

Aus dem Institut für Hygiene und Umweltmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Lebensmittel als Reservoir ESBL – produzierender
Enterobakterien

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Amelie Ida Eisele

aus Heidenheim an der Brenz

Datum der Promotion: 01.03.2019

Inhaltsverzeichnis

Deckblatt.....	1
Inhaltsverzeichnis	3
Verwendete Abkürzungen	6
Abbildungsverzeichnis.....	9
Tabellenverzeichnis.....	11
Abstrakt	13
1 Einleitung.....	15
1.1 Betalaktam – Antibiotika	15
1.1.1 Wirkungsweise	17
1.1.2 Resistenzentwicklung	17
1.1.3 Resistenzmechanismen	18
1.2 Beta – Laktamasen.....	19
1.2.1 Definition.....	19
1.2.2 Einteilung der Beta – Laktamasen.....	19
1.2.2.1 Einteilung nach Ambler.....	19
1.2.2.2 Einteilung nach Bush, Jacoby und Medeiros.....	20
1.2.3 Wirkungsweise	24
1.2.4 Beta – Laktamase – Inhibitoren.....	24
1.3 Extended – Spektrum – Beta - Laktamasen.....	25
1.3.1 Epidemiologie von ESBL	26
1.3.2 TEM, SHV, CTX - M, RAHN - 1 und OXA	26
1.4 Klinische Bedeutung der ESBL - produzierenden Enterobakterien bei Mensch und Tier	29
1.4.1 Therapiemöglichkeiten bei ESBL - produzierenden Enterobakterien beim Menschen	30
1.4.2 Antibiotika – Einsatz in der Veterinärmedizin	34
1.5 ESBL - Vorkommen außerhalb des Krankenhauses.....	37
1.5.1 Menschen als Reservoir ESBL – positiver Enterobakterien.....	38
1.5.2 Tiere als Reservoir ESBL – positiver Enterobakterien	39
1.5.3 Lebensmittel als Reservoir ESBL – positiver Enterobakterien	40
1.5.4 Umwelt als Reservoir ESBL – positiver Enterobakterien.....	40
2 Fragestellung.....	42
3 Material und Methoden.....	44
3.1 Material.....	44

3.1.1 Art und Umfang der Lebensmittelproben.....	44
3.1.2 Geräte.....	64
3.1.3 Verbrauchsmaterialien, Nährmedien, Chemikalien, Lösungen und Puffer.....	65
3.1.3.1 Verbrauchsmaterialien.....	65
3.1.3.2 Nährmedien.....	65
3.1.3.3 Chemikalien, Lösungen und Puffer.....	66
3.1.4 Antibiotika.....	67
3.2 Methoden.....	68
3.2.1 Verarbeitung der Lebensmittelproben zur Kultivierung von ESBL - produzierenden Enterobakterien.....	68
3.2.2 Phänotypische Bestätigung der ESBL - Produktion mit der Combination disc – Methode.....	69
3.2.3 Biochemische Identifizierung und Resistenztestung mit dem Vitek 2 Compact (BioMerieux, Deutschland).....	70
3.2.4 Lagerung der Bakterienisolate.....	71
3.2.5 Molekularbiologische Typisierung der ESBL - positiven Isolate.....	71
3.2.5.1 Isolierung der bakteriellen DNA.....	72
3.2.5.2 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA.....	73
3.2.5.3 Genotypisierung mittels der repetitive extragenomic palindromic (rep) - PCR.....	74
3.2.6 Versuch zur Übertragung von ESBL - positiven Erregern bei der Verarbeitung von Lebensmittelproben.....	79
4 Ergebnisse.....	80
4.1 Nachweis von ESBL - produzierenden Erregern in den Lebensmittelproben.....	80
4.2 Antibiotikaresistenzen der aus den Lebensmittel isolierten ESBL - positiven Erreger.....	82
4.3 Genotypisierung.....	99
4.3.1 Genotypische Untersuchung der ESBL - positiven Isolate mittels der Rep - PCR.....	99
4.3.1.1 ATCC - Referenzstämme.....	99
4.3.1.3 Genotypisierung der <i>S. fonticola</i> - Isolate.....	105
4.3.1.4 Genotypisierung der <i>E. fergusonii</i> – Isolate.....	109
4.4 Molekularbiologische Untersuchungen der ESBL - Gene / Resistenz gegen 3. Generations - Cephalosporine.....	109
4.4.1 Sequenzanalyse der <i>E. coli</i> – Isolate.....	110
4.4.1.1 <i>E. coli</i> – Isolate aus Hühnerbrustproben.....	110
4.4.1.2 <i>E. coli</i> – Isolate aus Rinderhackfleischproben.....	116
4.4.1.3 <i>E. coli</i> – Isolate aus Schweinehackfleischproben.....	116
4.4.2 Sequenzanalyse der <i>S. fonticola</i> – Isolate.....	117

