*. Im Folgenden wurden die relativen Abundanzen unterschiedlicher Resistenzgene der Gesamtheit derjenigen Betriebe, die mindestens einmal ein Antibiotikum der jeweiligen potenziell selektierenden Wirkstoffklasse angewandt hatten, verglichen mit allen Betrieben, in denen die Wirkstoffklasse nicht eingesetzt worden war. Bei den nicht-einsetzenden Schweinehaltungen wurde zudem weiter zwischen konventioneller und ökologischer Haltungsform unterschieden.

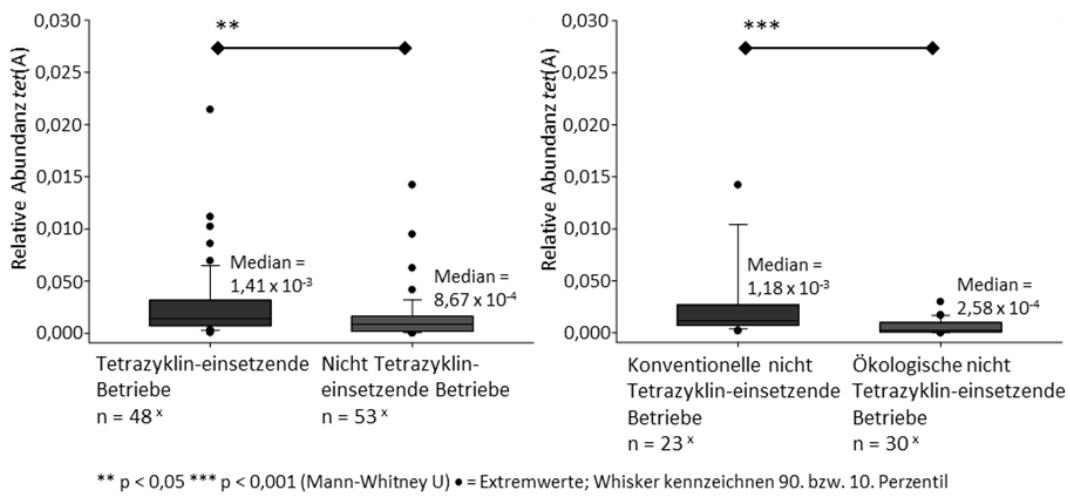
### 2.3.2.1 Tetrazyklinresistenzgene

In 26 der 58 „Screening“-Betriebe kamen während des Betrachtungszeitraumes Tetrazykline zum Einsatz, wobei sich unter diesen 26 Betrieben nur 3 ökologische Betriebe befanden. Im Umkehrschluss wurde diese Wirkstoffklasse in 32 Betrieben (12 konventionelle sowie 20 ökologische) nicht angewendet.

#### *tet(A)*

Sowohl in der relativen Abundanz (s. Abbildung 32, links) als auch in den absoluten Konzentrationen waren die *tet(A)*-Gehalte in Proben von Betrieben, in denen während des Betrachtungszeitraumes mindestens einmal Tetrazykline zum Einsatz kamen (Median absolut bei 6,96 lg copies/g) signifikant höher als in Betrieben, in denen diese Antibiotika nicht angewendet wurden (6,47 lg copies/g).

Betrachtet man nur die nicht-einsetzenden Betriebe, unterscheidet aber nach konventionellen und ökologischen Schweinehaltungsbetrieben, so ergeben sich in der relativen Abundanz abermals signifikante Unterschiede in den Gehalten (vgl. Abbildung 32, rechts): In der erstgenannten Vergleichsgruppe konnte verhältnismäßig mehr *tet(A)* detektiert werden als bei den nicht Tetrazyklin-einsetzenden ökologischen Betrieben. Bei den absolut ermittelten Konzentrationen hingegen unterschied sich der Median der untersuchten Proben der beiden Betriebsformen nicht voneinander (jeweils 6,47 lg copies/g).

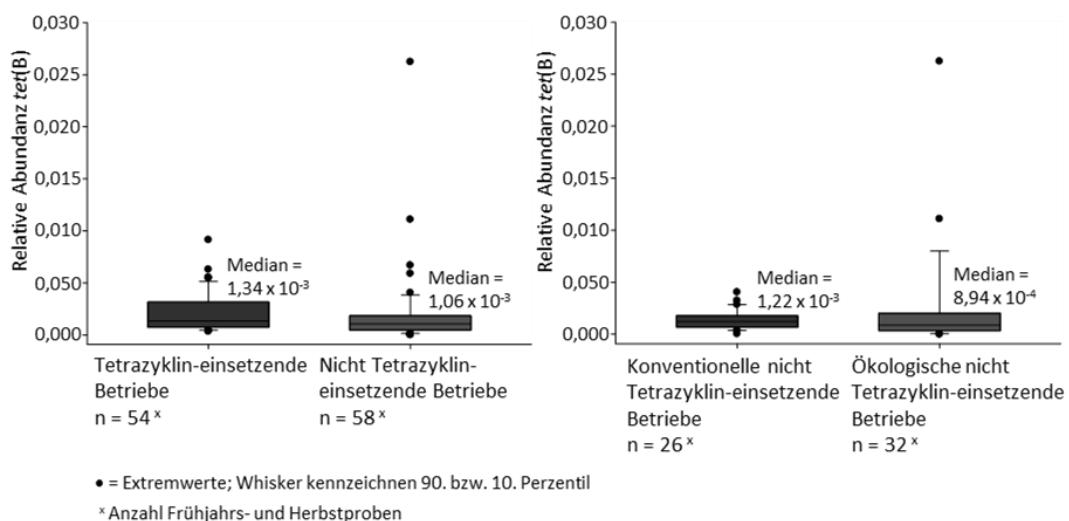


**Abbildung 32: Relative Abundanzen der *tet(A)*-Gehalte in Faeces von Schweinen aus Betrieben mit unterschiedlichem Management („Screening“); links: Tetrazyklin-Einsatz ja / nein, rechts: konventionelle und ökologische Betriebe ohne Tetrazyklin-Einsatz**

### *tet(B)*

Wie aus Abbildung 33 (links) ersichtlich wird, konnte für die relative Abundanz an *tet(B)* kein statistisch relevanter Unterschied zwischen Tetrazyklin-einsetzenden und nicht Tetrazyklin-einsetzenden Betrieben festgestellt werden. Scheinbar ebenfalls unabhängig von etwaigem Tetrazyklin-Einsatz auf den Betrieben waren auch die absolut ermittelten Konzentrationen in etwa auf dem gleichen Niveau (Median einsetzender Betriebe  $6,94 \text{ lg copies/g}$ ; Median nicht-einsetzender Betriebe  $6,80 \text{ lg copies/g}$ ).

Gleicher Sachverhalt ergibt sich für die Unterscheidung zwischen konventionellen und ökologischen nicht Tetrazyklin-einsetzenden Betrieben: Der Median der Proben konventioneller Betriebe betrug  $6,49 \text{ lg copies/g}$  und war damit zwar mehr als eine halbe lg-Stufe niedriger als bei den Proben der ökologischen Betriebe ( $7,01 \text{ lg copies/g}$ ), jedoch ohne statistisch nachweisbare Signifikanz. Auch bei Betrachtung der relativen Abundanz ergaben sich keine Unterschiede zwischen den beiden Vergleichsgruppen (vgl. Abbildung 33, rechts).



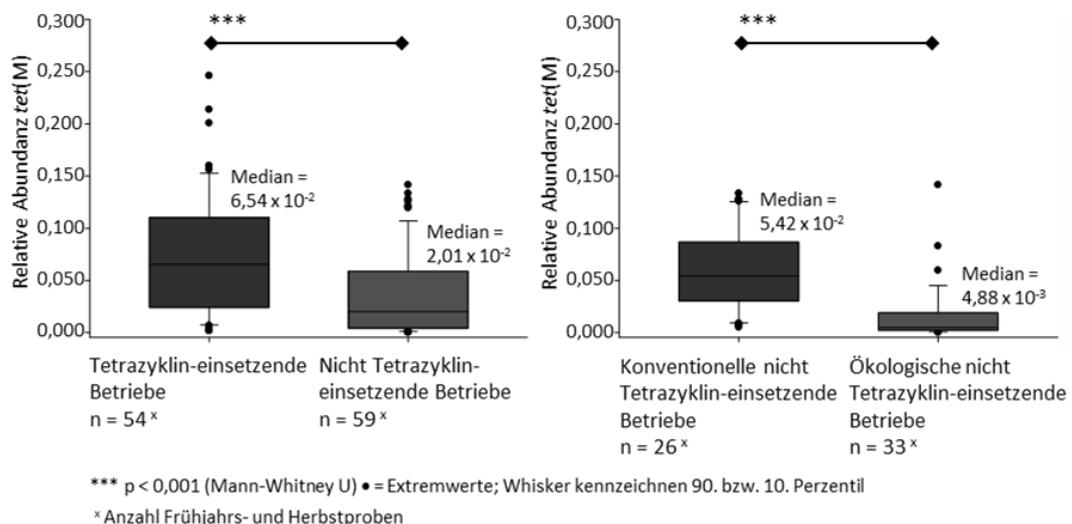
**Abbildung 33: Relative Abundanzen der *tet(B)*-Gehalte in Faeces von Schweinen aus Betrieben mit unterschiedlichem Management („Screening“); links: Tetrazyklin-Einsatz ja / nein, rechts: konventionelle und ökologische Betriebe ohne Tetrazyklin-Einsatz**

### *tet(M)*

Ähnlich wie schon bei *tet(A)* erwies sich die relative Abundanz an *tet(M)* in den Proben Tetrazyklin-einsetzender „Screening“-Betriebe signifikant erhöht im Vergleich zu Betrieben, bei denen diese Antibiotika nicht zur Anwendung

gekommen waren (Abbildung 34, links – auch an dieser Stelle sei kurz auf die abweichende Skalierung der y-Achse des Boxplot-Diagramms hingewiesen). Zum gleichen Ergebnis kommt man bei Betrachtung der absoluten Konzentrationen in den Proben der beiden Vergleichsgruppen, deren Median 8,61 lg copies/g (Tetrazyklin-einsetzend) bzw. 7,95 lg copies/g (nicht Tetrazyklin-einsetzend) betrug.

Beim Vergleich zwischen konventionellen nicht-einsetzenden und ökologischen nicht-einsetzenden Betrieben konnten ebenfalls ein signifikanter Unterschied festgemacht werden: Sowohl hinsichtlich ihrer relativen Abundanz (s. Abbildung 34, links), als auch absolut waren die *tet(M)*-Gehalte der Proben konventioneller Schweinehaltungen (Median 8,21 lg copies/g) auf signifikant höherem Niveau angesiedelt als in Proben, die auf ökologischen Betrieben gezogen wurden (7,87 lg copies/g).



**Abbildung 34: Relative Abundanzen der *tet(M)*-Gehalte in Faeces von Schweinen aus Betrieben mit unterschiedlichem Management („Screening“); links: Tetrazyklin-Einsatz ja / nein, rechts: konventionelle und ökologische Betriebe ohne Tetrazyklin-Einsatz**

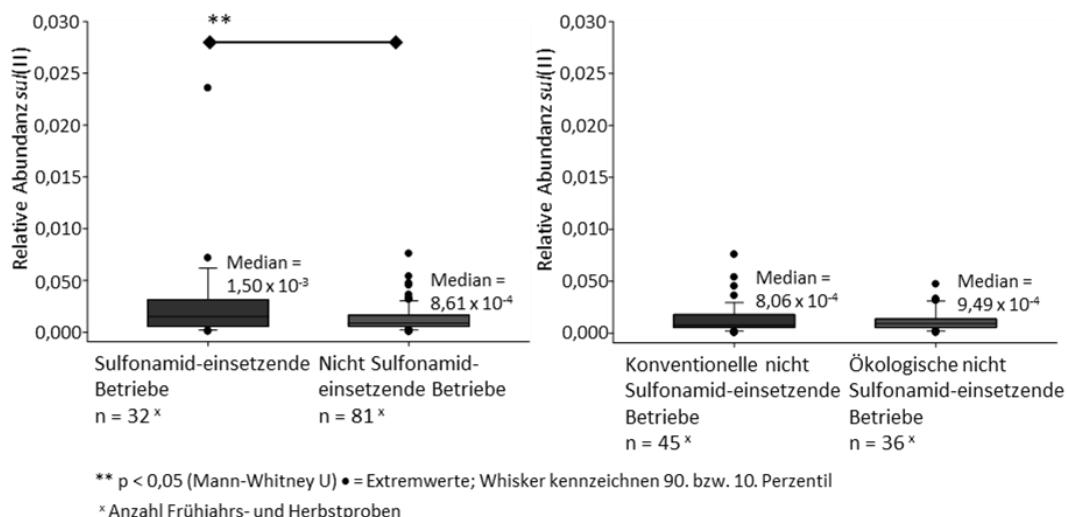
### 2.3.2.2 Sulfonamidresistenzgen *sul(II)*

In insgesamt 15 von 58 „Screening“-Betrieben kamen mindestens einmal Sulfonamide im Schweinestall zur Anwendung. Dabei handelte es sich um 13 konventionelle und 2 ökologische Schweinehaltungen.

Wie aus den Boxplots im linken Teil von Abbildung 35 hervorgeht, lag die relative Abundanz an *sul(II)* in den untersuchten Proben von Betrieben, auf denen

Sulfonamide regelmäßige Anwendung fanden, signifikant höher als in Proben nicht Sulfonamid-einsetzender Betriebe. Bei Betrachtung der absolut ermittelten Konzentrationen lagen die Betriebe mit Median-Werten von  $6,94 \text{ lg copies/g}$  bzw.  $6,78 \text{ lg copies/g}$  ohne statistisch messbare Signifikanzunterschiede in etwa gleichauf.

Die relative *sul(II)*-Abundanz in Proben nicht Sulfonamid-einsetzender konventioneller Betriebe unterschied sich im Vergleich zu den nicht-einsetzenden ökologischen Betrieben nicht signifikant (s. Abbildung 35, rechts). Hingegen waren die absolut gemessenen *sul(II)*-Gehalte in den Proben nicht-einsetzender ökologischer Betriebe im Vergleich zu den nicht-einsetzenden konventionellen Betrieben um mehr als eine halbe lg-Stufe, und damit statistisch signifikant, erhöht: Bei Erstgenannten lag der Median bei  $7,12 \text{ lg copies/g}$ , bei letzteren betrug dieser Wert nur  $6,48 \text{ lg copies/g}$ .



**Abbildung 35: Relative Abundanzen der *sul(II)*-Gehalte in Faeces von Schweinen aus Betrieben mit unterschiedlichem Management („Screening“); links: Sulfonamid-Einsatz ja / nein, rechts: konventionelle und ökologische Betriebe ohne Sulfonamid-Einsatz**

### 3 „Tracking“-Teil der Studie

Im „Tracking“-Teil der „ABYS“-Studie wurden 130 Schweine und parallel dazu deren Landwirte sowie enge Kontaktpersonen des Landwirtes aus sechs verschiedenen Betrieben (Auflistung und Hintergrundinformationen s. Tabelle 4) während der Mast über einen Zeitraum von mehreren Monaten regelmäßig sowie anlassbezogen bei Behandlungen mit Antibiotika beprobt. Gleichzeitig wurden die Antibiotikaeinsatzdaten aller Betriebe erhoben. Gemessen wurden die Konzentrationen (lg copies/g) verschiedener Antibiotikaresistenzgene in den Faeces von Tier und Mensch sowie in einem weiteren, nicht selbst bearbeiteten Studienteil teils auch die Konzentrationen von Antibiotika (ng/g) (vgl. Diskussion, Abschnitt V2.2.1). Anhand der Indikatorsspezies *E. coli* wurde mittels molekularbiologischer Verwandtschaftsanalysen die genotypische Ähnlichkeit zwischen Isolaten von Tier bzw. Landwirt / Kontaktperson bestimmt, bei besonders ähnlichen *E. coli*-Isolaten zudem Übereinstimmungen und Unterschiede der Resistenzmuster dieser herausgearbeitet. Die Erfassung von Resistenzdaten erfolgte bis hin zum Schlachthof, wo durch Beprobung von Fleisch der „Tracking“-Tiere der phäno- und genotypische Resistenzstatus der *E. coli* zum Zeitpunkt der Schlachtung ermittelt wurde.

#### 3.1 Antibiotikaeinsatz

##### 3.1.1 Betrieb A6

Zwischen Juli 2013 und Juni 2014 wurden auf dem konventionellen Mastbetrieb mit dem Code A6 insgesamt drei Durchgänge beprobt. Das allgemeine Beprobungsschema während Antibiotika-Behandlungen wurde bereits in Abbildung 11 dargestellt, der im Weiteren verwendete Code für den Beprobungszeitpunkt setzt sich aus einem „T“ für „Tag der Behandlung“ und einer Zahl, die den Behandlungstag widerspiegelt, zusammen. Die Eckpunkte von Antibiotika-Behandlungen über einen Zeitraum von 16 Tagen in Durchgang eins (S1 bis S10) sind im Folgenden chronologisch aufgelistet und schematisch in Abbildung 36 dargestellt: Sentinel-Schwein S8 wurde über zwei aufeinander-folgende Tage mit Amoxicillin-Trihydrat i.m. (Diagnose unbekannt) behandelt. Außerdem wurden alle zehn Tiere über drei Tage hinweg oral mit Colistinsulfat (Diagnose ebenfalls unbekannt) sowie ebenfalls alle Tiere über einen Zeitraum von sechs Tagen, wiederum oral, mit Tylosintartrat aufgrund der Diagnose „Durchfall“ therapiert.

Tag	Probencode	Behandlungseckpunkte	Bepropte Objekte
0		07-13	S1 - S10, P1, P2
1		Start Behandlung von S8 [Amoxicillin-Trihydrat]	
2		Stopp Behandlung	
3			
4	1T3		S7, S8, S10, P1, P2
5			
6	1T5	Start Behandlung S1 - S10 [Colistinsulfat]	S7, S8, S10
7			
8	2T2	Stopp Behandlung	S1, S3, S7, S8, S10, P1, P2
9			
10			
11	2T4	Start Behandlung S1 - S10 [Tylosintartrat]	S1, S3, S7, S8, S10, P1, P2
12			
13			
14	3T3		S1, S3, S7, S8, S10, P1, P2
15			
16		Stopp Behandlung	
17			
18	3T7		S1, S3, S7, S8, S10, P1, P2
19			
20			
21	3T10		S1, S3, S7, S8, S10, P1, P2

**Abbildung 36: Behandlungs- / Probenahmeschema, Betrieb A6, erster Mastdurchgang (Sentinel-Schweine S1 bis S10)**

Eine 23 Tage andauernde Behandlung aller Tiere im zweiten Mastdurchgang (S11 bis S20) aufgrund von „Durchfall“ erfolgte unter häufigem Präparatewechsel (vgl. Abbildung 37): Zunächst wurden die Schweine über sechs Tage oral mit Amoxicillin-Trihydrat behandelt. Gleich im Anschluss folgte eine dreitägige Behandlung mit Tylosintartrat, ebenfalls oral. Wiederum unmittelbar darauf therapierte man die Tiere zehn Tage lang oral mit Colistinsulfat, ehe letztlich (mit einem Tag Unterbrechung) über einen Zeitraum von vier Tagen abermals oral Tylosintartrat verabreicht wurde.

Tag	Probencode	Behandlungseckpunkte	Beprobte Objekte
0	11-13	Start Behandlung von S11- S20	S11, S13, S17, S18, S20, P1, P2
1	1T1	[Amoxicillin-Trihydrat]	
2			
3			
4	1T4	Stopp Behandlung	S11, S13, S17, S18, S20, P1, P2
5		Start Behandlung von S11- S20	
6		[Tylosintartrat]	
7			
8	1T8	Stopp Behandlung	S11, S13, S17, S18, S20, P1, P2
9		Start Behandlung von S11- S20	
10		[Colistinsulfat]	
11			
12	1T12		S11, S13, S17, S18, S20, P1, P2
13			
14			
15			
16			
17			
18	1T18	Stopp Behandlung	S11 - S20, P1, P2
19			
20		Start Behandlung von S11- S20	
21		[Tylosintartrat]	S11, S13, S17, S18, S20, P1, P2
22			
23		Stopp Behandlung	
24			
25	1T25		S11, S13, S17, S18, S20, P1, P2

**Abbildung 37: Behandlungs- / Probenahmeschema, Betrieb A6, zweiter Mastdurchgang (Sentinel-Schweine S11 bis S20)**

Wie schematisch in Abbildung 38 dargestellt, erfolgte eine Therapie der Schweine des dritten Durchgangs (S21 bis S30), abermals aufgrund der Diagnose „Durchfall“, mit dem Wirkstoff Tylosintartrat oral über sechs Tage.

Tag	Probencode	Behandlungseckpunkte	Beprobte Objekte
0	03-14		S21 - S30, P1, P2
1			
2			
3		Start Behandlung S21 - S30 [Tylosintartrat]	
4			
5	4T2		S21 - S25, P1, P2
6			
7	4T4	Stopp Behandlung	S21 - S25, P1, P2
8			
9			
10			
11			
12			
13	4T10		S21 - S30, P1, P2

**Abbildung 38: Behandlungs- / Probenahmeschema, Betrieb A6, dritter Mastdurchgang (Sentinel-Schweine S21 bis S30)**

Neben den für die einzelnen Mastdurchgänge aufgeführten Antibiotika wurden andere Mastdurchgänge auf Betrieb A6 zudem mit Florfenicol therapiert.

### 3.1.2 Betrieb A21

A21 ist ein konventioneller Mast-Betrieb. Im Zeitraum von Februar 2014 bis zum September des gleichen Jahres wurden zwei Mastdurchgänge mit insgesamt 20 Tieren beprobt. Die Tiere S1 bis S10 (erster Mastdurchgang) wurden aufgrund der Diagnose „Enteritis“ während des Beobachtungszeitraums für insgesamt sieben Tage am Stück oral mit Colistinsulfat behandelt (vgl. Abbildung 39).

Tag	Probencode	Behandlungseckpunkte	Beprobte Objekte
0	02-14	Start Behandlung von S1 - S10	S1 - S10, P1, P2
1	1T1	[Colistinsulfat]	S1 - S5, P1, P2
2	1T2		S1 - S5, P1, P2
3			
4			
5	1T5		S1 - S5, P1, P2
6		Stopp Behandlung	
7			
8			
9			
10			
11			
12	1T12		S1 - S5, P1, P2

**Abbildung 39: Behandlungs- / Probenahmeschema, Betrieb A21, erster Mastdurchgang (Sentinel-Schweine S1 bis S10)**

Während des zweiten Mastdurchganges (Tiere S11 bis S20) fand keine Therapie mit antibiotischen Wirkstoffen statt. Jedoch kam während des Beprobungszeitraums von Februar bis September 2014 bei einem anderen Durchgang ohne Studentiere Tylosinphosphat zum Einsatz.

### 3.1.3 Betrieb E5

Wie Tabelle 4 zu entnehmen ist, handelt es sich bei „Tracking“-Betrieb E5 um einen konventionellen „Kombi“-Betrieb, das heißt, dass die Schweine in dieser landwirtschaftlichen Nutztierhaltung nicht nur ausgemästet, sondern auch bereits dort aufgezogen werden. Die Ferkel von E5 stammen aus eigener Nachzucht, nach dem Absetzen im Alter von ca. vier Wochen erfolgt die Aufzucht in den ersten Wochen in räumlich separierten Flatdeck-Abteilen.

Was den Einsatz von Antibiotika auf diesem Betrieb betrifft, wird bei jedem neuen Mastdurchgang ein striktes Behandlungsschema eingehalten: Am ersten Lebenstag werden die Tiere einmalig intramuskulär (i.m.) mit Oxytetrazyklinhydrat (20 mg/kg Körpergewicht) behandelt, als „Diagnose“-Stellung wurde den Aufzeichnungen zur Arzneimittelanwendung wiederholt „Pneumonie-Prophylaxe“ und „Eperythrozoonose“ entnommen. Im Alter von ca. 3,5 Wochen wird noch im Abferkelstall, also unter der Muttersau, mit einer oralen Behandlung der Ferkel mit einer Mischung aus Colistinsulfat (16 mg/kg Körpergewicht) und Tetrazyklinhydrochlorid (130 mg/kg Körpergewicht) begonnen. Zwei Tage danach werden die Tiere ins Flatdeck umgestallt, die Behandlung mit Colistinsulfat und Tetrazyklinhydrochlorid dabei noch für weitere sieben Tage fortgesetzt. Nach Angaben des Landwirtes sollen sich noch bis zu zwei Tage nach Behandlungsstopp Rückstände der Medikamente im Futter befinden. Die Indikationen für diese Behandlung variierten für die einzelnen Mastdurchgänge und schlossen dabei „Atemwegsinfekte“, „Coli-Enteritiden“, „Pneumonien“, „Enteritiden“ und „Harnwegsinfekte“ ein.

Für das „ABYS“-Projekt wurden in diesem Betrieb vier Mastdurchgänge à zehn Tiere beprobt: Mastdurchgang eins umfasste die Schweine eins bis zehn (S1 bis S10), diese Tiere wurden jedoch nicht als Ferkel in die Studie aufgenommen, sondern zu einem Zeitpunkt, als sich die Tiere bereits in der Mitte der Mast befanden. Mastdurchgang zwei umfasste die Tiere S11 bis S20, Mastdurchgang drei die Tiere S31 bis S40 und Mastdurchgang vier die Tiere S41 bis S50. Eine Kodierung „S21 bis S30“ entfiel aus technischen Gründen für diesen Betrieb. Abbildung 40, Abbildung 41 und Abbildung 42 stellen die Eckpunkte der Behandlungen und Probenahmen der einzelnen Mastdurchgänge von E5 schematisch dar.

Tag	Probencode	Behandlungseckpunkte	Bepropte Objekte
-28		Einmalige Behandlung S11 – S20 am 1. Lebenstag [Oxytetrazyklinhydrat]	
⋮			
-2		Behandlungsstart im Abferkelstall	
-1			
0	1T0	Start Behandlung von S11 - S20 [Tetracyclinhydrochlorid +	S1 - S5, S11 - S20, P1, P2
1	1T2	Colistinsulfat]	S1 - S5, S11 - S20, P1, P2
2			
3	1T4		S1 - S5, S11 - S20, P1, P2
4			
5			
6		Stopp Behandlung	
7			
8			
9			
10	1T10		S1 - S10, S11 - S20, P2
11			
12			

**Abbildung 40: Behandlungs- / Probenahmeschema, Betrieb E5, zweiter Mastdurchgang (Sentinel-Schweine S11 bis S20)**

Tag	Probencode	Behandlungseckpunkte	Bepropte Objekte
-28		Einmalige Behandlung S31 – S40 am 1. Lebenstag [Oxytetrazyklinhydrat]	
⋮			
-2		Behandlungsstart im Abferkelstall	
-1			
0	2T0	Start Behandlung von S31 - S40 [Tetracyclinhydrochlorid +	S11 - S15, S31 - S40, P1, P2
1	2T2	Colistinsulfat]	S11 - S15, S31 - S40, P1, P2
2			
3	2T4		S11 - S15, S31 - S40, P1, P2
4			
5			
6		Stopp Behandlung	
7			
8			
9			
10	2T10		S11 - S20, S31 - S40, P1, P2
11			
12			

**Abbildung 41: Behandlungs- / Probenahmeschema, Betrieb E5, dritter Mastdurchgang (Sentinel-Schweine S31 bis S40)**

Tag	Probencode	Behandlungseckpunkte	Bepropte Objekte
-28		Einmalige Behandlung S41 – S50 am 1. Lebenstag [Oxytetrazyklinhydrat]	
...			
...			
-2		Behandlungsstart im Abferkelstall	
-1			
0	3T0	Start Behandlung von S41 - S50 [Tetracyclinhydrochlorid + Colistinsulfat]	S41, S42, S43, S46, S47, P1, P2
1	3T2		S41, S42, S43, S46, S47, P1, P2
2			
3			
4			
5	3T5		S41, S42, S43, S46, S47, P1, P2
6		Stopp Behandlung	
7			
8			
9			
10			
11			
12	3T12		S41- S50, P1, P2

**Abbildung 42: Behandlungs- / Probenahmeschema, Betrieb E5, vierter Mastdurchgang (Sentinel-Schweine S41 bis S50)**

Zusätzlich zu den Wirkstoffen, die en détail für die Behandlungen der Sentinel-Tiere aufgeführt wurden, wurde für diesen Betrieb im Zeitraum von Mai 2013 bis Juni 2014 bei anderen Tieren die Anwendung von Amoxicillin-Trihydrat, Enrofloxacin sowie Gentamicinsulfat dokumentiert. Auch Sulfonamid-Präparate und Tylosin kamen in E5 zum Einsatz.

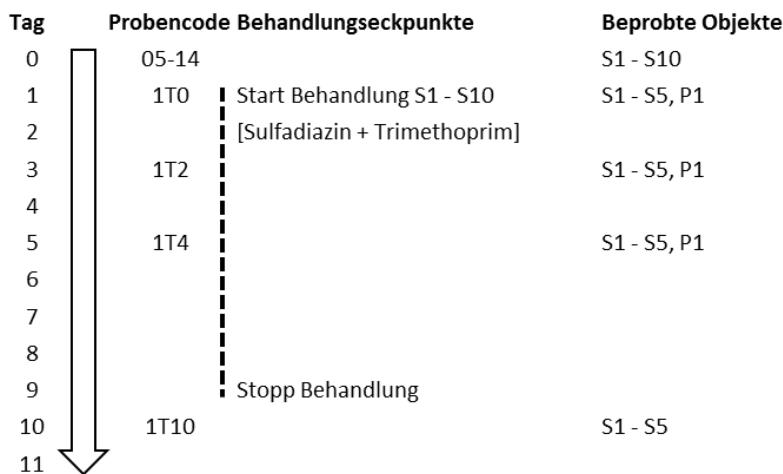
### 3.1.4 Betriebe H18 und J20

In den beiden ökologisch wirtschaftenden „Tracking“-Betrieben H18 und J20 wurde während des Beprobungszeitraums (H18: Juni bis November 2014; J20: März bis August 2014) keines der Studientiere antibiotisch behandelt. Dies bezieht sich im Falle beider Betriebe auf die zehn Tiere (S1 bis S10) des jeweilig beprobten Mastdurchgangs.

Jedoch kam es in Betrieb J20 im April 2014 zu drei einmaligen Einzeltierbehandlungen mit den Antibiotika Cefquinomsulfat, Chlortetrazyklinhydrochlorid und Sulfathiazol plus Sulfamidin in Kombination mit Trimethoprim.

### 3.1.5 Betrieb M13

In Betrieb M13 – es handelt sich, wie bei E5, um einen konventionellen „Kombi“-Betrieb mit eigener Aufzucht – wurden die Tiere des ersten beprobten Mastdurchgangs (S1 bis S10) wegen „Enteritis catarrhalis“ neun Tage lang oral mit einer Kombination aus Sulfadiazin und Trimethoprim therapiert (s. Abbildung 43).



**Abbildung 43: Behandlungs- / Probenahmeschema, Betrieb M13, erster Mastdurchgang (Sentinel-Schweine S1 bis S10)**

Ein zweiter Durchgang (S11 bis S20) wurde zwar ebenfalls mit einem Antibiotikum behandelt (Colistinsulfat, oral, über fünf Tage), jedoch war es aus technischen Gründen nicht möglich, während dieser Medikamentengabe Proben zu ziehen. Aus diesem Grund existieren von diesem Durchgang auf Betriebsebene ausschließlich monatliche Referenzproben.

Neben den angesprochenen Antibiotika bei den Studien-Schweinen kam bei M13 eine Vielzahl weiterer Wirkstoffe zum Einsatz: Amoxicillin-Trihydrat, Benzylpencillin-Benzathin, Benzylpenicillin-Procain, Cefquinomsulfat, Chlortetrazyklinhydrochlorid, Dihydrostreptomycinsulfat, Enrofloxacin, Lincomycinhydrochlorid-Monohydrat, Spectinomycinsulfat-Tetrahydrat, Sulfa-doxin und Tildipirosin. Überwiegend handelte es sich hierbei um Einzeltierbehandlungen.

### 3.2 Quantifizierung von Antibiotikaresistenzgenen

Die für die nachfolgenden Auswertungen einbezogenen Faecesproben wurden im Doppelansatz extrahiert, die in der qPCR gemessenen Werte der Resistenzgenkonzentrationen gemittelt. Auf eine Korrektur um die

Wiederfindungsrate wurde verzichtet, da hauptsächlich Gehalte innerhalb derselben Matrix (Schwein – Schwein, Mensch – Mensch) verglichen werden sollten. Beim Vergleich Schwein – Mensch muss berücksichtigt werden, dass Schweinefaecesproben bei Gehalten  $> 10^7$  lg copies/g eine deutlich verringerte WFR aufwiesen (30,3 %), humane Faecesproben jedoch nicht in diesem Maße (68,4 %). Abschließend wurden die logarithmierten Werte der ermittelten Konzentrationen nach den in den jeweiligen Abbildungen angegebenen Kriterien zusammengefügt. Die verwendeten statistischen Testverfahren und Signifikanzniveaus finden sich ebenfalls in den jeweiligen Boxplot-Diagrammen, berechnet wurden diese mithilfe von SigmaPlot 12.0.

Exemplarisch wurden zudem die zeitlichen Verläufe von Antibiotikaresistenzgen-Gehalten in Faeces dargestellt. Auch hierfür wurden die Proben im Doppelansatz extrahiert, die Messwerte gemittelt und der jeweilige Median aller einbezogenen Schweine zu jedem Beprobungszeitpunkt im Diagramm aufgetragen. Als Betrachtungsgrundlage der zeitlichen Verlaufsdiagramme dienen die unter Abschnitt 3.1 dieser Arbeit aufgeführten Behandlungs- und Probenahmeschemata der einzelnen „Tracking“-Betriebe.

Weiterhin wurden für den hochfrequent Tetrazyklin-einsetzenden „Tracking“-Betrieb E5 Trendanalysen erstellt, die mittel- und langfristige Entwicklungen der Konzentrationen der unterschiedlichen Tetrazyklinresistenzgene abbilden sollten.

### 3.2.1 Selektion

Analog zu den in Abschnitt 2.3.2 dargestellten Ergebnissen wurde auch für den „Tracking“-Teil geprüft, ob und in welchem Ausmaß die Abundanz der Resistenzgene *tet(A)*, *tet(B)* und *tet(M)* respektive *sul(II)* in den Faeces der Probanden durch den Einsatz von Tetrazyklinen und Sulfonamiden im Schweinebestand selektiert wird.

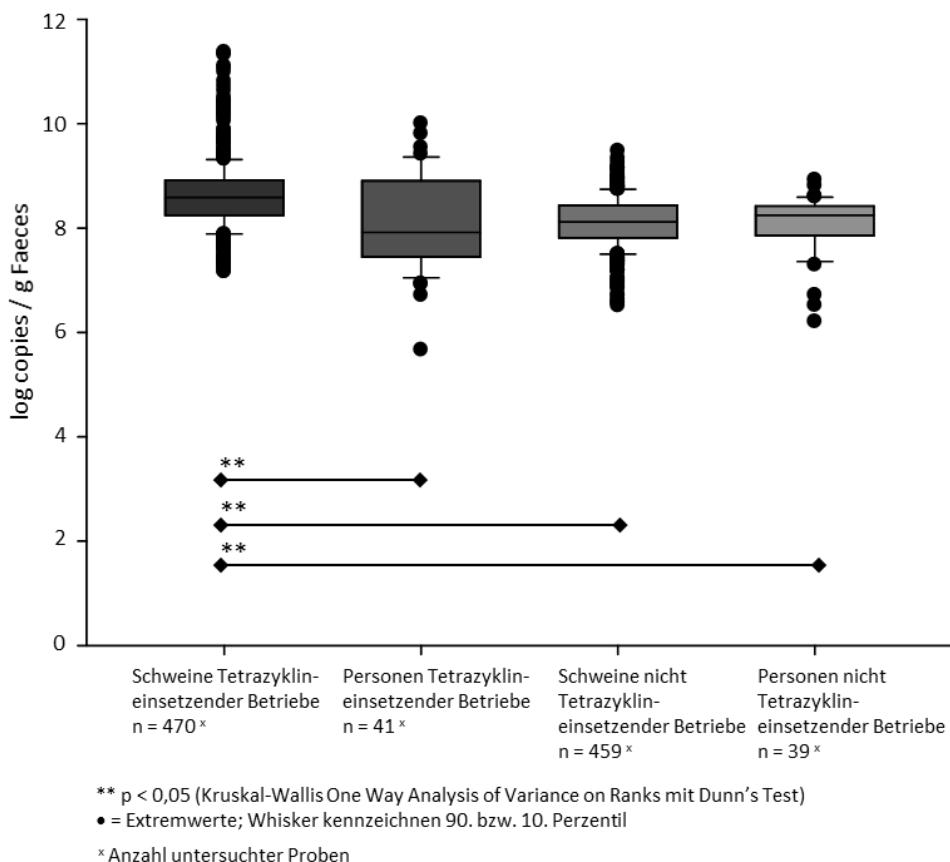
#### 3.2.1.1 Tetrazyklinresistenzgene

Wie aus den in Abschnitt 3.1 dargestellten Behandlungsschemata hervorgeht, kamen Tetrazykline nur an den „Tracking“-Schweinen aus Betrieb E5 zur Anwendung. Aus den Aufzeichnungen der Tierarzneimittelanwendungen ging jedoch hervor, dass diese Wirkstoffklasse auch in Betrieb M13 regelmäßig zum Einsatz kam, wenn auch nicht direkt an den Studientieren. In den Betrieben A21, A6, und H18 wurden während des gesamten Projektzeitraumes keine Tetrazykline

angewandt, im ökologischen Betrieb J20 wurde ein (nicht in die Studie eingeschlossenes) Tier mit Cyclo Spray (2,45 %) behandelt. Da es sich dabei um eine einmalige, nicht-systemische Arzneimittelanwendung, noch dazu ohne Wartezeit, handelte, wurden auch die Proben dieser Schweinehaltung in die Proben „nicht-einsetzender Betriebe“ eingeschlossen.

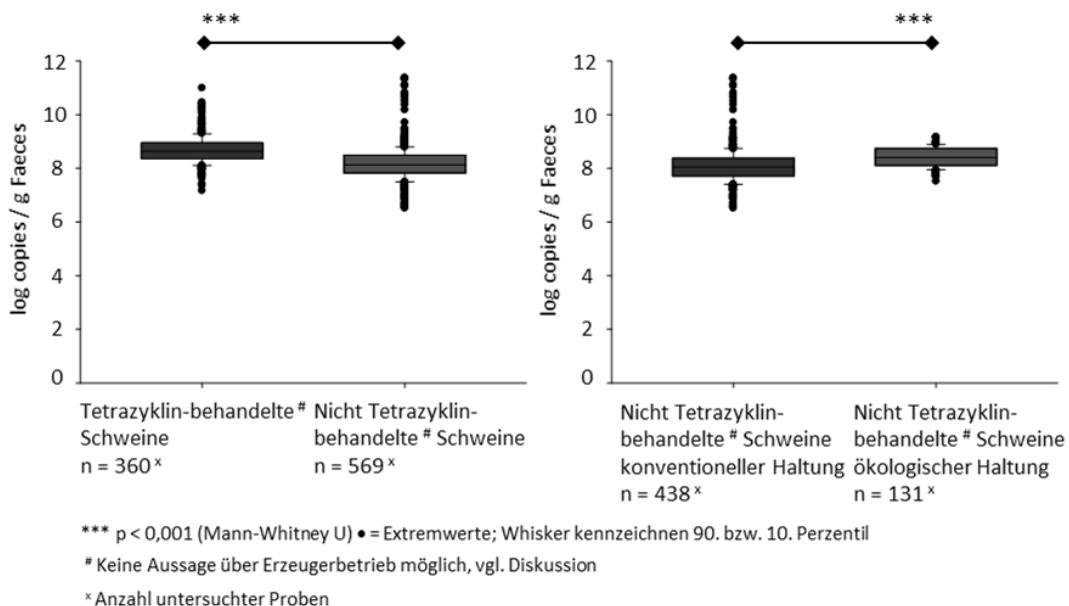
#### *tet(A)*

Im Diagramm aus Abbildung 44 sind die *tet(A)*-Gehalte der Faecesproben der Schweine und Personen von Tetrazyklin-einsetzenden Betrieben (E5, M13) den Gehalten von Betrieben gegenüber gestellt, in denen nicht wiederholt mit Tetrazyklinen therapiert wurde (A21, A6, H18, J20). Dabei wurde der mit 8,59 lg copies/g höchste Median in den porcinen Faecesproben ermittelt. Dieser war damit signifikant erhöht im Vergleich zum Median gemessener *tet(A)*-Konzentrationen aus den Faecesproben von Schweinen nicht Tetrazyklin-einsetzender Betriebe (dieser betrug 8,12 lg copies/g). Mit Werten von 7,92 bzw. 8,25 lg copies/g lagen die mittleren Gehalte an *tet(A)* in den Faeces von Personen einsetzender und nicht-einsetzender Betriebe in etwa auf einer Höhe. Dabei waren beide signifikant unter dem Niveau der Schweine aus Tetrazyklin-einsetzenden Betrieben angesiedelt.



**Abbildung 44: *tet(A)*-Gehalte in den Faecesproben von Schweinen und Personen Tetrazyklin-einsetzender sowie nicht Tetrazyklin-einsetzender „Tracking“-Betriebe**

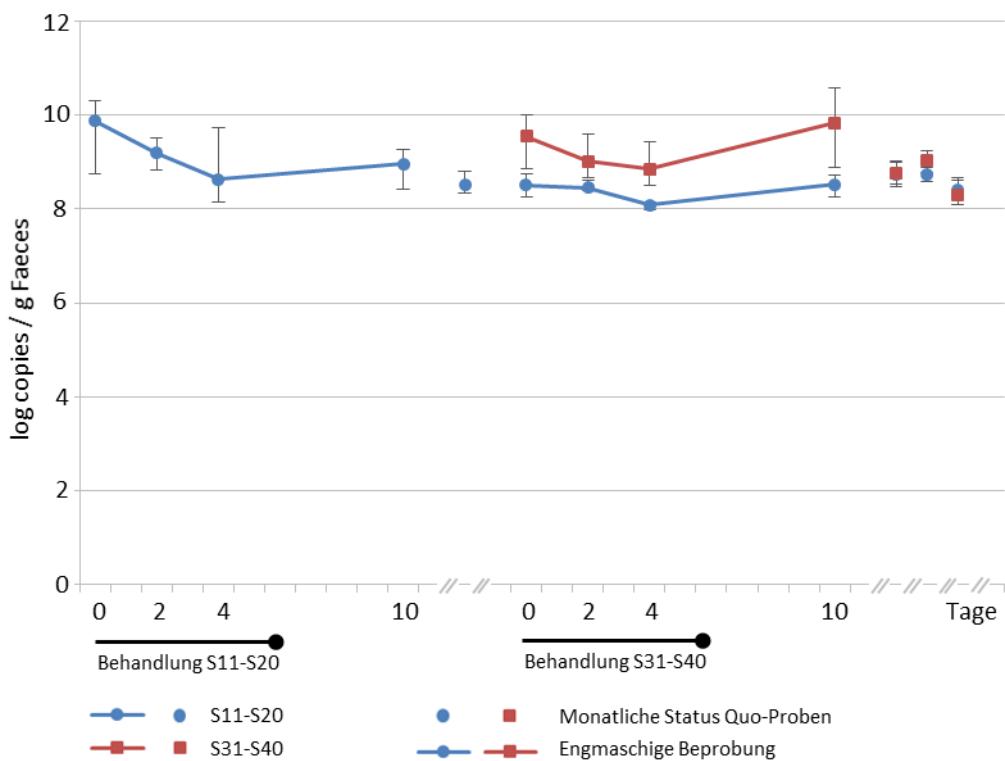
Betrachtet man die in Abbildung 45 im linken Diagramm dargestellte Gesamtheit der *tet(A)*-Gehalte der Studentiere, die auch tatsächlich selbst mit Tetrazyklinen behandelt wurden (ausschließlich aus Betrieb E5 stammend, vgl. Abschnitt 3.1) im Vergleich zu unbehandelten Tieren, so zeigt sich erneut, dass Erstgenannte auf signifikant höherem Niveau zu liegen kamen als Letztgenannte (Median behandelter Tiere: 8,63 lg copies/g; Median unbehandelter Tiere: 8,13 lg copies/g). Das rechte Boxplot-Diagramm aus Abbildung 45 vergleicht hingegen die Proben nicht Tetrazyklin-behandelter Schweine aus konventionellen bzw. ökologischen Betrieben miteinander: Der Median nicht behandelter ökologisch gehaltener Tiere betrug 8,40 lg copies/g, die ermittelten Konzentrationen waren damit signifikant höher als die nicht behandelter Schweine aus konventioneller Haltung (8,05 lg copies/g).



**Abbildung 45: *tet(A)*-Gehalte in den Faecesproben von „Tracking“-Schweinen; links: Tetrazyklin-behandelt ja / nein, rechts: konventionelle und ökologische Schweine ohne Tetrazyklin-Behandlung**

Exemplarisch zeigt Abbildung 46 die *tet(A)*-Gehalte zweier Mastdurchgänge des Betriebs E5 im zeitlichen Verlauf während und nach Behandlung mit Tetrazyklinen – als Betrachtungsgrundlage sollen dabei Abbildung 40 und Abbildung 41 dienen, die jeweils den genauen Therapieablauf darstellen. Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass die im Folgenden dargestellten Messungen der *tet*-Gehalte über den gesamten dargestellten Verlauf nicht mit Veränderungen in der molekularbiologisch bestimmten „Gesamtkeimzahl“ einhergingen (Daten nicht dargestellt). Bei der ersten Beprobung der sich zu diesem Zeitpunkt bereits in Wirkstoffkontakt befindenden Schweine S11 bis S20 an Tag 0 betrug der Median der Proben 9,88 lg copies/g Faeces. Während des weiteren Verlaufes der Behandlung sank der Resistenzgen-Gehalt über Tag 2 hinweg um mehr als eine lg-Stufe und kam an Tag 4 bei 8,64 lg copies/g zu liegen. An Tag 6 endete die Therapie mit Tetrazyklinen, die mittleren *tet(A)*-Gehalte stiegen in den folgenden vier Tagen leicht an und betrugen an Tag 10 im Median 8,96 lg/copies/g. In den darauffolgenden Monaten variierte der *tet(A)*-Median dieser Tiere in den etwa im Abstand von 30 Tagen gesammelten „Status Quo“-Proben zwischen 8,52 und 8,73 lg copies/g Faeces nur minimal und war dabei stets geringer als während und kurz nach der Therapie mit Tetrazyklinen. Genauso waren bei der engmaschigen Beprobung dieser Tiere während der Behandlung der Schweine S31 bis S40 nur minimale Veränderungen

bei den gemessenen *tet(A)*-Konzentrationen in den Faeces messbar. Hingegen zeigten die in diesem Zeitraum selbst mit Tetrazyklinen behandelten Schweine S31 bis S40 während der Therapie ähnliche Tendenzen wie der vorherige Mastdurchgang (S11 bis S20): Von Tag 0 sank der *tet(A)*-Median von 9,55 über Tag 2 (9,02) auf 8,85 lg copies/g an Tag 4 und stieg anschließend bis zu einem Wert von 9,83 lg copies/g an Tag 10 (vier Tage nach Behandlungsende) an. In den folgenden drei Monaten lagen die Gen-Gehalte auf niedrigerem Niveau und waren mit Werten zwischen 8,30 und 9,02 lg copies/g wiederum vergleichbar mit dem vorangegangenen Mastdurchgang.

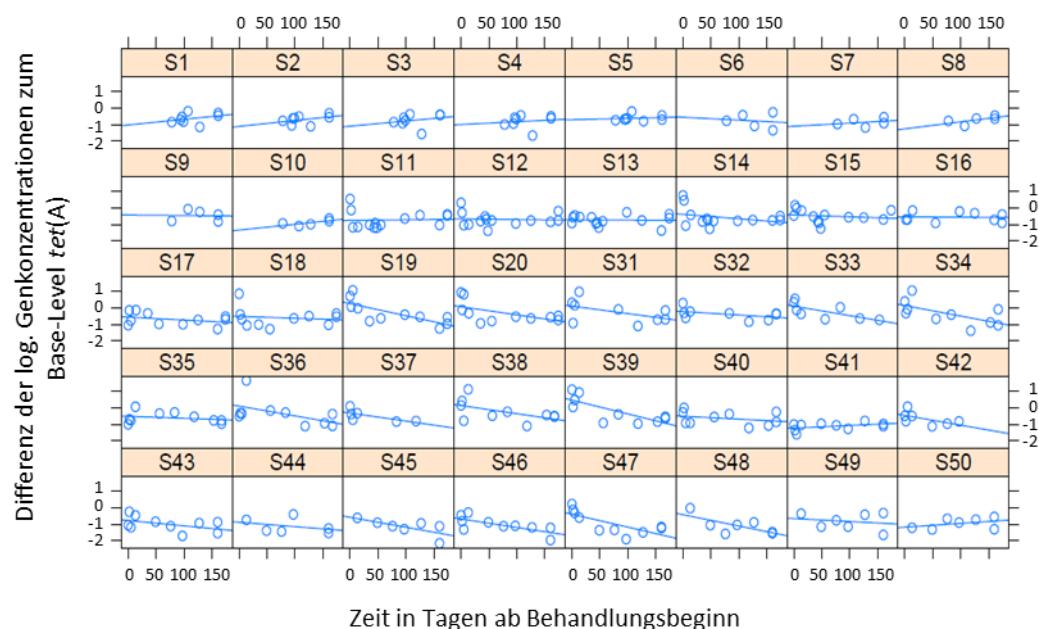


**Abbildung 46: *tet(A)*-Gehalte in Schweinefaeces der Mastdurchgänge zwei und drei aus Betrieb E5; als Betrachtungsgrundlage dienen die in Abbildung 40 und Abbildung 41 dargestellten Behandlungs- und Probenahmeschemata**

Die Trendanalyse diente der langfristigen Einordnung von Resistenzgenkonzentrationen. Das Zeitfenster reichte dabei im exemplarisch ausgewählten „Tracking“-Betrieb E5 von Tag 0, also dem Tag der erstmaligen oralen Tetrazyklin-Behandlung, bis zum Tag der Schlachtung (153 bis 167 Tage nach Ende der Tetrazyklin-Therapie).

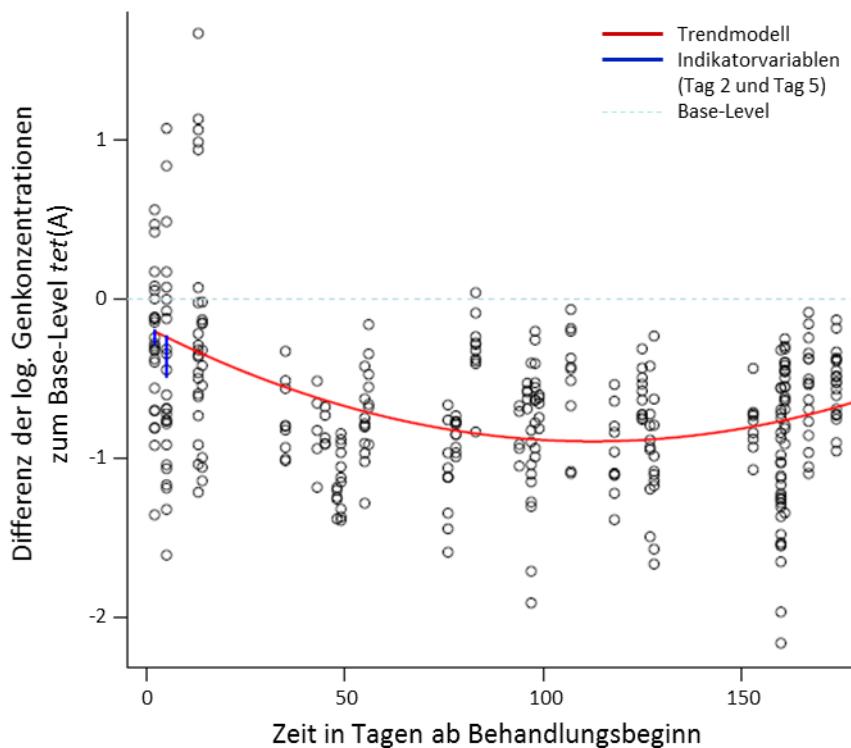
In Abbildung 47 sind zunächst die einzelnen Trendverläufe der *tet(A)*-Konzentrationen aller 40 im Tetrazyklin-einsetzenden „Tracking“-Betrieb

E5 beobachteten „Tracking“-Schweine aufgeführt. Das Base-Level an Tag 0 betrug dabei 9,32 lg copies/g Faeces. Wie bereits erwähnt, erfolgte die Darstellung der Resistenzgenkonzentrationen als Differenz der logarithmierten absolut gemessenen qPCR-Werte zu diesem Base-Level. Für die Schweine des ersten Mastdurchgangs (S1 bis S20) gab es erst ab Tag 71 nach Behandlungsende Messwerte, da diese Tiere, wie schon unter Abschnitt 3.1.3 besprochen, erst Mitte der Mast in die Studie aufgenommen wurden. In der Tendenz stieg *tet(A)* bei diesen Tieren hier zwischen Tag 71 und Tag 154 – dieser entspricht dem letzten Beprobungszeitpunkt, der Schlachtung – leicht an. Die Schweine des zweiten Durchgangs (S11 bis S20) blieben über den Betrachtungszeitraum (Tag 0 der „eigenen“ Behandlung mit Tetrazyklinen bis Tag 167 nach Ende dieser Behandlung) – mit Ausnahme von S19 und S20, bei denen der Trend nach unten verlief – tendenziell auf dem gleichen Niveau, was die Differenz vom *tet(A)*-Base-Level betrifft. Während Durchgang drei (S31 bis S40) sanken tendenziell bei allen Schweinen die erhobenen *tet(A)*-Messwerte während und nach der Behandlung mit Tetrazyklinen (Tag 0 der Behandlung bis Tag 160 nach Behandlungsende). Gleicher Sachverhalt trifft auf Durchgang vier (S41 bis S50) zu, wobei S41 und S50 von diesem Trend abwichen und über den Zeitverlauf (Tag 0 der Tetrazyklin-Behandlung bis Tag 153 post Behandlung) leicht anstiegen.



**Abbildung 47: Trendanalyse des Verlaufs von *tet(A)* auf Einzeltierebene (n = 336 Faecesproben), Betrieb E5**

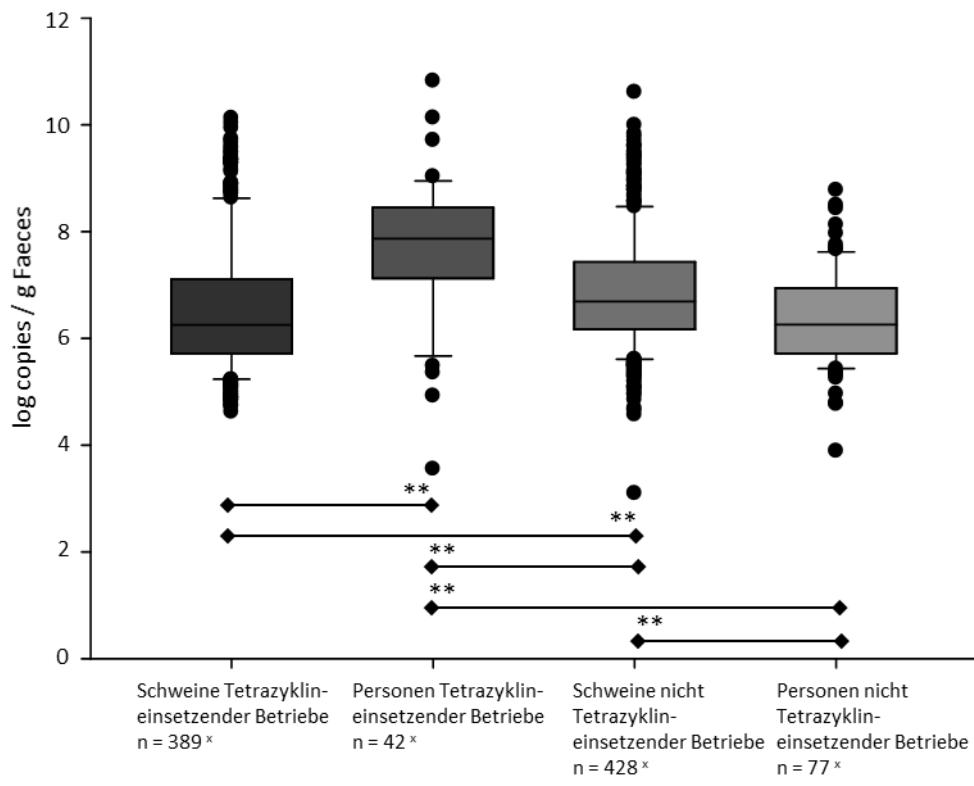
Zusammengefasst stellen sich die Ergebnisse aus Abbildung 47 auf Betriebsebene für alle 40 Tiere wie in Abbildung 48 aufgeführt dar; das Diagramm beruht dabei auf einem linearen gemischten Modell, bei dem als Faktorvariablen die Beprobungszeitpunkte Tag 2 und Tag 5 – unter antibiotischer Behandlung – dienen. Unter Berücksichtigung von linearem und quadratischem Effekt ergab sich über den gesamten Betrachtungszeitraum insgesamt ein hochsignifikanter Trendverlauf ( $p < 0,001$ ): Initial hohe *tet(A)*-Gehalte in den Faecesproben der Schweine aus Betrieb E5 sanken im Laufe einer Behandlung mit Tetrazyklinen zunächst, bevor die Gehalte, in etwa ab Tag 110, in der Tendenz wieder zu steigen begannen. Während der Behandlung ergab sich bei separater Betrachtung von Tag 2 – unter Konstanthalten aller anderen Variablen – für diesen Beprobungszeitpunkt keine signifikante Abweichung vom Base-Level, bei Tag 5 hingegen sehr wohl ( $p < 0,05$ ). Insbesondere an Tag 2 bis Tag 10 – also unter der Behandlung – zeigte sich eine sehr große Streuung der Daten.



**Abbildung 48: Trendanalyse des Verlaufs von *tet(A)* auf Betriebsebene ( $n = 336$  Schweinefaecesproben), Betrieb E5**

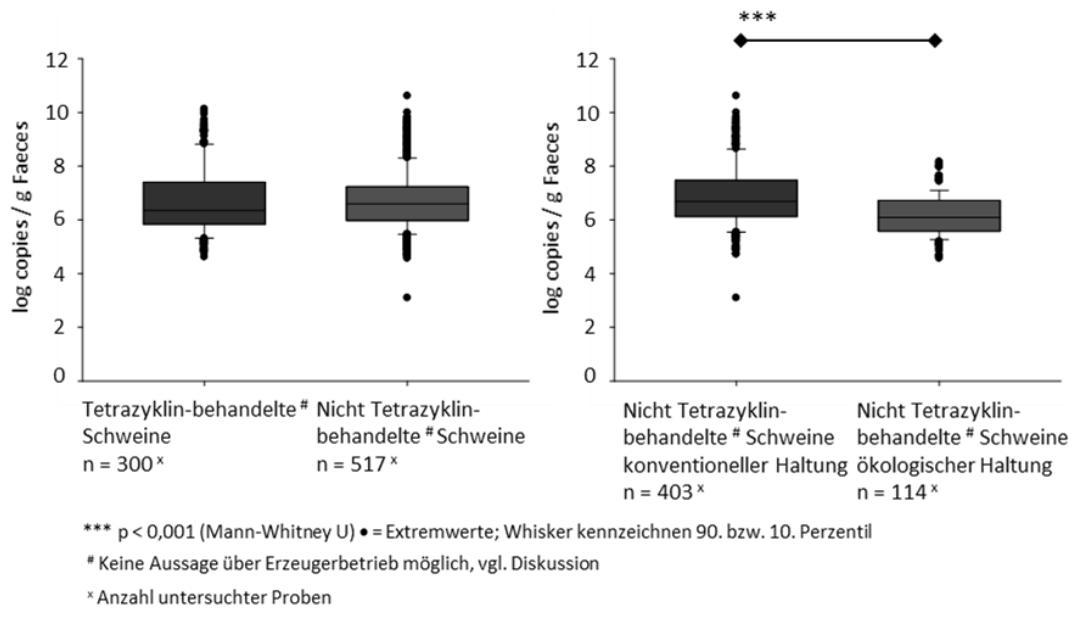
*tet(B)*

Schon beim ersten Blick auf die Boxplots in Abbildung 49 wird klar, dass für die Vergleichsgruppen die ermittelten *tet(B)*-Konzentrationen deutlich voneinander abwichen. Der Median von Schweinefaecesproben aus nicht Tetrazyklin-einsetzenden Betrieben mit 6,69 lg copies/g lag dabei signifikant über dem von Schweinen aus einsetzenden Betrieben (6,26 lg copies/g). Bei den Personen war dies genau umgekehrt: Im Stuhl von Personen, die in Schweinehaltungsbetrieben lebten, in denen regelmäßig Tetrazykline zur Anwendung kamen, wurden nämlich mit einem Median von 7,87 lg copies/g nicht nur die absolut höchsten, sondern gleichzeitig auch signifikant höhere *tet(B)*-Gehalte ermittelt als in den Proben der Vergleichsgruppen; der Median der Proben von Personen nicht-einsetzender Betriebe lag bei 6,26 lg copies/g. Die gemessenen Werte in einsetzenden Betrieben waren bei den Personen im Median höher angesiedelt als bei den Schweinen, auf Höfen ohne Tetrazyklin-Einsatz waren hingegen die Gehalte in Faecesproben der Tiere höher als in den Faecesproben der Menschen.



**Abbildung 49: *tet(B)*-Gehalte in den Faecesproben von Schweinen und Personen Tetrazyklin-einsetzender sowie nicht Tetrazyklin-einsetzender „Tracking“-Betriebe**

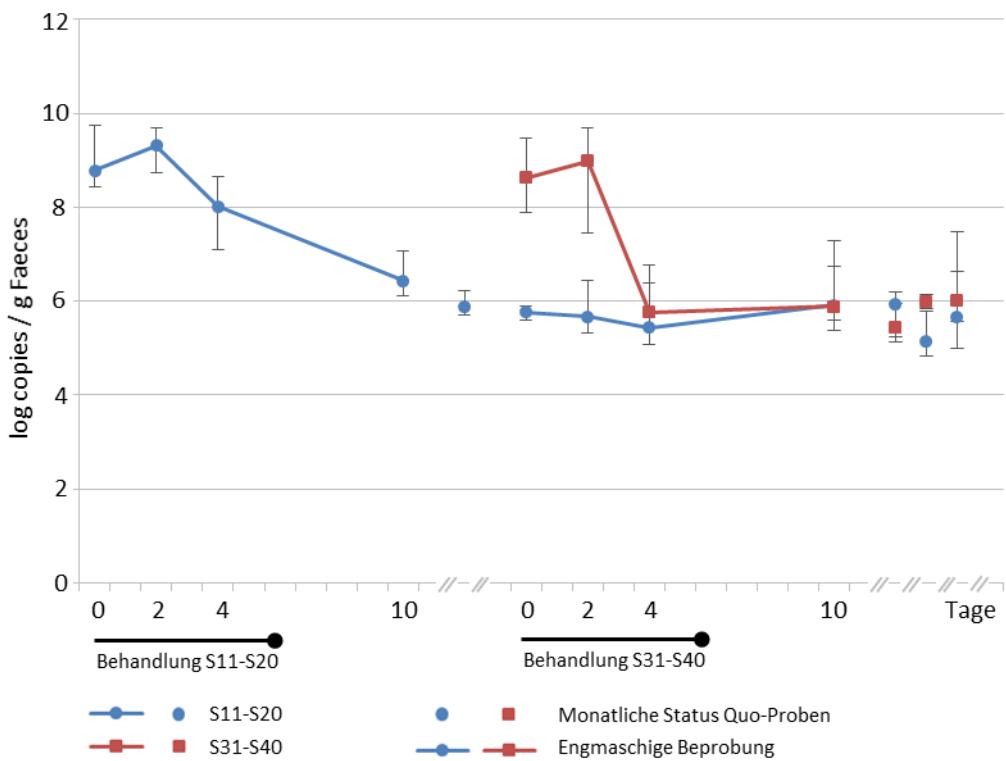
Weicht man von der Betrachtung „Tetrazyklin-Einsatz auf dem Betrieb vs. kein Tetrazyklin-Einsatz auf dem Betrieb“ ab und betrachtet nur die Schweine, die während des Betrachtungszeitraumes auch wirklich mit dieser Wirkstoffklasse behandelt wurden (s. Abbildung 50, links), so waren die gemessenen *tet(B)*-Gehalte mit einem Median von 6,34 lg copies/g in etwa vergleichbar hoch wie von unbehandelten Schweinen (6,59 lg copies/g). Anders als bei *tet(A)* lagen die Werte ökologischer, unbehandelter Schweine signifikant niedriger als die konventionell gehaltener, unbehandelter Tiere (6,09 und 6,69 lg copies/g), s. Abbildung 50, Boxplots im rechten der beiden Diagramme.



**Abbildung 50: *tet(B)*-Gehalte in den Faecesproben von „Tracking“-Schweinen; links: Tetrazyklin-behandelt ja / nein, rechts: konventionelle und ökologische Schweine ohne Tetrazyklin-Behandlung**

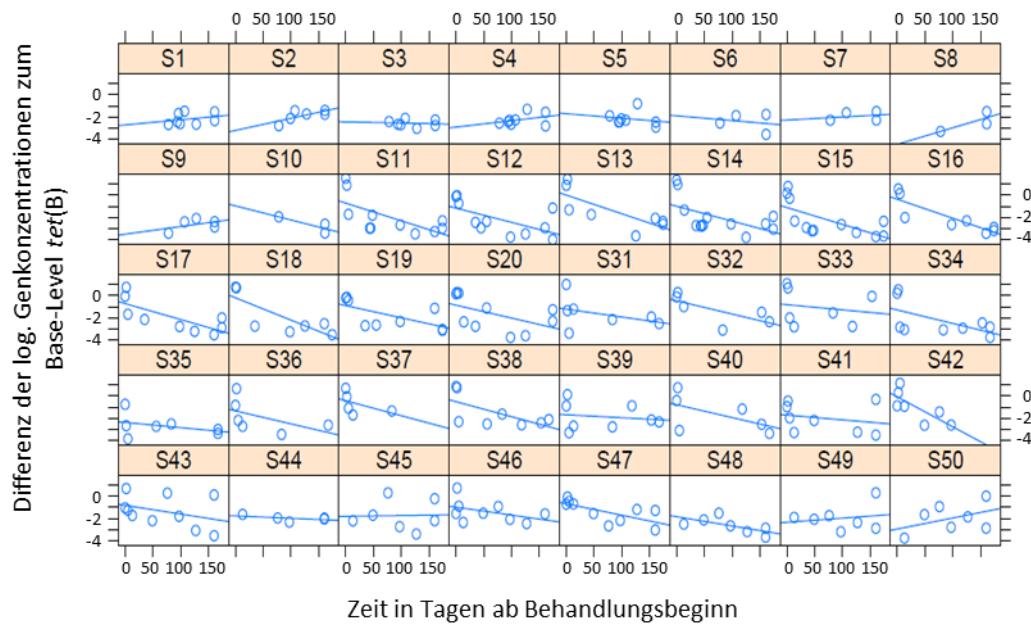
In Abbildung 51 ist der zeitliche Verlauf der *tet(B)*-Gehalte in den Faeces der Schweine S11 bis S20 bzw. S31 bis S40 während und nach Therapie mit Tetrazyklinen dargestellt. Beide Mastdurchgänge zeigten zu Behandlungsbeginn einen weiteren Anstieg der initial hohen Gehalte von 8,78 auf 9,32 (S11 bis S20) bzw. 8,64 auf 8,99 lg copies/g (S31 bis S40) im Median von Tag 0 zu Tag 2. Im Anschluss daran sanken die mittleren *tet(B)*-Konzentrationen bis hin zu Tag 4 rapide, bei S11 bis S20 um über eine lg-Stufe auf 8,02, bei S31 bis S40 gar um mehr als drei lg-Stufen auf 5,77 lg copies/g. Dieser Trend setzte sich bei den Schweinen 11 bis 20 zum Ende der Behandlung bzw. noch darüber hinaus bis hin zu Tag 10 fort; die Gehalte kamen hier bei 6,44 lg copies/g zu liegen. Bei S31 bis S40 hingegen blieben die gemessenen Werte für *tet(B)* zwischen Tag 4 und

Tag 10 (hier waren es 5,90 lg copies/g) nahezu konstant. Wie im Diagramm aus Abbildung 51 gut ersichtlich wird, lagen die während und nach der Behandlung von S31 bis S40 erfassten Gen-Gehalte bei den zu diesem Zeitpunkt nicht selbst therapierten Tieren S11 bis S20 mit einem Median von jeweils knapp unter 6,00 lg copies *tet(B)* pro g Faeces einerseits dauerhaft auf etwa dem gleichen Niveau. In diesem Bereich bewegten sich auch die mittleren *tet(B)*-Konzentrationen in den auf die Behandlung folgenden monatlichen „Status Quo“-Proben der beiden Vergleichsgruppen.



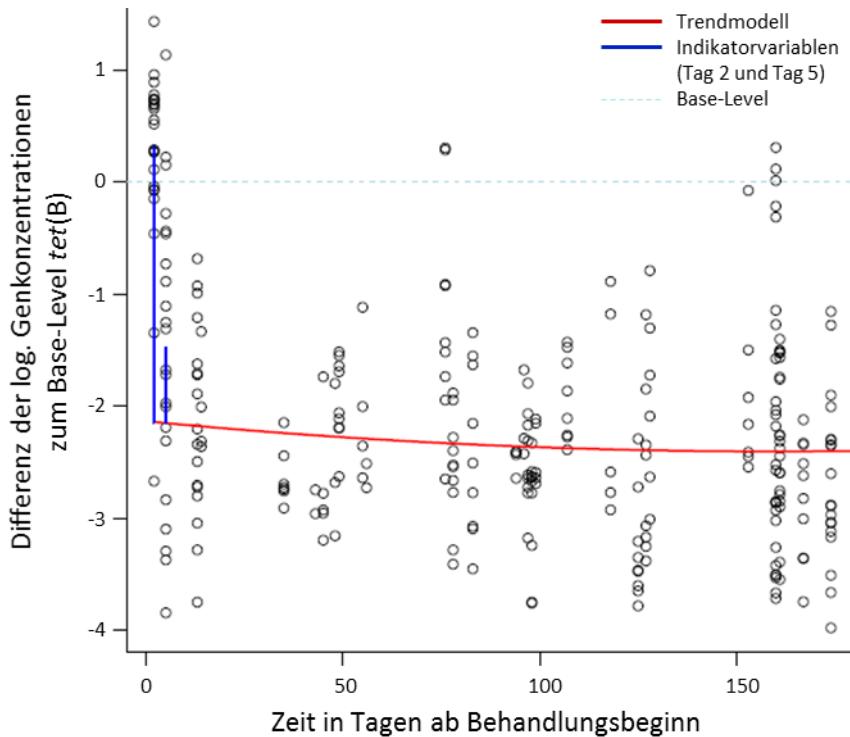
**Abbildung 51: *tet(B)*-Gehalte in Schweinefaeces der Mastdurchgänge zwei und drei aus Betrieb E5; als Betrachtungsgrundlage dienen die in Abbildung 40 und Abbildung 41 dargestellten Behandlungs- und Probenahmeschemata**

Die *tet(B)*-Verläufe der einzelnen „Tracking“-Tiere von Betrieb E5 über den gesamten Betrachtungszeitraum finden sich in Abbildung 52 wieder. Das Base-Level für dieses Resistenzgen betrug 8,60 lg copies/g Faeces. Bezüglich der exakten Zeiträume gelten für die einzelnen Durchgänge die gleichen Angaben wie im entsprechenden Abschnitt zu *tet(A)*. Im unbehandelten Durchgang eins (S1 bis S10) stieg die Differenz der *tet(B)*-Gehalte über die Zeit tendenziell an, jedoch gab es mit S5, S6 und S10 auch Tiere deren Gen-Gehalte in der Tendenz sanken. In den anderen beprobten Durchgängen sanken die Werte über die Zeit bei 27 von 30 Tieren, nur S45, S49 und S50 stiegen tendenziell an.



**Abbildung 52: Trendanalyse des Verlaufs von *tet(B)* auf Einzeltierebene (n = 276 Faecesproben), Betrieb E5**

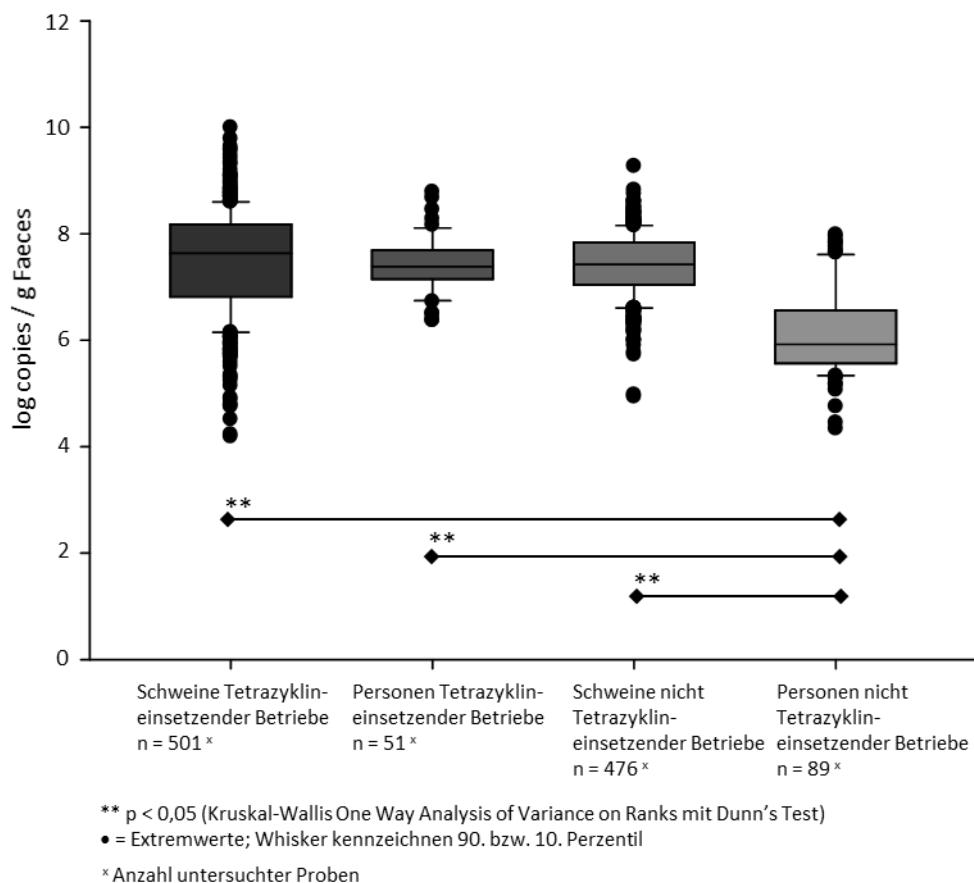
Abbildung 53 zeigt die Ergebnisse der *tet(B)*-Trendanalyse zusammengefasst und auf Betriebsebene: Die Gen-Gehalte sanken zwar über den gesamten Betrachtungszeitraum ein wenig ab, dieser Trend erwies sich in der statistischen Analyse unter Einbeziehung von linearem und quadratischem Effekt dieses abermals linear gemischten Modells als nicht signifikant. Wie schon bei der Trendanalyse zu *tet(A)* kamen dabei im Laufe der Zeit nahezu alle Messwerte unterhalb des Base-Levels zu liegen. Für die beiden Faktorvariablen ergaben sich jedoch erhebliche Abweichungen vom Base-Level: Im Falle von Tag 2, also während der Behandlung mit Tetrazyklinen, wich die log-Differenz um 2,45 Einheiten und damit hochsignifikant ( $p < 0,001$ ) nach oben ab, d. h. der Messwert kam deutlich über dem Wert, der nach Trend zu erwarten gewesen wäre, zu liegen. Auch an Tag 5, also gegen Ende der Tetrazyklin-Therapie der Sentinel-Schweine, war diese Tendenz noch von signifikantem Ausmaß ( $p < 0,05$ ).



**Abbildung 53: Trendanalyse des Verlaufs von *tet(B)* auf Betriebsebene (n = 276 Schweinefaecesproben), Betrieb E5**

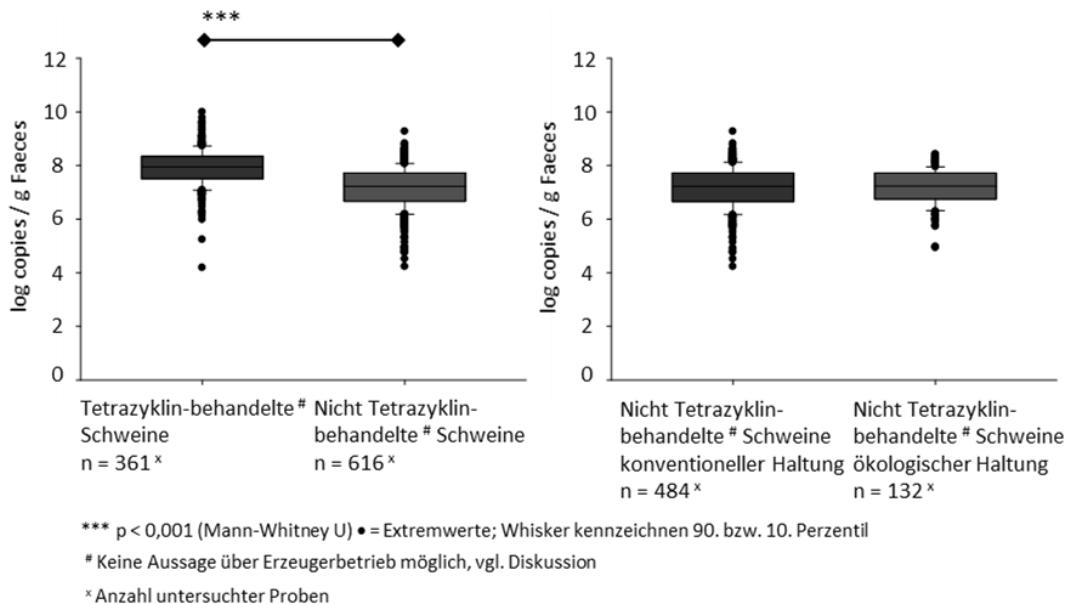
#### *tet(M)*

Im Vergleich der in den Faecesproben gemessenen Gehalte an *tet(M)* lag der Median der Personen Tetrazyklin-anwendender Betriebe mit 7,38 lg copies/g fast 1,5 lg-Stufen höher im Vergleich zu dem Wert, der für nicht anwendende Betriebe ermittelt werden konnte (5,92 lg /copies/g). Ebenso war dieser Wert bei Schweinen aus Stallungen Tetrazyklin-anwendender Betriebe höher als bei Tieren aus nicht-einsetzenden Betrieben – im absoluten Vergleich mit 7,63 (dies stellt gleichzeitig den höchsten *tet(M)*-Gehalt der drei Vergleichsgruppen) zu 7,42 lg copies/g jedoch nur geringgradig. Hinsichtlich des Probenursprungs unterschieden sich tierische und menschliche Proben bei mit Tetrazyklinen behandelnden Betrieben nicht wesentlich in ihrem Resistenzgen-Gehalt, bei Betrieben ohne Tetrazyklin-Einsatz war dies jedoch sehr wohl der Fall.



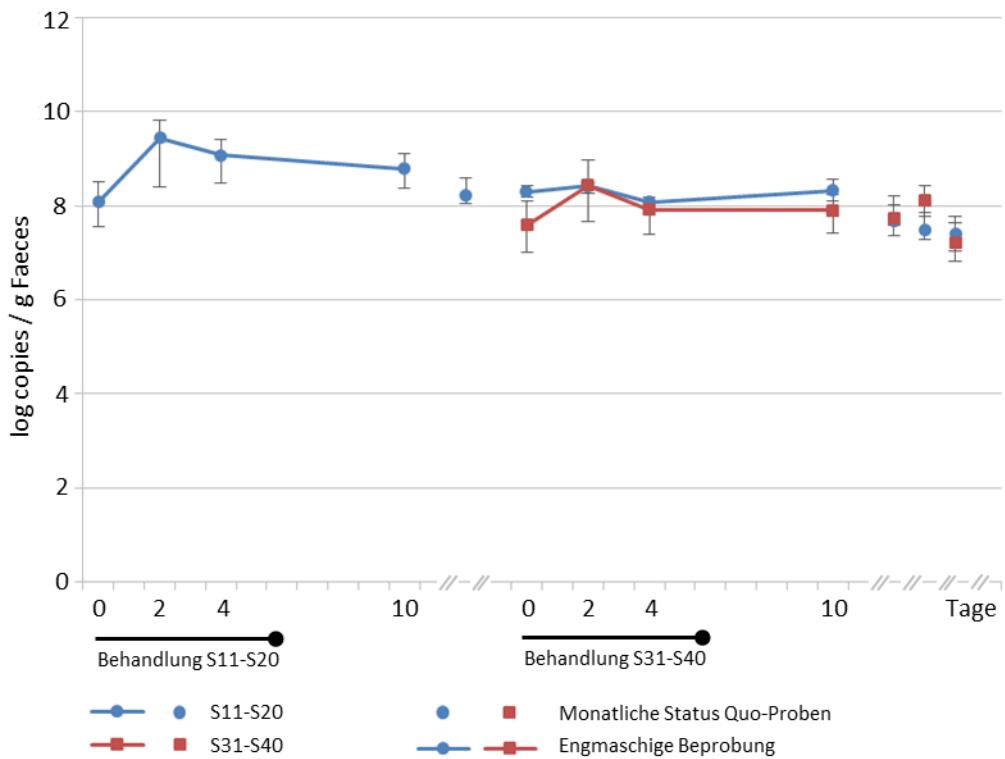
**Abbildung 54: *tet(M)*-Gehalte in den Faecesproben von Schweinen und Personen Tetrazyklin-einsetzender sowie nicht Tetrazyklin-einsetzender „Tracking“-Betriebe**

Sentinel-Schweine, die mit Tetrazyklinen behandelt wurden, wiesen im Vergleich zu unbehandelten Tieren signifikant höhere *tet(M)*-Gehalte in den Faeces auf (7,95 und 7,22 lg copies/g), dies zeigen die beiden Boxplots im linken Diagramm aus Abbildung 55. Eine ähnliche Tendenz konnte schon beim Vergleich „einsetzende vs. nicht-einsetzende Betriebe“ beobachtet werden. Die Haltungsart respektive die damit womöglich einhergehende Handhabung der Arzneimittelanwendung scheint keinen Einfluss auf die *tet(M)*-Resistenzgen-Gehalte zu haben, der Median von Tieren aus ökologischer Haltung kam mit 7,23 lg copies/g etwa gleichauf zu liegen mit dem von Tieren aus konventioneller Schweinehaltung (7,22 lg copies/g).



**Abbildung 55: *tet(M)*-Gehalte in den Faecesproben von „Tracking“-Schweinen; links: Tetrazyklin-behandelt ja / nein, rechts: konventionelle und ökologische Schweine ohne Tetrazyklin-Behandlung**

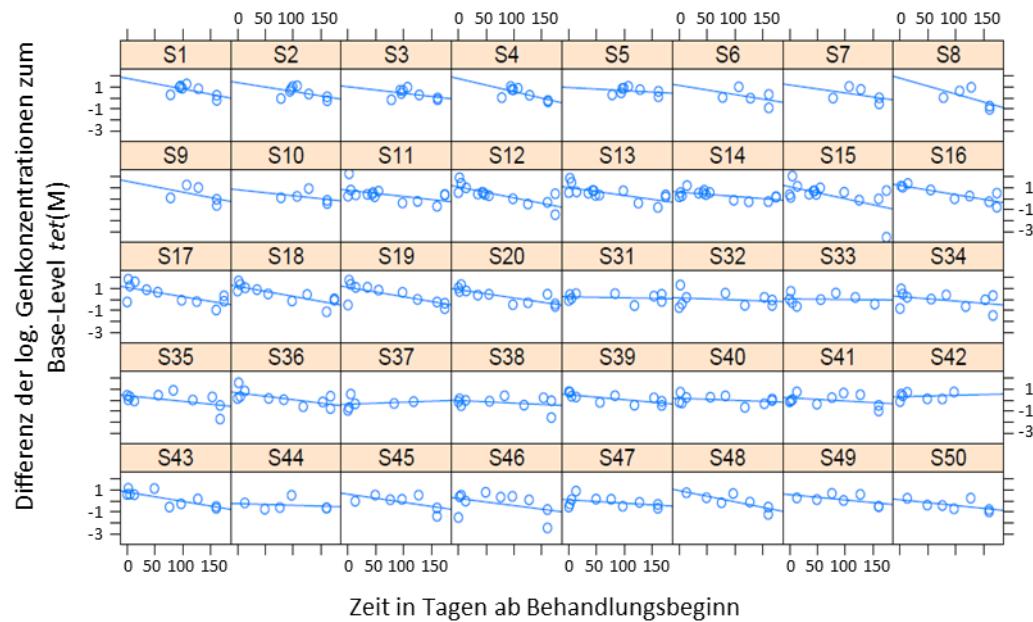
Einen zu *tet(B)* insgesamt ähnlichen, wenn auch unterschiedlich stark ausgeprägten Verlauf nahmen die *tet(M)*-Gehalte in den Faeces der Proben der beiden mit Tetrazyklinen behandelten Mastdurchgänge zwei und drei aus Betrieb E5. Auch hier kam es zu Beginn der Antibiotika-Behandlung zwischen Tag 0 und Tag 2 zu einem Anstieg der gemessenen Resistenzgenkonzentrationen: Bei S11 bis S20 stieg der Median in diesem Zeitraum von 8,09 auf 9,44 lg copies/g, bei den Schweinen 31 bis 40 von 7,59 auf 8,44 lg copies/g. In den folgenden Tagen sanken die Gehalte behandelter Tiere wieder langsam und lagen nach Ende der Behandlung an Tag 10 im Median bei 8,80 (S11 bis S20) bzw. 7,90 lg copies/g (S31 bis S40). Wie schon bei *tet(A)* und *tet(B)*, ergab sich für die *tet(M)*-Gehalte des Durchgangs S11 bis S20 für den Zeitraum, in dem diese Schweine nicht selbst mit Antibiotika behandelt wurden, ein abweichender Verlauf: Die ermittelten Konzentrationen bewegten sich während der zehn Beprobungstage zwischen 8,09 und 8,42 lg copies/g Faeces, ohne dabei allzu große Schwankungen aufzuweisen. Die monatlichen „Status Quo“-Proben der beiden Durchgänge blieben – anders als für *tet(B)* – auf vergleichsweise hohem Level, sie enthielten zwischen 7,22 und 8,22 lg copies/g Faeces.



**Abbildung 56: *tet(M)*-Gehalte in Schweinefaeces der Mastdurchgänge zwei und drei aus Betrieb E5; als Betrachtungsgrundlage dienen die in Abbildung 40 und Abbildung 41 dargestellten Behandlungs- und Probenahmeschemata**

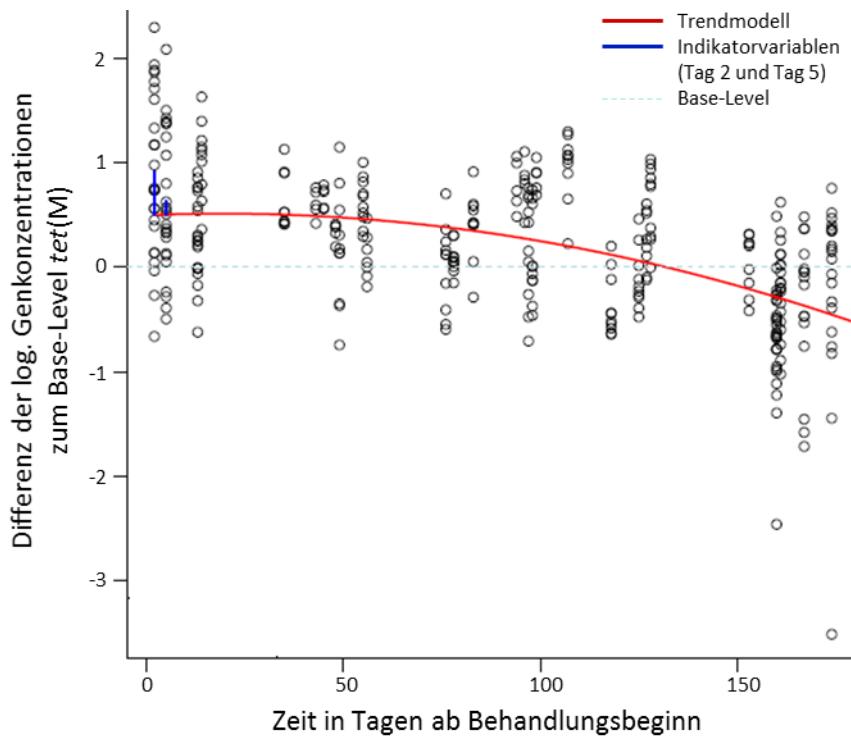
Auch für die gemessenen *tet(M)*-Gehalte der Faecesproben der „Tracking“-Tiere aus Betrieb E5 erfolgte eine zeitliche Einordnung sowohl auf Einzeltier- als auch auf Betriebsebene. Dabei wurde als Zielvariable, wie schon bei den entsprechenden Abschnitten zu *tet(A)* und *tet(B)* beschrieben, die log-Differenz der gemessenen Konzentrationen zum Base-Level – dieses betrug im Falle von *tet(M)* im Betrieb E5 7,69 lg copies/g Faeces – betrachtet.

Aus Abbildung 57 wird ersichtlich, dass bei nahezu allen Tieren der vier beprobten Durchgänge über den Zeitraum von Tag 0 der ersten Behandlung mit Tetrazyklinen im Ferkelalter bis hin zum Zeitpunkt der Schlachtung die initial hohen Resistenzgen-Gehalte mehr – beispielsweise bei S15 bis S20 – oder, wie bei S31 oder S32, weniger stark absinken. Nur die beiden „Tracking“-Schweine S37 und S42 weichen von diesem Trend ab, hier steigen die *tet(M)*-Gehalte in den Faeces im Laufe der Zeit leicht an.



**Abbildung 57: Trendanalyse des Verlaufs von  $tet(M)$  auf Einzeltierebene ( $n = 337$  Faecesproben), Betrieb E5**

Abbildung 58 überträgt diese Ergebnisse auf Betriebsebene und fasst die Einzelverläufe der log-Differenz der  $tet(M)$ -Gehalte vom Base-Level aller beprobten E5-Schweine in einem Diagramm zusammen. Die Analyse des linearen gemischten Modells mit quadratischem Effekt ergab für den Betrachtungszeitraum einen signifikanten Trendverlauf: Während zu Beginn der Behandlung mit Tetrazyklinen  $tet(M)$  in der Tendenz anstieg – dies belegt der im Vergleich zum Trend hochsignifikante Anstieg an Tag 2 ( $p < 0,001$ ) – und sich bis etwa Tag 50 auf dem annähernd gleichen Niveau bewegte, sanken die Werte ab diesem Zeitpunkt langsam ab und kamen zum Zeitpunkt der Schlachtung größtenteils unter dem Base-Level zu liegen.



**Abbildung 58: Trendanalyse des Verlaufs von *tet(M)* auf Betriebsebene (n = 337 Schweinefaecesproben), Betrieb E5**

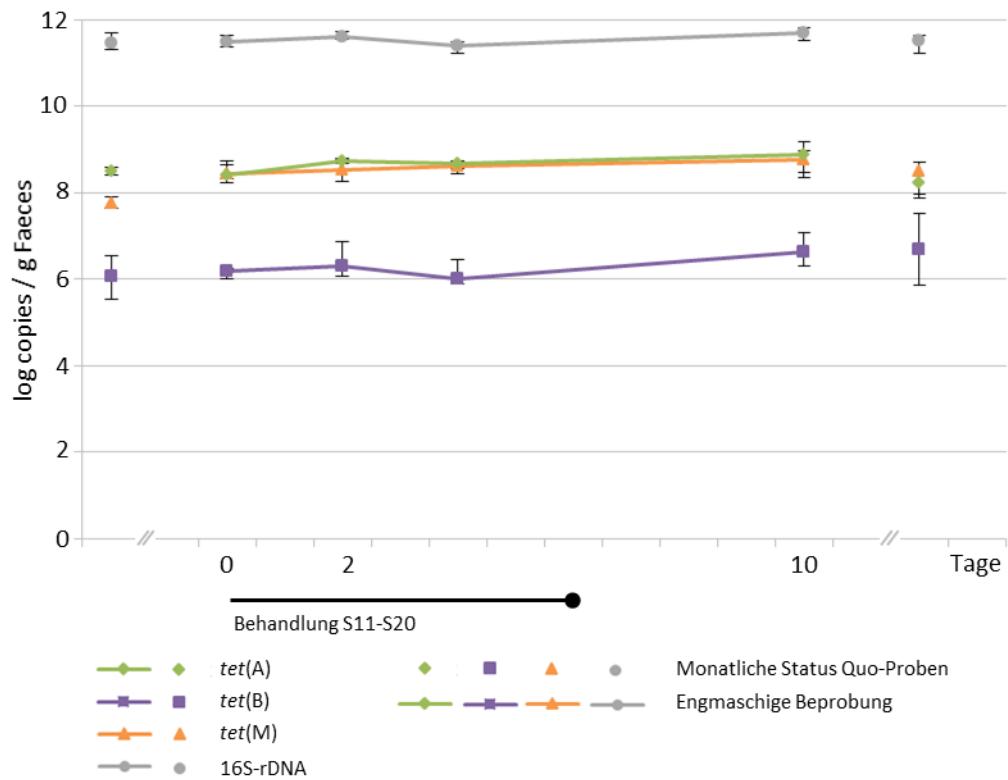
Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass bei Tetrazyklin-einsetzenden Betrieben im Vergleich zu solchen, wo diese antibiotische Wirkstoffklasse keine regelmäßige Anwendung fand, neben den *tet(A)*- und *tet(M)*-Gehalten der Faecesproben von Schweinen auch die *tet(B)*- sowie die *tet(M)*-Gehalte in Stuhlproben von Landwirten und den jeweiligen Kontaktpersonen signifikant erhöht waren. Umgekehrt waren die ermittelten *tet(B)*-Konzentrationen in Proben von Schweinen bei nicht-einsetzenden Betrieben signifikant höher als bei einsetzenden. Unmittelbar unter der Behandlung mit Tetrazyklinen lag die *tet(B)*-Konzentration bei den behandelten Schweinen allerdings mit 8,32 lg copies/g signifikant über dem Level der „Status Quo“-Proben (6,09 lg copies/g) und allgemein der Proben von Schweinen in nicht-einsetzenden Betrieben (6,69 lg copies/g).

Was den Probenursprung betrifft, so ergaben sich aus den durchgeführten Messungen für Proben porcinen Ursprungs bei Tetrazyklin-anwendenden Betrieben signifikant höhere *tet(A)*-Werte als für die Proben von Personen. Auch bei Betrachtung der *tet(M)*-Gehalte waren in Tetrazyklin-anwendenden Betrieben die ermittelten Konzentrationen in Schweinefaeces höher als in den humanen Stuhlproben. Anders verhielt es sich mit den *tet(B)*-Gehalten aus einsetzenden

Betrieben: Hier wurden beim Mensch signifikant höhere Werte erfasst als beim Tier.

Hinsichtlich der Haltungsart der Schweine in nicht behandelnden Betrieben ließen sich bei Betrachtung der Gen-Gehalte unterschiedliche Tendenzen ausmachen: Im Falle von *tet(A)* wurden höhere Gehalte bei Faecesproben ökologisch gehaltener Tiere gemessen, bei *tet(B)* waren die Gehalte in den Faeces von Schweinen aus konventioneller Haltung höher. Was *tet(M)* betrifft, waren die Ergebnisse nahezu identisch.

Bezüglich der Verläufe der Resistenzgenkonzentrationen unmittelbar während und nach Behandlung mit Tetrazyklinen wurden exemplarisch zwei Mastdurchgänge (S11 bis S20 und S31 bis S40) aus Betrieb E5 herausgegriffen: Jedes Mal ergaben sich hierbei – bei jeweils weitestgehend konstant bleibender molekularbiologisch bestimmter „Gesamtkeimzahl“ – wiederholbare Muster, stellvertretend sei an dieser Stelle der Anstieg der Konzentrationen von *tet(B)* und *tet(M)* während der ersten beiden Behandlungstage mit einem sich daran anschließenden Absinken bis zum Ende der Behandlung genannt. Diese Muster ließen sich auch für den, in dieser Arbeit nicht graphisch dargestellten, dritten beprobten Mastdurchgang (S41 bis S50) reproduzieren. Hingegen konnten solch charakteristische Veränderungen der Gen-Gehalte nicht beobachtet werden, wenn die beprobten Tiere nicht selbst behandelt wurden (vgl. Abschnitt 3.1.3). Auf einen Blick zeigt dies auch Abbildung 59, die die Tetrazyklinresistenzgenkonzentrationen in den Faeces des ersten (unbehandelten) Mastdurchganges von E5 (S1 bis S10) während der Behandlung von S11 bis S20 darstellt: Sowohl während als auch nach der Behandlung der Artgenossen blieben die Median-Werte von *tet(A)*, *tet(B)* und *tet(M)*, genauso wie die ermittelte Menge an 16S-rDNA, quasi konstant auf einem Level. Auch die vorherige Monatsprobe wichen im Falle von *tet(A)* und *tet(B)* kaum von einer Linie ab. In der ersten der Behandlung anschließenden Monatsprobe zeigten sich bei *tet(A)* und *tet(M)* geringgradige Abweichungen.



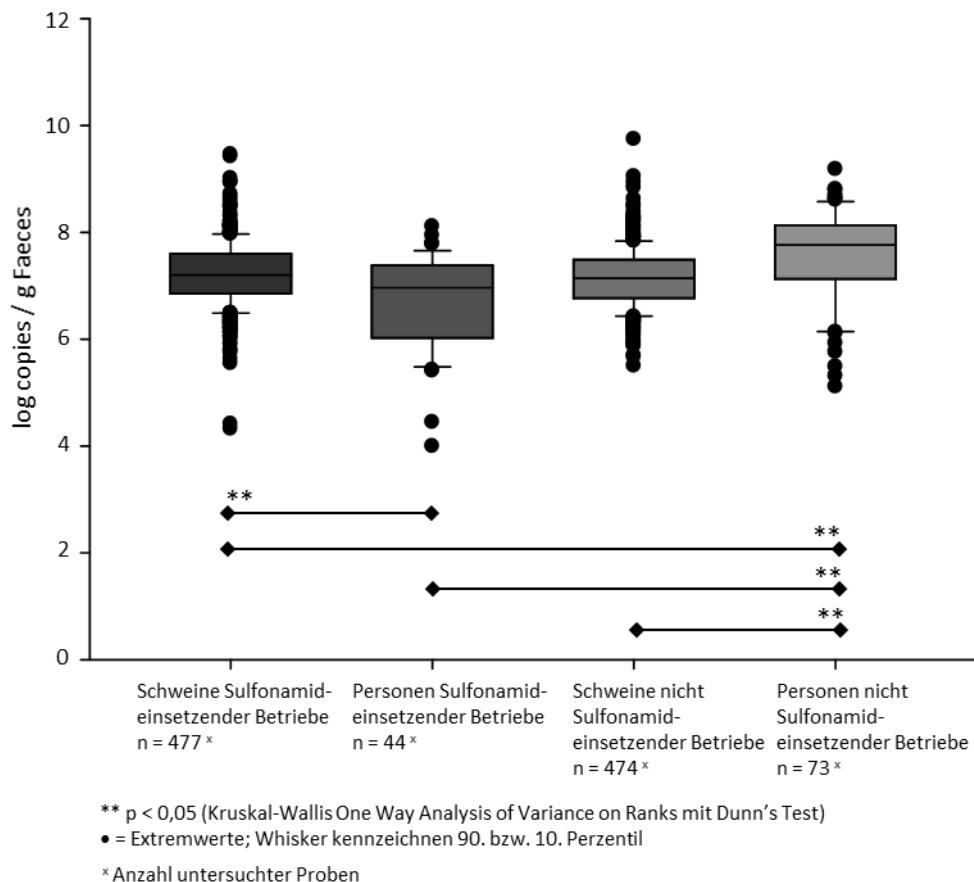
**Abbildung 59: *tet*-Gehalte sowie molekularbiologisch bestimmte „Gesamtkeimzahl“ (16S-rDNA) der zu diesem Zeitpunkt nicht selbst behandelten Schweine des ersten Mastdurchgangs (S1 bis S10), Betrieb E5**

### 3.2.1.2 Sulfonamidresistenzgene

Wie Abschnitt 3.1 entnommen werden kann, wurden nur in „Tracking“-Betrieb M13 in die Studie inkludierte Sentinel-Tiere mit Sulfonamiden behandelt. Auch in Betrieb E5 wurden diese Antibiotika in unregelmäßigen Abständen angewendet, dies geht aus den vor Ort erhobenen Daten zum Arzneimittel Einsatz hervor. Bei A21, A6, H18 wurde keine Sulfonamid-Behandlung registriert. Ähnlich wie schon bei den Tetrazyklinen kam es in Betrieb J20 zur Anwendung von Vetoprim (24 %) bei einem einzelnen, an Enteritis erkrankten Tier. Da es sich dabei um den einzigen Einsatz eines Antibiotikums der Wirkstoffklasse der Sulfonamide innerhalb des Betrachtungszeitraumes von über einem Jahr handelte, wurde J20 für diese Auswertung abermals als „nicht-einsetzender Betrieb“ gewertet.

In Abbildung 60 finden sich vier Boxplots wieder: Der höchste ermittelte *sul*(II)-Median der betrachteten Vergleichsgruppen, beziffert mit 7,76 lg copies/g, wurde bei den Personenproben nicht-einsetzender Betriebe registriert und lag damit signifikant höher nicht nur als der Wert der Gehalte von Personenproben

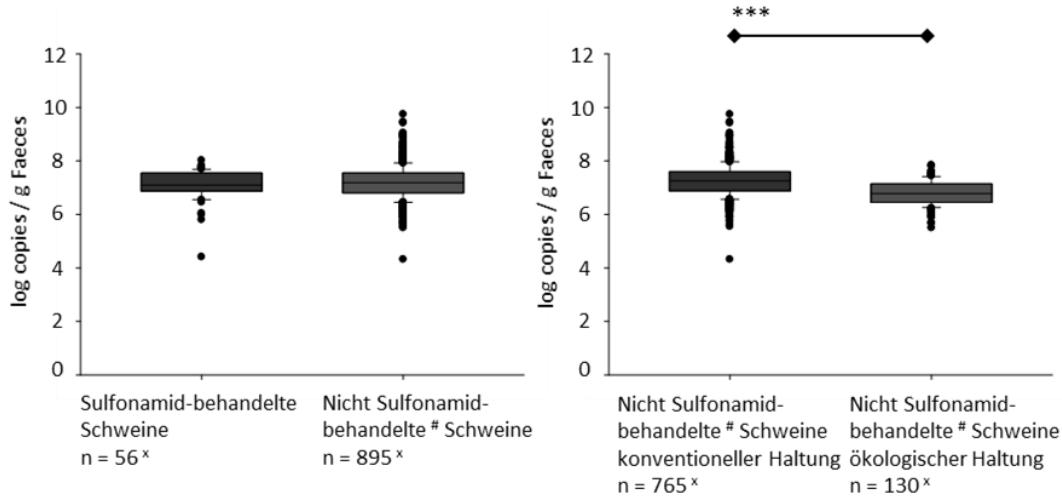
anwendender Betriebe (6,96 lg copies/g), sondern auch im Vergleich zu den Proben der Schweine. Die ermittelten *sul*(II)-Gehalte letzterer betragen 7,20 (einsetzende Betriebe) respektive 7,14 lg copies/g (nicht-einsetzende Betriebe). Während in Sulfonamid-einsetzenden Betrieben die Resistenzgen-Gehalte bei den Schweinen auf signifikant höherem Niveau zu liegen kamen als die der Personen, war dies, wie bereits angeschnitten, bei Betrieben, in denen nicht mit Sulfonamiden gearbeitet wurde, genau umgekehrt.



**Abbildung 60: *sul*(II)-Gehalte in den Faecesproben von Schweinen und Personen Sulfonamid-einsetzender sowie nicht Sulfonamid-einsetzender „Tracking“-Betriebe**

Wie aus den beiden Boxplots im linken Diagramm aus Abbildung 61 ersichtlich wird, ergaben sich beim Direktvergleich zwischen Sulfonamid-behandelten Tiere und solchen, bei denen diese Wirkstoffklasse nicht zum Einsatz kam, keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der ermittelten *sul*(II)-Gehalte (Median bei 7,10 bzw. 7,18 lg copies/g). Jedoch konnte bei der Unterscheidung zwischen konventionellen und ökologischen Betrieben, in denen Sulfonamide jeweils nicht regelmäßig zum Einsatz kamen (Abbildung 61, Diagramm rechts) festgestellt werden, dass die gemessenen Gen-Gehalte der erstgenannten Vergleichsgruppe

mit einem Median von 7,25 lg copies/g auf signifikant höherem Niveau zu liegen kamen als die der ökologischen Betriebe (6,78 lg copies/g).



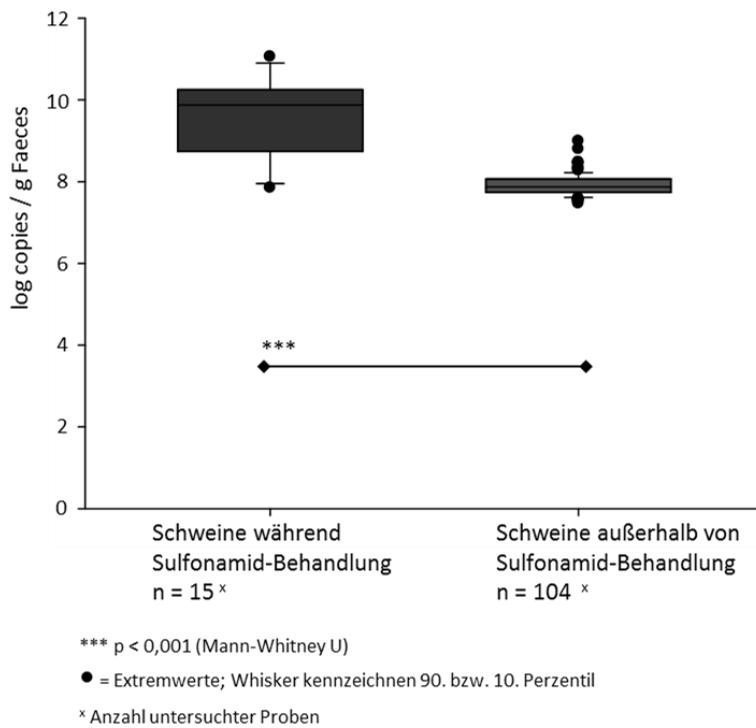
\*\*\* p < 0,001 (Mann-Whitney U) • = Extremwerte; Whisker kennzeichnen 90. bzw. 10. Perzentil

# Keine Aussage über Erzeugerbetrieb möglich, vgl. Diskussion

<sup>x</sup> Anzahl untersuchter Proben

**Abbildung 61: *sul*(II)-Gehalte in den Faecesproben von „Tracking“-Schweinen; links: Sulfonamid-behandelt ja / nein, rechts: konventionelle und ökologische Schweine ohne Sulfonamid-Behandlung**

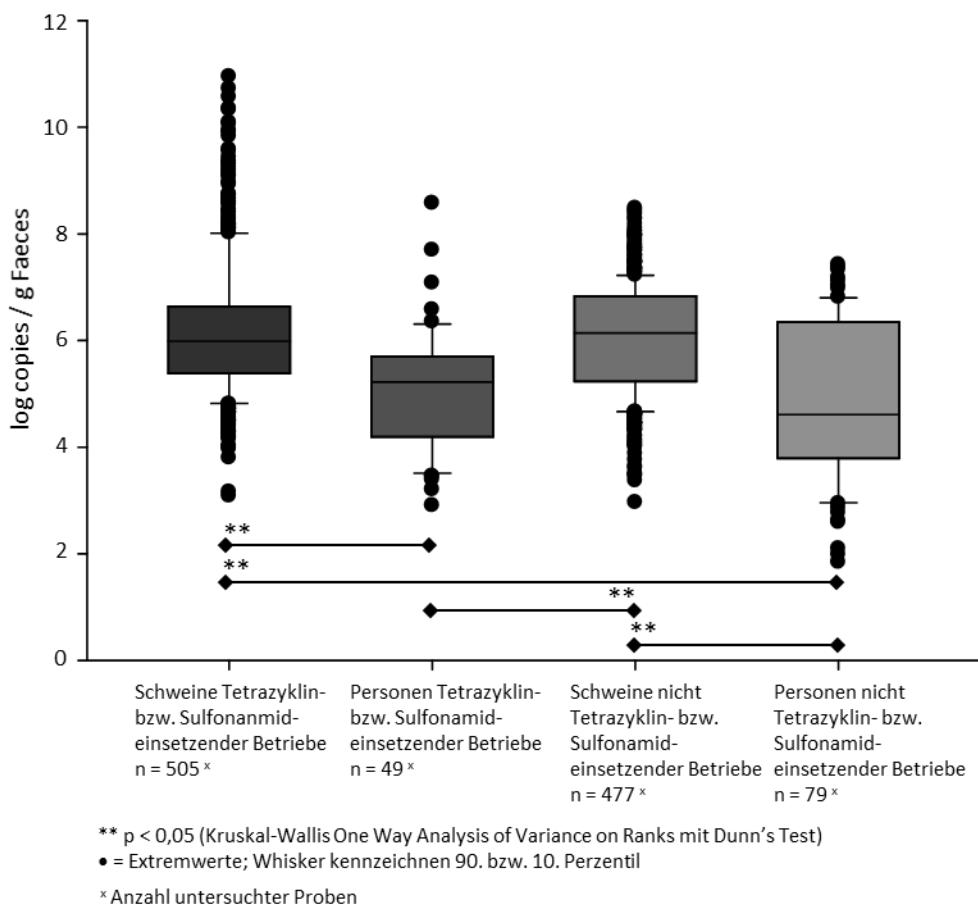
Ausschließlich für den „Tracking“-Betrieb M13 wurden auch Gehalte des Gens *sul*(I) quantifiziert. Aus diesem Grund ist an dieser Stelle ein Vergleich zwischen diesem Sulfonamid-einsetzenden Betrieb und solchen, die dies nicht tun, nicht möglich. Dies gilt in gleicher Weise für einen Vergleich zwischen Sulfonamid-behandelten und nicht behandelten Tieren. Stattdessen wurden in Abbildung 62 die *sul*(I)-Gehalte der Faecesproben von Tieren während der Behandlung mit Sulfonamiden (T0, T2, T4; vgl. Abbildung 43) den Gehalten desselben Gens außerhalb von Sulfonamid-Behandlungen gegenübergestellt. Dabei lagen die Messwerte für die erstgenannte Vergleichsgruppe mit einem Median von 9,88 lg copies/g signifikant über denen der Proben, die außerhalb einer Sulfonamid-Therapie gezogen wurden (7,87 lg copies/g). Die verhältnismäßig geringe Anzahl an untersuchten Proben von Tieren während der Behandlung ergibt sich aus der Tatsache, dass, wie in Abschnitt 3.1.5 thematisiert, im zweiten M13-Durchgang (S11 bis S20) nicht während der Sulfonamid-Behandlung dieser Schweine beprobt werden konnte.



**Abbildung 62: *sul(I)*-Gehalte in den Faecesproben von Schweinen während und außerhalb von Sulfonamid-Behandlung, Betrieb M13**

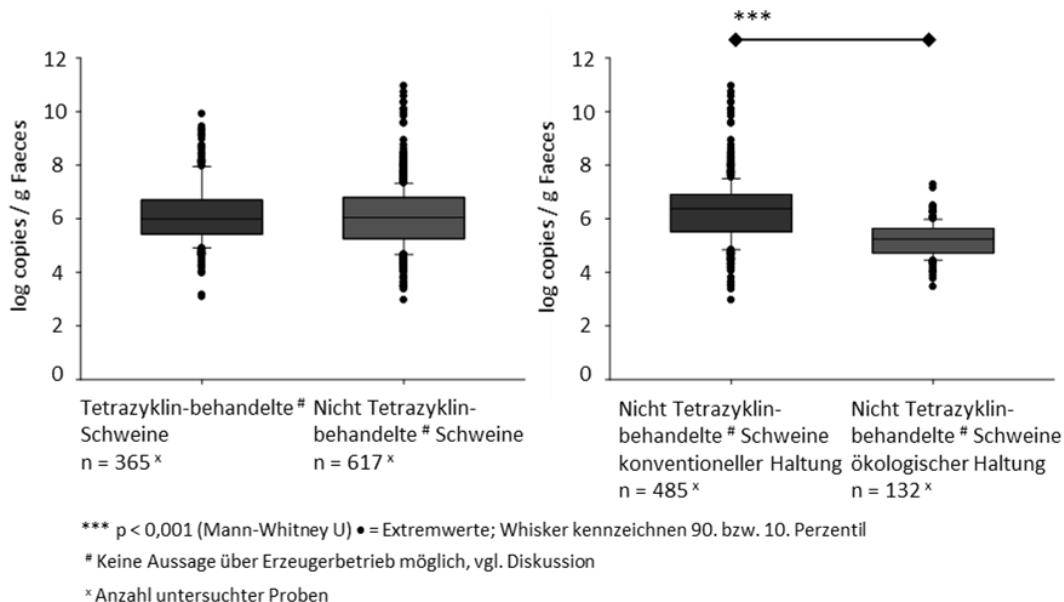
### 3.2.2 Co-Selektion

In Abbildung 63 sind die Ergebnisse hinsichtlich eines potenziellen co-selektiven Effektes durch den Einsatz von Tetrazyklinen bzw. Sulfonamiden auf die Integron-assoziierten Gene *qacE* / *qacEΔ1* dargestellt. Wie schon in vorherigen Abschnitten dieser Arbeit wurden dabei die Betriebe E5 und M13 zusammengefasst, da nur dort regelmäßig beide Wirkstoffklassen zum Einsatz kamen. Dem gegenüber stehen die Betriebe A21, A6, J20 und H18 als „nicht-einsetzende Betriebe“. Des Weiteren wurde im Diagramm abermals zwischen Schweinen und Personen unterschieden. Kein statistisch relevanter Unterschied war dabei zwischen den gemessenen Werten der *qacE* / *qacEΔ1*-Gehalte der Schweine einsetzender (Median bei 5,99 lg copies/g) und nicht-einsetzender Betriebe (6,14 lg copies/g) ausmachbar. Die gleiche Situation gilt für die Gen-Gehalte der Personen: Auch hier machte aus statistischer Sicht keinen Unterschied, ob die Proben aus Betrieben kamen, in denen regelmäßig Tetrazyklinen bzw. Sulfonamide eingesetzt wurden (der Median lag in dieser Gruppe bei 5,22 lg copies/g) oder nicht (4,61 lg copies/g). Beim Betrachten dieser Zahlen zeigt sich jedoch, dass die ermittelten Zahlenwerte der *qacE* / *qacEΔ1*-Gehalte in den Faeces der Schweine auf signifikant höherem Level angesiedelt waren als im Stuhl der beprobten Personen.



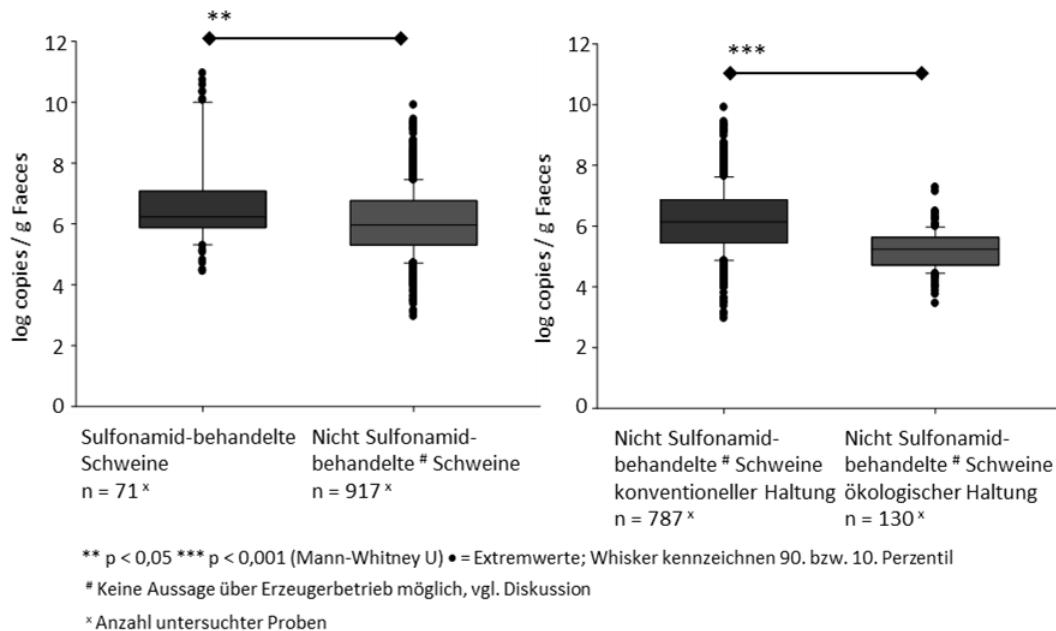
**Abbildung 63: *qacE* / *qacEΔ1*-Gehalte in den Faecesproben von Schweinen und Personen Tetrazyklin- bzw. Sulfonamid-einsetzender sowie nicht Tetrazyklin- bzw. Sulfonamid-einsetzender „Tracking“-Betriebe**

Bei Betrachtung der *qacE* / *qacEΔ1*-Gehalte in den Faecesproben von Schweinen, die selbst mit Tetrazyklinen therapiert wurden und solchen, bei denen dies nicht der Fall war (vgl. Abbildung 64), ließ sich kein statistisch relevanter Unterschied zwischen den beiden Vergleichspopulationen festmachen (Median behandelter Tiere: 5,99 lg copies/g; Median un behandelter Tiere: 6,05 lg copies/g). Im Vergleich zwischen Tetrazyklin-un behandelten Tieren konventionellen und ökologischen Ursprunges kam der Medianwert der gemessenen *qacE* / *qacEΔ1*-Konzentration der erstgenannten Gruppe mit 6,37 lg copies/g Faeces auf signifikant höherem Niveau zu liegen als der der ökologisch gehaltenen Schweine (5,24 lg copies/g).



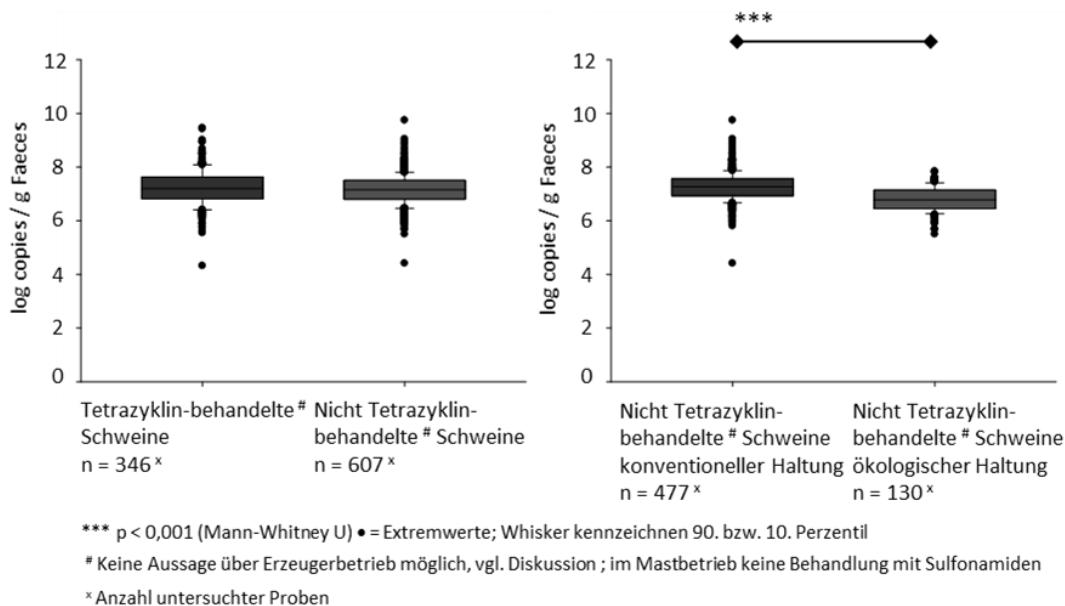
**Abbildung 64: *qacE / qacEΔ1*-Gehalte in den Faecesproben von „Tracking“-Schweinen; links: Tetrazyklin-behandelt ja / nein, rechts: konventionelle und ökologische Schweine ohne Tetrazyklin-Behandlung**

Hingegen waren, wie aus Abbildung 65 ersichtlich wird, die *qacE / qacEΔ1*-Gehalte in Faecesproben von Tieren, die im Betrieb mit Sulfonamiden behandelt worden waren mit einem Median von 6,23 lg copies/g signifikant höher als die unbehandelte Vergleichsgruppe (5,96 lg copies/g). Bei der Gegenüberstellung von nicht mit Sulfonamiden behandelten Tieren aus konventioneller bzw. ökologischer Herkunft ergaben sich für konventionell gehaltene Schweine abermals signifikant höhere Gehalte (Median bei 6,14 lg copies/g) als für ökologisch gehaltene (5,24 lg copies/g).



**Abbildung 65: *qacE* / *qacEΔ1*-Gehalte in den Faecesproben von „Tracking“-Schweinen; links: Sulfonamid-behandelt ja / nein, rechts: konventionelle und ökologische Schweine ohne Sulfonamid-Behandlung**

Hinsichtlich *sul*(II)-Gehalte machte es keinen Unterschied, ob die Schweine selbst mit Tetrazyklinen therapiert worden waren oder nicht (Median behandelter Tiere: 7,20 lg copies/g; Median un behandelter Tiere: 7,15 lg copies/g), dies geht aus Abbildung 66 hervor. Der Median der *sul*(II)-Konzentrationen nicht behandelter Schweine aus konventionellen Betrieben mit einem Wert von 7,27 lg copies/g höher angesiedelt als der von Tieren aus ökologischer Haltung (6,78 lg copies/g).



**Abbildung 66: sul(II)-Gehalte in den Faecesproben von „Tracking“-Schweinen; links: Tetrazyklin-behandelt ja / nein, rechts: konventionelle und ökologische Schweine ohne Tetrazyklin-Behandlung**

### 3.3 Genotypische Ähnlichkeit der Indikatorspezies *E. coli* zwischen Landwirten, dessen Familienmitgliedern und Schweinen

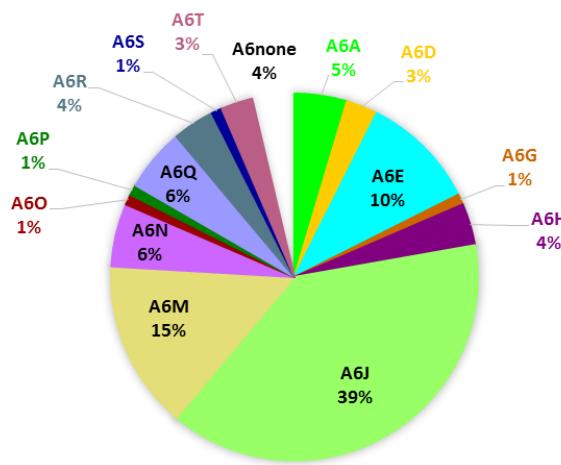
#### 3.3.1 ERIC-PCR

Mittels der molekularbiologischen Vergleichsmethoden ERIC-PCR und anschließender Cluster-Analysen wurde die genotypische Ähnlichkeit zwischen *E. coli*-Isolaten von Landwirt bzw. Kontaktperson und Schweinen ermittelt, um eine Aussage über die Herkunft und potenzielle Übertragungen der isolierten Indikatorkeime zwischen Mensch und Tier zu ermöglichen. Dabei wurde jeweils eine Gesamtcluster-Analyse aller untersuchten Isolate für den jeweiligen Betrieb erstellt. Die dazugehörigen Abbildungen dieser Gesamtcluster-Analyse finden sich im Anhang dieser Arbeit (Abbildung 112, Abbildung 113, Abbildung 114 und Abbildung 115). Überblick über die jeweilig untersuchten Probanden und Probenahmezeitpunkte geben Tabelle 34, Tabelle 35, Tabelle 36 und Tabelle 37, ebenfalls allesamt im Anhang dieser Arbeit. Die gebildeten Cluster wurden in alphabetischer Reihenfolge benannt, beispielsweise „A6A“, „A6B“, „A6C“ usw. Isolate, die keinem der Hauptcluster zugeordnet werden konnten wurden gesondert, z. B. unter dem Label „A6none“, dargestellt. Als „Hauptcluster“ werden im Folgenden solche benannt, die einen Anteil von mindestens 10 % aller für den jeweiligen Betrieb analysierten Isolate erreichen. Weiterhin sei darauf

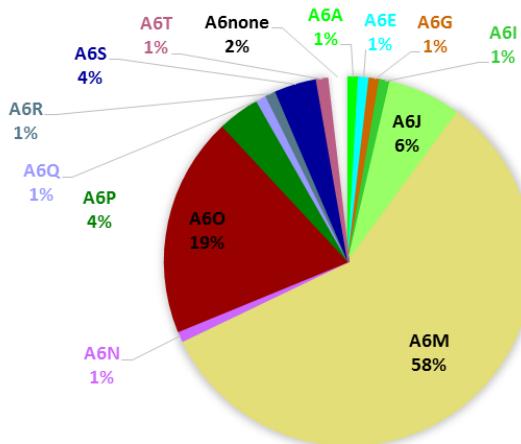
hingewiesen, dass in den Kreisdiagrammen der folgenden Abschnitte gleiche Cluster immer durch den gleichen Namen und die gleiche Farbe gekennzeichnet sind. Zwischen den Betrieben wurden keine Zusammenhänge untersucht, etwaig gleiche Farben zwischen Cluster-Diagrammen unterschiedlicher Betriebe haben somit keine Aussage.

### 3.3.1.1 Betrieb A6

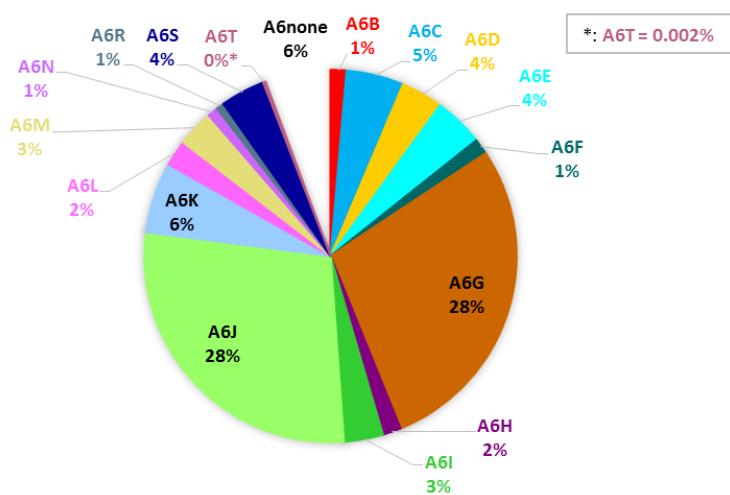
Abbildung 67, Abbildung 68 und Abbildung 69 zeigen die Ergebnisse der Cluster-Analyse des Betriebs A6, insgesamt wurden dabei 657 *E. coli* (detaillierte Übersicht der untersuchten Isolate unter Tabelle 34 im Anhang) in die Auswertung einbezogen, die nach Landwirt (P1), Familienmitglied (P2) und den gepoolten *E. coli*-Isolaten aller analysierten Schweine aufgesplittet sind. Die Prozentsätze der jeweiligen Cluster der folgenden Kreisdiagramme wurden zu ganzen Zahlen gerundet, weswegen es vorkommen kann, dass die Werte zusammengenommen nicht exakt 100 % ergeben (dies gilt auch für die in den kommenden Abschnitten beschriebenen Analysen der anderen drei „Tracking“-Betriebe).



**Abbildung 67: Cluster-Analyse der *E. coli*-Isolate (n = 108) vom Landwirt (P1), Betrieb A6**



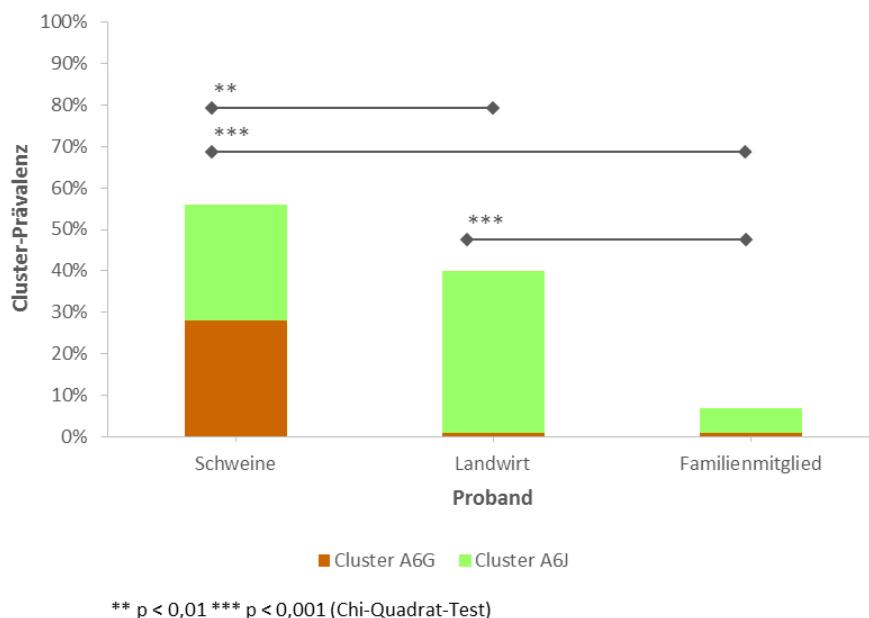
**Abbildung 68: Cluster-Analyse der *E. coli*-Isolate (n = 109) vom Familienmitglied (P2), Betrieb A6**



**Abbildung 69: Cluster-Analyse der *E. coli*-Isolate (n = 440) der Schweine, Betrieb A6**

Wie aus Abbildung 67 hervorgeht, ließen sich die aus den Faecesproben des Landwirtes isolierten *E. coli* in insgesamt 14 verschiedene Cluster untergliedern. Dabei stachen drei Hauptcluster, A6E, A6J und A6M, deren Größe zwischen 10 und 39 % lag, hervor – sie repräsentierten insgesamt 64 % der Isolate. Die Größe der elf übrigen Cluster variierte zwischen 1 und 6 %. Vier Prozent der untersuchten Keime konnten keinem Cluster zugeordnet werden und fielen daher in das Segment „A6none“. Die Cluster-Analyse des Familienmitglieds, dargestellt im Kreisdiagramm aus Abbildung 68, ergab zwei Hauptcluster, nämlich A6M mit einer Größe von 58 % und A6O mit 19 %. Elf kleinere Cluster umfassten zwischen 1 und 6 % der *E. coli*-Isolate der untersuchten Person. Der Anteil der nicht kategorisierbaren Isolate des Familienmitglieds („A6none“) betrug zwei Prozent. In Abbildung 69 sind die Ergebnisse der Cluster-Analyse der untersuchten *E. coli* aller Schweine aus Betrieb A6 aufgeführt: Zwei Hauptclustern, A6G und A6J mit einer Größe von jeweils 28 %, stehen 14 weitere Cluster gegenüber, deren Größe von 0,002 (A6T) bis 6 % (A6K) reichte. Sechs Prozent der Schweine-Isolate konnten nicht geclustert werden („A6none“).

Zur besseren Veranschaulichung der Verwandtschaftsverhältnisse der *E. coli*-Isolate menschlichen Ursprungs mit denen der Schweine wurde in Abbildung 70 überprüft, in welchem Maße sich die beiden bei den Schweinen identifizierten Hauptcluster A6G und A6J bei den Personen wiederfinden ließen.



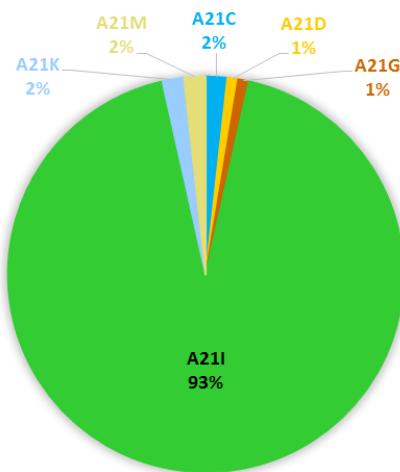
**Abbildung 70: Prävalenz schweine-assozierter Hauptcluster von *E. coli*-Isolaten (n = 299) beim Landwirt und Familienmitglied, Betrieb A6**

Für diese Abbildung gilt, ebenso wie für die nachfolgenden Abbildung 74, Abbildung 78 und Abbildung 82, Folgendes: Die abgebildeten Signifikanzen beziehen sich auf die Unterschiede in der absolute Höhe der jeweiligen Säulen und wurden mittels des Chi-Quadrat-Tests berechnet. Unter Cluster A6J fielen 28 % der vom Schwein isolierten *E. coli*, beim Landwirt umfasste selbiges Cluster gar 39 % aller Isolate. Beim Familienmitglied hingegen trat das Cluster nur in 6 % der Fälle in Erscheinung. Cluster A6G fand sich mit einem Anteil von 28 % fast ausschließlich bei den Schweinen wieder, dem steht eine Prävalenz von jeweils einem Prozent bei den Personen gegenüber.

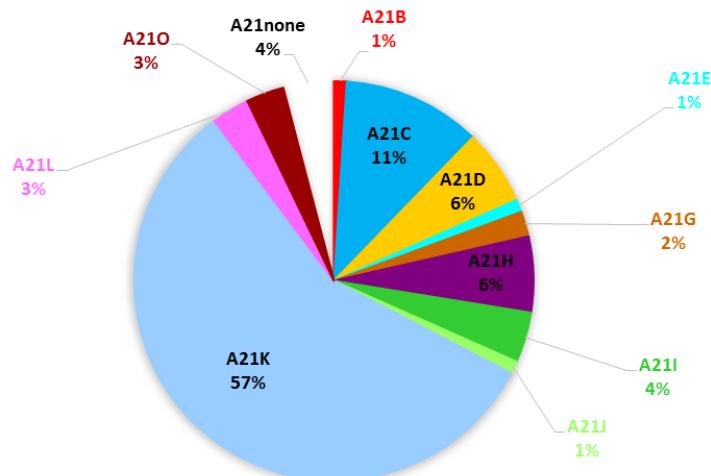
Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass aus den Faeces des Landwirtes isolierte *E. coli* im Vergleich der Cluster-Analysen signifikant höhere Übereinstimmung mit Isolaten des Schweins aufwiesen als *E. coli* des Familienmitglieds.

### **3.3.1.2 Betrieb A21**

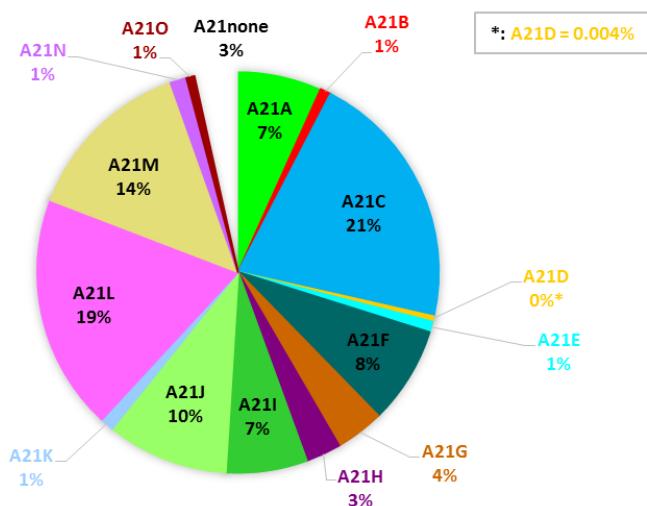
Die Ergebnisse der Cluster-Analysen der ERIC-Bandenmuster der untersuchten *E. coli*-Isolate (n = 671) aus Betrieb A21 finden sich in Abbildung 71, Abbildung 72 und Abbildung 73, abermals untergliedert nach Landwirt, Familienmitglied des Landwirtes sowie nach den Schweinen des Betriebs. Die detaillierte Auflistung der untersuchten Isolate befindet sich als Tabelle 35 im Anhang.



**Abbildung 71: Cluster-Analyse der *E. coli*-Isolate (n = 114) vom Landwirt (P1), Betrieb A21**



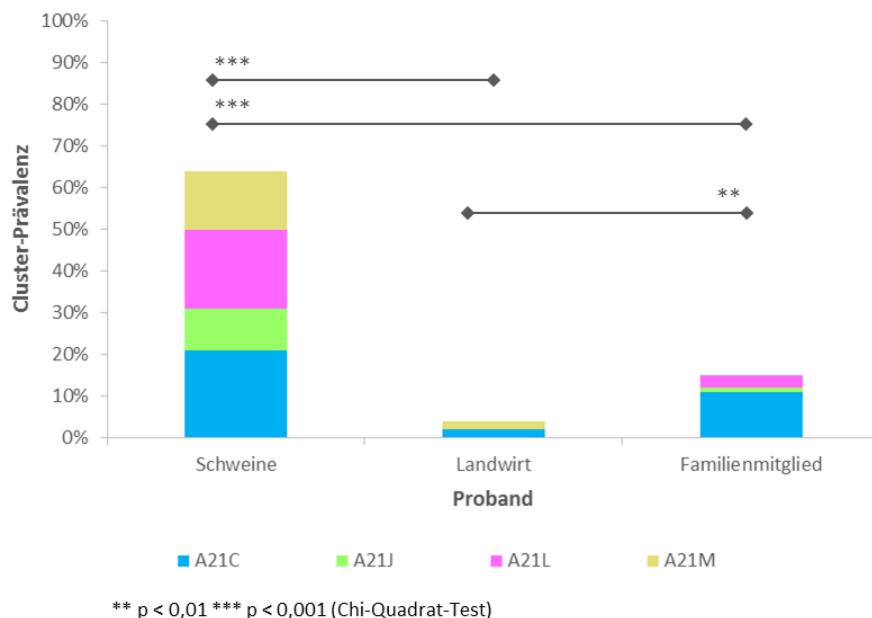
**Abbildung 72: Cluster-Analyse der *E. coli*-Isolate (n = 98) vom Familienmitglied (P2), Betrieb A21**



**Abbildung 73: Cluster-Analyse der *E. coli*-Isolate (n = 459) der Schweine, Betrieb A21**

Wie beim ersten Blick auf Abbildung 71 leicht ersichtlich, können beim Landwirt 93 % – der bei weitem größte Teil der aus den Faecesproben isolierten *E. coli* – einem einzigen Cluster, A21I, zugeordnet werden konnten. Darüber hinaus wurden fünf weitere Cluster von geringer Größe (zwischen einem und zwei Prozent) identifiziert, auf die die restlichen Isolate verteilt waren. Beim Familienmitglied fanden sich mit A21C und A21K zwei Hauptcluster, deren Größe mit 11 bzw. 57 % beziffert wurde. Neun weitere Cluster beherbergten zwischen einem und sechs Prozent der Isolate. Vier Prozent der *E. coli* des Familienmitglieds wurden dem Segment „A21none“ zugerechnet, da sie in keiner Übereinstimmung mit den übrigen Clustern standen. Die Isolate der Schweine aus Betrieb A21 fanden sich zu 64 % in einem der vier Hauptcluster A21C (21 %), A21J (10 %), A21L (19 %) und A21M (14 %) wieder. Des Weiteren wurden hier elf kleinere Cluster registriert, deren Größe zwischen 0,004 und 8 % lag. Drei Prozent der *E. coli* konnten nicht geclustert werden und fielen daher in die Kategorie „A21none“.

Abbildung 74 stellt die Prävalenz der vier bei den Schweinen registrierten Hauptcluster A21C, A21J, A21L und A21M der Prävalenz derselben Cluster bei den beprobten Personen gegenüber.



**Abbildung 74: Prävalenz schweine-assoziierter Hauptcluster von *E. coli*-Isolaten (n = 310) beim Landwirt und Familienmitglied, Betrieb A21**

Cluster A21C umfasste bei den Schweinen 21 % der untersuchten Isolate, dem gegenüber trat dieses Cluster beim Landwirt in 2 %, beim Familienmitglied 11 %

der Fälle auf. Das zweitgrößte Cluster der Schweine, A21L (19 %) ließ sich beim Landwirt gar nicht detektieren, bei der anderen Person in 3 % der Fälle. Ein ähnliches Bild zeigt sich bei der Betrachtung von Cluster A21J, das bei den Schweinen 14 % der Isolate umfasste, beim Landwirt überhaupt nicht auftrat und dem beim Familienmitglied nur ein Prozent der Isolate zugerechnet wurde. Umgekehrt verhielt es sich hingegen bei Cluster A21M, das bei den Schweinen (14 %) und beim Landwirt (2 %) auftrat, beim Familienmitglied jedoch nicht.

Alles in allem zeigten sich keine allzu großen Übereinstimmungen zwischen den *E. coli* beim Schwein auf der einen und denen bei den Personen auf der anderen Seite. Der Anteil der nach Cluster-Analyse mit den *E. coli* der Schweine übereinstimmenden Isolate lag mit 15 % beim Familienmitglied jedoch höher als beim Landwirt (4 %).

### 3.3.1.3 Betrieb E5

In Abbildung 75, Abbildung 76 und Abbildung 77 sind die Cluster-Analysen aller mittels ERIC-PCR untersuchten *E. coli*-Isolate (n = 1195) von „Tracking“-Betrieb E5 dargestellt, untergliedert nach Landwirt, Kontaktperson und Schweinen. Eine detaillierte Auflistung der jeweils untersuchten Probanden und Probenahmezeitpunkte dieses Betriebs findet sich im Anhang (Tabelle 36).

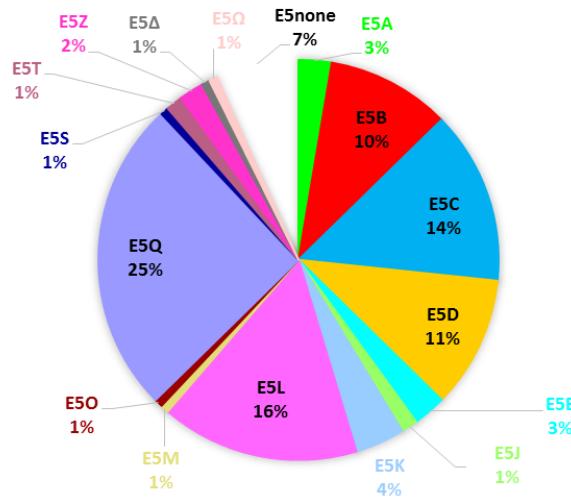


Abbildung 75: Cluster-Analyse der *E. coli*-Isolate (n = 150) vom Landwirt (P2), Betrieb E5

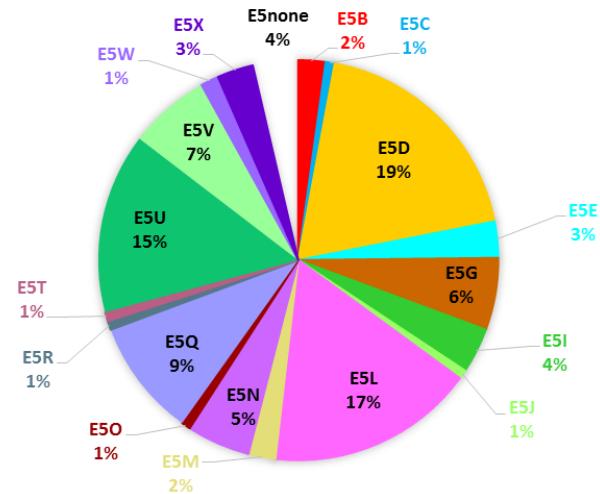


Abbildung 76: Cluster-Analyse der *E. coli*-Isolate (n = 137) vom Familienmitglied (P1), Betrieb E5

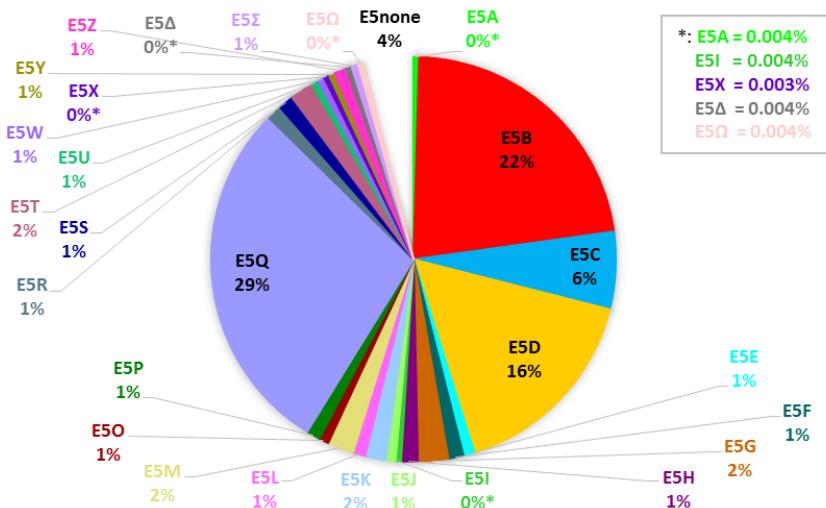
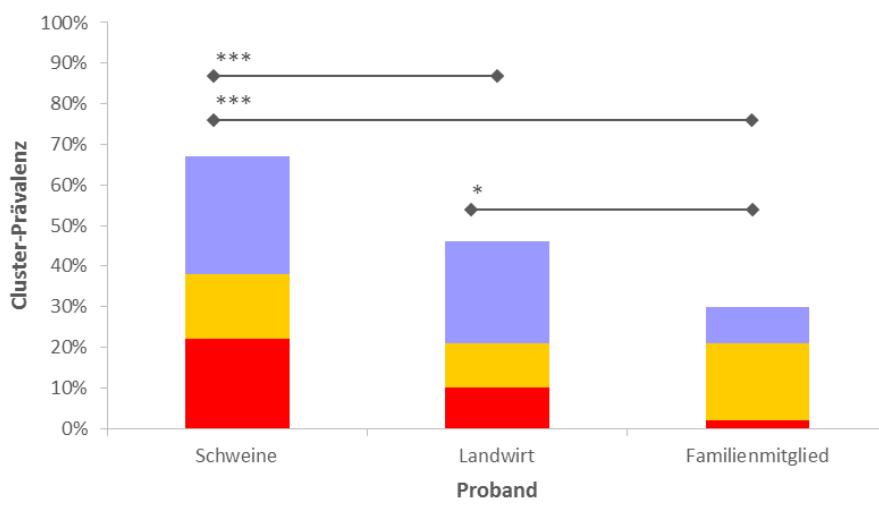


Abbildung 77: Cluster-Analyse der *E. coli*-Isolate (n = 908) der Schweine, Betrieb E5

Mit zusammengenommen 76 % entfielen mehr als drei Viertel aller Isolate des Landwirtes auf die fünf Hauptcluster E5B, E5C, E5D, E5L und E5Q. Daneben konnten elf weitere Cluster identifiziert werden. Sieben Prozent der Isolate konnten von GelCompar® II keinem bestimmten Cluster zugeordnet werden, sie fallen in das Segment „E5none“. Beim Familienmitglied konnte circa die Hälfte der Isolate den zwei Hauptclustern E5D (19 %), E5L (17 %) und dem hinzutretenden Hauptcluster E5U (15 %) zugerechnet werden. Daneben traten bei der Kontaktperson des Landwirtes 15 weitere Cluster in Erscheinung, 9 % entfielen dabei auf E5Q, einem Hauptcluster des Landwirtes. Als keinem Cluster zugehörig („E5none“) erwiesen sich 4 % der *E. coli*. Was die Schweine betrifft, so ließen sich deren Isolate neben drei Hauptclustern (E5B, E5D, E5Q), deren Anteil zusammen 67 % betrug, in 24 weiteren Cluster zusammenfassen. Keinem Cluster zugeordnet werden konnten hier vier Prozent.

Abbildung 78 vergleicht die Prävalenz der drei beim Schwein detektierten Hauptcluster E5B, E5D und E5Q mit der Häufigkeit derselben Cluster beim Landwirt und dessen Kontaktperson.



\* p < 0,05 \*\*\* p < 0,001 (Chi-Quadrat-Test)

**Abbildung 78: Prävalenz schweine-assoziierter Hauptcluster von *E. coli*-Isolaten (n = 720) beim Landwirt und Familienmitglied, Betrieb E5**

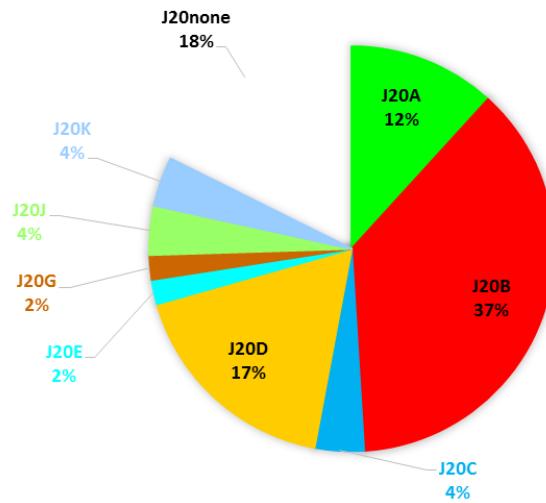
Beim Blick auf Abbildung 78 fällt noch einmal auf, dass die drei Hauptcluster der Schweine sowohl beim Landwirt, wie auch beim Familienmitglied auftraten. Cluster E5B trat bei den Schweinen in 22 % der Fälle, beim Landwirt immerhin noch in 10 % der Fälle auf, beim Familienmitglied hingegen wurden nur noch 2 %

der Isolate diesem Cluster zugerechnet. Das zweite Hauptcluster, E5D, trat mit 19 % am häufigsten beim Familienmitglied in Erscheinung, bei Schweinen und Landwirt betrug die Prävalenz 16 bzw. 11 %. In das Cluster E5Q fielen beim sowohl beim Schwein (29 %), wie auch beim Landwirt (25 %) verhältnismäßig mehr Isolate als beim Familienmitglied (9 %).

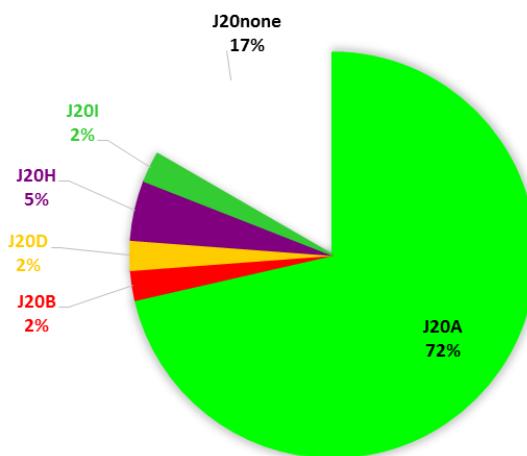
Obwohl die drei Hauptcluster der Schweine sowohl bei Landwirt als auch Familienmitglied auftraten, lässt sich zusammenfassen, dass die *E. coli*-Isolate des Landwirtes (abgesehen von Cluster E5D) in höherem Maße mit denen der Schweine übereinstimmen als die der Kontaktperson.

### 3.3.1.4 Betrieb J20

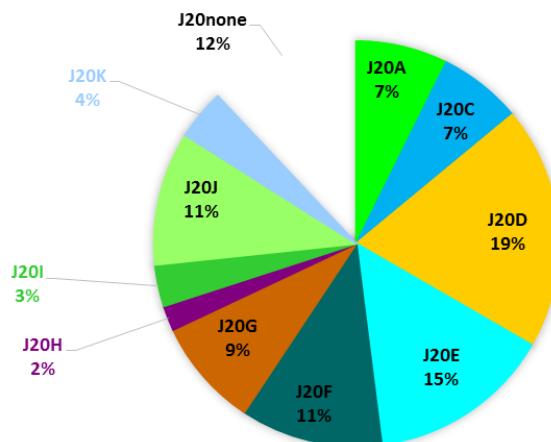
Ähnlich wie in den vorherigen Abschnitten dieser Arbeit, sind auch die Ergebnisse der Cluster-Analyse für Betrieb J20 in drei Kreisdiagrammen dargestellt, wobei nach Landwirt, Familienmitglied und Schweinen aufgeschlüsselt wurde (vgl. Abbildung 79, Abbildung 80 und Abbildung 81). Insgesamt handelt es sich dabei um 243 Isolate, die über den Zeitraum April bis einschließlich Juni 2014 gewonnen wurden. Auch hier findet sich eine Übersicht der einzelnen zur Untersuchung herangezogenen Isolate im Anhang Tabelle 37).



**Abbildung 79: Cluster-Analyse der *E. coli*-Isolate (n = 51) vom Landwirt (P1), Betrieb J20**



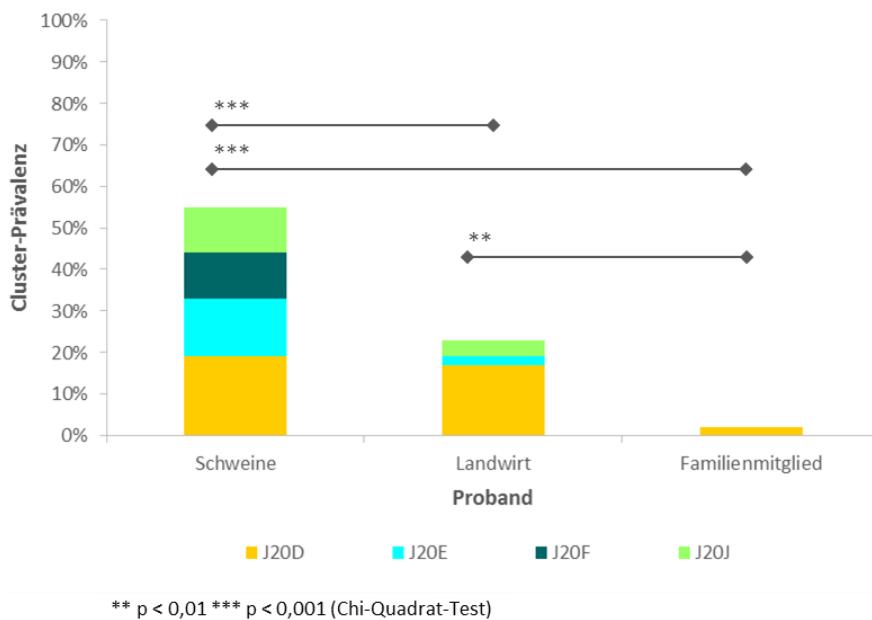
**Abbildung 80: Cluster-Analyse der *E. coli*-Isolate (n = 42) vom Familienmitglied (P2), Betrieb J20**



**Abbildung 81: Cluster-Analyse der *E. coli*-Isolate (n = 150) der Schweine, Betrieb J20**

Unter den acht beim Landwirt detektierten Clustern befanden sich drei Hauptcluster, deren Größe 37 % (J20B), 17 % (J20D) und 12 % (J20A) betrug. Die Größe der übrigen fünf Cluster variierte zwischen 2 und 4 %. Der Anteil der *E. coli*, deren ERIC-Bandenmuster keinem der Cluster zugeordnet werden konnten, war mit 18 % recht hoch („J20none“). Beim Familienmitglied wurden neben einem großen Hauptcluster, das mit 72 % den Großteil der Isolate umfasste, noch vier weitere Cluster identifiziert, deren Größe zwischen 2 und 5 % betrug. Auch bei dieser Person war der Anteil der nicht zuordnenbaren *E. coli* mit 17 % höher als in den anderen untersuchten Betrieben. J20D, J20E, J20F, J20J stellten die Hauptcluster bei den aus Schweine-Faeces isolierten Keimen dar, ihre Größe lag zwischen 11 und 19 %, zusammen stellten diese vier Cluster mehr als die Hälfte der Isolate. Weiterhin gab es sechs kleinere Cluster, die zwischen 2 und 9 % der *E. coli* umfassten. Zwölf Prozent der untersuchten Isolate konnten keinem der Cluster von J20 zugeordnet werden.

Das Säulendiagramm aus Abbildung 82 vergleicht das Auftreten der beim Schwein detektierten Hauptcluster mit der Prävalenz derselben Cluster bei den beprobten Personen.



**Abbildung 82: Prävalenz schweine-assozierter Hauptcluster von *E. coli*-Isolaten (n = 97) beim Landwirt und Familienmitglied, Betrieb J20**

J20D, beim Schwein mit 19 % das größte Cluster, fand sich in fast gleichem Umfang (17 %) auch beim Landwirt wieder. Auch beim Familienmitglied trat J20D auf, wenn auch nur in geringerem Ausmaß (2 %). Die beiden Cluster J20E

und J20J umfassten beim Schwein 15 bzw. 11 % der *E. coli*, beim Landwirt 2 bzw. 4 % und traten bei der anderen Person gar nicht in Erscheinung. Cluster J20F trat, wie bereits im vorherigen Absatz erwähnt, nur bei den Schweine-Isolaten auf.

Auch wenn die Isolate aus den Faeces des Landwirtes in ihrer Cluster-Zusammensetzung von der der Schweine abwichen, so wiesen diese *E. coli* alles in allem mehr Ähnlichkeiten zu jenen der Schweine auf, als dies bei den *E. coli* des Familienmitglieds der Fall war.

### 3.3.2 MLST-PCR

Exemplarisch wurden Ergebnisse der ERIC-PCR durch MLST-PCR und anschließende Sequenzierung überprüft. Als zu untersuchende Proben dienten das Isolat-Paar „E5-07-13-S14 Eco7“ und „E5-07-13-P2 Eco3“ (im Folgenden als „Paar E5-1“ bezeichnet) sowie das Isolat-Paar „E5-P2-3T5 Eco7“ und „E5-11-13-S39 Eco7“ (im Folgenden „Paar E5-2“) von „Tracking“-Betrieb E5. Bei Paar E5-1 handelt es sich dabei um zwei *E. coli*-Isolate der monatlichen „Status Quo“-Probe vom Juli 2013, einerseits von Schwein Nr. 14, andererseits vom Landwirt, deren Ähnlichkeit in der Auswertung der ERIC-Bandenmuster von GelCompar® II mit 100 % beziffert worden war. Paar E5-2 besteht aus einem Isolat, das an Tag 5 einer im Januar 2014 durchgeführten Behandlung der Schweine (vgl. Abbildung 42) aus den Faeces des Landwirtes gewonnen wurde und einem Isolat der monatlichen „Status Quo“-Probe November 2013 von Schwein Nr. 39. Hier betrug die Ähnlichkeit der ERIC-Bandenmuster in GelCompar® II ebenfalls 100 %.

Außerdem wurde das Isolat-Paar „A6-07-13-P1 Eco2“ und „A6-S8-3T3 Eco4“ (Paar A6-1), isoliert aus einer Faecesprobe der „Status Quo“-Probe des Monats Juli 2013 vom Landwirt respektive aus einer Faecesprobe von Schwein Nr. 8 während einer ebenfalls auf Juli 2013 datierten Behandlung mit Tylosin (vgl. Abbildung 36), beide von Betrieb A6, getestet. Auch hier lag als Auswahlkriterium eine von GelCompar® II berechnete Übereinstimmung von 100 % im ERIC-Bandenmuster zugrunde.

Die aufgereinigten PCR-Amplifikate wurden jeweils einmal sequenziert. Zunächst wurde der sog. „Sequence type“ (ST), also das sich aus den Sequenzen der der Housekeeping-Gene ergebende Allel-Profil, der untersuchten Isolate unter

Zuhilfenahme der online verfügbaren MLST-Datenbank für *E. coli* der Warwick Universität (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli/>) ermittelt. Auf der Website wird dem Housekeeping-Gen ein Zahlencode zugewiesen, der sich aus der Gensequenz ableitet. Kombiniert lassen sich die jeweiligen Codes der sieben Housekeeping-Gene auf der angegebenen Website in eine Suchmaske eingeben, im Anschluss daran wird die Datenbank nach identischen Sequenztypen abgeglichen. Abbildung 83 und Abbildung 84 zeigen die Ergebnisse des Datenbank-Abgleiches von Isolat-Paar E5-1 von Betrieb E5.

ST	adk	fumC	gyrB	icd	mdh	purA	recA	ST Complex
ST20	6	4	3	18	7	7	6	ST20 Cplx
<u>ST20</u>	6	4	3	18	7	7	6	ST20 Cplx
<u>ST561</u>	6	4	3	18	7	7	23	ST20 Cplx
<u>ST560</u>	6	4	3	77	7	7	6	ST20 Cplx
<u>ST3674</u>	6	4	3	18	7	7	14	None
<u>ST3579</u>	6	4	345	18	7	7	6	None

**Abbildung 83: Ergebnisse des MLST-Datenbank-Abgleiches von Isolat „E5-07-13-S14 Eco7“**

ST	adk	fumC	gyrB	icd	mdh	purA	recA	ST Complex
unknown ST	6	23	32	16	9	8	6	No ST Complex
<u>ST675</u>	6	23	32	16	9	8	7	None
<u>ST4733</u>	6	23	32	88	9	8	6	None
<u>ST3640</u>	6	23	3	16	9	8	6	None
<u>ST203</u>	6	23	32	16	43	8	6	None
<u>ST942</u>	6	4	3	16	9	8	6	None

**Abbildung 84: Ergebnisse des MLST-Datenbank-Abgleiches von Isolat „E5-07-13-P2 Eco3“**

Die Allele der beiden Isolate stimmten in zwei von sieben Fällen überein. Bei „E5-07-13-S14 Eco7“ handelte es sich um einen dem Sequenztyp ST20 identischen Klon (vgl. Abbildung 83). Für „E5-07-13-P2 Eco3“ hingegen konnte in der Datenbank keine 100 %ige Übereinstimmung mit einem der hinterlegten Sequenztypen gefunden werden (s. Abbildung 84). Die nächsten „Verwandten“ dieses Isolates sind die Sequenztypen ST675, ST4733, ST3640 und ST203, die allesamt in nur einem Allel-Profil eines der Housekeeping-Gene von

„E5-07-13-P2 Eco3“ abwichen. ST942 hingegen unterschieden sich bereits in den Nukleotidsequenzen zweier Housekeeping-Gene vom untersuchten Isolat.

Zusätzlich wurden die jeweils ohne Unterbrechung direkt hintereinander verknüpften Nukleotidsequenzen der Gene der beiden Isolate der jeweiligen *E. coli*-Paare mittels NCBI BLAST® gegeneinander abgeglichen und auf Unterschiede hin untersucht. Beispielhaft ist dieser Abgleich in Abbildung 85 dargelegt: Die Größe der entsprechend aneinandergereihten Sequenz der Isolate „E5-07-13-S14 Eco7“ (= Query) und „E5-07-13-P2 Eco3“ (= Sbjct) (Paar E5-1) betrug jeweils 5631 bp, in der Abbildung ist der Abschnitt von Basenpaar 721 bis 840 dargestellt. An Position 809 kam es zu einem „Mismatch“ der beiden Sequenzen, im Alignment gekennzeichnet durch den fehlenden Verbindungsstrich zwischen den abgeglichenen Nukleotiden. Die Analyse (eine vollständige Version des Nukleotidabgleiches befindet sich im Anhang) ergab, dass von den 5631 Basenpaaren insgesamt 5600 übereinstimmten, woraus eine Sequenzübereinstimmung von 99,5 % resultierte.

	Basen- position		Basen- position
Query 721	GAGCCAGTTCCGCTACGTGAGGCAGGCTGTATTGATATGTTGAGATTATGCTCGAGCA	780	
Sbjct 721	GAGCCAGTTCCGCTACGTGAGGCAGGCTGTATTGATATGTTGAGATTATGCTCGAGCA	780	
Query 781	TCGCTACCCAGCCGGAAATCTCCTGCCCTAGTGTAGCGGCGTGGCGTCTGCAAGTGGG	840	
	(green circle) (red circle)		
Sbjct 781	TCGCTACCCAGCCGGAAATCTCCTGCCCTAGTGTAGCGGCGTGGCGTCTGCAAGTGGG	840	

Übereinstimmung: T - T

Keine Übereinstimmung: T - C

**Abbildung 85: Ausschnitt des Sequenzabgleiches der Nukleotidsequenzen der Isolate „E5-07-13-S14 Eco7“ (= Query) und „E5-07-13-P2 Eco3“ (= Sbjct) (= Paar E5-1)**

Die Ergebnisse des MLST-Datenbankabgleiches von Isolat-Paar E5-2 zeigen Abbildung 86 und Abbildung 87.

ST	adk	fumC	gyrB	icd	mdh	purA	recA	ST Complex
ST10	10	11	4	8	8	8	2	ST10 Cplx
<u>ST10</u>	10	11	4	8	8	8	2	ST10 Cplx
<u>ST986</u>	10	134	4	8	8	8	2	None
<u>ST98</u>	10	11	4	39	8	8	2	ST10 Cplx
<u>ST976</u>	10	189	4	8	8	8	2	None
<u>ST975</u>	10	182	4	8	8	8	2	None

**Abbildung 86: Ergebnisse des MLST-Datenbank-Abgleiches von Isolat „E5-P2-3T5 Eco7“**

ST	adk	fumC	gyrB	icd	mdh	purA	recA	ST Complex
ST34	10	11	4	1	8	8	2	ST10 Cplx
<u>ST34</u>	10	11	4	1	8	8	2	ST10 Cplx
<u>ST98</u>	10	11	4	39	8	8	2	ST10 Cplx
<u>ST891</u>	10	11	4	33	8	8	2	None
<u>ST771</u>	10	11	4	148	8	8	2	None
<u>ST757</u>	136	11	4	1	8	8	2	None

**Abbildung 87: Ergebnisse des MLST-Datenbank-Abgleiches von Isolat „E5-11-13-S39 Eco7“**

Die ST-Codes stimmten hier in sechs von sieben Fällen überein – letztlich ist Isolat „E5-P2-3T5 Eco7“ identisch zum in der Datenbank hinterlegten Sequenztyp ST10, Isolat „E5-11-13-S39 Eco7“ hingegen identisch zu Sequenztyp ST34, beide gehören dem ST10-Komplex an.

Bei Paar E5-2 waren die jeweiligen Nukleotidsequenzen (auch hier ist eine vollständige Version im Anhang hinterlegt, wobei Isolat „E5-P2-3T5 Eco7“ = Query bzw. Isolat „E5-11-13-S39 Eco7“ = Sbjct) der beiden *E. coli*-Isolate in 5351 von insgesamt 5356 Basenpaaren oder umgerechnet in 99,9 % übereinstimmend. Die fünf Basenpaar-Mismatches kamen hierbei allesamt im gleichen Housekeeping-Gen, namentlich *icd*, zuliegen; im Umkehrschluss bedeutet dies, dass sechs der sieben Housekeeping-Gene eine Sequenzübereinstimmung von 100 % aufwiesen.

Die Ergebnisse des Abgleichs von Paar A6-1 mit der MLST-Datenbank sind in Abbildung 88 und Abbildung 89 dargestellt.

ST	adk	fumC	gyrB	icd	mdh	purA	recA	ST Complex
ST1146	6	29	4	1	24	8	7	None
<u>ST1146</u>	6	29	4	1	24	8	7	None
<u>ST1637</u>	6	29	16	1	24	8	7	None
<u>ST690</u>	6	4	4	1	98	8	7	None
<u>ST4679</u>	6	4	4	16	24	8	7	None
<u>ST4267</u>	6	6	4	16	24	8	7	None

**Abbildung 88: Ergebnisse des MLST-Datenbank-Abgleiches von Isolat „A6-S8-3T3 Eco4“**

ST	adk	fumC	gyrB	icd	mdh	purA	recA	ST Complex
ST101	43	41	15	18	11	7	6	ST101 Cplx
<u>ST101</u>	43	41	15	18	11	7	6	ST101 Cplx
<u>ST878</u>	43	41	15	18	9	7	6	None
<u>ST872</u>	43	41	15	18	24	7	6	None
<u>ST619</u>	43	41	15	18	59	7	6	ST101 Cplx
<u>ST604</u>	43	41	15	18	11	7	22	ST101 Cplx

**Abbildung 89: Ergebnisse des MLST-Datenbank-Abgleiches von Isolat „A6-07-13-P1 Eco2“**

Anhand der Allel-Codes in den beiden Abbildungen lässt sich feststellen, dass die beiden Isolate in keinem der sieben Allele übereinstimmen. „A6-S8-3T3 Eco4“ erwies sich als identisch zum Sequenztyp ST1146 (vgl. Abbildung 88), für das *E. coli*-Isolat „A6-07-13-P1 Eco2“ wurde in der Datenbank eine Übereinstimmung mit dem Sequenztyp ST101 gefunden (vgl. Abbildung 89).

Der Abgleich der Nukleotidsequenzen der Isolate „A6-07-13-P1 Eco2“ (= Query) und „A6-S8-3T3 Eco4“ (= Sbjct) befindet sich ebenfalls im Anhang dieser Arbeit. Mittels NCBI BLAST® wurden festgestellt, dass die 5451 bp lange Sequenz der beiden Isolate in 5407 Basenpaaren und damit zu 99,2 % übereinstimmte.

### 3.3.2.1 Charakterisierung der Resistenzmuster der *E. coli*-MLST-Isolat-Paare

Von den drei *E. coli*-MLST-Isolat-Paaren wurden sowohl phänotypische wie auch genotypische Resistenzprofile erstellt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 26 aufgeführt. Dabei wiesen die beiden Isolat-Paare aus „Tracking“-

Betrieb E5 die Gemeinsamkeit auf, dass in der Mikrodilution jeweils das Human-Isolat frei von phänotypischen Resistenzen war. Dagegen traten in beiden Schweine-*E. coli* Resistenzen in Erscheinung: Bei „E5-07-13-S14 Eco7“ (Paar E5-1) wurde FOS-Resistenz detektiert, „E5-11-13-S39 Eco7“ (Paar E5-2) wies phänotypische Resistenz gegen Amoxicillin / Clavulansäure, Ampicillin, Piperacillin und Trimethoprim / Sulfamethoxazol sowie verminderte Empfindlichkeit gegen Doxycyclin auf. Im zugrundeliegenden Genprofil glichen sich die DNA-Extrakte der Isolate des Paars E5-1: Abgesehen vom – bei *E. coli* natürlicherweise – chromosomal kodierten Protein AmpC konnte keines der untersuchten Resistenzgene detektiert werden. Anders die vorherrschende Situation bei Paar E5-2: Gemeinsam konnte in beiden Isolaten *bla*<sub>CTX-M</sub> nachgewiesen werden, jedoch wurden im DNA-Extrakt vom Schwein („E5-11-13-S39 Eco7“) mit *str*(A), *str*(B), *sul*(II) und *tet*(A) vier weitere Antibiotikaresistenzgene gefunden.

Während für das Paar A6-1 im aus dem Landwirt isolierten *E. coli* phänotypische Resistenz ausschließlich gegen Antibiotika aus der Wirkstoffklasse der  $\beta$ -Laktame detektiert wurde, war das porcine Isolat darüber hinaus auch gegen Trimethoprim / Sulfamethoxazol resistent und wies zudem verringerte Empfindlichkeit gegen Doxycyclin auf. Auch hinsichtlich des in den jeweiligen DNA-Extrakten ermittelten Resistenzgen-Spektrums unterschied sich das Paar A6-1, beim Schwein wurden in der PCR *tet*(A), *str*(A), *str*(B) und *sul*(II) amplifiziert.

**Tabelle 26: Phäno- und genotypische Resistenzprofile der *E. coli*-MLST-Isolat-Paare**

Isolat-Paar-Nr.	Isolatbezeichnung	Phänotypisches Resistenzprofil	n Resistzenzen		Genotypisches Resistenzprofil
			Wirkstoffe	Wirkstoffklassen	
E5-1	E5-07-13-S14 Eco7	FOS	1	1	Kein Resistenzgen detektiert
	E5-07-13-P2 Eco3	/	/	/	Kein Resistenzgen detektiert
E5-2	E5-P2-3T5 Eco7	/	/	/	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>
	E5-11-13-S39 Eco7	AMC AMP PIP DOX* T/S	5	3	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> -str(A)-str(B)-sul(II)-tet(A)
A6-1	A6-07-13-P1 Eco2	AMP PIP PIT CEP COX C/V CPP CAZ CXM	9	1	Kein Resistenzgen detektiert
	A6-S8-3T3 Eco4	AMC AMP PIP GEN TOB DOX* T/S COL	8	5	str(A)-str(B)-sul(II)-tet(A)

\* Beurteilung nicht anhand Breakpoint sondern mittels ECOFF; hier keine Aussage hinsichtlich Resistenz möglich, sondern lediglich eine orientierende Einschätzung zu verminderter Empfindlichkeit gegen den jeweiligen Wirkstoff!

Die weitere Chrarakterisierung der Resistenzeigenschaften dauerte zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit an und umfasst unter anderem molekularbiologische Untersuchungen zur Plasmid-Charakterisierung.

### **3.4 Resistenzstatus der *E. coli*-Isolate vom Schwein zum Zeitpunkt der Schlachtung**

Von den insgesamt 130 während der Mast in die Studie aufgenommenen „Tracking“-Tieren konnten letztlich 122 Schweine am Schlachthof beprobt werden, woraus 244 Fleischproben resultierten, zur Hälfte Hals-, zur Hälfte Bauchfleischstücke. Aus den Spüllösungen dieser Fleischstücke (vgl. Abschnitt III2.1.1) wurden 198 *E. coli* isoliert, wobei diese sich in 134 Isolate von Bauchfleisch- und 64 Isolate von Halsfleischproben aufgliedern ließen. Diese 198 Isolate stammten von insgesamt 54 Fleischproben bzw. 45 verschiedenen Tieren, woraus sich schlussfolgern lässt, dass auf mehr als einem Drittel (36,9 %) der Fleischproben der am Schlachthof beprobt Tiere *E. coli* isoliert werden konnten.

Tabelle 27 listet getrennt nach den einzelnen „Tracking“-Betrieben auf, wie viele Fleischproben jeweils zur Bestimmung des Resistenzstatus untersucht wurden, von wie vielen dieser Proben jeweils *E. coli* isoliert werden konnten bzw. auf welche Anzahl an Schweinen diese keimbelasteten Fleischprobe zurückgingen und schlüsselt zudem auf, um wie viele Fleisch-*E. coli* es sich insgesamt pro Betrieb handelte. An dieser Stelle sei angemerkt, dass jeweils alle *E. coli*, die sich auf den jeweiligen Fleischstücken befanden, von den Agar-Platten isoliert wurden. Daraus ergibt sich, dass den einzelnen Schweinen unterschiedlich viele Isolate zugeordnet werden konnten – in manchen Fällen, war dies nur ein Keim, im Falle der Fleischproben von Schwein Nr. 12 aus Betrieb A21 jedoch insgesamt 31 Isolate.

**Tabelle 27: Zuordnung der Fleisch-*E. coli*-Isolate nach „Tracking“-Betrieben**

Betrieb	Untersuchte Fleischproben (n = 244)	Fleischproben, von denen <i>E. coli</i> isoliert wurden (n = 54)	Tiere, deren Fleischproben mit <i>E. coli</i> belastet waren (n = 45)	<i>E. coli</i> - Isolate (n = 198)
E5	74	16	14	49
A21	38	14	10	66
A6	60	18	16	53
M13	36	3	3	24
H18	18	1	1	4
J20	18	2	1	2

Alle Fleisch-Isolate wurden zum einen mittels Mikrodilution hinsichtlich ihrer phänotypischen Resistenz gegenüber den in Tabelle 11 aufgeführten antibakteriellen Wirkstoffen untersucht. Zum anderen wurde die DNA der Isolate mittels Chelex® 100 extrahiert und im Anschluss via Endpunkt-PCR die Anwesenheit der in Tabelle 6 aufgelisteten Resistenzgene nachgewiesen (vgl. Abschnitt III2.2.1.1 und III2.2.1.2).

### 3.4.1 Phänotypische Resistenz

#### 3.4.1.1 Resistenzvorkommen und MHK-Verteilungen

Tabelle 28 fasst, getrennt nach den jeweiligen „Tracking“-Betrieben (zur Erinnerung: Bei H18 und J20 handelt es sich um die beiden ökologischen Schweinehaltungen), die Ergebnisse der Untersuchung der vom Fleisch isolierten *E. coli* auf phänotypische Antibiotikaresistenzen gegen die Wirkstoffklasse der  $\beta$ -Laktame (Auflistung der Wirkstoffkürzel s. Tabelle 5) zusammen.

Tabelle 29 zeigt Selbiges für die übrigen getesteten Wirkstoffe. Dabei wird zum einen farblich markiert, gegen welche Wirkstoffe keinerlei Resistenzen detektiert wurden. Zum anderen wird in den Tabellen farblich hervorgehoben, sobald bei mindestens einem Fleisch-Isolat des jeweiligen Betriebs Resistenz gegen einen der Wirkstoffe auftrat. In diesem Falle wurde zudem für die gesamte Population der *E. coli*-Isolate aus Fleischproben des jeweiligen Betriebs die MHK<sub>50</sub> respektive die MHK<sub>90</sub> analog zum in Abschnitt III2.1.4 beschriebenen Vorgehen ermittelt.

**Tabelle 28: Ergebnisse der phänotypischen Resistenztestung von Fleisch-*E. coli* (n = 198) gegen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika aus Tabelle 5**

Betrieb	Untersuchte <i>E. coli</i> -Isolate	AMC	AMP	PIP	PIT	CEP	CTX	COX	C/V	CPP	CAZ	CXM	ERT	IMP	MER
		MHK <sub>50</sub> / MHK <sub>90</sub>													
E5	49	64 / 128	256 / 256	256 / 256	2 / 4	0,25 / 0,25	0,25 / 0,25	8 / 32	0,5 / 1	0,5 / 1	0,25 / 0,5	4 / 8		0,25 / 16	
A21	66	64 / 128	256 / 256	256 / 256		0,25 / 0,25	0,25 / 0,25	8 / 32	0,5 / 1	0,5 / 0,5	0,25 / 1	4 / 8	0,25 / 0,25		
A6	53	16 / 64	256 / 256	128 / 256											
M13	24	2 / 32	2 / 256	1 / 128	1 / 2				1 / 8			0,25 / 0,25	4 / 8		
H18	4	4 / 16	2 / 256	2 / 256											
J20	2		4 / 16			0,25 / 8	0,25 / 16	16 / 32	0,5 / 8	0,5 / 8	0,25 / 8	8 / 32			

**Tabelle 29: Ergebnisse der phänotypischen Resistenztestung von Fleisch-*E. coli* (n = 198) gegen übrige Antibiotika aus Tabelle 5**

Betrieb	Untersuchte <i>E. coli</i> -Isolate	AMK	GEN	TOB	FLL	CIP	ENR	LEV	DOX	FOS	T/S	AZT	COL	
		MHK <sub>50</sub> / MHK <sub>90</sub>												
E5	49		1 / 2		8 / 16	0,063 / 0,5	0,063 / 1	0,063 / 1	8 / 32	16 / 64	0,5 / 8	1 / 1	1 / 1	
A21	66	4 / 8		0,5 / 1	8 / 16	0,063 / 1	0,063 / 2	0,063 / 1	4 / 32	16 / 32	0,5 / 8	1 / 1	1 / 1	
A6	53				8 / 8		0,063 / 0,013			2 / 32	16 / 16	0,5 / 8	1 / 1	1 / 2
M13	24				8 / 16		0,063 / 0,063			4 / 16	16 / 16	0,5 / 0,5		
H18	4				8 / 16		0,063 / 0,063			4 / 32		0,5 / 8		
J20	2				8 / 128		0,063 / 0,013			2 / 4	16 / 128		1 / 32	

Bei keinem der getesteten Fleisch-Isolate phänotypische Resistenz detektiert

Resistenz bei mindestens einem der untersuchten Fleisch-Isolate detektiert

Hier keine Aussage hinsichtlich Resistenz möglich, sondern lediglich eine orientierende Einschätzung zu verminderter Empfindlichkeit gegen den jeweiligen Wirkstoff!

Aus den Daten in Tabelle 28 geht hervor, dass unter den 49 Fleisch-Isolaten der Schweine aus Betrieb E5 Resistenz mit Ausnahme der beiden Carbapeneme Ertapenem und Meropenem gegen jeden Wirkstoff aus der Gruppe der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika detektiert wurde. Ganz ähnlich stellte sich die Situation in den *E. coli* aus Betrieb A21 dar, hier waren jedoch alle Isolate zusätzlich sensibel gegen Piperacillin / Tazobactam. Auch in „Tracking“-Betrieben M13 offenbarten sich in den vom Fleisch isolierten Keimen Resistenzen gegen die Hälfte der getesteten Wirkstoffe dieser Antibiotikaklasse. Gegen acht  $\beta$ -Laktame, waren die beiden Isolate von Schwein Nr. 2 aus dem ökologischen Betrieb J20 resistent; konkret beruhte dies auf verminderter Empfindlichkeit gegenüber Ampicillin und Cephalosporinen. In der Fleischprobe des anderen ökologischen Betriebs (H18) sowie in den Proben von A6 zeigten sich ebenfalls  $\beta$ -Laktam-resistente Keime, jedoch gegen weniger Wirkstoffe als in den anderen Betrieben – vorwiegend richteten sich die Resistenz hierbei gegen Penicilline. Hinsichtlich der MHKs fallen primär die relativ hohen Werte der *E. coli*-Isolat-Gruppen der Betriebe E5, A21, A6 und mit Abstrichen auch M13 und H18 bei den Penicillinen ins Auge. Des Weiteren ergaben sich für die beiden Isolate aus Betrieb J20 bei den Cephalosporinen verhältnismäßig höhere MHK<sub>90</sub>-Werte als in den übrigen Betrieben.

Die *E. coli*-Isolate von A6 und M13 erwiesen sich ebenso als empfindlich gegen alle untersuchten Aminoglykoside wie die der beiden ökologischen Schweinehaltungen H18 und J20.