4.4.3 Sequenzanalyse der <i>E. fergusonii</i> – Isolate	117
4.5 Versuch zur Übertragung von ESBL - positiven Erregern bei der Verarbeitung von Lebensmittelproben	118
5 Diskussion	120
5.1 Interpretation der Ergebnisse und Vergleich mit anderen Studien	120
5.2 Zusammenfassung / Konsequenzen der Ergebnisse	131
Literaturverzeichnis	134
Eidesstattliche Versicherung	161
Lebenslauf	162
Danksagung	164

Verwendete Abkürzungen

A = Absorption

A. baumannii = *Acinetobacter baumannii*

Abb. = Abbildung

Abs. = Absatz

AFLP = Amplified - Fragment - Length - Polymorphism

Aldi = Albrecht Diskont

AMG = Arzneimittelgesetz

AMP = Ampicillin

AmpC = Ampicillin class C

AMV = Arzneimittelverordnung

ASU = Ampicillin / Sulbactam

ATCC = American Type Culture Collection

AWMF = Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften

BfR = Bundesinstitut für Risikobewertung

BJM = Bush, Jacoby und Medeiros

bla = Betalaktamase

bp = Basenpaare

BSAC = British Society for Antimicrobial Chemotherapy

BVL = Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit

c = Konzentration

C = Cluster

°C = Grad Celsius

© = Copyright

ca. = circa

CAX = Cefuroxim - Axetil

CAZ = Ceftazidim

CIP = Ciprofloxacin

CLSI = Clinical Laboratory Standards Institute

CME = *Chryseobacterium meningosepticum*

CMY = cephamycin

CPD = Cefpodoxim

CRX = Cefuroxim

CTX = Cefotaxim

CTX – M = Cefotaximase - Munich Beta - Laktamase

CV = Clavulansäure

d = Schichtdicke

DART = Deutsche Antibiotika - Resistenzstrategie

DIMDI = Deutsches Institut für Medizinische Dokumentation und Information

DNA = Desoxyribonukleinsäure

ϵ = Extinktionskoeffizient

EARSS = European Antimicrobial Resistance Surveillance System

E. coli = *Escherichia coli*

ECDC = European Centre for Disease Prevention and Control

Edeka = Einkaufsgenossenschaft der Kolonialwarenhändler

EDTA = Ethylendiamintetraacetat

E. fergusonii = *Escherichia fergusonii*
 EFSA = European food safety authority (Europäische Lebensmittelsicherheitsbehörde)
 e.G. = eingetragene Genossenschaft
 EHEC = enterohämorrhagischen *Escherichia coli*
 EMA = European Medicines Agency
 EPEC = enteropathogene *Escherichia coli*
 ESBL = Extended - Spectrum - Beta - Laktamasen
 et al. = et alii (und andere)
 ETP = Ertapenem
 EU = Europäische Union
 EUCAST = European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
 EWR = Europäischer Wirtschaftsraum
 ExPEC = extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*
 ff = folgende
 FUTI = foodborne urinary tract infection
 G = Geflügel
 GbR = Gesellschaft bürgerlichen Rechts
 GEN = Gentamicin
 G - H = Gurke - Huhn (*E. coli* – Isolat aus Gurkenprobe nach Verwendung kontaminierter Utensilien)
 GmbH & Co KG = Gesellschaft mit beschränkter Haftung & Compagnie Kommanditgesellschaft
 H = Huhn (*E. coli* – Isolat aus Hühnerfleischprobe)
 HUS = hämolytisch urämisches Syndrom
 i.d.R = in der Regel
 I.E. = Internationale Einheiten
 IMI = Imipenem
 int = intermediär
 KbE = Kolonie bildende Einheiten
 k. A. = keine Angabe
K. ascorbata = *Kluyvera ascorbata*
K. pneumoniae = *Klebsiella pneumoniae*
 LAVES = Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
 LEV = low elution volume
 LPG = Landwirtschaftliche Produktionsgenossenschaft
 mcr = mobilized colistin resistance
 MEM = Meropenem
 µg = Mikrogramm
 mg = Milligramm
 MHK = minimale Hemmkonzentration
 min = Minute/n
 µl = Mikroliter
 ml = Milliliter
 MLST = Multilocus - Sequenztyp
 mol = molekulare Stoffmenge
 MOX = Moxifloxacin
 MRSA = Methicillin - resistenter *Staphylococcus aureus*
 n = Anzahl
 NaCl = Natriumchlorid
 NARMS = National Antimicrobial Resistance Monitoring System

NDM = Neu - Delhi - Metallo – Beta – Laktamase
Nr. = Nummer
OXA = Oxacillinase
P. aeruginosa = *Pseudomonas aeruginosa*
PBP = Penicillin - bindendes Protein
PCR = Polymerase chain reaction
PER = Pseudomonas extended resistance
PFGE = Pulsfeld - Gelelektrophorese
PIP = Piperacillin
PMP = Proteus, Morganella und Providencia
PTA = Piperacillin / Tazobactam
r = resistant
R = Rind
® = Registered sign
RAHN = *Rhanella aquatilis*
Ref. = Referenz
rep = repetitive extragenomic palindromic
REWE = Revisionsverband der Westkauf-Genossenschaften
RKI = Robert Koch-Institut
RNA = Ribonukleinsäure
rpm = rounds per minute
s = sensibel
S = Schwein
sec = Sekunde
S. fonticola = *Serratia fonticola*
SHV = SulphHydrylVariable
S. marcescens = *Serratia marcescens*
s.o. = siehe oben
sog. = sogenannte
spp. = species pluralis
ST = Sequenztyp
SXT = Trimethoprim / Sulfamethoxazol
T = Tonne
t = Zeit
Tab. = Tabelle
TAQ = Thermophilus aquaticus
TEM = Temoniera
TIG = Tigecylin
tRNA = Aminoacyl - transfer – RNA
TSB = Tryptic – Soja - Bouillon
U = Unit
u.a. = unter anderem
v.a. = vor allem
VEB = Vietnamese extended - spectrum beta - lactamase
VIM = Verona Imipenemase
VRE = Vancomycin - resistente Enterokken
WHO = Weltgesundheitsorganisation
z.B. = zum Beispiel
Zn = Zink