Verminderte Empfindlichkeit gegen Florfeincol trat mit Ausnahme von H18, in den Fleischproben aller Betriebe mindestens einmal auf, Resistenz gegen Ciprofloxacin, und Levofloxacin bzw. dem Anschein nach verminderte Empfindlichkeit gegen Enrofloxacin – allesamt Vertreter der Fluorchinolone – hingegen nur in *E. coli*-Isolaten der Tiere aus E5 bzw. A21. Die MHK-Werte für die letztgenannten Isolat-Gruppen waren dabei jedoch relativ niedrig.

Nur die beiden Isolate von Schwein Nr. 12 aus Betrieb J20 erwiesen sich ausnahmslos als empfindlich gegenüber Doxycyclin und Trimethoprim / Sulfamethoxazol. Unter den Fleisch-Isolaten aller übrigen Betriebe befanden sich jeweils mehrere, die gegen diese beiden Wirkstoffe resistent (Trimethoprim / Sulfamethoxazol) bzw. scheinbar vermindert empfindlich waren. Im Falle der Keime des Betriebs E5 lag bereits die MHK<sub>50</sub> mit

einem Wert von acht über dem von EUCAST vorgelegten epidemiologischen Cut-off für Doxycyclin.

Gegen die beiden Wirkstoffe Fosfomycin und Aztreonam wurden – diesmal mit Ausnahme des ökologischen Betriebs H18 und hinsichtlich Aztreonam auch M13 – Resistenzen in den Fleisch-Isolaten aller anderen Betriebe aufgedeckt. Colistin-Resistenz wurde nur in den konventionellen Betrieben E5, A21 und A6 detektiert, bei allen Isolat-Gruppen lagen die  $MHK_{50}$ - und  $MHK_{90}$ -Werte dabei unter dem definierten Breakpoint.

In Tabelle 30 sind die phänotypischen Resistenzprofile aller vom gleichen Stück Bauchfleisch isolierten *E. coli* (n = 29) von Schwein Nr. 12 aus Betrieb A21 dargestellt. Die darin enthaltenen Daten sollen – ohne dabei detailliert auf die einzelnen Resistenzen einzugehen – verdeutlichen, dass die sich aus der Mikrodilution ergebenden Resistenzprofile trotz des einheitlichen Ursprungs der Probe durchaus variieren: So gab es unter den 29 Fleisch-Isolaten dieses Tieres insgesamt 12 verschiedene phänotypische Resistenzprofile. Dabei umfasste das Spektrum der Resistenzen zwischen 1 und 16 Wirkstoffen respektive 1 bis 7 Wirkstoffklassen.

**Tabelle 30: Phänotypische Resistenzprofile aller von der Bauchfleischprobe des Schweins Nr. 12 (Betrieb A21) isolierten *E. coli* (n = 29)**

Betrieb	Isolatbezeichnung	Probenart	Phänotypisches Resistenzprofil	n Resistzenzen	
				Wirkstoffe	Wirkstoffklassen
A21	S12-Eco1	Bauchfleisch	AMC AMP PIP CXM DOX*	5	2
A21	S12-Eco2	Bauchfleisch	AMC AMP PIP DOX*	4	2
A21	S12-Eco3	Bauchfleisch	DOX*	1	1
A21	S12-Eco4	Bauchfleisch	AMC AMP PIP DOX* T/S	5	3
A21	S12-Eco5	Bauchfleisch	DOX*	1	1
A21	S12-Eco6	Bauchfleisch	AMC AMP PIP DOX*	4	2
A21	S12-Eco7	Bauchfleisch	AMC AMP PIP DOX* T/S	5	3
A21	S12-Eco8	Bauchfleisch	AMC AMP PIP DOX*	4	2
A21	S12-Eco9	Bauchfleisch	AMC AMP PIP DOX*	4	2
A21	S12-Eco10	Bauchfleisch	AMC AMP PIP FOS	4	2
A21	S12-Eco11	Bauchfleisch	AMC AMP PIP COX	4	1
A21	S12-Eco12	Bauchfleisch	AMC AMP PIP	3	1
A21	S12-Eco13	Bauchfleisch	AMC AMP PIP	3	1
A21	S12-Eco14	Bauchfleisch	AMC	1	1
A21	S12-Eco15	Bauchfleisch	AMC AMP PIP	3	1
A21	S12-Eco16	Bauchfleisch	AMC AMP PIP CEP CTX COX CPP CXM DOX* T/S AZT	11	4
A21	S12-Eco17	Bauchfleisch	AMC AMP PIP DOX* T/S	5	3
A21	S12-Eco18	Bauchfleisch	AMC AMP PIP COX	4	1
A21	S12-Eco19	Bauchfleisch	AMC AMP PIP	3	1
A21	S12-Eco20	Bauchfleisch	AMC AMP PIP	3	1
A21	S12-Eco21	Bauchfleisch	AMC AMP PIP	3	1
A21	S12-Eco22	Bauchfleisch	AMC AMP PIP COX	4	1
A21	S12-Eco23	Bauchfleisch	AMC AMP PIP COX	4	1
A21	S12-Eco24	Bauchfleisch	AMC AMP PIP CIP ENR* LEV	6	2
A21	S12-Eco25	Bauchfleisch	AMC AMP PIP DOX*	4	2
A21	S12-Eco26	Bauchfleisch	AMC AMP PIP	3	1
A21	S12-Eco27	Bauchfleisch	AMC AMP PIP	3	1
A21	S12-Eco28	Bauchfleisch	AMC AMP PIP DOX*	4	2
A21	S12-Eco29	Bauchfleisch	AMC AMP PIP CEP CTX C/V CPP CXM AMK FLL* CIP ENR* LEV	16	7
			DOX* T/S AZT		

\* Beurteilung nicht anhand Breakpoint sondern mittels ECOFF; hier keine Aussage hinsichtlich Resistenz möglich, sondern lediglich eine orientierende Einschätzung zu verminderter Empfindlichkeit gegen den jeweiligen Wirkstoff!

### 3.4.1.2 Rückverfolgung resistenter Isolate zum Hof

Exemplarisch wurde anhand der Betriebe E5 und A6 überprüft, ob Isolate von einzelnen Schweinen, deren Fleischstücke im Schlachthof mit phänotypisch resistenten *E. coli* belastet waren, schon auf Betriebsebene ähnliche oder gar identische Resistenzmuster aufwiesen.

Wie Tabelle 31 zeigt, konnten in jedem der beiden „Tracking“-Betriebe auf Einzeltierebene Isolate identifiziert werden, die bereits auf dem Hof phänotypisch gegen dieselben Wirkstoffe resistent waren, wie später auf dem Schlachtkörper; dabei wiesen die phänotypischen Resistenzprofile in ihrer Gesamtheit zum Teil hohe Ähnlichkeiten auf. Die den jeweiligen Isolaten zugrundeliegenden genotypischen Resistenzprofile unterschieden sich in den meisten Fällen hingegen mehr oder weniger deutlich voneinander. Nur im Falle eines Isolat-Paars („A6-2T2-S1 Eco1“ und „A6-S1 Halsfleisch Eco2“) stimmten alle detektierten Resistenzgene überein.

**Tabelle 31: Phäno- und genotypische Resistenzprofile von *E. coli*-Isolaten einzelner Tiere auf Betriebs- und Schlachthofebene**

Betrieb	Proband	Isolatbezeichnung	Probenahmeort / Probenahmezeitpunkt	Phänotypisches Resistenzprofil	n Resistzenzen		Genotypisches Resistenzprofil
					Wirkstoffe	Wirkstoffklassen	
E5	S10	07-13 Eco4	Betrieb, „Status Quo“ Juli 2013	AMC AMP PIP DOX*	4	2	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> - <i>tet</i> (A)- <i>sul</i> (I)- <i>qacE</i> Δ1
		Halsfleisch Eco1	Schlachthof, Juli 2013	AMC AMP PIP DOX* T/S	5	3	<i>tet</i> (A)- <i>tet</i> (B)- <i>str</i> (A)- <i>str</i> (B)
E5	S43	3T5 Eco3	Betrieb, Behandlung Januar 2014	DOX*	1	1	<i>tet</i> (B)- <i>str</i> (A)- <i>str</i> (B)
		Bauchfleisch Eco1	Schlachthof, Juni 2014	DOX*	1	1	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> - <i>tet</i> (A)- <i>sul</i> (I)
E5	S47	3T0 Eco9	Betrieb, Behandlung Januar 2014	AMC AMP DOX* T/S	4	3	<i>tet</i> (A)- <i>str</i> (A)- <i>str</i> (B)- <i>sul</i> (II)
		Bauchfleisch Eco2	Schlachthof, Juni 2014	AMC AMP DOX* PIP FOS	5	3	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> - <i>tet</i> (A)- <i>str</i> (A)- <i>str</i> (B)
A6	S1	2T2 Eco1	Betrieb, Behandlung Juli 2013	AMP PIP DOX* AMC FLL* COL	6	4	<i>tet</i> (A)- <i>str</i> (A)- <i>str</i> (B)- <i>sul</i> (II)
		Halsfleisch Eco2	Schlachthof, Oktober 2013	AMP PIP DOX* T/S	4	3	<i>tet</i> (A)- <i>str</i> (A)- <i>str</i> (B)- <i>sul</i> (II)
A6	S7	3T3 Eco4	Betrieb, Behandlung Juli 2013	AMC AMP PIP DOX*	4	2	<i>tet</i> (A)- <i>str</i> (A)- <i>str</i> (B)- <i>sul</i> (II)- <i>qacE</i> Δ1
		Halsfleisch Eco3	Schlachthof, Oktober 2013	AMC AMP PIP DOX* T/S	5	3	<i>tet</i> (A)
A6	S8	3T3 Eco4	Betrieb, Behandlung Juli 2013	AMC AMP PIP DOX* T/S GEN TOB COL	8	5	<i>tet</i> (A)- <i>str</i> (A)- <i>str</i> (B)- <i>sul</i> (II)
		Bauchfleisch Eco1	Schlachthof, Oktober 2013	AMC AMP PIP DOX* T/S	5	3	<i>tet</i> (A)

\* Beurteilung nicht anhand Breakpoint sondern mittels ECOFF; hier keine Aussage hinsichtlich Resistenz möglich, sondern lediglich eine orientierende Einschätzung zu verminderter Empfindlichkeit gegen den jeweiligen Wirkstoff!

### 3.4.2 Genotypische Resistenz

Alle *E. coli*, die aus den Spülösungen der Hals- und Bauchfleischproben isoliert werden konnten, wurden auf die Anwesenheit verschiedener Antibiotika-Resistenzgene (s. Tabelle 6) untersucht – Mutationen des chromosomal kodierten *ampC*-Gens nur in ESBL-verdächtigen Keimen. Dabei war das Spektrum der phäno- und genotypischen Resistenzuntersuchungen, wie bereits in Abschnitt III2.2.1.2 thematisiert, nicht deckungsgleich.

#### 3.4.2.1 Resistenzvorkommen

Tabelle 32 zeigt, in welchem Ausmaß die untersuchten Fleischproben der „Tracking“-Schweine mit Resistenzgen-positiven *E. coli* belastet waren.

**Tabelle 32: Prävalenz Resistenzgen-positiver *E. coli* (n = 198 untersuchte Isolate) in Fleischproben (n = 244), sortiert nach „Tracking“-Betrieben**

Betrieb	Untersuchte Fleischproben	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	<i>qacEΔ1</i>	<i>str(A)</i>	<i>str(B)</i>	<i>sul(I)</i>	<i>sul(II)</i>	<i>tet(A)</i>	<i>tet(B)</i>
		Prävalenz Resistenzgen-positiver <i>E. coli</i> in Fleischproben							
E5	74	1,4 %	5,4 %	10,8 %	4,1 %	2,7 %	6,8 %	13,5 %	8,1 %
A21	38	13,2 %	7,9 %	18,4 %	18,4 %	10,5 %	15,8 %	15,8 %	10,5 %
A6	60	6,7 %	6,7 %	10,0 %	8,3 %	5,0 %	11,7 %	15,0 %	6,7 %
M13	36	5,6 %	2,8 %	2,8 %	2,8 %	2,8 %		2,8 %	
H18	18	5,6 %	5,6 %	5,6 %		5,6 %	5,6 %		5,6 %
J20	18								

Resistenzgen in keinem *E. coli* der untersuchten Fleischproben nachgewiesen

Resistenzgen in *E. coli* von mindestens einer Fleischprobe nachgewiesen

In den konventionellen Betrieben E5, A21 und A6 wurde jedes der untersuchten Resistenzgene in den DNA-Extrakten von *E. coli* mindestens einer Fleischprobe nachgewiesen. Für Betrieb E5 wurden *tet(A)*-positive *E. coli* in 13,5 % der Proben nachgewiesen, während *str(A)*-positive *E. coli* auf 10,8 % der untersuchten Fleischstücke detektiert wurden. Auf etwa jeder zwölften Fleischprobe (8,1 %) wurden *tet(B)*-beherbergende *E. coli* nachgewiesen. Fleischstücke aus Betrieb A21 waren in jeweils knapp einem Fünftel der Fälle (18,4 %) mit *str(A)*- bzw. *str(B)*-positiven *E. coli* belastet, *sul(II)*- und *tet(A)*-tragende Fleisch-Isolate wurden in jeweils 15,8 % der Proben detektiert. Darüber hinaus ließen sich *bla*<sub>CTX-M</sub>-positive *E. coli* in 13,2 % aller untersuchten Fleischstücke dieses Betriebes nachweisen. In A6 waren 10 % – *str(A)* – bzw. 15 % – *tet(A)* – der Fleischproben mit *E. coli* kontaminiert, die das jeweilige Resistenzgen in ihrer DNA beherbergten. Auch *sul(II)* wurde in vergleichbar vielen Fällen (11,7 % der

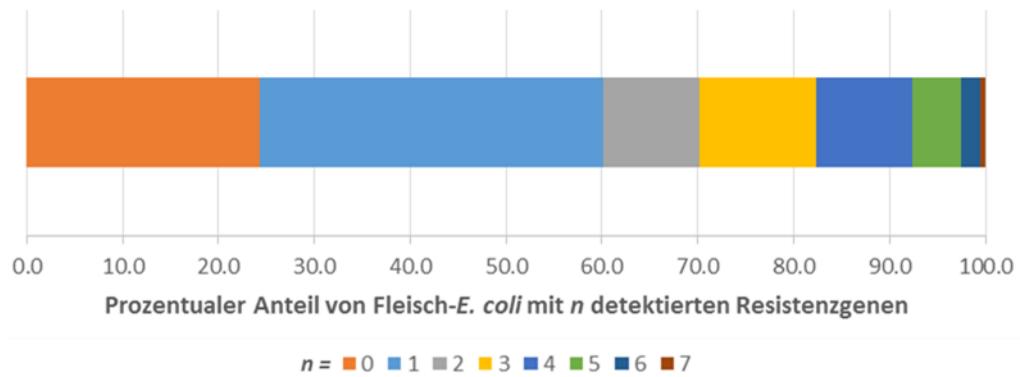
untersuchten Proben) gefunden. Im vierten konventionellen Betrieb, M13, traten Resistenzgen-positive *E. coli* nur in verhältnismäßig wenigen Fleischproben in Erscheinung, das am häufigsten nachgewiesene Gen war dabei *bla*<sub>CTX-M</sub> (5,6 %). Hingegen wurden *sul*(II)- und *tet*(B)-tragende *E. coli* in keiner der untersuchten Fleischproben von M13 detektiert. Auf einem Fleischstück aus dem ökologischen Betrieb H18 fanden sich multiresistente Isolate – hier traten abgesehen von *str*(A) und *tet*(B) alle Gene mindestens einmal in Erscheinung. In Fleischproben aus der zweiten ökologischen Schweinehaltung (J20) wurde kein *E. coli*-Isolat ermittelt, das eines der untersuchten Resistenzgene beherbergte.

Wie Tabelle 33 zu entnehmen ist, waren – über Betriebsgrenzen hinweg – 10,7 % aller untersuchten 244 Fleischproben mit *tet*(A)-positiven *E. coli* kontaminiert, das entspricht in etwa jedem neunten Fleischstück. *str*(A) wurde in Fleisch-*E. coli* aus 9,4 % der Proben nachgewiesen, darauf folgen *sul*(II) mit einem Wert von 7,8 %, *str*(B) (6,6 %) und *tet*(B) (6,1 %). *bla*<sub>CTX-M</sub>- bzw. *qacEΔ1*-tragende Fleisch-*E. coli* wurden in jeweils 13 Proben (das entspricht jeweils 5,3 % der Fälle) und damit etwas häufiger als *sul*(I)-positive *E. coli* (4,5 %) detektiert.

**Tabelle 33: Prävalenz Resistenzgen-positiver *E. coli* (n = 198 untersuchte Isolate) in Fleischproben (n = 244), betriebsübergreifend**

Resistenzgen	Resistenzgen-positive <i>E. coli</i> in untersuchten Fleischproben	
	n	%
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	13	5,3
<i>tet</i> (A)	26	10,7
<i>tet</i> (B)	15	6,1
<i>sul</i> (I)	11	4,5
<i>sul</i> (II)	19	7,8
<i>str</i> (A)	23	9,4
<i>str</i> (B)	16	6,6
<i>qacEΔ1</i>	13	5,3

Betrachtet man das Auftreten der Resistenzgene auf Ebene der Isolate, so war – unter Einbeziehung potenziell klonaler *E. coli* – in etwas weniger als einem Viertel, genauer gesagt in 24,2 % (n = 48) der 198 Keime keines der gesuchten Gene auffindbar (vgl. Abbildung 90). Ergo wurde in 75,8 % (n = 150) der Isolate mindestens eines der aufgeführten Resistenzgene detektiert.



**Abbildung 90: Prozentuale Verteilung von Mehrfachresistenzen in Fleisch-*E. coli* (n = 198)**

## V DISKUSSION

### 1 Methodendiskussion

#### 1.1 Untersuchungsmaterial

Bei der Akquise der Schweine haltenden „Screening“-Betriebe lag das Augenmerk auf Mast- und „Kombi“-Betrieben. Die Akquise der Betriebe gelang nur mit erheblichem Einsatz. Das Projekt wurde bei Vortragsveranstaltungen (Hans-Eisenmann-Zentrum; Ringerzeugertreffen) vorgestellt und mit Flyern beworben, zudem erfolgte zu Projektbeginn Öffentlichkeitsarbeit im Bayerischen Landwirtschaftlichen Wochenblatt und im DLZ-Agrarmagazin; entscheidend war darüber hinaus insbesondere die Zusammenarbeit mit dem Bayerischen Tiergesundheitsdienst und der LfL. Beide Institutionen konnten aus datenschutzrechtlichen Gründen keine Kontakte bereitstellen, sondern warben aktiv im Kontakt mit den Landwirten für deren eigenständige Kontaktaufnahme. Letztlich gelang es trotz dieser Schwierigkeiten, 35 konventionelle und 23 ökologische Betriebe (geographisch verteilt über alle sieben Regierungsbezirke Bayerns) für die Teilnahme am Projekt zu gewinnen. Bei den „Tracking“-Betrieben konnten neben vier konventionellen Betrieben zwei ökologische Schweinehaltungsbetriebe mit erwiesen geringem Antibiotikaverbrauch als Referenzbetriebe eingeschlossen werden.

Die Akquise der „Tracking“-Betriebe erfolgte aus den oben genannten Gründen zu unterschiedlichen Zeitpunkten, woraus für die jeweiligen Betriebe unterschiedlich lange Beobachtungszeiträume – Betrieb E5 wurde über 13 Monate hinweg begleitet, die Betriebe J20 und H18 hingegen nur über 5 bzw. 6 Monate – und eine ungleich Anzahl an beprobten Mastdurchgängen resultierten. Diesem Sachverhalt wurde bei der Datenauswertung durch die Auswahl geeigneter statistischer Verfahren Rechnung getragen. Hinsichtlich des Studien-Designs wurde für den „Tracking“-Teil, ähnlich wie in vergleichbaren Forschungsarbeiten, zum Mittel der Kohortenstudie gegriffen (Song et al. 2010, Bolton et al. 2013, Hansen et al. 2013).

Was die Struktur der teilnehmenden Betriebe betrifft, so war es aufgrund zu großer Abweichungen in der Schweinehaltungspraxis nicht möglich,

konventionelle und ökologische Schweinehaltungen gleicher Betriebsgröße einzuschließen. Daher sei an dieser Stelle auf die Literatur verwiesen: Eine Studie von Hölzel (2006) konnte zeigen, dass die Betriebsgröße zwar Einfluss auf den durch unterschiedlichen Antibiotikaeinsatz bedingten Gehalt in wirtschaftseigenen Düngemitteln nimmt, über diesen indirekten Einfluss hinaus jedoch nicht auf die Resistenzgenkonzentrationen. Der Antibiotikaeinsatz wurde in der vorliegenden Studie als eigene Einflussgröße erfasst, somit ist nicht von einer Verfälschung der Ergebnisse durch indirekte Effekte der Betriebsgröße – über Auswirkungen auf den Antibiotikaeinsatz – auszugehen.

Da die Probenahme der Gülle-, Jauche- und Festmistproben im „Screening“ durch die Landwirte erfolgte, kann – auch wenn diese mit entsprechenden Handlungsanleitungen ausgestattet waren – nicht völlig ausgeschlossen werden, dass es zu Fehlern kam. Dabei sollte in erster Linie eine mangelhafte Variation der Entnahmepunkte der Festmistproben aus dem Misthaufen in Betracht gezogen werden; auch ließe sich an eine verspätete – beispielsweise erst nach Ausbringung des wirtschaftseigenen Düngers erfolgte – Probenahme denken.

## **1.2 Prüfung der phänotypischen Resistenz**

Bis Ende des vergangenen Jahrzehntes wurden die Grenzwerte zur Beurteilung der Resistenz von Infektionserregern in Deutschland vom Arbeitsausschuss „Chemotherapeutische Untersuchungsmethoden“ im Deutschen Institut für Normung (DIN) festgelegt und mit dem Beiblatt 1 zur DIN-Norm 58940-4 publiziert (Rodloff et al. 2008). Auch in anderen europäischen Ländern beschäftigten sich vergleichbare Institutionen mit der Grenzwertfindung, bei der es sich um einen Prozess handelt, in dessen Bewertung eine Vielzahl unterschiedlicher Daten einfließt – beispielsweise Indikationsgebiete, Dosierung, Pharmakokinetik und -dynamik der jeweiligen Substanz oder auch MHK-Verteilungen verschiedener Erregerspezies. Daraus resultierte, dass die Festsetzung der Grenzwerte in verschiedenen Ländern teils unterschiedlich gehandhabt wurde, was zur Folge hat, dass sich Ergebnisse zur Resistenzlage von Erregern nicht sinnvoll miteinander vergleichen lassen (Rodloff et al. 2008). Im Zuge des Versuchs einer europaweiten Angleichung der Beurteilungskriterien zur Ermittlung der Wirksamkeit von antimikrobiellen Medikamenten wurde mit der Norm ISO 20776-1:2006 einerseits ein einheitliches Testverfahren geschaffen und andererseits vom EUCAST-Exekutivkommitee für Europa einheitliche

Breakpoints, untergliedert nach einzelnen Erregergruppen, zur Beurteilung von MHK-Werten für wichtige Antibiotika vorgelegt.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen zum phänotypischen Resistenzverhalten einzelner *E. coli*-Isolate sollten nicht primär der Beurteilung der klinischen Wirkung einzelner antibiotischer Wirkstoffe beim Schwein dienen. Im Sinne einer Risikoabschätzung der Gesundheitsgefährdung von Personen, die mit landwirtschaftlichen Nutztieren oder deren Produkten bzw. Ausscheidungen in Kontakt kommt, sollte vielmehr geprüft werden, welchen Einfluss das Einsetzen von Antibiotika beim Tier auf die mögliche Übertragung resistenter *E. coli* auf den Menschen hat. Zu diesem Zweck wurden überwiegend Wirkstoffe getestet, die auch bzw. ausschließlich in der Humanmedizin zum Einsatz kommen. Bei der Auswahl geeigneter Breakpoints für die Empfindlichkeitstestung dieser Wirkstoffe wurde entsprechend auf veröffentlichte EUCAST-Grenzwerte zurückgegriffen, deren Fokus ebenfalls auf der Humanmedizin in Europa liegt. Bewusst wurde hinsichtlich der angewendeten Methode auf das Heranziehen anderer Standardisierungen, wie beispielsweise der des amerikanischen Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), verzichtet. Im Vergleich zu letzteren stellen sich die EUCAST-Festlegungen im Regelfall deutlich vorsichtiger dar als die der CLSI (Rodloff et al. 2008). Eine Mischung der beiden Bewertungssysteme führt aufgrund unterschiedlicher zugrundeliegender Beurteilungskriterien einerseits zu mangelnder Aussagekraft der Ergebnisse: Rodloff et al. (2008) führen als Extrembeispiel einen 16-fachen Dosis-Unterschied bei der Beurteilung der Wirksamkeit von Cefotaxim bei Enterobacteriaceae an. Andererseits ist eine objektive Vergleichbarkeit mit Ergebnissen anderer Studien nicht mehr gegeben. Aus diesen Gründen wurde für Wirkstoffe, für die von EUCAST bisher keine gesonderten Breakpoints für *E. coli* definiert sind, nicht etwa auf CLSI- oder veraltete DIN-Grenzwerte zurückgegriffen, sondern orientierend epidemiologische Cut-off-Werte (ECOFF), ebenfalls veröffentlicht von EUCAST, herangezogen. Letztere basieren auf Daten zahlreicher internationaler Studien und Antibiotikaresistenz-Monitoringprogramme zu MHK-Wildtyp-Verteilungen und lassen eine orientierende Einordnung hinsichtlich verringelter Empfindlichkeit gegen Wirkstoffe ohne definierten Breakpoint prinzipiell zu, jedoch keine Kennzeichnung als resistent oder sensibel, worauf EUCAST ausdrücklich

hinweist (<http://www.eucast.org><sup>10</sup>, letzter Zugriff am 30.09.2015). Bei Überschreitung dieses Cut-offs liegt demnach keine definierte Resistenz gegen den jeweiligen Wirkstoff vor. Diesem Sachverhalt wurde durch Fußnoten in den jeweiligen Diagrammen zur Auflistung von Resistenzprofilen einzelner *E. coli*-Isolate Rechnung getragen.

### 1.3 ERIC- und MLST-PCR

Sinn und Zweck des molekularbiologischen „Fingerprintings“ von *E. coli*-Isolaten aus den Faeces von Schweinen, Landwirten und Kontaktpersonen mittels ERIC-PCR war es, ein schnelles, günstiges und gut reproduzierbares Verfahren zu etablieren, um ähnliche Isolate herauszufiltern (Li et al. 2009). Dabei stand, unter anderem auf Grund des hohen Probendurchsatzes – alleine im Rahmen dieser Arbeit wurden knapp 2800 Isolate hinsichtlich ihrer Verwandtschaftsverhältnisse untersucht – zunächst die Sensitivität der Methode im Vordergrund, ehe mit der Methode der MLST-PCR und anschließender Sequenzierung Techniken zur Feindifferenzierung angewandt wurden. Zur besseren Vergleichbarkeit verschiedener Gele wurden, wie in der Literatur empfohlen, je Gel-Lauf drei Probentaschen mit DNA-Ladder bestückt (Gerner-Smidt et al. 1998). Der bei der Auswertung der ERIC-Bandenmuster in GelCompar® II zur Ausgabe „identischer“ Klone gewählte Cut-off von 56 % erscheint sehr niedrig, wurde allerdings bewusst so festgelegt, unter anderem, da die Beladung der Geltaschen mit DNA-Extrakt relativ hoch gewählt werden musste, da schwache Banden sonst nicht im Gel sichtbar wurden. Dies resultierte mitunter in Überlagerungen von nahe beieinander gelegenen Banden. Letztlich wurde der so entstehenden Abweichung von Bandenmustern zum einen durch den niedrig angesetzten Cut-off Rechnung getragen, zum anderen, indem die Position der Banden mit einer Toleranz von 1,87 % verglichen wurde. Der niedrige Cut-off-Wert resultierte auch aus den Wiederholungen der Positivkontrolle, die für ein und denselben Stamm im Mittel nur 63,4 % Übereinstimmung aufwies. Aufgrund der gestuften Vorgehensweise – Bestätigung ähnlicher ERIC-Muster durch MLST – erschien in diesem ersten Schritt wichtig, eine sensitive Erkennung potenzieller Klone zu gewährleisten. Die Spezifität des ERIC-Typings ohne Nachschaltung weiterer Methoden muss allerdings als eingeschränkt betrachtet werden.

---

<sup>10</sup> [http://www.eucast.org/mic\\_distributions\\_ecoffs/](http://www.eucast.org/mic_distributions_ecoffs/)

Aufgrund der oben beschriebenen Überlagerung von Banden kam es vor, dass visuell als sehr ähnlich empfundene Profile nur Übereinstimmungswerte unterhalb des Cut-offs erreichten, während durch die Toleranzestellungen teils unterschiedlich aussehende Bandenmuster als hoch übereinstimmend ausgegeben wurden (vgl. Abbildung 18). Dennoch erschien die auch in anderen Studien zum genomischen Fingerprinting so durchgeführte automatisierte Auswertung mittels Software unter Beachtung einer sorgfältigen Validierung immer noch zuverlässiger als die visuelle Auswertung einer so hohen Anzahl an Bandenmustern durch eine Einzelperson (Struelens 1998, Ramchandani et al. 2005, Dorneles et al. 2014).

Der von Wilson und Sharp (2006) aufgebrachten These, ERIC-Sequenzen seien im Genom von *E. coli*-Stämmen nicht in ausreichender Anzahl vorhanden und überdies hinaus zu weit auseinandergelegen, steht die hohe Anzahl detekter Banden je Stamm entgegen. Die MLST-Analyse konnte bestätigen, dass es sich bei den zuvor anhand der ERIC-Bandenmuster als „identisch“ eingeordneten Isolat-Paaren tatsächlich um *E. coli*-Stämme handelte, deren Housekeeping-Gensequenzen teils in hohem Maße übereinstimmen. Trotz alledem bleibt an dieser Stelle festzustellen, dass ERIC-Sequenzen – unabhängig von den Ergebnissen, die unter der Verwendung der 1991 von Versalovic et al. publizierten ERIC-Primerpaare erzielt werden – in Bakterien wohl tatsächlich nicht so weit verbreitet sind wie zuvor angenommen (Wilson et al. 2006). Der Abgleich der in dieser Arbeit verwendeten ERIC-Primer mit einem Gesamt-Genom-sequenzierten *E. coli* (Genbank-Eintrag: NZ\_JNPC01000026.1) mittels NCBI BLAST® ergab 17 Bindungsstellen, interessanterweise allesamt im Bereich zwischen 192405 und 193159 bp.

Auch wenn sich MLST für die in der vorliegenden Arbeit gesetzten Zielstellungen eignete, so ist die Methode aufgrund ihrer im Vergleich zur Gesamt-Genom-Analyse deutlich eingeschränkten Auflösung auch kritisch zu betrachten: So lassen sich mittels MLST weder auf Spontanmutation beruhende Veränderungen im Resistenzverhalten detektieren noch können Aussagen über die Anwesenheit respektive Verbreitung mobiler genetischer Elemente getroffen werden – beides sind jedoch essentielle Faktoren bei der Betrachtung von Antibiotikaresistenzen. Angesichts der in den letzten Jahren deutlich gesunkenen Preise und der höheren Auflösung steht mittlerweile mit dem „whole genome

sequencing“ grundsätzlich eine noch aussagekräftigere – jedoch in der Auswertung zeitaufwendigere – Methode zur Verfügung, um Verwandtschaftsbeziehungen zwischen verschiedenen Bakterienstämmen zu bestimmen (Larsen et al. 2012, Miller 2013). Zu diskutieren ist allerdings, inwiefern spontane Anpassungsreaktionen nach Wirtswechsel bzw. unter Antibiotikatherapie eine Klassifizierung von Bakterienstämmen als (ursprünglich) „ungleich“ rechtfertigen.

### 1.3.1 „Matrixversuch“

Die mittleren Wiederfindungsraten für die jeweiligen Untersuchungsmatrices Gülle, Jauche, Festmist und Faeces unterschieden sich voneinander – auch wenn sich die Amplifikationskurven in der qPCR optisch sehr ähnelten (vgl. Abbildung 19). Dabei lagen die prozentualen Werte für *tet(B)* bei Gülle und Jauche mit Werten von 72,2 % bzw. 77,4 % recht nah beieinander, die Matrix Festmist lag mit 124,5 % jedoch deutlich darüber. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die für den Versuch verwendete Matrix „Festmist“, wie in Abschnitt III2.1.1 eingehend beschrieben, als Suspension eingesetzt wurde und im Vergleich zu Jauche- und Gülleproben weniger den DNA-Extraktionsprozess bzw. die Amplifikation potenziell inhibierende Stoffe enthielt. Auch der Sachverhalt, dass das zur DNA-Extraktion herangezogene PowerSoil®-DNA Isolation Kit laut Herstellerangaben vorrangig für die Gewinnung von DNA aus – stofflich dem Festmist eher nahen – Boden- und Sedimentproben mit hohen Huminsäure-Gehalten (z. B. Sediment, Kompost, Dung) angewendet wird und Faecesproben dabei erst nachrangig genannt werden, könnte dazu geführt haben, dass sich Genmaterial aus Festmist besser isolieren ließ als aus Gülle und Jauche.

Als Konsequenz der in Tabelle 24 dargestellten unterschiedlichen Wiederfindungsraten wurden die gemessenen Resistenzgenkonzentrationen der „Screening“-Proben, wie bereits in den entsprechenden Abschnitten erwähnt, um die mittlere Wiederfindungsrate korrigiert; diese Vorgehensweise beruhte auch darauf, dass sich ein Großteil der ermittelten Resistenzgen-Gehalte in Konzentrationen zwischen 6,0 bis 8,0 lg copies/g Probenmaterial bewegte und die jeweiligen Wiederfindungsraten sich in diesem Bereich als relativ konstant erwiesen. Zusätzlich wurde angesichts der in den Matrices voneinander abweichenden ermittelten molekularbiologisch bestimmten „Gesamtkeimzahl“ auf eine geeignete Darstellung der Messwerte geachtet (Darstellung einmal in

Form der absoluten Konzentrationen und einmal als relative Abundanzen). Für den „Tracking“-Teil wurde, ob der Tatsache, dass es sich bei den Proben in beiden Fällen um die gleiche Matrix, nämlich Faeces, handelte und sich die ermittelten Wiederfindungsraten unter Berücksichtigung der Standardabweichung über die verschiedenen Verdünnungsstufen des Matrixvergleichs in ähnlichen Bereichen bewegten, bewusst auf einen solchen Angleich verzichtet. Ob der auffallend niedrigen WFR von Gülle und Schweinefaeces in der höchsten Konzentrationsstufe ( $10^8$  lg copies/g) im „Matrixversuch“ muss jedoch davon ausgegangen werden, dass ermittelte Genkonzentrationen  $> 10^7$  lg copies/g im Falle dieser beiden Matrices in der Tendenz unterschätzt werden.

Letztlich bleibt als Fazit des Versuches festzuhalten, dass ein Vergleich von solch unterschiedlichen Matrices zwar nach angemessener Validierung und unter Berücksichtigung von Korrekturfaktoren möglich, jedoch nicht fehlerlos ist. Allerdings war dieses Vorgehen alternativlos, da derzeit konventionelle Schweinehaltungsbetriebe, die ihre Tiere auf Stroh halten, nicht in ausreichendem Maß vorhanden sind.

Bei der Einordnung der unterschiedlichen Matrices zu Ergebnissen aus der englischsprachigen Literatur kam erschwerend hinzu, dass es im Englischen verschiedene Begriffe für die jeweiligen wirtschaftseigenen Düngemittel gibt, diese allerdings oftmals mehrdeutig sind und darüber hinaus im Material-Teil von Forschungsarbeiten oftmals nur ungenügend definiert sind. So lässt sich der Begriff „manure“ ins Deutsche mit „Dung“, „Dünger“, „Mist“ und „Gülle“ übersetzen. Spezifiziert wird das Wort durch vorangestellte Adjektive wie „liquid“ bzw. „farmyard“ (manure), worunter dann einerseits „Gülle“, allerdings auch „Jauche“, andererseits „Stallmist“ gemeint sind. Darüber hinaus existiert der Begriff „slurry“, der neben „Gülle“ bzw. „Jauche“ auch mit „(Klär-)Schlamm“ übersetzt werden könnte. In Anbetracht dessen wurde bei Literatur-Vergleichen Vorsicht an den Tag gelegt und die jeweiligen Definition der angesprochenen Wirtschaftsdünger kritisch hinterfragt.

#### 1.4 Resistenzgen-Nachweis

Für die zum quantitativen Resistenzgen-Nachweis verwendeten Referenzstämme war nur für den *tet(M)*-tragenden Stamm *Bacillus cereus* R89 die genaue Anzahl der Kopien dieses Resistenzgens im Genom – nämlich genau eine (auf dem Transposon Tn916 gelegene) Kopie pro Bakterienzelle – bekannt (Agersø et al. 2002). Alle anderen Referenzstämme der in der qPCR nachgewiesenen Resistenzgene tragen letztere in einer nicht bekannten Kopienzahl im Genom, so dass die ermittelten Genkonzentrationen letztlich eher Äquivalente/g darstellen, als tatsächliche „lg copies“-Werte.

Um den Austrag an Antibiotikaresistenzgenen durch die wirtschaftseigenen Düngemittel in die Umwelt zu quantifizieren wurde entschieden, die ermittelten Gen-Konzentrationen überwiegend als absolute Werte in der Einheit „lg copies /g“ darzustellen. Zusätzlich wurde auch auf die Angabe als relative Abundanzen zurückgegriffen: Hierfür wurden die ermittelten Resistenzgenkonzentration normalisiert in Relation zum Gehalt an 16S-rRNA-Genen in derselben Probe gesetzt, wobei darauf geachtet wurde, dass die ermittelte molekularbiologische „Gesamtkeimzahl“ mittels möglichst Bakterien-spezifischer Universal-Primer bestimmt wurde (Koike et al. 2007, Czekalski et al. 2012, Dorn-In et al. 2015). In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, dass unterschiedliche Bakterien unterschiedlich viele Kopien der Target-Sequenzen in ihrem Genom tragen – *E. coli* beispielsweise sieben. Somit stellen Keimzahl-Äquivalente immer nur eine Näherung dar. Zudem darf der Begriff „Gesamtkeimzahl“ nicht mit dem Gehalt an lebenden Bakterien gleichgesetzt werden, da in der qPCR auch DNA-Material toter Keime amplifiziert wird.

Um sicherzugehen, dass es sich bei den in der qPCR amplifizierten Genprodukten tatsächlich um das gesuchte Gen handelte, wurden exemplarisch Amplifikate von Feldproben sequenziert und die Sequenzen im Anschluss mit den Sequenzen der Amplifikate der verwendeten Standards abgeglichen. Wie in Abschnitt IV1.2.5 dargestellt, konnte die Identität der jeweiligen Gene im Falle eines jeden der untersuchten Gene mindestens einmal durch Sequenzierung bestätigt werden. Abweichende Sequenzierungsergebnisse ergaben sich für Amplifikate mit zum jeweiligen Standard übereinstimmender Schmelzkurve nicht.

## 2 Ergebnisdiskussion

### 2.1 „Screening“-Teil der Studie

#### 2.1.1 Quantifizierung von Antibiotikaresistenzgenen

Ziel der Untersuchungen war es unter anderem, verschiedene Gene, die Resistenz gegen Tetrazykline und Sulfonamide vermitteln, in den auf konventionellen und ökologischen Betrieben anfallenden Ausscheidungen der Schweine (Gülle; Jauche bzw. Festmist) quantitativ zu bestimmen, um so den Austrag dieser Gene durch die genannten wirtschaftseigenen Düngemittel in die Umwelt einschätzen zu können. Darüber hinaus sollte eruiert werden, ob der Einsatz bestimmter Antibiotika selektiven Einfluss auf die Abundanz korrespondierender Resistenzgene in den Wirtschaftsdüngern nimmt. Der Nachweis von *qacE* / *qacEΔ1* diente als Marker für die Verbreitung von mobilen genetischen Elementen (vgl. Abschnitt II1.3.5).

##### 2.1.1.1 Molekularbiologisch bestimmte „Gesamtkeimzahl“ (16S-rDNA)

Die Erfassung von 16S-rRNA-Genen half dabei festzustellen, ob Veränderungen in der Quantität einzelner Resistenzgene auf eine veränderte quantitative Zusammensetzung der molekularbiologischen „Gesamtkeimzahl“ in den jeweiligen Proben zurückzuführen waren. Darüber hinaus – das zeigen die Ergebnisse der 16S-rDNA-Gehalte von Gülle, Jauche und Festmist in Abbildung 22 – war sie Hinweis gebend auf etwaige unterschiedliche „Gesamtkeimzahlen“ in den beprobten „Screening“-Matrices: So war die molekularbiologisch bestimmte „Gesamtkeimzahl“ – trotz Korrektur der Matrices um die jeweilige WFR – in Festmistproben signifikant höher als in Jauche- und Gülleproben. Generell sind Keimgehalt und die Zusammensetzung der Mikrobiota in diesen Düngemitteln immer auch abhängig von den Lagerungsbedingungen, wobei Leung und Topp (2001) hinsichtlich der aeroben und anaeroben Gesamtkeimzahl in Gülle über einen Zeitraum von sieben Wochen keine Veränderungen beobachten konnten. (Leung et al. 2001). Die Tatsache, dass die Diversität der Bakterienpopulation in Gülle ausgeprägter ist als in Faecesproben, weist jedoch darauf hin, dass wirtschaftseigene Düngemittel nach Ausscheidung noch Veränderungen hinsichtlich der Keimpopulation unterworfen sind (Duriez et al. 2007). Die festgestellten Unterschiede im Vergleich der drei Probenmatrices könnten hypothetisch auf einen höheren Feststoffanteil im Festmist, unter

anderem bedingt durch das Stroh, zurückzuführen sein: So enthalten Gülle und insbesondere Jauche im Vergleich zu Festmist wesentlich größere Mengen an vermeintlich steriles Urin (Møller et al. 2002). Zwar wurde die Sterilität von Urin aus gesunden Katzen in einer kürzlich veröffentlichten Studie aus Norwegen bestätigt, dem stehen jedoch Ergebnisse neuerer Forschungsarbeiten aus Human- wie Veterinärmedizin gegenüber, in denen der Nachweis von bakterieller DNA in Kultur-negativem Urin sehr wohl gelang (Anderson et al. 2004, Imirzalioglu et al. 2008, Wolfe et al. 2012, Lund et al. 2014). Dass sich in der Literatur bisher keine Belege für höhere Bakteriendichte in Festmist finden lassen, zeigt eine Langzeitstudie, in der Veränderungen von unterschiedlichen mikrobiellen Parametern in Böden untersucht wurden, die mit unterschiedlichen wirtschaftseigenen Düngemitteln behandelt worden waren: Dort konnten keine Unterschiede hinsichtlich der Gesamtmenge an Bakterien ausgemacht werden, egal ob die Bodenproben mit Festmist oder Klärschlamm gedüngt worden waren (El Azhari et al. 2012). Dies lässt sich letztlich aber wohl eher auf die Nährwerte in den ausgebrachten Düngemitteln zurückführen als auf die mit den jeweiligen Matrices ausgebrachte Bakterienmenge.

### 2.1.1.2 Resistenzgen-Gehalte – relative Abundanzen

Als Folge der in den Matrices detektierten unterschiedlich hohen molekularbiologisch bestimmten „Gesamtkeimzahlen“ wurden beim Vergleich der für die jeweiligen Matrices in der qPCR ermittelten und um die WFR korrigierten Resistenzgen-Gehalte die relativen Abundanzen einander gegenüber gestellt: Für die Gene *tet(A)*, *tet(M)* und *qacE* / *qacEΔ1* waren diese in den Güllen konventioneller Betriebe signifikant höher als in den Proben aus ökologischer Schweinehaltung. Die mit Abstand höchsten Werte (Median bei  $7,16 \times 10^{-2}$  copies/16S-rRNA-Gen copies) unter den untersuchten Resistenzgenen wurden dabei für das ribosomale Schutzprotein *tet(M)*, das am weitesten verbreitete Tetrazyklinresistenzgen überhaupt (Roberts 2011), ermittelt – sie gleichen dabei weitestgehend den Konzentrationen ( $2,32 \times 10^{-2}$  copies/16S-rRNA-Gen copies), die in Gülleproben von chinesischen Schweinehaltungsbetrieben gemessen wurden (Cheng et al. 2013).

Organische Düngemittel, wie sie die drei verschiedenen untersuchten Matrices darstellen, tragen bei Ausbringung auf landwirtschaftliche Nutzflächen signifikant zum Anstieg von Antibiotikaresistenzgenen und zur Selektion von resistenten

Bakterienpopulationen im Boden bei (Heuer et al. 2011). Heuer et al. (2011) kommen zu dem Schluss, dass die Gefahr für den Menschen, mit Boden- assoziierten Resistenzen in Kontakt zu kommen (beispielsweise über die Aufnahme von pflanzlichen Lebensmitteln), höchstwahrscheinlich stark unterschätzt wird. Tschechische Forscher stellten in ihren Untersuchungen zum Auftreten von *tet(M)* in Rinder-Gülle fest, dass die Abundanzen in Bodenproben, die im unmittelbaren räumlichen Umfeld der untersuchten Stallungen gezogen worden waren, mit Höchstwerten von  $2,00 \times 10^{-2}$  copies/16S-rRNA-Gen copies teils noch höher waren als die Konzentrationen (ca.  $1,00 \times 10^{-3}$  copies/16S-rRNA-Gen copies) in der Gülle selbst (Kyselkova et al. 2015). Die Tatsache, dass in Studien weitere Tetrazyklin- und zahlreiche andere Resistenzgene in Boden- und Luftproben in der Nähe von Schweinehaltungsbetrieben detektiert wurden, unterstreicht, dass die Ausbringung von Gülle und anderen wirtschaftseigenen Düngemitteln eine zentrale Rolle bei der Verbreitung von Resistenzgenen in die Umwelt spielt (Zhu et al. 2013). Auch wenn die Gülle von mit Antibiotika behandelten Tieren durch Rückstände dieser Medikamente und bereits enthaltene resistente Bakterien bei Ausbringung auf landwirtschaftliche Nutzflächen nachweislich zur Selektion antibiotikaresistenter Keime und Anreicherung von Resistenzgenen im Boden führte, bedeutet dies jedoch nicht zwangsläufig, dass etwaig detektierte Resistenzen im Boden auf mit den wirtschaftseigenen Düngemitteln in die Umwelt eingebrachte Antibiotikaresistenzgene zurückzuführen sind (Ghosh et al. 2007, Heuer et al. 2007). Die Komplexität, die sich hinter den Konsequenzen des Einsatzes tierischer Düngemittel verbirgt, zeigen Ergebnisse von Wissenschaftlern der Yale University auf: Sie wiesen nach, dass sich durch Düngung mit Gülle von Rindern, die zuvor nie mit Antibiotika behandelt worden waren, nicht nur die Zusammensetzung der Mikrobiota in Bodenproben verändert, sondern auch die Zahl  $\beta$ -Laktam-resistenter Bakterien im Boden erhöht, wobei die Forscher diese selektierende Wirkung auf bisher nicht identifizierte Bestandteile im organischen Dünger zurückführen (Udikovic-Kolic et al. 2014). Entscheidende Bedeutung bei der möglichen Reduktion von Resistenzfaktoren kommt dabei u. a. einem adäquaten Lagerungsmanagement der Wirtschaftsdünger zu (Storteboom et al. 2007). So ließen sich in einer Studie die zu Beginn noch detektierten Tetrazyklin-, Sulfonamid- und Fluorchinolonresistenzgene in Schweinegülle mit Ausnahme des Gens *parC* durch Kompostierung nach 28 bis 42 Tagen nicht mehr nachweisen (Selvam et al. 2012).

In allen in dieser Arbeit untersuchten wirtschaftseigenen Düngemittel ließen sich auch die Integron-assoziierten Gene *qacE* / *qacEΔ1* detektieren. Dies lässt vermuten, dass auch auf bayerischen Schweinehaltungsbetrieben der horizontale Genaustausch und die damit einhergehende Verbreitung von Resistenzgenen in Schweine- und Umwelt-assoziierten Mikroorganismen eine wesentliche Rolle spielt – angesichts der ermittelten Abundanzen in konventionellen Betrieben bisher mehr als in ökologischen.

Im Gegensatz zu den Untersuchungsergebnissen der *tet*-Abundanzen ergaben sich für *sul*(II) im Vergleich der Matrices die höchsten Abundanzen für Fesmist; sie waren signifikant erhöht im Vergleich zu Gülle und Jauche, die in etwa auf ähnlichem Niveau zu liegen kamen. Dies relativiert auf den ersten Blick den Verdacht, dass bei der Ausbringung von Wirtschaftsdünger aus konventionellen Betrieben in der Tendenz eine höhere Resistenzgen-Belastung zu erwarten ist als bei wirtschaftseigenen Düngemitteln aus ökologischer Tierhaltung. Diese These muss jedoch differenziert betrachtet werden: Ein unmittelbarer Vergleich gestaltet sich hier schwierig, da zu erwarten ist, dass sich die tatsächlich auf landwirtschaftliche Nutzflächen ausgebrachte Menge der verschiedenen Wirtschaftsdünger pro Hektar voneinander unterscheidet.

Interessanterweise traf die Tendenz zu höheren Gehalten in Proben aus ökologischer Tierhaltung für die „Tracking“-Proben der einzeln beobachteten Tiere nicht zu: Hier waren die absoluten *sul*(II)-Gehalte in den Faecesproben konventioneller Tiere signifikant höher ( $p < 0,001$ ; Daten nicht dargestellt) als die der ökologisch gehaltenen Schweine. Die Abweichung zu den Ergebnissen aus dem „Screening“-Teil könnte evtl. darauf zurückzuführen sein, dass es im Festmist nachträglich zu einer Vermehrung an *sul*(II) gekommen ist, etwa durch umweltstabile Bakterien.

Es lässt sich zusammenfassen, dass von Schweinehaltungsbetrieben eine Belastung der Umwelt mit Antibiotikaresistenzgenen ausgeht, die wesentlich in der Ausbringung von Gülle, Jauche und Fesmist auf landwirtschaftliche Nutzflächen begründet liegt. Eine allgemeingültige Aussage, ob diese Belastung nun durch konventionelle oder ökologische wirtschaftseigene Düngemittel höher ist, erscheint an dieser Stelle anhand der dargestellten Ergebnisse nicht möglich.

### 2.1.1.3 Absolute Resistenzgen-Gehalte in Abhängigkeit vom Beprobungszeitpunkt

Bei der Auswertung der durchgeführten Untersuchungen stellte sich heraus, dass in allen drei beprobten Matrices die *tet*(A)-Gehalte in Herbst-Proben signifikant gegenüber denen in Proben aus dem Frühjahr erhöht waren. Für die beiden anderen Tetrazyklinresistenzgene, *tet*(B) und *tet*(M), und auch für *sul*(II) ließen sich keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit vom Beprobungszeitpunkt feststellen. Dies steht im Widerspruch zu Ergebnissen aus dem Jahr 2006, als *tet*(M)-Gehalte in Gülle im Frühjahr höher waren als im Herbst (Hölzel 2006). Im direkten Vergleich der beiden Arbeiten waren die *tet*(M)-Gehalte mit absoluten und um die WFR korrigierten Werten von 8,49 lg copies/g (Hölzel) bzw. 8,52 lg copies/g (diese Arbeit) in den Frühjahrsproben beinahe identisch, während die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Konzentrationen für die Herbstproben mit 8,34 lg copies/g höher angesiedelt waren als bei Hölzel (7,99 lg copies/g). McKinney et al. (2010) stellten fest, dass die Konzentrationen der von ihnen untersuchten Tetrazyklinresistenzgene in Proben, gezogen aus Nutztierhaltungen nachgeschalteten Klärteichen, im Sommer am niedrigsten waren, die von *sul*(I) und *sul*(II) hingegen im Winter. In einer ähnlichen Forschungsarbeit waren die Konzentrationen von verschiedenen *tet*-Genen, isoliert aus Proben, gewonnen in räumlicher Nähe von Tetrazyklin-einsetzenden Tierhaltungen, während der Monate September, Oktober und November signifikant erhöht (Peak et al. 2007). Somit lassen sich keine einheitlichen Trends und Faktoren ausmachen; vielmehr scheinen die vermeintlich jahreszeitlichen Schwankungen letztlich nur Variationen anderer Faktoren abzubilden.

Was *qacE* / *qacEΔ1* betrifft, so waren die Gehalte in Jaucheproben – dies trifft, wenn auch nicht in signifikantem Maße, auch für Gülle und Festmist zu – im Frühjahr signifikant höher als im Herbst. Letzteres könnte darauf zurückzuführen sein, dass es für gewöhnlich in den kalten Wintermonaten zu erhöhtem Krankheitsaufkommen und damit einhergehenden Behandlungsspitzen mit antimikrobiellen Wirkstoffen kommt, die wiederum einen erhöhten Selektionsdruck für die im Stall befindlichen Bakterienpopulationen bedingen, infolgedessen vermehrt horizontaler Genaustausch stattfindet (Peak et al. 2007). Tatsächlich geht aus der Auswertung der während des Projektes erhobenen Daten zum Arzneimitteleinsatz hervor, dass es in den Winter-Monaten Oktober bis März

zu mehr Antibiotika-Behandlungen kam als in den Monaten April bis September (Daten nicht dargestellt).

#### 2.1.1.4 Selektion

Es ist unstrittig, dass therapeutische Gaben von Antibiotika eine Zunahme von antibiotikaresistenten Bakterien in Mensch und Tier nach sich ziehen (Levy et al. 1976). Auch konnten Studien bereits eine Verknüpfung zwischen dem Einsatz von Antibiotika in landwirtschaftlichen Nutztierhaltungen und der Abundanz verschiedener Tetrazyklin- bzw. Sulfonamidresistenzgene in tierischen Ausscheidungen herstellen (Peak et al. 2007, Schwaiger et al. 2009, McKinney et al. 2010). Vor diesem Hintergrund galt es zu überprüfen, ob sich die Resistenzgen-Gehalte von „Screening“-Betrieben, in denen während des Betrachtungszeitraumes mehr als einmal Tetrazykline respektive Sulfonamide zum Einsatz gekommen waren, von denen in Proben aus Schweinehaltungen unterschieden, in denen dies nicht der Fall war. Zudem wurden nicht-einsetzende konventionelle Betriebe nicht-einsetzenden ökologischen Betrieben gegenübergestellt – dies geschah im Hinblick auf die Hypothese, dass in ökologischen Schweinehaltungen eher von einem langfristigen „low level use“ von Antibiotika auszugehen ist, während die Nicht-Anwendung bestimmter Antibiotika bei konventionellen Betrieben auch auf eine Wirkstoff-Rotation zurückzuführen sein könnte, beispielsweise bei bereits bestehender Resistenzproblematik. Da davon auszugehen ist, dass das Mikrobiom von Gülle und Jauche in seiner Gesamtheit ähnlicher ist als das von Festmist im Vergleich zu den beiden genannten wirtschaftseigenen Düngemitteln (s. oben) wurden im Sinne einer bestmöglichen Näherung nur Gülle- und Jaucheproben in diese Auswertung einbezogen.

Alles in allem waren in Betrieben, in denen Schweine mit Tetrazyklinen therapiert wurden, die Abundanzen der beiden Resistenzgene *tet(A)* und *tet(M)* signifikant erhöht im Vergleich zu den Messungen für Betriebe, auf denen Tetrazykline keine Anwendung fanden. Bezuglich *tet(B)* ließen sich diesbezüglich zwar keine signifikanten Unterschiede feststellen, in der Tendenz wurden aber auch hier bei einsetzenden Betrieben höhere Abundanzen ermittelt. Auch die Ergebnisse des Vergleichs zwischen Sulfonamid-einsetzenden Betrieben und solchen, die dies nicht tun, zeigten signifikant höhere *sul(II)*-Abundanzen für Schweinehaltungen, in denen diese Wirkstoffklasse Anwendung fand.

Diese Ergebnisse lassen sich durch Selektionsprozesse erklären. Solche Selektionsprozesse beginnen bereits kurz nach Applikation eines Antibiotikums im Körper, genauer gesagt im Darm, der behandelten Tiere: Einzelne, bereits gegen das verabreichte Antibiotikum resistente Bakterien haben in Anwesenheit des Wirkstoffes einen Fitnessvorteil gegenüber der übrigen Bakterienpopulation (Lenski 1997). Selbiges geschieht nach Ausscheidung des Antibiotikums und dessen Metaboliten in der Gülle – es konnten gezeigt werden, dass, abhängig vom verabreichten Wirkstoff, zwischen 30 % und 90 % Antibiotika über Urin und Faeces unmetabolisiert wieder ausgeschieden werden (Elmund et al. 1971, Feinman 1978, Alcock et al. 1999, Sarmah et al. 2006). Auch hier stehen resistente Bakterien in Konkurrenz zur sensitiven Population; durch den vom Antibiotikum weiterhin ausgeübten Selektionsdruck kommt es insgesamt zu einer Verschiebung hin zu mehr antibiotikaresistenten Keimen, denen entsprechende Resistenzgene wiederum einen Fitnessvorteil verschaffen. Peak et al. (2007) konnten in Proben, gewonnen aus Nutztierhaltungen nachgeschalteten Klärteichen, höhere Abundanzen der von ihnen untersuchten Tetrazyklinresistenzgene feststellen, wenn in den Betrieben mehr Tetrazykline als in den Vergleichsgruppen eingesetzt wurden, wobei die ermittelten Gehalte an *tet(B)* niedriger waren als an *tet(M)* und anderen *tet*-Genen. Dies steht prinzipiell im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit, denn es wurden die höchsten relativen Abundanzen in Gülleproben Tetrazyklin-einsetzender Betriebe für *tet(M)* ermittelt, die niedrigsten für *tet(B)*.

Beim Vergleich konventioneller und ökologischer „Screening“-Betriebe, die jeweils keine Tetrazykline einsetzen, unterschieden sich die Gen-Gehalte in ihrer relativen Abundanz ebenfalls bei *tet(A)* und *tet(M)* signifikant voneinander und waren bei den konventionellen Schweinehaltungen höher. Wiederum waren die Ergebnisse hinsichtlich *tet(B)* in der Tendenz ähnlich, ohne dass sich die Vergleichsgruppen signifikant voneinander unterschieden. Da ein unmittelbarer Zusammenhang mit der selektierenden Wirkung von Tetrazyklinen bei diesen nicht-einsetzenden Betrieben per definitionem ausscheidet, könnten sich die ermittelten Ergebnisse entweder auf co-selektive Prozesse zurückführen lassen, die im Zusammenhang mit der Haltungsart stehen; alternativ wäre denkbar, dass sich in den Gülleproben der konventionellen Betriebe *tet*-Gene bzw. *tet*-tragende Populationen trotz ausbleibendem Kontakt mit einem selektierenden Wirkstoff

über einen längeren Zeitraum halten und sich so stets ein *tet*-„Grundrauschen“ detektieren lässt. Als Ursache unwahrscheinlich erscheint hingegen der undokumentierte Verbrauch von Antibiotika in den „Screening“-Betrieben.

Bei den nicht Sulfonamid-einsetzenden Betrieben waren die *sul*(II)-Abundanzen in konventionellen und ökologischen Haltungen auf ähnlichem Niveau angesiedelt.

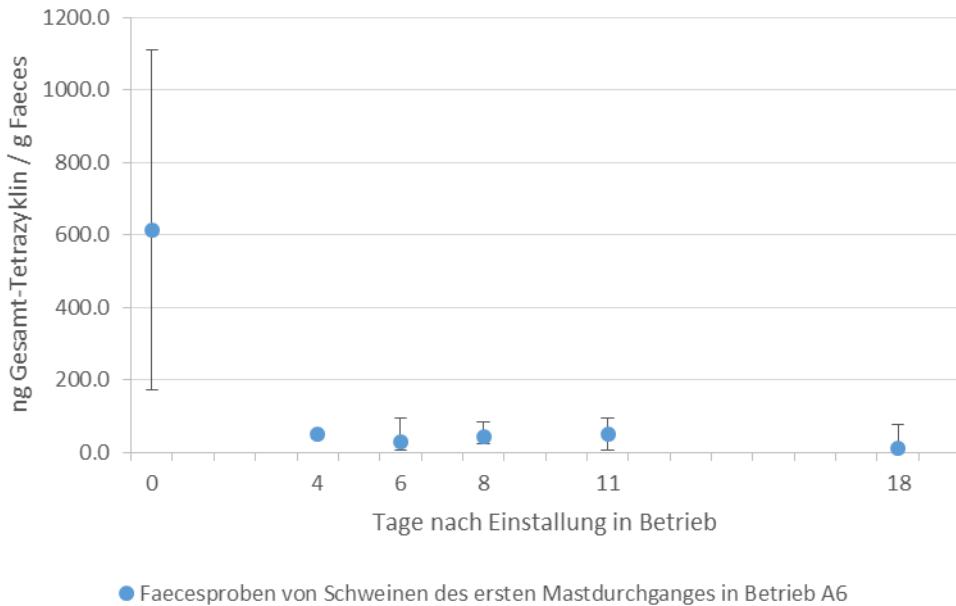
## 2.2 „Tracking“-Teil der Studie

### 2.2.1 Antibiotikaeinsatz

Zwar ging aus den Aufzeichnungen zur Arzneimittelanwendung hervor, dass während des Betrachtungszeitraumes in mehreren Betrieben keine Tetrazykline eingesetzt wurden. Jedoch ergaben in einem weiteren „ABYS“-Studienteil mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie / Massenspektrometrie (HPLC-MS/MS) durchgeführte analytische Rückstandsmessungen, dass die Schweine der drei beprobten Mastdurchgänge des konventionellen „Tracking“-Betriebs A6 bereits in den Faecesproben, die jeweils unmittelbar nach Einstallung der Tiere gezogen wurden, Gehalte von bis zu 1620,3 ng „Gesamt-Tetrazyklin“/g Faeces aufwiesen. Aus Gründen der Risikoabschätzung soll „Gesamt-Tetrazyklin“ hier definiert sein als Gesamtsumme aller untersuchten Tetrazykline und seiner Derivate (Frey et al. 2010). Bei A6 handelte es sich um einen konventionellen Betrieb, der seine Tiere im Alter von etwa drei Monaten durch Zukauf von stets demselben Ferkelerzeuger bezieht (vgl. Tabelle 4). Der Nachweis von Tetrazyklinen in den Faeces beruht aller Wahrscheinlichkeit nach darauf, dass die Tiere bereits im Erzeugerbetrieb mit Tetrazyklinen behandelt wurden. Die Tatsache, dass der Schwerpunkt des Antibiotikaeinsatzes in der Schweinehaltung in der Aufzucht zu suchen ist, unterstützt diese Vermutung (Hagmüller 2013). Aus Gründen der Anonymisierung war keine Nachfrage im Erzeugerbetrieb zum exakten Ablauf etwaiger Behandlungen möglich.

Wie Abbildung 91 exemplarisch zeigt, gingen die in den Faeces von Tieren des ersten Mastdurchganges ermittelten Tetrazyklin-Gehalte im Zeitraum von 18 Tagen nach der Einstallung deutlich zurück und lagen dabei schon ab Tag 4 nach Einstallung in Bereichen unter der Nachweigrenze 100 ng/g. Angesichts der

Tatsache, dass auf dem Betrieb selbst keine Tetrazykline mehr eingesetzt wurden ist davon auszugehen, dass die Rückstandskonzentrationen auch bei anderen Tieren mit der Zeit abnahmen; aus logistischen Gründen war die Messung der Rückstände in sämtlichen Proben bis zur Fertigstellung dieser Arbeit jedoch nicht möglich.



**Abbildung 91: Verlauf der Gesamt-Tetrazyklin-Gehalte in Faecesproben (n = 29) von Schweinen des ersten Mastdurchgangs ab Einstellung in „Tracking“-Betrieb A6**

Als unmittelbare Konsequenz ergibt sich aus diesen Ergebnissen, dass die in den Abschnitten IV3.2.1 und IV3.2.2 betrachtete Differenzierung der Resistenzgen-Gehalte in Proben „behandelter“ und „unbehandelter“ Schweine nur eingeschränkte Gültigkeit besitzt: Daher wird – wie bereits in den jeweiligen Diagrammen durch Fußnote erläutert – an dieser Stelle noch einmal darauf verwiesen, dass es stets um „im „Tracking“-Betrieb behandelte Schweine“ bzw. „im „Tracking“-Betrieb nicht behandelte Schweine“ geht, da sich die jeweiligen Untersuchungen nur auf Betriebs- bzw. Schlachthofebene abspielten, eine Aussage über etwaige frühere Behandlungen im Erzeugerbetrieb jedoch nicht möglich war. Dies betrifft selbsterklärend nur die zukaufenden Betriebe (A6, A21, H18, J20).

Im konventionellen „Tracking“-Betrieb E5 stammen die Ferkel aus eigener Nachzucht und werden bereits am ersten Lebenstag einmalig i.m. mit Oxytetracyklinhydrat behandelt wobei die zugrundeliegenden „Diagnosen“ „Pneumonie-Prophylaxe“ und „Eperythrozoonose“ lauteten. Hierzu sei

angemerkt, dass in den Leitlinien für den sorgfältigen Umgang mit antibakteriell wirksamen Tierarzneimitteln in Punkt 3 beim Einsatz von Antibiotika zunächst einmal immer eine mindestens klinische Diagnosestellung gefordert wird (vgl. Abschnitt II1.2). Im vorliegenden Fall handelt es sich offensichtlich um einen regelmäßigen Einsatz in einem bestimmten Altersabschnitt – hier ist bei Antibiotikagabe grundsätzlich ein ErregerNachweis und ein Antibiogramm nach Erregerisolierung erforderlich bzw. muss durch regelmäßige Untersuchungen die Resistenzsituation überprüft werden, ansonsten handelt der den Landwirt betreuende Tierarzt nicht entsprechend der Leitlinien (BTK 2015). Zudem sind Landwirt und Tierarzt aufgefordert, erfolgversprechende Alternativen zum Antibiotikaeinsatz zu überprüfen.

## **2.2.2 Quantifizierung von Antibiotikaresistenzgenen**

### **2.2.2.1 Selektion**

In diesem Punkt der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, ob die Anwesenheit von Antibiotika der Wirkstoffklassen der Tetrazykline und der Sulfonamide durch selektierende Effekte zu veränderten Konzentrationen an entsprechenden Antibiotikaresistenzgenen in den Faeces von Schweinen bzw. von Personen auf dem Betrieb führt, wie dies für Schweine bereits beobachtet wurde (Schwaiger et al. 2009, Looft et al. 2012). Dafür wurden die Proben Antibiotikum-einsetzender Betriebe mit denen nicht-einsetzender verglichen sowie tatsächlich im Betrieb behandelte Tiere nicht behandelten gegenübergestellt. Dies geschah sowohl für das „Screening“ – hier wurden viele Betriebe in einem relativ groben Raster abgedeckt – als auch für das „Tracking“, in dem der Fokus bei wenigen Betrieben auf einem engmaschigen Raster und zeitlicher Verfolgung der beobachteten Probanden lag.

Um potenzielle selektive Effekte auch zeitlich einordnen zu können wurden exemplarisch für den äußerst frequent Tetrazyklin-einsetzenden Betrieb E5 zeitliche Verlaufsdiagramme erstellt, die zeigen sollten, wie sich die Tetrazyklinresistenzgen-Gehalte während und unmittelbar nach Antibiotika-Gabe verhalten. Darüber hinaus sollten Trendanalysen der Resistenzgenkonzentrationen helfen, langfristige Effekte des Antibiotikaeinsatzes aufzudecken und zu visualisieren.

### Tetrazyklinresistenzgene bei Mensch und Schwein

Die *tet*(M)- und *tet*(B)-Gehalte in den Faecesproben von Personen von Betrieben, auf denen regelmäßig Tetrazykline eingesetzt wurden, waren signifikant höher als die ermittelten Konzentrationen für Personen von Betrieben, bei denen dies nicht der Fall war. Bei den Schweinen der beiden Vergleichsgruppen wurden hingegen keine solch deutlichen Unterschiede in den Konzentrationen dieser beiden Gene festgestellt – beide Gruppen zeigten hohe Gehalte. Vergleichbare Tendenzen zeigten auch schon die Ergebnisse der *tet*(B)-Gehalte in den „Screening“-Proben. Dies spricht dafür, dass die hohen *tet*-Gen-Konzentrationen im Stuhl der beprobten Personen nicht durch die Übertragung resistenter Bakterien oder von Resistenzgenen vom Tier auf den Menschen zustande kamen. Eher könnten die Unterschiede auf der selektierenden Wirkung der Antibiotika selbst beruhen, der die betroffenen Landwirte und Kontaktpersonen durch den direkten oder indirekten Kontakt mit den antimikrobiellen Wirkstoffen bei der täglichen Arbeit auf dem Hof unterworfen sind – hierbei wäre an die manuelle Verabreichung von medikierten Futtermitteln, Antibiotikarückstände in den Ausscheidungen der Tiere, an den Tieren selbst, im Stall oder in der Stallluft zu denken. Langfristig könnten die beschriebenen Vorgänge der Grund für höhere Gehalte an *tet*-Genen bei Bakterien im Darm der entsprechenden Personen sein. Beispielsweise warnen Hamscher et al. (2003) nicht nur davor, dass mit Antibiotika kontaminierte Staub aus Schweinemastbetrieben ein möglicher Auslöser für die Entwicklung von Atemwegserkrankungen ist, sondern sprechen auch davon, dass bei Landwirten, die täglich in Kontakt mit subtherapeutischen Antibiotikakonzentrationen kommen, ein erhöhtes Risiko der Resistenzentwicklung besteht (Hamscher et al. 2003). Die Ergebnisse einer französischen Studie konnten belegen, dass die Prävalenz Tetrazyklin-resistenter commensaler Darmbakterien bei Antibiotika-einsetzenden Schweinehaltern signifikant erhöht war im Vergleich zu Personen, die den Farmern zwar in Geschlecht, Alter und Herkunft ähnelten, jedoch weder in landwirtschaftlichen Betrieben, noch in Schlachthöfen oder pharmazeutischen Unternehmen tätig waren und auch sonst keinen engen Kontakt zu Farmpersonal hatten (Aubry-Damon et al. 2004). Die in der vorliegenden Arbeit beprobten Personen wurden nach eigenen Angaben während des mehrmonatigen Studienzeitraumes nicht selbst mit Antibiotika therapiert. Daher kann dies als mögliche Ursache für die hohen Gen-Gehalte zwar ausgeschlossen werden,

jedoch können langfristige selektive Effekte hervorgerufen durch länger zurückliegende Antibiotikagaben, nicht vollkommen außer Acht gelassen werden, da zu letzteren keine ausreichenden Angaben vorlagen.

Die Tatsache, dass beim Vergleich zwischen den Faeces von Schweinen und Personen Tetrazyklin-anwendender Betriebe signifikant höhere *tet(A)*-Gehalte in den porcinen, für *tet(B)* jedoch signifikant höhere Konzentrationen in den humanen Proben detektiert wurden, steht einerseits im Einklang mit der Literatur, in der von höheren *tet(A)*-Prävalenzen in tierischen Indikator-Keimen wie *E. coli* bzw. höherer *tet(B)*-Prävalenz beim Menschen die Rede ist (Chopra et al. 2001, Bryan et al. 2004, Schwaiger et al. 2010). Andererseits wird durch diesen Sachverhalt die These gestärkt, dass der Einfluss auf das Resistenzgeschehen beim Menschen mehr durch den Kontakt zu Antibiotika beeinflusst wird als durch Übertragung von Resistenzgenen zwischen Bakterien von Tier und Mensch.

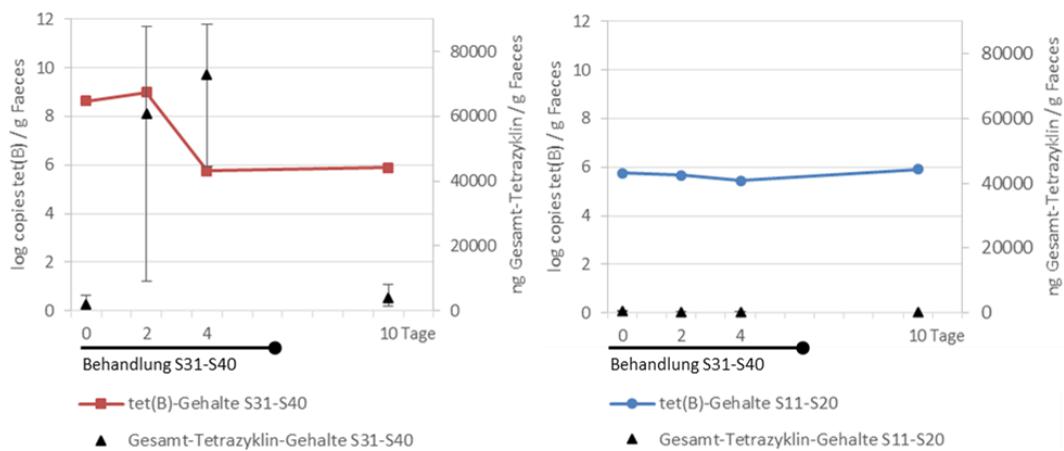
Dass die *tet(B)*- und *tet(M)*-Gehalte in den Schweine-Faeces nicht Tetrazyklin-einsetzender Betriebe in der absoluten Höhe durchaus mit denen einsetzender Betriebe vergleichbar waren, könnte damit zusammenhängen, dass sich auch ohne den unmittelbaren selektiven Druck von Antibiotika das Resistom (Begriffsklärung vgl. Abschnitt II2.2) dieser Tierart durch den jahrelangen Einsatz von Antibiotika und damit verbundenen co-selektiven Prozessen in der landwirtschaftlichen Nutztierhaltung soweit ausgebaut hat, dass stets ein hohes Niveau an (Tetrazyklin-)Resistenzen im Darm von Schweinen detektierbar ist (Looft et al. 2012). Auch können, wie eingehend thematisiert, Vorbehandlungen mit Tetracyklinen beim Erzeugerbetrieb nicht als mögliche Erklärung für hohe Gehalte der genannten Gene in Betrieben, die dieses Antibiotikum nicht selbst regelmäßig anwenden, ausgeschlossen werden. Für *tet(B)* wird andererseits auf den rapiden Konzentrationsabfall nach Behandlungsende verwiesen, so dass die Mehrzahl der Proben behandelter Tiere – außerhalb der eigentlichen Behandlungen – vergleichsweise niedrig zu liegen kam; auch dies erklärt, dass sich tierische Proben einsetzender und nicht-einsetzender Betriebe nicht signifikant voneinander unterschieden.

Hinsichtlich *tet(A)* und *tet(M)* waren die gemessenen Gen-Konzentrationen in den Faeces signifikant höher, wenn die Schweine im Betrieb selbst mit Tetrazyklinen therapiert wurden. Zwar waren die ermittelten Konzentrationen bzgl. *tet(B)* für Tetrazyklin-behandelte und -unbehandelte Tiere auf ähnlichem Niveau

angesiedelt, jedoch konnte auch hier nachgewiesen werden, dass die Gehalte unmittelbar während der Behandlung mit Tetrazyklinen höher waren als zu Zeitpunkten, in denen die Tiere nicht behandelt wurden (Daten nicht dargestellt). Deutlich lässt sich aus diesen Ergebnissen schlussfolgern, dass die Therapie mit Tetrazyklinen einen selektierenden Einfluss auf die Bakterienpopulation im Darm der Schweine hat: Sensible Keime werden durch das Antibiotikum in ihrem Wachstum gehemmt, der Pool der Resistenzträger vergrößert sich, da diese unter dem direkten Druck des verabreichten Antibiotikums einen Fitnessvorteil haben (Lenski 1997). Hierzu finden sich verschiedene Studien, die von einem Anstieg Tetrazyklin-resistenter Bakteriensolate bzw. Resistenzgen-Abundanzen im Darm von Schweinen unter Antibiotikabehandlung zeugen (Borel et al. 2012, Looft et al. 2012). Dass bei diesen Vorgängen dem horizontalen Gentransfer eine entscheidende Rolle zukommt, ist ebenfalls in der Literatur belegt (Barlow 2009, Looft et al. 2012). Die beim Vergleich zwischen Tetrazyklin-behandelten und -unbehandelten Schweinen erhobenen Daten beziehen sich nur auf Therapien, die sich tatsächlich auf Ebene der „Tracking“-Betriebe abspielten. Wieviele Studientiere beispielsweise bereits beim Ferkelerzeuger mit Antibiotika medikiert wurden und deswegen bereits bei Einschluss in die Studie höhere Resistenzgen-Gehalte in ihren Mikrobiota aufwiesen, konnte nicht abschließend geklärt werden (vgl. Abschnitt 2.2.1). Dies bedeutet, dass auf Selektion beruhende Unterschiede ggf. unterschätzt werden, beeinträchtigt aber nicht die Validität der dennoch beobachteten signifikanten Unterschiede. Allerdings könnte sich diese Tatsache verfälschend auf Vergleiche der „nicht behandelten“ konventionellen und ökologischen Schweine auswirken. Betrachtet man jedoch die Gen-Gehalte in den Faecesproben der Schweine, die im Laufe dieser Studie nicht selbst mit Tetrazyklinen behandelt worden waren, in Abhängigkeit von der Haltungsart der Tiere, so weist nichts darauf hin, dass solche Behandlungen im Erzeugerbetrieb die Ergebnisse systematisch verfälschten: Für *tet(A)* wurden in ökologischen, für *tet(B)* hingegen in konventionellen nicht Tetrazyklin-behandelten Schweinen signifikant höhere Gen-Gehalte gemessen. Bei *tet(M)* lagen die Gehalte in beiden Vergleichsgruppen etwa gleichauf.

Dass es im Laufe einer Therapie mit Tetrazyklinen zu selektionsbedingten Veränderungen der Resistenzgenkonzentrationen in den Faeces der behandelten Tiere kommt, zeigten unter anderem Alexander et al. (2011). Die Autoren konnten

einen Anstieg von *tet*(B) in den Faecesproben von mit Chlortetrazyklin behandelten Rindern nachwiesen (Alexander et al. 2011). Solch ein Anstieg stellte sich auch in den Ergebnissen, die Abbildung 51 zugrunde liegen, dar: Bereits an Tag 0 der Behandlung mit Tetrazyklinhydrochlorid (130 mg/kg Körpergewicht) und Colistinsulfat (16 mg/kg Körpergewicht) wiesen die Schweine des dritten Mastdurchgangs (S31 bis S40) in Betrieb E5 in den Faecesproben hohe *tet*(B)-Konzentrationen auf, die sich auf den bereits unter der Muttersau erfolgten kurzzeitigen Vorkontakt mit dem medikierten Futtermittel zurückführen lassen könnten. Dieser Verdacht bestätigt sich beim Blick auf Abbildung 92 (links): Trägt man die in der qPCR gemessenen *tet*(B)-Konzentrationen im Diagramm gegen die Rückstände an ermitteltem „Gesamt-Tetrazyklin“ (Begriffsdefinition s. Abschnitt 2.2.1) in den jeweiligen Faecesproben zum gleichen Zeitpunkt auf, so lässt sich erkennen, dass sich bereits an Tag 0 Mengen von bis zu 2829 ng „Gesamt-Tetrazyklin“/g in den Faeces der Tiere nachweisen ließen. An dieser Stelle sei eingeschoben, dass „echte“ Tag 0-Proben zwar wünschenswert gewesen wären, jedoch nicht realisierbar, da es sich bei der vorliegenden Arbeit nicht um eine Interventionsstudie handelte, sondern gezielt ein Praxisbetrieb unter betriebseigenem Behandlungsmanagement für die Beprobung ausgewählt wurde. Im Laufe der eigentlichen Behandlung der Tiere kam es dann zunächst zu einem Anstieg der Gen-Gehalte an Tag 2, verbunden mit einem deutlichen Anstieg an „Gesamt-Tetrazyklin“ in den Faeces. Nun begannen die *tet*(B)-Gehalte – weiterhin während der Behandlung – über Tag 4 bis zu Tag 10 (bereits nach der Behandlungsende) deutlich abzusinken und kamen auf einem Wert über zwei log-Stufen unter dem zu Beginn der Behandlung zu liegen. Leicht verzögert stiegen die Antibiotika-Rückstände im Kot noch bis Tag 4 an, sanken dann aber ebenfalls rapide ab, wobei interessanterweise auch an Tag 10, also bereits 4 Tage nach Ende der Antibiotika-Therapie noch Mengen von bis zu 10361 ng „Gesamt-Tetrazyklin“/g Faeces ausgeschieden wurden. Stuart B. Levy beschrieb in einem Selbstversuch einen ganz ähnlichen zeitlichen Verlauf und führt die Veränderungen hinsichtlich der Resistenzausprägung auf Selektionsprozesse zurück: Das zu Beginn einer fünftägigen Tetrazyklin-Behandlung niedrige Tetrazyklinresistenz-Level erreichte nach 2 Tagen einen Gipfel, bevor die Werte langsam zu sinken begannen und sich erst nach 15 Tagen wieder auf einem Niveau wie vor Behandlungsbeginn eingependelten (Levy 1997).



**Abbildung 92: *tet(B)*- sowie Gesamt-Tetrazyklin-Gehalte in den Faeces von Schweinen aus dem Betrieb E5; links: Schweine des dritten Mastdurchgangs (S31 bis S40) während Behandlung, rechts: Schweine des zweiten Mastdurchgangs (S11 bis S20) außerhalb Behandlung**

Beim Blick auf Abbildung 92 wird ebenso deutlich, dass die Veränderungen in den Konzentrationen der Resistenzgene eng mit den tatsächlich im Darm befindlichen Mengen an Antibiotika verknüpft sind. Als Belege dafür finden sich im rechten Diagramm derselben Abbildung die *tet(B)*-Gehalte und Medikamenten-Rückstände in den Faeces der zum gleichen Zeitpunkt der Behandlung von S31 bis S40 beprobten, aber nicht selbst behandelten Schweine S11 bis S20: Weder ließen sich hier nennenswerte Veränderungen hinsichtlich der *tet(B)*-Gehalte nachweisen, noch war dies für die ermittelten „Gesamt-Tetrazyklin“-Rückstände der Fall. Auch bei diesen Tieren wurden mit Werten von bis zu 657 ng/g Faeces noch nach Ende der Behandlung geringe Mengen Tetrazyklin mit dem Kot ausgeschieden. Mögliche Erklärung wäre, dass es trotz räumlicher Trennung der sich jeweils gerade in Behandlung befindlichen Mastdurchgänge von den übrigen Schweinen zu einer Verschleppung geringer Mengen der eingesetzten Antibiotika kam. Alternativ wäre daran zu denken, dass der Stallbereich, beispielsweise durch frühere Behandlungen oder ungenügende Hygienemaßnahmen, dauerhaft mit geringen Rückstandsmengen belastet ist, so dass die Schweine auch zu Zeitpunkten außerhalb eigener Behandlungen Tetrazykline oral oder durch die Luft aufnahmen. Hamscher et al. (2003) wiesen in Langzeitanalysen von Stallstaub aus Schweinehaltungsbetrieben in über 90 % der untersuchten Proben Tylosin, verschiedene Tetrazykline, Sulfonamide und Chloramphenicol in einer Gesamtkonzentrationen von bis zu 12,5 mg/kg Staub nach.

Als potenzielle Ursache für die dargestellten Veränderungen in den *tet(B)*-Konzentrationen unter der Behandlung können Schwankungen der molekularbiologisch bestimmten „Gesamtkeimzahl“ ausgeschlossen werden – sie unterlag während der Tetrazyklin-Therapie keinen nennenswerten Schwankungen (Daten nicht dargestellt).

Alles in allem ließen sich die beschriebenen *tet(B)*-Gehalte während und nach Tetrazyklin-Behandlung auch für die anderen, genauso behandelten Mastdurchgänge desselben Betriebs reproduzieren. Die *tet(M)*-Gehalte in den Faecesproben derselben Tiere (s. Abbildung 56) vollzogen im Laufe der Tetrazyklin-Behandlung eine Entwicklung, die sich anfangs mit der von *tet(B)* deckte: Einem Anstieg von Tag 0 auf Tag 2 folgte ebenfalls ein Absinken der Konzentrationen, wobei dieses im Falle von *tet(M)* deutlich weniger ausgeprägt war als bei *tet(B)*, so dass die Messwerte an Tag 10, also nach Ende der Behandlung, immer noch über denen zu Beginn der Behandlung lagen. Erst im Laufe der nächsten monatlichen „Status Quo“-Proben sanken die *tet(M)*-Gehalte auf ein etwas niedrigeres Niveau. Diese Ergebnisse stimmen nicht mit einer Studie überein, in der trotz Tetrazyklin-Gabe bei Schweinen keine Veränderungen hinsichtlich der *tet(M)*-Konzentrationen festgestellt werden konnten (Holman et al. 2013). Das liegt jedoch möglicherweise darin begründet, dass in der genannten Studie von Holman et al. (2013) subtherapeutische Dosierungen zum Einsatz kamen, wohingegen sich die in „Tracking“-Betrieb E5 angewandte Medikation sehr wohl im therapeutisch wirksamen Bereich bewegte.

Die für die *tet(A)*-Gehalte in den Faeces der E5-Schweine erstellten Verlaufsdiagramme (s. Abbildung 46) waren in ihrem Muster nahezu konträr zu dem, das sich für *tet(B)* und *tet(M)* ergab: Zwar waren die detektierten Konzentrationen auch hier zu Behandlungsbeginn hoch, jedoch kam es unmittelbar während der ersten vier Tage der Tetrazyklin-Therapie zu einem Absinken der Gen-Gehalte ehe die Werte im Anschluss, also gegen Ende sowie in den Tagen nach der Behandlung, wieder zu steigen begannen. Es besteht die Möglichkeit, dass sich im Laufe der Behandlung die Trägerpopulationen der jeweiligen *tet*-Gene gegenseitig in ihrer Ausprägungsstärke beeinflusst haben: Denkbar ist hier eine Verschiebung zwischen Bakteriengattungen – so ist *tet(M)* häufiger in Gram-positiven Gattungen nachzuweisen – aber auch eine Verschiebung der Genträger innerhalb derselben Gattung oder Spezies, oder

Unterschiede, die auf horizontalem Gentransfer beruhen (Bryan et al. 2004, Schwaiger et al. 2010). Hierbei ist bemerkenswert, dass *tet(A)* und *tet(B)* negativ assoziiert sind (Boerlin et al. 2005). Weshalb es letztlich zu einer anfänglichen Selektion von *tet(B)* auf Kosten von *tet(A)* und einer Umkehr des Prozesses kam, kann in Fitnessvorteilen der *tet(A)*-Träger bzw. der Co-Kodierung von Fitnessfaktoren auf *tet(A)*-Plasmiden begründet liegen; um dies aufzuklären, wären Plasmid-Charakterisierungen vonnöten.

Einmal mehr handelt es sich bei den beschriebenen Beobachtungen um Prozesse, die letztlich auf der selektierenden Wirkung der verabreichten Medikamente beruhen. Dies lässt sich zum einen an den zum Zeitpunkt der Behandlung nachgewiesenen Tetrazyklin-Rückstandskonzentrationen festmachen. Zum anderen fällt auf, dass sich die zeitgleich erhobenen *tet*-Gen-Konzentrationen in den Faeces unbehandelter Kontrollgruppen, also Tieren bei denen kein verabreichtes Antibiotikum Selektionsdruck auf die Mikrobiota im Darm ausübt, nicht nennenswert veränderten (vgl. Abbildung 59).

Die molekularbiologisch bestimmte „Gesamtkeimzahl“ blieb – wie oben bereits kurz angedeutet – unter der Tetrazyklintherapie konstant. Somit kam es also unter Therapie nicht zu einer generellen Hemmung des Bakterienwachstums, sondern lediglich zu Verschiebungen. Nicht unerwähnt bleiben soll an dieser Stelle, dass sich in der Literatur auch Berichte finden lassen, in denen von Schwankungen der Ausprägung von Tetrazyklinresistenz bei Sauen und Ferkeln die Rede ist, die nicht auf den Einsatz von Antibiotika sondern nach Meinung der Autoren vielmehr auf Stress zurückzuführen sind (Kim et al. 2005). Auf diese Weise ließe sich auch erklären, warum es bei den *tet(B)*-Gehalten in den Faecesproben der auf die Tetrazyklin-Behandlung folgenden monatlichen „Status Quo“-Proben zu Abweichungen zwischen den einzelnen Mastdurchgängen kam.

Was die langfristigen Trendanalysen der drei untersuchten Tetrazyklinresistenzgene betrifft, so soll an dieser Stelle zunächst noch einmal kurz erwähnt werden, dass sich die Base-Level, die den jeweiligen Auswertungen zugrunde lagen, aus dem Mittelwert aller gemessenen Konzentrationen der jeweiligen *tet*-Gene an Tag 0 einer Behandlung mit Tetrazykline ergaben. Wie in Abschnitt IV3.1.3 dargelegt, wurde den Schweinen aller beprobten Mastdurchgänge des Betriebs E5 bereits am ersten Lebenstag i.m. Tetrazyklin injiziert; zudem wurde kurz vor dem Absetzen und der damit verbundenen

Umstellung ins Flatdeck oral ein medikiertes Futtermittel dargeboten, das Colistinsulfat und Tetrazyklinhydrochlorid enthielt. Auch wenn die Tiere nach Angaben des Landwirtes und Beobachtungen der beprobenden Personen von dieser Futtermischung unter der Sau noch kaum etwas aufnahmen, wiesen die Faecesproben einiger Schweine in den qPCR-Messungen bereits an Tag 0 recht hohe *tet*-Gen-Gehalte auf. Auch ließ sich bereits vor Behandlungsbeginn Tetrazyklin in den Faeces der Schweine nachweisen (vgl. Abbildung 92). Dies deutet darauf hin, dass der Vorkontakt mit den Antibiotika bereits selektive Prozesse in der Darm-Mikrobiota der Probanden zur Folge hatte. Dementsprechend war das den Trendanalysen zugrunde liegende Base-Level relativ hoch angesetzt, letztlich spiegeln sich aber eben darin die realen Verhältnisse dieses Betriebs wider.

Deutlich geht aus Abbildung 53 hervor, dass es trotz der andauernden Behandlung mit Tetrazyklinen im Laufe weniger Tage zur negativen Selektion der *tet*(B)-tragenden Bakterienpopulation kam, wobei als negative Selektoren Einflüsse verstanden werden, die insgesamt zu einer Attenuation, d. h. einer verzögerten Transkription der DNA in mRNA bei der Proteinbiosynthese, oder zur Elimination der korrespondierenden (Resistenz-)Gene führen (Barkovskii et al. 2012, Madigan et al. 2013). Zwar lagen die *tet*(B)-Gehalte an Tag 2 noch auf Höhe des Base-Levels und damit signifikant über dem zu erwartenden Trend, jedoch waren die Werte an Tag 5 nach Behandlungsbeginn und damit schon gegen Behandlungsende bereits wieder deutlich niedriger angesiedelt. Nachdem sich die gemessenen Konzentrationen nach Ende der Behandlung rasch auf einem im Vergleich zum Base-Level wesentlich niedrigeren Niveau eingependelt hatten, gab es in den Monaten danach keine nennenswerten Veränderungen der *tet*(B)-Gehalte in den Faeces. Letzteres deckt sich mit der Beobachtung, dass insgesamt keine signifikanten Unterschiede in den *tet*(B)-Gehalten von behandelten und unbehandelten Schweinen detektiert werden konnten (vgl. Abbildung 50).