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die verschiedenen Gruppen der Betalaktam – Antibiotika. Abbildung übernommen aus (Babic, Hujer et al. 2006).....	15
Abbildung 2: Strukturelle Gemeinsamkeiten der Ambler Klassen A, C, und D Serin – Beta – Laktamasen (die aktive Serin – Gruppe ist gelb dargestellt); Ambler Klasse B Metallo Beta – Laktamase (die beiden Zn ²⁺ Ionen sind grau dargestellt). Abbildung übernommen aus (Drawz und Bonomo 2010).....	20
Abbildung 3: Einteilung der Beta – Laktamasen nach Ambler (gelb) und nach BJM (blau)	21
Abbildung 4: hydrolytische Reaktion der Beta – Laktamase. Abbildung übernommen aus (Mutschler, Geisslinger et al. 2008).	24
Abbildung 5: Beta – Laktamase – Inhibitoren. Abbildung übernommen aus (Drawz und Bonomo 2010).	25
Abbildung 6: Mögliche Übertragungswege ESBL – positiver <i>Enterobacteriaceae</i> zwischen Menschen, Tieren, Lebensmitteln, sowie der Umwelt. Abbildung nach (Ewers, Bethe et al. 2012, Friese und Rösler 2013).....	38
Abbildung 7: Maxwell® DNA Aufreinigung (aus Maxwell® 16 Technisches Handbuch, 2013)	72
Abbildung 8: Prinzip der rep - PCR (aus BioMerieux Technisches Handbuch, 2009)...	74
Abbildung 9 a und 9 b: Prinzip der vom Agilent 2100 Bioanalyzer verwendeten Mikrofluid - Chips (aus Agilent Technologies Technisches Handbuch, 2007).....	76
Abbildung 10: Darstellung der rep - PCR Ergebnisse im DiversiLab System	78
Abbildung 11: Verwandtschaftsanalyse für <i>E. coli</i> ATCC 25922 Kontrollstämme aus verschiedenen DiversiLab – Typisierungen.....	99
Abbildung 12: Verwandtschaftsanalyse für <i>S. marcescens</i> ATCC 8100 Kontrollstämme aus verschiedenen DiversiLab – Typisierungen	100
Abbildung 13: Verwandtschaftsanalyse der 35 mit dem DiversiLab System untersuchten <i>E. coli</i> – Isolate aus Hühnerbrustproben	101
Abbildung 14: Verwandtschaftsanalyse und Ähnlichkeitsmatrix der 4 mit dem DiversiLab System untersuchten <i>E. coli</i> – Isolate aus Rinderhackfleischproben	104
Abbildung 15: Verwandtschaftsanalyse und Ähnlichkeitsmatrix der 6 mit dem DiversiLab System untersuchten <i>E. coli</i> – Isolate aus Schweinehackfleischproben	105
Abbildung 16: Verwandtschaftsanalyse der 18 mit dem DiversiLab System untersuchten <i>S. fonticola</i> – Isolate aus Hühnerbrust-, Rinderhackfleisch-, Schweinehackfleischproben	107
Abbildung 17: Verwandtschaftsanalyse und Ähnlichkeitsmatrix der 2 mit dem DiversiLab System untersuchten <i>E. fergusonii</i> – Isolate aus Hühnerbrustproben	109
Abbildung 18: ESBL - Typen der <i>E. coli</i> – Isolate und <i>mcr - 1</i> positive Proben aus Hühnerfleischproben je Supermarkt	110
Abbildung 19: Phylogruppen der <i>E. coli</i> – Isolate aus Hühnerfleischproben je Supermarkt	111
Abbildung 20: Phylogruppen der <i>E. coli</i> – Isolate aus Hühnerfleischproben mit Verteilung der jeweils unterschiedlichen ESBL – Typen und des Plasmid - vermittelten Colistinresistenzgen <i>mcr – 1</i>	112

Abbildung 21: Verwandtschaftsanalyse und Ähnlichkeitsmatrix der Proben der mit dem DiversiLab System untersuchten <i>E. coli</i> – Isolate zum Versuch zur Übertragung von ESBL - positiven Erregern bei der Verarbeitung von Lebensmittelproben	119
Abbildung 22: Aufbauschema: Struktur einer Geflügelproduktion. Entnommen aus (Friese und Rösler 2013).....	122
Abbildung 23: Räumliche Verteilung der Verkäufe von Polymyxinen in mg / kg tierische Biomasse in 26 EU / EWR - Länder für das Jahr 2013 (entnommen aus (EMA 2015)).	128