Betrachtet man die Trendanalyse der *tet*(A)-Gehalte aus Betrieb E5 (s. Abbildung 48), so lässt sich erkennen, dass die Gen-Konzentrationen vom Zeitpunkt der Einstellung hinweg in den ersten 100 Tagen langsam absanken und erst dann wieder ansteigen. Was die Ursache dieses Anstieges der *tet*(A)-Gehalte nach ca. 100 Tagen war, bleibt unklar. Neben den oben angesprochenen Aspekten zur Fitness wären auch Veränderungen im Stallregime als Ursache denkbar,

beispielsweise eine Umstellung in den letzten Wochen vor der Schlachtung in Bereiche des Stalles, wo die Tiere vermehrt Kontakt zu potenziell selektierenden Antibiotika hatten. Betrachtet man die absoluten Messwerte der jeweiligen *tet*-Gene für alle in E5 beprobten Schweine, so wurden für *tet(A)* mit einem Median von 8,63 lg copies/g Faeces höhere Gen-Konzentrationen ermittelt als für *tet(B)* (6,34 lg copies/g Faeces). Dies deckt sich mit den bereits angesprochenen Beobachtungen, dass *tet(A)* im Vergleich zu *tet(B)* in aus Schweine-Faeces isolierten Bakterien grundsätzlich das dominantere Resistenzgen zu sein scheint (Lanz et al. 2003). Vor diesem Hintergrund wäre es angesichts der in den Trendanalysen beschriebenen Gen-Konzentrationsverläufe möglich, dass es mittel- bis langfristig zu einer Verschiebung hin zu mehr *tet(A)*-tragenden Bakterien kam (s. oben).

Einzelne Tiere, beispielsweise die Schweine mit den Nummern 16, 41 und 50 in Abbildung 47, wichen im Gen-Verlauf stark von anderen Probanden ab. Infolge der Tatsache, dass bei kranken Tieren oftmals die Futteraufnahme reduziert ist, könnten die genannten Einzeltiere evtl. weniger Antibiotikum aufgenommen haben – dies deckt sich auch mit den zum Teil festgestellten Unterschieden im Gesamt-Tetrazyklin-Gehalt in den Faeces der Schweine. Streuungen der Resistenzgenkonzentrationen insbesondere unter der Behandlung ließen sich aber auch auf Unterschiede im Mikrobiom zurückführen. So könnten aus der Ursprungspopulation andere als die untersuchten Tetrazyklinresistenzgene (vgl. Tabelle 1) selektiert worden sein; denkbar ist auch, dass einzelne Tiere evtl. ein in stärkerem Maß „Selektions-resilientes“ Mikrobiom aufweisen als andere Schweine aus der Gruppe.

Wie schon im Verlaufsdiagramm aus Abbildung 56 ließen sich auch in den Ergebnissen der Trendanalyse an Tag 2 der Therapie mit Tetrazyklinen höhere und dabei über dem Base-Level liegende *tet(M)*-Gehalte ausmachen, als zu Behandlungsbeginn. Dies ist analog zu hohen *tet(B)*-Gehalten zu diesem Zeitpunkt: Dass Bakterienpopulationen bei Kontakt mit Antibiotika prinzipiell oftmals auf zwei verschiedene Resistenzmechanismen zurückgreifen, zeigen Studien von Schwaiger et al. (2009), in denen Tetrazyklin-haltige Gülle positiv selektierend auf *tet(M)*- (ribosomales Schutzprotein) und in derselben Zelle auch *tet(L)*-tragende (Efflux-basiertes System) *Enterococcus faecalis* wirkte. Allerdings erscheint die Kombination aus *tet(M)* und *tet(B)* auf Zellebene

unwahrscheinlich, da ersteres meist in Gram-positiven, letzteres hingegen überwiegend in Gram-negativen Bakterien vorkommt (Bryan et al. 2004, Roberts 2011). Auf Populationsebene ist eine solche Kombination hingegen – gerade aufgrund der unterschiedlichen Träger – als wahrscheinlich anzunehmen.

Im weiteren Verlauf der Behandlung sanken die *tet(M)*-Gehalte leicht ab, und blieben – weiterhin über Base-Level-Niveau – bis ca. 40 Tagen nach Behandlungsende in etwa auf dem gleichen Level, was den Anschein erweckt, als hätte die initiale Therapie auch mittelfristig noch Auswirkungen auf die Populationsstabilität der *tet(M)*-tragenden Bakterien. Erst danach begannen die Konzentrationen etwas stärker abzusinken und kamen ab ca. Tag 130 unter dem Base-Level zu liegen. Wodurch diese Entwicklung bedingt war, bleibt an dieser Stelle offen.

Alles in allem zeigten sich in den Trendanalysen zu Beginn des Beobachtungszeitraums, also in den Tagen rund um die Behandlung mit Tetrazyklinen, Veränderungen in den Gehalten der *tet*-Gene, die sich unmittelbar durch Selektionsprozesse, hervorgerufen durch die applizierten antimikrobiellen Wirkstoffe, erklären lassen. Ob die mittel- bis langfristigen Trendverläufe jedoch auch noch im Zusammenhang mit der anfänglichen Tetrazyklin-Therapie standen, eventuell auf Wirkung des gleichzeitig verabreichten Colistinsulfats beruhten oder ganz andere Einflussfaktoren – in der Literatur wird das selektive Potenzial von Nicht-Antibiotika, z. B. von Schwermetallen wie Zink oder Kupfer, diskutiert (Hölzel et al. 2012) – für etwaige Veränderungen der Gen-Konzentrationen verantwortlich zeichneten, kann abschließend nicht sicher beantwortet werden. Generell sei an dieser Stelle angemerkt, dass es sich bei den Ergebnissen der beschriebenen Trendanalyse nur um die Daten eines exemplarisch ausgewählten und zudem recht hochfrequent Tetrazyklin-einsetzenden Schweinehaltungsbetriebs handelte; da darüber hinaus ein Mangel an wissenschaftlichen Studien besteht, die sich mit Langzeiteffekten von Antibiotikabehandlungen in der Nutztierhaltung auseinandersetzen (Burow et al. 2014), erscheint eine Einordnung der erhobenen Befunde zur Literatur nur schwer möglich.

### Sulfonamidresistenzgene

Generell scheint eine Sulfonamid-Exposition das Risiko der Resistenzentwicklung beim Schwein zu erhöhen (Rosengren et al. 2007). Dazu und auch zu den beschriebenen Ergebnissen für Tetrazyklinresistenzgene gegenläufig konnten beim Vergleich der *sul*(II)-Gehalte aus Faecesproben von Tieren aus Sulfonamid-einsetzenden und nicht-einsetzenden Betrieben keine signifikanten Unterschiede in den beiden Vergleichsgruppen festgestellt werden. Zur Erinnerung: Im „Screening“ waren hingegen signifikant höhere *sul*(II)-Konzentrationen in den wirtschaftseigenen Düngemittelproben einsetzender Betriebe, verglichen zu nicht einsetzenden Betrieben gefunden worden. Was die Personen betrifft, so wurden jedoch in den Proben von Schweinehaltungsbetrieben, in denen im Studienzeitraum keine Sulfonamide zum Einsatz kamen, signifikant höhere Konzentrationen dieses Resistenzgens gemessen, als in den Proben Sulfonamid-einsetzender Betriebe. Hammerum et al. (2006) fanden *sul*(II)-Gene in 14 % der 199 von ihnen untersuchten Indikator-*E. coli*-Isolate gesunder, zuvor nicht mit Sulfonamiden behandelter Personen. Eine andere Studie berichtet von einer Prävalenz von 15 % (n = 76 menschliche Isolate) und damit ähnlichen Zahlen (Wu et al. 2010). Auch britische Forscher benennen *sul*(II) als das in *E. coli* beim Menschen am häufigsten vorkommende Sulfonamidresistenzgen und führen die Tatsache, dass das Gen in England trotz stark rückläufiger Verschreibungsraten von Sulfonamiden weiterhin häufig in klinischen *E. coli*-Isolaten vom Menschen detektiert unter anderem darauf zurück, dass es für Bakterien vermutlich keinen selektiven Nachteil hat, dieses Resistenzgen im Genom zu tragen (Bean et al. 2009). Die genannten Literaturstellen sprechen demnach dafür, dass das Auftreten von *sul*(II) im Menschen nicht unmittelbar an den Einsatz von Sulfonamiden geknüpft sein muss.

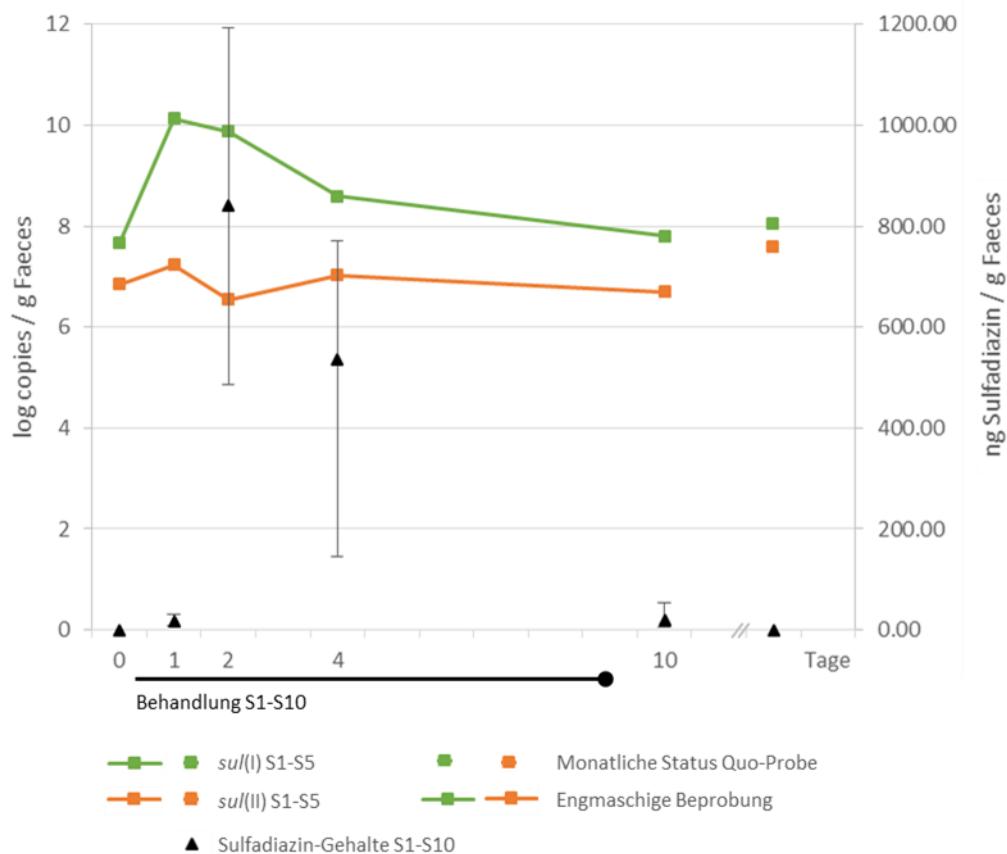
Dass in Betrieben, auf denen regelmäßig Sulfonamide eingesetzt werden, niedrigere *sul*(II)-Gehalte im Stuhl von Personen gemessen wurden, könnte beispielsweise damit zusammenhängen, dass es in solchen Betrieben durch die selektierende Wirkung der angewendeten Antibiotika in den Bakterienpopulationen häufiger zum Austausch von genetischem Material via mobiler genetischer Elemente und damit einhergehend zu Verschiebungen hin zu anderen vorherrschenden Resistenzgenen, beispielsweise *sul*(I), kommt. Dabei spielt einerseits wiederum eine Rolle, dass das ebenfalls Sulfonamidresistenz

vermittelnde Gen *sul*(I) mit Klasse-1-Integrons assoziiert ist, sich oft auf Plasmiden und Transposons wiederfindet und daher häufig in kurzfristige Selektionsprozesse involviert ist (Carattoli 2001, Guerra et al. 2003, Bean et al. 2009). Andererseits befindet sich auch *sul*(II) oftmals auf „Broad host range“-Plasmiden und ist dadurch ebenfalls an den Vorgängen beim Austausch, der Aufnahme und dem Verlust von genetischem Material in Bakterienpopulationen beteiligt (Heuer et al. 2008). Co-selektive Prozesse könnten somit *sul*(II) auch ohne Einsatz von Sulfonamiden selektieren.

Nur im „Tracking“-Betrieb M13 wurden die Schweine im Studienzeitraum tatsächlich selbst mit dieser Wirkstoffklasse behandelt, hier können zudem frühere Behandlungen ausgeschlossen werden, da es sich um einen Betrieb ohne Zukauf handelte. Für die nicht auf Betriebsebene mit Sulfonamid-behandelten Tiere ist wiederum keine Aussage über etwaige Behandlungen im Erzeugerbetrieb möglich. Bei der Unterscheidung zwischen Tieren, die im „Tracking“-Betrieb mit Sulfonamiden therapiert wurden, ergaben sich insgesamt keine signifikanten Unterschiede in den *sul*(II)-Gehalten im Vergleich zu unbehandelten Tieren. Zwar deckt sich dies mit den Ergebnissen von *tet*(B) in Tetrazyklin-behandelten und -unbehandelten Schweinen (auch hier waren die Gehalte der beiden Vergleichsgruppen auf vergleichbarem Niveau), jedoch waren bei *sul*(II) erstaunlicherweise auch die Gehalte von unter der Sulfonamid-Behandlung gezogenen Proben signifikant niedriger als außerhalb der Behandlung ( $p < 0,05$ ; Daten nicht dargestellt). Damit zeigen sich die Ergebnisse nicht nur abweichend von denen der Tetrazyklinresistenzgene, für die gezeigt werden konnte, dass es im Falle von Behandlung mit dem entsprechenden Antibiotikum zu höheren Resistenzgen-Gehalten in der jeweiligen Vergleichsgruppe kommt, sondern weichen auch von den Auswertungen für *sul*(I) ab: Hier nämlich waren die Gehalte in den Faeces von Schweinen während der Behandlung sehr wohl höher als außerhalb der Behandlung (vgl. Abbildung 62).

Aufgrund der beschriebenen Ergebnisse liegt der Verdacht nahe, dass es im Zuge von Behandlungen mit Sulfonamiden zu einer Verschiebung hin zu mehr *sul*(I)-beherbergenden Bakterien unter gleichzeitig negativer Selektion von *sul*(II)-tragenden Populationen kommt. Um etwaige Selektionsprozesse während solch einer Behandlung zu visualisieren, wurden in Abbildung 93 die Verläufe der Gehalte der beiden *sul*-Resistenzgene in den Faeces sowie die mit diesen Proben

ausgeschiedenen Mengen an Sulfadiazin der Tiere S1 bis S10 aus „Tracking“-Betrieb M13 kurz vor, während und nach Sulfadiazin-Therapie dargestellt: Tatsächlich kam es dabei während des ersten Behandlungstages zu einem wesentlich stärker ausgeprägten Anstieg der *sul(I)*-Gehalte als dies für *sul(II)* der Fall war. Die höchsten Ausscheidungsraten von Sulfadiazin wurden an Tag 2 der Behandlung gemessen – zu diesem Zeitpunkt waren die Konzentrationen beider *sul*-Gene bereits wieder rückläufig. An Tag 10, also einen Tag nach Behandlungsende wurden nur noch geringe Mengen des verabreichten Antibiotikums in den Faeces der Tiere nachgewiesen. Die Resistenzgene hatten sich zu diesem Zeitpunkt hinsichtlich ihrer absoluten Konzentration deutlich angenähert, wobei insgesamt jedoch immer noch höhere Gehalte an *sul(I)* gemessen wurden als an *sul(II)*. In der nächsten auf die Behandlung folgenden monatlichen „Status Quo“-Probe kamen die Konzentrationen beide Gene beinahe auf dem gleichen Niveau zu liegen, Sulfadiazin wurde zu diesem Zeitpunkt nicht mehr ausgeschieden.



**Abbildung 93: *sul(I)*-, *sul(II)* sowie Sulfadiazin-Gehalte in den Faecesproben von Schweinen aus dem Betrieb M13; als Betrachtungsgrundlage dient das in Abbildung 43 dargestellte Behandlungsschema**

Insgesamt konnte an diesem Beispiel gezeigt werden, dass es im Laufe einer Sulfonamid-Behandlung tatsächlich zu einer ausgeprägten positiven Selektion der *sul*(I)-tragenden Bakterienpopulation kam. Dies ging – wie schon bei Therapie mit Tetrazyklinen – einher mit einer nahezu gleichbleibenden molekularbiologisch bestimmten „Gesamtkeimzahl“ (Daten nicht dargestellt). Die *sul*(II)-Gehalte befanden sich über den Zeitraum der Behandlung fast durchgehend auf einem ähnlich hohen Level. Dies steht im Einklang mit Ergebnissen von Hammerun et al. (2006) und Lanz et al. (2003), die in ihren Forschungsarbeiten in Sulfonamid-resistenten *E. coli*-Isolaten aus Schweinen jeweils häufiger *sul*(I) als potenziellen Resistenzvermittler fanden als *sul*(II). Jedoch finden sich in der Literatur auch Berichte, die dem widersprechen. So wiesen beispielsweise Heuer et al. (2008) in frischer Gülle von Schweinen, die mit Sulfadiazin behandelt worden waren, höhere Abundanzen für *sul*(II) als für *sul*(I) nach. Da davon auszugehen ist, dass Selektionseffekte auf einzelne Resistenzgene innerhalb der mikrobiellen Gesamtpopulation stark von der ursprünglichen Trägerpopulation abhängen, könnten derartige Abweichungen auf Unterschieden im initialen Mikrobiom basieren.

Zum derzeitigen Zeitpunkt liegen keine unmittelbaren Vergleichsstudien zur quantitativen Bestimmung von *sul*-Genen in Schweinefaeces während und nach Behandlung mit Sulfonamiden vor. Auch handelt es sich – wie schon bei den Untersuchungen zu den Tetrazyklinresistenzgenen – in der vorliegenden Arbeit jeweils um nur auf Betriebsebene repräsentative Ergebnisse einer Kohortenstudie. Aus diesen Gründen kann an dieser Stelle letztlich keine allgemeingültige Aussage über die quantitativen Zusammenhänge zwischen Sulfonamid-Einsatz und den Konzentrationen unterschiedlicher *sul*-Resistenzgene getroffen werden.

### 2.2.2.2 Co-Selektion

Dass Schweine, die auf Ebene der „Tracking“-Betriebe mit Tetrazyklinen behandelt worden waren, nicht automatisch auch höhere Konzentrationen an anderen, nicht gegen das eingesetzte Antibiotikum gerichteten Resistenzgenen – im Fall dieser Arbeit *sul*(II) und *qacE/qacEΔ1* – aufwiesen als Tetrazyklin-unbehandelte Tiere zeigen die Ergebnisse in Abbildung 64 und Abbildung 66. Auch Thames et al. (2012) konnten bei Gruppen von Kälbern, denen über Milch-Austauscher keine oder subtherapeutisch oder therapeutisch dosierte Konzentrationen an Oxytetrazyklinhydrochlorid verabreicht worden waren, keine

Veränderungen hinsichtlich der Gehalte von *sul*-Resistenzgenen nachweisen. Dem gegenüber stehen jedoch Ergebnisse einer ähnlich angelegten Studie, in denen der Einsatz von Milch-Austauscher, der Neomycinsulfat und Tetrazyklinhydrochlorid enthielt, die Selektion von – unter anderem gegen Sulfonamide – resistenten *E. coli* in den Faeces der behandelten Kälber zur Folge hatte (Berge et al. 2006). Weiterhin muss einschränkend hinzugefügt werden, dass in Betrieb E5 gleichzeitig mit Colistinsulfat behandelt wurde, so dass mögliche Interaktionen der beiden Wirkstoffklassen beim Prozess der etwaigen Co-Selektion anderer Resistenzgene nicht ausgeschlossen werden können. Erst kürzlich wurden in der Literatur erstmals Colistinresistenz-codierende mobile genetische Elemente beschrieben, demnach besteht prinzipiell die Möglichkeit der Genkopplung (Liu et al. 2015).

Auch wenn die vorliegenden Ergebnisse nicht auf ein ausgeprägtes co-selektives Potenzial von Tetrazyklinen hindeuten, sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass es im Zuge von direkten oder Co-Selektionsprozessen, hervorgerufen durch jeglichen Einsatz von Antibiotika, immer in einem gewissen Maß zum Austausch von genomischen Material zwischen Bakterienpopulationen via horizontalem Gentransfer kommt, der immer dann besonders stark ausgeprägt ist, wenn die Behandlung mit für die Bakterien nur subletalen Konzentrationen durchgeführt wird (Schuurmans et al. 2014). Daher sollte immer darauf geachtet werden, dass im Zuge von Therapien mit Antibiotika, möglichst ununterbrochen, über den gesamten Behandlungszeitraum ausreichend hohe Wirkstoffkonzentrationen im Patienten erreicht werden (Davies et al. 2010).

Sulfonamide sind hier durch die unmittelbare Kopplung von *sul*(I) und *qacEΔI* auf Integrons potente Co-Selektoren (Carattoli 2001). Deutlich wird dies anhand der Tatsache, dass die *qacE* / *qacEΔI*-Gehalte in Tieren, die selbst mit Sulfonamiden behandelt wurden, im Median signifikant höher angesiedelt waren als die Gehalte unbehandelter Vergleichstiere.

Ein weiterer Punkt, der bei der Auswertung zur Co-Selektion auffiel, waren die bei Tetrazyklin- / Sulfonamid-behandelten Schweinen im Vergleich zum Menschen höheren *qacE* / *qacEΔI*-Gehalte in den Faecesproben. Zumindest für den Zeitraum der Studie kann ausgeschlossen werden, dass die beprobten Personen selbst mit Antibiotika behandelt worden waren. Die stärkere Verbreitung dieser mit horizontalem Gentransfer assoziierten Gene unter den

Schweinen könnte damit zusammenhängen, dass es aufgrund des häufigen Einsatzes von Antibiotika in der Schweinehaltung in der Bakterienpopulation dieser Tierart generell häufiger zum anpassungsbedingten Austausch von Genmaterial und damit verbunden zu höheren *qacE* / *qacEΔI*-Gehalten kommt als bei der menschlichen Darm-Mikrobiota.

Forscher zeigten, dass ein Resistenztransfer zwischen Bakterien-Isolaten aus landwirtschaftlichen Nutztieren und human-assoziierten Bakterien häufiger stattfindet als zwischen tierischen Bakterien und nicht mit dem Menschen in Verbindung gebrachten Bakterienpopulationen der Umwelt. Dies unterstreicht zum einen die enorme Bedeutung, die dem horizontalen Gentransfer bei der Verbreitung von Antibiotikaresistenzen beigemessen wird, und verdeutlicht zum anderen, dass Nutztier-assoziierte Bakterien durch die Weitergabe von Resistenzgenen über mobiler genetischer Elemente – ohne dabei den Menschen direkt zu besiedeln – für klinisch relevante Resistzenzen im Menschen verantwortlich zeichnen können (Smillie et al. 2011).

### **2.2.3 Genotypische Ähnlichkeit der Indikatorspezies *E. coli* zwischen Landwirten, dessen Familienmitgliedern und Schweinen**

#### **2.2.3.1 ERIC-PCR**

Die Untersuchung der aus porcinen und humanen Faecesproben isolierten *E. coli* mittels ERIC-PCR und anschließender Auswertung durch die Software GelCompar® II hatte zum Ziel, in einem schnellen, kostengünstigen und dennoch möglichst sensitiven Verfahren genotypische Ähnlichkeiten dieser Indikator spezies bei verschiedenen Trägern (Schwein / Mensch) aufzudecken. Dies sollte zum einen die Hypothese belegen, dass solche Ähnlichkeiten zwischen Isolaten aus Tier und Mensch tatsächlich vorhanden sind. Zum anderen wurde hyophetisiert, dass die Ähnlichkeiten der *E. coli* des Landwirtes zu Isolaten der Schweine aufgrund der räumlichen Nähe und Kontaktzeit stärker ausgeprägt sind als die der *E. coli* seiner Familienmitglieder respektive enger Kontaktpersonen.

Vergleicht man die Prozentsätze der *E. coli*-Isolate, die sich in den in Abschnitt IV3.3.1 dieser Arbeit aufgeführten Kreisdiagrammen sowohl bei den einzelnen Personen als auch bei den Schweinen wiederfanden, so ergaben sich für

die Betriebe A6, A21 und E5 für den Landwirt höhere Übereinstimmungsraten als für die Kontaktperson. Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Beim Blick auf Betrieb J20 hingegen befanden sich 81 % aller Isolate aus Faeces der Kontaktperson in Clustern, die mit dem Schwein geteilt wurden. Für den Landwirt betrug dieser Wert nur 45 %. Bei genauerer Betrachtung der den letztgenannten Daten zugrundeliegenden Diagramme aus Abbildung 80 und Abbildung 81 fällt jedoch auf, dass der Großteil der Isolate (> 70 %) des Familienmitglieds in das Cluster „J20A“ fiel, vom Schwein hingegen nur 7 %. Beim Vergleich aller geteilten Cluster kommt es dadurch letztlich zu einer verzerrten Darstellung der Ergebnisse kommt, da bei dieser Betrachtungsweise nicht zum Ausdruck kommt, ob die Cluster überwiegend von humanen oder porcinen *E. coli* „gefüllt“ sind – die wahrscheinliche Richtung einer etwaigen Übertragung (hier: Person zu Schwein) wird somit außer Acht gelassen. Aus diesem Grund wurden zur besseren Veranschaulichung und Zusammenfassung der Ergebnisse der jeweiligen Betriebe Säulendiagramme erstellt, in denen die Prävalenz der Hauptcluster der Schweine im Menschen dargestellt ist. Hier zeigte sich, dass in den Betrieben A6, E5 und J20 der Prozentsatz der Human-Isolate, die auch Teil der analysierten Hauptcluster der Schweine waren, beim Landwirt jeweils signifikant höher war als beim Familienmitglied. Nur in Betrieb A21 waren die Verhältnisse umgekehrt: Hier war die Prävalenz Schweine-assoziierter Hauptcluster bei der Kontaktperson höher als beim Landwirt. Dieses Ergebnis relativiert sich jedoch in Anbetracht der Tatsache, dass es sich beim Familienmitglied des Betriebs A21 um den Vater des Landwirtes handelte (vgl. Tabelle 4), dieser bis zu Beginn seiner Rente im selben Betrieb als Schweinehalter fungierte und sich auch nach wie vor in regelmäßigen Abständen im Stall aufhielt. Die *E. coli*-Isolate des Landwirtes in diesem Betrieb wurden zu 93 % dem Cluster „A21I“ zugeordnet – bei allen anderen beprobeden Personen ließ sich eine deutliche höhere Diversität an *E. coli* detektieren. Dieser Sachverhalt könnte Hinweis gebend auf eine etwaige Dysbiose beim Landwirt von A21 sein und als Erklärung dafür dienen, warum in diesem Fall verhältnismäßig wenig Ähnlichkeiten mit den Clustern der Schweine nachgewiesen werden konnten.

Zusammenfassend konnten die durchgeführten Untersuchungen beide eingangs aufgestellten Hypothesen belegen und aufzeigen, dass *E. coli*-Isolate aus Faeces des Landwirtes in signifikantem Maße höhere Übereinstimmung mit Isolaten vom

Schwein aufweisen als *E. coli* von engen Kontaktpersonen. Begründet könnte dies in einem Interspezies-Transfer von Bakterien zwischen Tier und Mensch liegen, der wiederum höchstwahrscheinlich auf direkten und indirekten Kontakt mit fäkalen Ausscheidungen bei der täglichen Arbeit im Stall zurückzuführen ist. Bereits 1976 gelang Levy et al. der Nachweis von aus Hühnern isolierten *E. coli*-Stämmen in den Faeces der menschlichen Kontaktpersonen und auch in den Jahren danach finden sich in der Literatur Berichte über die potenzielle Übertragung von Bakterien vom landwirtschaftlichen Nutztieren auf den Menschen im Allgemeinen bzw. den Landwirt im Speziellen (Levy et al. 1976, Linton et al. 1977, Armand-Lefevre et al. 2005). Heutzutage scheint der Kontakt zu Schweinen eine große Rolle beim Transfer von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* vom Tier auf den Menschen zu spielen (Broens et al. 2012, Dorado-Garcia et al. 2015, Ye et al. 2015). Eindrucksvoll zeigten Marshall et al. (1990) die Dimensionen der Ausbreitung von Bakterien zwischen verschiedenen Sepzies in landwirtschaftlichen Betrieben auf: Resistenz-markierte *E. coli* aus dem Darm von Kindern und Schweinen breiteten sich in Abwesenheit von Selektion durch Antibiotika durch direkten Kontakt auf den Menschen aus; darüber hinaus durch direkten und indirekten – z. B. durch Aerosole bedingten – Kontakt auch auf andere Tiere wie Fliegen oder Mäuse. Dass in derselben Studie festgestellt wurde, dass der Keimaustausch bei offenem Kontakt zu den Tieren stärker ausgeprägt war als bei Isolierungsmaßnahmen (Schutzkleidung und Ähnliches), zeigt, dass die Intensität des Kontaktes eine Rolle bei der *E. coli*-Übertragung spielt und könnte eine Erklärung dafür sein, dass auch in der vorliegenden Arbeit die *E. coli* aus den Faeces der Familienmitglieder den Isolaten der Schweine weniger ähnlich waren als die des Landwirtes. Auch die Isolate aus Faeces der Kontaktpersonen wiesen gewisse Ähnlichkeiten mit *E. coli* der Schweine auf: Das kann einerseits damit begründet werden, dass diese in den meisten Fällen direkt oder indirekt in die Arbeit am Hof eingebunden waren und erscheint andererseits auch in Anbetracht der Tatsache nicht verwunderlich, dass hohe Mengen an Gram-negativen Bakterien in der Umgebungsluft von Schweinehaltungsbetrieben detektiert wurden, die wiederum von Personen aufgenommen werden können (Clark et al. 1983).

Bei der Auswertung der Cluster-Analysen ließ sich freilich auch ein gewisses Maß an Übereinstimmung zwischen *E. coli*-Populationen der Faeces von

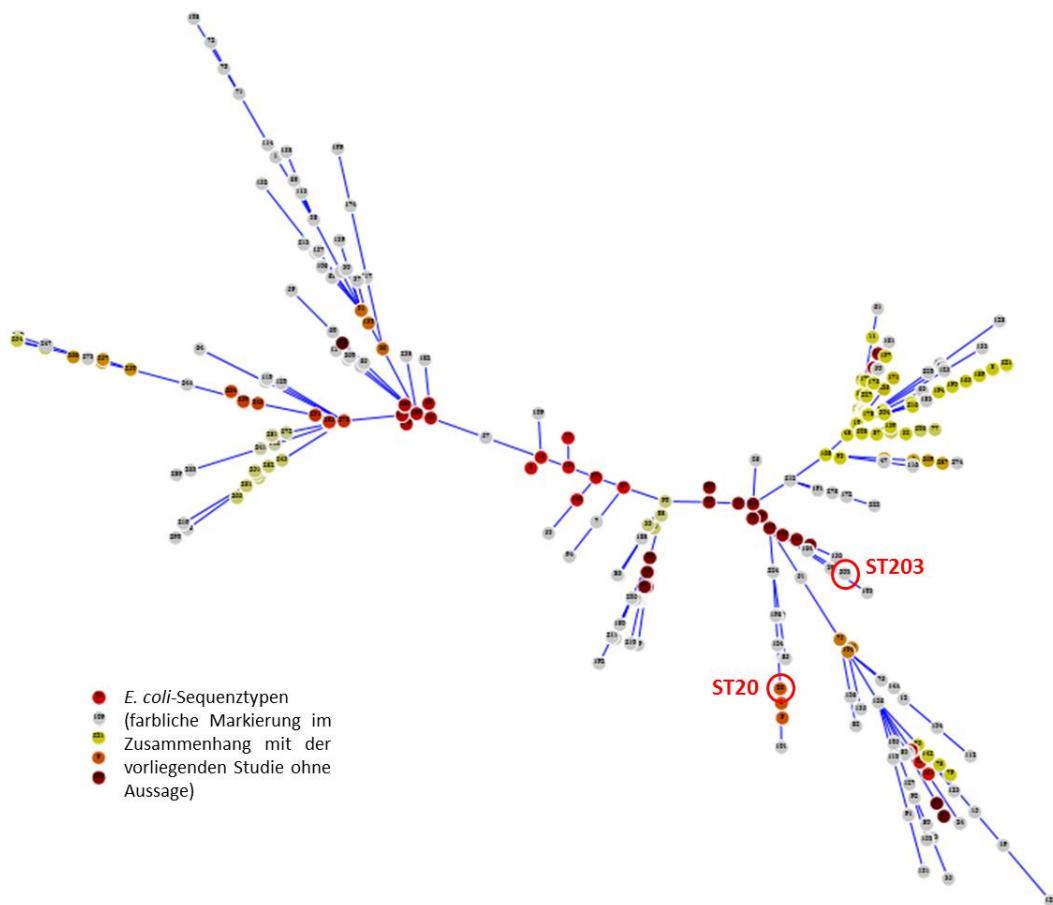
Landwirt und Kontaktperson ausmachen – dies deckt sich mit weltweit durchgeföhrten Beobachtungen, in denen feststellt wurde, dass sich die Struktur der fäkalen Mikrobiota unter Mitgliedern einer Familie stark ähnelt (Yatsunenko et al. 2012).

### 2.2.3.2 MLST-Charakterisierung

Das Durchführen einer MLST-PCR mit anschließender Sequenzierung der Amplikate der *E. coli*-Housekeeping-Gene diente der Spezifizierung der Ergebnisse der ERIC-PCRs und Cluster-Analysen und sollte die Ähnlichkeit dreier ausgewählter Isolat-Paarungen aus den „Tracking“-Betrieben E5 und A6 noch genauer darstellen.

#### Isolat-Paar E5-1

Bei dem aus porcinen Faeces gewonnenen Isolat „E5-07-13-S14 Eco7“ handelte es sich um einen *E. coli*-Stamm des Sequenztyps ST20, Teil des ST20-Komplexes, in dem sich unter anderem EHEC- und EPEC-Stämme finden lassen (Wirth et al. 2006). Für das korrespondierende Human-Isolat „E5-07-13-P2 Eco3“ konnte die MLST-Datenbank anhand des Allel-Profiles keine Übereinstimmung mit einem der hinterlegten Sequenztypen finden – die beiden *E. coli* des untersuchten Paars E5-1 stimmten folglich nicht in ihrem Sequenztyp überein. Der phylogenetische Baum aller in der MLST-Datenbank registrierten Sequenztypen in Abbildung 94 hilft, den Abstand zwischen ST20 und ST203 (der dem Humanisolat am nächsten „verwandte“ ST) zu visualisieren und zeigt, dass die Sequenztypen verhältnismäßig nah beieinander zu liegen kamen.



**Abbildung 94: Lage von ST20 und ST203 des Isolat-Paars E5-1 im phylogenetischen Baum (modifiziert nach <http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli/svg/browser/>)**

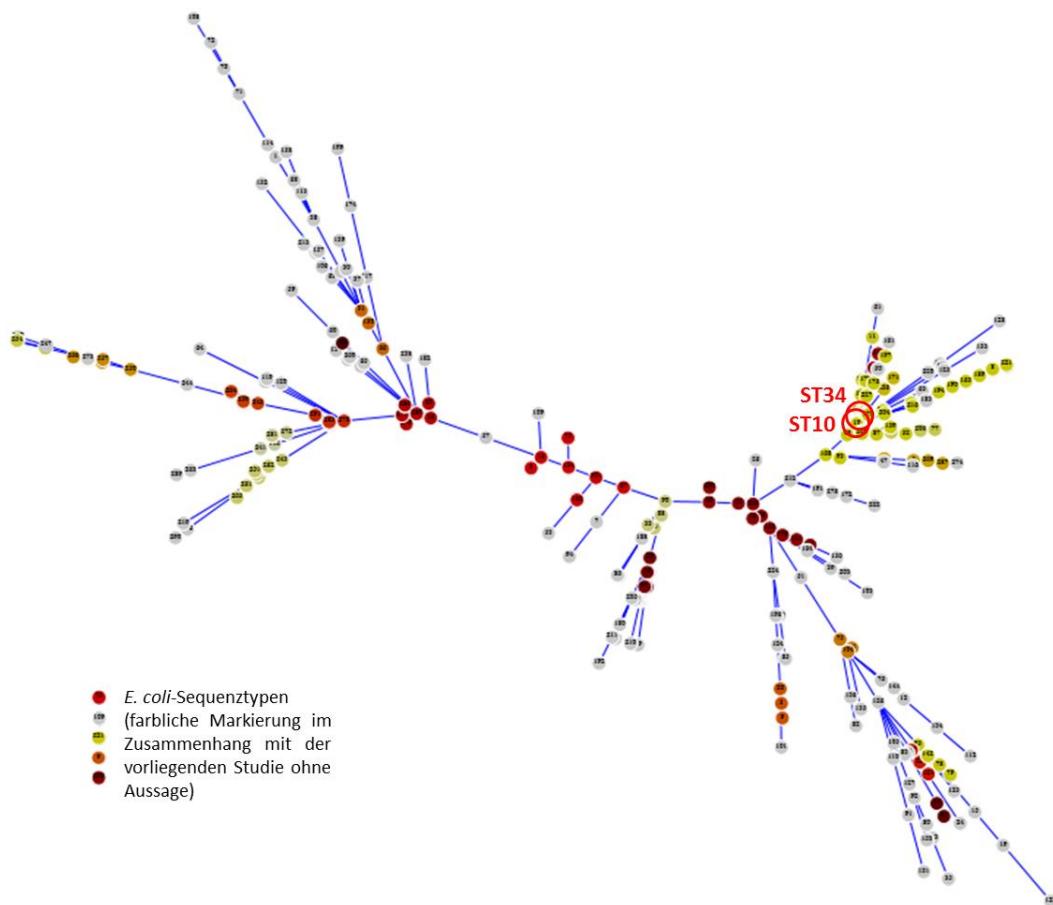
Der Abgleich der verknüpften Nukleotidsequenzen der Housekeeping-Gene der beiden Isolate mittels NCBI BLAST® ergab eine Übereinstimmung in 5600 von 5631 Basenpaaren, das entspricht einem Score von 10227 bits. Nur fünf von über hundert Einträgen mit einer Ähnlichkeit von mehr 99 % in der NCBI Genbank wiesen im Abgleich mit der verknüpften Sequenz des porcinen Isolates „E5-07 13-S14 Eco7“ einen höheren Score auf, wobei der besten Score (10363 bits) mit einer Übereinstimmung in 5621 bp für einen EHEC-Stamm des Serotyps O103:H2 ermittelt wurde (Ogura et al. 2009). Für das korrespondierende Human-Isolat „E5-07-13-P2 Eco3“ zeigten 15 von über 100 zu mehr als 99 % mit dem gesuchten Isolat übereinstimmende Genbank-Einträge höhere Übereinstimmung als der porcine Klon. Der aus den Faeces einer gesunden, adulten Person isolierte *E. coli*-Stamm SE11 (Oshima et al. 2008) war derjenige, der beim BLAST-Abgleich den höchsten Score (10308 bits) und damit die größte Sequenzähnlichkeit – 5610 bp stimmten im Abgleich der verknüpften Sequenzen überein – ergab.

Hinsichtlich ihrer Resistenzeigenschaften unterschieden sich das porcine und das humane *E. coli*-Isolat einzig durch die beim Schweine-Isolat detektierte phänotypische Resistenz gegen Fosfomyin. Weitere phänotypische Resistzenzen konnten ebenso wenig nachgewiesen werden wie die Anwesenheit der in der Studie untersuchten Resistenzgene.

#### Isolat-Paar E5-2

Durch Abgleich mit der MLST-Datenbank konnte dem Human-Isolat „E5-P2-3T5“ der Sequenztyp 10, dem Isolat vom Schwein („E5-11-13-S39 Eco7“) der Sequenztyp 34 zugeordnet werden. Beide Sequenztypen verbindet die Tatsache, dass sie dem ST10-Komplex zugehörig sind. In einer kürzlich veröffentlichten Studie waren die meisten der mittels MLST-PCR untersuchten *E. coli* aus Ferkeln dänischer Intensiv-Schweinemastbetriebe ebenfalls vom Sequenztyp ST10 (Herrero-Fresno et al. 2015). Stämme dieses Sequenztyps werden in der Literatur mit pathogenen *E. coli* assoziiert und wurden auch schon aus Geflügel und von Menschen mit Harnwegsinfektionen und Septitiden isoliert (Giufre et al. 2012, Manges et al. 2012). Auch ST34 wird mit enteroaggregativen *E. coli*-Stämmen in Verbindung gebracht (Roche et al. 2010).

Auch beim zweiten *E. coli*-Paar aus Betrieb E5 handelte es sich zwar nicht um Isolate vom gleichen Sequenztyp, Abbildung 95 verdeutlicht jedoch, wie nah die beiden Isolate in ihrer phylogenetischen Abstammung beieinander liegen.



**Abbildung 95: Lage von ST10 und ST34 des Isolat-Paars E5-2 im phylogenetischen Baum (modifiziert nach <http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli/svg/browser/>)**

Die enorme Ähnlichkeit der beiden Isolate wird durch die Sequenzierungsergebnisse weiter unterstrichen: Die jeweils verknüpften Sequenzen der sieben Housekeeping-Gene ergaben im Abgleich eine Übereinstimmungsrate von 99,9 % und unterschieden sich insgesamt letztlich nur durch nur fünf Basenpaarabweichungen innerhalb des für die Isocitrat / Isopropylmalat-Dehydrogenase kodierenden *icd*-Gens. Ob diese Basenpaarabweichungen auf Mutationen zurückzuführen sind und falls ja, ob diese erst nach einer potenziellen Keimübertragung zwischen Tier und Mensch (oder umgekehrt) zustande gekommen sind, bleibt offen. Johnson et al. (2007) verglichen verschiedene *E. coli*-Stämme miteinander und stellten fest, dass einzig und allein Stämme vom gleichen Sequenztyp eine 100 %ige Sequenzübereinstimmung aufwiesen (Johnson et al. 2007). Dass die beiden untersuchten Isolate trotz hoher Sequenzübereinstimmungen nicht dem gleichen Sequenztyp zugeordnet wurden, liegt demnach darin begründet, dass bereits eine einzige Nukleotidabweichung in der Sequenz der jeweiligen Housekeeping-Gene

ausreicht, damit von der MLST-Datenbank ein anderes Allel-Profil zugewiesen wird. Vor dem Hintergrund, dass im Bericht der extern durchgeföhrten Sequenzierung von einer geringgradig ausgeprägten Primer-Dimer-Überlagerung der *icd*-Sequenzen des Forward-Primers die Rede war, sollte in Betracht gezogen werden, dass die detektierten Basenabweichung eventuell auch durch Leseprobleme bei der Sequenzierung zustande kamen. Dem steht allerdings entgegen, dass zumindest drei der fünf abweichenden Basenpaare in den mittleren Bereichen des amplifizierten Genproduktes positioniert waren.

Ohne konkrete Hinweise auf fehlerhafte Sequenzierung wurde auf eine Wiederholung der Sequenzermittlung ob der Tatsache, dass es sich bei der Fa. Sequiserve um eines der erfahrensten Unternehmen auf diesem Gebiet in Deutschland handelt, bewusst verzichtet.

Hinsichtlich ihrer geno- und phänotypischen Resistenzprofile (vgl. Tabelle 26) unterschieden sich die beiden Isolate des Paares E5-2 sehr deutlich: Während auf Seiten des Human-Isolates keinerlei phänotypischen Resistenzen detektiert wurden, zeigte sich das *E. coli*-Isolat vom Schwein in der Mikrodilution gegen diverse  $\beta$ -Laktam-Antibiotika ebenso resistent wie gegen Sulfonamide und darüber hinaus verminderte Empfindlichkeit gegen das im Betrieb – und auch an diesem Tier – zu Therapiezwecken eingesetzte Tetrazyklin. Für all die beim Schweine-Isolat aufgezählten Resistenzen bieten die mittels Endpunkt-PCR detektierten Resistenzgene eine potenzielle Erklärung. Interessanterweise entspricht das genotypische Resistenzprofil dieses Isolates dem, das Schwaiger et al. (2010) am häufigsten in phänotypisch Tetrazyklin-resistenten *E. coli* aus Schweinegülleproben und klinischen Proben vom Menschen nachweisen konnten (in der genannten Studie wurden jedoch keine  $\beta$ -Laktam-Resistenzgene untersucht). Weiterhin erwähnenswert ist die Tatsache, dass sich sowohl im DNA-Extrakt des Isolat des Landwirtes als auch in dem des Schweins das für ESBL-Enzyme kodierende Resistenzgen *bla*<sub>CTX-M</sub> befand, dieses jedoch offensichtlich nur im Schwein exprimiert wurde. Plasmid-Charakterisierungen der beiden Isolate dauerten zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit an.

Die bei diesem Isolat-Paar gemachten Beobachtungen – ein potenzieller Transfer von Bakterien zwischen Tier und Mensch scheint nicht zwangsläufig auch mit einer dauerhaften Etablierung von (mobilen) Resistenzfaktoren im neuen Wirt verknüpft zu sein – decken sich mit Ergebnissen aus der Literatur, in der

beschrieben ist, dass zwischen *E. coli*-Isolaten von Landwirt und Schwein nur geringe Ähnlichkeiten hinsichtlich der phänotypisch ausgeprägten Resistenzprofile herrschen (Nijsten et al. 1996).

#### Isolat-Paar A6-1

Angesichts einer ermittelten Übereinstimmung der verknüpften Sequenzen der Housekeeping-Gene der beiden *E. coli* von A6 von 99,2 % überrascht, dass dieses Isolat-Paar in keinem der sieben Allel-Typen übereinstimmte. Der Vergleich mit Sequenzen anderer *E. coli* aus der Genbank mittels NCBI BLAST® ergab eine Vielzahl an Einträgen, die jeweils höhere Übereinstimmungs-Scores mit den jeweils verknüpften Sequenzen der beiden Isolate aufwiesen als die im direkten Alignment ermittelten 9823 bits. Dies und die Tatsache, dass es sich bei Housekeeping-Genen ja *per se* um hochkonservierte Regionen im Genom handelt relativiert die vermeintlich hohe Sequenzübereinstimmung von 99,2 %. Infolgedessen kamen auch die beiden mittels MLST-Datenbank ermittelten Sequenztypen – ST1146 beim Schweine- bzw. ST101 beim Human-Isolat – im phylogenetischen Baum so weit voneinander entfernt zu liegen, dass eine graphische Darstellung nicht mehr möglich war. Der dem menschlichen Isolat entsprechende *E. coli*-Sequenztyp 101 wurde in Deutschland in einer Probe klinischen Ursprungs identifiziert, dort interessanterweise in Kombination mit dem gegen ein weites Spektrum an  $\beta$ -Laktam-Antibiotika Resistenz vermittelnden Gen *bla*<sub>NDM-1</sub>, dessen Ursprünge auf dem indischen Subkontinent vermutet werden (Yong et al. 2009, Pfeifer et al. 2011).

Hinsichtlich ihrer Resistenzprofile gab es, vergleichbar mit Isolat-Paar E5-2, keine sonderlich großen Gemeinsamkeiten zwischen *E. coli* vom Landwirt und *E. coli* vom Schwein: Beide zeigten phänotypische Resistenz gegen Ampicillin und Piperacillin, beim porcinen Isolat traten zusätzlich jedoch Resistenzen gegen vier weitere Wirkstoffklassen und eine deutlich größere Palette an Resistenzgenen auf (vgl. Tabelle 26).

Vor dem Hintergrund, dass es sich bei den untersuchten *E. coli* um bereits vorselektierte, in der ERIC-PCR maximal ähnliche Isolate (100 % Übereinstimmung in der GelCompar® II-Auswertung) handelte, ergaben sich bei der MLST-Charakterisierung hohe Übereinstimmungen bezüglich des ermittelten Sequenztyps der ausgewählten Isolat-Paare von Schwein und Mensch; ein

Isolat-Paar erwies sich jedoch als wenig ähnlich in der Sequenztyp-Zuordnung. Die MLST-Charakterisierung stellt alles in allem ein geeignetes Instrument zur Feindifferenzierung der Ergebnisse der ERIC-PCR dar.

#### **2.2.4 Resistenzstatus der *E. coli*-Isolate vom Schwein zum Zeitpunkt der Schlachtung**

Vor dem Hintergrund, dass der Konsum von Fleisch und Fleischprodukten letztlich das Bindeglied zwischen der Schweineproduktion und dem Verbraucher darstellt, wurden die im „Tracking“ verfolgten Sentinel-Tiere zuletzt im Rahmen des Schlachtprozess beprobt. Um Hygiene- und Resistenzstatus der Hals- und Bauchfleischproben zu überprüfen, wurde abermals *E. coli* herangezogen, einerseits aufgrund der Funktion als Indikatororganismus (vgl. Abschnitt II4.2), andererseits weil dieses Bakterium eine wichtige Rolle bei der Aufnahme und Verbreitung von Antibiotikaresistenzen und auch als Krankheitserreger spielt (Schwaiger et al. 2012). Überprüft wurde, ob und in welchem Umfang Fleischproben am Ende des Schlachtprozesses mit *E. coli* belastet sind und wie sich der Resistenzstatus der Isolate zu diesem Zeitpunkt darstellt. Demnach kann durch die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen auch keine Aussage über weitere etwaige Kontaminationen getroffen werden, wie sie beispielsweise im Laufe der weiteren Verarbeitung des Schlachttierkörpers oder auf dem Weg zum Einzelhandel geschehen können (Björkroth et al. 1997).

Von 22,1 % der 244 untersuchten Fleischproben wurden *E. coli* isoliert, wobei sich der prozentuale Anteil mit *E. coli* kontaminierte Fleischstücke an der Schlachtstätte der Schweine der konventionellen Betriebe A6, A21, E5 und M13 auf 24,5 % und der der Fleischproben der ökologisch gehaltenen Schweine auf 11,1 % (J20) bzw. 5,5 % (H18) belief. Schwaiger et al. (2012) bezifferten den Prozentsatz der Bauchfleischproben vom Schwein ( $n = 250$ ), auf denen im Schlachthof unter Verwendung weitestgehend ähnlicher Methodik *E. coli* nachgewiesen werden konnte, mit 72 % wesentlich höher. Dies lässt grundsätzlich darauf schließen, dass es im Rahmen der Schlachtung in unterschiedlichem Ausmaß – dies wiederum könnte schlichtweg mit den unterschiedlichen lokalen Gegebenheiten im Schlachthof zusammenhängen – zu fäkaler Kontamination kommt.

Die Beurteilung des quantitativen Vergleichs zwischen *E. coli*-Isolaten, die auf konventionellen Fleischproben und auf solchen aus ökologischer Herkunft nachgewiesen werden konnten, erscheint an dieser Stelle aus mehreren Gründen wenig zielführend: Zum einen wurden unterschiedlich viele Betriebe der jeweiligen Haltungsart beprobt, zum anderen variierte auch die Anzahl der untersuchten Durchgänge und dementsprechend die Zahl der Fleischproben so stark, dass keine statistisch gültigen Aussagen über Vergleiche zwischen beiden Formen der Schweinehaltung getroffen werden konnten. Dazu kommt, dass die „Tracking“-Schweine an unterschiedlichen Schlachthöfen (s. oben) geschlachtet wurden, so dass letztlich zahlreiche Faktoren, die im Zusammenhang mit dem Ort der Schlachtung stehen und Auswirkungen auf den Hygienestatus der Schlachttierkörper haben können (vgl. Abschnitt 2.2.4.3), im Hinblick auf eine objektive Vergleichsgrundlage außer Acht gelassen werden müssten. Aus den genannten Gründen wurde im weiteren Verlauf der Darstellung auf direkte Vergleiche zwischen Fleisch aus konventioneller bzw. aus ökologischer Erzeugung verzichtet.

#### **2.2.4.1 Phänotypische Resistenz**

Dass – unabhängig davon, ob es sich um Fleischproben am Schlachthof oder um verarbeitete Fleischerzeugnisse handelt – Schweinefleisch mit phänotypisch resistenten *E. coli* belastet sein kann, zeigen zahlreiche Beispiele in der Literatur (Miranda et al. 2008, Van et al. 2008, Geser et al. 2012, Schwaiger et al. 2012). Bereits in den 1960er Jahren beschrieb H. Williams Smith die transiente Besiedlung des menschlichen Verdauungstraktes mit resistenten *E. coli*-Stämmen tierischen Ursprungs nach oraler Aufnahme (Smith 1969). Auch spätere Studien scheinen den Verdacht zu bestätigen, dass die menschliche Mikrobiota durch die orale Aufnahme von keimbelasteten tierischen Lebensmitteln mit resistenten Bakterien in Kontakt kommt (Taylor 1999, Sorensen et al. 2001).

Wie die Untersuchungsergebnisse zeigten, konnte in allen „Tracking“-Betrieben für *E. coli*-Isolate von den am Schlachthof gewonnenen Schweinefleischproben Resistenz gegen klassische Aminopenicilline detektiert werden, wobei bei drei der Betriebe (A6, A21, E5) bereits die  $MHK_{50}$  mit einem Wert von 256 mg/l äußert hoch angesiedelt war. Überraschend ist dies vor allem für Betrieb A21, da dort im Gegensatz zu den anderen konventionellen „Tracking“-Betrieben während des gesamten Beobachtungszeitraums keinerlei  $\beta$ -Laktam-Antibiotika eingesetzt

wurden. Da es sich jedoch um einen Zukauf-Betrieb handelt, wäre eine mögliche Erklärung für die Resistenzen gegen  $\beta$ -Laktame etwaige Behandlungen der Schweine mit dieser Wirkstoffklasse beim Ferkelerzeuger. Dass in Fleischproben von fünf von sechs Betrieben Piperacillin-resistente *E. coli* gefunden wurden, obwohl die Anwendung dieses Wirkstoffes bei Lebensmittel liefernden Tieren nach Verordnung (EU) Nr. 37/2010 nicht erlaubt ist, dürfte mit Kreuz-Resistenz gegen andere  $\beta$ -Laktam-Antibiotika zusammenhängen (Mokaddas et al. 1999, James et al. 2001, VO(EU)\_37 2010).

Auf eine prozentuale Angabe von Resistenz-Prävalenzen gegen die jeweiligen Wirkstoffe wurde im Übrigen bewusst verzichtet, da die Tatsache, dass von den Proben unterschiedliche viele Isolate gewonnen wurden und sich unter diesen identische Klone hätten befinden können, zu einer Verzerrung bei der Darstellung der Ergebnisse der phänotypisch aufgetretenen Resistenzen der *E. coli* vom Fleisch führen muss. Vergleiche mit der Literatur zeigen jedoch, dass  $\beta$ -Laktam-Resistenzen von Fleisch-*E. coli* nichts Ungewöhnliches darstellen: Die derzeit aktuellen DANMAP-Daten beziffern – unter Verwendung derselben Breakpoints – die Prävalenz von Ampicillin-resistenten *E. coli* von dänischem Schweinefleisch auf 26,9 %, die von importiertem Fleisch auf 36,0 % (<http://www.danmap.org><sup>11</sup>, letzter Zugriff am 30.09.2015). Mit 23,2 % lieferten Untersuchungen von Schwaiger et al. (2012) an Schweinefleischproben vom Schlachthof vergleichbare Werte.

Überraschenderweise zeigte sich eines der beiden Fleisch-Isolate vom ökologischen Betrieb J20 in hohem Maße resistent gegen sämtliche getesteten Wirkstoffe aus der Gruppe der Cephalosporine. Der Verdacht liegt nahe, dass dies in Zusammenhang stehen könnte mit einer einmaligen Behandlung eines einzigen anderen Schweins mit Cefquinom, dem derzeit einzigen für Lebensmittel liefernde Tiere zugelassenen Cephalosporin der 4. Generation. Ob dem tatsächlich so ist, sich die Resistenz erst später im Betrieb ausgebildet hat oder der resistente Keim erst im Rahmen des Transportes oder gar während des Schlachtprozesses auf den Tierkörper übergegangen ist, muss an dieser Stelle offen bleiben.

Bei Betrachtung des Wirkstoffes Cefpodoxim-Proxetil und der Kombination

---

<sup>11</sup> <http://www.danmap.org/~media/Projekt%20sites/Danmap/DANMAP%20reports/DANMAP%202013/DANMAP%202013%20web%20annex.ashx>

Cefpodoxim / Clavulansäure ließ sich zudem feststellen, dass sich unter den 198 Isolaten auch drei phänotypische ESBL-Bildner befanden. Als Definition liegt diesem Sachverhalt eine  $\text{MHK} \geq 2 \text{ mg/l}$  für Cefpodoxim bei gleichzeitigem  $\text{MHK}$ -Verhältnis von mindestens 1:8 des gleichen Wirkstoffs in Kombination mit bzw. ohne Clavulansäure zugrunde (Stürenburg et al. 2003). An seine Grenzen stößt dieses Beurteilungsprinzip wenn durch gleichzeitige Expression anderer, nicht durch Clavulansäure inhibierbarer  $\beta$ -Laktamasen (z. B. Plasmid-medierte *ampC*- $\beta$ -Laktamsen oder Carbapenemasen) der ESBL-Phänotyp maskiert wird (Drieux et al. 2008, Roberts et al. 2009). Bei allen drei am Schlachthof nachgewiesenen ESBL-Bildnern handelte es sich um von Bauchfleischstücken isolierte *E. coli* zweier Schweine des „Tracking“-Betriebs A21. Dass es sich bei diesem Befund nicht um einen Einzelfall handelt, zeigen diverse Studien, in denen ESBL-bildende Enterobacteriaceae in rohem Fleisch vom Schlachthof oder aus dem Einzelhandel nachgewiesen wurden, wobei Geflügelfleisch in der Tendenz häufiger belastet zu sein scheint, als Fleisch vom Schwein (Springer et al. 2012, Carmo et al. 2014, Petternel et al. 2014). Ergebnisse einer Studie aus Dänemark zeigen höhere Raten ESBL-bildender *E. coli* in Schweinehaltungsbetrieben, in denen viele Cephalosporine der 3. und 4. Generation eingesetzt werden und lassen zudem den Transfer von ESBL-Gene tragenden Resistenzplasmiden vom Schwein auf den Landwirt vermuten (Hammerum et al. 2014). Die EFSA identifizierte in einem Bericht aus dem Jahr 2011 über die Risiken für Verbraucher, mit ESBL- / *ampC*-bildenden Keimen in Lebensmitteln und Lebensmittel liefernden Tieren in Kontakt zu kommen, die Mensch-zu-Mensch-Übertragung in Krankenhäusern und in der Allgemeinbevölkerung als hauptsächliche Ursache für die Verbreitung dieser Keime (EFSA 2011). Zwar war im gleichen Bericht von steigenden Nachweisraten von ESBL-bildenden *E. coli* in Lebensmittel liefernden Tieren und tierischen Lebensmitteln die Rede, jedoch herrschte zu diesem Zeitpunkt weitestgehend Uneinigkeit hinsichtlich eines potenziellen Hauptreservoirs dieser Bakterien; auch konnten keine konkreten Risikofaktoren benannt werden (EFSA 2011, Sharp et al. 2014). Sharp et. al. (2014) kommen bei der Auswertung aktueller Forschungsarbeiten allerdings zu dem Schluss, dass die überwiegende Mehrzahl der Besiedlungen des Menschen mit ESBL-bildenden *E. coli* nicht über die Tierhaltung und Lebensmittel liefernde Tiere erklärt werden kann.

Die größtenteils detektierte Sensitivität der untersuchten Fleisch-*E. coli* gegen Carbapeneme lässt sich darin begründen, dass kein Wirkstoff dieser Klasse für die Anwendung beim Nutztier zugelassen ist.

Wie bereits unter Abschnitt 1.2 erläutert, sollte bei Betrachtung der Ergebnisse hinsichtlich des Wirkstoffe Doxycyclin und Florfenicol vermieden werden, von „Resistenz“ zu sprechen, da zur Beurteilung kein definierter Breakpoint sondern ein epidemiologischer Cut-off herangezogen wurde. Florfenicol, in der Schweinehaltung eingesetzt zur Behandlung von akuten respiratorischen Erkrankungen, hervorgerufen durch *Acinetobacillus pleuropneumoniae* und *Pasteurella multocida* (Ueda et al. 1995), wurde nur in Betrieb A6 verwendet – nicht jedoch an Studientieren. Erstaunlicherweise wiesen Fleisch-Isolate dieses Betriebs im Vergleich mit den anderen Schweinehaltungen trotzdem die niedrigste MHK<sub>90</sub> auf. In Isolaten aus E5 wurde die höchste Doxycyclin-MHK<sub>50</sub> aller „Tracking“-Betriebe detektiert, was höchstwahrscheinlich auf den äußerst frequenten Einsatz von Tetrazyklinen in diesem Betrieb zurückzuführen ist.

Letztlich bleibt festzuhalten, dass betriebsübergreifend in von Fleischproben isolierten *E. coli* Resistenz bzw. verminderte Empfindlichkeit gegen fast alle der untersuchten Wirkstoffe in Erscheinung trat. Vor dem Hintergrund der zu Beginn dieses Abschnittes thematisierten Gefahr, dass antibiotikaresistente Keime mit der Nahrung auf den Menschen transferiert werden können, lässt sich schlussfolgern, dass vom Verzehr von rohem, mit (resistenten) *E. coli* kontaminiertem Fleisch ein Gesundheitsrisiko für den Verbraucher ausgeht. Minimieren lässt sich diese Gefahr durch vergleichsweise simple Maßnahmen: So tragen ordnungsgemäße Hygiene bei der Gewinnung, Lagerung und Zubereitung solcher Lebensmittel ebenso zur Keimminimierung bzw. -eliminierung bei wie eine ausreichend lange Erhitzung bei entsprechend hohen Temperaturen (Van et al. 2008).

#### 2.2.4.2 Genotypische Resistenz

Die für diese Arbeit ausgewählten Resistenzgene sollten Tetrazykline, Sulfonamide und Streptomycin abdecken, da diese sowohl in Human- als auch Veterinärmedizin häufig zum Einsatz kommen, was zu einem höheren Risiko der Resistenzentwicklung führt (Schwaiger et al. 2010). Auch wurde in Studien aus Großbritannien gezeigt, dass solche Resistenzgene am Schlachthof häufig in aus Nutztieren isolierten *E. coli* nachgewiesen werden (Enne et al. 2008). Mit dem

Nachweis von *bla*<sub>CTX-M</sub> wurde zudem dem gehäuften Auftreten ESBL-bildender Keime bei Tieren und Lebensmitteln Rechnung getragen. Ausdrücklich sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass sich anhand der vorliegenden Ergebnisse keine allgemeingültigen Rückschlüsse über das Resistenzspektrum der untersuchten *E. coli*-Isolate aus Fleischproben ziehen lassen, da über die ausgewählten Resistenzgene hinaus auch zahlreiche weitere Gene Resistenz gegen die entsprechenden Antibiotika vermitteln können – als konkretes Beispiel sei auf die Vielzahl existierender *tet*-Gene verwiesen (vgl. Tabelle 1).

Im Zusammenhang mit einer potenziellen Gesundheitsgefährdung beim Verzehr von keimbelasteten tierischen Lebensmitteln wird in den meisten Fällen zuerst an den Transfer von pathogenen Zoonose-Erregern oder resistenter Bakterien auf den Menschen gedacht. Unterschätzt wird hingegen, dass saprophytische Mikroorganismen aus dem Darm von landwirtschaftlichen Nutztieren ein enormes Reservoir an Antibiotikaresistenzgenen beherbergen (Garofalo et al. 2007). Auch bei Einhaltung hygienischer Standards kann es vorkommen, dass solche Bakterien rohes Fleisch kontaminieren, weswegen die Gefahr besteht, dass im Falle des Verzehrs von solch keimbelastetem rohem Fleisch Resistenzgene zwischen tierischen und menschlichen Bakterien transferiert werden könnten (van den Bogaard et al. 2000, Garofalo et al. 2007). Unklar erscheint, ob der Eintrag von Antibiotikaresistenzgenen bzw. antibiotikaresistenten Bakterien direkt bei der Schlachtung oder aber in den nachgeschalteten Prozessen der Produktionskette höher ist (Schwaiger et al. 2012). Über Letztgenannte kann im Fall der vorliegenden Arbeit keine Aussage mehr getroffen werden, da die Verfolgung der Sentinel-Tiere mit der Beprobung der Schlachttierkörper endete.

Zwar hat der bloße Nachweis eines Resistenzgens nicht automatisch zur Folge, dass das Gen vom Bakterium auch phänotypisch exprimiert wird, doch vor dem eben erläuterten Hintergrund eines potenziellen Resistenzgentransfers auf die humane Mikrobiota erscheint die Tatsache, dass – unter Einbeziehung potenziell klonaler Isolate vom selben Fleischstück – in mehr als drei Viertel der untersuchten Fleisch-*E. coli* mindestens eines der untersuchten Antibiotikaresistenzgene detektiert werden konnte, dennoch bemerkenswert.

Betriebsübergreifend war in den untersuchten Fleischproben die Prävalenz *tet*(A)-positiver *E. coli* höher als die *tet*(B)-beherbergender. Dies erscheint nicht weiter verwunderlich, da bereits gezeigt wurde, dass das erstgenannte Gen häufiger in

Isolaten porcinen Ursprungs auftritt als *tet*(B) (Lanz et al. 2003, Schwaiger et al. 2010). Auch Studien-Ergebnisse aus Vietnam ergaben, dass in *E. coli* aus Fleischproben verschiedener Tierarten, darunter auch Schweinefleisch, *tet*(A) häufiger in Erscheinung tritt als *tet*(B) (Van et al. 2008). Des Weiteren stehen höhere *tet*(A)-Prävalenzen im Einklang mit den im „Tracking“-Teil über Betriebsgrenzen hinweg detektierten höheren Faeces-Gehalten an *tet*(A) als an *tet*(B). Bezüglich der untersuchten Sulfonamidresistenzgene wurde *sul*(II) in 7,8 % der Fleischproben nachgewiesen, *sul*(I) hingegen nur in 4,5 % der Fälle. Dies deckt sich in der Tendenz mit anderen Studien, in denen in rohem Schweinefleisch ebenfalls häufiger *sul*(II) als *sul*(I) detektiert werden konnte – allerdings handelte es sich dabei um Fleischproben aus dem Einzelhandel und nicht wie im Falle der vorliegenden Arbeit um Proben, die direkt am Schlachthof gewonnen wurden (Hammerum et al. 2006). Auch unter phänotypisch Sulfonamid-resistant getesteten *E. coli* aus während des Schlachtprozesses gewonnenen Rektum-Kotproben wurde *sul*(II) häufiger identifiziert als *sul*(I) (Ramos et al. 2013). *str*(A) trat öfter in Erscheinung als *str*(B). Dies ist bemerkenswert, da diese beiden Gene für gewöhnlich nur gemeinsam eine funktionale Resistenz gegenüber Streptomycin vermitteln können (Chiou et al. 1995). Gemeinsam traten *str*(A) und *str*(B) in 40 der 198 vom Fleisch isolierten *E. coli* auf (Daten nicht dargestellt).

Während in der vorliegenden Arbeit im Sinne einer möglichst breiten Erfassung der entsprechenden Gene Primer verwendet wurden, die für konservierte Regionen von *bla*<sub>CTX-M</sub> kodieren, werden in den meisten anderen Studien mehrere Primer-Paare verwendet, die spezielle Varianten dieses Gens amplifizieren. Dass sich in den DNA-Extrakten der vom Fleisch isolierten *E. coli* grundsätzlich *bla*<sub>CTX-M</sub> detektieren ließ überrascht kaum, bereits anderen Forschern gelang der Nachweis verschiedener solcher Gene ESBL-bildender *E. coli* aus rohem Schweinefleisch – unabhängig davon ob die Proben am Schlachthof oder aus dem Einzelhandel gewonnen worden waren (Springer et al. 2012, Wasinski et al. 2013, Egervarn et al. 2014). Meist handelt es sich bei den detektierten Genen um solche der CTX-M-1-Gruppe (Agersø et al. 2012, Geser et al. 2012). Bereits erwähnt wurde, dass Schweinefleisch im direkten Vergleich mit Geflügelfleisch seltener mit ESBL-Bildnern respektive den jeweiligen Resistenzgenen belastet zu sein scheint (Agersø et al. 2012).

Die Tatsache, dass der Nachweis von *bla<sub>CTX-M</sub>* in vom Fleisch isolierten *E. coli* deutlich häufiger gelang als der eines ESBL-Phänotyps liegt aller Wahrscheinlichkeit nach in einer Maskierung des ESBL-Phänotyps (z. B. durch Plasmid-medierte *ampC*- $\beta$ -Laktamsen) begründet, wie in den Ausführungen zur phänotypischen Resistenz näher dargestellt wurde (vgl. oben).

In der Literatur finden sich bereits Berichte über *qacEΔ1* in *E. coli*, die aus Fleischproben aus dem Einzelhandel isoliert wurden (Zou et al. 2014). Wertet man Isolate, die sowohl *sul(I)* als auch *qacEΔ1* beherbergten, als positiv für Klasse-1-Integrons (vgl. Abschnitt II1.3.2.2), so traten solche Integrons in 8,1 % der 198 Fleisch-*E. coli* auf (Daten nicht dargestellt). In Anbetracht der Tatsache, dass diese Integrons viele Antibiotikaresistenzgene sammeln, erscheint diese Zahl bemerkenswert, da durch Plasmide und Transposons eine Übertragung auf andere Bakterien stattfinden kann (Recchia et al. 1995, Carattoli 2001, Partridge et al. 2009, Carattoli 2013). Beispiele aus der Literatur belegen, dass nach oraler Aufnahme resistenter Keime über Schweinefleisch diese Bakterien nicht nur die Magen-Darm-Passage überleben, sondern auch bis zu 14 Tage nach Ingestion im Stuhl nachweisbar sind (Sorensen et al. 2001, Enne et al. 2008). In Anbetracht dieser Tatsache erscheint es durchaus wahrscheinlich, dass es im Darm betroffener Personen zum Austausch mobiler genetischer Elemente und damit einhergehend zur Weitergabe und Verbreitung von Resistenzgenen in Bakterienpopulationen kommt. Dabei steht der Transfer von Resistenzgenen auf obligat pathogene Bakterien und Zoonose-Erreger eher im Hintergrund. Ein viel höheres Gesundheitsrisiko für den Menschen dürfte von fakultativ pathogenen Erregern wie beispielsweise *E. coli* ausgehen, da diese ohnehin bereits Teil der Mikrobiota sind, sich nach Erlangung von Resistenzgenen jedoch vermehrt im Darm ansammeln und bei Gelegenheit opportunistische Infektionen auslösen könnten, die infolge der Resistenz gegen Antibiotika nicht mehr gut therapierbar wären.

#### 2.2.4.3 Rückverfolgung resistenter Isolate zum Betrieb

Durch die Rückverfolgung resistenter Schlacht-*E. coli* sollte unterschieden werden, ob die Tiere resistente Isolate schon auf dem „Tracking“-Betrieb in sich trugen, oder ob sich der Resistenzeintrag ins Tier bzw. auf den Schlachtkörper vielmehr erst während des Transportes oder am Ort der Schlachtung zutrug. In Anbetracht der Tatsache, dass der Grundstein für die Entwicklung der Mikrobiota

im Schwein bereits in den ersten Lebenswochen gelegt wird kann selbstverständlich nie ausgeschlossen werden, dass *E. coli*-Isolate aus zukaufenden Betrieben ihren Ursprung bereits im Erzeugerbetrieb hatten (Konstantinov et al. 2006).

Tatsächlich konnte für sechs exemplarisch ausgewählte Isolat-Paare der „Tracking“-Betriebe E5 und A6 gezeigt werden, dass einzelne Tiere schon auf Betriebsebene *E. coli* mit zum Teil durchaus hohen Übereinstimmungen im phänotypischen Resistenzmuster zum jeweiligen Schlacht-Pendant aufwiesen. Dass es sich bei den für diesen Vergleich ausgewählten Isolaten jedoch tatsächlich um dieselben Stämme handelte, erscheint angesichts der Tatsache, dass bei keinem der *E. coli*-Paare eine 100 %ige Übereinstimmung im phäno- und genotypischen Resistenzprofil detektiert werden konnte, fraglich. So erwies sich beispielsweise ein während einer Antibiotika-Behandlung gewonnenes Isolat von Schwein Nr. 1 aus Betrieb A6 hinsichtlich des genotypischen Resistenzprofils zwar als identisch mit einem Halsfleisch-Isolat desselben Tieres; jedoch wurden zu den beiden Beprobungszeitpunkten zum Teil Abweichungen der phänotypisch erfassten Resistenzen der genannten Isolate ermittelt. Begründet könnte dies darin liegen, dass es im Zeitraum zwischen der Gewinnung der Isolate (Juli bis Oktober 2013) zu Anpassungsreaktionen des Stammes kam, die durch unterschiedliche Umweltbedingungen zu den jeweiligen Beprobungszeitpunkten hervorgerufen wurden. So ließe sich die im Juli detektierte phänotypische Resistenz durch den während der Colistin-Behandlung des Tieres vorherrschenden Selektionsdruck des Antibiotikums erklären. Hingegen war das Bakterium in den drei Monaten danach nicht mehr in unmittelbarem Kontakt mit dem Wirkstoff, so dass die Resistenz verloren gegangen sein könnte. Unterstützt wird diese Theorie von Literaturberichten, in denen die Reversibilität von Colistin-Resistenz beschrieben wird, wenn das Antibiotikum abgesetzt wird (Falagas et al. 2005, Li et al. 2006, Kempf et al. 2013). Colistin kommt in der Schweinehaltung sehr häufig zum Einsatz, gilt gleichzeitig aber auch als „Reserve“-Antibiotikum in der Humanmedizin und findet dort Anwendung bei der Behandlung von Infektionen mit multiresistenten *Pseudomonas aeruginosa* (Conway et al. 2003, Kempf et al. 2013).

Letztlich kann an dieser Stelle kein endgültiger Beweis erbracht werden, dass die Quelle der im Schlachthof detektierten resistenten Fleisch-*E. coli* wirklich der

jeweilige „Tracking“-Betrieb war. Zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit wurde damit begonnen, die rückverfolgten Isolate der MLST-Untersuchung zu unterziehen, auch dauerte die Plasmid-Charakterisierung dieser *E. coli* noch an – beides soll diesbezüglich weitere Erkenntnisse liefern. Ein Eintrag aus dem Herkunftsbetrieb scheint angesichts der Tatsache, dass alles in allem Ähnlichkeiten in den Resistenzmustern von *E. coli*-Isolaten von Tieren auf Betriebsebene und im Schlachthof auftraten, möglich. Dennoch sollte daran gedacht werden, dass das Auftreten resistenter Keime auf dem Schlachtkörper auch auf Vorgänge zurückzuführen sein könnte, die nicht unmittelbar mit dem Herkunfts- respektive Erzeugerbetrieb assoziiert sind: So zeigten Studien, dass der Kontakt der Schweine mit dem vor Ort etablierten Bakterien-Spektrum oder den Mikrobiota anderer, zuvor dort eingestallter Tiere, während der kurzzeitigen Aufstallung der Schweine in den Wartebuchten des Schlachthofes eine mögliche Kontaminationsquelle hinsichtlich der Besiedlung resistenter Keime des Tierkörpers darstellt (Wu et al. 2009, Kich et al. 2011). Ebenso sollte an unzureichende Hygiene während des Schlachtprozesses gedacht werden.

## VI SCHLUSSFOLGERUNGEN

- 1) Wirtschaftseigene Düngemittel konventioneller wie ökologischer bayerischer Schweinehaltungsbetriebe enthielten die untersuchten Resistenzgene *tet*(A), *tet*(B), *tet*(M), *sul*(II) sowie *qacE* / *qacEΔ1* in teils erheblicher Konzentration (bis zu einem Mittelwert von 8,45 lg copies *tet*(M)/g Gülle). Dabei stellte sich ein Zusammenhang zwischen dem Einsatz bestimmter Antibiotika und der Quantität an Antibiotikaresistenzgenen in den Ausscheidungen der Schweine dar: Proben aus Betrieben, in denen regelmäßig Tetrazykline bzw. Sulfonamide zum Einsatz kamen, wiesen signifikant höhere *tet*(A)- und *tet*(M)- bzw. *sul*(II)-Abundanzen auf als Proben von Betrieben, in denen diese Antibiotika nicht eingesetzt wurden.
- 2) Antibiotika-Behandlungen bedingten quantitative Veränderungen in den Konzentrationen korrespondierender Resistenzgene in den Faeces von Schweinen: Neben signifikant höheren *tet*(A)- und *tet*(M)-Gehalten in Tetrazyklin-behandelten Schweinen im Vergleich zu unbehandelten Tieren waren auch die *sul*(I)-Konzentrationen in Faecesproben von Schweinen während einer Behandlung mit Sulfonamiden signifikant höher als außerhalb der Behandlung. Unmittelbar zu Beginn einer Tetrazyklin-Therapie stiegen durch die selektierende Wirkung des Antibiotikums die fäkalen *tet*(B)- und *tet*(M)-Konzentrationen in Schweinen merklich an – parallel dazu sanken jedoch die *tet*(A)-Gehalte. Dies verdeutlicht, dass sich ein und derselbe Selektor offensichtlich unterschiedlich auswirkt auf die Ausbreitung von Resistenzgenen in Bakterienpopulationen.
- 3) Wie Trendanalysen der Gene *tet*(A) und *tet*(M) zeigten, ergeben sich auch mittel- bis langfristig noch Veränderungen von Resistenzgen-Gehalten in Schweinefaeces. Womöglich spielen co-selektive Prozesse eine bislang unterschätzte Rolle beim Resistenzgeschehen in Schweinehaltungsbetrieben. Insbesondere die *tet*(M)-Gehalte sanken nur sehr langsam unter das – ohnehin hohe – Ausgangsniveau ab; dies unterstreicht, dass Langzeitbeobachtungen zur Auswirkung des Antibiotikaeinsatzes wichtige, bislang kaum vorhandene Informationen zur Risikobewertung liefern.

- 4) Das Risiko einer Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen auf Personen aus landwirtschaftlichen Betrieben muss sich nicht primär aus einer Übertragung antibiotikaresistenter Bakterien vom Tier ergeben. Die Ergebnisse der molekularbiologischen Verwandtschaftsanalysen deuten zwar darauf hin, dass es zu einem Transfer von *E. coli* zwischen Schwein und Landwirt kommt. Dies geht jedoch nicht zwingend mit einer dauerhaften Etablierung der (mobilen) Resistenzgene im neuen Wirt einher.

Bemerkenswert erscheint, dass bei Personen, die auf Schweinehaltungsbetrieben leben, in denen regelmäßig Tetrazykline eingesetzt werden, signifikant höhere *tet(B)*- und *tet(M)*-Gehalte in den Faeces detektiert wurden als in Proben von Personen auf Betrieben, die keine Tetrazykline einsetzen. Dies legt die Vermutung nahe, dass der direkte und indirekte Kontakt zu den antibiotischen Wirkstoffen selbst größeren selektiven Einfluss auf den Resistenzstatus im Mikrobiom des Menschen nimmt als der Kontakt mit antibiotikaresistenten Bakterien.

- 5) Am Schlachthof wurden antibiotikaresistente *E. coli* auf rohem Fleisch der beobachteten Schweine detektiert. Die entsprechenden Antibiotikaresistenzen konnten auch im Herkunftsbetrieb nachgewiesen werden, obwohl eine etwaige Antibiotikabehandlung der Tiere zum Zeitpunkt der Schlachtung mehrere Monate zurück lag. Dies unterstreicht, dass „Wartezeit“-Regelungen – die darauf abzielen, eine Verbrauchergefährdung durch Antibiotikarückstände zu unterbinden – nicht geeignet sind, den Verbraucher auch vor einer Aufnahme resistenter Keime zu schützen. Die sorgfältige Beachtung von hygienischen Grundregeln im Umgang mit tierischen Lebensmitteln ist von elementarer Bedeutung, da hierdurch das Risiko sowohl einer Infektion als auch einer Kolonisierung durch resistente Bakterien weitgehend reduziert wird.

## VII ZUSAMMENFASSUNG

Über den Einsatz von Antibiotika in der landwirtschaftlichen Nutztierhaltung wird lebhaft debattiert, er soll die Resistenzentwicklung sowie die Ausbreitung von resistenten Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen begünstigen. Während sich Forschungsprojekte bisher vorwiegend mit der Erfassung und Auswertung von Verbrauchsmengen und getrennt davon dem Monitoring von Resistzenzen befassten, sollten in der vorliegenden Arbeit unter Berücksichtigung der Haltungsumwelt (konventionell vs. ökologisch) diese Aspekte miteinander verknüpft werden. Ziel war es, in einem bayernweiten „Screening“ zu eruieren, inwiefern der Einsatz von Antibiotika in 58 Schweinehaltungsbetrieben in Zusammenhang mit einem Eintrag von Antibiotikaresistenzgenen in die Umwelt steht. Darüber hinaus wurden Schweine, Landwirte und Kontaktpersonen sechs exemplarisch ausgewählter „Tracking“-Betriebe unter Praxisbedingungen – teils über den gesamten Lebenszeitraum der Tiere bis hin zur Schlachtung – beprobt, um möglichst engmaschig und langfristig Daten zur jeweiligen Resistenzsituation zu erfassen. Des Weiteren wurde die Übertragung von (resistenten) *E. coli* zwischen Schwein und Landwirt bzw. Familienmitgliedern untersucht.

Mittels quantitativer PCR konnte gezeigt werden, dass verschiedene Tetrazyklin- und Sulfonamidresistenzgene ebenso in Ausscheidungen bayerischer Schweine beider untersuchten Haltungsformen vorhanden sind wie Gene, die potenzielle Multiresistenz-Elemente (Integrons) kennzeichnen. Die höchsten Konzentrationen wurden für *tet(M)* gefunden, die Durchschnittswerte betrugen 8,45 lg copies/g Gülle. Dies ist insofern bemerkenswert, da es bei Ausbringung solcher wirtschaftseigener Düngemittel auf landwirtschaftliche Nutzflächen zum Eintrag dieser Gene in die Umwelt kommt. Für die Gene *tet(A)*, *tet(M)* und *qacE* / *qacEΔ1* ließen sich in Gülleproben konventionell wirtschaftender Schweinehaltungen signifikant höhere relative Abundanzen ermitteln als in den Jauche- und Festmistproben der ökologischen Betriebe – für *sul(II)* war dies gegenläufig. Der Einsatz von Tetrazyklinen führte zu höheren *tet(A)*- und *tet(M)*-Gehalten, wobei ohne den Einsatz von Tetrazyklinen in konventionellen Betrieben höhere „Basis-Level“ dieser Gene detektiert wurden als in ökologischen. Zudem waren in Gülle- und Jaucheproben von Betrieben, in denen Sulfonamide angewendet wurden, die *sul(II)*-Gehalte signifikant erhöht im Vergleich zu nicht anwendenden Betrieben.

Quantitative PCR-Ergebnisse verdeutlichen, dass die Anwendung von Antibiotika selektiven Einfluss auf die Konzentrationen korrespondierender Resistenzgene nimmt: Einhergehend mit zunehmenden Rückständen des Wirkstoffes stiegen die *tet*(B)- und *tet*(M)-Gehalte in den Faeces von Schweinen zu Beginn von Behandlungen mit Tetrazyklinen deutlich an, Ähnliches ließ sich für *sul*(I) während Sulfonamid-Behandlung beobachten. Auch wurden für die beiden genannten *tet*-Gene in den Stuhlproben von Personen aus Betrieben, in denen regelmäßig Tetrazykline eingesetzt werden, signifikant höhere Gehalte ermittelt als in humanen Proben von Betrieben, die keine Tetrazykline einsetzten. Auch die *tet*(A)-Gehalte in Schweinefaeces unterschieden sich in diesen Betrieben signifikant, wobei die höheren Gehalte ebenfalls in Tetrazyklin-einsetzenden Betrieben gefunden wurden; jedoch entwickelten sich die Konzentrationen dieses Gens unmittelbar während der Behandlung gegenläufig zu *tet*(B) und *tet*(M).

Mittels „Molecular typing“ (ERIC-PCR) konnte gezeigt werden, dass Isolate des Indikatororganismus *E. coli* vom Landwirt den *E. coli* vom Schwein signifikant ähnlicher sind als die der Kontaktpersonen. Dies kann als Hinweis darauf gedeutet werden, dass es durch direkten und / oder indirekten Kontakt zum Transfer von Bakterien zwischen Tier und Mensch kommt. Phäno- und genotypische Resistenz-Untersuchungen ausgewählter Isolat-Paare von Schwein und Landwirt ergaben jedoch grundlegende Unterschiede im Resistenzprofil – eine Übertragung von *E. coli* scheint demnach nicht zwingend mit einer dauerhaften Etablierung der (mobilen) Resistenzgene im neuen Wirt einherzugehen. Weiterführende Untersuchungen mit einem Fokus auf Plasmid-Charakterisierungen versprechen diesbezüglich weitere Erkenntnisse zu liefern.

Im Sinne einer Risikoabschätzung für den Verbraucher wurden am Schlachthof Fleischproben der „Tracking“-Schweine auf die Anwesenheit von *E. coli* untersucht: In 22,1 % der 244 Proben wurde diese Bakterienart nachgewiesen, darüber hinaus wurden phäno- und genotypische Resistenzen detektiert. Die Rückverfolgung resistenter Isolate lässt vermuten, dass der Resistenzeintrag bereits im Herkunftsbetrieb erfolgte, Kontaminationen im Laufe des weiteren Produktionsprozesses können jedoch nie gänzlich ausgeschlossen werden. Unabhängig davon kann mit resistenten Keimen besiedeltes rohes Fleisch z. B. für immunsupprimierte Personen und bei Nichtbeachtung hygienischer Grundregeln im Umgang mit tierischen Lebensmitteln ein Gesundheitsrisiko bergen.

## VIII SUMMARY

Livestock farming is said to play an important role in the evolution and spread of antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes. Up to now research has focused mainly on recording and analyzing antibiotic consumption rates and apart from that has dealt with the monitoring of antibiotic resistance. In contrast, the present thesis intends to combine those different aspects considering the management system of the animals (conventional vs. organic). In order to estimate the burden on the environment, the “screening“ part of this study aimed to investigate whether the use of antimicrobial drugs in 58 different Bavarian piggeries exerts influence on the abundance of different antibiotic resistance genes in farm-produced fertilizer samples (manure, liquid manure and farmyard manure). For the “tracking“ part of this thesis fecal samples from pigs, their farmers and the farmers’ family members were obtained – partly for a period from birth to slaughter of the pigs. To this purpose six different farms were selected exemplarily in order to gather continuous and long-term information about the antibiotic resistance status. In addition spread of (resistant) *E. coli* between pigs and the farmer or his family members was investigated.

By means of quantitative PCR tetracycline and sulfonamide resistance genes could be detected in the excretion of Bavarian pigs of both kinds of management systems as well as genes that indicate for the presence of multiresistance elements (e.g. integrons). This is worth stating because those genes are spread to agricultural land via the above mentioned farm-produced fertilizers. With regard to the genes *tet(A)*, *tet(M)* and *qacE* / *qacEΔ1*, there were significantly higher relative abundances detected in fertilizers of conventional farms (manure) than in samples of liquid and farmyard manure. On the contrary the relative abundance of *sul(II)* was higher in the fertilizers of organic farms. Regular use of tetracyclines led to higher *tet(A)* and *tet(M)* concentrations. Speaking of farms that do not regularly apply tetracyclines, the base level of those two genes was higher for conventional piggeries than for organic ones. Comparing farms that either do or do not use sulfonamides on a regular basis, mean concentrations of *sul(II)* were significantly higher in samples of manure and liquid manure of applying farms.

Quantitative PCR data suggest that the use of antibiotics has selective impact on the quantitative abundance of corresponding antibiotic resistance genes: Concomitant with increasing residues of the antibiotic agent itself, *tet*(B) and *tet*(M) concentrations in porcine fecal samples increased distinctly during tetracycline treatment of the pigs. The same applies for *sul*(I) values during treatment with sulfonamides. In addition to that, qPCR results revealed higher abundances of those two *tet* genes in human fecal samples from farms where tetracyclines are regularly used compared to samples of people living on piggeries where this is not the case. *tet*(A) concentrations in porcine feces were higher in tetracycline applying farms as well; yet the quantitative trend of this gene during tetracycline treatment considerably differed from *tet*(B) and *tet*(M).

Molecular typing (ERIC-PCR) of strains of the indicator organism *E. coli* revealed that *E. coli* from farmers were much more similar to the *E. coli* of pigs than were isolates of their family members. This is a considerable indication for a spread of bacteria from animal to men (or vice versa), probably based on direct and / or indirect interactions. However, selected isolate pairs from pig and farmer clearly differed in their pheno- and genotypic resistance profiles – this indicates that transfer of *E. coli* does not automatically result in a permanent establishment of (mobile) antimicrobial resistance genes in the new host. Ongoing research focusing on characteristics of plasmids of those isolate pairs might provide new insights concerning the spread of antibiotic resistance.

To assess the risk for consumers to get colonized by (resistant) bacteria via intake of food, raw meat samples of the „tracking“ pigs were obtained at slaughter and screened for the presence of *E. coli*: in 22.1 % of samples (n = 244) *E. coli* could be detected, partly equipped with pheno- and genotypic antimicrobial resistance. Results of tracing such resistant isolates indicate that entry of resistance had already occurred on farm level, yet contaminations during the production cycle cannot be ruled out. Either way, raw meat colonized with resistant bacteria may entail a potential health risk, primarily for immunocompromised men and when failing to observe basic hygienic rules handling food of animal origin.

## IX LITERATURVERZEICHNIS

- Aarestrup, F. (2012). Sustainable farming: Get pigs off antibiotics. *Nature* **486**(7404): 465-466.
- Aarestrup, F.M. (2003). Effects of termination of AGP use on antimicrobial resistance in food animals. *Working papers for the WHO international review panels evaluation, Document WHO/CDS/CPE/ZFK/2003.1 a. World Health Organization, Geneva, Switzerland*: 6-11.
- Aarestrup, F.M., Y. Agersø, F. Bager, N. Frimodt-Møller, A.M. Hammerum, V.F. Jensen, J. Poulsen & R. Skov (2010). DANMAP 2009. Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark., National Food Institute.
- Aarestrup, F.M., V.F. Jensen, H.-D. Emborg, E. Jacobsen & H.C. Wegener (2010). Changes in the use of antimicrobials and the effects on productivity of swine farms in Denmark. *Am J Vet Res* **71**(7): 726-733.
- Abraham, E.P. & E. Chain (1940). An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature* **146**(3713): 837.
- Agersø, Y., F.M. Aarestrup, K. Pedersen, A.M. Seyfarth, T. Struve & H. Hasman (2012). Prevalence of extended-spectrum cephalosporinase (ESC)-producing *Escherichia coli* in Danish slaughter pigs and retail meat identified by selective enrichment and association with cephalosporin usage. *J Antimicrob Chemother* **67**(3): 582-588.
- Agersø, Y., L.B. Jensen, M. Givskov & M.C. Roberts (2002). The identification of a tetracycline resistance gene *tet*(M), on a *Tn916*-like transposon, in the *Bacillus cereus* group. *FEMS Microbiol Lett* **214**(2): 251-256.
- Agersø, Y., G. Sengelov & L.B. Jensen (2004). Development of a rapid method for direct detection of *tet*(M) genes in soil from Danish farmland. *Environ Int* **30**(1): 117-122.
- Albrecht, H. & A. Schutte (1999). Homeopathy versus antibiotics in metaphylaxis of infectious diseases: a clinical study in pig fattening and its significance to consumers. *Altern Ther Health Med* **5**(5): 64-68.
- Alcock, R.E., A. Sweetman & K.C. Jones (1999). Assessment of organic contaminant fate in waste water treatment plants. I: Selected compounds and physicochemical properties. *Chemosphere* **38**(10): 2247-2262.
- Alexander, T.W., J.L. Yanke, T. Reuter, E. Topp, R.R. Read, B.L. Selinger & T.A. McAllister (2011). Longitudinal characterization of antimicrobial resistance genes in feces shed from cattle fed different subtherapeutic antibiotics. *BMC Microbiol* **11**: 19-19.
- Allen, H.K., J. Donato, H.H. Wang, K.A. Cloud-Hansen, J. Davies & J. Handelsman (2010). Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Rev Micro* **8**(4): 251-259.

Alonso, A., P. Sánchez & J.L. Martínez (2001). Environmental selection of antibiotic resistance genes. *Environ Microbiol* **3**(1): 1-9.

AMG (2014). Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln: Arzneimittelgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 12. Dezember 2005 (BGBl. I S. 3394), das zuletzt durch Artikel 3 des Gesetzes vom 17. Dezember 2014 (BGBl. I S. 2222) geändert worden ist.

Aminov, R.I. (2010). A brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for the future. *Front Microbiol* **1**: 134.

Aminov, R.I., J.C. Chee-Sanford, N. Garrigues, B. Teferedegne, I.J. Krapac, B.A. White & R.I. Mackie (2002). Development, validation, and application of PCR primers for detection of tetracycline efflux genes of gram-negative bacteria. *Appl Environ Microbiol* **68**(4): 1786-1793.

Aminov, R.I., N. Garrigues-Jeanjean & R.I. Mackie (2001). Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. *Appl Environ Microbiol* **67**(1): 22-32.

Aminov, R.I. & R.I. Mackie (2007). Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiol Lett* **271**(2): 147-161.

Anderson, E.S. (1968). Drug resistance in *Salmonella* Typhimurium and its implications. *Br Med J* **3**(5614): 333-339.

Anderson, M., D. Bollinger, A. Hagler, H. Hartwell, B. Rivers, K. Ward & T.R. Steck (2004). Viable but nonculturable bacteria are present in mouse and human urine specimens. *J Clin Microbiol* **42**(2): 753-758.

Anonymous (2013). Landwirtschaftliche Tierhaltung. BVL Buchverlag (Die Landwirtschaft), München.

Anonymous (2014). Fleischatlas 2014, Heinrich-Böll-Stiftung, Bund für Umwelt- und Naturschutz Deutschland, Le Monde diplomatique.

ANTHV (2006). Verordnung über Nachweispflichten der Tierhalter für Arzneimittel, die zur Anwendung bei Tieren bestimmt sind (Tierhalter-Arzneimittel-Nachweisverordnung): Tierhalter-Arzneimittel-Nachweisverordnung vom 20. Dezember 2006 (BGBl. I S. 3450, 3453).

Antunes, P.c., C. Réu, J.C. Sousa, L.s. Peixe & N. Pestana (2003). Incidence of *Salmonella* from poultry products and their susceptibility to antimicrobial agents. *Int J Food Microbiol* **82**(2): 97-103.

Armand-Lefevre, L., R. Ruimy & A. Andremont (2005). Clonal comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from healthy pig farmers, human controls, and pigs. *Emerg Infect Dis* **11**(5): 711-714.

Aubry-Damon, H., K. Grenet, P. Sall-Ndiaye, D. Che, E. Cordeiro, M.-E. Bougnoux, E. Rigaud, Y. Le Strat, V. Lemanissier, L. Armand-Lefèvre, D. Delzescaux, J.-C. Desenclos, M. Liénard & A. Andremont (2004). Antimicrobial resistance in commensal flora of pig farmers. *Emerg Infect Dis* **10**(5): 873-879.

- Avery, O.T., C.M. MacLeod & M. McCarty (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J Exp Med* **79**(2): 137-158.
- Baquero, F., J.-L. Martínez & R. Cantón (2008). Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr Opin Biotechnol* **19**(3): 260-265.
- Barbosa, T.M., K.P. Scott & H.J. Flint (1999). Evidence for recent intergeneric transfer of a new tetracycline resistance gene, *tet*(W), isolated from *Butyrivibrio fibrisolvens*, and the occurrence of *tet*(O) in ruminal bacteria. *Environ Microbiol* **1**(1): 53-64.
- Barkovskii, A.L., K.M. Manoylov & C. Bridges (2012). Positive and negative selection towards tetracycline resistance genes in manure treatment lagoons. *J Appl Microbiol* **112**(5): 907-919.
- Barlow, M. (2009). What antimicrobial resistance has taught us about horizontal gene transfer. *Methods Mol Biol* **532**: 397-411.
- Bassett, E.J., M.S. Keith, G.J. Armelagos, D.L. Martin & A.R. Villanueva (1980). Tetracycline-labeled human bone from ancient Sudanese Nubia (A.D. 350). *Science* **209**(4464): 1532-1534.
- Bean, D.C., D.M. Livermore & L.M.C. Hall (2009). Plasmids imparting sulfonamide resistance in *Escherichia coli*: Implications for persistence. *Antimicrob Agents Chemother* **53**(3): 1088-1093.
- Bébéar, C. & S. Pereyre (2005). Mechanisms of drug resistance in *Mycoplasma pneumoniae*. *Curr Drug Targets Infect Disord* **5**(3): 263-271.
- Berge, A.C.B., D.A. Moore & W.M. Sischo (2006). Field trial evaluating the influence of prophylactic and therapeutic antimicrobial administration on antimicrobial resistance of fecal *Escherichia coli* in dairy calves. *Appl Environ Microbiol* **72**(6): 3872-3878.
- Bergey, D.H. & J.G. Holt (1994). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Bertrand, K.P., K. Postle, L.V. Wray Jr & W.S. Reznikoff (1983). Overlapping divergent promoters control expression of Tn10 tetracycline resistance. *Gene* **23**(2): 149-156.
- BfR (2011). EHEC-Ausbruch 2011 - Aufklärung des Ausbruchs entlang der Lebensmittelkette. Berlin, Bundesamt für Risikobewertung.
- Bischoff, M., J. Bauer, P. Preikschat, K. Schwaiger, G. Mölle & C. Hözel (2012). First detection of the antiseptic resistance gene *qacA/B* in *Enterococcus faecalis*. *Microb Drug Resist* **18**(1): 7-12.
- Björkroth, K.J. & H.J. Korkeala (1997). Use of rRNA gene restriction patterns to evaluate lactic acid bacterium contamination of vacuum-packaged sliced cooked whole-meat product in a meat processing plant. *Appl Environ Microbiol* **63**(2): 448-453.

- Boerlin, P., R. Travis, C.L. Gyles, R. Reid-Smith, N.J. Heather Lim, V. Nicholson, S.A. McEwen, R. Friendship & M. Archambault (2005). Antimicrobial resistance and virulence genes of *Escherichia coli* isolates from swine in Ontario. *Appl Environ Microbiol* **71**(11): 6753-6761.
- Bolton, D.J., C. Ivory & D. McDowell (2013). A study of *Salmonella* in pigs from birth to carcass: serotypes, genotypes, antibiotic resistance and virulence profiles. *Int J Food Microbiol* **160**(3): 298-303.
- Borel, N., N. Regenscheit, A. Di Francesco, M. Donati, J. Markov, Y. Masserey & A. Pospischil (2012). Selection for tetracycline-resistant *Chlamydia suis* in treated pigs. *Vet Microbiol* **156**(1-2): 143-146.
- Boucher, Y., M. Labbate, J.E. Koenig & H.W. Stokes (2007). Integrrons: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria. *Trends Microbiol* **15**(7): 301-309.
- Bradler, G. & H. Thrum (1963). Nourseothricin A und B, zwei neue antibakterielle Antibiotica einer *Streptomyces-noursei*-Variante. *Zeitschr. f. allg. Mikrobiol.* **3**(2): 105-112.
- Brambilla, G. & A. Cantafiora (2004). Metabolic and cardiovascular disorders in highly inbred lines for intensive pig farming: how animal welfare evaluation could improve the basic knowledge of human obesity. *Ann Ist Super Sanita* **40**(2): 241-244.
- Broens, E.M., E.A.M. Graat, A.W. van de Giessen, M.J. Broekhuizen-Stins & M.C.M. de Jong (2012). Quantification of transmission of livestock-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. *Vet Microbiol* **155**(2-4): 381-388.
- Bryan, A., N. Shapir & M.J. Sadowsky (2004). Frequency and distribution of tetracycline resistance genes in genetically diverse, nonselected, and nonclinical *Escherichia coli* strains, isolated from diverse human and animal sources. *Appl Environ Microbiol* **70**(4): 2503-2507.
- Bryan, L.E. (1988). General mechanisms of resistance to antibiotics. *J Antimicrob Chemother* **22 Suppl A**: 1-15.
- BTK (2015). Leitlinien für den sorgfältigen Umgang mit antibakteriell wirksamen Tierarzneimitteln. Überarbeitete Fassung mit tierartspezifischen Ergänzungen, Stand Januar 2015, erschienen als Beilage zum Deutschen Tierärzteblatt 3/2015. Hannover, Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG.
- Buffet-Bataillon, S., P. Tattevin, M. Bonnaure-Mallet & A. Jolivet-Gougeon (2012). Emergence of resistance to antibacterial agents: the role of quaternary ammonium compounds - a critical review. *Int J Antimicrob Agents* **39**(5): 381-389.
- Bülte, M. & M. Goll (2014). *Escherichia coli*. Eigenschaften, Vorkommen und Präventionsmaßnahmen. Behr's, Hamburg.

- Burdett, V. (1996). *tet(M)*-promoted release of tetracycline from ribosomes is GTP dependent. *J Bacteriol* **178**(11): 3246-3251.
- Burow, E., C. Simoneit, B.A. Tenhagen & A. Käsbohrer (2014). Oral antimicrobials increase antimicrobial resistance in porcine *E. coli* – A systematic review. *Prev Vet Med* **113**(4): 364-375.
- BVL (2014). Dritte Datenerhebung zur Antibiotikaabgabe in der Tiermedizin. Berlin.
- BVL (2015). Vierte Datenerhebung zur Antibiotikaabgabe in der Tiermedizin. Berlin.
- Carattoli, A. (2001). Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Vet. Res.* **32**(3-4): 243-259.
- Carattoli, A. (2013). Plasmids and the spread of resistance. *Int J Med Microbiol* **303**(6-7): 298-304.
- Carbonnelle, E., C. Mesquita, E. Bille, N. Day, B. Dauphin, J.-L. Beretti, A. Ferroni, L. Gutmann & X. Nassif (2011). MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clin Biochem* **44**(1): 104-109.
- Carmo, L.P., L.R. Nielsen, P.M. da Costa & L. Alban (2014). Exposure assessment of extended-spectrum beta-lactamases/AmpC beta-lactamases-producing *Escherichia coli* in meat in Denmark. *Infect Ecol Epidemiol* **4**.
- Carter, J.E. & T.N. Evans (2005). Clinically significant *Kluyvera* infections: a report of seven cases. *Am J Clin Pathol* **123**(3): 334-338.
- Cheng, W., H. Chen, C. Su & S. Yan (2013). Abundance and persistence of antibiotic resistance genes in livestock farms: A comprehensive investigation in eastern China. *Environ Int* **61**: 1-7.
- Chia, J.H., C. Chu, L.H. Su, C.H. Chiu, A.J. Kuo, C.F. Sun & T.L. Wu (2005). Development of a multiplex PCR and SHV melting-curve mutation detection system for detection of some SHV and CTX-M beta-lactamases of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterobacter cloacae* in Taiwan. *J Clin Microbiol* **43**(9): 4486-4491.
- Chiou, C.S. & A.L. Jones (1995). Expression and identification of the *strA-strB* gene pair from streptomycin-resistant *Erwinia amylovora*. *Gene* **152**(1): 47-51.
- Chopra, I., L. Hesse & A. O'Neill (2002). Discovery and development of new anti-bacterial drugs. *Pharmacochemistry Library*. Elsevier. **Volume 32**: 213-225.
- Chopra, I. & M. Roberts (2001). Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**(2): 232-260.
- Chuanchuen, R., S. Khemtong & P. Padungtod (2007). Occurrence of *qacE/qacEA1* genes and their correlation with class 1 integrons in *Salmonella enterica* isolates from poultry and swine. *Southeast Asian J Trop Med Public*

*Health* **38**(5): 855-862.

Clark, S., R. Rylander & L. Larsson (1983). Airborne bacteria, endotoxin and fungi in dust in poultry and swine confinement buildings. *Am Ind Hyg Assoc J* **44**(7): 537-541.

Clewel, D.B., S.E. Flannagan, D.D. Jaworski & D.B. Clewell (1995). Unconstrained bacterial promiscuity: the Tn916-Tn1545 family of conjugative transposons. *Trends Microbiol* **3**(6): 229-236.

Cohen, S.N., A.C.Y. Chang & L. Hsu (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-Factor DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **69**(8): 2110-2114.

Collignon, P., J.H. Powers, T.M. Chiller, A. Aidara-Kane & F.M. Aarestrup (2009). World Health Organization ranking of antimicrobials according to their importance in human medicine: A critical step for developing risk management strategies for the use of antimicrobials in food production animals. *Clin Infect Dis* **49**(1): 132-141.

Collis, C.M. & R.M. Hall (1992). Gene cassettes from the insert region of integrons are excised as covalently closed circles. *Mol Microbiol* **6**(19): 2875-2885.

Connell, S.R., D.M. Tracz, K.H. Nierhaus & D.E. Taylor (2003). Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **47**(12): 3675-3681.

Conway, S.P., K.G. Brownlee, M. Denton & D.G. Peckham (2003). Antibiotic treatment of multidrug-resistant organisms in cystic fibrosis. *Am J Respir Med* **2**(4): 321-332.

Cortés, P., V. Blanc, A. Mora, G. Dahbi, J.E. Blanco, M. Blanco, C. Lopez, A. Andreu, F. Navarro, M.P. Alonso, G. Bou, J. Blanco & M. Llagostera (2010). Isolation and characterization of potentially pathogenic antimicrobial-resistant *Escherichia coli* strains from chicken and pig farms in Spain. *Appl Environ Microbiol* **76**(9): 2799-2805.

Corvec, S., A. Prodhomme, C. Giraudeau, S. Dauvergne, A. Reynaud & N. Caroff (2007). Most *Escherichia coli* strains overproducing chromosomal AmpC  $\beta$ -lactamase belong to phylogenetic group A. *J Antimicrob Chemother* **60**(4): 872-876.

Cosloy, S.D. & M. Oishi (1973). Genetic transformation in *Escherichia coli* K12. *Proc Natl Acad Sci USA* **70**(1): 84-87.

Crick, F.H. (1966). Codon-anticodon pairing: the wobble hypothesis. *J Mol Biol* **19**(2): 548-555.

Cullimore, D.R. (2010). Practical Atlas for Bacterial Identification, Second Edition. CRC Press, Boca Raton.

Czekalski, N., T. Berthold, S. Caucci, A. Egli & H. Buergmann (2012). Increased levels of multiresistant bacteria and resistance genes after wastewater treatment

- and their dissemination into Lake Geneva, Switzerland. *Front Microbiol* **3**.
- D'Costa, V.M., K.M. McGrann, D.W. Hughes & G.D. Wright (2006). Sampling the antibiotic resistome. *Science* **311**(5759): 374-377.
- Dahme, E. & E. Weiss (2007). Grundriß der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere. Enke, Stuttgart.
- Datta, N. & R. Hedges (1972). Host ranges of R factors. *J Gen Microbiol* **70**(3): 453-460.
- Dauber-Osguthorpe, P., V.A. Roberts, D.J. Osguthorpe, J. Wolff, M. Genest & A.T. Hagler (1988). Structure and energetics of ligand binding to proteins: *Escherichia coli* dihydrofolate reductase-trimethoprim, a drug-receptor system. *Proteins* **4**(1): 31-47.
- Davies, J. & D. Davies (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* **74**(3): 417-433.
- Delcour, A.H. (2009). Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochim Biophys Acta* **1794**(5): 808-816.
- Dibner, J.J. & J.D. Richards (2005). Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poult Sci* **84**(4): 634-643.
- Domagk, G. (1935). Chemotherapie der bakteriellen Infektionen. *Angew. Chem* **48**(42): 657-667.
- Dönhöfer, A., S. Franckenberg, S. Wickles, O. Berninghausen, R. Beckmann & D.N. Wilson (2012). Structural basis for *tet*(M)-mediated tetracycline resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**(42): 16900-16905.
- Dorado-Garcia, A., W. Dohmen, M.E.H. Bos, K.M. Verstappen, M. Houben, J.A. Wagenaar & D.J.J. Heederik (2015). Dose-response relationship between antimicrobial drugs and livestock-associated MRSA in pig farming. *Emerg Infect Dis* **21**(6): 950-959.
- Dorn-In, S., R. Bassitta, K. Schwaiger, J. Bauer & C.S. Hözel (2015). Specific amplification of bacterial DNA by optimized so-called universal bacterial primers in samples rich of plant DNA. *J Microbiol Methods* **113**(0): 50-56.
- Dorneles, E.M.S., J.A. Santana, D. Ribeiro, F.A. Dorella, A.S. Guimarães, M.S. Moawad, S.A. Selim, A.L.M. Garaldi, A. Miyoshi, M.G. Ribeiro, A.M.G. Gouveia, V. Azevedo, M.B. Heinemann & A.P. Lage (2014). Evaluation of ERIC-PCR as genotyping method for *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates. *PLoS One* **9**(6): e98758.
- Drieux, L., F. Brossier, W. Sougakoff & V. Jarlier (2008). Phenotypic detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. *Clin Microbiol Infect* **14**: 90-103.
- Duggar, B.M. (1948). Aureomycin: a product of the continuing search for new antibiotics. *Ann N Y Acad Sci* **51**(2): 177-181.

- Dürckheimer, W. (1975). Tetracycline: Chemie, Biochemie und Struktur-Wirkungs-Beziehungen. *Angew. Chem* **87**(21): 751-764.
- Duriez, P. & E. Topp (2007). Temporal dynamics and impact of manure storage on antibiotic resistance patterns and population structure of *Escherichia coli* Isolates from a commercial swine farm. *Appl Environ Microbiol* **73**(17): 5486-5493.
- ECDC/EMA (2009). The bacterial challenge: time to react. Stockholm, ECDC/EMEA Joint Working Group.
- Eckert, B. & C.F. Beck (1989). Overproduction of transposon Tn10-encoded tetracycline resistance protein results in cell death and loss of membrane potential. *J Bacteriol* **171**(6): 3557-3559.
- EFSA (2011). Scientific Opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and/or AmpC  $\beta$ -lactamases in food and food-producing animals. *EFSA Journal* **9**(8): 95.
- EFSA (2015). ECDC/EFSA/EMA first joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals. *EFSA Journal* **13**(1): 114.
- Egervarn, M., S. Borjesson, S. Byfors, M. Finn, C. Kaipe, S. Englund & M. Lindblad (2014). *Escherichia coli* with extended-spectrum beta-lactamases or transferable AmpC beta-lactamases and *Salmonella* on meat imported into Sweden. *Int J Food Microbiol* **171**: 8-14.
- Ehrlich, P. & S. Halta (1910). Die experimentelle Chemotherapie der Spirilloseen. Springer, Berlin.
- Eich, K.O. & U. Schmidt (1998). Handbuch Schweinekrankheiten. Landwirtschaftsverlag, Münster.
- El Azhari, N., S. Lainé, V. Sappin-Didier, J. Beguet, N. Rouard, L. Philippot & F. Martin-Laurent (2012). Long-term impact of 19 years' farmyard manure or sewage sludge application on the structure, diversity and density of the protocatechuate-degrading bacterial community. *Agr Ecosyst Environ* **158**: 72-82.
- Elmund, G.K., S.M. Morrison, D.W. Grant & S.M. Nevins (1971). Role of excreted chlortetracycline in modifying the decomposition process in feedlot waste. *Bull Environ Contam Toxicol* **6**(2): 129-132.
- EMA (2014). Sales of veterinary antimicrobial agents in 26 EU/EEA countries in 2012 - Fourth ESVAC report, European Medicines Agency.
- Endtz, H.P., G.J. Ruijs, B. van Klinger, W.H. Jansen, T. van der Reyden & R.P. Mouton (1991). Quinolone resistance in campylobacter isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine. *J Antimicrob Chemother* **27**(2): 199-208.
- Engberg, J., F.M. Aarestrup, D.E. Taylor, P. Gerner-Smidt & I. Nachamkin (2001). Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*:

resistance mechanisms and trends in human isolates. *Emerg Infect Dis* **7**(1): 24-34.

Enne, V.I., C. Cassar, K. Sprigings, M.J. Woodward & P.M. Bennett (2008). A high prevalence of antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolated from pigs and a low prevalence of antimicrobial resistant *E. coli* from cattle and sheep in Great Britain at slaughter. *FEMS Microbiol Lett* **278**(2): 193-199.

Escherich, T. (1886). Die Darmbakterien des Säuglings und ihre Beziehungen zur Physiologie der Verdauung. F. Enke, Stuttgart.

Escobar-Páramo, P., O. Clermont, A.-B. Blanc-Potard, H. Bui, C. Le Bouguénec & E. Denamur (2004). A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol* **21**(6): 1085-1094.

Estler, C.J. & H. Schmidt (2007). Pharmakologie und Toxikologie: für Studium und Praxis; mit 281 Tabellen. Schattauer, Stuttgart.

Falagas, M.E. & S.K. Kasiakou (2005). Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis* **40**(9): 1333-1341.

Farmiloe, F.J., S.J. Cornford, J.B.M. Coppock & M. Ingram (1954). The survival of *Bacillus subtilis* spores in the baking of bread. *J. Sci. Food Agr* **5**(6): 292-304.

FDA (2013). Guidance for Industry; New Animal Drugs and New Animal Drug Combination Products Administered in or on Medicated Feed or Drinking Water of Food-Producing Animals: Recommendations for Drug Sponsors for Voluntarily Aligning Product Use Conditions with GFI #209, Food and Drug Administration

Feil, E.J., J.M. Smith, M.C. Enright & B.G. Spratt (2000). Estimating recombinational parameters in *Streptococcus pneumoniae* from multilocus sequence typing data. *Genetics* **154**(4): 1439-1450.

Feinman, S.E. (1978). Draft environmental impact statement: subtherapeutic antibacterial agents in animal feeds / prepared by Susan E. Feinman, and John C. Matheson III. [Dept. of Health, Education, and Welfare, Public Health Service], Food and Drug Administration, Bureau of Veterinary Medicine, Rockville, Md.

Ferguson, D. (2013). Veterinary Sciences - A Forum for One Medicine, One Health. *J Vet Sci* **1**(1): 1.

Feuerpfeil, I., J. López-Pila, R. Schmidt, E. Schneider & R. Szewzyk (1999). Antibiotikaresistente Bakterien und Antibiotika in der Umwelt. *Bundesgesundheitsbl. - Gesundheitsforsch. - Gesundheitssch.* **42**(1): 37-50.

Fey, P.D., T.J. Safranek, M.E. Rupp, E.F. Dunne, E. Ribot, P.C. Iwen, P.A. Bradford, F.J. Angulo & S.H. Hinrichs (2000). Ceftriaxone-resistant *Salmonella* infection acquired by a child from cattle. *N Engl J Med* **342**(17): 1242-1249.

Fischbach, M.A. & C.T. Walsh (2009). Antibiotics for emerging pathogens. *Science* **325**(5944): 1089-1093.

- Fleming, A. (1929). On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Br J Exp Pathol* **10**(3): 226-236.
- Fluit, A.C. & F.J. Schmitz (2004). Resistance integrons and super-integrons. *Clin Microbiol Infect* **10**(4): 272-288.
- Freiwald, A. & S. Sauer (2009). Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. *Nature Prot* **4**(5): 732-742.
- Frey, H.H., F.R. Althaus & W. Löscher (2010). Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin. Enke, Stuttgart.
- Frost, L.S., R. Leplae, A.O. Summers & A. Toussaint (2005). Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Micro* **3**(9): 722-732.
- Früh, B., D. Bochicchio, S. Edwards, L. Hgelund, C. Leeb, M. Heinonen, F. Maupertuis, A. Sundrum, S. Werne, S. Wiberg, H. Mejer, A. Prunier, A. Roepstorff, S. Lubac, M. Bonde, T. Rousing & A. Sundrum (2011). Animal health and welfare in organic pig production - Final Report COREPIG.
- Fuentes, D.E., C.A. Navarro, J.C. Tantaleán, M.A. Araya, C.P. Saavedra, J.M. Pérez, I.L. Calderón, P.A. Youderian, G.C. Mora & C.C. Vásquez (2005). The product of the *qacC* gene of *Staphylococcus epidermidis* CH mediates resistance to β-lactam antibiotics in gram-positive and gram-negative bacteria. *Res Microbiol* **156**(4): 472-477.
- Garcia-Migura, L., R.S. Hendriksen, L. Fraile & F.M. Aarestrup (2014). Antimicrobial resistance of zoonotic and commensal bacteria in Europe: The missing link between consumption and resistance in veterinary medicine. *Vet Microbiol* **170**(1-2): 1-9.
- Garofalo, C., C. Vignaroli, G. Zandri, L. Aquilanti, D. Bordoni, A. Osimani, F. Clementi & F. Biavasco (2007). Direct detection of antibiotic resistance genes in specimens of chicken and pork meat. *Int J Food Microbiol* **113**(1): 75-83.
- Garrity, G., D.J. Brenner, N.R. Krieg & J.R. Staley (2007). Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria. Springer.
- Gebreyes, W.A. & C. Altier (2002). Molecular characterization of multidrug-resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Typhimurium isolates from swine. *J Clin Microbiol* **40**(8): 2813-2822.
- Gedek, B. (1974). Possibilities and limitations of microbiological animal feed control. *Dtsch Tierärztl Wschr* **81**(2): 37-40 contd.
- Gerner-Smidt, P., L.M. Graves, S. Hunter & B. Swaminathan (1998). Computerized analysis of restriction fragment length polymorphism patterns: Comparative evaluation of two commercial software packages. *J Clin Microbiol* **36**(5): 1318-1323.
- Geser, N., R. Stephan & H. Hachler (2012). Occurrence and characteristics of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing enterobacteriaceae in food

- producing animals, minced meat and raw milk. *BMC Vet Res* **8**: 21.
- Ghosh, S. & T.M. LaPara (2007). The effects of subtherapeutic antibiotic use in farm animals on the proliferation and persistence of antibiotic resistance among soil bacteria. *ISME J* **1**(3): 191-203.
- Gilbert, P. & L.E. Moore (2005). Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *J Appl Microbiol* **99**(4): 703-715.
- Gilson, E., D. Perrin & M. Hofnung (1990). DNA polymerase I and a protein complex bind specifically to *E. coli* palindromic unit highly repetitive DNA: implications for bacterial chromosome organization. *Nucleic Acids Res* **18**(13): 3941-3952.
- Giufre, M., C. Graziani, M. Accogli, I. Luzzi, L. Busani, M. Cerquetti & G. Escherichia Coli Study (2012). *Escherichia coli* of human and avian origin: detection of clonal groups associated with fluoroquinolone and multidrug resistance in Italy. *J Antimicrob Chemother* **67**(4): 860-867.
- Goldman, R.A., T. Hasan, C.C. Hall, W.A. Strycharz & B.S. Cooperman (1983). Photoincorporation of tetracycline into *Escherichia coli* ribosomes. Identification of the major proteins photolabeled by native tetracycline and tetracycline photoproducts and implications for the inhibitory action of tetracycline on protein synthesis. *Biochemistry* **22**(2): 359-368.
- Griffith, F. (1928). The significance of pneumococcal types. *J Hyg* **27**(02): 113-159.
- Grinsted, J., F. de la Cruz & R. Schmitt (1990). The Tn21 subgroup of bacterial transposable elements. *Plasmid* **24**(3): 163-189.
- Groß, U. (2013). Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Thieme, Stuttgart.
- Guerra, B., E. Junker, A. Schroeter, B. Malorny, S. Lehmann & R. Helmuth (2003). Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle, swine and poultry. *J Antimicrob Chemother* **52**(3): 489-492.
- Guiyoule, A., G. Gerbaud, C. Buchrieser, M. Galimand, L. Rahalison, S. Chanteau, P. Courvalin & E. Carniel (2001). Transferable plasmid-mediated resistance to streptomycin in a clinical isolate of *Yersinia pestis*. *Emerg Infect Dis* **7**(1): 43.
- Gupta, A., J.M. Nelson, T.J. Barrett, R.V. Tauxe, S.P. Rossiter, C.R. Friedman, K.W. Joyce, K.E. Smith, T.F. Jones, M.A. Hawkins, B. Shiferaw, J.L. Beebe, D.J. Vugia, T. Rabatsky-Ehr, J.A. Benson, T.P. Root, F.J. Angulo & N.W.G. for the (2004). Antimicrobial resistance among *Campylobacter* strains, United States, 1997-2001. *Emerg Infect Dis* **10**(6): 1102-1109.
- Gyles, C.L. (2007). Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *J Anim Sci* **85**(13 Suppl): E45-62.

- Hagmüller, W. (2013). Antibiotikafreie Ferkelaufzucht und Schweinemast - eine Illusion? 20 Jahre Veterinärphytotherapie Jubiläumssymposium.
- Hammerum, A.M., J. Larsen, V.D. Andersen, C.H. Lester, T.S.S. Skytte, F. Hansen, S.S. Olsen, H. Mordhorst, R.L. Skov, F.M. Aarestrup & Y. Agerso (2014). Characterization of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* obtained from Danish pigs, pig farmers and their families from farms with high or no consumption of third- or fourth-generation cephalosporins. *J Antimicrob Chemother* **69**(10): 2650-2657.
- Hammerum, A.M., D. Sandvang, S.R. Andersen, A.M. Seyfarth, L.J. Porsbo, N. Frimodt-Møller & O.E. Heuer (2006). Detection of *sul1*, *sul2* and *sul3* in sulphonamide resistant *Escherichia coli* isolates obtained from healthy humans, pork and pigs in Denmark. *Int J Food Microbiol* **106**(2): 235-237.
- Hamscher, G., H.T. Pawelzick, S. Sczesny, H. Nau & J. Hartung (2003). Antibiotics in dust originating from a pig-fattening farm: a new source of health hazard for farmers? *Environ Health Perspect* **111**(13): 1590-1594.
- Hansen, K.H., P. Damborg, M. Andreasen, S.S. Nielsen & L. Guardabassi (2013). Carriage and fecal counts of cefotaxime M-producing *Escherichia coli* in pigs: a longitudinal study. *Appl Environ Microbiol* **79**(3): 794-798.
- Hansson, K., O. Sköld & L. Sundström (1997). Non-palindromic attI sites of integrons are capable of site-specific recombination with one another and with secondary targets. *Mol. Microbiol* **26**(3): 441-453.
- Hartmann, A. (2005). Horizontaler Gentransfer - ein natürlicher Prozess. mensch+umwelt spezial. Neuherberg, GSF - Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit in der Helmholtz-Gemeinschaft. **17**: 59-64.
- Hassan, K.A., M. Galea, J. Wu, B.A. Mitchell, R.A. Skurray & M.H. Brown (2006). Functional effects of intramembranous proline substitutions in the staphylococcal multidrug transporter QacA. *FEMS Microbiol Lett* **263**(1): 76-85.
- Heizmann, W., P.C. Döller, B. Gutbrod & H. Werner (1988). Rapid identification of *Escherichia coli* by Fluorocult media and positive indole reaction. *J Clin Microbiol* **26**(12): 2682-2684.
- Henchion, M., M. McCarthy, V.C. Resconi & D. Troy (2014). Meat consumption: Trends and quality matters. *Meat Sci* **98**(3): 561-568.
- Herrero-Fresno, A., I. Larsen & J.E. Olsen (2015). Genetic relatedness of commensal *Escherichia coli* from nursery pigs in intensive pig production in Denmark and molecular characterization of genetically different strains. *J Appl Microbiol* **119**(2): 342-353.
- Herrero, M., V. de Lorenzo & K.N. Timmis (1990). Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **172**(11): 6557-6567.

- Heuer, H., A. Focks, M. Lamshöft, K. Smalla, M. Matthies & M. Spiteller (2008). Fate of sulfadiazine administered to pigs and its quantitative effect on the dynamics of bacterial resistance genes in manure and manured soil. *Soil Biol Biochem* **40**(7): 1892-1900.
- Heuer, H., H. Schmitt & K. Smalla (2011). Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Curr Opin Microbiol* **14**(3): 236-243.
- Heuer, H. & K. Smalla (2007). Manure and sulfadiazine synergistically increased bacterial antibiotic resistance in soil over at least two months. *Environ Microbiol* **9**(3): 657-666.
- Hillen, W. & C. Berens (2002). Tetracyclin-gesteuerte Genregulation: Vom bakteriellen Ursprung zum eukaryotischen Werkzeug. *Biosp. Heidelb.* **8**(4): 355-359.
- Hinnebusch, J. & K. Tilly (1993). Linear plasmids and chromosomes in bacteria. *Mol Microbiol* **10**(5): 917-922.
- Hirsch, R., T. Ternes, K. Haberer & K.-L. Kratz (1999). Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Sci Total Environ* **225**(1-2): 109-118.
- Ho, P.L., J. Chan, W.U. Lo, P.Y. Law, Z. Li, E.L. Lai & K.H. Chow (2013). Dissemination of plasmid-mediated fosfomycin resistance fosA3 among multidrug-resistant *Escherichia coli* from livestock and other animals. *J Appl Microbiol* **114**(3): 695-702.
- Holah, J.T., J.H. Taylor, D.J. Dawson & K.E. Hall (2002). Biocide use in the food industry and the disinfectant resistance of persistent strains of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. *J Appl Microbiol* **92**: 111S-120S.
- Holman, D.B. & M.R. Chenier (2013). Impact of subtherapeutic administration of tylosin and chlortetracycline on antimicrobial resistance in farrow-to-finish swine. *FEMS Microbiol Ecol* **85**(1): 1-13.
- Holmberg, S., J. Wells & M. Cohen (1984). Animal-to-man transmission of antimicrobial-resistant *Salmonella*: investigations of U.S. outbreaks, 1971-1983. *Science* **225**(4664): 833-835.
- Hölzel, C.S. (2006). Antibiotikaresistente Bakterien und Resistenzgene in Schweinegülle Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Hölzel, C.S., K.S. Harms, H. Küchenhoff, A. Kunz, C. Müller, K. Meyer, K. Schwaiger & J. Bauer (2010). Phenotypic and genotypic bacterial antimicrobial resistance in liquid pig manure is variously associated with contents of tetracyclines and sulfonamides. *J Appl Microbiol* **108**(5): 1642-1656.
- Hölzel, C.S., C. Müller, K.S. Harms, S. Mikolajewski, S. Schäfer, K. Schwaiger & J. Bauer (2012). Heavy metals in liquid pig manure in light of bacterial antimicrobial resistance. *Environ Res* **113**: 21-27.
- Huddleston, J.R. (2014). Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes. *Infect Drug Resist* **7**: 167-176.

- Hulton, C.S.J., C.F. Higgins & P.M. Sharp (1991). ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium and other enterobacteria. *Mol Microbiol* **5**(4): 825-834.
- Hummel, R., H. Tschäpe & W. Witte (1986). Spread of plasmid-mediated nourseothricin resistance due to antibiotic use in animal husbandry. *J Basic Microbiol* **26**(8): 461-466.
- Ilea, R. (2009). Intensive livestock farming: Global trends, increased environmental concerns, and ethical solutions. *J Agr Environ Ethics* **22**(2): 153-167.
- Imirzalioglu, C., T. Hain, T. Chakraborty & E. Domann (2008). Hidden pathogens uncovered: metagenomic analysis of urinary tract infections. *Andrologia* **40**(2): 66-71.
- Ioannou, C.J., G.W. Hanlon & S.P. Denyer (2007). Action of disinfectant quaternary ammonium compounds against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **51**(1): 296-306.
- ISO (2006). ISO 20776-1:2006: Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems - Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices - Part 1: Reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases, International Organization for Standardization.
- Jacob, F. & E. Wollman (1958). Genetic and physical determinations of chromosomal segments in *Escherichia coli*. *Symposia of the Society for Experimental Biology*.
- Jacobs, W.A. (1916). The bactericidal properties of the quaternary salts of hexamethylenetetramine I. The problem of the chemotherapy of experimental bacterial infections. *J Exp Med* **23**(5): 563-568.
- Jaglic, Z. & D. Cervinkova (2012). Genetic basis of resistance to quaternary ammonium compounds – the *qac* genes and their role: a review. *Vet Med* **57**: 275-281.
- Jain, A. & P. Srivastava (2013). Broad host range plasmids. *FEMS Microbiol Lett* **348**(2): 87-96.
- James, C.W. & C. Gurk-Turner (2001). Cross-reactivity of beta-lactam antibiotics. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* **14**(1): 106-107.
- Jaurin, B. & S. Normark (1983). Insertion of IS2 creates a novel ampC promoter in *Escherichia coli*. *Cell* **32**(3): 809-816.
- Jechalke, S., S. Schreiter, B. Wolters, S. Dealtry, H. Heuer & K. Smalla (2014). Widespread dissemination of class 1 integron components in soils and related ecosystems as revealed by cultivation-independent analysis. *Front Microbiol* **4**.
- Johnson, T.J., S. Kariyawasam, Y. Wannemuehler, P. Mangamele, S.J. Johnson, C. Doekott, J.A. Skyberg, A.M. Lynne, J.R. Johnson & L.K. Nolan (2007). The

genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1:H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* genomes. *J Bacteriol* **189**(8): 3228-3236.

Jones, I.G. & M. Midgley (1985). Expression of a plasmid borne ethidium resistance determinant from *Staphylococcus* in *Escherichia coli*: Evidence for an efflux system. *FEMS Microbiol Lett* **28**(3): 355-358.

Jorgensen, R.A. & W.S. Reznikoff (1979). Organization of structural and regulatory genes that mediate tetracycline resistance in transposon Tn10. *J Bacteriol* **138**(3): 705-714.

Kalant, H. (1965). The pharmacology of semisynthetic antibiotics. *Can Med Assoc J* **93**(16): 839-843.

Kaper, J.B., J.P. Nataro & H.L.T. Mobley (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* **2**(2): 123-140.

Karas, M., D. Bachmann & F. Hillenkamp (1985). Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules. *Anal Chem* **57**(14): 2935-2939.

Kazimierczak, K.A., H.J. Flint & K.P. Scott (2006). Comparative analysis of sequences flanking *tet*(W) resistance genes in multiple species of gut bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **50**(8): 2632-2639.

Kempf, I., M.A. Fleury, D. Drider, M. Bruneau, P. Sanders, C. Chauvin, J.-Y. Madec & E. Jouy (2013). What do we know about resistance to colistin in enterobacteriaceae in avian and pig production in Europe? *Int J Antimicrob Agents* **42**(5): 379-383.

Kich, J.D., A. Coldebella, N. Morés, M.G. Nogueira, M. Cardoso, P.M. Fratamico, J.E. Call, P. Fedorka-Cray & J.B. Luchansky (2011). Prevalence, distribution, and molecular characterization of *Salmonella* recovered from swine finishing herds and a slaughter facility in Santa Catarina, Brazil. *Int J Food Microbiol* **151**(3): 307-313.

Kim, L.M., J.T. Gray, B.G. Harmon, R.D. Jones & P.J. Fedorka-Cray (2005). Susceptibility of *Escherichia coli* from growing piglets receiving antimicrobial feed additives. *Foodborne Pathog Dis* **2**(4): 304-316.

Köhler, J. (1924). Hemmt der Wasserblau-Metachromgelb-Agar Dreifarbenährboden nach Gassner das Wachstum Gram-positiver Bakterien? Dissertation, Tierärztliche Hochschule zu Berlin.

Koike, S., I.G. Krapac, H.D. Oliver, A.C. Yannarell, J.C. Chee-Sanford, R.I. Aminov & R.I. Mackie (2007). Monitoring and source tracking of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater adjacent to swine production facilities over a 3-year period. *Appl Environ Microbiol* **73**(15): 4813-4823.

Konstantinov, S.R., A.A. Awati, B.A. Williams, B.G. Miller, P. Jones, C.R. Stokes, A.D.L. Akkermans, H. Smidt & W.M. De Vos (2006). Post-natal development of the porcine microbiota composition and activities. *Environ*

*Microbiol* **8**(7): 1191-1199.

Kyselkova, M., J. Jirout, N. Vrchotova, H. Schmitt & D. Elhottova (2015). Spread of tetracycline resistance genes at a conventional dairy farm. *Front Microbiol* **6**.

Lanz, R., P. Kuhnert & P. Boerlin (2003). Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. *Vet Microbiol* **91**(1): 73-84.

Larsen, J., H.C. Schønheyder, C.H. Lester, S.S. Olsen, L.J. Porsbo, L. Garcia-Migura, L.B. Jensen, M. Bisgaard & A.M. Hammerum (2010). Porcine-origin gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* in humans, Denmark. *Emerg Infect Dis* **16**(4): 682-684.

Larsen, M.V., S. Cosentino, S. Rasmussen, C. Friis, H. Hasman, R.L. Marvig, L. Jelsbak, T. Sicheritz-Pontén, D.W. Ussery, F.M. Aarestrup & O. Lund (2012). Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J Clin Microbiol* **50**(4): 1355-1361.

Larsson, D.G.J., C. de Pedro & N. Paxeus (2007). Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *J Hazard Mater* **148**(3): 751-755.

Lederberg, J. (1952). Cell genetics and hereditary symbiosis. *Physiol. Rev* **32**(4): 403-430.

Leipe, D.D., Y.I. Wolf, E.V. Koonin & L. Aravind (2002). Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *J Mol Biol* **317**(1): 41-72.

Lennox, E.S. (1955). Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. *Virology* **1**(2): 190-206.

Lenski, R.E. (1997). The cost of antibiotic resistance - from the perspective of a bacterium. *Antibiotic Resistance: Origins, Evolution, Selection and Spread*. D. J. Chadwick and J. Goode. **207**: 131-140.

Leung, K. & E. Topp (2001). Bacterial community dynamics in liquid swine manure during storage: molecular analysis using DGGE/PCR of 16S rDNA. *FEMS Microbiol Ecol* **38**(2-3): 169-177.

Levy, S.B. (1997). Antibiotic resistance: An ecological imbalance. *Antibiotic Resistance: Origins, Evolution, Selection and Spread*. D. J. Chadwick and J. Goode. **207**: 1-9.

Levy, S.B. (1998). The challenge of antibiotic resistance. *Sci Am* **278**(3): 32-39.

Levy, S.B., G.B. Fitzgerald & A.B. Macone (1976). Changes in intestinal flora of farm personnel after introduction of a tetracycline-supplemented feed on a farm. *N Engl J Med* **295**(11): 583-588.

Levy, S.B., G.B. Fitzgerald & A.B. Macone (1976). Spread of antibiotic-resistant plasmids from chicken to chicken and from chicken to man. *Nature* **260**(5546): 40-42.

- Levy, S.B. & B. Marshall (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med*
- Lewis, K. (2012). Antibiotics: Recover the lost art of drug discovery. *Nature* **485**(7399): 439-440.
- Li, J., R.L. Nation, J.D. Turnidge, R.W. Milne, K. Coulthard, C.R. Rayner & D.L. Paterson (2006). Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Lancet Infect Dis* **6**(9): 589-601.
- Li, W., D. Raoult & P.-E. Fournier (2009). Bacterial strain typing in the genomic era. *FEMS Microbiol Rev* **33**(5): 892-916.
- Linton, A.H., K. Howe, P.M. Bennett, M.H. Richmond & E.J. Whiteside (1977). The colonization of the human gut by antibiotic resistant *Escherichia coli* from chickens. *J Appl Bacteriol* **43**(3): 465-469.
- Littlejohn, T.G., I.T. Paulsen, M.T. Gillespie, J.M. Tennent, M. Midgley, I.G. Jones, A.S. Purewal & R.A. Skurray (1992). Substrate specificity and energetics of antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* **74**(2-3): 259-265.
- Littmann, E., R. Schulte-Sutrum, B. Kloth, H. Lindermayer, H. Nienhoff & J. Weiß (2000). Praktische Schweinemast - Haltung, Fütterung, Gesundheit, Qualität, Markt, Ökonomik. BLV Verlagsgesellschaft mbH, München.
- Liu, Y.Y., Wang, Y., Walsh, T.R., Yi, L.X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L.F., Gu, D., Ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D., Zhou, H., Liang, Z., Liu, J.H., Shen, J. (2015). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* **16**(2): 161-168.
- Looft, T., T.A. Johnson, H.K. Allen, D.O. Bayles, D.P. Alt, R.D. Stedtfeld, W.J. Sul, T.M. Stedtfeld, B. Chai, J.R. Cole, S.A. Hashsham, J.M. Tiedje & T.B. Stanton (2012). In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**(5): 1691-1696.
- Löser, R. & F. Deerberg (2004). Ökologische Schweineproduktion: Struktur, Entwicklung, Probleme, politischer Handlungsbedarf. Endbericht. Bonn.
- Lund, H.S., G. Skogtun, H. Sørum & A.V. Eggertsdóttir (2014). Absence of bacterial DNA in culture-negative urine from cats with and without lower urinary tract disease. *Journal of Feline Medicine and Surgery*
- Madigan, M.T., T.D. Brock, J.M. Martinko, D.P. Clark & D.A. Stahl (2013). Brock Mikrobiologie. Pearson Studium, Hallbergmoos.
- Manges, A.R. & J.R. Johnson (2012). Food-borne origins of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. *Clin Infect Dis* **55**(5): 712-719.
- Marathe, N.P., V.R. Regina, S.A. Walujkar, S.S. Charan, E.R.B. Moore, D.G.J. Larsson & Y.S. Shouche (2013). A treatment plant receiving waste water from multiple bulk drug manufacturers is a reservoir for highly multi-drug resistant integron-bearing bacteria. *PLoS One* **8**(10): e77310.

- Marshall, B., D. Petrowski & S.B. Levy (1990). Inter- and intraspecies spread of *Escherichia coli* in a farm environment in the absence of antibiotic usage. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**(17): 6609-6613.
- Martinez, J.L. (2009). Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ Pollut* **157**(11): 2893-2902.
- Martínez, J.L. (2008). Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Natural Environments. *Science* **321**(5887): 365-367.
- Mateu, E. & M. Martin (2001). Why is Anti-Microbial Resistance a Veterinary Problem As Well? *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **48**(8): 569-581.
- Maxcy, R.B., N.P. Tiwari & P.R. Soprey (1971). Changes in *Escherichia coli* Associated with Acquired Tolerance for Quaternary Ammonium Compounds. *Appl Microbiol* **22**(2): 229-232.
- Maynard, C., J.M. Fairbrother, S. Bekal, F. Sanschagrin, R.C. Levesque, R. Brousseau, L. Masson, S. Lariviere & J. Harel (2003). Antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* O149:K91 isolates obtained over a 23-year period from pigs. *Antimicrob Agents Chemother* **47**(10): 3214-3221.
- McKinney, C.W., K.A. Loftin, M.T. Meyer, J.G. Davis & A. Pruden (2010). *tet* and *sul* antibiotic resistance genes in livestock lagoons of various operation type, configuration, and antibiotic occurrence. *Environ Sci Technol* **44**(16): 6102-6109.
- Medigue, C., T. Rouxel, P. Vigier, A. Henaut & A. Danchin (1991). Evidence for horizontal gene transfer in *Escherichia coli* speciation. *J Mol Biol* **222**(4): 851-856.
- Mellmann, A., D. Harmsen, C.A. Cummings, E.B. Zentz, S.R. Leopold, A. Rico, K. Prior, R. Szczepanowski, Y. Ji, W. Zhang, S.F. McLaughlin, J.K. Henkhaus, B. Leopold, M. Bielaszewska, R. Prager, P.M. Brzoska, R.L. Moore, S. Guenther, J.M. Rothberg & H. Karch (2011). Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. *PLoS One* **6**(7): e22751.
- Miller, J.M. (2013). Whole-genome mapping: a new paradigm in strain-typing technology. *J Clin Microbiol* **51**(4): 1066-1070.
- Miranda, J.M., B.I. Vázquez, C.A. Fente, J. Barros-Velázquez, A. Cepeda & C.M. Franco Abuín (2008). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* strains isolated from organic and conventional pork meat: a comparative survey. *Europ Food Res Tech* **226**(3): 371-375.
- Modi, S.R., H.H. Lee, C.S. Spina & J.J. Collins (2013). Antibiotic treatment expands the resistance reservoir and ecological network of the phage metagenome. *Nature* **499**(7457): 219-222.
- Mokaddas, E.M. & S.C. Sanyal (1999). Resistance patterns of *Pseudomonas aeruginosa* to carbapenems and piperacillin/tazobactam. *J Chemother* **11**(2): 93-96.

- Mølbak, K. (2004). Spread of resistant bacteria and resistance genes from animals to humans – the public health consequences. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **51**(8-9): 364-369.
- Møller, H.B., S.G. Sommer & B.K. Ahring (2002). Separation efficiency and particle size distribution in relation to manure type and storage conditions. *Bioresour Technol* **85**(2): 189-196.
- Mossel, D.A.A. (1983). Marker (index and indicator) organisms in food and drinking water. Semantics, ecology, taxonomy and enumeration. *Antonie van Leeuwenhoek* **48**(6): 609-611.
- Nataro, J.P. & J.B. Kaper (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **11**(1): 142-201.
- Neu, H.C. (1992). The crisis in antibiotic resistance. *Science* **257**(5073): 1064-1073.
- Newman, D.J. & G.M. Cragg (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod* **70**(3): 461-477.
- NFSTC. (2015). Chelex® 100 Extraction Process. from [http://projects.nfstc.org/pdi/Subject03/pdi\\_s03\\_m03\\_01.htm](http://projects.nfstc.org/pdi/Subject03/pdi_s03_m03_01.htm).
- Nijsten, R., N. London, A. Van Den Bogaard & E. Stobberingh (1996). Antibiotic resistance among *Escherichia coli* isolated from faecal samples of pig farmers and pigs. *J Antimicrob Chemother* **37**(6): 1131-1140.
- Nikaido, H. (1998). Antibiotic resistance caused by gram-negative multidrug efflux pumps. *Clin Infect Dis* **27**(Supplement 1): S32-S41.
- Normark, B.H. & S. Normark (2002). Evolution and spread of antibiotic resistance. *J Intern Med* **252**(2): 91-106.
- O'Brien, T.F. (2002). Emergence, spread, and environmental effect of antimicrobial resistance: how use of an antimicrobial anywhere can increase resistance to any antimicrobial anywhere else. *Clin Infect Dis* **34**(Supplement 3): S78-S84.
- Ochman, H., J.G. Lawrence & E.A. Groisman (2000). Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* **405**(6784): 299-304.
- Ogura, Y., T. Ooka, A. Iguchi, H. Toh, M. Asadulghani, K. Oshima, T. Kodama, H. Abe, K. Nakayama, K. Kurokawa, T. Tobe, M. Hattori & T. Hayashi (2009). Comparative genomics reveal the mechanism of the parallel evolution of O157 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**(42): 17939-17944.
- Oppegaard, H., T.M. Steinum & Y. Wasteson (2001). Horizontal transfer of a multi-drug resistance plasmid between coliform bacteria of human and bovine origin in a farm environment. *Appl Environ Microbiol* **67**(8): 3732-3734.
- Ørskov, F. & I. Ørskov (1984). Serotyping of *Escherichia coli*. *Methods in Microbiology*. T. Bergan. Academic Press: 43-112.

- Ortega Morente, E., M.A. Fernández-Fuentes, M.J. Grande Burgos, H. Abriouel, R. Pérez Pulido & A. Gálvez (2013). Biocide tolerance in bacteria. *Int J Food Microbiol* **162**(1): 13-25.
- Oshima, K., H. Toh, Y. Ogura, H. Sasamoto, H. Morita, S.-H. Park, T. Ooka, S. Iyoda, T.D. Taylor, T. Hayashi, K. Itoh & M. Hattori (2008). Complete genome sequence and comparative analysis of the wild-type commensal *Escherichia coli* strain SE11 isolated from a healthy adult. *DNA Research* **15**(6): 375-386.
- Pagani, L., E. Dell'Amico, R. Migliavacca, M.M. D'Andrea, E. Giacobone, G. Amicosante, E. Romero & G.M. Rossolini (2003). Multiple CTX-M-type Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in nosocomial isolates of Enterobacteriaceae from a hospital in Northern Italy. *J Clin Microbiol* **41**(9): 4264-4269.
- Partridge, S.R., G. Tsafnat, E. Coiera & J.R. Iredell (2009). Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol Rev* **33**(4): 757-784.
- Paulson, D.S. (2002). Handbook of Topical Antimicrobials: Industrial Applications in Consumer Products and Pharmaceuticals. CRC Press, Boca Raton.
- Peak, N., C.W. Knapp, R.K. Yang, M.M. Hanfelt, M.S. Smith, D.S. Aga & D.W. Graham (2007). Abundance of six tetracycline resistance genes in wastewater lagoons at cattle feedlots with different antibiotic use strategies. *Environ Microbiol* **9**(1): 143-151.
- Penadés, J.R., J. Chen, N. Quiles-Puchalt, N. Carpéna & R.P. Novick (2015). Bacteriophage-mediated spread of bacterial virulence genes. *Curr Opin Microbiol* **23**(0): 171-178.
- Perreten, V. & P. Boerlin (2003). A new sulfonamide resistance gene (sul3) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland. *Antimicrob Agents Chemother* **47**(3): 1169-1172.
- Perry, J.A. & G.D. Wright (2013). The antibiotic resistance "mobilome": searching for the link between environment and clinic. *Front Microbiol* **4**: 138.
- Petternel, C., H. Galler, G. Zarfel, J. Luxner, D. Haas, A.J. Grisold, F.F. Reinthaler & G. Feierl (2014). Isolation and characterization of multidrug-resistant bacteria from minced meat in Austria. *Food Microbiol* **44**: 41-46.
- Pfeifer, Y., W. Witte, M. Holfelder, J. Busch, P. Nordmann & L. Poirel (2011). NDM-1-Producing *Escherichia coli* in Germany. *Antimicrob Agents Chemother* **55**(3): 1318-1319.
- Philippon, A., R. Labia & G. Jacoby (1989). Extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **33**(8): 1131.
- Poirel, L., P. Kämpfer & P. Nordmann (2002). Chromosome-encoded ambler class A  $\beta$ -lactamase of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **46**(12): 4038-4040.

- Rådström, P. & G. Swedberg (1988). RSF1010 and a conjugative plasmid contain *sulII*, one of two known genes for plasmid-borne sulfonamide resistance dihydropteroate synthase. *Antimicrob Agents Chemother* **32**(11): 1684-1692.
- Rådström, P., G. Swedberg & O. Sköld (1991). Genetic analyses of sulfonamide resistance and its dissemination in gram-negative bacteria illustrate new aspects of R plasmid evolution. *Antimicrob Agents Chemother* **35**(9): 1840-1848.
- Ramaswamy, S. & J.M. Musser (1998). Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tuber Lung Dis* **79**(1): 3-29.
- Ramchandani, M., A.R. Manges, C. DebRoy, S.P. Smith, J.R. Johnson & L.W. Riley (2005). Possible animal origin of human-associated, multidrug-resistant, uropathogenic *Escherichia coli*. *Clin Infect Dis* **40**(2): 251-257.
- Ramos, S., N. Silva, M. Caniça, J.L. Capelo-Martinez, F. Brito, G. Igrejas & P. Poeta (2013). High prevalence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* from animals at slaughter: A food safety risk. *J Sci Food Agric* **93**(3): 517-526.
- Recchia, G.D. & R.M. Hall (1995). Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology* **141** (Pt 12): 3015-3027.
- Rivera, I.G., M.A. Chowdhury, A. Huq, D. Jacobs, M.T. Martins & R.R. Colwell (1995). Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences and the PCR to generate fingerprints of genomic DNAs from *Vibrio cholerae* O1, O139, and non-O1 strains. *Appl Environ Microbiol* **61**(8): 2898-2904.
- RKI (2014). Infektionsepidiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2013. Berlin, Robert Koch Institut.
- Robberts, F.J.L., P.C. Kohner & R. Patel (2009). Unreliable extended-spectrum  $\beta$ -lactamase detection in the presence of plasmid-mediated AmpC in *Escherichia coli* clinical isolates. *J Clin Microbiol* **47**(2): 358-361.
- Roberts, M.C. (2005). Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiol Lett* **245**(2): 195-203.
- Roberts, M.C. (2011). Environmental macrolide-mincosamide-streptogramin and tetracycline resistant bacteria. *Front Microbiol* **2**.
- Roche, J.K., A. Cabel, J. Sevilleja, J. Nataro & R.L. Guerrant (2010). Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) impairs growth while malnutrition worsens EAEC infection: a novel murine model of the infection malnutrition cycle. *J Infect Dis* **202**(4): 506-514.
- Rodloff, A., T. Bauer, S. Ewig, P. Kujath & E. Müller (2008). Sensibel, intermediär und resistent – Wirkintensität von Antibiotika. *Dtsch Ärztebl*. **105**(39): 657-662.
- Rosengren, L.B., C.L. Waldner, R.J. Reid-Smith, P.M. Dowling & J.C.S. Harding (2007). Associations between feed and water antimicrobial use in farrow-to-finish swine herds and antimicrobial resistance of fecal *Escherichia coli* from grow-finish pigs. *Microb Drug Resist* **13**(4): 261-269.

- Rouch, D.A., D.S. Cram, D. Di Berardino, T.G. Littlejohn & R.A. Skurray (1990). Efflux-mediated antiseptic resistance gene *qacA* from *Staphylococcus aureus*: common ancestry with tetracycline- and sugar-transport proteins. *Mol Microbiol* **4**(12): 2051-2062.
- Russell, A.D. (2000). Do biocides select for antibiotic resistance? *J Pharm Pharmacol* **52**(2): 227-233.
- Salak-Johnson, J.L., S.R. Niekamp, S.L. Rodriguez-Zas, M. Ellis & S.E. Curtis (2007). Space allowance for dry, pregnant sows in pens: Body condition, skin lesions, and performance. *J Anim Sci* **85**(7): 1758-1769.
- Salyers, A.A., N.B. Shoemaker, A.M. Stevens & L.-Y. Li (1995). Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. *Microbiol Rev* **59**(4): 579-590.
- Sarmah, A.K., M.T. Meyer & A.B.A. Boxall (2006). A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere* **65**(5): 725-759.
- Schubert, S. & A. Wieser (2010). MALDI-TOF MS in der mikrobiologischen Diagnostik. *Biosp.* (7/2010): 760-762.
- Schuurmans, J.M., S.A.F.T. van Huijum, J.R. Piet, N. Händel, J. Smelt, S. Brul & B.H. ter Kuile (2014). Effect of growth rate and selection pressure on rates of transfer of an antibiotic resistance plasmid between *E. coli* strains. *Plasmid* **72**: 1-8.
- Schwabe, C.W. (1984). Veterinary Medicine and Human Health. Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Schwabe, U. & D. Paffrath (2014). Arzneiverordnungs-Report 2014: Aktuelle Daten, Kosten, Trends und Kommentare. Springer Berlin Heidelberg.
- Schwaiger, K., K. Harms, C. Hölzel, K. Meyer, M. Karl & J. Bauer (2009). Tetracycline in liquid manure selects for co-occurrence of the resistance genes *tet*(M) and *tet*(L) in *Enterococcus faecalis*. *Vet Microbiol* **139**(3-4): 386-392.
- Schwaiger, K., C. Hölzel & J. Bauer (2010). Resistance gene patterns of tetracycline resistant *Escherichia coli* of human and porcine origin. *Vet Microbiol* **142**(3-4): 329-336.
- Schwaiger, K., S. Huther, C. Hoelzel, P. Kaempf & J. Bauer (2012). Prevalence of antibiotic-resistant enterobacteriaceae isolated from chicken and pork meat purchased at the slaughterhouse and at retail in Bavaria, Germany. *Int J Food Microbiol* **154**(3): 206-211.
- Schwarz, S., A. Böttner, H.M. Hafez, C. Kehrenber, M. Kietzmann, D. Klarmann, G. Klein, P. Krabisch, T. Kühn, G. Luhofer, A. Richter, W. Traeder, K.H. Waldmann, J. Wallmann & C. Werckenthin (2003). Empfindlichkeitsprüfung bakterieller Infektionserreger von Tieren: Methoden zur in-vitro Empfindlichkeitsprüfung und deren Eignung in Hinblick auf die Erarbeitung therapeutisch nutzbarer Ergebnisse. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **116**: 353-361.

- Schwarz, S., P. Silley, S. Simjee, N. Woodford, E. van Duijkeren, A.P. Johnson & W. Gaastra (2010). Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *Vet Microbiol* **141**(1–2): 1-4.
- Schwieger, F. & C.C. Tebbe (1998). A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Appl Environ Microbiol* **64**(12): 4870-4876.
- Selbitz, H.J., U. Truyen & P. Valentin-Weigand (2010). Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. Enke, Stuttgart.
- Selvam, A., D. Xu, Z. Zhao & J.W. Wong (2012). Fate of tetracycline, sulfonamide and fluoroquinolone resistance genes and the changes in bacterial diversity during composting of swine manure. *Bioresour Technol* **126**: 383-390.
- Sharp, H., L. Valentin, J. Fischer, B. Guerra, B. Appel & A. Kasbohrer (2014). Abschätzung des Transfers von ESBL-bildenden *Escherichia coli* zum Menschen für Deutschland. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* **127**(11-12): 464-477.
- Sharples, G.J. & R.G. Lloyd (1990). A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. *Nucleic Acids Res* **18**(22): 6503-6508.
- Singer, R.S., R. Finch, H.C. Wegener, R. Bywater, J. Walters & M. Lipsitch (2003). Antibiotic resistance—the interplay between antibiotic use in animals and human beings. *Lancet Infect Dis* **3**(1): 47-51.
- Sköld, O. (2001). Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Vet Res* **32**(3-4): 261-273.
- Smalla, K., H. Heuer, A. Gotz, D. Niemeyer, E. Krogerrecklenfort & E. Tietze (2000). Exogenous isolation of antibiotic resistance plasmids from piggery manure slurries reveals a high prevalence and diversity of IncQ-like plasmids. *Appl Environ Microbiol* **66**(11): 4854-4862.
- Smillie, C.S., M.B. Smith, J. Friedman, O.X. Cordero, L.A. David & E.J. Alm (2011). Ecology drives a global network of gene exchange connecting the human microbiome. *Nature* **480**(7376): 241-244.
- Smith, H. (1969). Transfer of antibiotic resistance from animal and human strains of *Escherichia coli* to resident *E. coli* in the alimentary tract of man. *The Lancet* **293**(7607): 1174-1176.
- Smith, K.E., J.M. Besser, C.W. Hedberg, F.T. Leano, J.B. Bender, J.H. Wicklund, B.P. Johnson, K.A. Moore & M.T. Osterholm (1999). Quinolone-resistant *Campylobacter jejuni* infections in Minnesota, 1992-1998. Investigation Team. *N Engl J Med* **340**(20): 1525-1532.
- Sojka, W.J. (1965). *Escherichia coli* in domestic animals and poultry.
- Song, J.W. & K.C. Chung (2010). Observational studies: cohort and case-control studies. *Plast Reconstr Surg* **126**(6): 2234-2242.

- Sorensen, T.L., M. Blom, D.L. Monnet, N. Frimodt-Møller, R.L. Poulsen & F. Espersen (2001). Transient intestinal carriage after ingestion of antibiotic-resistant *Enterococcus faecium* from chicken and pork. *N Engl J Med* **345**(16): 1161-1166.
- Sousa, J., G. Alves, A. Fortuna & A. Falcão (2012). Analytical methods for determination of new fluoroquinolones in biological matrices and pharmaceutical formulations by liquid chromatography: a review. *Anal Bioanal Chem* **403**(1): 93-129.
- Spratt, B.G., W.P. Hanage & E.J. Feil (2001). The relative contributions of recombination and point mutation to the diversification of bacterial clones. *Curr Opin Microbiol* **4**(5): 602-606.
- Springer, B. & K. Bruckner (2012). Characterization of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* from raw meat and comparison to human isolates. *Wien. Tierärztl. Mschr.* **99**: 44-50.
- Starr, M.P. & D.M. Reynolds (1951). Streptomycin resistance of coliform bacteria from turkeys fed streptomycin. *Am J Public Health Nations Health* **41**(11 Part 1): 1375-1380.
- Stokes, H.W. & R.M. Hall (1989). A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol Microbiol* **3**(12): 1669-1683.
- Storteboom, H.N., S.C. Kim, K.C. Doesken, K.H. Carlson, J.G. Davis & A. Pruden (2007). Response of antibiotics and resistance genes to high-intensity and low-intensity manure management. *J Environ Qual* **36**(6): 1695-1703.
- Street, B.R. & H.W. Gonyou (2008). Effects of housing finishing pigs in two group sizes and at two floor space allocations on production, health, behavior, and physiological variables. *J Anim Sci* **86**(4): 982-991.
- Struelens, M.J. (1998). Molecular epidemiologic typing systems of bacterial pathogens: current issues and perspectives. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **93**(5): 581-585.
- Stürenburg, E. & D. Mack (2003). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. *J Infect* **47**(4): 273-295.
- Sundsfjord, A., G. Skov Simonsen & P. Courvalin (2001). Human infections caused by glycopeptide-resistant *Enterococcus* spp: are they a zoonosis? *Clin Microbiol Infect* **7**: 16-33.
- Sundström, L., P. Rådström, G. Swedberg & O. Sköld (1988). Site-specific recombination promotes linkage between trimethoprim- and sulfonamide resistance genes. Sequence characterization of dhfrV and *sul*(I) and a recombination active locus of Tn21. *Mol Gen Genet* **213**(2-3): 191-201.
- Swedberg, G., C. Fermér & O. Sköld (1993). Point Mutations in the Dihydropteroate Synthase Gene Causing Sulfonamide Resistance. Chemistry and Biology of Pteridines and Folates. J. Ayling, M. G. Nair and C. Baugh. Springer

US. **338**: 555-558.

Swedberg, G. & O. Sköld (1980). Characterization of different plasmid-borne dihydropteroate synthases mediating bacterial resistance to sulfonamides. *J Bacteriol* **142**(1): 1-7.

Taylor, D.E. & A. Chau (1996). Tetracycline resistance mediated by ribosomal protection. *Antimicrob Agents Chemother* **40**(1): 1-5.

Taylor, D.J. (1999). Antimicrobial use in animals and its consequences for human health. *Clin. Microbiol. Infect* **5**(3): 119-124.

Tennent, J.M., B.R. Lyon, M. Midgley, I.G. Jones, A.S. Purewal & R.A. Skurray (1989). Physical and biochemical characterization of the *qacA* gene encoding antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Gen Microbiol* **135**(1): 1-10.

Tenover, F.C. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Infect Control* **119**(6, Supplement 1): S3-S10.

Threlfall, E.J., L.R. Ward, J.A. Frost & G.A. Willshaw (2000). The emergence and spread of antibiotic resistance in food-borne bacteria. *Int J Food Microbiol* **62**(1-2): 1-5.

Tschäpe, H., E. Tietze, R. Prager, W. Voigt, E. Wolter & G. Seltmann (1984). Plasmid-borne streptothrin resistance in gram-negative bacteria. *Plasmid* **12**(3): 189-196.

Udikovic-Kolic, N., F. Wichmann, N.A. Broderick & J. Handelsman (2014). Bloom of resident antibiotic-resistant bacteria in soil following manure fertilization. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**(42): 15202-15207.

Ueda, Y., S. Ohtsuki & N. Narukawa (1995). Efficacy of florfenicol on experimental *Actinobacillus pleuropneumonia* in pigs. *J Vet Med Sci* **57**(2): 261-265.

van den Bogaard, A.E. & E.E. Stobberingh (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics: Links between animals and humans. *Int J Antimicrob Agents* **14**(4): 327-335.

Van Rennings, L., R. Merle, C. Münchhausen, J. Stahl, W. Honscha, A. Käsbohrer & L. Kreienbrock (2013). Variablen zur Beschreibung des Antibiotikaeinsatzes beim Lebensmittelliefernden Tier. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **13**(07-08): 297-309.

Van Rennings, L., C. Von Münchhausen, W. Honscha, H. Ottolie, A. Käsbohrer & L. Kreienbrock (2013). Repräsentative Verbrauchsmengenerfassung von Antibiotika in der Nutztierhaltung - Kurzbericht über die Ergebnisse der Studie "VetCAB-Pilot". <http://www.vetcab.de/index.htm>.

van Treeck, U., F. Schmidt & B. Wiedemann (1981). Molecular nature of a streptomycin and sulfonamide resistance plasmid (pBP1) prevalent in clinical *Escherichia coli* strains and integration of an ampicillin resistance transposon (TnA). *Antimicrob Agents Chemother* **19**(3): 371-380.

- Van, T.T., J. Chin, T. Chapman, L.T. Tran & P.J. Coloe (2008). Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: an analysis of *Escherichia coli* isolations for antibiotic resistance and virulence genes. *Int J Food Microbiol* **124**(3): 217-223.
- Vedantam, G., G.G. Guay, N.E. Austria, S.Z. Doktor & B.P. Nichols (1998). Characterization of mutations contributing to sulfathiazole resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **42**(1): 88-93.
- Versalovic, J., T. Koeuth & J.R. Lupski (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* **19**(24): 6823-6831.
- Versalovic, J., T. Koeuth, E.R. McCabe & J.R. Lupski (1991). Use of the polymerase chain reaction for physical mapping of *Escherichia coli* genes. *J Bacteriol* **173**(17): 5253-5255.
- VO(EG)\_882 (2004). Verordnung (EG) Nr. 882/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 über amtliche Kontrollen zur Überprüfung der Einhaltung des Lebensmittel- und Futtermittelrechts sowie der Bestimmungen über Tiergesundheit und Tierschutz, Commission Européenne.
- VO(EG)\_1831 (2003). Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 des europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2003 über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung, Commission Européenne.
- VO(EU)\_37 (2010). Verordnung (EU) Nr.37/2010 der Kommission vom 22. Dezember 2009 über pharmakologisch wirksames Stoffe und ihre Einstufung hinsichtlich der Rückstandshöchstmengen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs, Commission Européenne.
- Waldmann, K.H., H. Plonait & K. Bickhardt (2004). Lehrbuch der Schweinekrankheiten. Parey, Stuttgart.
- Walsh, C. & G. Wright (2005). Introduction: antibiotic resistance. *Chem Rev* **105**(2): 391-394.
- Walsh, F. & B. Duffy (2013). The culturable soil antibiotic resistome: a community of multi-drug resistant bacteria. *PLoS One* **8**(6): e65567.
- Walsh, P.S., D.A. Metzger & R. Higuchi (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* **10**(4): 506-513.
- Wang, C., Q. Zhan, Z. Mi, Z. Huang & G. Chen (2008). Distribution of the antiseptic-resistance gene *qacEΔ1* in 283 clinical isolates of gram-negative bacteria in China. *J Hos Infect* **69**(4): 394-396.
- Wang, M., J.H. Tran, G.A. Jacoby, Y. Zhang, F. Wang & D.C. Hooper (2003). Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother* **47**(7): 2242-2248.
- Wang, N., X. Yang, S. Jiao, J. Zhang, B. Ye & S. Gao (2014). Sulfonamide-resistant bacteria and their resistance genes in soils fertilized with manures from Jiangsu Province, Southeastern China. *PLoS One* **9**(11): e112626.

- Wasinski, B., H. Rozanska & J. Osek (2013). Occurrence of extended spectrum beta-lactamase-and AmpC-producing *Escherichia coli* in meat samples. *Bulletin of the Vet Inst Pulawy* **57**(4): 513-517.
- Werner, C., K. Dietze & A. Sundrum (2008). Umsetzung eines Tiergesundheitsplanes auf ökologisch wirtschaftenden Ferkelerzeugerbetrieben in Deutschland *Landbauforschung - Agr For Res* **58**(4): 271-281.
- Whitman, W.B., D.C. Coleman & W.J. Wiebe (1998). Prokaryotes: The unseen majority. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**(12): 6578-6583.
- WHO (2012). The evolving threat of antimicrobial resistance - Options for action, World Health Organization.
- WHO (2014). Antimicrobial resistance - Fact sheet N°194.
- WHO (2014). Antimicrobial Resistance - Global Report on Surveillance 2014, World Health Organization.
- Wiener, J., J.P. Quinn, P.A. Bradford, R.V. Goering, C. Nathan, K. Bush & R.A. Weinstein (1999). Multiple antibiotic-resistant *Klebsiella* and *Escherichia coli* in nursing homes. *Jama* **281**(6): 517-523.
- Wilson, L.A. & P.M. Sharp (2006). Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) sequences in *Escherichia coli*: Evolution and implications for ERIC-PCR. *Mol Biol Evol* **23**(6): 1156-1168.
- Wirth, T., D. Falush, R. Lan, F. Colles, P. Mensa, L.H. Wieler, H. Karch, P.R. Reeves, M.C.J. Maiden, H. Ochman & M. Achtman (2006). Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol Microbiol* **60**(5): 1136-1151.
- Witte, W., H. Heier, I. Klare, H. Ludwig, R. Hummel, K. Ziesche, H. Ludke, S. Schmidt & H. Rische (1984). The development of antibiotic resistance of coliform bacteria in connection with the nutritional use of nourseothricin in swine. *Arch Exp Vet* **38**(6): 807-815.
- Wolfe, A.J., E. Toh, N. Shibata, R. Rong, K. Kenton, M. FitzGerald, E.R. Mueller, P. Schreckenberger, Q. Dong, D.E. Nelson & L. Brubaker (2012). Evidence of uncultivated bacteria in the adult female bladder. *J Clin Microbiol* **50**(4): 1376-1383.
- Wright, G.D. (2007). The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nat Rev Micro* **5**(3): 175-186.
- Wright, G.D. (2010). Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? *Curr Opin Microbiol* **13**(5): 589-594.
- Wu, S., A. Dalsgaard, A.M. Hammerum, L.J. Porsbo & L.B. Jensen (2010). Prevalence and characterization of plasmids carrying sulfonamide resistance genes among *Escherichia coli* from pigs, pig carcasses and human. *Acta Vet Scand* **52**(1): 47-47.
- Wu, S., A. Dalsgaard, A.R. Vieira, H.-D. Emborg & L.B. Jensen (2009). Prevalence of tetracycline resistance and genotypic analysis of populations of

*Escherichia coli* from animals, carcasses and cuts processed at a pig slaughterhouse. *Int J Food Microbiol* **135**(3): 254-259.

Yang, J.L., M.S. Wang, A.C. Cheng, K.C. Pan, C.F. Li & S.X. Deng (2008). A simple and rapid method for extracting bacterial DNA from intestinal microflora for ERIC-PCR detection. *World J Gastroenterol* **14**(18): 2872-2876.

Yang, W., I.F. Moore, K.P. Koteva, D.C. Bareich, D.W. Hughes & G.D. Wright (2004). *tet(X)* Is a flavin-dependent monooxygenase conferring resistance to tetracycline antibiotics. *J Biol Chem* **279**(50): 52346-52352.

Yatsunenko, T., F.E. Rey, M.J. Manary, I. Trehan, M.G. Dominguez-Bello, M. Contreras, M. Magris, G. Hidalgo, R.N. Baldassano, A.P. Anokhin, A.C. Heath, B. Warner, J. Reeder, J. Kuczynski, J.G. Caporaso, C.A. Lozupone, C. Lauber, J.C. Clemente, D. Knights, R. Knight & J.I. Gordon (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* **486**(7402): 222-+.

Ye, X., W. Liu, Y. Fan, X. Wang, J. Zhou, Z. Yao & S. Chen (2015). Frequency-risk and duration-risk relations between occupational livestock contact and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage among workers in Guangdong, China. *Am J Infect Control* **43**(7): 676-681.

Yong, D., M.A. Toleman, C.G. Giske, H.S. Cho, K. Sundman, K. Lee & T.R. Walsh (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. *Antimicrob Agents Chemother* **53**(12): 5046-5054.

Zechner, E., F. De La Cruz, R. Eisenbrandt, A. Grahn, G. Koraimann, E. Lanka, G. Muth, W. Pansegrau, C. Thomas & B. Wilkins (2000). Conjugative-DNA transfer processes.

Zhao, W.H., G. Chen, R. Ito, S. Kimura & Z.Q. Hu (2012). Identification of a plasmid-borne *blaIMP-11* gene in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J Med Microbiol* **61**(Pt 2): 246-251.

Zhu, Y.G., T.A. Johnson, J.Q. Su, M. Qiao, G.X. Guo, R.D. Stedtfeld, S.A. Hashsham & J.M. Tiedje (2013). Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**(9): 3435-3440.

Zinsstag, J., E. Schelling, D. Waltner-Toews & M. Tanner (2011). From “one medicine” to “one health” and systemic approaches to health and well-being. *Prev Vet Med* **101**(3-4): 148-156.

Zou, L., J. Meng, P.F. McDermott, F. Wang, Q. Yang, G. Cao, M. Hoffmann & S. Zhao (2014). Presence of disinfectant resistance genes in *Escherichia coli* isolated from retail meats in the USA. *J Antimicrob Chemother* **69**(10): 2644-2649.

## X ANHANG

**Tabelle 34: Übersicht der zur ERIC-Analyse herangezogenen *E. coli*-Isolate (n = 657), Betrieb A6**

**Tabelle 35: Übersicht der zur ERIC-Analyse herangezogenen *E. coli*-Isolate (n = 671), Betrieb A21**

Proband	Probenahmezeitpunkt							Schlachtdaten		
	1T1	1T2	1T5	1T12	02-14	03-14	04-14	05-14	Caecum	Rektum
S1	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
S2	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
S3	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
S4	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
S5	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
P1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
P2	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓			

**Tabelle 36: Übersicht der zur ERIC-Analyse herangezogenen *E. coli*-Isolate (n = 1195), Betrieb E5**



**Tabelle 37: Übersicht der zur ERIC-Analyse herangezogenen *E. coli*-Isolate (n = 243), Betrieb J20**

Proband	Probenahmezeitpunkt		
	04-14	05-14	06-14
S1	✓	✓	✓
S2	✓	✓	✓
S3	✓	✓	✓
S4	✓	✓	✓
S5	✓	✓	✓
P1	✓	✓	✓
P2	✓	✓	✓

Score 1635 bits (885)	Expect 0.0	Identities 887/888 (99%)	Gaps 0/888 (0%)	Strand Plus/Plus
Query 1	GTGAAACCAACATAACCCCTGATCGTAATTCTGAGCACTGTCGCGCTCGACGCTGTCGGC	60		
Sbjct 5657	GTGAAACCAACAGACCCCTGATCGTAATTCTGAGCACTGTCGCGCTCGACGCTGTCGGC	5716		
Query 61	ATCGGCCTGATTATGCCGGTGTGCCGGGCTCTGCCGATCTGGTTCACTCGAACGAC	120		
Sbjct 5717	ATCGGCCTGATTATGCCGGTGTGCCGGGCTCTGCCGATCTGGTTCACTCGAACGAC	5776		
Query 121	GTCACCGCCACTATGGCATTCTGCTGGCGCTGTATCGCTTGTGCAATTGCGCTGCGCA	180		
Sbjct 5777	GTCACCGCCACTATGGCATTCTGCTGGCGCTGTATCGCTTGTGCAATTGCGCTGCGCA	5836		
Query 181	CCTGTGCTGGCGCGCTGTGCGATCGTTCCGGCGCCGGTCTTGCCTCGCTCGCTG	240		
Sbjct 5837	CCTGTGCTGGCGCGCTGTGCGATCGTTCCGGCGCCGGTCTTGCCTCGCTCGCTG	5896		
Query 241	GCCGGCGCTGCTGTGCGACTACGCCATGGCGACGGCGCCCTTCCTTGGGTTCTCTAT	300		
Sbjct 5897	GCCGGCGCTGCTGTGCGACTACGCCATGGCGACGGCGCCCTTCCTTGGGTTCTCTAT	5956		
Query 301	ATCGGGCGGATCGTGGCGCATCACGGGGCAGCTGGGCGGTAGCGCGCTTATATT	360		
Sbjct 5957	ATCGGGCGGATCGTGGCGCATCACGGGGCAGCTGGGCGGTAGCGCGCTTATATT	6016		
Query 361	GCCGATATCACTGATGGCGATGAGCGCGCGCGACTTCGGCTTATGAGCGCTGTTTC	420		
Sbjct 6017	GCCGATATCACTGATGGCGATGAGCGCGCGCGACTTCGGCTTATGAGCGCTGTTTC	6076		
Query 421	GGGTTCGGGATGGTCGCGGGACCTGTGCTCGGTGGCTGATGGCGGTTCTCCCCCAC	480		
Sbjct 6077	GGGTTCGGGATGGTCGCGGGACCTGTGCTCGGTGGCTGATGGCGGTTCTCCCCCAC	6136		
Query 481	GCTCCGTTCTTCGCCCGGGCAGCCTTGACGGCTCAATTCTGACGGCTGTTCCCT	540		
Sbjct 6137	GCTCCGTTCTTCGCCCGGGCAGCCTTGACGGCTCAATTCTGACGGCTGTTCCCT	6196		
Query 541	TTGCCGGAGTCGCACAAAGCGAACGCCGGCGTTACGCCGGAGGCTCTCAACCCGCTC	600		
Sbjct 6197	TTGCCGGAGTCGCACAAAGCGAACGCCGGCGTTACGCCGGAGGCTCTCAACCCGCTC	6256		
Query 601	GCTTCGTTCCGGTGGGCCGGGATGACCGTCGTCGCCGCGCTGATGGCGGCTTCTTC	660		
Sbjct 6257	GCTTCGTTCCGGTGGGCCGGGATGACCGTCGTCGCCGCGCTGATGGCGGCTTCTTC	6316		
Query 661	ATCATGCAACTTGTGGACAGGTGCCGGCGCTTGGGTATTTCGGCGAGGATCGC	720		
Sbjct 6317	ATCATGCAACTTGTGGACAGGTGCCGGCGCTTGGGTATTTCGGCGAGGATCGC	6376		
Query 721	TTTCACTGGGACGCGACCACGATCGGATTTCGCTTGCCTGGCATTCTGCATTCA	780		
Sbjct 6377	TTTCACTGGGACGCGACCACGATCGGATTTCGCTTGCCTGGCATTCTGCATTCA	6436		
Query 781	CTCGCCCAAGCAATGATCACCGGCCCTGTAGCCGCCGGCTGGCGAAAGGCCGGCACTC	840		
Sbjct 6437	CTCGCCCAAGCAATGATCACCGGCCCTGTAGCCGCCGGCTGGCGAAAGGCCGGCACTC	6496		
Query 841	ATGCTCGGAATGATTGCCGACGGCACAGGCTACATCCTGCTTGCCTTC	888		
Sbjct 6497	ATGCTCGGAATGATTGCCGACGGCACAGGCTACATCCTGCTTGCCTTC	6544		

**Abbildung 96: Verknüpfte Sequenzen von *Salmonella* [4,5,12:i:-] (= Query) und Genbank-Eintrag AF542061.1 (= Sbjct)**

Score 381 bits (206)	Expect 2e-108	Identities 206/206 (100%)	Gaps 0/206 (0%)	Strand Plus/Plus
Query 1	TACGTGAATTATTGCTCGGAAGATATCGCTAACCAATTGGCTATTGCTTGCACATT	60		
Sbjct 27719	TACGTGAATTATTGCTCGGAAGATATCGCTAACCAATTGGCTATTGCTTGCACATT	27778		
Query 61	ATGCGTTAACAGGTTATTTGCTCTGGCTGGAAAAATGCTGACCGATTGGTC	120		
Sbjct 27779	ATGCGTTAACAGGTTATTTGCTCTGGCTGGAAAAATGCTGACCGATTGGTC	27838		
Query 121	GGCGCCCAAGTGTGTTGCTTAATAGGCCATCGCTGGATTACTTATTGCTGGCTT	180		
Sbjct 27839	GGCGCCCAAGTGTGTTGCTTAATAGGCCATCGCTGGATTACTTATTGCTGGCTT	27898		
Query 181	TTTCAAGTGCCTTGGATGCTGTAT	206		
Sbjct 27899	TTTCAAGTGCCTTGGATGCTGTAT	27924		

**Abbildung 97: Verknüpfte Sequenzen von *Escherichia coli* 2638 (= Query) und Genbank-Eintrag AF326777.3 (= Sbjct)**

Score 1334 bits (722)	Expect 0.0	Identities 722/722 (100%)	Gaps 0/722 (0%)	Strand Plus/Plus
Query 1	CGGCATCGTCAACATAAACCTCGGACAGTTCTCCGATGGAGGCCGGTATCTGGCGCCAGA	60		
Sbjct 1127				
Query 61	CGCAGCCATTGCGCAGGCGCGTAAGCTGATGGCCGAGGGGGCAGATGTGATCGACCTCGG	120		
Sbjct 1187				
Query 121	TCCGGCATCCAGCAATCCCAGCAGCGCGCTGTTCTCGACAGAAATCGCGCGTAT	180		
Sbjct 1247				
Query 181	CGCGCCGGTGCTGGACGCGCTCAAGGCAGATGGCATTCCCGTCTCGCTCGACAGTTATCA	240		
Sbjct 1307				
Query 241	ACCCGCGACGCAAGCCTATGCCCTGTCGCGTGGTGTGGCCTATCTCAATGATATTCGCGG	300		
Sbjct 1367				
Query 301	TTTTCCAGACGCTGCCTCTATCCGAATTGGCAAATCATCTGCCAAACTCGTCGTTAT	360		
Sbjct 1427				
Query 361	GCATTCGGTGCAAGACGGGCAGGCAGATCGGCGCGAGGCACCCGCTGGGACATCATGGA	420		
Sbjct 1487				
Query 421	TCACATTGCGCGTTCTTGACGCGCGCATCGCGCGCTGACGGGTGCCGGTATCAAACG	480		
Sbjct 1547				
Query 481	CAACCGCCTGCTCTGATCCCGGATGGGTTTTCTGGGGCTGCTCCGAAACCTC	540		
Sbjct 1607				
Query 541	GCTCTCGGTGCTGGCGCGGTTGATGAATTGCGCTGCCCTCGATTTGCCGGTGCTTCT	600		
Sbjct 1667				
Query 601	GTCTGTTCGCGCAAATCCTTCTGCGCGCGTACAGGCCGTGGTCCGGGGATGTCGG	660		
Sbjct 1727				
Query 661	GGCCGCGACACTCGCTGCAGAGCTTGCAGGCCGCCAGGTGGAGCTGACTTCATCCGAC	720		
Sbjct 1787				
Query 721	AC 722			
Sbjct 1847				
Sbjct 1848	AC 1848			

**Abbildung 98: Verknüpfte Sequenzen von *Salmonella* Typhimurium DT12 (= Query) und Genbank-Eintrag NG\_041603.1 (= Sbjct)**

Query 1	TTCGGCATTCTGAATCTCACCGAGGACTCCTTCTCGATGAGAGCCGGCGCTAGACCCC	60
Sbjct 47398	TTCGGCATTCTGAATCTCACCGAGGACTCCTTCTCGATGAGAGCCGGCGCTAGACCCC	47339
Query 61	GCCGGCGCTGTACCGCGCGATCGAAATGCTGCGAGTCGGATCAGACGTCGTGGATGTC	120
Sbjct 47338	GCCGGCGCTGTACCGCGCGATCGAAATGCTGCGAGTCGGATCAGACGTCGTGGATGTC	47279
Query 121	GGACCGGCCAGCCATCCGGACGCGAGGCCGTATGCCGCCGATGAGATCAGACGT	180
Sbjct 47278	GGACCGGCCAGCCATCCGGACGCGAGGCCGTATGCCGCCGATGAGATCAGACGT	47219
Query 181	ATTGCGCCGCTTAGACGCCCTGTCGATCAGATGCACCGTGTTCAAATGACAGCTTC	240
Sbjct 47218	ATTGCGCCGCTTAGACGCCCTGTCGATCAGATGCACCGTGTTCAAATGACAGCTTC	47159
Query 241	CAACCGGAAACCCAGCGCTATGCGCTCAAGCGCGCGTGGCTACCTGAACGATATCCAA	300
Sbjct 47158	CAACCGGAAACCCAGCGCTATGCGCTCAAGCGCGCGTGGCTACCTGAACGATATCCAA	47099
Query 301	GGATTTCTGACCCCTGCGCTCTATCCGATATTGCTGAGGCGGACTGCAGGCTGGTGGTT	360
Sbjct 47098	GGATTTCTGACCCCTGCGCTCTATCCGATATTGCTGAGGCGGACTGCAGGCTGGTGGTT	47039
Query 361	ATGCACCTAGCGCAGCGGGATGGCATTGCGCACCCGCACCGGTACCTCGACCCGAAGAC	420
Sbjct 47038	ATGCACCTAGCGCAGCGGGATGGCATTGCGCACCCGCACCGGTACCTCGACCCGAAGAC	46979
Query 421	GCGCTCGACGAGATTGTCGGTTCTCGAGGCGCGGGTTCCGCCTTGCACGGAGCGGG	480
Sbjct 46978	GCGCTCGACGAGATTGTCGGTTCTCGAGGCGCGGGTTCCGCCTTGCACGGAGCGGG	46919
Query 481	GTCGCTGCCGACCGGCTACCTCGATCCGGGATGGGATTTTCTTGAGCCCCGCACCG	540
Sbjct 46918	GTCGCTGCCGACCGGCTACCTCGATCCGGGATGGGATTTTCTTGAGCCCCGCACCG	46859
Query 541	GAAACATCGCTGCACGTGCTGCGAACCTCAAAAGCTGAAGTCGGCGTTGGGCTTCG	600
Sbjct 46858	GAAACATCGCTGCACGTGCTGCGAACCTCAAAAGCTGAAGTCGGCGTTGGGCTTCG	46799
Query 601	CTATTGGTCTCGGTGTCGGGAAATCCTCTTGGCGCCACCGTTGGCCTTGTAAAG	660
Sbjct 46798	CTATTGGTCTCGGTGTCGGGAAATCCTCTTGGCGCCACCGTTGGCCTTGTAAAG	46739
Query 661	GATCTGGTCCAGCGAGCCTTGCAGCGGAACTTCACCGGATCGGCAATGGCGTGACTAC	720
Sbjct 46738	GATCTGGTCCAGCGAGCCTTGCAGCGGAACTTCACCGGATCGGCAATGGCGTGACTAC	46679
Query 721	GTCCGCACCCACGCGCTGGAGATCTGCGAACCGCAATCACCTCTCGAAACCTCGCG	780
Sbjct 46678	GTCCGCACCCACGCGCTGGAGATCTGCGAACCGCAATCACCTCTCGAAACCTCGCG	46619
Query 781	AAATTCGCAAGTCGCGACGCCAGAGACCGAGGGTTAGATCAT	822
Sbjct 46618	AAATTCGCAAGTCGCGACGCCAGAGACCGAGGGTTAGATCAT	46577

**Abbildung 99: Verknüpfte Sequenzen von *Salmonella Typhimurium DT104* (= Query) und Genbank-Eintrag KP899803.1 (= Sbjct)**

Score 128 bits (69)	Expect 8e-34	Identities 69/69 (100%)	Gaps 0/69 (0%)	Strand Plus/Plus
Query 1	CGCATTTATTTCTTCTGTTCTGAAATCCATCCCTGTCGGTGTGCTTATGCAGT	60		
Sbjct 5456	CGCATTTATTTCTTCTGTTCTGAAATCCATCCCTGTCGGTGTGCTTATGCAGT	5515		
Query 61	CTGGTCGGG 69			
Sbjct 5516	CTGGTCGGG 5524			

**Abbildung 100: Verknüpfte Sequenzen von *Escherichia coli* 1/05 Eco4-O-L (= Query) und Genbank-Eintrag KM589496.1 (= Sbjct)**

Score 486 bits (263)	Expect 6e-134	Identities 268/270 (99%)	Gaps 1/270 (0%)	Strand Plus/Plus
Query 1	CAGCAGCCGCGGTAAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAACCGAATTACTGGCGTAAAGCGC	60		
Sbjct 336				395
Query 61	ACGCAGGCGGTTGTTAAGTCGGATGTGAAATCCCGGGCTAACCTGGAACTGCATCT	120		
Sbjct 396				455
Query 121	GATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGTAGAATTCCAGGTGAGCGGTGAAATG	180		
Sbjct 456				515
Query 181	CGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGC GGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTC	240		
Sbjct 516				575
Query 241	AGGTGCGAAAGCGCGGGTATCAAAACAGGAT	270		
Sbjct 576				604

**Abbildung 101: Verknüpfte Sequenzen von *Escherichia coli* 2638 (= Query) und Genbank-Eintrag KF756007.1 (= Sbjct)**

Score 316 bits (171)	Expect 1e-90	Identities 171/171 (100%)	Gaps 0/171 (0%)	Strand Plus/Plus
Query 1	ACAGAAAGCTTATTATATAACAGTGGAGCGATTACAGAATTAGGAAGCGTGGACAAAGGT	60		
Sbjct 70				129
Query 61	ACAACGAGGACGGATAATACGCTTTAGAACGTCAGAGAGGAATTACAATTACAGACAGGA	120		
Sbjct 130				189
Query 121	ATAACCTCTTTCAGTGGAAAATACGAAGGTGAACATCATAGACACGCCA	171		
Sbjct 190				240

**Abbildung 102: Verknüpfte Sequenzen von *Bacillus cereus* R89 (= Query) und Genbank-Eintrag AF491293.1 (= Sbjct)**

Score 1605 bits (869)	Expect 0.0	Identities 869/869 (100%)	Gaps 0/869 (0%)	Strand Plus/Plus
Query 20	TGATCGTAATTCTGAGCACTGTCGCGCTGACGCTGTCCGCATCGGCCCTGATTATGCCGG	79		
Sbjct 1	TGATCGTAATTCTGAGCACTGTCGCGCTGACGCTGTCCGCATCGGCCCTGATTATGCCGG	60		
Query 80	TGCTGCCGGGCTCCTGCGCGATCTGGTTCACTCGAACGACGTCACCGCCCCACTATGGCA	139		
Sbjct 61	TGCTGCCGGGCTCCTGCGCGATCTGGTTCACTCGAACGACGTCACCGCCCCACTATGGCA	120		
Query 140	TTCTGCTGGCGCTGTATGCGTTGATGCAATTGCGCTGCCACCTGTGCTGGCGCGCTGT	199		
Sbjct 121	TTCTGCTGGCGCTGTATGCGTTGATGCAATTGCGCTGCCACCTGTGCTGGCGCGCTGT	180		
Query 200	CGGATCGTTCGGGCGGCCGGCTTGCCTCGTCTCGCTGGCCGGCTGCTGTCGACT	259		
Sbjct 181	CGGATCGTTCGGGCGGCCGGCTTGCCTCGTCTCGCTGGCCGGCTGCTGTCGACT	240		
Query 260	ACGCCATCATGGCGACGGCGCCTTCCTTGGTTCTCTATATCGGGCGGATCGTGGCCG	319		
Sbjct 241	ACGCCATCATGGCGACGGCGCCTTCCTTGGTTCTCTATATCGGGCGGATCGTGGCCG	300		
Query 320	GCATCACCGGGCGACTGGGGCGTAGCCGGCTTATATTGCCGATATCACTGATGGCG	379		
Sbjct 301	GCATCACCGGGCGACTGGGGCGTAGCCGGCTTATATTGCCGATATCACTGATGGCG	360		
Query 380	ATGAGCGCGCGCGGACTTCGGCTTATGAGCGCTGTTCGGGATGGTCGCGG	439		
Sbjct 361	ATGAGCGCGCGCGGACTTCGGCTTATGAGCGCTGTTCGGGATGGTCGCGG	420		
Query 440	GACCTGTGCTCGGTGGCTGATGGGCGGTTCTCCCCCACGCTCCGTCTTCGCCCGCG	499		
Sbjct 421	GACCTGTGCTCGGTGGCTGATGGGCGGTTCTCCCCCACGCTCCGTCTTCGCCCGCG	480		
Query 500	CAGCCTTGAAACGGCTCAATTCTGACGGGCTGTTCTTTGCCGAGTCGCACAAAG	559		
Sbjct 481	CAGCCTTGAAACGGCTCAATTCTGACGGGCTGTTCTTTGCCGAGTCGCACAAAG	540		
Query 560	GCGAACGCCGCCGTTACGCCGGAGGCTCTAACCCGCTCGCTTCCGGTGGGCC	619		
Sbjct 541	GCGAACGCCGCCGTTACGCCGGAGGCTCTAACCCGCTCGCTTCCGGTGGGCC	600		
Query 620	GGGGCATGACCGTCGTCGCCCTGATGGCGTCTTCATCATGCAACTGTGCGAC	679		
Sbjct 601	GGGGCATGACCGTCGTCGCCCTGATGGCGTCTTCATCATGCAACTGTGCGAC	660		
Query 680	AGGTGCCGGCGCGCTTGGTCATTTGGCGAGGATCGCTTCACTGGGACGCGACCA	739		
Sbjct 661	AGGTGCCGGCGCGCTTGGTCATTTGGCGAGGATCGCTTCACTGGGACGCGACCA	720		
Query 740	CGATCGGCATTCGCTTGCCTGCGCATTGGCATTCTGCAATTCACTGCCAGGCAATGATCA	799		
Sbjct 721	CGATCGGCATTCGCTTGCCTGCGCATTGGCATTCTGCAATTCACTGCCAGGCAATGATCA	780		
Query 800	CCGGCCCTGTAGCCGCCGGCTGGCGAAAGGCGGGCACTCATGCTCGGAATGATTGCCG	859		
Sbjct 781	CCGGCCCTGTAGCCGCCGGCTGGCGAAAGGCGGGCACTCATGCTCGGAATGATTGCCG	840		
Query 860	ACGGCACAGGCTACATCCTGCTTGCCTTC	888		
Sbjct 841	ACGGCACAGGCTACATCCTGCTTGCCTTC	869		

**Abbildung 103: Verknüpfte Sequenzen von *Salmonella* [4,5,12:i:-] (= Query) und Probe „A6-11-13-S13“ (= Sbjct)**

Score 381 bits (206)	Expect 5e-111	Identities 206/206 (100%)	Gaps 0/206 (0%)	Strand Plus/Plus
Query 1	TACGTGAATTATTGCTTCGGAAGATATCGCTAACCACTTGGCGTATTGCTTGCAC	TTT	60	
Sbjct 1	TACGTGAATTATTGCTTCGGAAGATATCGCTAACCACTTGGCGTATTGCTTGCAC	TTT	60	
Query 61	ATGCGTTAATGCAGGTTATCTTGCTCCTGGCTTGGAAAAATGTCGACCGATTGG	TC	120	
Sbjct 61	ATGCGTTAATGCAGGTTATCTTGCTCCTGGCTTGGAAAAATGTCGACCGATTGG	TC	120	
Query 121	GGCGCCCAGTGCCTGTTGTCATTAATAGGCGCATCGCTGGATTACTTATTGCTGG	CTT	180	
Sbjct 121	GGCGCCCAGTGCCTGTTGTCATTAATAGGCGCATCGCTGGATTACTTATTGCTGG	CTT	180	
Query 181	TTTCAAGTGCCTTGGATGCTGTAT	206		
Sbjct 181	TTTCAAGTGCCTTGGATGCTGTAT	206		

**Abbildung 104: Verknüpfte Sequenzen von *Escherichia coli* 2638 (= Query) und Probe „A6-11-13-P1“ (= Sbjct)**

Score 1310 bits (709)	Expect 0.0	Identities 716/722 (99%)	Gaps 0/722 (0%)	Strand Plus/Plus
Query 1	CGGCATCGTCAACATAACCTCGGACAGTTCTCCGATGGAGGCCGGATCTGGCGCCAGA	GA	60	
Sbjct 1	CGGCATCGTCAACATAACCTCGGACAGTTCTCCGATGGAGGCCGGATCTGGCGCCAGA	GA	60	
Query 61	CGCAGCCATTGCGCAGGCGCGTAAGCTGATGGCCGAGGGGGCAGATGTCGACCTCGG	GG	120	
Sbjct 61	CGCAGCCATTGCGCAGGCGCGTAAGCTGATGGCCGAGGGGGCAGATGTCGACCTCGG	GG	120	
Query 121	TCCGGCATCCAGCAATCCCAGCAGCCGCGCTGTTCGTCCGACACAGAAATCGCGCGTAT	CA	180	
Sbjct 121	TCCGGCATCCAGCAATCCCAGCAGCCGCGCTGTTCGTCCGACACAGAAATCGCGCGTAT	CA	180	
Query 181	CGCGCCGGTGTGGACCGCGCTCAAGGCAGATGGCATTCCCGTCGCTCGACAGTTATCA	TA	240	
Sbjct 181	CGCGCCGGTGTGGACCGCGCTCAAGGCAGATGGCATTCCCGTCGCTCGACAGTTATCA	TA	240	
Query 241	ACCCCGCGACGCAAGCCTATGCCTTGTGCGGTGGTGTGGCCTATCTCAATGATATCCGG	GG	300	
Sbjct 241	ACCCCGCGACGCAAGCCTATGCCTTGTGCGGTGGTGTGGCCTATCTCAATGATATCCGG	GG	300	
Query 301	TTTCCAGACGCTGCGTTCTATCGCAATTGGCAAATCATCTGCCAAACTCGCGTTAT	AT	360	
Sbjct 301	TTTCCAGACGCTGCGTTCTATCGCAATTGGCAAATCATCTGCCAAACTCGCGTTAT	AT	360	
Query 361	GCATTCGGTCAAGACGGGAGGCAGATCGGCGCGAGGCACCCGCTGGCGACATCATGGA	AA	420	
Sbjct 361	GCATTCGGTCAAGACGGGAGGCAGATCGGCGCGAGGCACCCGCTGGCGACATCATGGA	AA	420	
Query 421	TCACATTGCGCGTTCTTGACGCGCGCATCGCGCGCTGACGGGTGCCGGTATCAAACG	CG	480	
Sbjct 421	TCACATTGCGCGTTCTTGACGCGCGCATCGCGCGCTGACGGGTGCCGGTATCAAACG	CG	480	
Query 481	CAACCGCCTTGTCCCTGATCCGGCATGGGTTTTCTGGGGCTGCTCCGAAACCTC	TC	540	
Sbjct 481	CAACCGCCTTGTCCCTGATCCGGCATGGGTTTTCTGGGGCTGCTCCGAAACCTC	TC	540	
Query 541	GCTCTCGGTGCTGGCGCGGTTCGATGAATTGCGGCTGCGCTTCGATTGCGGTGCTCT	CT	600	
Sbjct 541	GCTCTCGGTGCTGGCGCGGTTCGATGAATTGCGGCTGCGCTTCGATTGCGGTGCTCT	CT	600	
Query 601	GTCTGTTCGCGCAAATCCTTCTGCGCGCGCTCACAGGCCGTGGTCCGGGATGTCGG	GG	660	
Sbjct 601	GTCTGTTCGCGCAAATCCTTCTGCGCGCGCTCACAGGCCGTGGTCCGGGATGTCGG	GG	660	
Query 661	GGCCCGCGACACTCGCTGCAGAGCTTGGCCGCCGCCAGGGTGGAGCTGACTTCATCCGAC	CAC	720	
Sbjct 661	GGCCCGCGACACTCGCTGCAGAGCTTGGCCGCCGCCAGGTGGAGCTSACTCATMCKCAC	CAC	720	
Query 721	AC 722			
Sbjct 721	AC 722			

**Abbildung 105: Verknüpfte Sequenzen von *Salmonella* Typhimurium DT12 (= Query) und Probe „M13-S4-1T4“ (= Sbjct)**

Score 1519 bits (822)	Expect 0.0	Identities 822/1822 (100%)	Gaps 0/822 (0%)	Strand Plus/Plus
Query 1	TTCCGGCATTCTGAATCTCACCGAGGACTCCTCTTCGATGAGAGCCGGCGGCTAGACCCC		60	
Sbjct 1	TTCCGGCATTCTGAATCTCACCGAGGACTCCTCTTCGATGAGAGCCGGCGGCTAGACCCC		60	
Query 61	GCCGGCGCTGTCACCGCGGCGATCGAAATGCTGCGAGTCGGATCAGACGTCGTGGATGTC		120	
Sbjct 61	GCCGGCGCTGTCACCGCGGCGATCGAAATGCTGCGAGTCGGATCAGACGTCGTGGATGTC		120	
Query 121	GGACCCGGCCGCCAGCCATCCGGACGCGAGGCCGTATGCCGGCGATGAGATCAGACGT		180	
Sbjct 121	GGACCCGGCCGCCAGCCATCCGGACGCGAGGCCGTATGCCGGCGATGAGATCAGACGT		180	
Query 181	ATTGCGCCGCTTCTAGACGCCCTGTCGATCAGATGCACCGTGTTCATCGACAGCTTC		240	
Sbjct 181	ATTGCGCCGCTTCTAGACGCCCTGTCGATCAGATGCACCGTGTTCATCGACAGCTTC		240	
Query 241	CAACCGGAAACCCAGCGCTATGCGCTCAAGCGCGCGTGGGCTACCTGAACGATATCCAA		300	
Sbjct 241	CAACCGGAAACCCAGCGCTATGCGCTCAAGCGCGCGTGGGCTACCTGAACGATATCCAA		300	
Query 301	GGATTCCTGACCCCTGCGCTCTATCCGATATTGCTGAGGCGGACTGCAGGCTGGTGGTT		360	
Sbjct 301	GGATTCCTGACCCCTGCGCTCTATCCGATATTGCTGAGGCGGACTGCAGGCTGGTGGTT		360	
Query 361	ATGCACTCAGCGCAGCGGGATGGCATTGCCACCCGACCGGTACCTCGACCCGAAGAC		420	
Sbjct 361	ATGCACTCAGCGCAGCGGGATGGCATTGCCACCCGACCGGTACCTCGACCCGAAGAC		420	
Query 421	GCGCTCGACGAGATTGTGCGGTTCTCGAGGGCGCGGGTTCCGCCTTGCACGGAGCGGG		480	
Sbjct 421	GCGCTCGACGAGATTGTGCGGTTCTCGAGGGCGCGGGTTCCGCCTTGCACGGAGCGGG		480	
Query 481	GTCGCTGCCGACCGGCTATCCTCGATCCGGGGATGGGATTTTCTTGAGCCCCGACCG		540	
Sbjct 481	GTCGCTGCCGACCGGCTATCCTCGATCCGGGGATGGGATTTTCTTGAGCCCCGACCG		540	
Query 541	GAAACATCGCTGCACGTGCTGCAACCTCAAAAGCTGAAGTCGGCGTTGGGCTTCG		600	
Sbjct 541	GAAACATCGCTGCACGTGCTGCAACCTCAAAAGCTGAAGTCGGCGTTGGGCTTCG		600	
Query 601	CTATTGGTCTCGGTCTCGGAAATCCTCTGGCGCCACCGTTGGCCTTCTGTAAAG		660	
Sbjct 601	CTATTGGTCTCGGTCTCGGAAATCCTCTGGCGCCACCGTTGGCCTTCTGTAAAG		660	
Query 661	GATCTGGGTCAGCGAGCCTTGCAGCGGAACCTCACCGATCGGCAATGGCGTACTAC		720	
Sbjct 661	GATCTGGGTCAGCGAGCCTTGCAGCGGAACCTCACCGATCGGCAATGGCGTACTAC		720	
Query 721	GTCCGCACCCACGCGCCTGGAGATCTGCGAAGCGCAATCACCTCTCGAAACCTCGCG		780	
Sbjct 721	GTCCGCACCCACGCGCCTGGAGATCTGCGAAGCGCAATCACCTCTCGAAACCTCGCG		780	
Query 781	AAATTCGCGACTCGCGACGCCAGAGACCGAGGGTTAGATCAT		822	
Sbjct 781	AAATTCGCGACTCGCGACGCCAGAGACCGAGGGTTAGATCAT		822	

**Abbildung 106: Verknüpfte Sequenzen von *Salmonella Typhimurium DT104* (= Query) und Probe „M13-S1-1T0“ (= Sbjct)**

Score 128 bits (69)	Expect 8e-36	Identities 69/69 (100%)	Gaps 0/69 (0%)	Strand Plus/Plus
Query 1	CGCATTTCATTTCTCTGGTTCTGAAATCCATCCCTGTCGGTGTGCTTATGCAGT		60	
Sbjct 1	CGCATTTCATTTCTCTGGTTCTGAAATCCATCCCTGTCGGTGTGCTTATGCAGT		60	
Query 61	CTGGTCGGG 69			
Sbjct 61	CTGGTCGGG 69			

**Abbildung 107: Verknüpfte Sequenzen von *Escherichia coli* 1/05 Eco4-O-L (= Query) und Probe „E5-P1-3T12“ (= Sbjct)**

---

Score 316 bits (171)	Expect 1e-91	Identities 171/171 (100%)	Gaps 0/171 (0%)	Strand Plus/Plus
Query 1	ACAGAAAGCTTATTATATAACAGTGGAGCGATTACAGAATTAGGAAGCGTGGACAAAGGT		60	
Sbjct 1	ACAGAAAGCTTATTATATAACAGTGGAGCGATTACAGAATTAGGAAGCGTGGACAAAGGT		60	
Query 61	ACAACGAGGACGGATAATA CGCTTTAGAACGTCAGAGAGGAATTACAATT CAGACAGGA		120	
Sbjct 61	ACAACGAGGACGGATAATA CGCTTTAGAACGTCAGAGAGGAATTACAATT CAGACAGGA		120	
Query 121	ATAACCTTTTCAGTGGAAAATACGAAGGTGAACATCATAGACACGCCA		171	
Sbjct 121	ATAACCTTTTCAGTGGAAAATACGAAGGTGAACATCATAGACACGCCA		171	

**Abbildung 108: Verknüpfte Sequenzen von *Bacillus cereus* R89 (= Query) und Probe „E5-P2-3T2“ (= Sbjct)**

Score 10227 bits (5538)	Expect 0.0	Identities 5600/5631 (99%)	Gaps 0/5631 (0%)	Strand Plus/Plus
Query 1	ATTCTGCTTGGCCTCCGGCGCGGGAAAGGGACTCAGGCTCAGTCATCATGGAGAAA		60	
Sbjct 1	ATTCTGCTTGGCCTCCGGCGCGGGAAAGGGACTCAGGCTCAGTCATCATGGAGAAA		60	
Query 61	TATGGTATTCGCAAATCTCACTGGCGATATGCTGCGTGTGCGGTCAAATCTGGCTCC		120	
Sbjct 61	TATGGTATTCGCAAATCTCACTGGCGATATGCTGCGTGTGCGGTCAAATCTGGCTCC		120	
Query 121	GAGCTGGTAAACAAGCAAAGACATTATGGATGCTGGCAAACGGTACCGACGAACGT		180	
Sbjct 121	GAGCTGGTAAACAAGCAAAGACATTATGGATGCTGGCAAACGGTACCGACGAACGT		180	
Query 181	GTGATCGCGCTGGTTAAAGAGCGCATTGCTCAGGAAGACTGCCGTAAATGGTTCTGTTG		240	
Sbjct 181	GTGATCGCGCTGGTTAAAGAGCGCATTGCTCAGGAAGACTGCCGTAAATGGTTCTGTTG		240	
Query 241	GACGGCTTCCCGCTTACCATCCGCAGGCAGACCGATGAAAGAACGGGCATCAATGTT		300	
Sbjct 241	GACGGCTTCCCGCTTACCATCCGCAGGCAGACCGATGAAAGAACGGGCATCAATGTT		300	
Query 301	GATTACGTTCTGGAATTGACGTACCGGACGAACGTATTGTTGATCGTATCGTAGGCCG		360	
Sbjct 301	GATTACGTTCTGGAATTGACGTACCGGACGAACGTATTGTTGATCGTATCGTAGGCCG		360	
Query 361	CGCGTTCATGCGCGTCTGGTCGTGTTTACCGTTAAATTCAATCCGCCAAAGTAGAA		420	
Sbjct 361	CGCGTTCATGCGCGTCTGGTCGTGTTTACCGTTAAATTCAATCCGCCAAAGTAGAA		420	
Query 421	GGCAAAGACGACGTTACCGGTAAAGAAACTGACTACCCGTAAAGACGATCAGGAAGAAC		480	
Sbjct 421	GGCAAAGACGACGTTACCGGTAAAGAAACTGACTACCCGTAAAGACGATCAGGAAGAAC		480	
Query 481	GTGCGTAAACGTCTGGTTGAAATACCATCAGATGACTGCACCGCTGATCGGCTACTACTCC		540	
Sbjct 481	GTGCGTAAACGTCTGGTTGAAATACCATCAGATGACTGCACCGCTGATCGGCTACTACTCC		540	
Query 541	AAAGAACGGAAAGCGGGTAACACCAAATACCGGAAAGTTGACGGTCACAGGTGCCAGCG		600	
Sbjct 541	AAAGAACGGAAAGCGGGTAACACCAAATACCGGAAAGTTGACGGTCACAGGTGCCAGCG		600	
Query 601	CTTCAAATTGTTGGCGCGGTAAACAAACGGTGACAGGTAAATGACTGCCAGTTCATCG		660	
Sbjct 601	CTTCAAATTGTTGGCGCGGTAAACAAACGGTGACAGGTAAATGACTGCCAGTTCATCG		660	
Query 661	CTACCGCAGCGCATACTCCGGATGGGTATTAGTCAGTACCCACCGCTGTACCGCCAA		720	
Sbjct 661	CTACCGCAGCGCATACTCCGGATGGGTATTAGTCAGTACCCACCGCTGTACCGCCAA		720	
Query 721	GAGCCAGTCCGCTACGTGAGGCGAGGCTGATTGCGATATGTTGAGATTATGCTCGAGCA		780	
Sbjct 721	GAGCCAGTCCGCTACGTGAGGCGAGGCTGATTGCGATATGTTGAGATTATGCTCGAGCA		780	
Query 781	TCGCTACCCAGCGGAAATCTCCTGCCCTAGTGTGTTAGCGGCGTGGCGTCTGCAAGTGG		840	
Sbjct 781	TCGCTACCCAGCGGAAATCTCCTGCCCTAGTGTGTTAGCGGCGTGGCGTCTGCAAGTGG		840	
Query 841	TTCGACCGATTGACGATATCGGCAAATGCACCGATTTCACTCAGTGTGTGTCA		900	
Sbjct 841	TTCGACCGATTGACGATATCGGCAAATGCACCGATTTCACTCAGTGTGTGTCA		900	
Query 901	GGGTTTTAAGCTCGGAATGAGTTGCTTGCACCGCCAGCGCCACAGTGCATCG		960	
Sbjct 901	GGGTTTTAAGCTCGGAATGAGTTGCTTGCACCGCCAGCGCCACAGTGCATCG		960	
Query 961	CCGTCGGAAAGACATCGTGGAACTTGGCTTGTACGTCGCTAGGGTAACTT		1020	
Sbjct 961	CCGTCGGAAAGACATCGTGGAACTTGGCTTGTACGTCGCTAGGGTAACTT		1020	
Query 1021	TACGTTCCATCCCGCGACGCCCGAGTAATTCACTGGCCGGTTAGCCAGCAGTCGT		1080	
Sbjct 1021	TACGTTCCATCCCGCGACGCCCGAGTAATTCACTGGCCGGTTAGCCAGCAGTCGT		1080	
Query 1081	TCATGTTCATGTTACTTGCCTGCGGAGCCGGCTGCCAGATAGCCAGCGGGATTG		1140	
Sbjct 1081	TCATGTTCATGTTACTTGCCTGCGGAGCCGGCTGCCAGATAGCCAGCGGGATTG		1140	

Query	1141	CGTCATGCTGCTGCCAGTACTTCATCCGCCCTGCCAATGGCGCTCGCTTCTCTT	1200
Sbjct	1141	CGTCATGCTGCTGCCAGTACTTCATCCGCCCTGCCAATGGCGCTCGCTTCTCTT	1200
Query	1201	CAGACAACAAGCCTAACATTCACTTAACCTTGCCGCTGCGCGCTGGTTAGGCCAGCG	1260
Sbjct	1201	CAGACAACAAGCCTAACATTCACTTAACCTTGCCGCTGCGCGCTGGTTAGGCCAGCG	1260
Query	1261	CATGAATCAGTGAGGTGGGCATTTCTCCGTCGAAATGCCGAAATGCCAGCGAGCGTT	1320
Sbjct	1261	CATGAATCAGTGAGGTGGGCATTTCTCCGTCGAAATGCCGAAATGCCAGCGAGCGTT	1320
Query	1321	GAGTTTGTGCGCCCCACAGCTTATCTGCCGGACATCAATGCCCATCGAATCTTTT	1380
Sbjct	1321	GAGTTTGTGCGCCCCACAGCTTATCTGCCGGACATCAATGCCCATCGAATCTTTT	1380
Query	1381	CGCTCGTACATGGAAAGTAAAGTAGTTCCGGCACAGCAAGAAGATCACCTGCA	1440
Sbjct	1381	CGCTCGTACATGGAAAGTAAAGTAGTTCCGGCACAGCAAGAAGATCACCTGCA	1440
Query	1441	AAACGGCAAACCTCAACGTTCTGAAAATCCGATTATCCCTACATTGAAGGTGATGGAAT	1500
Sbjct	1441	AAACGGCAAACCTCAACGTTCTGAAAATCCGATTATCCCTACATTGAAGGTGATGGAAT	1500
Query	1501	CGGTGTAGATGTAACCCAGCCATGCTGAAAGTGGTCGACGCTGCGAGAAAGCTA	1560
Sbjct	1501	CGGTGTAGATGTAACCCAGCCATGCTGAAAGTGGTCGACGCTGCGAGAAAGCTA	1560
Query	1561	TAAAGGCGAGCGTAAAATCTCTGGATGAAATTACACCGGTAAAAATCCACACAGGT	1620
Sbjct	1561	TAAAGGCGAGCGTAAAATCTCTGGATGAAATTACACCGGTAAAAATCCACACAGGT	1620
Query	1621	TTATGGTCAGGATGTCGGCTGCCGTGAAACCCCTGATCTGATTGATCGTGAATATCGCGT	1680
Sbjct	1621	TTATGGTCAGGACGTCTGGCTGCCGTGAAACTCTTGATCTGATTGATCGTGAATATCGCGT	1680
Query	1681	TGCCATTAAAGGTCGCTGACCACCTCTGGTGGCGGTATTCGCTCTGAACGTTGC	1740
Sbjct	1681	TGCCATTAAAGGTCGCTGACCACCTCTGGTGGCGGTATTCGCTCTGAACGTTGC	1740
Query	1741	CCTGCGCCAGGAACGGATCTACATCTGCCCTGCCGTACGTTACTATCAAGGCAC	1800
Sbjct	1741	CCTGCGCCAGGAACGGATCTACATCTGCCCTGCCGTACGTTACTATCAAGGCAC	1800
Query	1801	TCCAAGCCCCGTTAAACACCCCTGAACTGACCGATATGGTTATCTCCGTAAAAACTCGGA	1860
Sbjct	1801	TCCAAGCCCCGTTAAACACCCCTGAACTGACCGATATGGTTATCTCCGTAAAAACTCGGA	1860
Query	1861	AGACATTATGCCGGTATCGAATGGAAACGAGACTCTGCCGACGCCGAGAAAGTATTAA	1920
Sbjct	1861	AGACATTATGCCGGTATCGAATGGAAACGAGACTCTGCCGACGCCGAGAAAGTATTAA	1920
Query	1921	ATTCCCTGCGTGAAGAGATGGCGTGAAGAAAATCGCTCCCGAACATTGCGGTATCGG	1980
Sbjct	1921	ATTCCCTGCGTGAAGAGATGGCGTGAAGAAAATCGCTCCCGAACATTGCGGTATCGG	1980
Query	1981	TATCAAGCCGTCTGAAAGAAGGCCACAAACGCTCTGGCCGCGATGAAATACGC	2040
Sbjct	1981	TATTAAGCCGTCTGGAAAGAAGGCCACAAACGCTCTGGCCGCGATGAAATACGC	2040
Query	2041	AATTGCCAACGCGTACTCTGTGACCCCTGGTCACAAAGCAACATCATGAAGTTAC	2100
Sbjct	2041	AATTGCCAACGCGTACTCTGTGACCCCTGGTCACAAAGCAACATCATGAAGTTAC	2100
Query	2101	CGAAGGCGCGTTAAAGACTGGGGCTACCAAGCTGGCGCGTGAAGAGTTGGCGGTGAAC	2160
Sbjct	2101	CGAAGGCGCGTTAAAGACTGGGGCTACCAAGCTGGCGCGTGAAGAGTTGGCGGTGAAC	2160
Query	2161	GATCGACGGCGGCCGTGGCTAAAGTTAAACCCGAACACCGGCAAAGAGATCGTCAT	2220
Sbjct	2161	GATCGACGGCGGCCGTGGCTAAAGTTAAACCCGAACACCGGCAAAGAGATCGTCAT	2220
Query	2221	TAAAGACGTGATTGCTGATGCATTCTGCAACAGATCCTGCTGCCGCGCTGATGAA	2280
Sbjct	2221	TAAAGACGTGATTGCTGATGCATTCTGCAACAGATCCTGCTGCCGCGCTGATGAA	2280

Query	2281	AGAGATGAAAGAACTGGAGACCGTGGCATCCCGTTCTGAGCGCTCTGCTGCTGCTGA 	2340
Sbjct	2281	AGAGATGAAAGAACTGGAGACCGTGGCATCCCGTTCTGAGCGCTCTGCTGCTGCTGA 	2340
Query	2341	AGCATGTCCGCTGATCCTGATTATCACGTTGCGCTGGATAACCGCGTGGAGAAAGCGCG 	2400
Sbjct	2341	AGCATGTCCGCTGATCCTGATTATCACGTTGCGCTGGATAACCGCGTGGAGAAAGCGCG 	2400
Query	2401	TGGCGCAAAGCGATCGGCACCACCGGTCGTTGATCGGGCTGCTTATGAAGATAAAGT 	2460
Sbjct	2401	TGGCGCAAAGCGATCGGCACCACCGGTCGTTGATCGGGCTGCTTATGAAGATAAAGT 	2460
Query	2461	AGCACGTGCGGTCTCGCTGTTGGCACCTTTCGACAAAGAAACCTTCGCTGAAAAACT 	2520
Sbjct	2461	AGCACGTGCGGTCTCGCTGTTGGCACCTTTCGACAAAGAAACCTTCGCTGAAAAACT 	2520
Query	2521	GAAAGAAGTGTGAAATACAACTCCAGTTGGTAACACTACAAAGCTGAAGCGGT 	2580
Sbjct	2521	GAAAGAAGTGTGAAATACAACTCCAGTTGGTAACACTACAAAGCTGAAGCGGT 	2580
Query	2581	TGATTACCAAGAAAGTCTGGATGATAAGATGGCTGTTGCCGACATCCTGACTTCTATGGT 	2640
Sbjct	2581	TGATTACCAAGAAAGTCTGGATGATAAGATGGCTGTTGCCGACATCCTGACTTCTATGGT 	2640
Query	2641	GGTTGACGTTCTGACCTGCTCGACCAGGCGCGTCAGCGTGGCGATTCGTCATGTTGA 	2700
Sbjct	2641	GGTTGACGTTCTGACCTGCTCGACCAGGCGCGTCAGCGTGGCGATTCGTCATGTTGA 	2700
Query	2701	AGGTGCGCAGGGTACCGTGTGGATATCGACCAACGGTACTTATCCGTACGTAACCTCTTC 	2760
Sbjct	2701	AGGTGCGCAGGGTACCGTGTGGATATCGACCAACGGTACTTATCCGTACGTAACCTCTTC 	2760
Query	2761	CAACACCACTGCTGGTGGCGTGGCGACCGGTTCCGGCTGGCCCGCGTTATGTTGATTA 	2820
Sbjct	2761	CAACACCACTGCTGGTGGCGTGGCGACCGGTTCCGGCTGGCCCGCGTTATGTTGATTA 	2820
Query	2821	TGTTCTGGGTATCCTCAAAGCTACTCAACTCGTAGGTGCAAGGTCCTCCGACCGA 	2880
Sbjct	2821	CGTTCTGGGTATCCTCAAAGCTACTCAACTCGTAGGTGCAAGGTCCTCCGACCGA 	2880
Query	2881	ACTGTTGATGAAACTGGCGAGTCTCTGCAAGCAGGGTAACGAATTGGCGCAACTAC 	2940
Sbjct	2881	ACTGTTGATGAAACTGGCGAGTCTCTGCAAGCAGGGTAACGAATTGGCGCAACTAC 	2940
Query	2941	GGGGCGTCGTCGTCGACCGGCTGGTGGACACCGGTTGCCGTTCTCGTGCAGCT 	3000
Sbjct	2941	GGGGCGTCGTCGTCGACCGGCTGGTGGACACCGGTTGCCGTTCTCGTGCAGCT 	3000
Query	3001	GAACCTCCGTCTGGCTTCTGCCGTGACTAAACTGGACGTTCTGGATGGCTGAAAGAGGT 	3060
Sbjct	3001	GAACCTCCGTCTGGCTTCTGCCGTGACTAAACTGGACGTTCTGGATGGCTGAAAGAGGT 	3060
Query	3061	GAAACTCTCGCTGGCTTACCGTATGCGCATTGCTTACCCGTGACCGATTTCTCACCTT 	3120
Sbjct	3061	TAAACTCTCGCTGGCTTACCGTATGCGCATTGCTTACCCGTGACCGATTTCTCACCTT 	3120
Query	3121	TGTAGCTGTACACCGCGCTGTTCTCGATCAGCTTCTTTACGCCAGGTCAACCA 	3180
Sbjct	3121	TGTAGCTGTACACCGCGCTGTTCTCGATCAGCTTCTTTACGCCAGGTCAACCA 	3180
Query	3181	GTTCGCCGTAGAAGTTGATACCTCGCCGTAGAGGATCTGAATTAGCCTGTTAAACG 	3240
Sbjct	3181	GTTCGCCGTAGAAGTTGATACCTCGCCGTAGAGGATCTGAATTAGCCTGTTAAACG 	3240
Query	3241	GCGCAGCGATTTGTTCTCACCAACTTCACGCGGGTTTCGCTACCCACACGTTTCGC 	3300
Sbjct	3241	GCGCAGCGATTTGTTCTCACCAACTTCACGCGGGTTTCGCTACCCACACGTTTCGC 	3300
Query	3301	CCTCTTCACCGCGCCGATACGACGGATGTCGAGACGAACAGAGGGTAGAATTTCAGCG 	3360
Sbjct	3301	CCTCTTCACCGCGCCGATACGACGGATGTCGAGACGAACAGAGGGTAGAATTTCAGCG 	3360
Query	3361	CGTTACCCGGTAGTGGTTCCGGTTACCGAACATCACACCAATTTCATACCGATCT 	3420
Sbjct	3361	CGTTACCCGGTAGTGGTTCCGGTTACCGAACATCACACCAATTTCATACCGATCT 	3420

Query	3421	GGTTGATGAAGATCAGCAGCGTGGACTGCTTCAGGTTACCCGCCAGCTTACGCATCG 	3480
Sbjct	3421	GGTTGATGAAGATCAGCAGCGTGGACTGCTTCAGGTTACCCGCCAGCTTACGCATCG 	3480
Query	3481	CCTGGCTCATACGTGCCGCAAGGCCATGTGAGAGTCGCCGATTCGCCCTCGATT 	3540
Sbjct	3481	CCTGGCTCATACGTGCCGCAAGGCCATGTGAGAGTCGCCGATTCGCCCTCGATT 	3540
Query	3541	CCGCTTCGGCGTCAGTGCCGCCACGGAGTCACAGACGATAACGCTACTGCCAGAAC 	3600
Sbjct	3541	CCGCTTCGGCGTCAGTGCCGCCACGGAGTCACAGACGATAACGCTACTGCCAGAAC 	3600
Query	3601	GCGCCAGGGCGTCACAGATTCCAGTGCTCGCCGGTGTCCGGCTGGAGCACAGCA 	3660
Sbjct	3601	GCGCCAGGGCGTCACAGATTCCAGTGCTCGCCGGTGTCCGGCTGGAGCACAGCA 	3660
Query	3661	GGTTATCGATATCGACGCCAGTTACGTGCTAGATTGGTCCAGCGCGTGTTCAGCAT 	3720
Sbjct	3661	GGTTATCGATATCGACGCCAGTTACGTGCTAGATTGGTCCAGCGCGTGTTCAGCAT 	3720
Query	3721	CGATAAACGCACAGGTTTACCTTCACGCTGCCGATCACCTGCAGCGTCAGCG 	3780
Sbjct	3721	CGATAAACGCACAGGTTTACCTTCACGCTGCCGATCACCTGCAGCGTCAGCG 	3780
Query	3781	TGGTTTACCGGAAGATTCCGGTCCGTAGATTTCGACGATGGCGACACGGATGACGGA 	3840
Sbjct	3781	TGGTTTACCGGAAGATTCCGGTCCGTAGATTTCGACGATGGCGACACGGATGACGGA 	3840
Query	3841	CCGGTCTGCACCACATGGTATTGAGGTGGTAGATAACGCTATCGACGAAGCGCTCGGG 	3900
Sbjct	3841	CCGGTCTGCACCACATGGTATTGAGGTGGTAGATAACGCTATCGACGAAGCGCTCGGG 	3900
Query	3901	GTCACTGTAAAGAAATTATCGTACCATTCACGCCGATAACTCTGTCTCTGTACAGGATG 	3960
Sbjct	3901	GTCACTGTAAAGAAATTATCGTACCATTCACGCCGATAACTCTGTCTCTGTACAGGACG 	3960
Query	3961	ACGGGCGCGCATTCCGACCGGTATTCCACCCGGAAGAGGGCGTATGGCGGGGAAGTGA 	4020
Sbjct	3961	ACGGGCGCGCATTCCGACCGGTATTCCACCCGGAAGAGGGCGTATGGCGGGGAAGTGA 	4020
Query	4021	TCATGACCGTTCTGCACGCAGCGGTAAATTGACGATAACTCCTATAAAGTGTCCGGCG 	4080
Sbjct	4021	TCATGACCGTTCTGCACGCAGCGGTAAATTGACGATAACTCCTATAAAGTGTCCGGCG 	4080
Query	4081	GTCTGCACGGCGTTGGTCTCGTAGTAAACGCCCTGTCGCAAAACTGGAGCTGGTA 	4140
Sbjct	4081	GTCTGCACGGCGTTGGTCTCGTAGTAAACGCCCTGTCGCAAAACTGGAGCTGGTA 	4140
Query	4141	TCCAGCGCGAGGGTAAATTACCGTCAGATCTACGAACACGGGTACCGCAGGCCCGC 	4200
Sbjct	4141	TCCAGCGCGAGGGTAAATTACCGTCAGATCTACGAACACGGGTACCGCAGGCCCGC 	4200
Query	4201	TGGCGGTTACCGGCAGACTGAAAAACCGGCACCATGGTGCCTTCTGGCCAGCCTCG 	4260
Sbjct	4201	TGGCGGTTACCGGCAGACTGAAAAACCGGCACCATGGTGCCTTCTGGCTAGCCTCG 	4260
Query	4261	AAACCTTCACCAATGTGACCGAGTCGAATATGAAATTCTGGCAGACGCTGCGTAGT 	4320
Sbjct	4261	AAACCTTCACCAATGTGACCGAGTCGAATATGAAATTCTGGCAGACGCTGCGTAGT 	4320
Query	4321	TGTCGTTCTCAACTCCGGCGTTCCATTCTGCTCGCGACAAGCGCAGGCCAAAGAAG 	4380
Sbjct	4321	TGTCGTTCTCAACTCCGGCGTTCCATTCTGCTCGCGACAAGCGCAGGCCAAAGAAG 	4380
Query	4381	ACCACTTCACTATGAAGGTGGCATCAAGGCCTCGTTGAATATCTGAACAAGAACAAA 	4440
Sbjct	4381	ACCACTTCACTATGAAGGTGGCATCAAGGCCTCGTTGAATATCTGAACAAGAACAAA 	4440
Query	4441	CGCCGATCCACCGAATATCTTCTACTTCCACCGAAAAAGACGGTATTGGCGTCGAAG 	4500
Sbjct	4441	CGCCGATCCACCGAATATCTTCTACTTCCACCGAAAAAGACGGTATTGGCGTCGAAG 	4500
Query	4501	TGGCGTTGCAGTGGAACGATGGCTCCAGGAAAAACATCTACTGCTTACCAACACATC 	4560
Sbjct	4501	TGGCGTTGCAGTGGAACGATGGCTCCAGGAAAAACATCTACTGCTTACCAACACATC 	4560

Query	4561	CGCAGCGTGACGGCGGTACTCACCTGGCAGGCTCCGTGCGGCATGACCCGTACCCGT 	4620
Sbjct	4561	CGCAGCGTGACGGCGGTACTCACCTGGCAGGCTCCGTGCGGCATGACCCGTACTCTGA 	4620
Query	4621	ATGCCTACATGGACAAAGAAGGCTACAGCAAAAAAGCCAAAGTCAGCGCCACCGGTGACG 	4680
Sbjct	4621	ACGCCTACATGGACAAAGAAGGCTACAGCAAAAAAGCCAAAGTCAGCGCCACCGGTGACG 	4680
Query	4681	ATGCGCGTGAAAGCCTGATATGAAAGTCGAGTCCTCGCGCTGCTGGCGGTATTGGCCA 	4740
Sbjct	4681	ATGCGCGTGAAAGCCTGATATGAAAGTCGAGTCCTCGCGCTGCTGGCGGTATTGGCCA 	4740
Query	4741	GGCGCTTGCACACTGTTAAAACCCAACACTGCCTTCAGGTCAGAACTCTCTGTATGA 	4800
Sbjct	4741	GGCGCTTGCACACTGTTAAAACCCAACACTGCCTTCAGGTCAGAACTCTCTGTATGA 	4800
Query	4801	TATCGCTCCAGTGACTCCGGTGTGGCTGCGATCTGAGCCATATCCCTACTGCTGTGAA 	4860
Sbjct	4801	TATCGCTCCAGTGACTCCGGTGTGGCTGCGATCTGAGCCATATCCCTACTGCTGTGAA 	4860
Query	4861	AATCAAAGGTTTCTGGTGAAGATGCGACTCCGGCCTGGAAGGCGCAGATGTCGTTCT 	4920
Sbjct	4861	AATCAAAGGTTTCTGGTGAAGATGCGACTCCGGCCTGGAAGGCGCAGATGTCGTTCT 	4920
Query	4921	TATCTCTGCAGGTGTAGCGCTAACCGGGTATGGATCGTCCGACCTGTTAACGTTAA 	4980
Sbjct	4921	TATCTCTGCAGGTGTAGCGCTAACCGGGTATGGATCGTCCGACCTGTTAACGTTAA 	4980
Query	4981	CGCCGGCATCGTAAAAACCTGGTACAGCAAGTTGCAAAACCTGCCGAAAGCGTCAT 	5040
Sbjct	4981	CGCCGGCATCGTAAAAACCTGGTACAGCAAGTTGCAAAACCTGCCGAAAGCGTCAT 	5040
Query	5041	TGGTATTATCACTAACCGTTAACACACAGTTGCGATTGCTGCTGAAGTGTGCTAAAAAA 	5100
Sbjct	5041	TGGTATTATCACTAACCGTTAACACACAGTTGCGATTGCTGCTGAAGTGTGCTAAAAAA 	5100
Query	5101	AGCCGGTTTATGACAAAACAAACTGTCGGCTTACACGCTGGATATCATTGTC 	5160
Sbjct	5101	AGCCGGTTTATGACAAAACAAACTGTCGGCTTACACGCTGGATATCATTGTC 	5160
Query	5161	CAACACCTTGTGCGGAACTGAAAGGCAAACAGCCAGCGAAGTTGAAGTGCCGTTAT 	5220
Sbjct	5161	CAACACCTTGTGCGGAACTGAAAGGCAAACAGCCAGCGAAGTTGAAGTGCCGTTAT 	5220
Query	5221	TGGCGGTCACTCTGGTGTACCATCTCGCGCTGCTGACAGGTTCTGGCGTTAGTT 	5280
Sbjct	5221	TGGCGGTCACTCTGGTGTACCATCTCGCGCTGCTGACAGGTTCTGGCGTTAGTT 	5280
Query	5281	TACCGAGCAGGAAGTGGCTGATCTGACCAAACGTATCCAGAACCGCAGGTACTGAAGTGGT 	5340
Sbjct	5281	TACCGAGCAGGAAGTGGCTGATCTGACCAAACGTATCCAGAACCGCAGGTACTGAAGTGGT 	5340
Query	5341	TGAAGCGAAAGCCGGTGGCGGTCTGCAACCCCTGTCATGGGCCAGGCAGCTGCACGTT 	5400
Sbjct	5341	TGAAGCGAAAGCCGGTGGCGGTCTGCAACCCCTGTCATGGGCCAGGCAGCTGCACGTT 	5400
Query	5401	TGGTCTGTCCTGGTGTGCACTGCAGGGCACAAGGCCTGTCGAATGTCCTACGT 	5460
Sbjct	5401	TGGTCTGTCCTGGTGTGCACTGCAGGGCACAAGGCCTGTCGAATGTCCTACGT 	5460
Query	5461	TGAAGGCACGGTCAGTACGCCGTTCTCTCTCAACCGCTGCTGCTGGTAAAACGG 	5520
Sbjct	5461	TGAAGGCACGGTCAGTACGCCGTTCTCTCAACCGCTGCTGCTGGTAAAACGG 	5520
Query	5521	CGTGGAAAGAGCGTAAATCTATCGGTACCCCTGAGCGCATTGAAACAGAACCGCCTGGAAGG 	5580
Sbjct	5521	CGTGGAAAGAGCGTAAATCTATCGGTACCCCTGAGCGCATTGAAACAGAACCGCCTGGAAGG 	5580
Query	5581	TATGCTGGATACGCTCAAGAAAGATATCGCTCTGGGCAGGAGTCGTAA 	5631
Sbjct	5581	TATGCTGGATACGCTCAAGAAAGATATCGCTCTGGGCAGGAGTCGTAA 	5631

**Abbildung 109: Verknüpfte Sequenzen von „E5-07-13-S14 Eco7“ (= Query und Probe „E5-07-13-P2 Eco3“ (= Sbjct) (= „Paar E5-1“)**





Query	2281	AAAGAAGCAGAAGCGGGTAAATACCAAATACCGAAGTTGACGGAAATTGTTCGCGCG	2340
Sbjct	2281	AAAGAAGCAGAAGCGGGTAAATACCAAATACCGAAGTTGACGGAAATTGTTCGCGCG	2340
Query	2341	GTAACAAACGGTGCACAGGTAAATGACTGCCAGTTCATCTGCTACGCGACGCGCATACTCC	2400
Sbjct	2341	GTAACAAACGGTGCACAGGTAAATGACTGCCAGTTCATCTGCTACGCGACGCGCATACTCC	2400
Query	2401	GGATGGGTATTAGTCAGTACCCACCCTGTACCGCAAGAGCCAGTTCCGCTACGTGA	2460
Sbjct	2401	GGATGGGTATTAGTCAGTACCCACCCTGTACCGCAAGAGCCAGTTCCGCTACGTGA	2460
Query	2461	GGCAGGCTGTATTGATATGTTGAGATTATGCTCGAGCATCGCTACCCAGCCGAAATC	2520
Sbjct	2461	GGCAGGCTGTATTGATATGTTGAGATTATGCTCGAGCATCGCTACCCAGCCGAAATC	2520
Query	2521	TCCTGCCCAACGGTAAACGGCGTGGCATCCTGCAAGTGAGTACGACCAATTGACGATA	2580
Sbjct	2521	TCCTGCCCAACGGTAAACGGCGTGGCATCCTGCAAGTGAGTACGACCAATTGACGATA	2580
Query	2581	TCGGCAAAAGCACGGATTCTCATTCAGTGTCTGTCAGGGTTAAAGCTGAGGAATG	2640
Sbjct	2581	TCGGCAAAAGCACGGATTCTCATTCAGTGTCTGTCAGGGTTAAAGCTGAGGAATG	2640
Query	2641	AGTTGCTTGCGCAGCGCAGCAGCGCCGAACGTGCATCGCGTCGAAAGACATCGTG	2700
Sbjct	2641	AGTTGCTTGCGCAGCGCAGCAGCGCCGAACGTGCATCGCGTCGAAAGACATCGTG	2700
Query	2701	GAACCTTGGCTTTGTTACGTCGTTAGGGTGAACCTTACGTTCCATCCCGCGACA	2760
Sbjct	2701	GAACCTTGGCTTTGTTACGTCGTTAGGGTGAACCTTACGTTCCATCCCGCGACA	2760
Query	2761	CCGCCGAGTAATTCACTGGCCCGGTTAGCCAGCATTGTTATGTTACTTTGC	2820
Sbjct	2761	CCGCCGAGTAATTCACTGGCCCGGTTAGCCAGCATTGTTATGTTACTTTGC	2820
Query	2821	GTGCCGGAGCCGGTCTGCCAGATAGCCAGCGGAATTCTCGTCATGCTGCTGCCAGT	2880
Sbjct	2821	GTGCCGGAGCCGGTCTGCCAGATAGCCAGCGGAATTCTCGTCATGCTGCTGCCAGT	2880
Query	2881	ACTTCATCCGCCGCTGACGAATGGCGCTCGTTCTCTTCAGACAACAAGCTAAATCT	2940
Sbjct	2881	ACTTCATCCGCCGCTGACGAATGGCGCTCGTTCTCTTCAGACAACAAGCTAAATCT	2940
Query	2941	TCATTAACCTTTGCCGCTGACGCTTGGTTAGGCCAGCGCATGAATCACTGAGGTGGC	3000
Sbjct	2941	TCATTAACCTTTGCCGCTGACGCTTGGTTAGGCCAGCGCATGAATCACTGAGGTGGC	3000
Query	3001	ATTTTCTCCGTCGAAATCGGAAATGCTCCAGCGAGCGTTGAGTTGCGCCCCACAGC	3060
Sbjct	3001	ATTTTCTCCGTCGAAATCGGAAATGCTCCAGCGAGCGTTGAGTTGCGCCCCACAGC	3060
Query	3061	TTATCTGCCGGACATCAATGCCCATCGAATCTTCTCGCTCGTACAAGAACTGGA	3120
Sbjct	3061	TTATCTGCCGGACATCAATGCCCATCGAATCTTCTCGCTCGTACAAGAACTGGA	3120
Query	3121	AGACCGTGGCATCCCGTCTCGTACGCGCTGAGCGCTGCTGCTGAAGCATGTCGCTGATCCT	3180
Sbjct	3121	AGACCGTGGCATCCCGTCTCGTACGCGCTGAGCGCTGCTGCTGAAGCATGTCGCTGATCCT	3180
Query	3181	TGATTATCACGTTGCGCTGGATAACGCGCGTGGCGCGAAAGCGATCGG	3240
Sbjct	3181	TGATTATCACGTTGCGCTGGATAACGCGCGTGGCGCGAAAGCGATCGG	3240
Query	3241	CACCACCGGTCGTTGATCGGGCTGCTTATGAAGATAAAAGTAGCACGTCGCGGTCTCG	3300
Sbjct	3241	CACCACCGGTCGTTGATCGGGCTGCTTATGAAGATAAAAGTAGCACGTCGCGGTCTCG	3300
Query	3301	TGTTGGCGACCTTTCGACAAAGAACCTCGCTGAAAAACTGAAAAGAAGTGTGGAATA	3360
Sbjct	3301	TGTTGGCGACCTTTCGACAAAGAACCTCGCTGAAAAACTGAAAAGAAGTGTGGAATA	3360
Query	3361	TCACAACTCCAGTTGGTTAACTACTACAAAGCTGAAGCGGTTGATTACCGAAAGTTCT	3420
Sbjct	3361	TCACAACTCCAGTTGGTTAACTACTACAAAGCTGAAGCGGTTGATTACCGAAAGTTCT	3420

Query	3421	GGATGATACGATGGCTGTTGCCGACATCTGACTTCTATGGTGGTTGACGTTCTGACCT	3480
Sbjct	3421	GGATGATACGATGGCTGTTGCCGACATCTGACTTCTATGGTGGTTGACGTTCTGACCT	3480
Query	3481	GCTCGACCAGGCGCGTCAGCGTGGCGATTCTGTATGGTGGTTGACGTTCTGACCT	3540
Sbjct	3481	GCTCGACCAGGCGCGTCAGCGTGGCGATTCTGTATGGTGGTTGACGTTCTGACCT	3540
Query	3541	GCTGGATATCGACCACGGTACTTATCCGTACGTAACCTCTTCAACACCACTGCTGGTGG	3600
Sbjct	3541	GCTGGATATCGACCACGGTACTTATCCGTACGTAACCTCTTCAACACCACTGCTGGTGG	3600
Query	3601	CGTGGCGACCGGTTCCGGCTGGGCCGTTATGTTGATTACGTTCTGGGTATCCTCAA	3660
Sbjct	3601	CGTGGCGACCGGTTCCGGCTGGGCCGTTATGTTGATTACGTTCTGGGTATCCTCAA	3660
Query	3661	AGCTTACTCCACTCGTAGGTGCAGGTCGTTCCGACCGAACGTTGATGAAACTGG	3720
Sbjct	3661	AGCTTACTCCACTCGTAGGTGCAGGTCGTTCCGACCGAACGTTGATGAAACTGG	3720
Query	3721	CGAGTTCCCTCTGCAAGCAGGGTAACGAATTGGCGCAACTACGGGGCGTCGTCGTCGAC	3780
Sbjct	3721	CGAGTTCCCTCTGCAAGCAGGGTAACGAATTGGCGCAACTACGGGGCGTCGTCGTCGAC	3780
Query	3781	CGGCTGGCTGGACACCGTTGCCGTTCGTCGTGCGGTACAGCTGAACTCCCTGTCTGGCTT	3840
Sbjct	3781	CGGCTGGCTGGACACCGTTGCCGTTCGTCGTGCGGTACAGCTGAACTCCCTGTCTGGCTT	3840
Query	3841	CTGCCTGACTAAACTGGACGTTCTGGATGGCCTGAAAGAGGTTAAACTCTGCGTGGCTTA	3900
Sbjct	3841	CTGCCTGACTAAACTGGACGTTCTGGATGGCCTGAAAGAGGTTAAACTCTGCGTGGCTTA	3900
Query	3901	CCGTATGCCCTGCTTCTGATCAGCTCTTTACGCCAGGTCAACCAGTCGCCG	3960
Sbjct	3901	CCGTATGCCCTGCTTCTGATCAGCTCTTTACGCCAGGTCAACCAGTCGCCG	3960
Query	3961	TAGAAGTTGATACCTTCGCCGTAGAGGATCTGAAATTCAAGCTGTTAACGGCGCAGCG	4020
Sbjct	3961	TAGAAGTTGATACCTTCGCCGTAGAGGATCTGAAATTCAAGCTGTTAACGGCGCAGCG	4020
Query	4021	ATTTTGTCTTCACCACTTCACGCCGGTTTCGCTACCCACACGTTTCGCCCTTTTC	4080
Sbjct	4021	ATTTTGTCTTCACCACTTCACGCCGGTTTCGCTACCCACACGTTTCGCCCTTTTC	4080
Query	4081	ACCGGCCGATACGACGGATGTCGAGACGAAACAGAGGCCAGAATTTCAGCGCTTACCA	4140
Sbjct	4081	ACCGGCCGATACGACGGATGTCGAGACGAAACAGAGGCCAGAATTTCAGCGCTTACCA	4140
Query	4141	CCGGTAGTGGTTCCGGGTACCGAACATCACACCAATTTCATACGGATCTGGTTGATG	4200
Sbjct	4141	CCGGTAGTGGTTCCGGGTACCGAACATCACACCAATTTCATACGGATCTGGTTGATG	4200
Query	4201	AAGATCAGCAGCGTGGACTGCTTCAGGTTACCGCAGCTACGCATGCCCTGGCTC	4260
Sbjct	4201	AAGATCAGCAGCGTGGACTGCTTCAGGTTACCGCAGCTACGCATGCCCTGGCTC	4260
Query	4261	ATCATACGTGCCGAAGGCCCATGTGAGAGTCGGGATTCGCCCTCGATTCCGTTTC	4320
Sbjct	4261	ATCATACGTGCCGAAGGCCCATGTGAGAGTCGGGATTCGCCCTCGATTCCGTTTC	4320
Query	4321	GGCGTCAGTGCCGCCACGGAGTCACGACGATAACGCTACTGCGCAGAACGCGCAGG	4380
Sbjct	4321	GGCGTCAGTGCCGCCACGGAGTCACGACGATAACGCTACTGCGCAGAACGCGCAGG	4380
Query	4381	GCGTCACAGATTCCAGTGCCTGCTGCCGGTGTCCGGCTGGGAGCACAGCAGGTTGTCG	4440
Sbjct	4381	GCGTCACAGATTCCAGTGCCTGCTGCCGGTGTCCGGCTGGGAGCACAGCAGGTTGTCG	4440
Query	4441	ATATCGACGCCAGTTACGTGCGTAGATTGGGTCACGGCGTGTTCAGCATCGATAAAC	4500
Sbjct	4441	ATATCGACGCCAGTTACGTGCGTAGATTGGGTCACGGCGTGTTCAGCATCGATAAAC	4500
Query	4501	GCACAGGTTTACCTTCACGCTCTGCAAAACGGCAAACCTAACGTTCTGAAAATCCGA	4560
Sbjct	4501	GCACAGGTTTACCTTCACGCTCTGCAAAACGGCAAACCTAACGTTCTGAAAATCCGA	4560

Query	4561	TTATCCCTTACATTGAAGGTGATGGAATCGGTAGATGTAACCCAGCCATGCTGAAAG 	4620
Sbjct	4561	TTATCCCTTACATTGAAGGTGATGGAATCGGTAGATGTAACCCAGCCATGCTGAAAG 	4620
Query	4621	TGGTCGACGCTGCAGTCGAGAAAGCCTATAAAGCGAGCGTAAACCTGGATGGAAA 	4680
Sbjct	4621	TGGTCGACGCTGCAGTCGAGAAAGCCTATAAAGCGAGCGTAAACCTGGATGGAAA 	4680
Query	4681	TTTACACCGGTAAAATCCACACAGGTTATGGTCAGGACGTCTGGCTGCCTGCTGAAA 	4740
Sbjct	4681	TTTACACCGGTAAAATCCACACAGGTTATGGTCAGGATGTCTGGCTGCCTGCTGAAA 	4740
Query	4741	CTCTTGATCTGATTGCTGAATATCGCGTTGCCATTAAAGGTCCGCTGACCACTCCGGTG 	4800
Sbjct	4741	CCCTTGATCTGATTGCTGAATATCGCGTTGCCATTAAAGGTCCGCTGACCACTCCGTG 	4800
Query	4801	GTGGCGGTATTGCTCTCTGAACGTTGCCCTGCGCCAGGAACGGATCTACATCTGCC 	4860
Sbjct	4801	GTGGCGGTATTGCTCTCTGAACGTTGCCCTGCGCCAGGAACGGATCTACATCTGCC 	4860
Query	4861	TGCGTCCGGTACGTTACTATCAGGGCACTCCAAGCCCGTTAAACACCCCTGAACGTGACCG 	4920
Sbjct	4861	TGCGTCCGGTACGTTACTATCAGGGCACTCCAAGCCCGTTAAACACCCCTGAACGTGACCG 	4920
Query	4921	ATATGGTTATCTCCGTAAAACCTCGGAAGACATTTATCGGGTATCGAATGGAAAGCAG 	4980
Sbjct	4921	ATATGGTTATCTCCGTAAAACCTCGGAAGACATTTATCGGGTATCGAATGGAAAGCAG 	4980
Query	4981	ACTCTGCCGACGCCGAGAAAGTGATTAATTCTCGCTGAAGAGATGGGGTGAAGAAAA 	5040
Sbjct	4981	ACTCTGCCGACGCCGAGAAAGTGATTAATTCTCGCTGAAGAGATGGGGTGAAGAAAA 	5040
Query	5041	TTCGCTCCCGAACATTGTTATCGGTATTAAGCCGTTCGGAAGAAGGCACCAAC 	5100
Sbjct	5041	TTCGCTCCCGAACATTGTTATCGGTATTAAGCCGTTCGGAAGAAGGCACCAAC 	5100
Query	5101	GTCTGGTTCGTCAGCGATCGAATACGCAATTGCTAACGATCGTACTCTGTGACTCTGG 	5160
Sbjct	5101	GTCTGGTTCGTCAGCGATCGAATACGCAATTGCTAACGATCGTACTCTGTGACTCTGG 	5160
Query	5161	TGCACAAAGGCAACATCATGAAGTTCACCGAAGGAGCGTTAAAGACTGGGCTACCAAC 	5220
Sbjct	5161	TGCACAAAGGCAACATCATGAAGTTCACCGAAGGAGCGTTAAAGACTGGGCTACCAAC 	5220
Query	5221	TGGCCCGTGAAGAGTTGGCGCTGAACGTGATCGACCGTGGCCCTGGCTAAAGTTAAA 	5280
Sbjct	5221	TGGCCCGTGAAGAGTTGGCGCTGAACGTGATCGACCGTGGCCCTGGCTAAAGTTAAA 	5280
Query	5281	ACCCGAAACACTGGCAAAGAGATCGTCATTAAGACGTGATTGCTGATGCCCTCGAAC 	5340
Sbjct	5281	ACCCGAAACACTGGCAAAGAGATCGTCATTAAGACGTGATTGCTGATGCCCTCGAAC 	5340
Query	5341	AGATCCTGCTGCGTCC 5356 	
Sbjct	5341	AGATCCTGCTGCGTCC 5356 	

**Abbildung 110: Verknüpfte Sequenzen von „E5-P2-3T5 Eco7“ (= Query) und Probe „E5-11-13-S39 Eco7“ (= Sbjct) (= „Paar E5-2“)**

Score 9823 bits (5319)	Expect 0.0	Identities 5407/5451 (99%)	Gaps 0/5451 (0%)	Strand Plus/Plus
Query 1	CGCGGGGAAAGGGACTCAGGCTCAGTTCATCATGGAGAAATATGGTATTCCGCAAATCTC		60	
Sbjct 1	CGCGGGGAAAGGGACTCAGGCTCAGTTCATCATGGAGAAATATGGTATTCCGCAAATCTC		60	
Query 61	CACTGGCATAATGCTGCGTCTGCGGTCAAATCTGGCTCCGAGCTGGTAAACAAGCAA		120	
Sbjct 61	CACTGGCATAATGCTGCGTCTGCGGTCAAATCTGGCTCCGAGCTGGTAAACAAGCAA		120	
Query 121	AGACATTATGGATGCTGGCAAATGGTCACCGACGAACGGTATCGCGCTGGTAAAGA		180	
Sbjct 121	AGACATTATGGATGTTGCGCAAATGGTCACCGACGAACGGTATCGCGCTGGTAAAGA		180	
Query 181	GCGCATTGCTCAGGAAGACTGCCGTAAATGGTTCTGTGGACGGCTCCCGTACCAT		240	
Sbjct 181	GCGCATTGCTCAGGAAGACTGCCGTAAATGGTTCTGTGGACGGCTCCCGTACCAT		240	
Query 241	TCCGCAGGCAGACCGATGAAAGAACGGCATCAATGGTATTACGTTCTGGAATTCGA		300	
Sbjct 241	TCCGCAGGCAGACCGATGAAAGAACGGCATCAATGGTATTACGTTCTGGAATTCGA		300	
Query 301	CGTACCGGACGAACTGATTGTTATCGTAGGCCGCCGTTCATGCGCGCTG		360	
Sbjct 301	CGTACCGGACGAACTGATCGTTGACCGTATCGTAGGCCGCCGTTCATGCGCGCTG		360	
Query 361	TCGTGTTATCAGTTAAATTCAATCCGCCGAAAGTAGAAGGCAAAGACGACGTTACCG		420	
Sbjct 361	TCGTGTTATCAGTTAAATTCAATCCGCCGAAAGTAGAAGGCAAAGACGACGTTACCG		420	
Query 421	TGAAGAACTGACTACCCGTAAAGACGATCAGGAAGAACCGTGCCTAACGTTCTGGTGA		480	
Sbjct 421	TGAAGAACTGACTACCCGTAAAGACGATCAGGAAGAACCGTGCCTAACGTTCTGGTGA		480	
Query 481	ATACCATCAGATGACTGCACCGCTGATCGGCTACTACTCCAAAGAACGGGAAGCGGTAA		540	
Sbjct 481	ATACCATCAGATGACTGCACCGCTGATCGGCTACTACTCCAAAGAACGGGAAGCGGTAA		540	
Query 541	CACCAAATACGCAGGAAAGTTGACGGAAATTGTTCGGCCGGTAACAAACGGTCACAGGT		600	
Sbjct 541	CACCAAATACGCAGGAAAGTTGACGGAAATTGTTCGGCCGGTAACAAACGGTCACAGGT		600	
Query 601	AATGACTGCCAGTTCATCTGCTACCGACCGCATACTCCGATGGTATTAGTCCAGT		660	
Sbjct 601	AATGACTGCCAGTTCATCTGCTACCGACCGCATACTCCGATGGTATTAGTCCAGT		660	
Query 661	ACCCACCGCTGTACCGCCAAGAGCCAGTTCCGCTACGTGAGGCAGGCTGTATTGATATG		720	
Sbjct 661	ACCCACCGCTGTACCGCCAAGAGCCAGTTCCGCTACGTGAGGCAGGCTGTATTGATATG		720	
Query 721	TTTGAGATTATGCTCGAGCATCGCTACCCAGCCGAAATCTCCTGCCCTAGTGTAGCGG		780	
Sbjct 721	TTTGAGATTATGCTCGAGCATCGCTACCCAGCCGAAATCTCCTGCCCTAGTGTAGCGG		780	
Query 781	CGTGGCATTCTGCAAGTGGGTCGACCGATTTGACGATATCGCAAATGCACCGATT		840	
Sbjct 781	CGTGGCATTCTGCAAGTGGGTCGACCGATTTGACGATATCGCAAATGCACCGATT		840	
Query 841	TTCACCTAGCTGTGTCAGGGTTAAAGCTGCCGAATGAGTTGCTGCCAGCGCAG		900	
Sbjct 841	TTCACCTAGCTGTGTCAGGGTTAAAGCTGCCGAATGAGTTGCTGCCAGCGCAG		900	
Query 901	CAGCGCCGCAACGTGCATGCCGTCGAAAGACATCGTTGAACTTGGCTTTGTCAC		960	
Sbjct 901	CAGCGCCGCAACGTGCATGCCGTCGAAAGACATCGTTGAACTTGGCTTTGTCAC		960	
Query 961	GTCGTCGTTAGGGTGAACCTTACGTTCATCCCGCGCACGCCGCCAGTAATTCACTGG		1020	
Sbjct 961	GTCGTCGTTAGGGTGAACCTTACGTTCATCCCGCGCACGCCGCCAGTAATTCACTGG		1020	
Query 1021	CCGGTTAGCCAGCAGCTCGTCATGTTCATGTTACTTGCCTGCCAGTAATTCACTGGCA		1080	
Sbjct 1021	CCGGTTAGCCAGCAGCTCGTCATGTTCATGTTACTTGCCTGCCAGTAATTCACTGGCA		1080	
Query 1081	GATAGCCAGCGGAATTCTCGTCATGCTGCTGCCAGTAATTCACTCGCCCTGCCG		1140	
Sbjct 1081	GATAGCCAGCGGAATTCTCGTCATGCTGCTGCCAGTAATTCACTCGCCCTGCCG		1140	

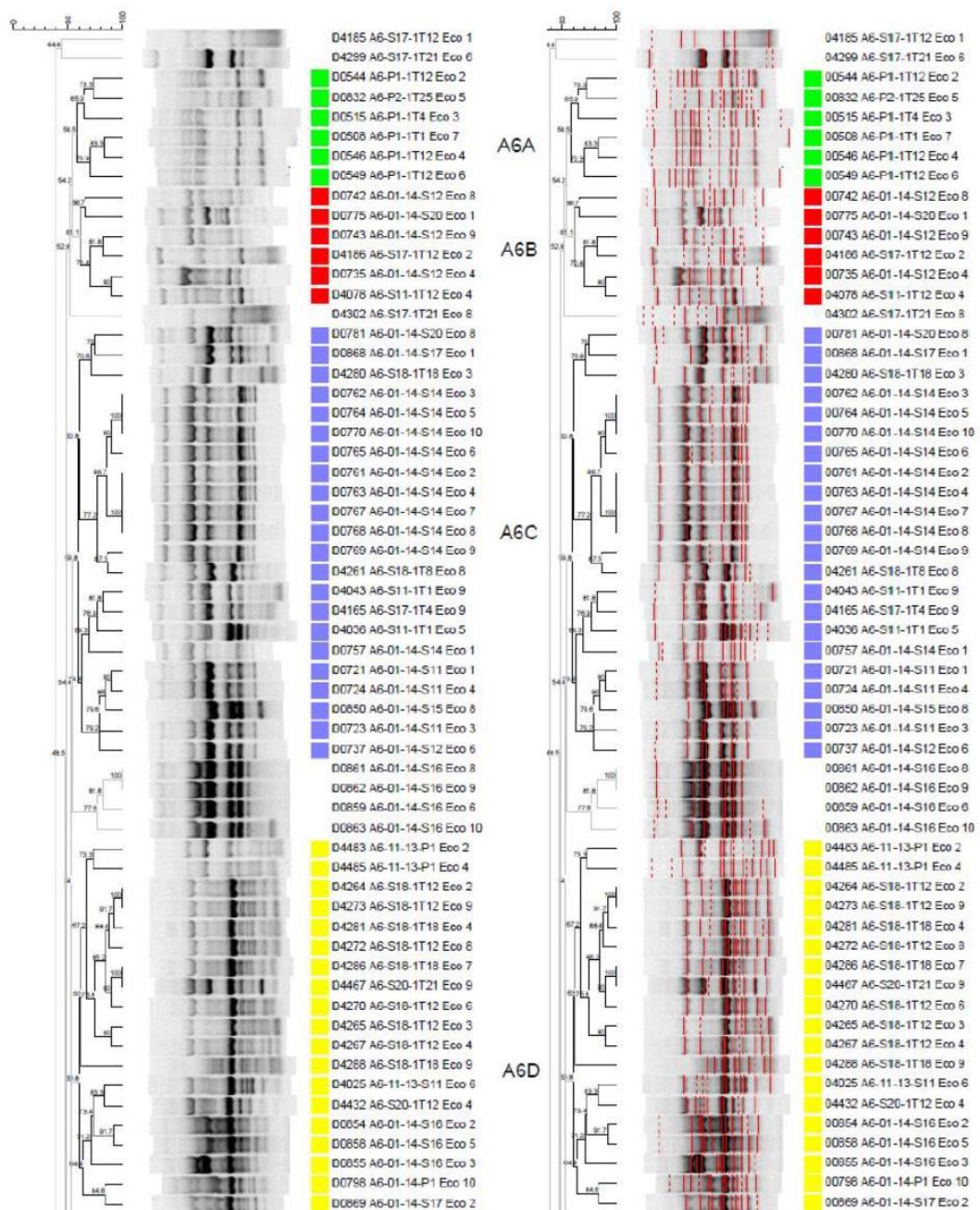


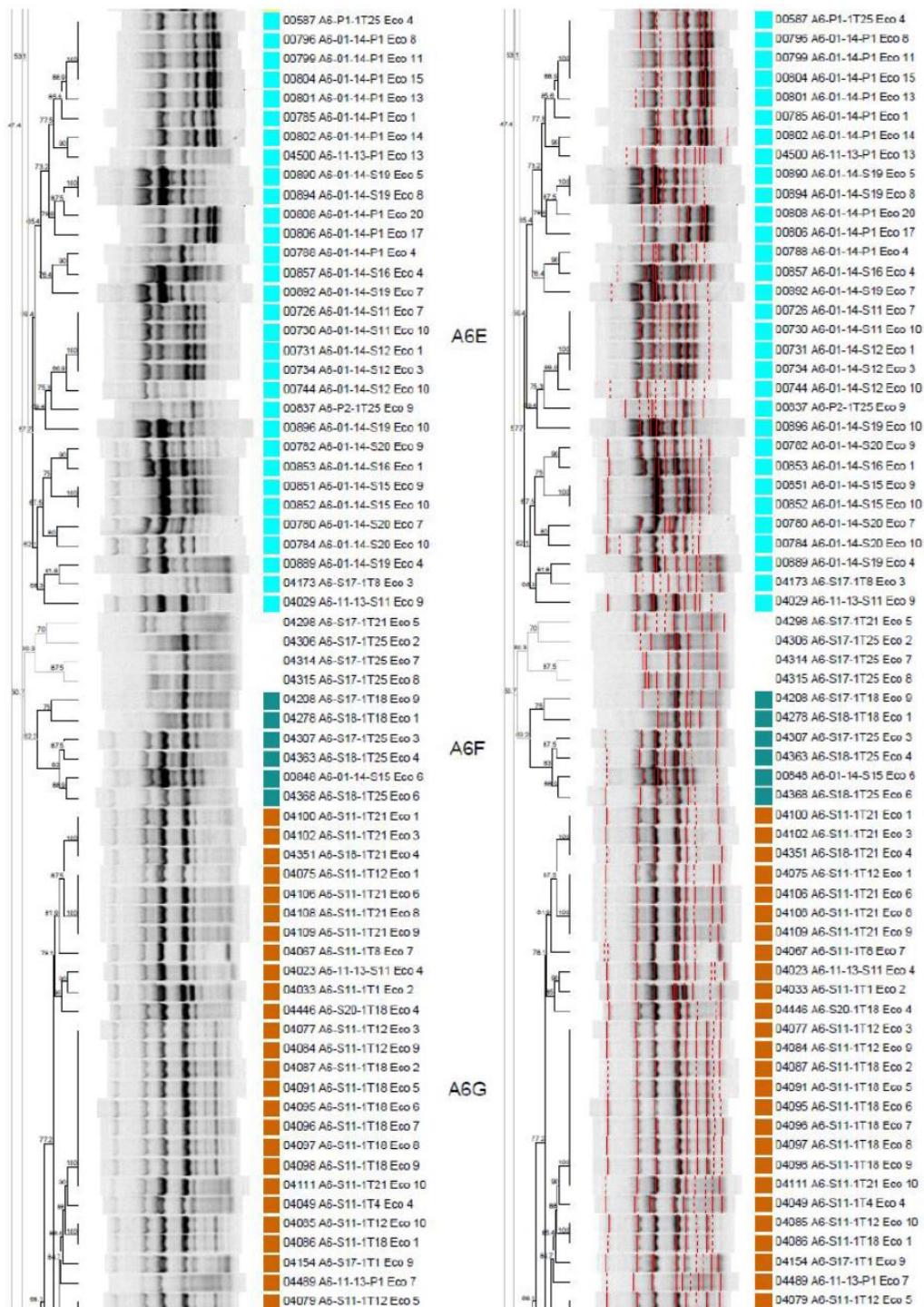
Query	2281	CGCGTGAGAAAAGCGCGTGGCGCAAAGCGATCGCACCAACCGGTCGTGGTATCGGGCTG 	2340
Sbjct	2281	CGCGTGAGAAAAGCGCGTGGCGCAAAGCGATCGCACCAACCGGTCGTGGTATCGGGCTG 	2340
Query	2341	CTTATGAAGATAAAAGTAGCACGTCGCGGCTCGCGTGTGGCGACCTTTGACAAAGAAA 	2400
Sbjct	2341	CTTATGAAGATAAAAGTAGCACGTCGCGGCTCGCGTGTGGCGACCTTTGACAAAGAAA 	2400
Query	2401	CCTTCGCTGAAAAACTGAAAGAAGTGTGAAATATCACAACCTCCAGTTGGTTAACTACT 	2460
Sbjct	2401	CCTTCGCTGAAAAACTGAAAGAAGTGTGAAATATCACAACCTCCAGTTGGTTAACTACT 	2460
Query	2461	ACAAAGCTGAAGCGGTTGATTACAGAAAGTTCTGGATGATAACGATGGCTGTTGCCGACA 	2520
Sbjct	2461	ACAAAGCTGAAGCGGTTGATTACAGAAAGTTCTGGATGATAACGATGGCTGTTGCCGACA 	2520
Query	2521	TCCTGACTTCTATGGTGGTTGACGTTCTGACCTGCTCGACCAGGCGCTCAGCGTGGCG 	2580
Sbjct	2521	TCCTGACTTCTATGGTGGTTGACGTTCTGACCTGCTCGACCAGGCGCTCAGCGTGGCG 	2580
Query	2581	ATTTCGTCATGTTGAAGGTGCGCAGGGTACGCTGCTGGATATCGACCAACGGTACTTATC 	2640
Sbjct	2581	ATTTCGTCATGTTGAAGGTGCGCAGGGTACGCTGCTGGATATCGACCAACGGTACTTATC 	2640
Query	2641	CGTACGTAACCTCTCCAACACCACTGCTGGTGGCGTGGCGACCGGTTCCGGCTGGGC 	2700
Sbjct	2641	CGTACGTAACCTCTCCAACACCACTGCTGGTGGCGTGGCGACCGGTTCCGGCTGGGC 	2700
Query	2701	CGCGTTATGTTGATTACGTTCTGGGTATCCTCAAAGCTTACTCCACTCGTGTAGGTGCAG 	2760
Sbjct	2701	CGCGTTATGTTGATTATGTTCTGGGTATCCTCAAAGCTTACTCAACTCGTGTAGGTGCAG 	2760
Query	2761	GTCCGTTCCCACCGAACACTGTTGATGAAACTGGCGAGTCCTCTGCAAGCAGGTAACG 	2820
Sbjct	2761	GTCCGTTCCCACCGAACACTGTTGATGAAACTGGCGAGTCCTCTGCAAGCAGGTAACG 	2820
Query	2821	AATTCCGGCGCAACTACGGGCGTCGTCGTCGACCGGCTGGCTGGACACCGTTGCCGTT 	2880
Sbjct	2821	AATTCCGGCGCAACTACGGGCGTCGTCGTCGACCGGCTGGCTGGACACCGTTGCCGTT 	2880
Query	2881	GTCGTGCGGTACAGCTGAACCTCCCTGTCGGCTCTGCCGACTAAACTGGACGTTCTGG 	2940
Sbjct	2881	GTCGTGCGGTACAGCTGAACCTCCCTGTCGGCTCTGCCGACTAAACTGGACGTTCTGG 	2940
Query	2941	ATGGCCTGAAAGAGGTTAAACTCTCGCTGGCTTACCGTATGGATCTTCACCTTTGTAG 	3000
Sbjct	2941	ATGGCCTGAAAGAGGTTAAACTCTCGCTGGCTTACCGTATGGATCTTCACCTTTGTAG 	3000
Query	3001	CTGTACCACCGCCTGCTTCCTCGATCAGCTCTCTTACGCCAGGTCAACCAAGTCG 	3060
Sbjct	3001	CTGTACCACCGCCTGCTTCCTCGATCAGCTCTCTTACGCCAGGTCAACCAAGTCG 	3060
Query	3061	CCGTAGAAGTTGATACTTCGCCGTAGAGGATCTGAAATTCAGCCGTTAACGGTCA 	3120
Sbjct	3061	CCGTAGAAGTTGATACTTCGCCGTAGAGGATCTGAAATTCAGCCGTTAACGGTCA 	3120
Query	3121	GCGATTTGTTCTTCACCACTTCACGCCGGTTCGCTACCCACGTTTCGCCCTCT 	3180
Sbjct	3121	GCGATTTGTTCTTCACCACTTCACGCCGGTTCGCTACCCACGTTTCGCCCTCT 	3180
Query	3181	TTCACCGCGCCGATAACGACGGATGTCGAGACGAAACAGAGGGCTAGAATTTCAGCGCTTA 	3240
Sbjct	3181	TTCACCGCGCCGATAACGACGGATGTCGAGACGAAACAGAGGGCTAGAATTTCAGCGCTTA 	3240
Query	3241	CCACCGGTAGGGTTCCGGTTACCGAACATCACACCAATTTCATACGGATCTGGTG 	3300
Sbjct	3241	CCACCGGTAGGGTTCCGGTTACCGAACATCACACCAATTTCATACGGATCTGGTG 	3300
Query	3301	ATGAAGATCAGCGTGTGGACTGCTCAGGTTACCCGCCAGCTACGCATCGCTGG 	3360
Sbjct	3301	ATGAAGATCAGCGTGTGGACTGCTCAGGTTACCCGCCAGCTACGCATCGCTGG 	3360
Query	3361	CTCATCATACGTGCCGCAAGGCCCATGTGAGAGTCGCCGATTCGCCCTCGATTCCGCT 	3420
Sbjct	3361	CTCATCATACGTGCCGCAAGGCCCATGTGAGAGTCGCCGATTCGCCCTCGATTCCGCT 	3420

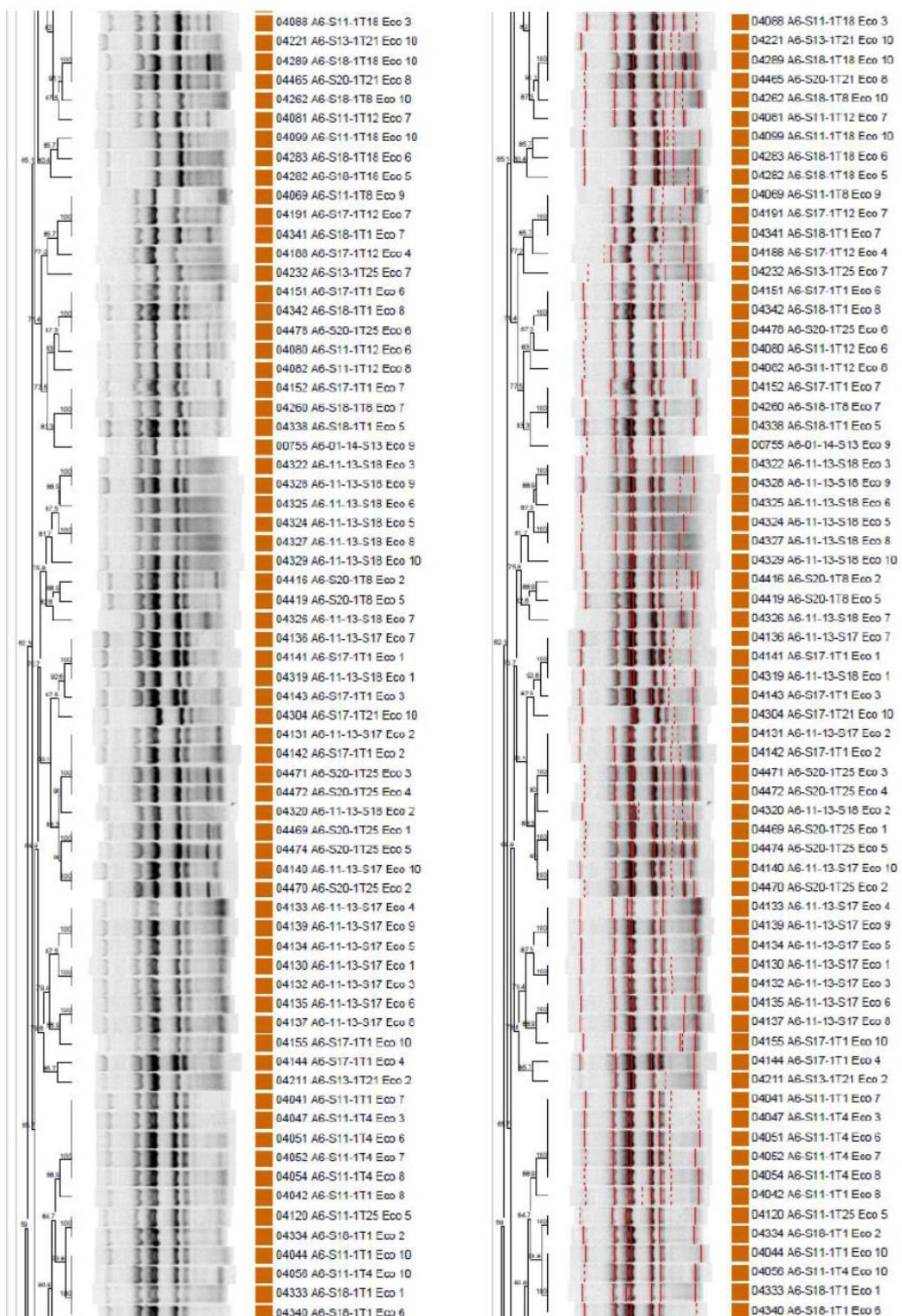
Query	3421	TTCGGCGTCAGTGCCGCCACGGAGTCACGACGATAACGCTACTGCGCCAGAACGCC 3480 
Sbjct	3421	TTCGGCGTCAGTGCCGCCACGGAGTCACGACGATAACGCTACTGCGCCAGAACGCC 3480 
Query	3481	AGGGCGTCACAGATTCAGTGCCTGCTCGCCGGTGTCCGGCTGGGAGCACAGCAGGTTA 3540 
Sbjct	3481	AGGGCGTCACAGATTCAGTGCCTGCTCGCCGGTGTCCGGCTGGGAGCACAGCAGGTTA 3540 
Query	3541	TCGATATCGACGCCAGTTACGTGCGTAGATTGGTCCAGCGCGTGTTCAGCATCGATA 3600 
Sbjct	3541	TCGATATCGACGCCAGTTACGTGCGTAGATTGGTCCAGCGCGTGTTCAGCATCGATA 3600 
Query	3601	AACGCACAGGTTTACCTTCACGCTGCGCTGCCGATCACCTGCAACGTCAGCGTGGTT 3660 
Sbjct	3601	AACGCACAGGTTTACCTTCACGCTGCGCTGCCGATCACCTGCAACGTCAGCGTGGTT 3660 
Query	3661	TTACCGGAAGATTCCCGGTCCTAGATTCGACGACCGGCTGCAACCACATGGTATCGAG 3720 
Sbjct	3661	TTACCGGAAGATTCCCGGTCCTAGATTCGACGACCGGCTGCAACCACATGGTATCGAG 3720 
Query	3721	GTGGTAGATAACGCTATCGACGAAGCGCTCGCGGGTCACTGTAAGAAATTATCGTCACC 3780 
Sbjct	3721	GTGGTAGATAACGCTATCGACGAAGCGCTCGCGGGTCACTGTAAGAAATTATCGTCACC 3780 
Query	3781	ATTACGCCGATAACTCTGCTCTGTACAGGATGACGGGCGGGCATTCCGACCGGTATT 3840 
Sbjct	3781	ATTACGCCGATAACTCTGCTCTGTACAGGATGACGGGCGGGCATTCCGACCGGTATT 3840 
Query	3841	CACCCGGAAGAGGGCGTATCGCGGCCGAAGTGTACATGACCGTTCTGCACGCAGCGGT 3900 
Sbjct	3841	CACCCGGAAGAGGGCGTATCGCGGCCGAAGTGTACATGACCGTTCTGCACGCAGCGGT 3900 
Query	3901	AAATTGACGATAACTCCTATAAGTGTCCGGCGTCTGCACGGCGTTGGTTTCGGTA 3960 
Sbjct	3901	AAATTGACGATAACTCCTATAAGTGTCCGGCGTCTGCACGGCGTTGGTTTCGGTA 3960 
Query	3961	GTAAACGCCCTGTCGCAAAACTGGAGCTGGTTATCCAGCGGAGGGTAAATTACCGT 4020 
Sbjct	3961	GTAAACGCCCTGTCGCAAAACTGGAGCTGGTTATCCAGCGGAGGGTAAATTACCGT 4020 
Query	4021	CAGATCTACGAACACGGGTACCGCAGGCCCGCTGGCGTTACCGCGAGACTGAAAAA 4080 
Sbjct	4021	CAGATCTACGAACACGGGTACCGCAGGCCCGCTGGCGTTACCGCGAGACTGAAAAA 4080 
Query	4081	ACCGGCACCATGGTGGCTTCTGGCCCAGCCTCGAACCTTCACCAATGTGACCGAGTT 4140 
Sbjct	4081	ACCGGCACCATGGTGGCTTCTGGCCCAGCCTCGAACCTTCACCAATGTGACCGAGTT 4140 
Query	4141	GAATATGAAATTCTGGCGAACGTCTGCGTGAGTTGTCGTTCTCACTCCGGCTTCC 4200 
Sbjct	4141	GAATATGAAATTCTGGCGAACGTCTGCGTGAGTTGTCGTTCTCACTCCGGCTTCC 4200 
Query	4201	ATTCGTCTGCGCGACAAGCGCAGGGAAAGAACGACCACTTCCACTATGAAGGCGGCATC 4260 
Sbjct	4201	ATTCGTCTGCGCGACAAGCGTACGGCAAAGAACGACCACTTCCACTATGAAGGCGGCATC 4260 
Query	4261	AAGGCCTTCGTTGAATATCTGAACAAGAACAAAAGCCGATCCACCGAATATCTTAC 4320 
Sbjct	4261	AAGGCCTTCGTTGAATATCTGAACAAGAACAAAAGCCGATCCACCGAATATCTTAC 4320 
Query	4321	TTCTCCACTGAAAAAGACGGTATTGGCGTCAAGTGGCGTTGCGAGTGGACGATGGCTTC 4380 
Sbjct	4321	TTCTCCACTGAAAAAGACGGTATTGGCGTCAAGTGGCGTTGCGAGTGGACGATGGCTTC 4380 
Query	4381	CAGGAAAACATCTACTGCTTTACCAACAAACATTCCGCAGCGTGACGGCGGTACTCACCTG 4440 
Sbjct	4381	CAGGAAAACATCTACTGCTTTACCAACAAACATTCCGCAGCGTGACGGCGGTACTCACCTG 4440 
Query	4441	GCAGGCTTCGTCGGCGATGACCGCTACCCGTAAACGCTACATGGACAAAGAAGGCTAC 4500 
Sbjct	4441	GCAGGCTTCGTCGGCGATGACCGCTACCCGTAAACGCTACATGGACAAAGAAGGCTAC 4500 
Query	4501	AGCAAAAAAGCCAAAGTTAGCGCCACCGGTGACGATGCGCGTGAAGGCTGATTATTGGC 4560 
Sbjct	4501	AGCAAAAAAGCCAAAGTCAGCGCCACCGGTGACGATGCGCGTGAAGGCTGATTATTGGC 4560 

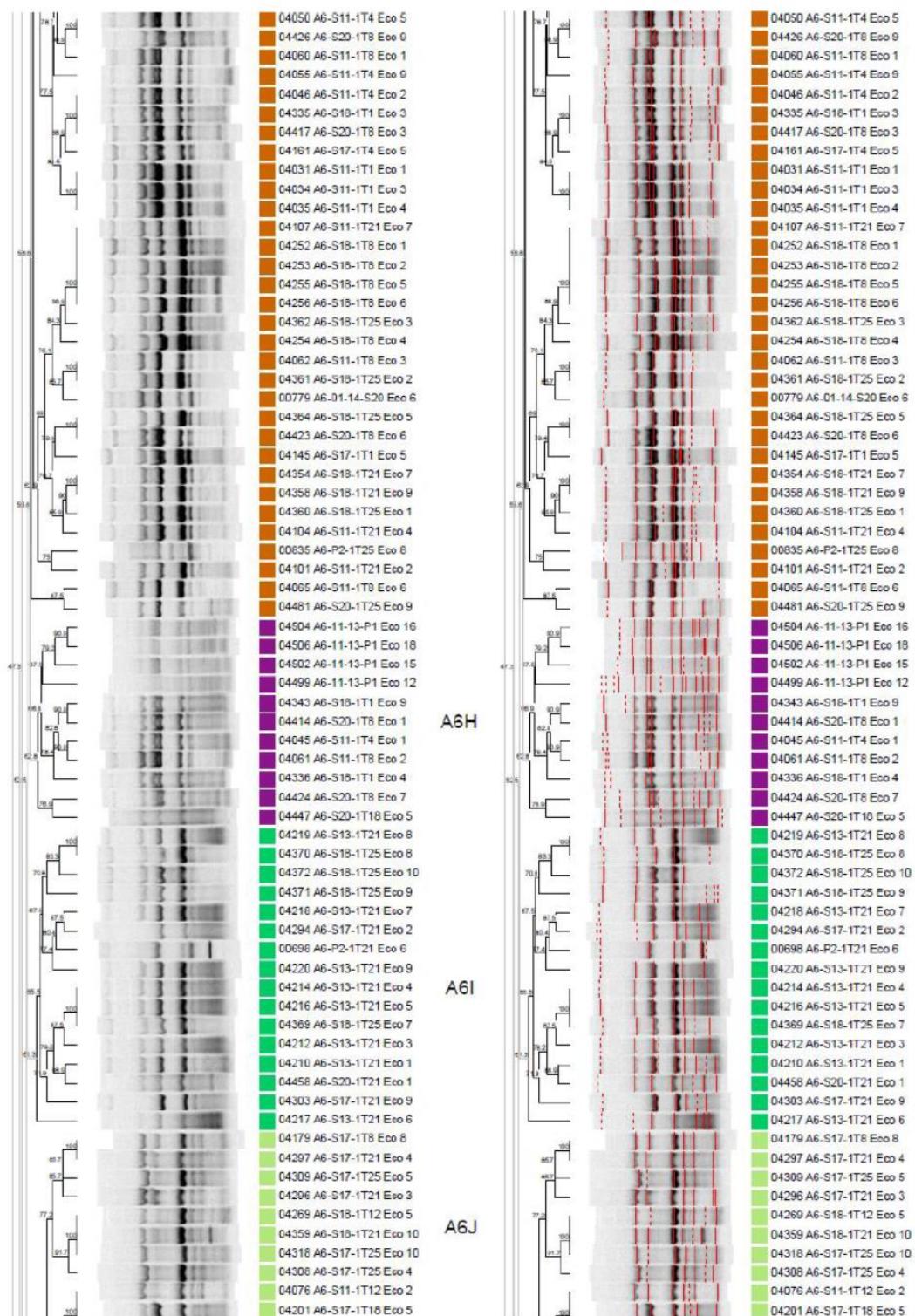
Query	4561	CAGGCCTTGCACACTGTAAAAACCAACTGCCTTCAGGTCAGAACCTCTCTGTAT	4620
Sbjct	4561	CAGGCCTTGCACACTGTAAAAACCAACTGCCTTCAGGTCAGAACCTCTCTGTAT	4620
Query	4621	GATATCGCTCCAGTGACTCCGGTGTGGCGTCGATCTGAGCCATATCCCTACTGCTGTG	4680
Sbjct	4621	GATATCGCTCCAGTGACTCCGGTGTGGCGTCGATCTGAGCCATATCCCTACTGCTGTG	4680
Query	4681	AAAATCAAAGGTTTCTGGTGAAGATGCGACTCCGGCCTGGAAGGCGCAGATGTCGTT	4740
Sbjct	4681	AAAATCAAAGGTTTCTGGTGAAGATGCGACTCCGGCCTGGAAGGCGCAGATGTCGTT	4740
Query	4741	CTTATCTCTGCAGGTGTAGCGCTAACCGGGTATGGATCGTCCGACCTGTTAACGTT	4800
Sbjct	4741	CTTATCTCTGCAGGTGTAGCGCTAACCGGGTATGGATCGTCCGACCTGTTAACGTT	4800
Query	4801	AACGCCGCATCGTAAAAACCTGGTACAGCAAGTTCGAAACCTGCCGAAAGCGTGC	4860
Sbjct	4801	AACGCCGCATCGTAAAAACCTGGTACAGCAAGTTCGAAACCTGCCGAAAGCGTGC	4860
Query	4861	ATTGGTATTACTAAACCCGTTAACACCACTGTTGCAATTGCTGCTGAAGTGCTGAAA	4920
Sbjct	4861	ATTGGTATTACTAAACCCGTTAACACCACTGTTGCGATTGCTGCTGAAGTGCTGAAA	4920
Query	4921	AAAGCCGGTGTATGACAAAAACAAACTGTTCGCGTTACACGCTGGATATCATTGCT	4980
Sbjct	4921	AAAGCCGGTGTATGACAAAAACAAACTGTTCGCGTTACACGCTGGATATCATTGCT	4980
Query	4981	TCCAACACCTTGTGCGGAACTGAAAGC AACAGCCAGCGAAGTTGAAGTGCCGGTT	5040
Sbjct	4981	TCCAACACCTTGTGCGGAACTGAAAGC AACAGCCAGCGAAGTTGAAGTGCCGGTT	5040
Query	5041	ATTGGCGGTACTCTGGTGTACCATTCTGCCGCTGCTCACAGGTTCTGGCGTTAGT	5100
Sbjct	5041	ATTGGCGGTACTCTGGTGTACCATTCTGCCGCTGCTCACAGGTTCTGGCGTTAGT	5100
Query	5101	TTTACCGAGCAGGAAGTGGCTGATCTGACCAACGTATCCAGAACCGGGTACTGAGGTG	5160
Sbjct	5101	TTTACCGAGCAGGAAGTGGCTGATCTGACCAACGTATCCAGAACCGGGTACTGAGGTG	5160
Query	5161	GTTGAAGCGAAAGCCGGTGGCGGGTCTGCAACCCGTCTATGGCCAGGCAGCTGCACGT	5220
Sbjct	5161	GTTGAAGCGAAAGCCGGTGGCGGGTCTGCAACCCGTCTATGGCCAGGCAGCTGCACGT	5220
Query	5221	TTTGGTCTGTCCTGGTGTGCACTGCAGGGCGAACAAAGGCGTGTGCAATGTGCCAAC	5280
Sbjct	5221	TTTGGTCTGTCCTGGTACCGCAGTGCAGGGCGAACAAAGGCGTGTGCAATGTGCCAAC	5280
Query	5281	GTTGAAGGCAGGGTCAGTACGCCGTTCTCTCAACCGCTGCTGGTAAAAAC	5340
Sbjct	5281	GTTGAAGGCAGGGTCAGTACGCCGTTCTCTCAACCGCTGCTGGTAAAAAC	5340
Query	5341	GGCGTGGAAAGACGCTAAATCTATCGGTACCCGTAGCGCATTGAAACAGAACCGCCTGGAA	5400
Sbjct	5341	GGCGTGGAAAGACGCTAAATCTATCGGTACCCGTAGCGCATTGAAACAGAACCGCCTGGAA	5400
Query	5401	GGTATGCTGGATACGCTGAAGAAAGATATCGCTCTGGGGCAGGAGTCGTT	5451
Sbjct	5401	GGTATGCTGGATACGCTGAAGAAAGATATCGCTCTGGGGCAGGAGTCGTT	5451

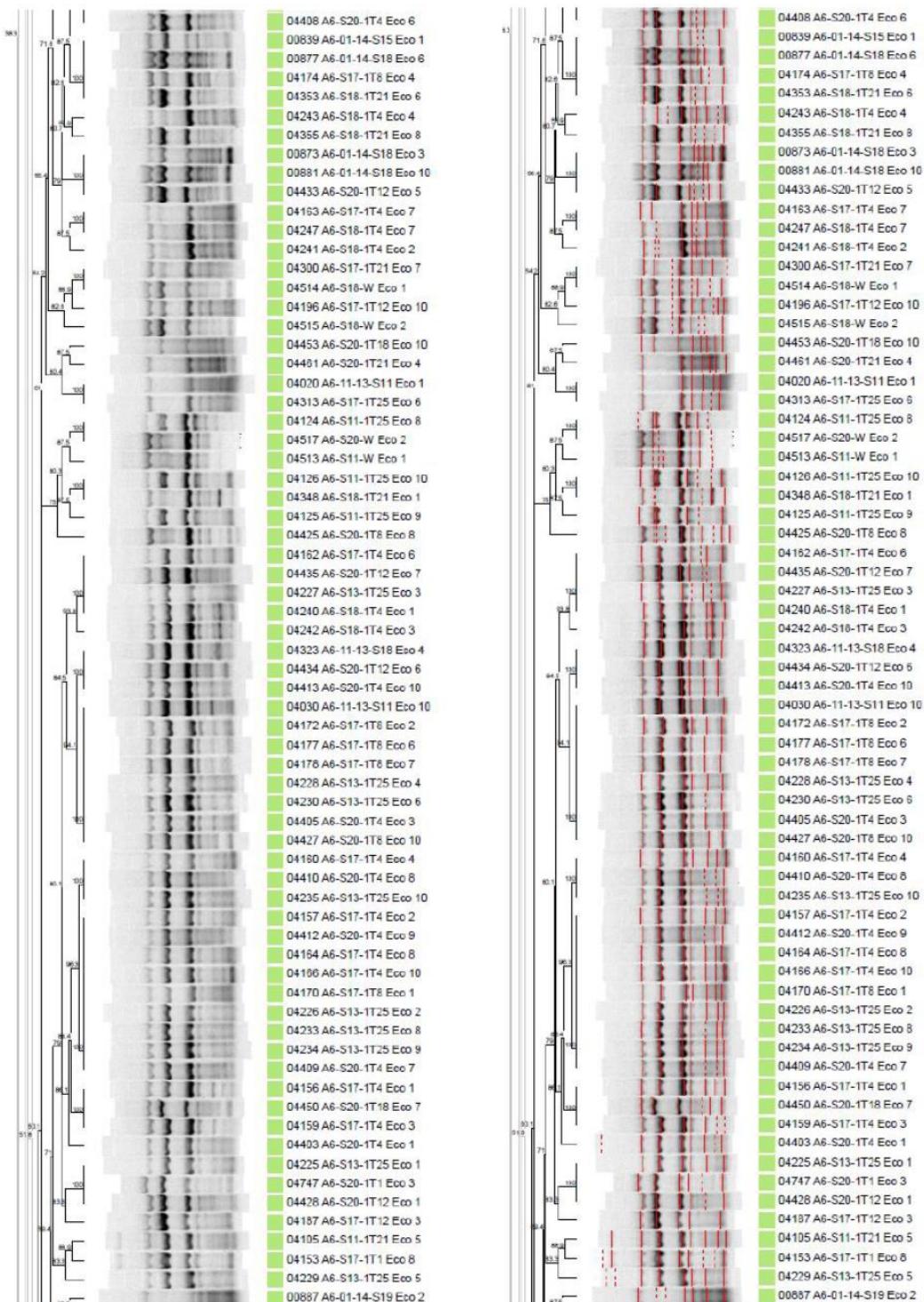
**Abbildung 111: Verknüpfte Sequenzen von „A6-07-13-P1 Eco2“ (= Query) und Probe „A6-S8-3T3 Eco4“ (= Sbjct) (= „Paar A6-1“)**

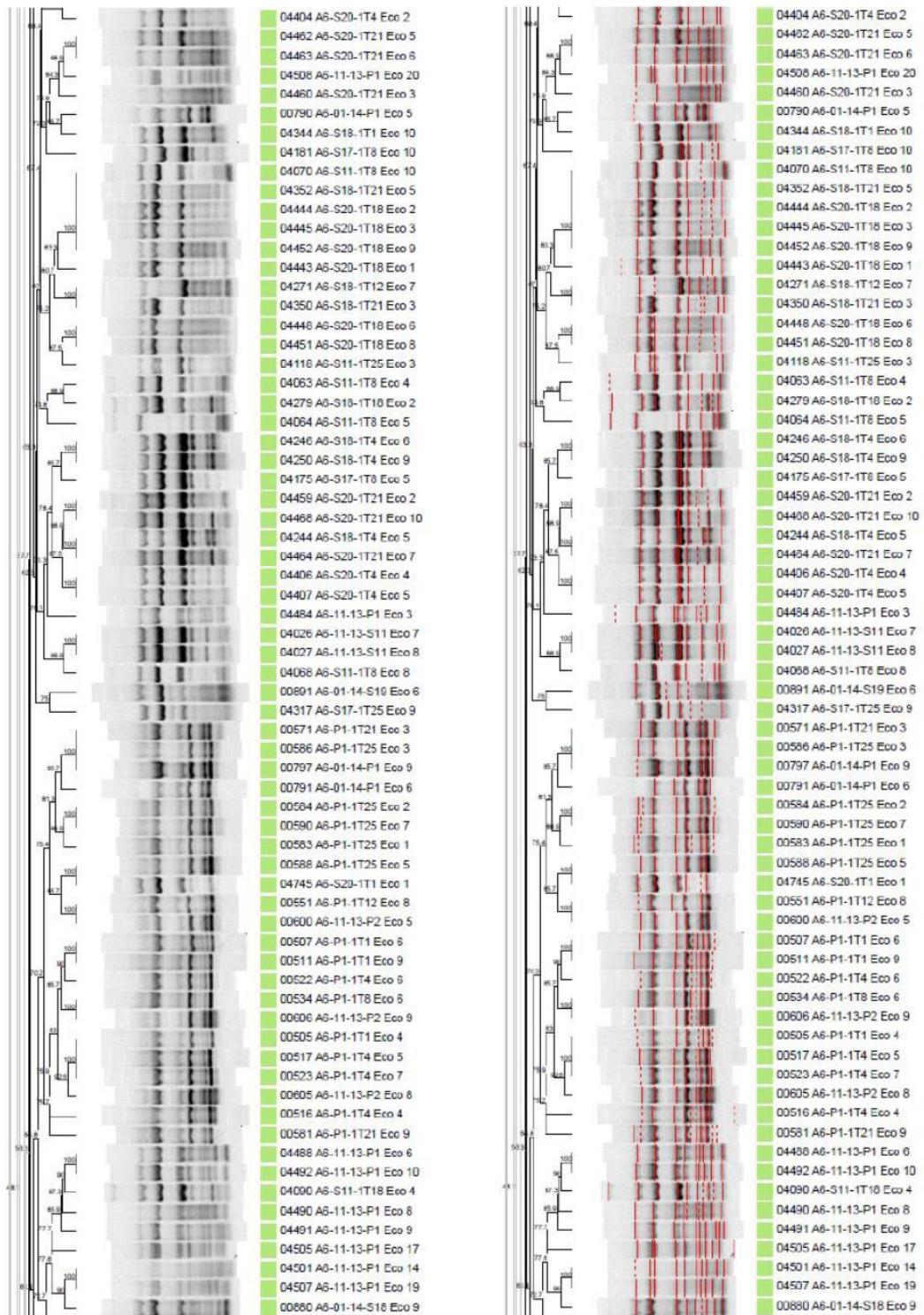


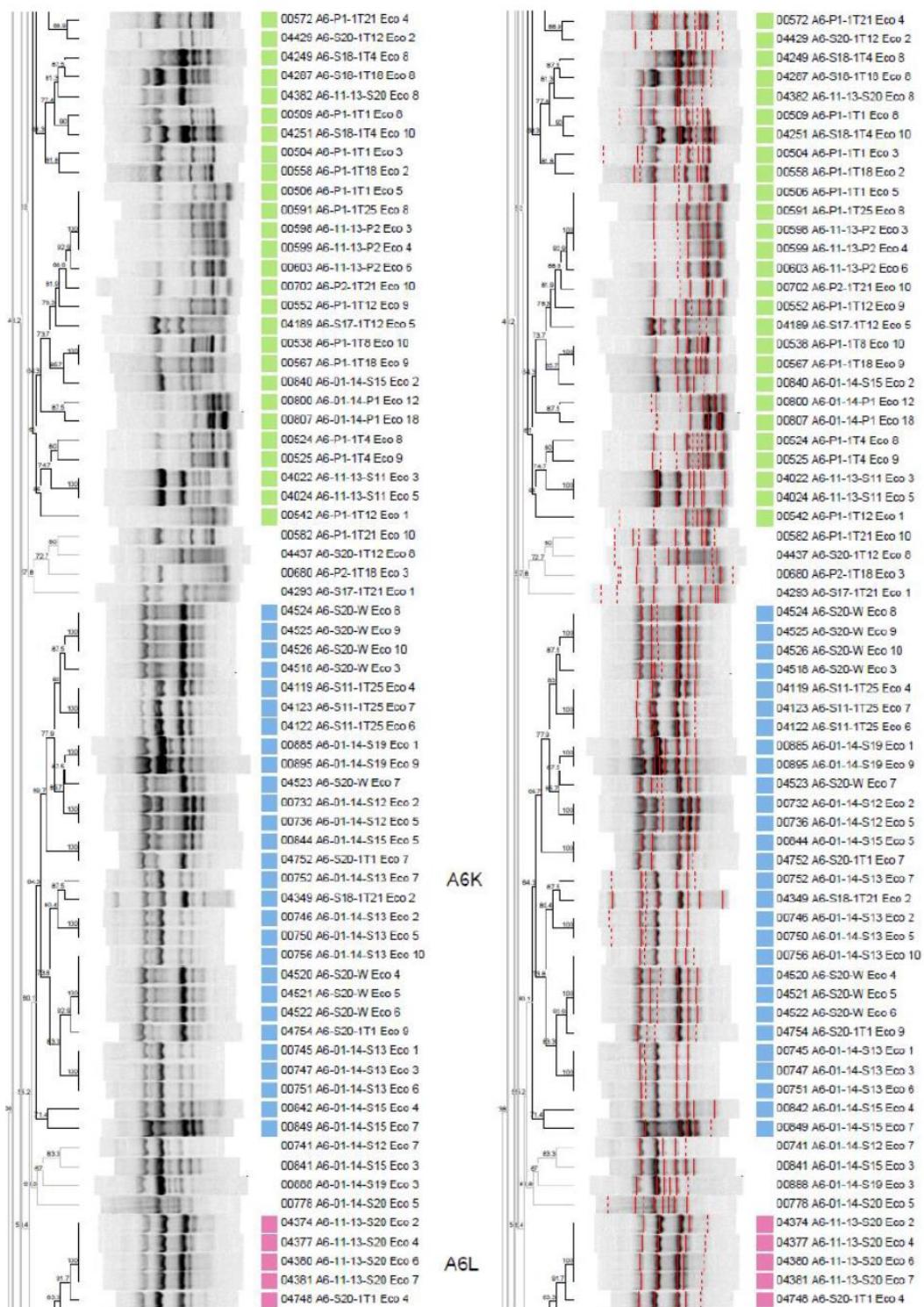


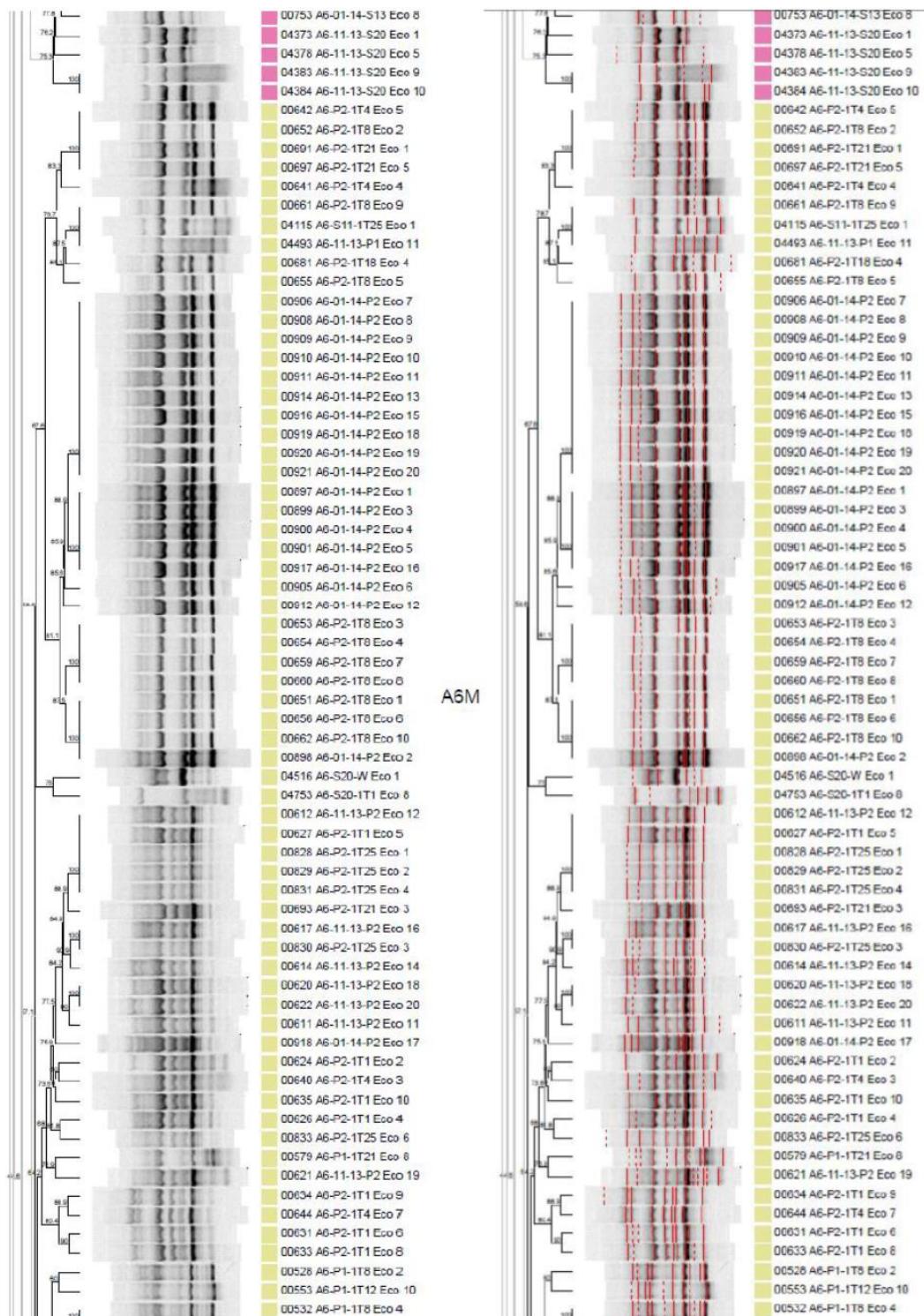


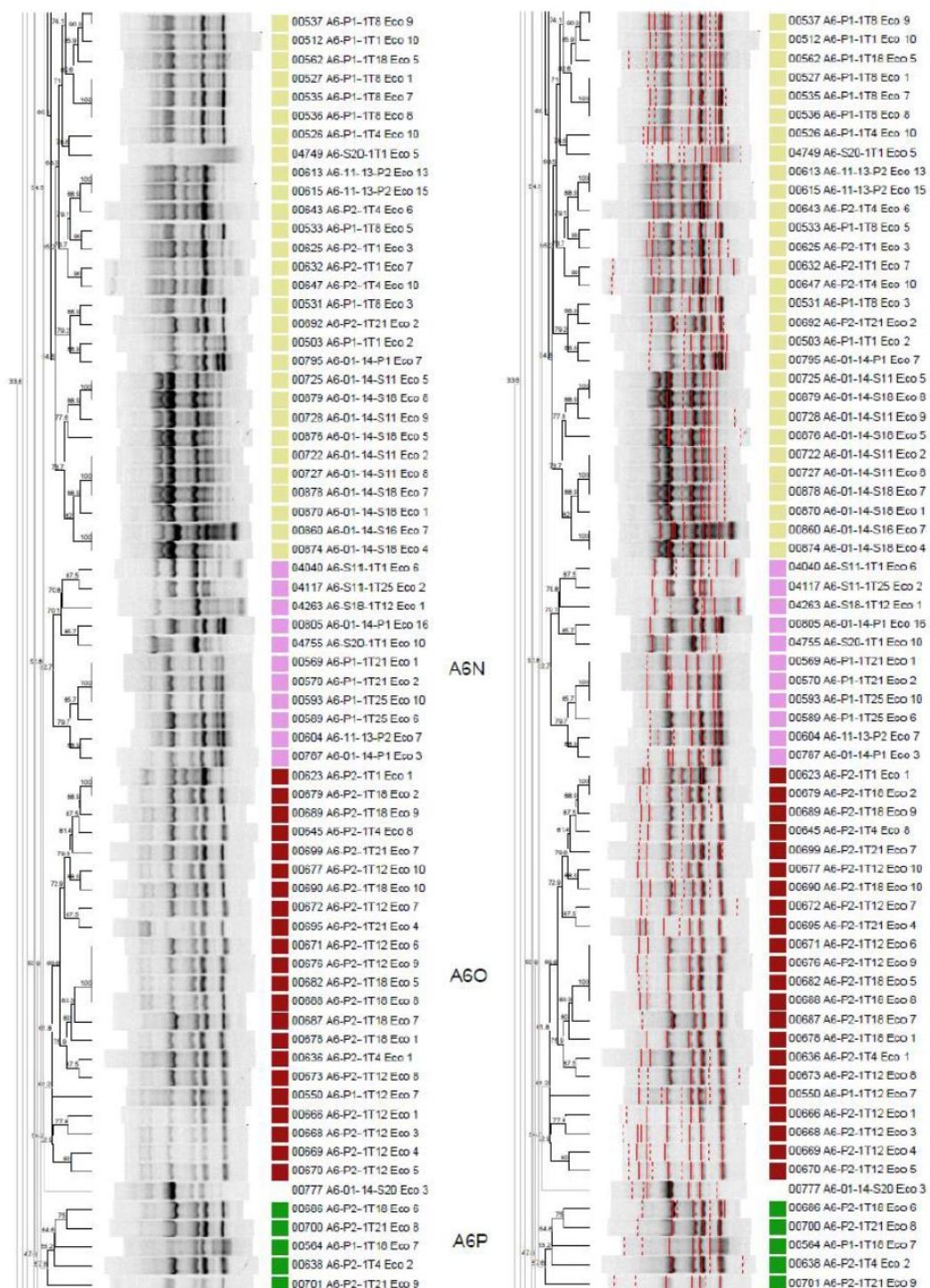












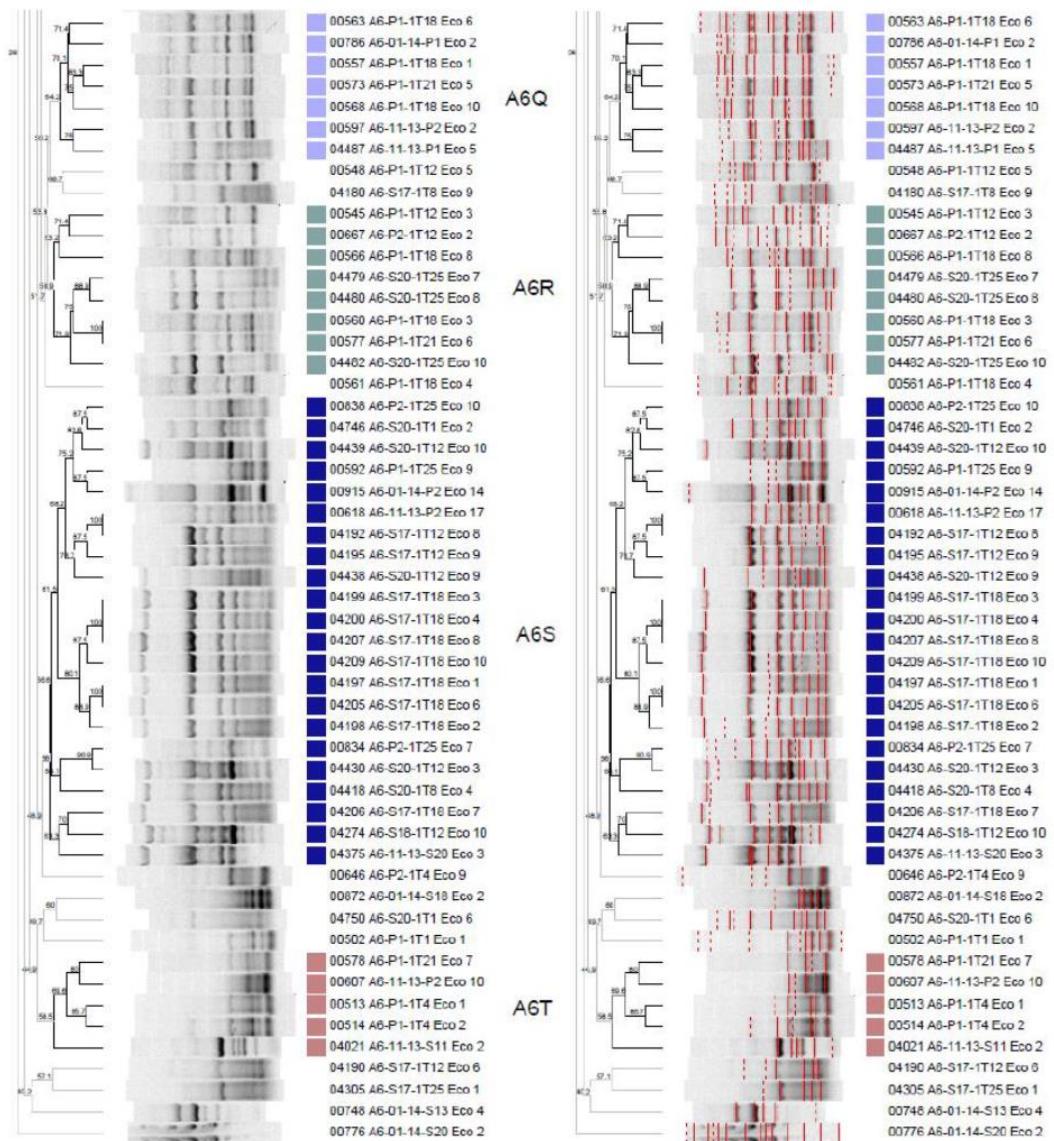
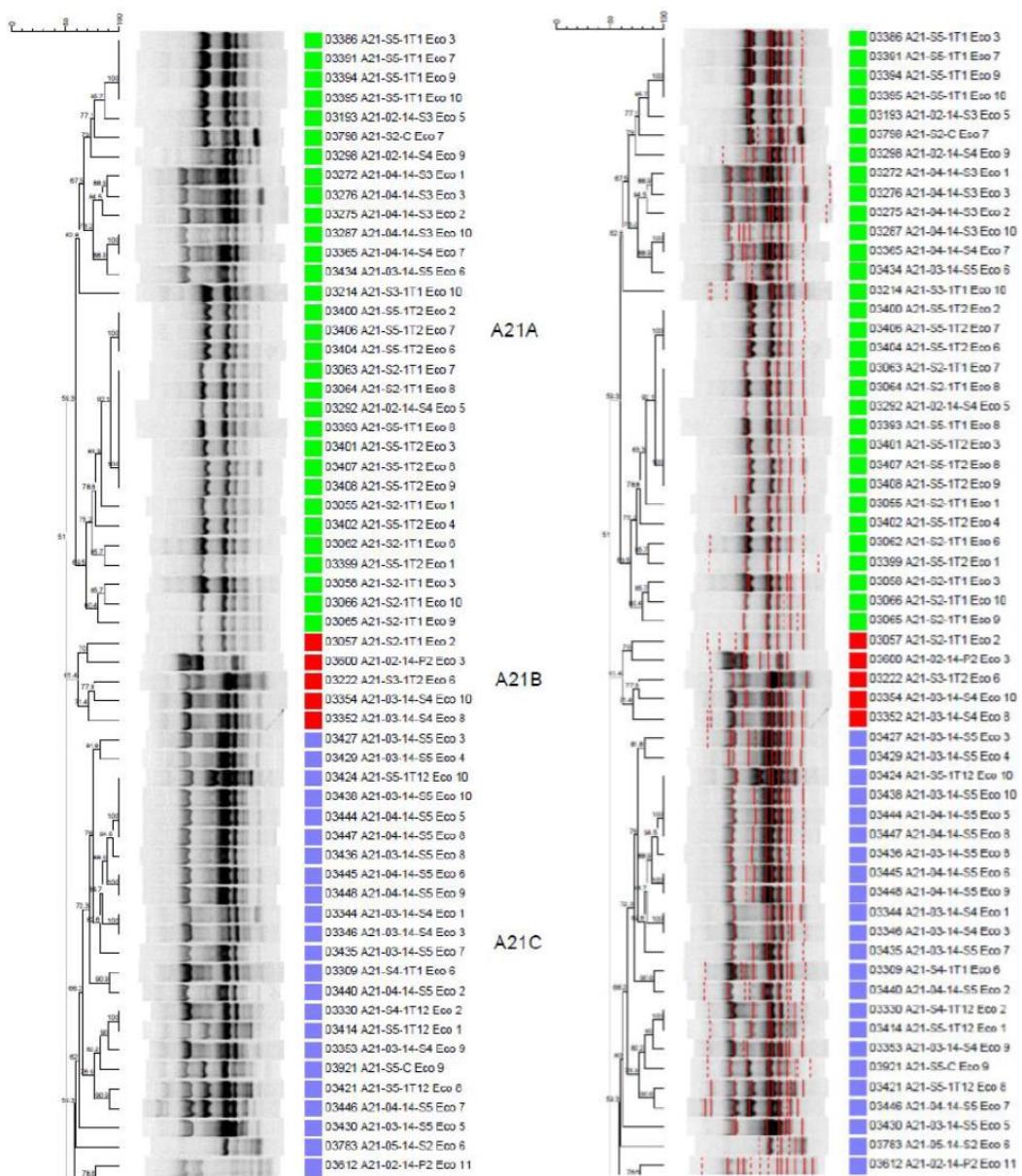
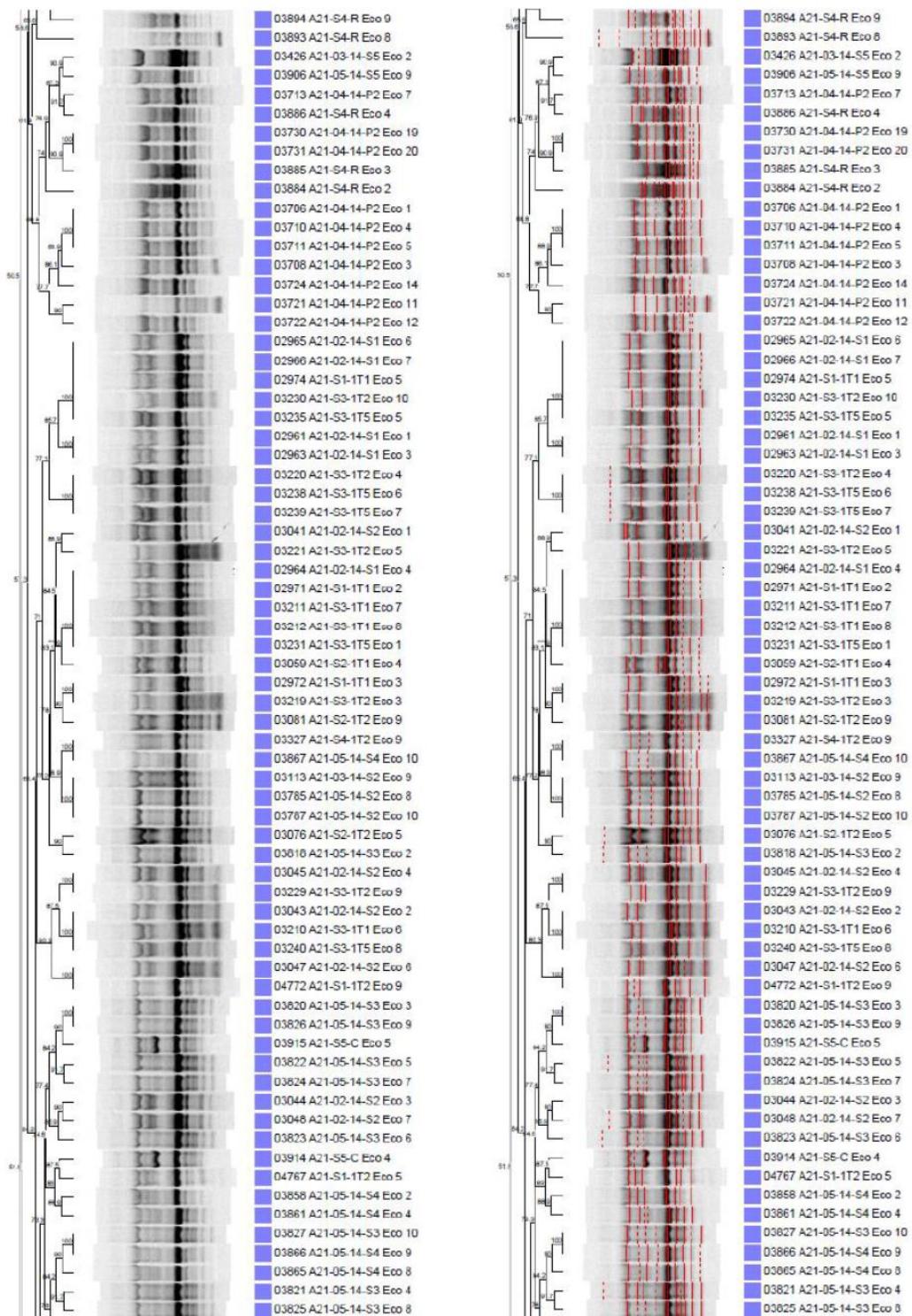
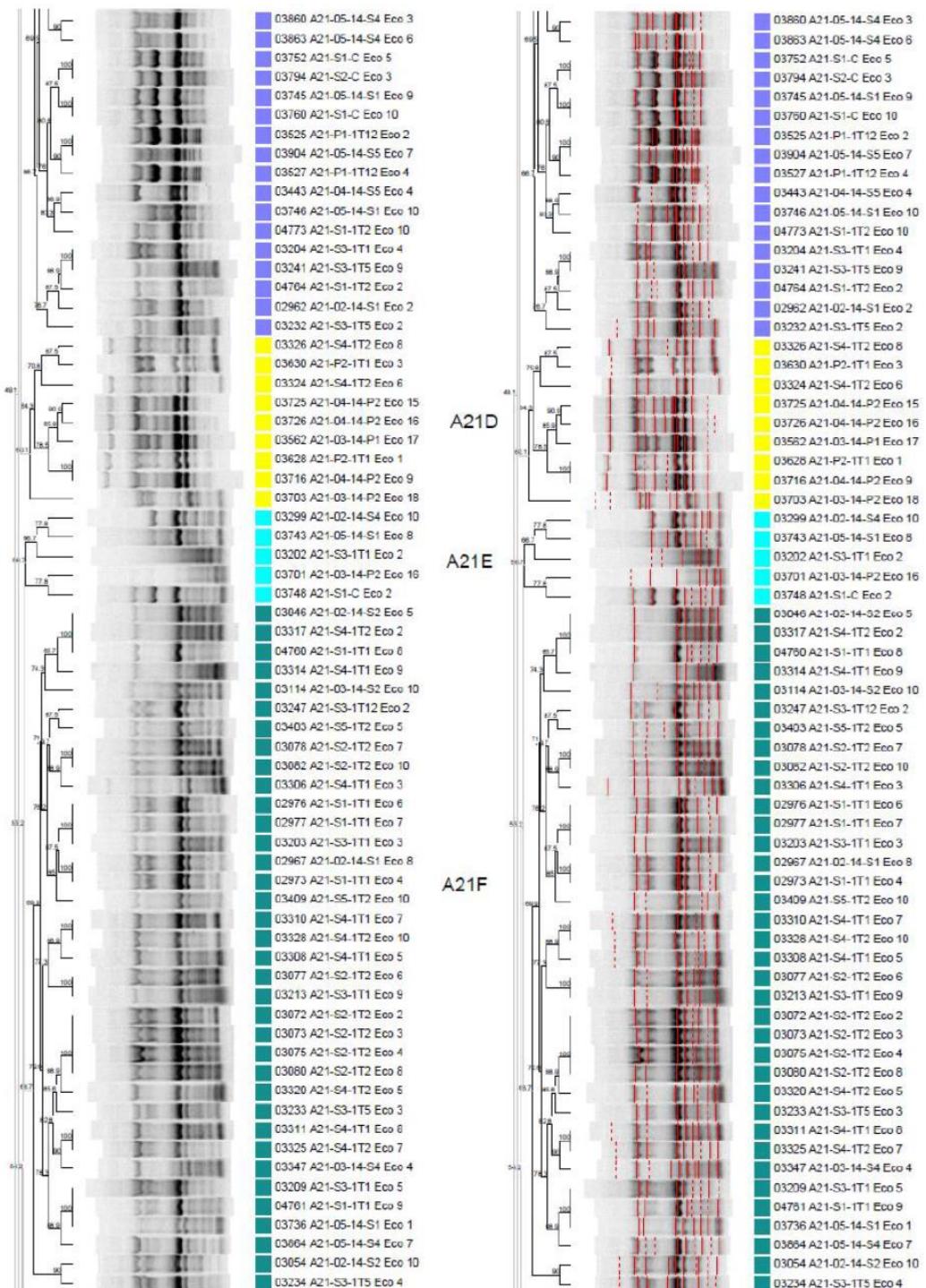
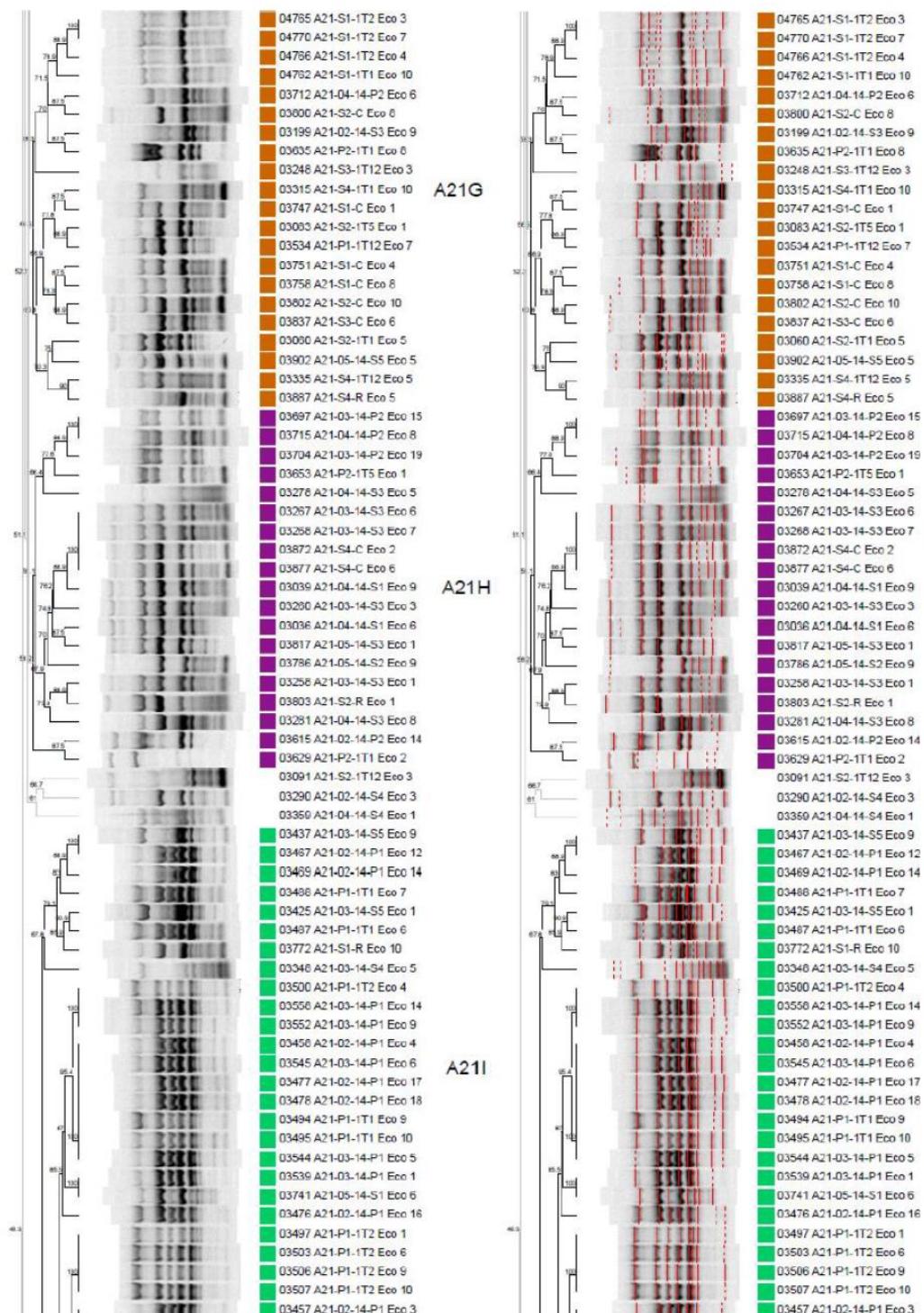


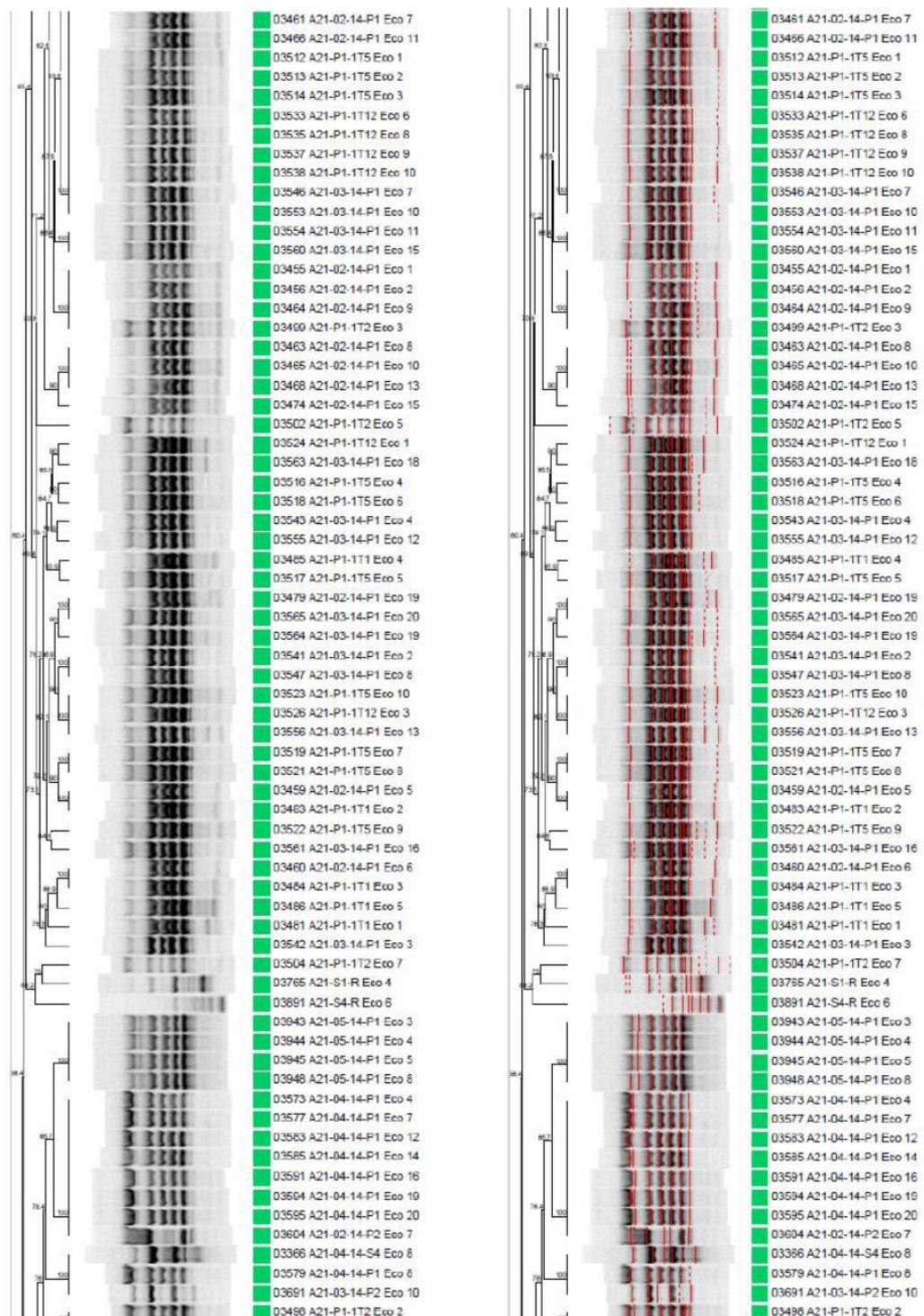
Abbildung 112: Cluster-Analyse aller ERIC-Bandenmuster untersuchter *E. coli*-Isolate aus „Tracking“-Betrieb A6

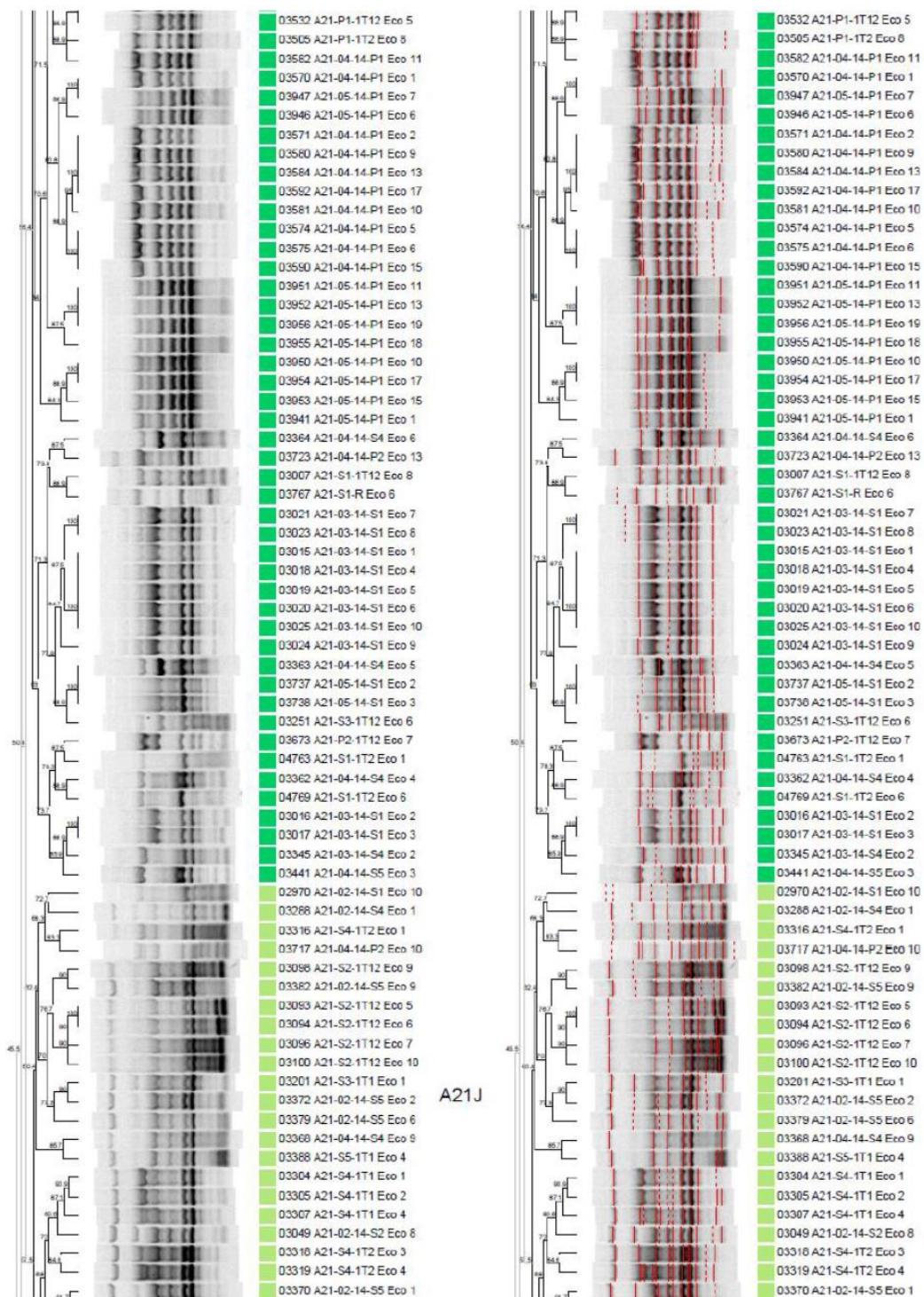


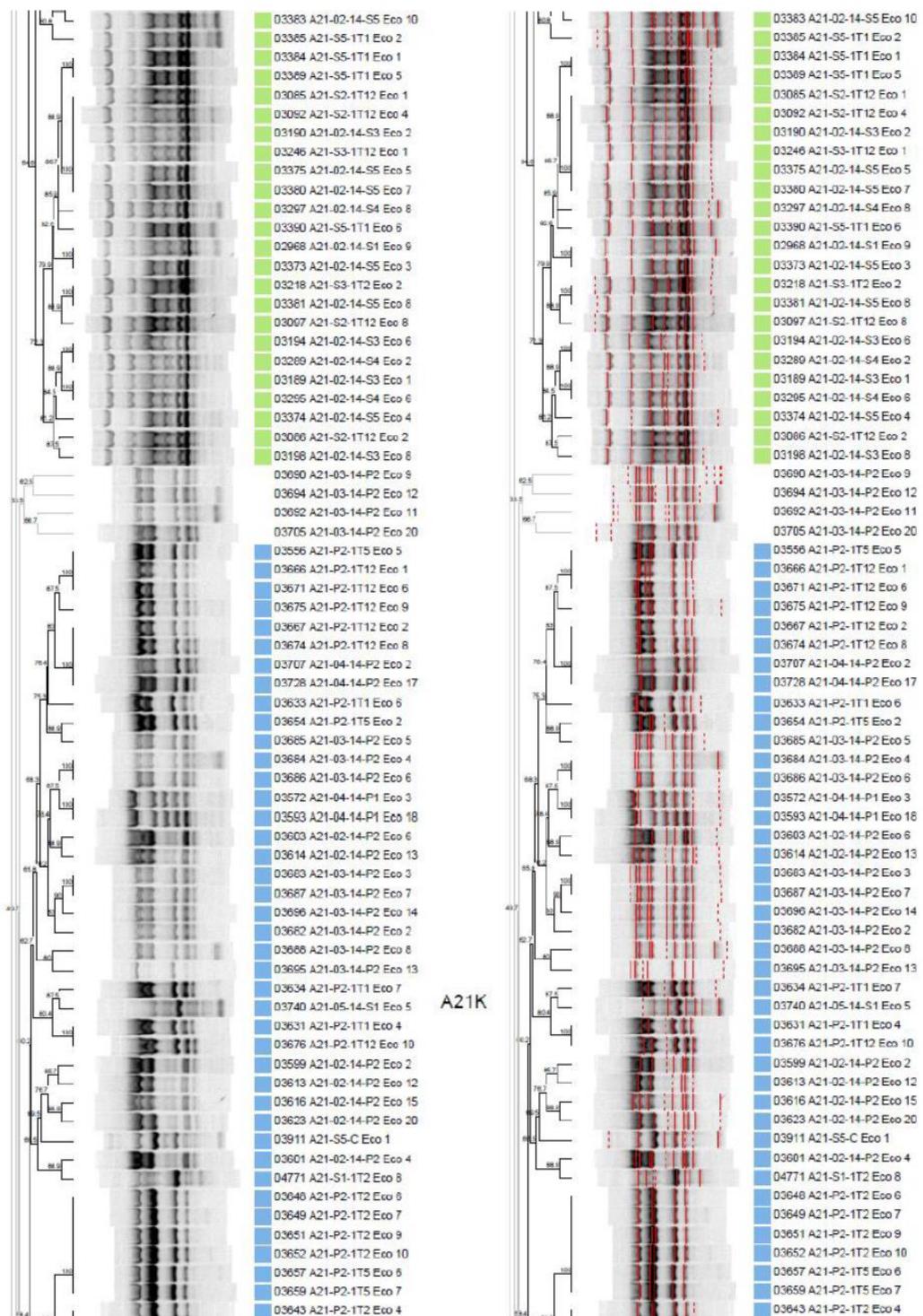


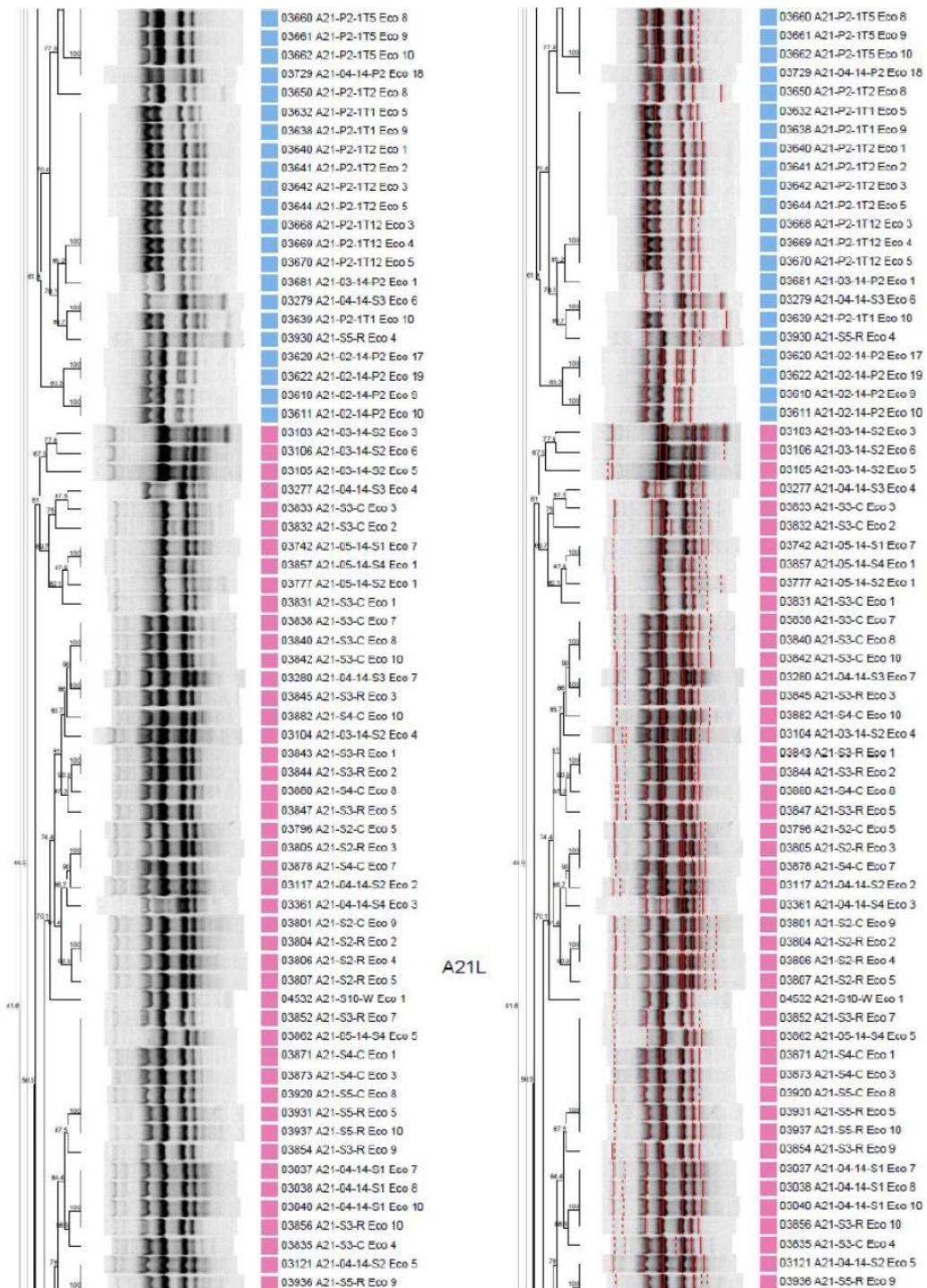


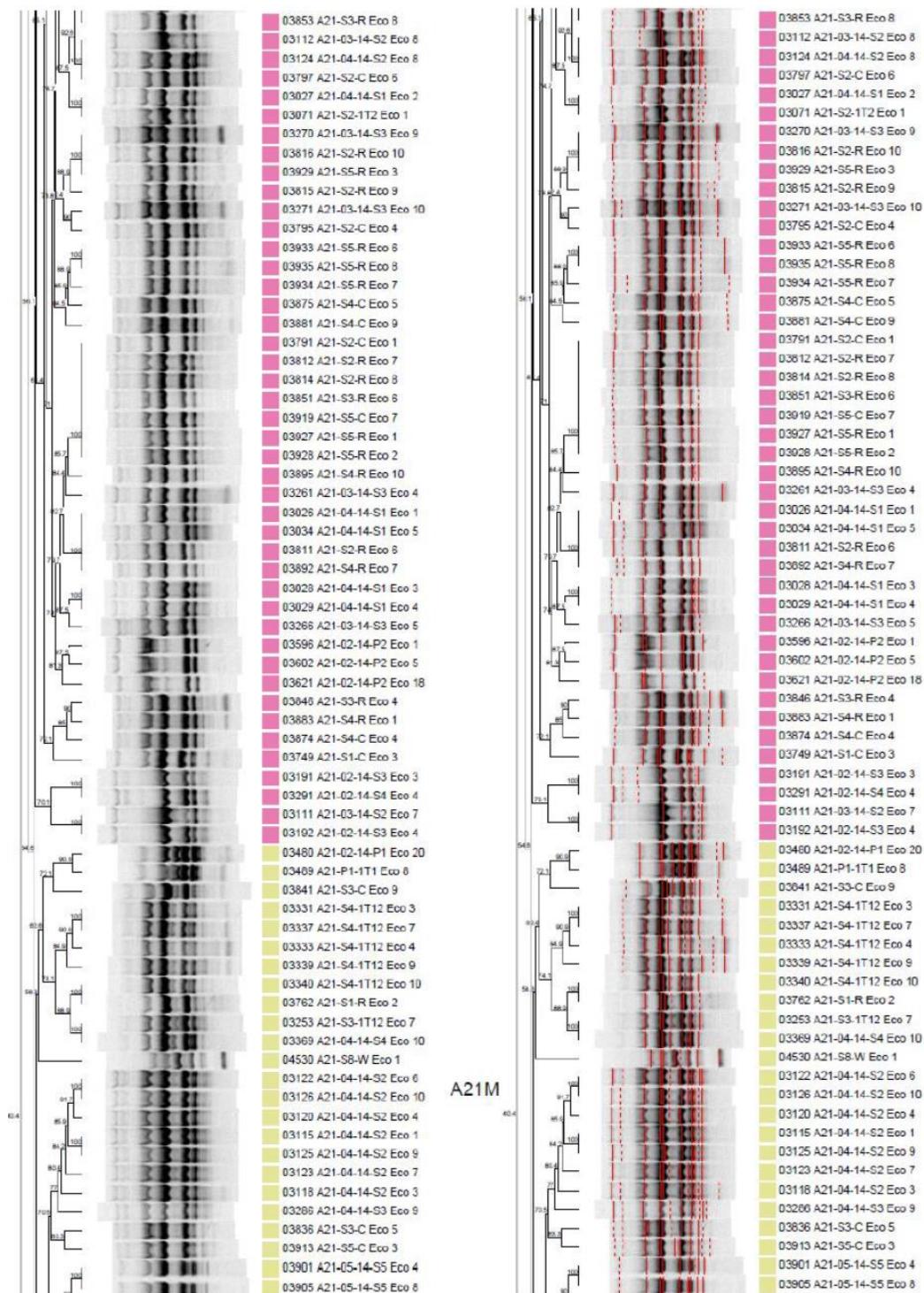


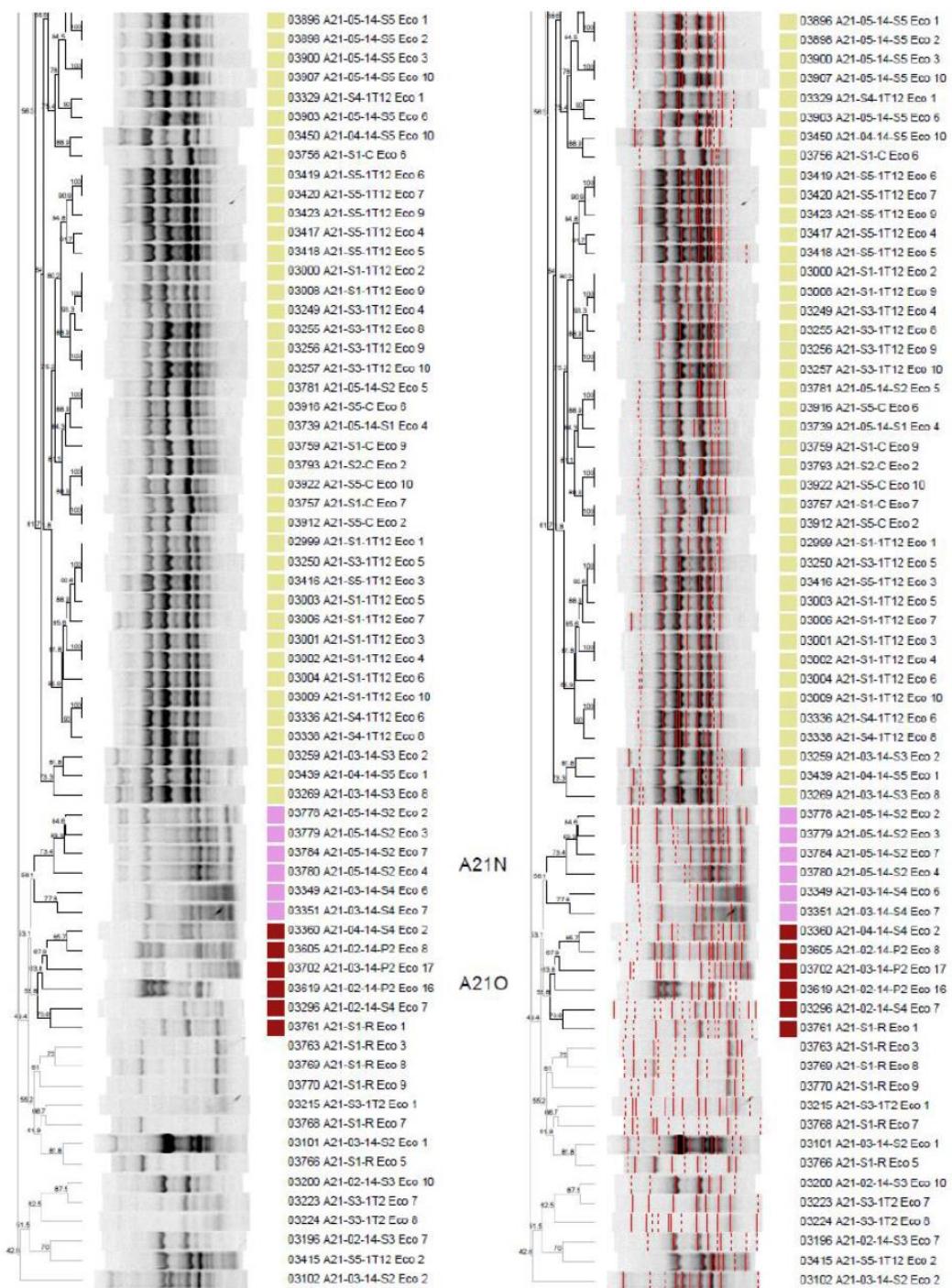




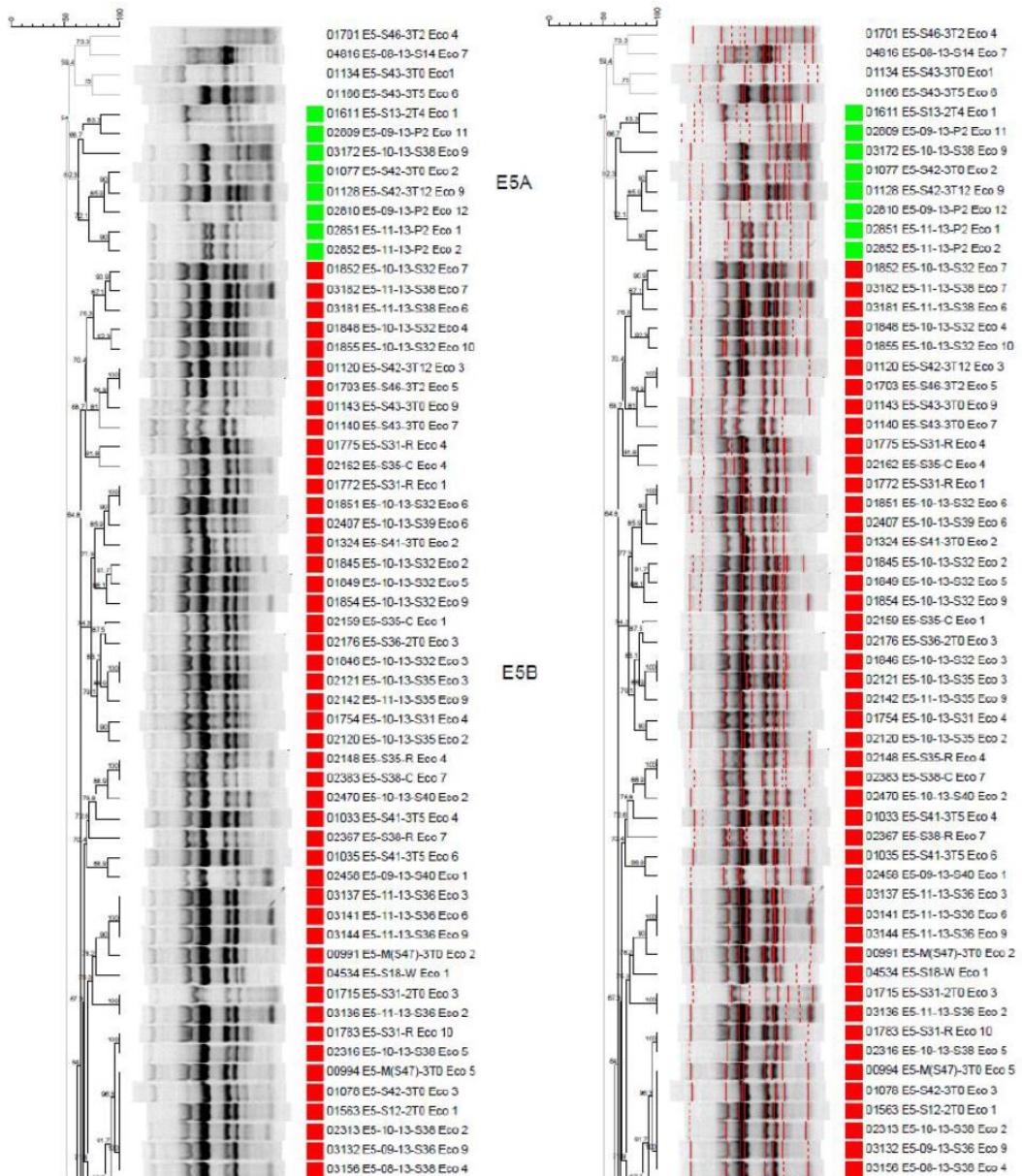


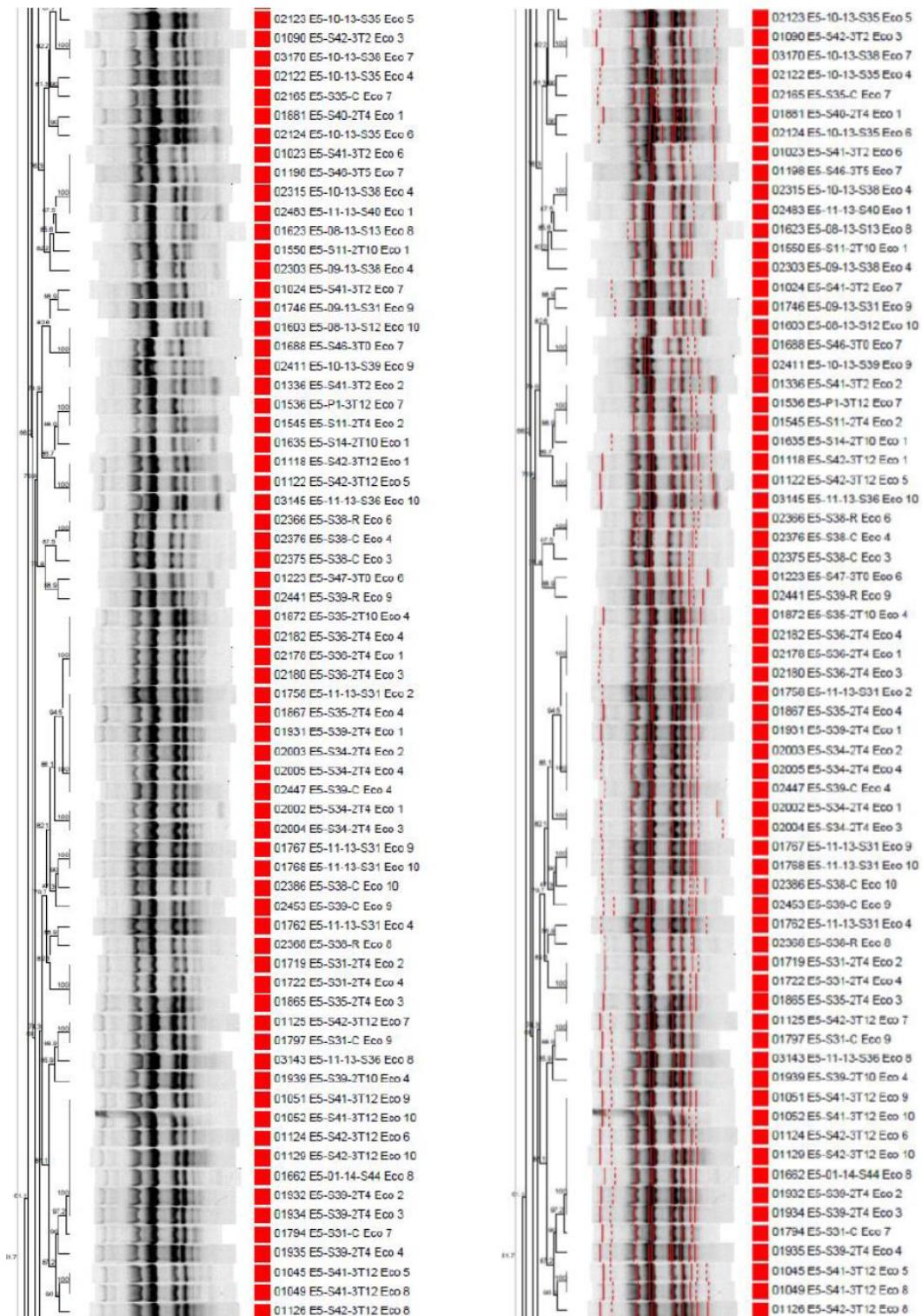


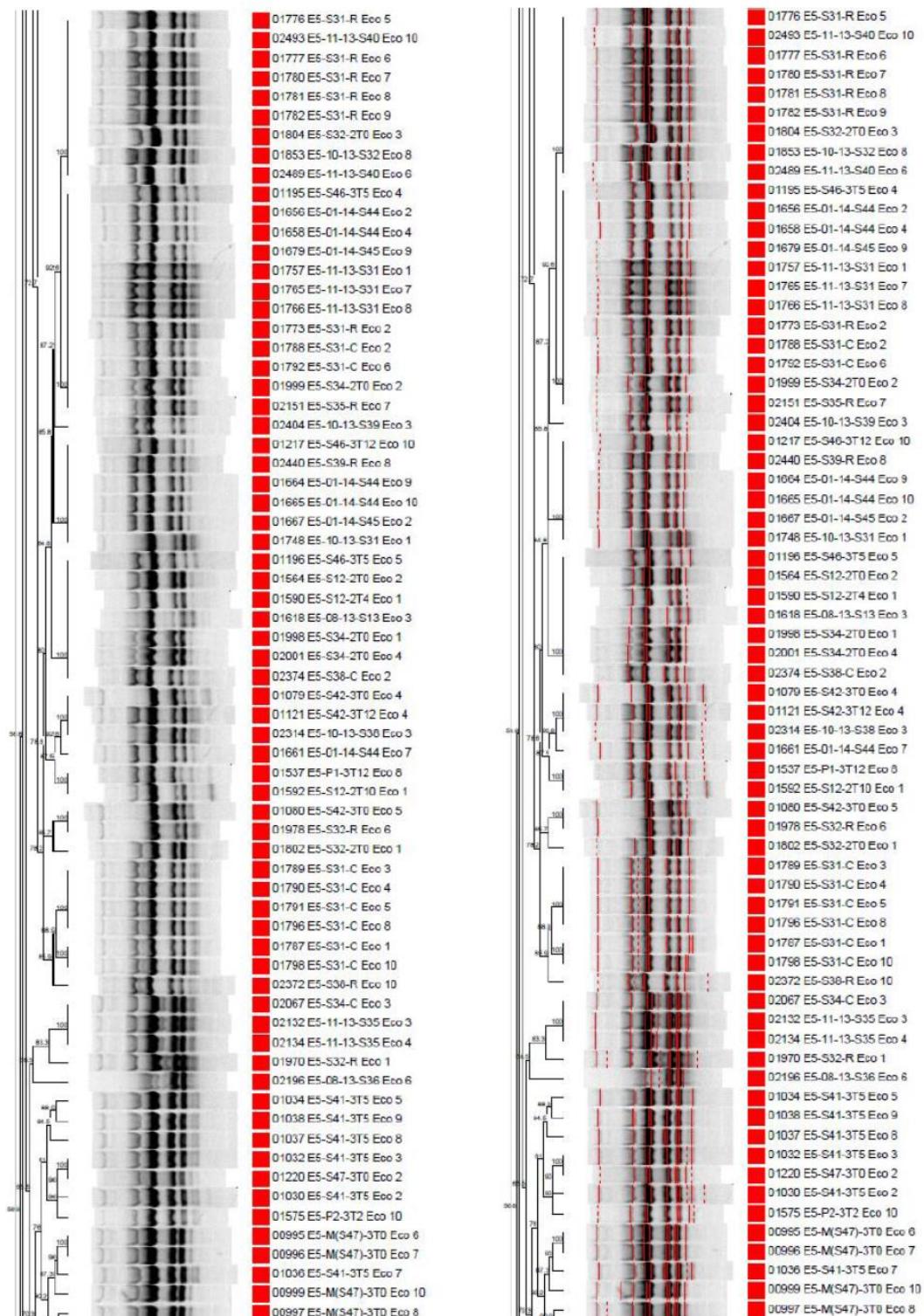


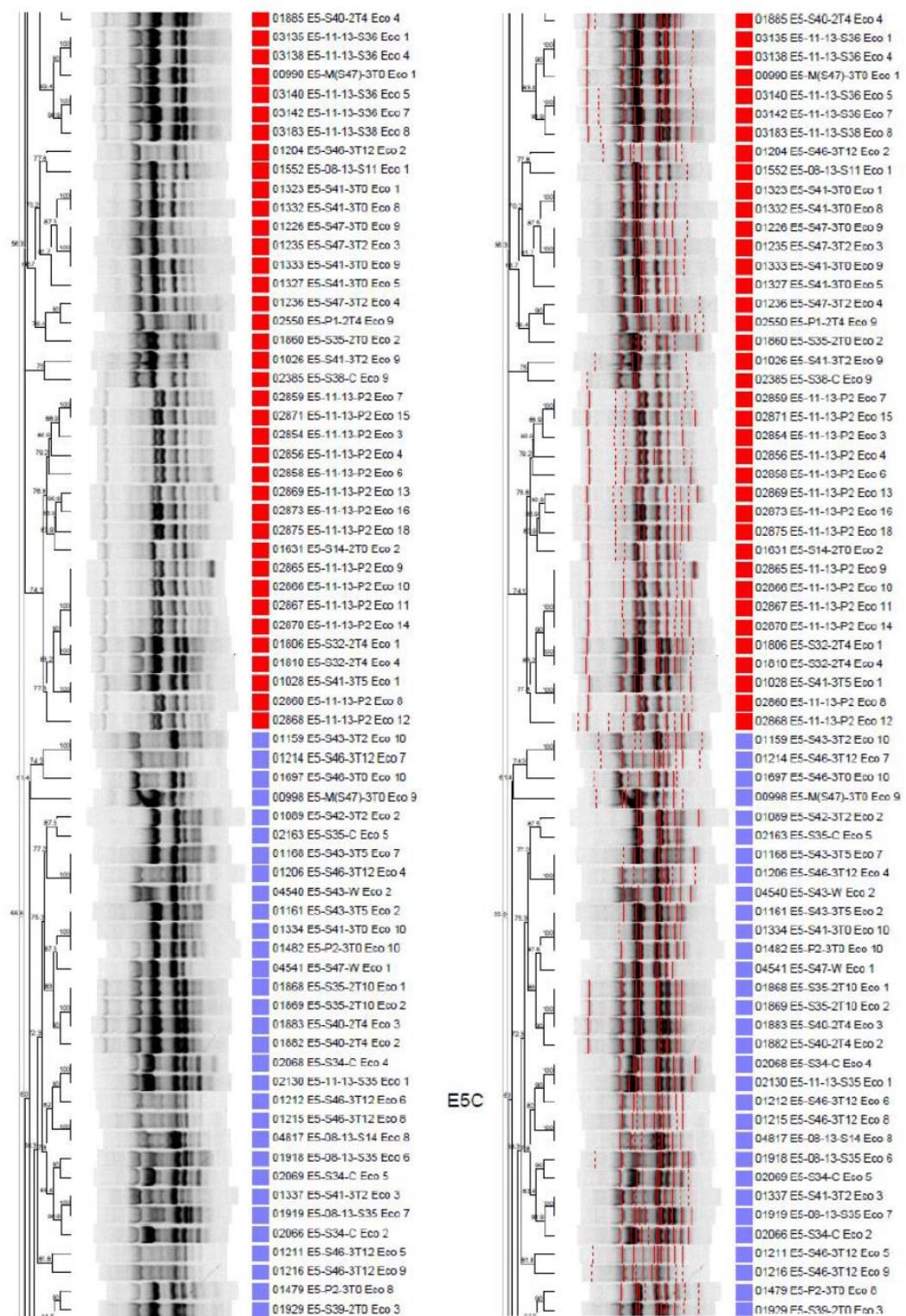


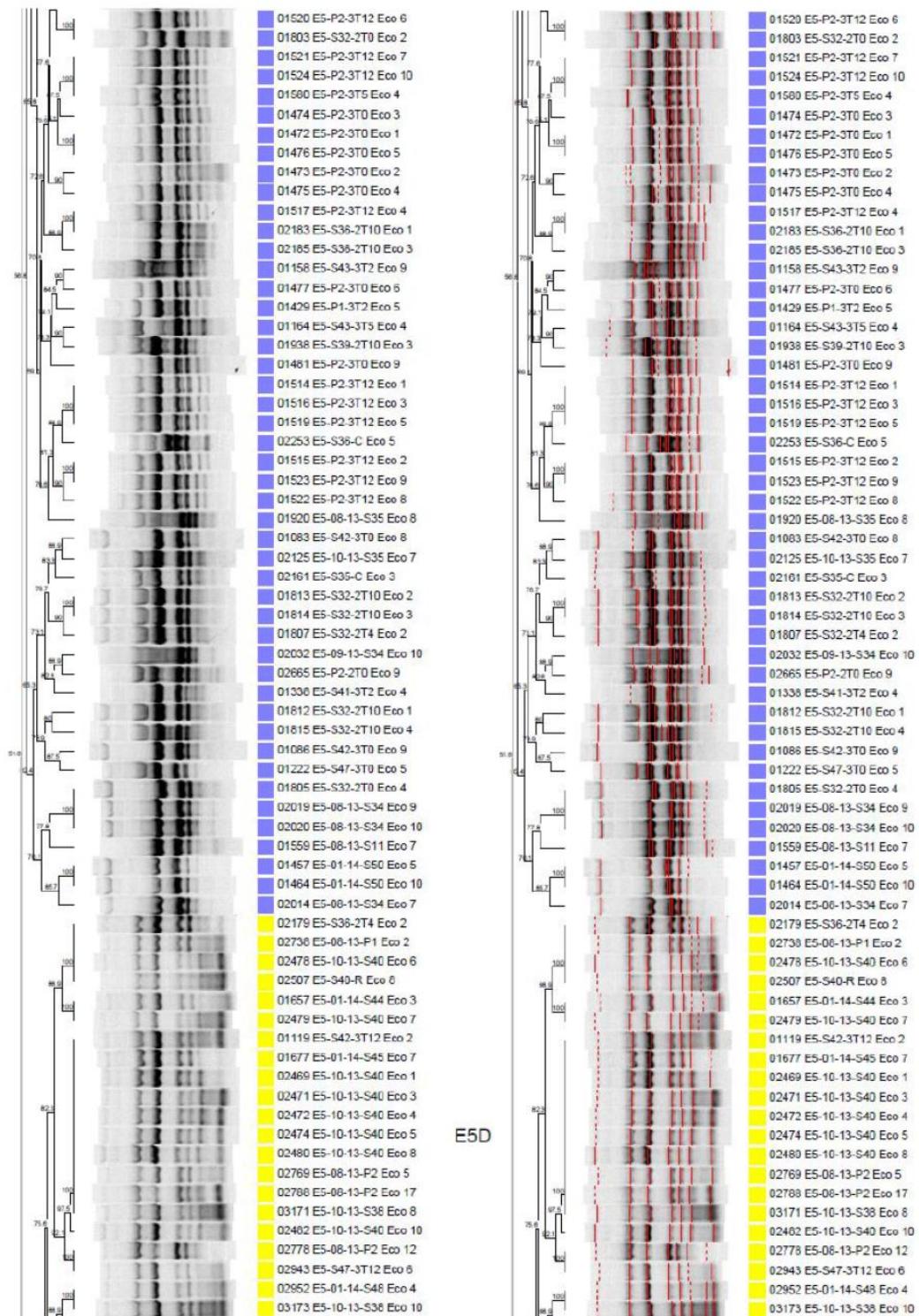
**Abbildung 113: Cluster-Analyse aller ERIC-Bandenmuster untersuchter *E. coli*-Isolate aus „Tracking“-Betrieb A21**

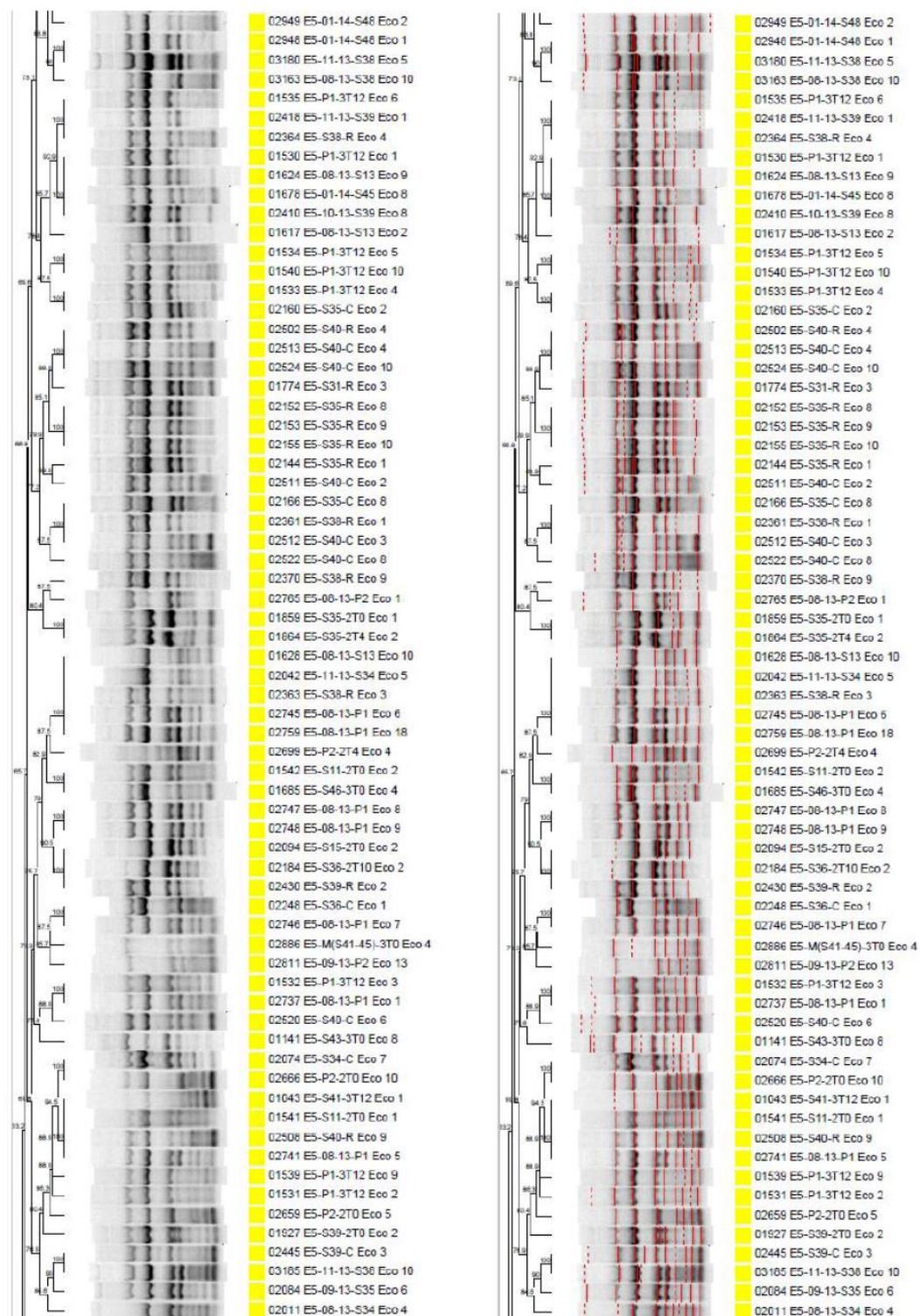


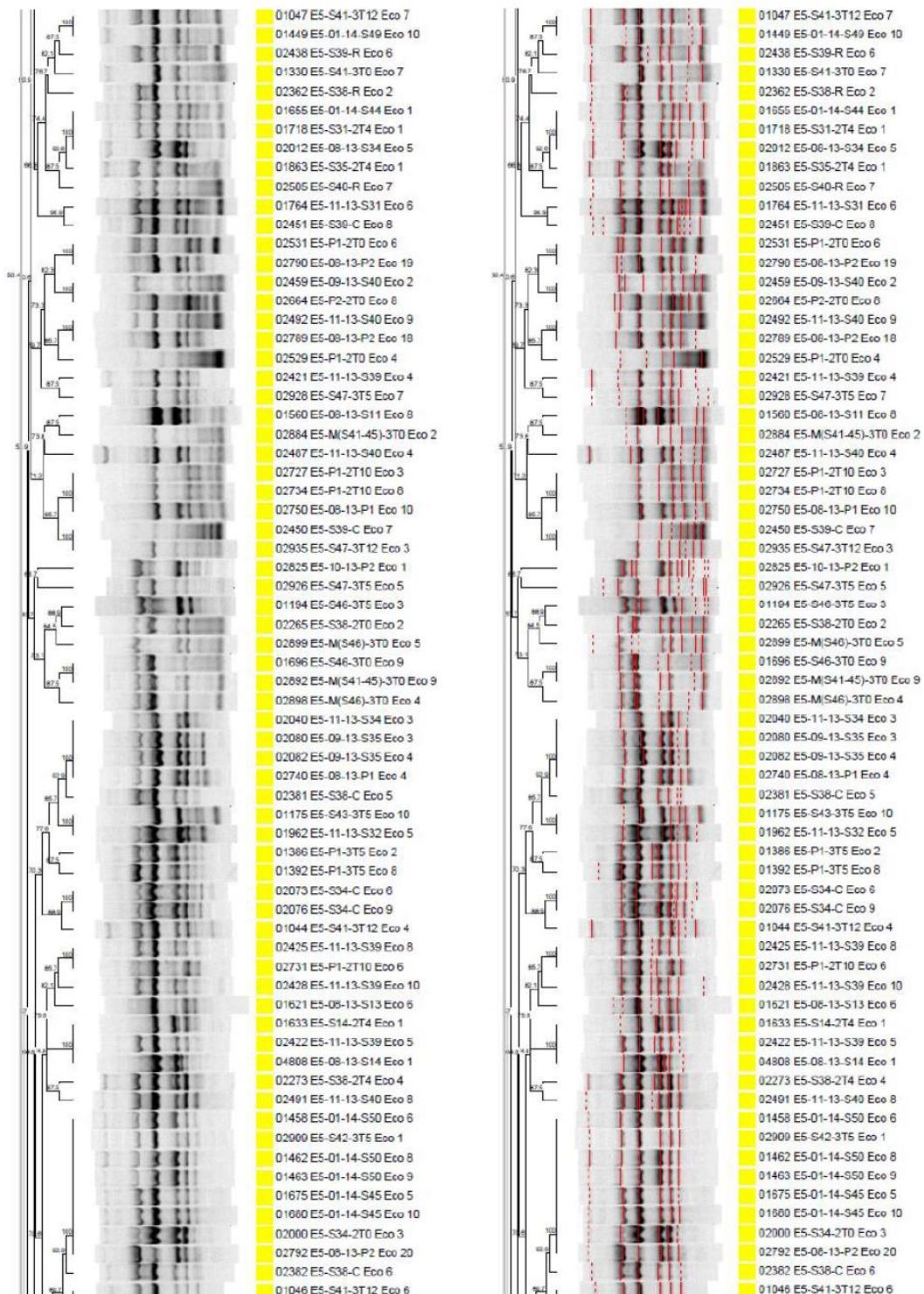


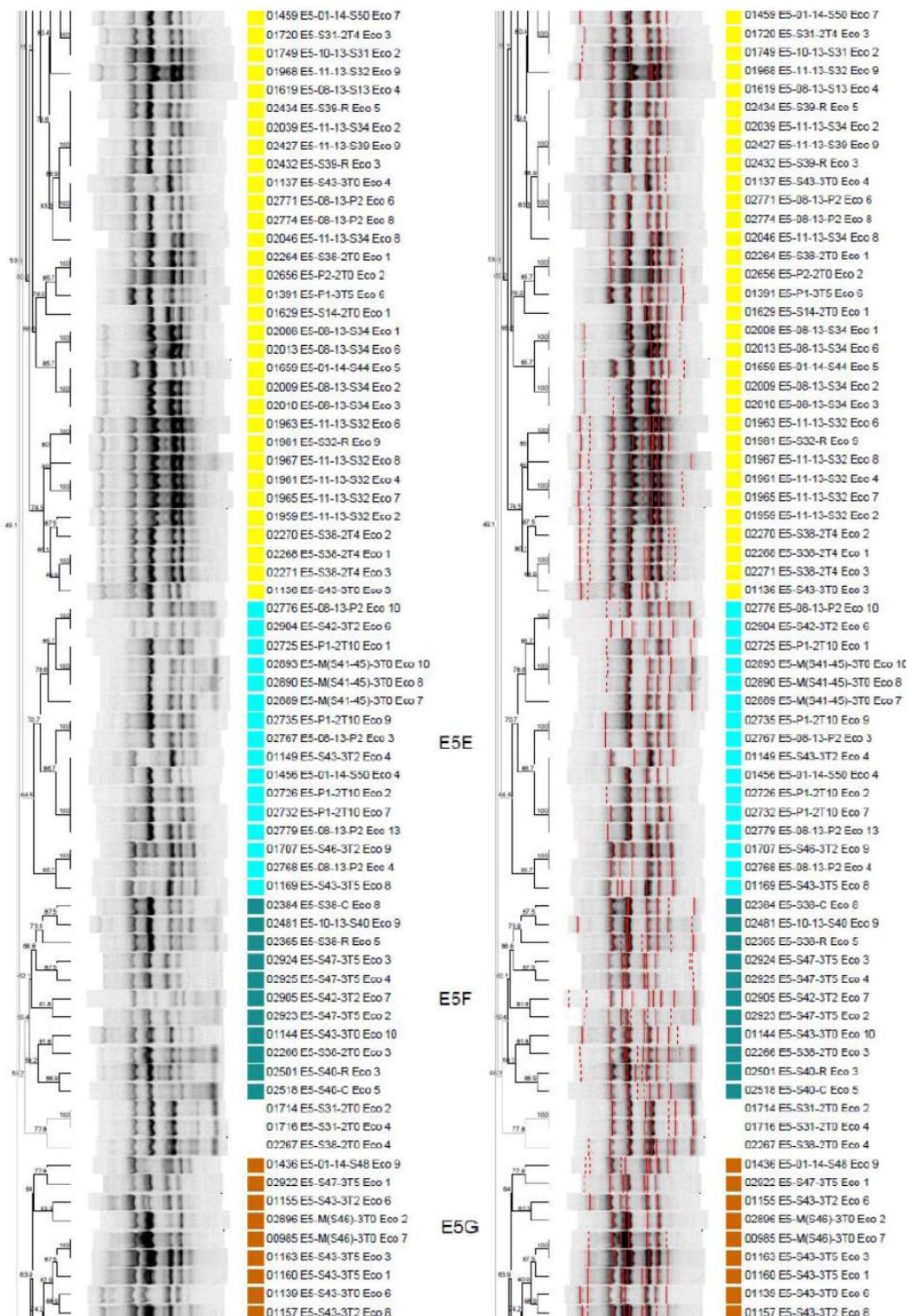


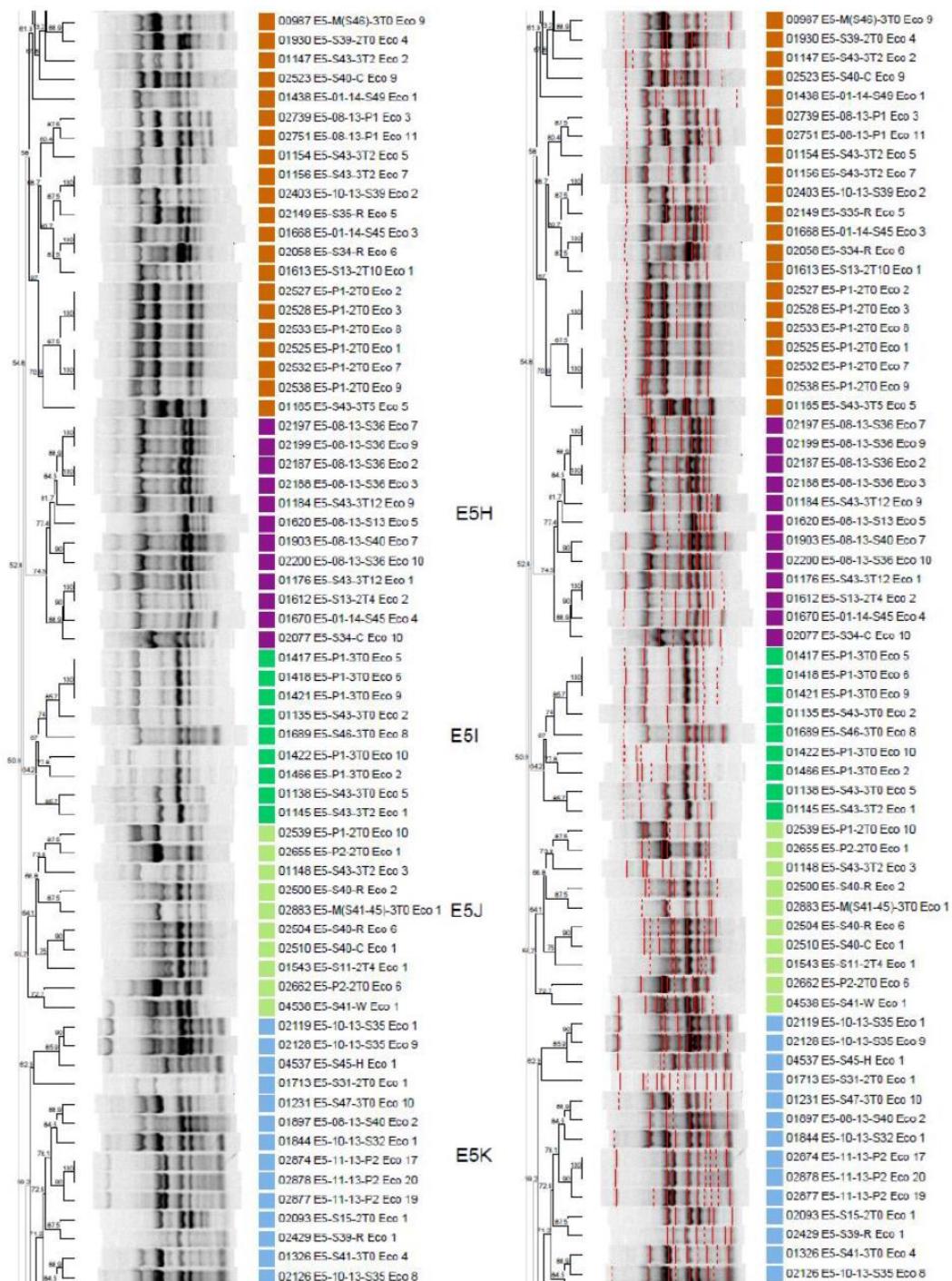


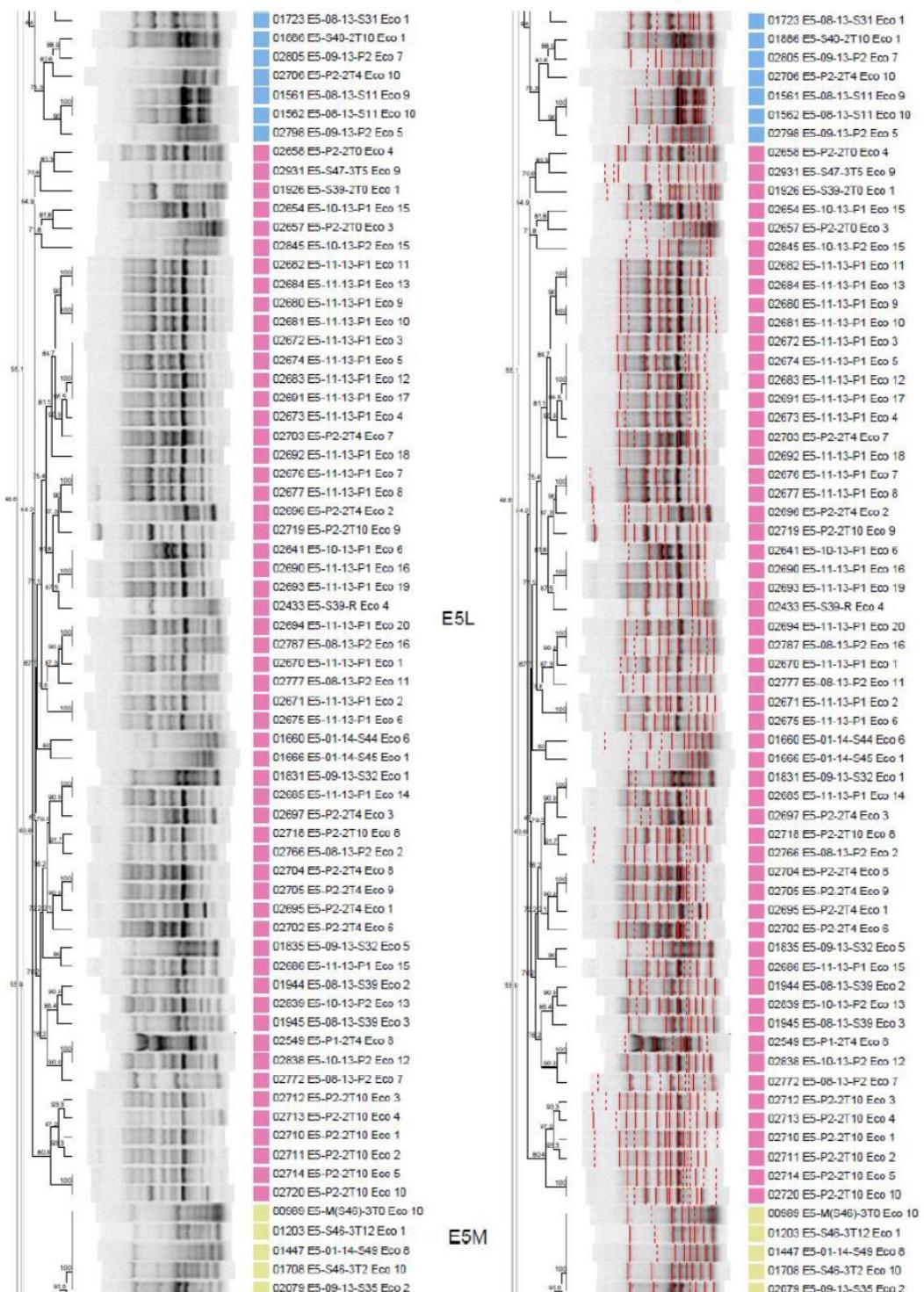


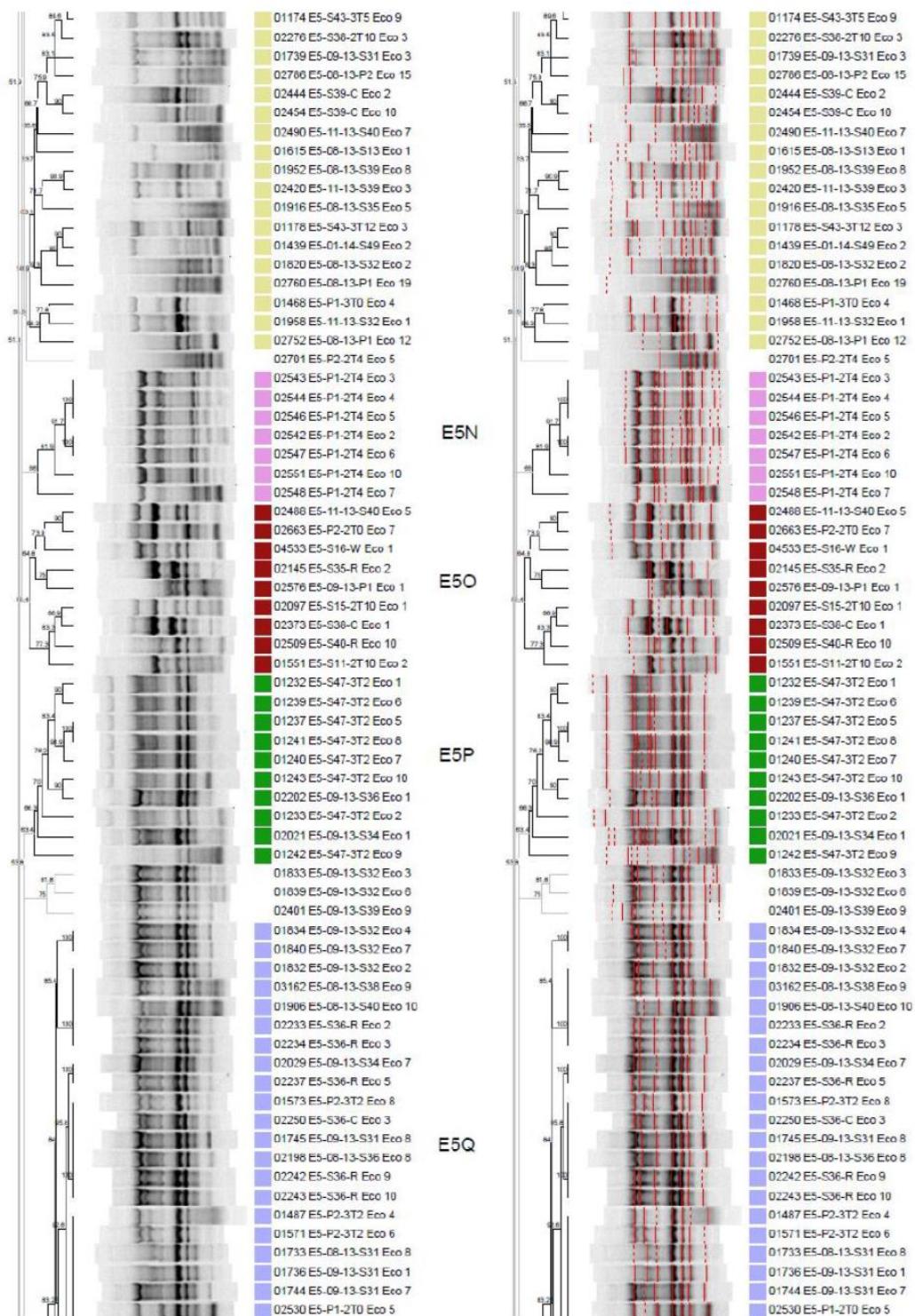


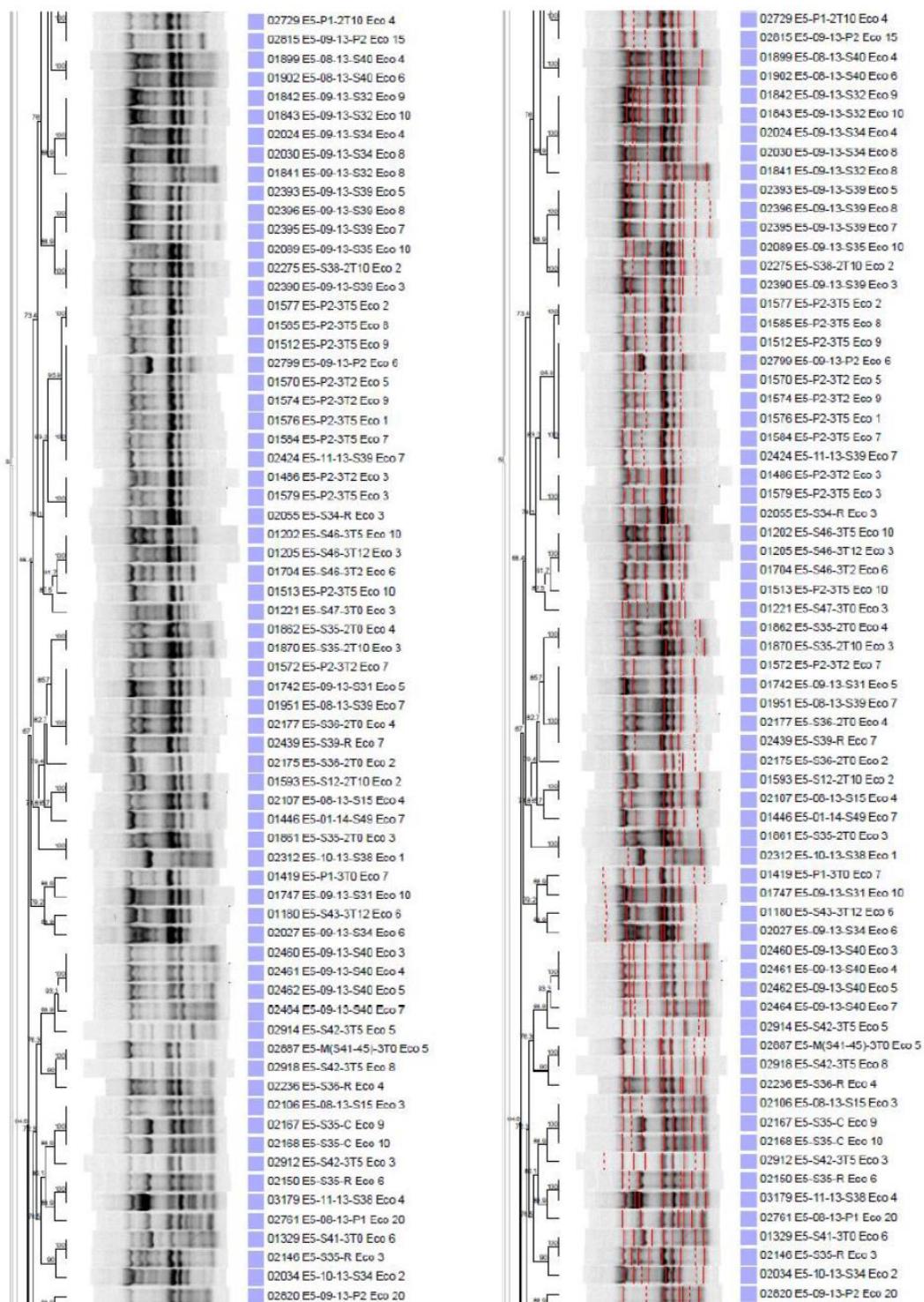


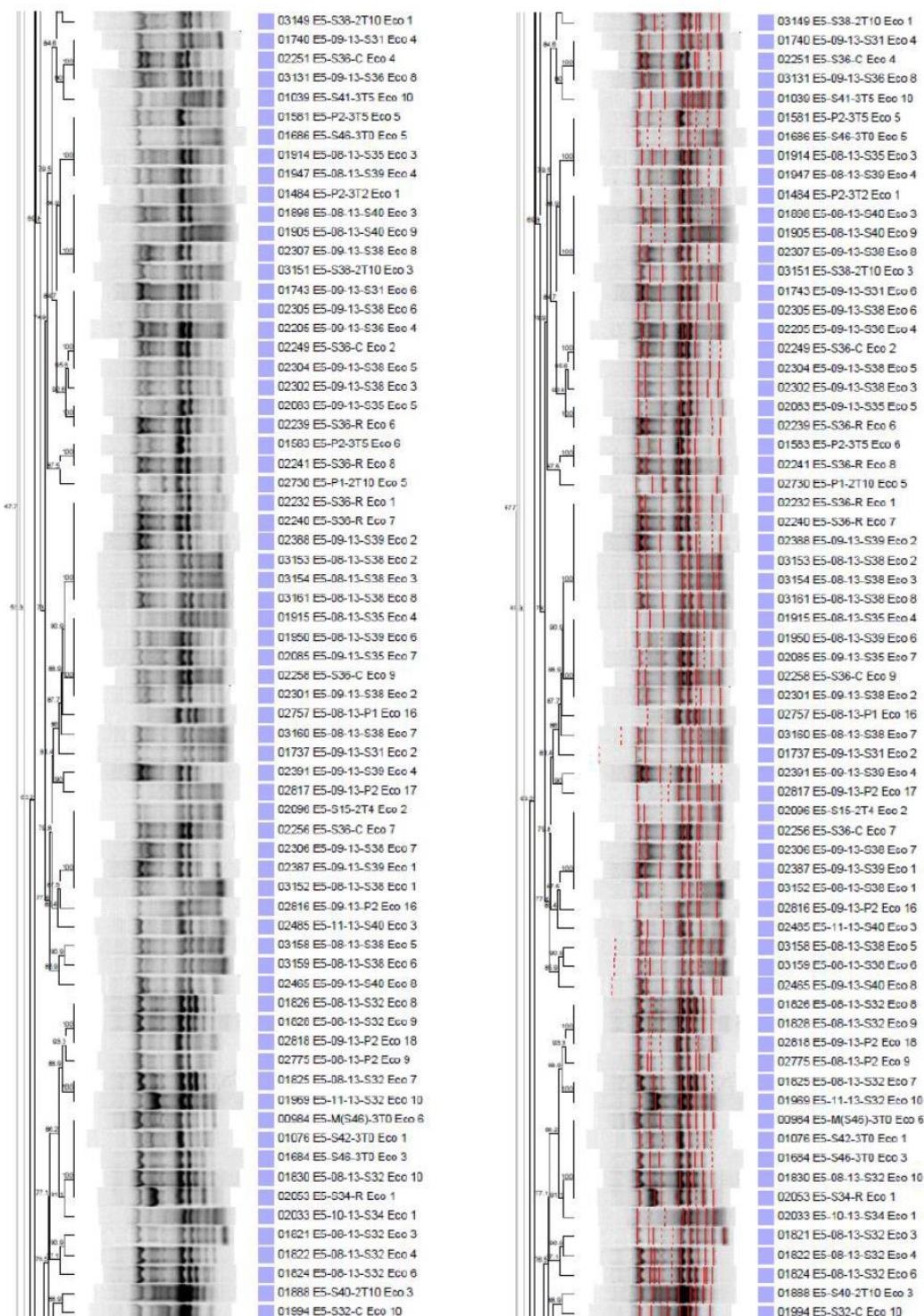


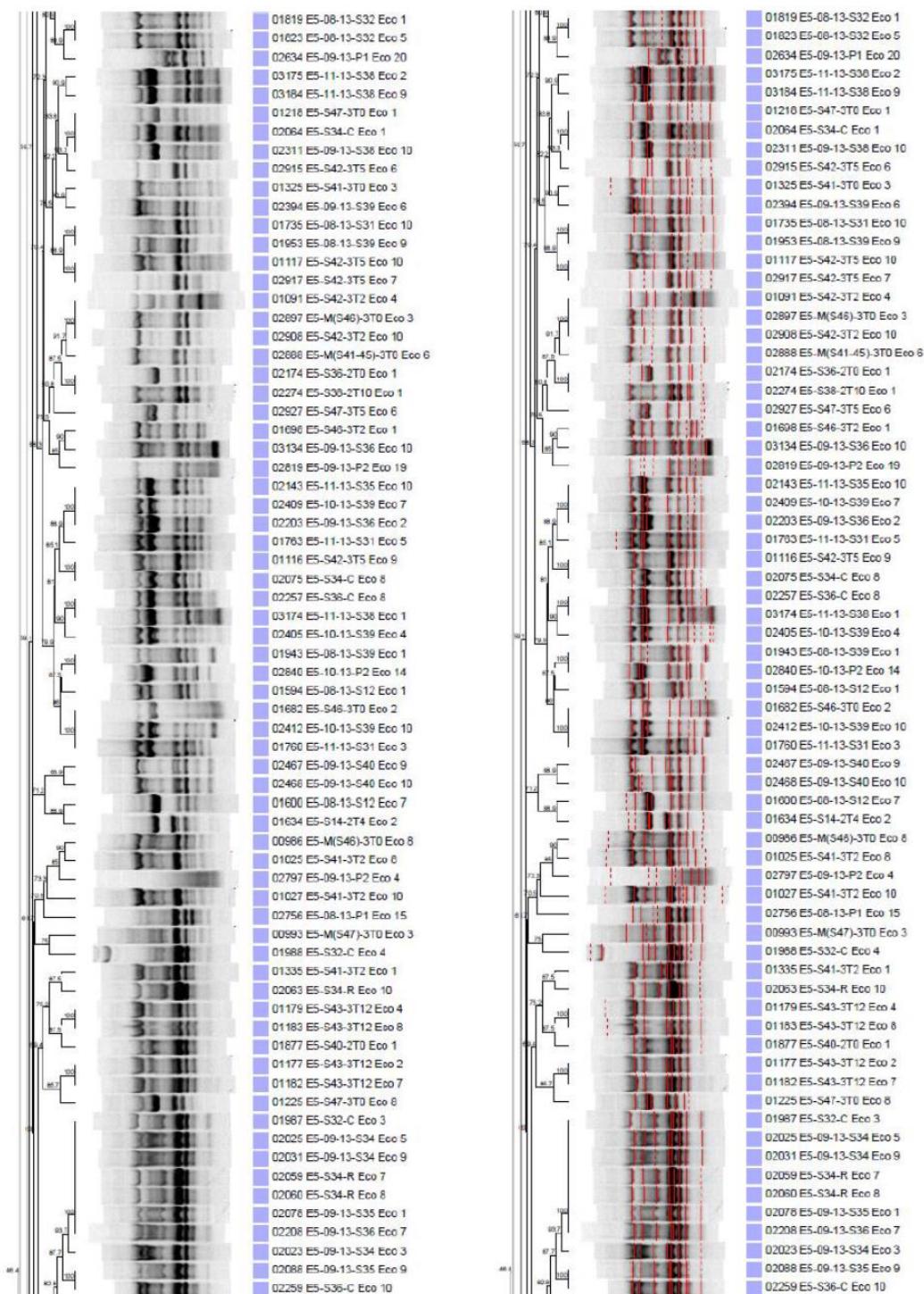


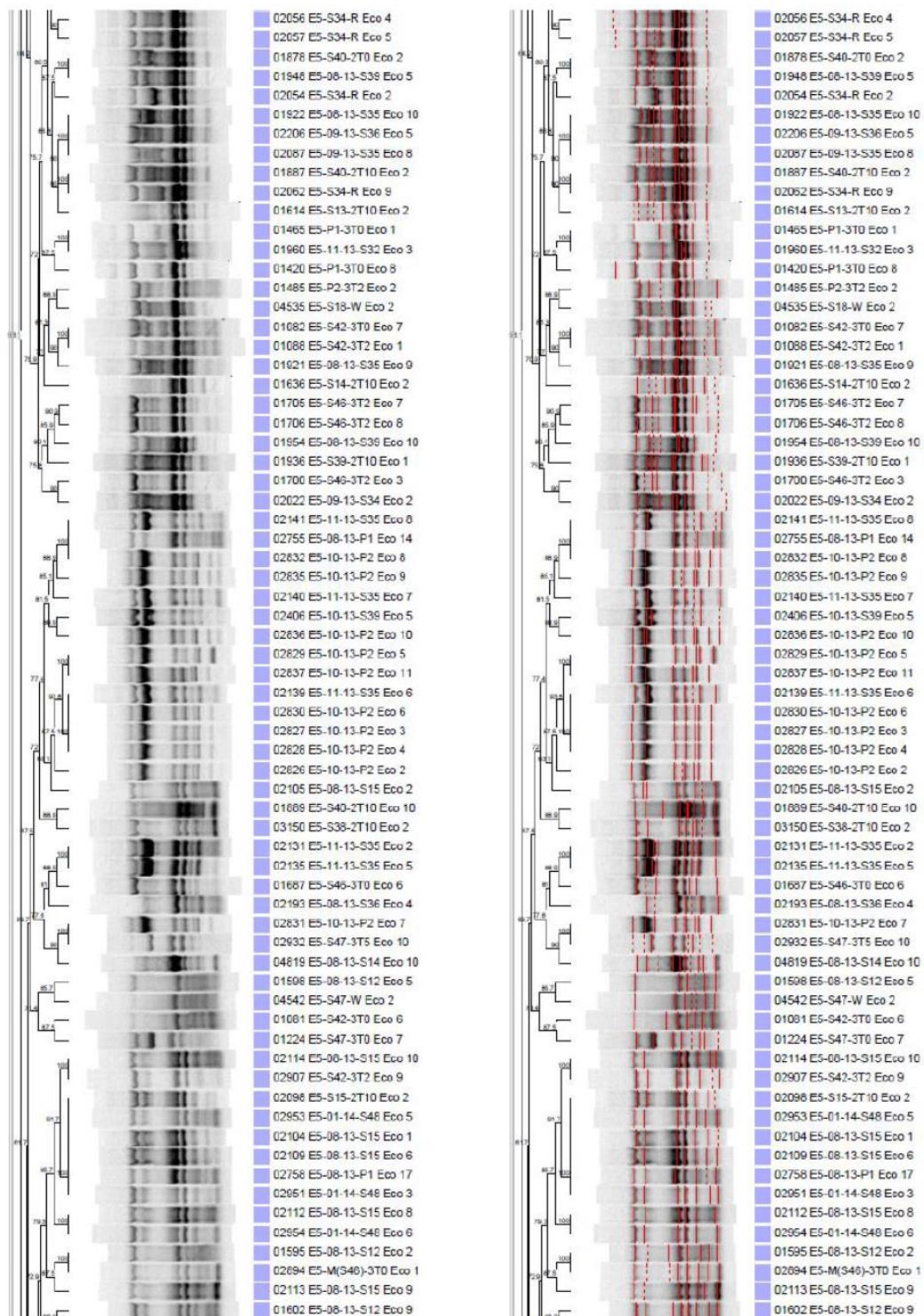


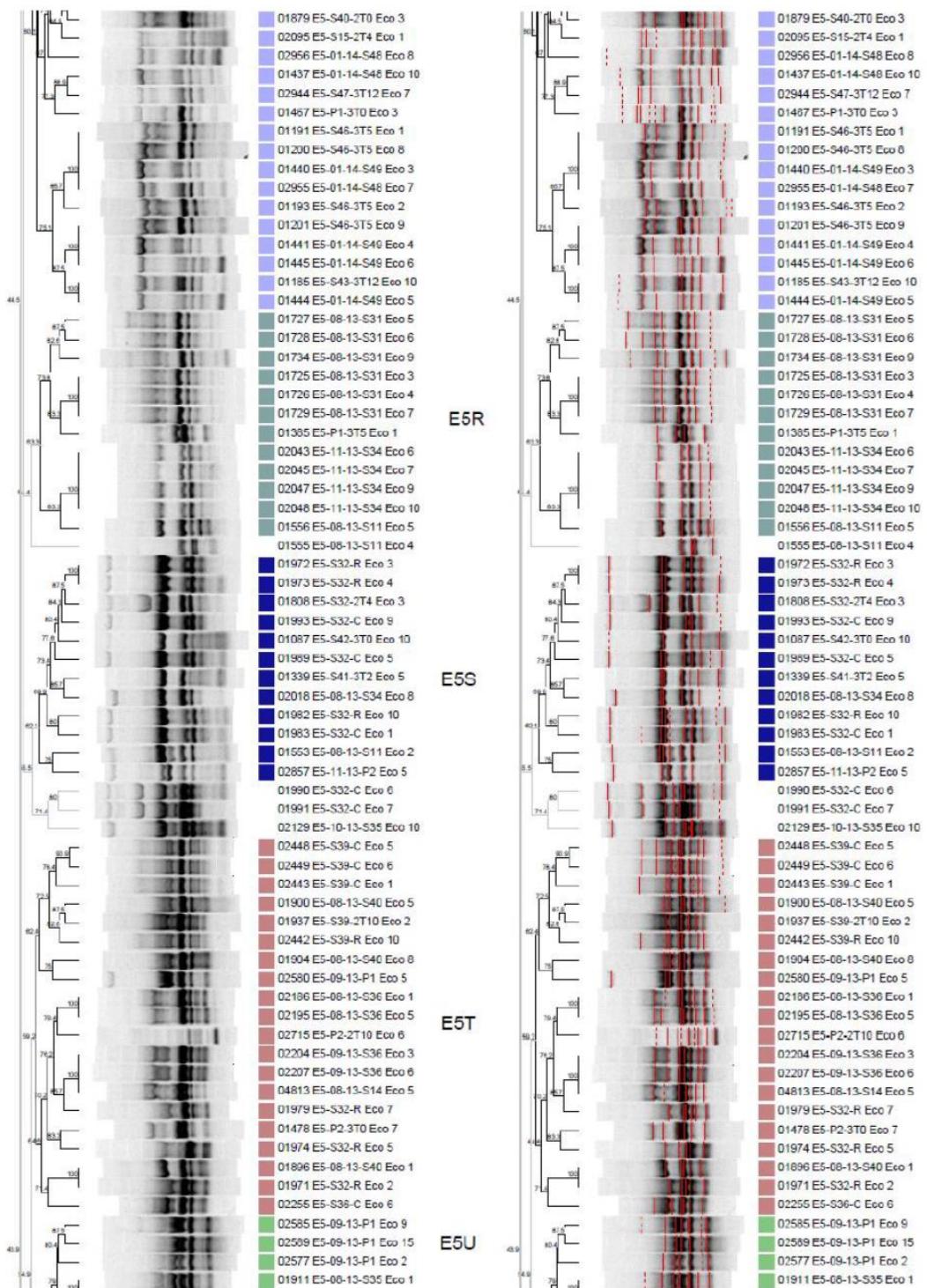


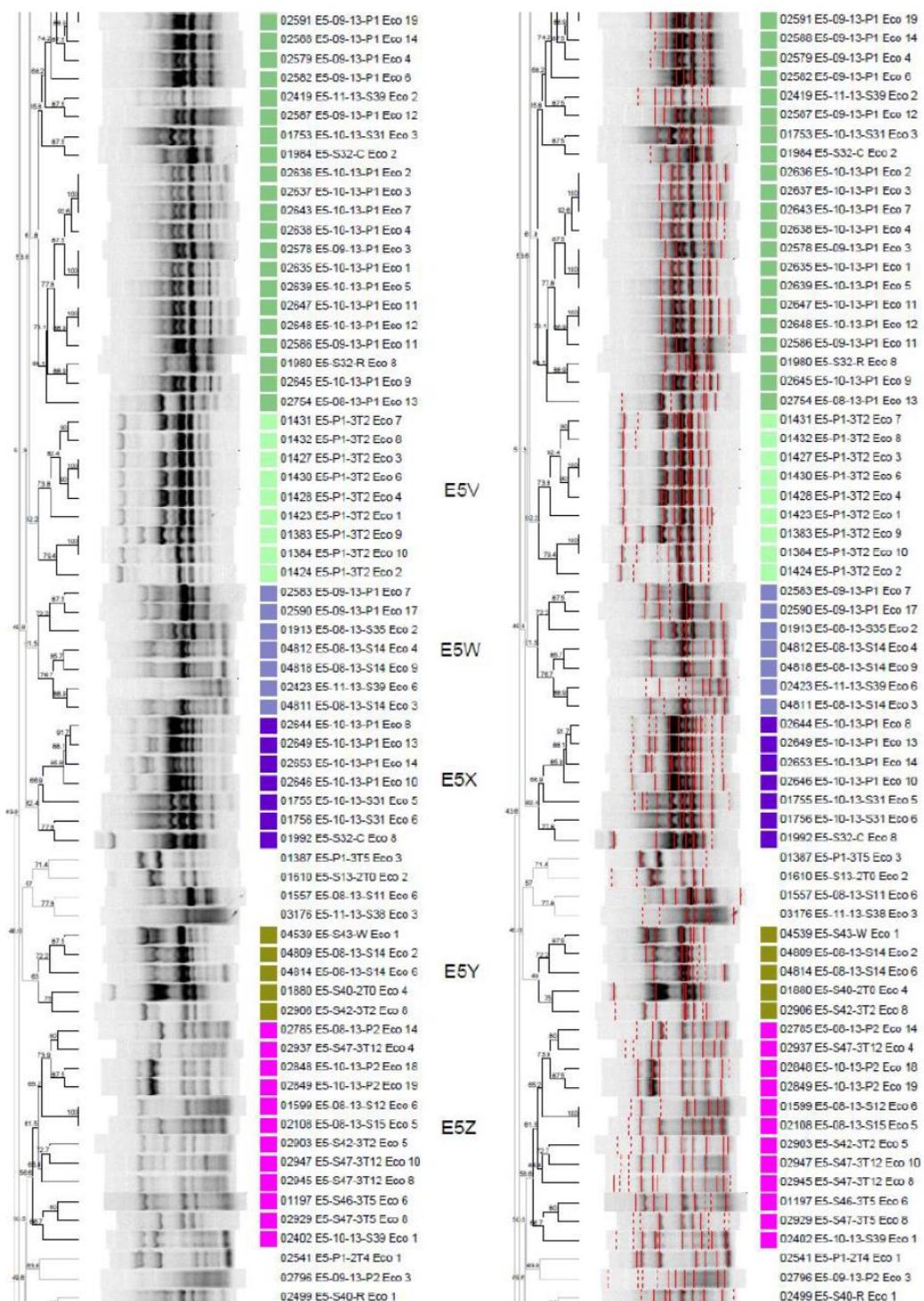


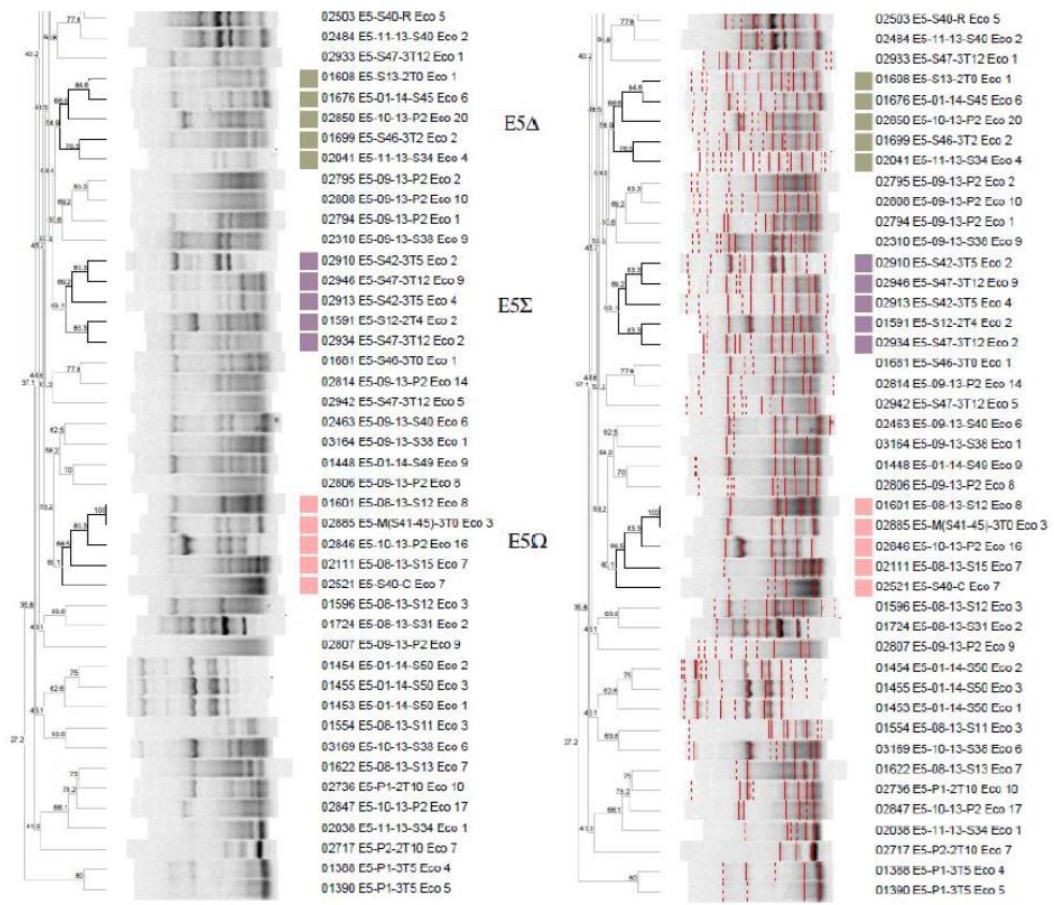




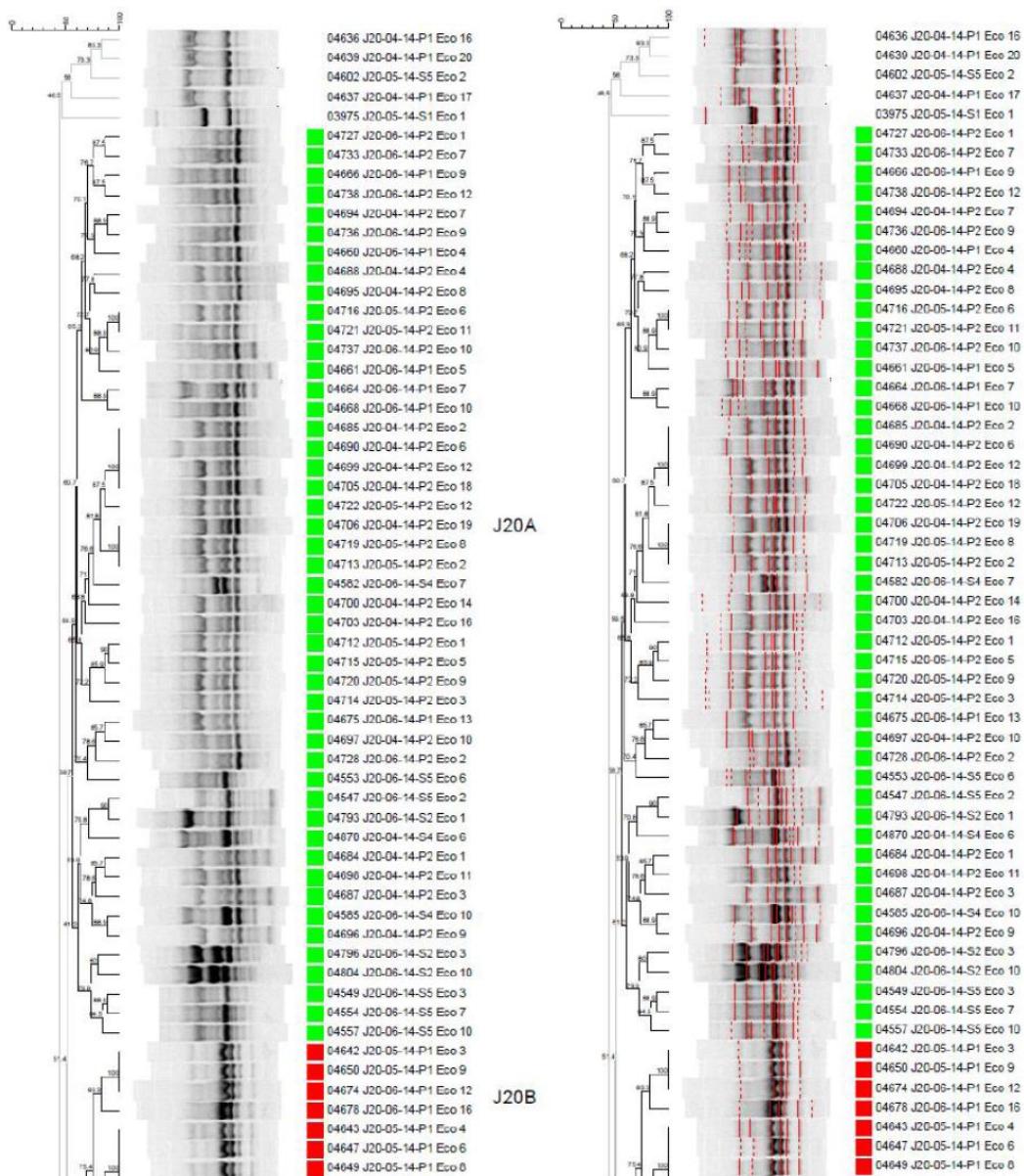


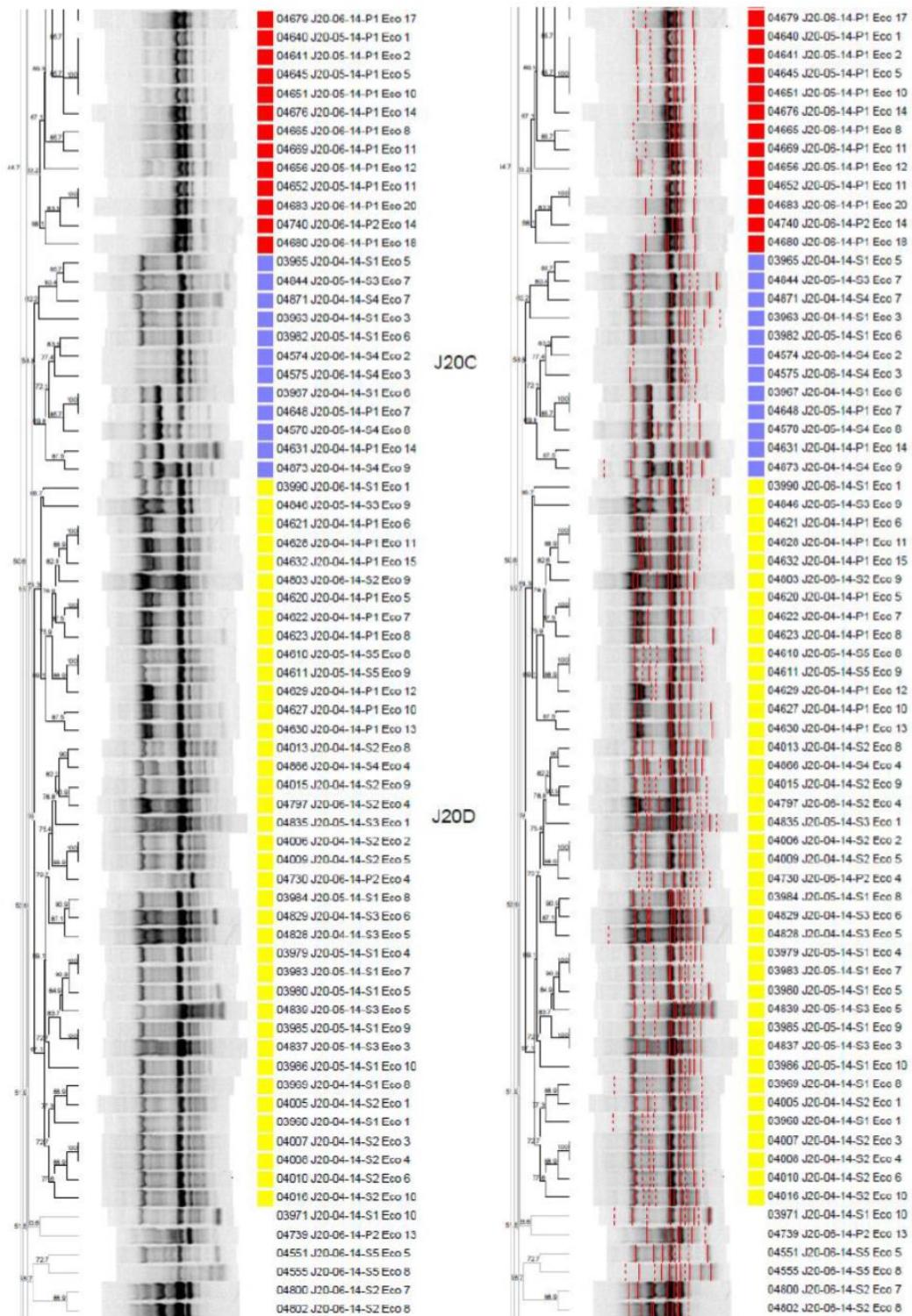


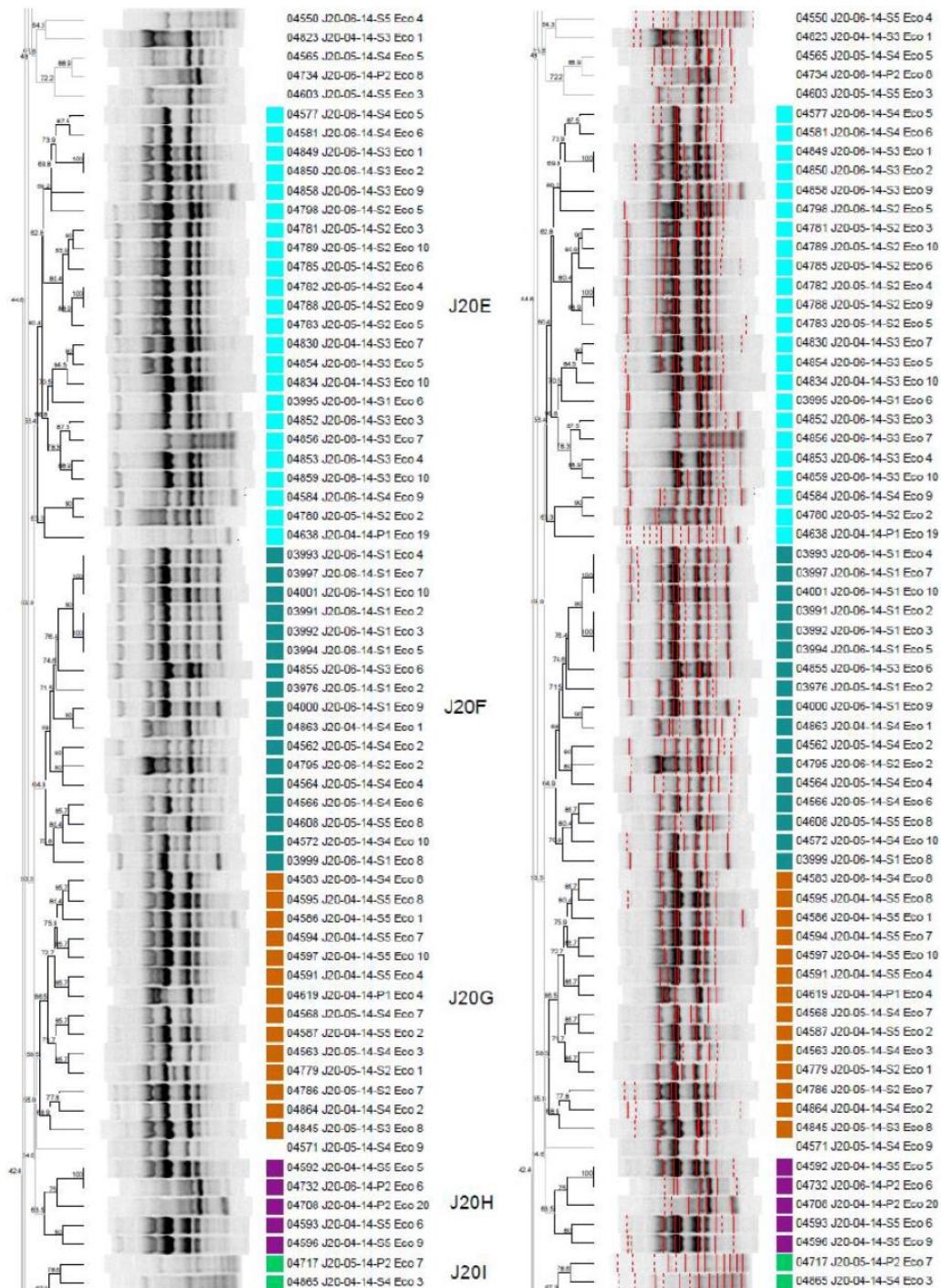




**Abbildung 114: Cluster-Analyse aller ERIC-Bandenmuster untersuchter *E. coli*-Isolate aus „Tracking“-Betrieb E5**







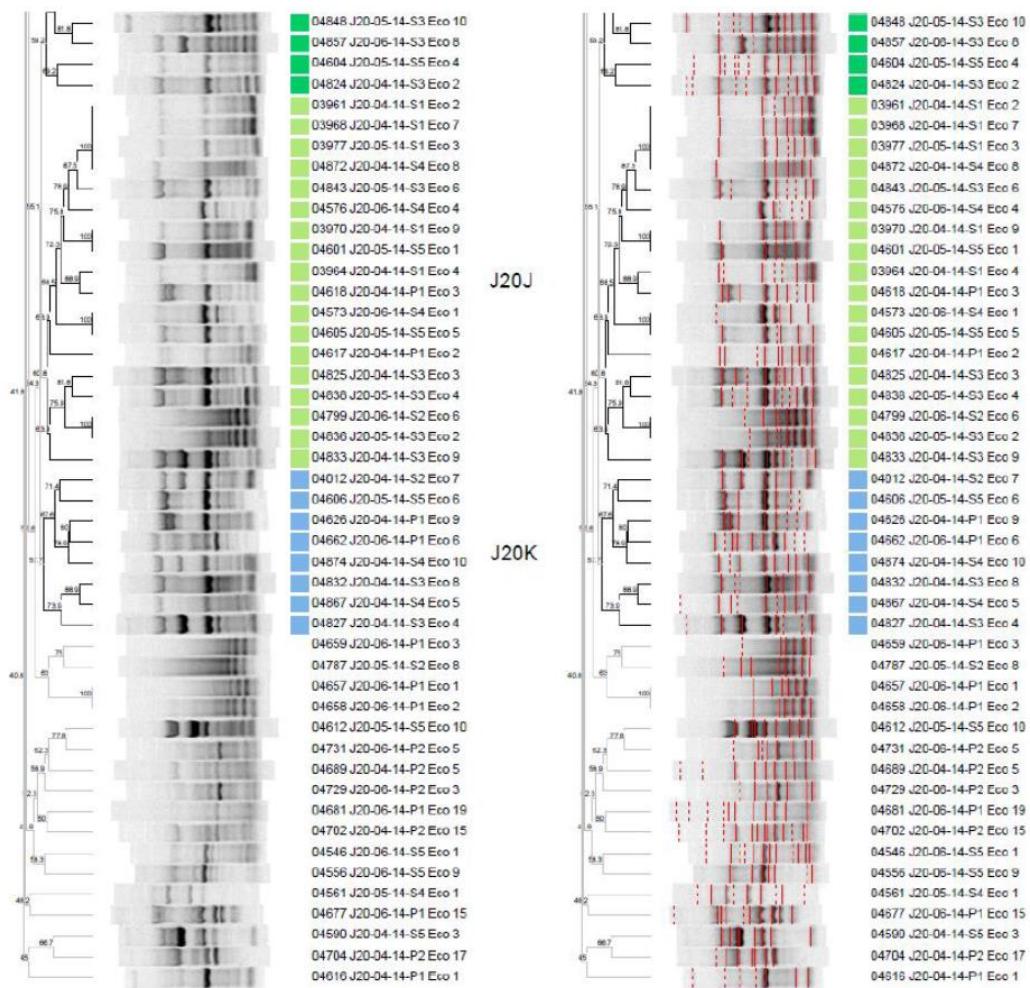


Abbildung 115: Cluster-Analyse aller ERIC-Bandenmuster untersuchter *E. coli*-Isolate aus „Tracking“-Betrieb J20

## XI ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
°C	Grad Celsius
®	Registered trade mark
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
A	Adenin
ABYS	Antibiotikaeinsatz in der bayerischen Schweinehaltungspraxis: Konsequenzen für Mensch, Tier und Umwelt (Projekttitel)
Az.	Aktenzeichen
AMG	Arzneimittelgesetz (Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln)
ANTHV	Tierhalter-Arzneimittel-Nachweisverordnung
ATP	Adenosintriphosphat
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BLAST	Basic local alignment search tool
bp	Basenpaare
BTK	Bundestierärztekammer
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
cm	Centimeter
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
d. h.	das heißt
DANMAP	Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme
dest.	destilliert
DHPS	Dihydropteroatsynthase

---

DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DSM/DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
ECOFF	European epidemiological cut-off value
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
EFSA	European Food Safety Authority
EG	Europäische Gemeinschaft
EHEC	enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
EMA	European Medicines Agency
ERIC	Enterobacterial repetitive intergenic consensus
ESBL	Extended-spectrum Beta-Laktamase
et al.	et alii (und andere)
EU	Europäische Union
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
Fa.	Firma
FW	Forward
G	Guanin
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
Gen.	Generation
GLB	Gel loading buffer
GmbH (& Co. KG)	Gesellschaft mit beschränkter Haftung (& Compagnie Kommanditgesellschaft)
GTP	Guanosintriphosphat
H <sub>2</sub> O	Dihydrogenmonoxid (Wasser)
ISO	International Organization for Standardization
Kb	Kilobase
KbE	Koloniebildende Einheiten
kDA	Kilodalton

---

kg	Kilogramm
l	Liter
LfL	(Bayerische) Landesanstalt für Landwirtschaft
LGL	(Bayerisches) Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität München
LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantification
lg	dekadischer Logarithmus
M	Molar
mA	Milliampere
MALDI-TOF MS	Matrix-assisted Laser Desorption / Ionisation-Time-of-Flight Mass Spectrometry
Mg <sup>2+</sup>	divalentes Magnesium
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MHK	minimale Hemmkonzentration
min	Minute
ml	Milliliter
MLST	Multilocus sequence typing
mM	Millimolar
mRNA	Messenger ribonucleic acid
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Nr.	Nummer
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OIE	World Organisation for Animal Health
P	Person
p	Probability (Wahrscheinlichkeit)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Hydroxonium-Ionenkonzentration
PABA	para-Aminobenzoësäure
PCR	Polymerase chain reaction

---

QAC	Quaternary ammonium compound
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction (= Real-time PCR)
RNA	Ribonucleic acid
rpm	Revolutions per minute
rDNA	Ribosomal desoxyribonucleic acid
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid
RV	Reverse
S	Schwein
s.	siehe
sek	Sekunde
sog.	sogenannt
spp.	Species (Plural)
ST	Sequence type
StMUV	(Bayerisches) Staatsministerium für Umwelt und Verbraucherschutz
StMELF	(Bayerisches) Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten
T	Thymin
t	Tonne
TM	Unregistered trade mark
Tn	Transposon
TUM	Technische Universität München
tRNA	Transfer ribonucleic acid
U	Unit
usw.	und so weiter
UV	ultraviolett
vgl.	vergleiche
VetCAb	Veterinary Consumption of Antibiotics
VO	Verordnung
vs.	versus
WFR	Wiederfindungsrate
WHO	World Health Organisation
z. B.	zum Beispiel

## **XII      ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abbildung 1: Entdeckungszeitpunkte verschiedener Antibiotikaklassen, modifiziert nach Lewis (2012) .....	4
Abbildung 2: Prozentuale Übersicht der im Jahr 2014 an Tierärzte abgegebenen Menge an antimikrobiellen Wirkstoffen .....	7
Abbildung 3: Resistenzmechanismen Gram-negativer Bakterien (modifiziert nach Allen et al. 2010) .....	9
Abbildung 4: Aufbau Klasse-1-Integron sowie schematische Darstellung der Aufnahme einer Gen-Kassette (modifiziert nach Carattoli 2001) .....	17
Abbildung 5: Regulation der Genexpression des Tetrazyklin-Effluxproteins <i>tet(A)</i> (nach Hillen und Berens 2002).....	20
Abbildung 6: Chemische Strukturformeln von PABA (Metabolit) und Sulfonamid (Antimetabolit).....	22
Abbildung 7: Entwicklung der Anzahl an Schweinehaltungsbetrieben in Deutschland, verglichen mit der Anzahl gehaltener Mastschweine und Sauen (1997 - 2009), modifiziert nach Anonymous (2013).....	33
Abbildung 8: Potenzielle Übertragungswege von bakteriellen Resistzenzen (modifiziert nach <a href="http://www.fve.org/news/publications/pdf/antibioen.pdf">http://www.fve.org/news/publications/pdf/antibioen.pdf</a> , letzter Zugriff am 30.09.2015).....	36
Abbildung 9: Systematische Einordnung von <i>Escherichia coli</i> .....	37
Abbildung 10: Schema Proben- / Datenfluss am Beispiel des fiktiven Betriebs „Meyer“ .....	50
Abbildung 11: Beprobungsschema „Tracking“-Betrieb .....	53
Abbildung 12: Ablauf DNA-Extraktion mittels Chelex® 100-Methode.....	63
Abbildung 13: 127 bp lange ERIC-Sequenz, dargestellt als Haarnadelstruktur (Wilson et al. 2006).....	66
Abbildung 14: Ablauf der DNA-Aufreinigung mittels GenElute™ PCR Clean Up Kit.....	70
Abbildung 15: Arbeitsablauf PowerSoil®-DNA Isolation Kit.....	77
Abbildung 16: Ablauf Gel-Extraktion mittels QIAquick Gel Extraction Kit .....	81
Abbildung 17: Gelelektrophoretische Trennung der ERIC-PCR-Produkte der Positivkontrolle „A6-S20-1T18 Eco5“ .....	85

---

Abbildung 18: Exemplarischer Direktvergleich der gelelektrophoretischen Auftrennung aus unterschiedlichen ERIC-PCR-Läufen resultierender Bandenmuster des Positivklons „A6-S20-1T18 Eco5“ .....	86
Abbildung 19: qPCR-Amplifikation unterschiedlicher Proben des „Matrixversuches“ .....	90
Abbildung 20: Schmelzkurven-Analyse der Amplifikate aus Abbildung 20 .....	91
Abbildung 21: Übersicht der gewonnen „Screening“-Proben (n = 158), geordnet nach Zeitpunkt (links) bzw. Probenart (rechts) .....	94
Abbildung 22: 16S-rRNA-Gen-Gehalte in Gülle-, Jauche- und Festmistproben der „Screening“-Betriebe .....	96
Abbildung 23: Gehalte der Tetrazyklinresistenzgene <i>tet</i> (A), <i>tet</i> (B) und <i>tet</i> (M) in Gülle-, Jauche- und Festmistproben der „Screening“-Betriebe .....	97
Abbildung 24: Gehalte der Resistenzgene <i>qacE</i> / <i>qacEΔ1</i> und <i>sul</i> (II) in Gülle-, Jauche- und Festmistproben der „Screening“-Betriebe .....	98
Abbildung 25: <i>tet</i> (A)-Gehalte in Gülleproben in Abhängigkeit vom Beprobungszeitpunkt .....	99
Abbildung 26: <i>qacE</i> / <i>qacEΔ1</i> -Gehalte in Jauche in Abhängigkeit vom Beprobungszeitpunkt .....	99
Abbildung 27: Relative Abundanzen der <i>tet</i> (A)-Gehalte in Gülle-, Jauche- und Festmistproben aus dem „Screening“ .....	100
Abbildung 28: Relative Abundanzen der <i>tet</i> (B)-Gehalte in Gülle-, Jauche- und Festmistproben aus dem „Screening“ .....	101
Abbildung 29: Relative Abundanzen der <i>tet</i> (M)-Gehalte in Gülle-, Jauche- und Festmistproben aus dem „Screening“ .....	102
Abbildung 30: Relative Abundanzen der <i>qacE</i> / <i>qacEΔ1</i> -Gehalte in Gülle-, Jauche- und Festmistproben aus dem „Screening“ .....	103
Abbildung 31: <i>sul</i> (II)-Gehalte in Gülle-, Jauche- und Festmistproben aus dem „Screening“ .....	104
Abbildung 32: Relative Abundanzen der <i>tet</i> (A)-Gehalte in Faeces von Schweinen aus Betrieben mit unterschiedlichem Management („Screening“) ...	105
Abbildung 33: Relative Abundanzen der <i>tet</i> (B)-Gehalte in Faeces von Schweinen aus Betrieben mit unterschiedlichem Management („Screening“) ...	106
Abbildung 34: Relative Abundanzen der <i>tet</i> (M)-Gehalte in Faeces von Schweinen aus Betrieben mit unterschiedlichem Management („Screening“) ...	107

---

Abbildung 35: Relative Abundanzen der <i>sul</i> (II)-Gehalte in Faeces von Schweinen aus Betrieben mit unterschiedlichem Management („Screening“) ...	108
Abbildung 36: Behandlungs- / Probenahmeschema, Betrieb A6, erster Mastdurchgang (Sentinel-Schweine S1 bis S10) .....	110
Abbildung 37: Behandlungs- / Probenahmeschema, Betrieb A6, zweiter Mastdurchgang (Sentinel-Schweine S11 bis S20) .....	111
Abbildung 38: Behandlungs- / Probenahmeschema, Betrieb A6, dritter Mastdurchgang (Sentinel-Schweine S21 bis S30) .....	111
Abbildung 39: Behandlungs- / Probenahmeschema, Betrieb A21, erster Mastdurchgang (Sentinel-Schweine S1 bis S10) .....	112
Abbildung 40: Behandlungs- / Probenahmeschema, Betrieb E5, zweiter Mastdurchgang (Sentinel-Schweine S11 bis S20) .....	114
Abbildung 41: Behandlungs- / Probenahmeschema, Betrieb E5, dritter Mastdurchgang (Sentinel-Schweine S31 bis S40) .....	114
Abbildung 42: Behandlungs- / Probenahmeschema, Betrieb E5, vierter Mastdurchgang (Sentinel-Schweine S41 bis S50) .....	115
Abbildung 43: Behandlungs- / Probenahmeschema, Betrieb M13, erster Mastdurchgang (Sentinel-Schweine S1 bis S10) .....	116
Abbildung 44: <i>tet</i> (A)-Gehalte in den Faecesproben von Schweinen und Personen Tetrazyklin-einsetzender sowie nicht Tetrazyklin-einsetzender „Tracking“-Betriebe .....	119
Abbildung 45: <i>tet</i> (A)-Gehalte in den Faecesproben von „Tracking“-Schweinen	120
Abbildung 46: <i>tet</i> (A)-Gehalte in Schweinefaeces der Mastdurchgänge zwei und drei aus Betrieb E5 .....	121
Abbildung 47: Trendanalyse des Verlaufs von <i>tet</i> (A) auf Einzeltierebene (n = 336 Faecesproben), Betrieb E5 .....	122
Abbildung 48: Trendanalyse des Verlaufs von <i>tet</i> (A) auf Betriebsebene (n = 336 Schweinefaecesproben), Betrieb E5 .....	123
Abbildung 49: <i>tet</i> (B)-Gehalte in den Faecesproben von Schweinen und Personen Tetrazyklin-einsetzender sowie nicht Tetrazyklin-einsetzender „Tracking“-Betriebe .....	124
Abbildung 50: <i>tet</i> (B)-Gehalte in den Faecesproben von „Tracking“-Schweinen	125
Abbildung 51: <i>tet</i> (B)-Gehalte in Schweinefaeces der Mastdurchgänge zwei und drei aus Betrieb E5 .....	126

---

Abbildung 52: Trendanalyse des Verlaufs von <i>tet</i> (B) auf Einzeltierebene (n = 276 Faecesproben), Betrieb E5 .....	127
Abbildung 53: Trendanalyse des Verlaufs von <i>tet</i> (B) auf Betriebsebene (n = 276 Schweinefaecesproben), Betrieb E5.....	128
Abbildung 54: <i>tet</i> (M)-Gehalte in den Faecesproben von Schweinen und Personen Tetrazyklin-einsetzender sowie nicht Tetrazyklin-einsetzender „Tracking“-Betriebe .....	129
Abbildung 55: <i>tet</i> (M)-Gehalte in den Faecesproben von „Tracking“-Schweinen	130
Abbildung 56: <i>tet</i> (M)-Gehalte in Schweinefaeces der Mastdurchgänge zwei und drei aus Betrieb E5 .....	131
Abbildung 57: Trendanalyse des Verlaufs von <i>tet</i> (M) auf Einzeltierebene (n = 337 Faecesproben), Betrieb E5 .....	132
Abbildung 58: Trendanalyse des Verlaufs von <i>tet</i> (M) auf Betriebsebene (n = 337 Schweinefaecesproben), Betrieb E5.....	133
Abbildung 59: <i>tet</i> -Gehalte sowie molekularbiologisch bestimmte „Gesamtkeimzahl“ (16S-rDNA) der zu diesem Zeitpunkt nicht selbst behandelten Schweine des ersten Mastdurchgangs (S1 bis S10), Betrieb E5.....	135
Abbildung 60: <i>sul</i> (II)-Gehalte in den Faecesproben von Schweinen und Personen Sulfonamid-einsetzender sowie nicht Sulfonamid-einsetzender „Tracking“-Betriebe .....	136
Abbildung 61: <i>sul</i> (II)-Gehalte in den Faecesproben von „Tracking“-Schweinen	137
Abbildung 62: <i>sul</i> (I)-Gehalte in den Faecesproben von Schweinen während und außerhalb von Sulfonamid-Behandlung, Betrieb M13 .....	138
Abbildung 63: <i>qacE</i> / <i>qacEΔ1</i> -Gehalte in den Faecesproben von Schweinen und Personen Tetrazyklin- bzw. Sulfonamid-einsetzender sowie nicht Tetrazyklin- bzw. Sulfonamid-einsetzender „Tracking“-Betriebe....	139
Abbildung 64: <i>qacE</i> / <i>qacEΔ1</i> -Gehalte in den Faecesproben von „Tracking“-Schweinen .....	140
Abbildung 65: <i>qacE</i> / <i>qacEΔ1</i> -Gehalte in den Faecesproben von „Tracking“-Schweinen .....	141
Abbildung 66: <i>sul</i> (II)-Gehalte in den Faecesproben von „Tracking“-Schweinen	142
Abbildung 67: Cluster-Analyse der <i>E. coli</i> -Isolate (n = 108) vom Landwirt (P1), Betrieb A6 .....	144

---

Abbildung 68: Cluster-Analyse der <i>E. coli</i> -Isolate (n = 109) vom Familienmitglied (P2), Betrieb A6.....	144
Abbildung 69: Cluster-Analyse der <i>E. coli</i> -Isolate (n = 440) der Schweine, Betrieb A6.....	144
Abbildung 70: Prävalenz schweine-assoziierter Hauptcluster von <i>E. coli</i> -Isolaten (n = 299) beim Landwirt und Familienmitglied, Betrieb A6 .....	145
Abbildung 71: Cluster-Analyse der <i>E. coli</i> -Isolate (n = 114) vom Landwirt (P1), Betrieb A21 .....	147
Abbildung 72: Cluster-Analyse der <i>E. coli</i> -Isolate (n = 98) vom Familienmitglied (P2), Betrieb A21 .....	147
Abbildung 73: Cluster-Analyse der <i>E. coli</i> -Isolate (n = 459) der Schweine, Betrieb A21 .....	147
Abbildung 74: Prävalenz schweine-assoziierter Hauptcluster von <i>E. coli</i> -Isolaten (n = 310) beim Landwirt und Familienmitglied, Betrieb A21 .....	148
Abbildung 75: Cluster-Analyse der <i>E. coli</i> -Isolate (n = 150) vom Landwirt (P2), Betrieb E5.....	150
Abbildung 76: Cluster-Analyse der <i>E. coli</i> -Isolate (n = 137) vom Familienmitglied (P1), Betrieb E5 .....	150
Abbildung 77: Cluster-Analyse der <i>E. coli</i> -Isolate (n = 908) der Schweine, Betrieb E5.....	150
Abbildung 78: Prävalenz schweine-assoziierter Hauptcluster von <i>E. coli</i> -Isolaten (n = 720) beim Landwirt und Familienmitglied, Betrieb E5 .....	151
Abbildung 79: Cluster-Analyse der <i>E. coli</i> -Isolate (n = 51) vom Landwirt (P1), Betrieb J20.....	153
Abbildung 80: Cluster-Analyse der <i>E. coli</i> -Isolate (n = 42) vom Familienmitglied (P2), Betrieb J20.....	153
Abbildung 81: Cluster-Analyse der <i>E. coli</i> -Isolate (n = 150) der Schweine, Betrieb J20 .....	153
Abbildung 82: Prävalenz schweine-assoziierter Hauptcluster von <i>E. coli</i> -Isolaten (n = 97) beim Landwirt und Familienmitglied, Betrieb J20 .....	154
Abbildung 83: Ergebnisse des MLST-Datenbank-Abgleiches von Isolat „E5-07-13-S14 Eco7“ .....	156
Abbildung 84: Ergebnisse des MLST-Datenbank-Abgleiches von Isolat „E5-07-13-P2 Eco3“ .....	156

---

Abbildung 85: Ausschnitt des Sequenzabgleiches der Nukleotidsequenzen der Isolate „E5-07-13-S14 Eco7“ (= Query) und „E5-07-13-P2 Eco3“ (= Sbjct) (= Paar E5-1) .....	157
Abbildung 86: Ergebnisse des MLST-Datenbank-Abgleiches von Isolat „E5-P2-3T5 Eco7“ .....	158
Abbildung 87: Ergebnisse des MLST-Datenbank-Abgleiches von Isolat „E5-11-13-S39 Eco7“ .....	158
Abbildung 88: Ergebnisse des MLST-Datenbank-Abgleiches von Isolat „A6-S8-3T3 Eco4“ .....	159
Abbildung 89: Ergebnisse des MLST-Datenbank-Abgleiches von Isolat „A6-07-13-P1 Eco2“ .....	159
Abbildung 90: Prozentuale Verteilung von Mehrfachresistenzen in Fleisch- <i>E. coli</i> (n = 198) .....	172
Abbildung 91: Verlauf der Gesamt-Tetrazyklin-Gehalte in Faecesproben (n = 29) von Schweinen des ersten Mastdurchgangs ab Einstallung in „Tracking“-Betrieb A6 .....	189
Abbildung 92: <i>tet(B)</i> - sowie Gesamt-Tetrazyklin-Gehalte in den Faeces von Schweinen aus dem Betrieb E5 .....	195
Abbildung 93: <i>sul(I)</i> -, <i>sul(II)</i> sowie Sulfadiazin-Gehalte in den Faecesproben von Schweinen aus dem Betrieb M13 .....	203
Abbildung 94: Lage von ST20 und ST203 des Isolat-Paars E5-1 im phylogenetischen Baum (modifiziert nach <a href="http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli//svg/browser/">http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli//svg/browser/</a> ) .....	210
Abbildung 95: Lage von ST10 und ST34 des Isolat-Paars E5-2 im phylogenetischen Baum (modifiziert nach <a href="http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli//svg/browser/">http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli//svg/browser/</a> ) .....	212
Abbildung 96: Verknüpfte Sequenzen von <i>Salmonella</i> [4,5,12:i:-] (= Query) und Genbank-Eintrag AF542061.1 (= Sbjct) .....	263
Abbildung 97: Verknüpfte Sequenzen von <i>Escherichia coli</i> 2638 (= Query) und Genbank-Eintrag AF326777.3 (= Sbjct) .....	263
Abbildung 98: Verknüpfte Sequenzen von <i>Salmonella</i> Typhimurium DT12 (= Query) und Genbank-Eintrag NG_041603.1 (= Sbjct) .....	264
Abbildung 99: Verknüpfte Sequenzen von <i>Salmonella</i> Typhimurium DT104 (= Query) und Genbank-Eintrag KP899803.1 (= Sbjct) .....	265

---

Abbildung 100: Verknüpfte Sequenzen von <i>Escherichia coli</i> 1/05 Eco4-O-L (= Query) und Genbank-Eintrag KM589496.1 (= Sbjct).....	265
Abbildung 101: Verknüpfte Sequenzen von <i>Escherichia coli</i> 2638 (= Query) und Genbank-Eintrag KF756007.1 (= Sbjct) .....	266
Abbildung 102: Verknüpfte Sequenzen von <i>Bacillus cereus</i> R89 (= Query) und Genbank-Eintrag AF491293.1 (= Sbjct) .....	266
Abbildung 103: Verknüpfte Sequenzen von <i>Salmonella</i> [4,5,12:i:-] (= Query) und Probe „A6-11-13-S13“ (= Sbjct).....	267
Abbildung 104: Verknüpfte Sequenzen von <i>Escherichia coli</i> 2638 (= Query) und Probe „A6-11-13-P1“ (= Sbjct).....	268
Abbildung 105: Verknüpfte Sequenzen von <i>Salmonella</i> Typhimurium DT12 (= Query) und Probe „M13-S4-1T4“ (= Sbjct) .....	268
Abbildung 106: Verknüpfte Sequenzen von <i>Salmonella</i> Typhimurium DT104 (= Query) und Probe „M13-S1-1T0“ (= Sbjct).....	269
Abbildung 107: Verknüpfte Sequenzen von <i>Escherichia coli</i> 1/05 Eco4-O-L (= Query) und Probe „E5-P1-3T12“ (= Sbjct) .....	269
Abbildung 108: Verknüpfte Sequenzen von <i>Bacillus cereus</i> R89 (= Query) und Probe „E5-P2-3T2“ (= Sbjct) .....	270
Abbildung 109: Verknüpfte Sequenzen von „E5-07-13-S14 Eco7“ (= Query) und Probe „E5-07-13-P2 Eco3“ (= Sbjct) (= „Paar E5-1“).....	275
Abbildung 110: Verknüpfte Sequenzen von „E5-P2-3T5 Eco7“ (= Query) und Probe „E5-11-13-S39 Eco7“ (= Sbjct) (= „Paar E5-2“).....	280
Abbildung 111: Verknüpfte Sequenzen von „A6-07-13-P1 Eco2“ (= Query) und Probe „A6-S8-3T3 Eco4“ (= Sbjct) (= „Paar A6-1“).....	285
Abbildung 112: Cluster-Analyse aller ERIC-Bandenmuster untersuchter <i>E. coli</i> - Isolate aus „Tracking“-Betrieb A6 .....	295
Abbildung 113: Cluster-Analyse aller ERIC-Bandenmuster untersuchter <i>E. coli</i> - Isolate aus „Tracking“-Betrieb A21 .....	305
Abbildung 114: Cluster-Analyse aller ERIC-Bandenmuster untersuchter <i>E. coli</i> - Isolate aus „Tracking“-Betrieb E5 .....	323
Abbildung 115: Cluster-Analyse aller ERIC-Bandenmuster untersuchter <i>E. coli</i> - Isolate aus „Tracking“-Betrieb J20 .....	327

### **XIII TABELLENVERZEICHNIS**

Tabelle 1: Übersicht über Tetrazyklinresistenzgene und deren Wirkungsmechanismus ( <a href="http://faculty.washington.edu/marilynr/tetweb1.pdf">http://faculty.washington.edu/marilynr/tetweb1.pdf</a> , Stand 06.08.2015; letzter Zugriff am 30.09.2015).....	18
Tabelle 2: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Primer sowie deren Sequenzen und Referenzangaben.....	48
Tabelle 3: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Referenzstämme und ihrer Bezugsquellen .....	49
Tabelle 4: Hintergrundinformationen zur Betriebsstruktur der sechs „Tracking“-Betriebe .....	51
Tabelle 5: Übersicht der zur Untersuchung auf phänotypische Resistenz verwendeten antimikrobiellen Wirkstoffe.....	62
Tabelle 6: Zielgene, Fragmentgröße und Annealingtemperatur der für den qualitativen Resistenzgen-Nachweis verwendeten Primer .....	64
Tabelle 7: Zusammensetzung der Reagenzien beim Resistenzgen-Nachweis mittels Endpunkt-PCR.....	65
Tabelle 8: PCR-Protokoll zum qualitativen Resistenzgen-Nachweis .....	65
Tabelle 9: Zielgene, Fragmentgröße und Annealingtemperatur der für die ERIC-PCR verwendeten Primer .....	66
Tabelle 10: Zusammensetzung der Reagenzien für ERIC-PCR .....	67
Tabelle 11: PCR-Protokoll zur ERIC-PCR .....	67
Tabelle 12: Zielgene, Fragmentgröße und Annealingtemperatur der für die MLST-PCR verwendeten Primer .....	68
Tabelle 13: Zusammensetzung der Reagenzien für MLST-PCR.....	69
Tabelle 14: PCR-Protokoll zur MLST-PCR .....	69
Tabelle 15: Einstellungen der Software GelCompar® II bei der Einspeisung von ERIC-PCR-Bandenmustern .....	72
Tabelle 16: Einstellungen der Software GelCompar® II bei der Erstellung von Cluster-Analysen .....	73
Tabelle 17: Bestandteile PowerSoil®-DNA Isolation Kit .....	76
Tabelle 18: Zielgene, Fragmentgröße und Annealingtemperatur der für die qPCR verwendeten Primer.....	78
Tabelle 19: Zusammensetzung der Reagenzien pro Well in der qPCR .....	79

---

Tabelle 20: qPCR-Protokoll zur Resistenzgenquantifizierung .....	79
Tabelle 21: Minimal-, Maximal- und Medianwerte des Cut-offs [lg copies/g] aller Lightcycler-Läufe (n = 158 pro Gen bzw. n = 39 für <i>sul</i> (I)) beim Resistenzgen-Nachweis mittels qPCR .....	88
Tabelle 22: Minimal-, Maximal- und Medianwerte der LOQs [lg copies/g] aller Lightcycler-Läufe (n = 158 pro Gen bzw. n = 39 für <i>sul</i> (I)) beim Resistenzgen-Nachweis mittels qPCR .....	89
Tabelle 23: Durchschnittlicher Fehler und durchschnittliche Effizienz [± (Standardabweichung)] aller Lightcycler-Läufe (n = 158 pro Gen bzw. n = 39 für <i>sul</i> (I)) beim Resistenzgen-Nachweis mittels qPCR...89	
Tabelle 24: Wiederfindungsraten [% ± (Standardabweichung)] für <i>tet</i> (B) in unterschiedlichen Matrices des „Matrixversuches“; alle Matrices im Doppelansatz in den Konzentrationsstufen 10 <sup>8</sup> bis 10 <sup>4</sup> lg copies/g analysiert .....	92
Tabelle 25: Übereinstimmungsraten der ermittelten Gensequenzen der qPCR-Amplifikate mutmaßlicher Resistenzgene mit Referenzeinträgen der NCBI-Gendatenbank .....	93
Tabelle 26: Phäno- und genotypische Resistenzprofile der <i>E. coli</i> -MLST-Isolat-Paare .....	161
Tabelle 27: Zuordnung der Fleisch- <i>E. coli</i> -Isolate nach „Tracking“-Betrieben ..	163
Tabelle 28: Ergebnisse der phänotypischen Resistenztestung von Fleisch- <i>E. coli</i> (n = 198) gegen β-Laktam-Antibiotika aus Tabelle 5 .....	164
Tabelle 29: Ergebnisse der phänotypischen Resistenztestung von Fleisch- <i>E. coli</i> (n = 198) gegen übrige Antibiotika aus Tabelle 5.....	164
Tabelle 30: Phänotypische Resistenzprofile aller von der Bauchfleischprobe des Schweins Nr. 12 (Betrieb A21) isolierten <i>E. coli</i> (n = 29).....	167
Tabelle 31: Phäno- und genotypische Resistenzprofile von <i>E. coli</i> -Isolaten einzelner Tiere auf Betriebs- und Schlachthofebene.....	169
Tabelle 32: Prävalenz Resistenzgen-positiver <i>E. coli</i> (n = 198 untersuchte Isolate) in Fleischproben (n = 244), sortiert nach „Tracking“-Betrieben .....	170
Tabelle 33: Prävalenz Resistenzgen-positiver <i>E. coli</i> (n = 198 untersuchte Isolate) in Fleischproben (n = 244), betriebsübergreifend .....	171
Tabelle 34: Übersicht der zur ERIC-Analyse herangezogenen <i>E. coli</i> -Isolate (n = 657), Betrieb A6 .....	259

Tabelle 35: Übersicht der zur ERIC-Analyse herangezogenen <i>E. coli</i> -Isolate (n = 671), Betrieb A21 .....	259
Tabelle 36: Übersicht der zur ERIC-Analyse herangezogenen <i>E. coli</i> -Isolate (n = 1195), Betrieb E5.....	260
Tabelle 37: Übersicht der zur ERIC-Analyse herangezogenen <i>E. coli</i> -Isolate (n = 243), Betrieb J20.....	262

## **XIV DANKSAGUNG**

Großer Dank geht an dieser Stelle an Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Johann Bauer: Einerseits für die mir gebotene Möglichkeit, am Lehrstuhl für Tierhygiene zu einem solch wichtigen und gleichermaßen interessanten Thema zu promovieren. Andererseits für die immerwährende Motivation und die vielen guten Ratschläge.

Herrn Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger danke ich herzlich für seine Bereitschaft, diese Arbeit als Inaugural-Dissertation anzunehmen. Darüber hinaus für die stets gute Erreichbarkeit und für die Zeit, die die Korrektur dieser Arbeit in Anspruch nahm.

Bei Frau PD Dr. Christina Hölzel möchte ich mich ganz besonders bedanken für die hervorragende fachliche Unterstützung in den vergangenen drei Jahren. Zudem danke ich ihr für all die Zeit und Energie, die der Betreuung und der überaus sorgfältigen Durchsicht dieser Arbeit zukam und dafür, dass sie dabei immer das richtige Maß aus Anleitung und selbstständigem Arbeiten für mich fand. Herzlichen Dank auch für die tröstenden Worte in schwierigen Zeiten!

Mein Dank gilt dem StMUV für die finanzielle Förderung dieses Projektes.

Weiterhin möchte ich den Projektpartnern vom LGL meinen Dank für die fortwährend gute Zusammenarbeit aussprechen.

Frau Julia Herbinger und Herrn Prof. Dr. Helmut Küchenhoff vom StaBLab sei recht herzlich für Ihre Mithilfe bei der statistischen Auswertung gedankt.

Ich danke allen Personen der am Projekt teilnehmenden Betriebe und auch den Mitarbeitern der Schlachthöfe – ohne deren Kooperationsbereitschaft wäre die Durchführung der Studie nicht möglich gewesen.

Explizit möchte ich mich bei allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Tierhygiene bedanken: Ohne die stetige Unterstützung und exzellente Arbeit eines jeden Einzelnen wäre dieses Projekt nicht bewältigbar gewesen. Es war eine schöne Zeit bei euch im Team!

Besonderer Dank gebührt Barbara Fritz, auf die einfach immer Verlass war und ist. Danke an Thomas Korbica für die Unterstützung bei unzähligen DNA-Extraktionen, Danke an Annika Bartuschat für die Hilfe bei der

Projektorganisation. Ebenso Danke an Samart Dorn-In für die bereitwillige Hilfestellung bei der Etablierung der qPCR-Methodik.

Nicht unerwähnt bleiben dürfen Stefanie Schäfer, Anja Burgmaier, Simone Heisz und Ricarda Mayer, deren Leistungen und Vorarbeiten einen wesentlichen Baustein zur Fertigstellung dieser Arbeit beitrugen. Danke, nicht nur dafür!

Ich bin dankbar, in Julia Storch nicht nur die allerbeste Büroteilpartnerin, sondern auch eine Freundin fürs Leben gefunden zu haben.

Gracias an Melanie Spornraft fürs fortwährende Mut Zureden und Verbreiten positiver Energie, Danke an Julia Wilke für viele erheiternde Zugfahrten, ernste und lustige Gespräche!

Ich möchte Familie, Kollegen und Freunden danken, die sich in der Zeit nach dem Tod meiner Mutter allesamt aufopferungsvoll um mich gekümmert und mich bei jeder Gelegenheit unterstützt haben. Besonders ohne euch, Brigitte & Rupert, Bodo, Traudi & Manfred, Matthias, Petra & Marinus, Nina & Alex, Alex & Tomas, Valerie, Sophie, Melissa & Falk, Eike, Lukas, Basti, Serge und Moritz, hätte ich das alles nicht geschafft!

Mari, Danke, dass du immer zu mir stehst, mir Mut machst, mich zum Lachen bringst und mich einen Teil deines Lebens sein lässt. Ich hab dich lieb!

Base, Danke für die Unterstützung die du mir über all die Jahre hast zukommen lassen – auch ohne dich wäre ich nie so weit gekommen. Ruhe in Frieden!

Hey Mama, leider bekommst du die Fertigstellung dieser, meiner Doktorarbeit nicht mehr direkt mit – ich spüre aber, dass das alles nicht an dir vorbeigeht und du stolz auf mich bist. Danke, dass du mich in jeder Phase meines Weges begleitet, unterstützt und mir so vieles im Leben überhaupt erst ermöglicht hast! Du fehlst mir sehr. Aber der Mari und mir geht's gut – ich weiß, das ist das, was dir immer am wichtigsten war!

Danke Mama, für alles! Ich hab dich lieb!