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der Betalaktam – Antibiotika (Tabelle angelehnt an (Brodt 2013))	15
Tabelle 2: Mechanismen der Bakterien zur Ausbildung von Resistenzen.....	18
Tabelle 3: Einteilung der Beta – Laktamasen nach Ambler (Ambler 1980) und nach BJM (Bush 1989a), (Bush 1989b), (Bush 1989c), (Bush, Jacoby et al. 1995)	22
Tabelle 4: Abgaben der Antibiotika von pharmazeutischen Unternehmen und Großhändlern an Tierärzte in Deutschland vom Jahr 2011 bis 2015. Tabelle übernommen aus © Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL 2016).	36
Tabelle 5: Salatgurken.....	44
Tabelle 6: Lachs (geräuchert, ungewürzt, aus Aquakultur)	45
Tabelle 7: Sprossengemüse	47
Tabelle 8: Tofu (abgepackt, ungewürzt)	51
Tabelle 9: Radieschen (im Bund)	52
Tabelle 10: Zwiebeln	53
Tabelle 11: Frühlingszwiebeln (im Bund)	54
Tabelle 12: Hähnchenbrustfilet.....	54
Tabelle 13: Rinder - Hackfleisch.....	58
Tabelle 14: Schweine - Hackfleisch.....	61
Tabelle 15: Geräteliste	64
Tabelle 16: Eingesetzte Verbrauchsmaterialien	65
Tabelle 17: Eingesetzte Nährmedien	65
Tabelle 18: Eingesetzte Chemikalien, Lösungen und Puffer.....	66
Tabelle 19: Wirkstoffe bzw. Wirkstoffkombinationen der VitekTestkarte AST N223	67
Tabelle 20: Zusammensetzung des Master - Mix.....	75
Tabelle 21: Reaktionsschritte der PCR	76
Tabelle 22: Nachweis von ESBL - positiven Erregern in Hähnchenbrustproben	80
Tabelle 23: Nachweis von ESBL - positiven Erregern in Rinderhackfleischproben	81
Tabelle 24: Nachweis von ESBL - positiven Erregern in Schweinehackfleischproben .	81
Tabelle 25: Resistenzergebnisse der <i>E. coli</i> – Isolate aus Hühnerbrustproben	83
Tabelle 26: Resistenzergebnisse der ESBL - positiven <i>E. coli</i> - Isolate aus Rinderhackfleischproben	87
Tabelle 27: Resistenzergebnisse der ESBL - positiven <i>E. coli</i> - Isolate aus Schweinehackfleischproben	89
Tabelle 28: Resistenzergebnisse der <i>S. fonticola</i> – Isolate aus Hühnerbrustproben	91
Tabelle 29: Resistenzergebnisse der <i>S. fonticola</i> – Isolate aus Rinderhackfleischproben	94
Tabelle 30: Resistenzergebnis des <i>S. fonticola</i> – Isolats aus einer Schweinehackfleischprobe	96

Tabelle 31: Resistenzergebnisse der <i>E. fergusonii</i> – Isolate aus Hühnerbrustproben..	98
Tabelle 32: Genotyp und Herkunft der ESBL - positiven <i>E. coli</i> – Isolate aus Hühnerbrustproben.....	101
Tabelle 33: Genotyp und Herkunft der ESBL - positiven <i>E. coli</i> – Isolate aus Rinderhackfleischproben	104
Tabelle 34: Genotyp und Herkunft der ESBL - positiven <i>E. coli</i> – Isolate aus Schweinehackfleischproben	105
Tabelle 35: Genotyp und Herkunft der ESBL - positiven <i>S. fonticola</i> – Isolate aus Hühnerbrust-, Rinderhackfleisch- und Schweinehackfleischproben	108
Tabelle 36: Genotyp und Herkunft der ESBL - positiven <i>E. fergusonii</i> – Isolate aus Hühnerbrustproben.....	109
Tabelle 37: Genotyp, Herkunft und Ergebnisse der Sequenzanalyse der ESBL - positiven <i>E. coli</i> – Isolate aus Hühnerbrustproben	113
Tabelle 38: Genotyp, Herkunft und Ergebnisse der Sequenzanalyse der ESBL - positiven <i>E. coli</i> – Isolate aus Rinderhackfleischproben.....	116
Tabelle 39: Genotyp, Herkunft und Ergebnisse der Sequenzanalyse der ESBL - positiven <i>E. coli</i> – Isolate aus Schweinehackfleischproben.....	116
Tabelle 40: Genotyp, Herkunft und Ergebnisse der Sequenzanalyse der ESBL - positiven <i>E. fergusonii</i> – Isolate aus Hühnerbrustproben	117

Abstrakt

Durch den rasanten Anstieg der Prävalenz ESBL – produzierender *Enterobacteriaceae* in der Veterinär- und Humanmedizin und einer Zunahme von Infektionen mit ESBL – produzierenden Bakterien weltweit rücken diese Keime zunehmend in den Fokus des öffentlichen Interesses. Eine Transmission der Erreger auf den Menschen über die Lebensmittelkette wird diskutiert. Ziel dieser Arbeit ist es, das Vorkommen von ESBL – produzierenden Enterobakterien in verschiedenen tierischen und vegetarischen Lebensmitteln zu untersuchen und ob es in der Küche beim Umgang mit Lebensmitteln, die mit ESBL – positiven Erregern kontaminiert sind, zur Übertragung auf Küchenutensilien und andere Lebensmittel und auf diesem Weg möglicherweise auf den Konsumenten kommen kann.

Insgesamt wurden 5 verschiedene Gemüsearten, 3 verschiedene Fleischarten, Fisch und Tofu à mindestens 50 Proben von jeweils 4 - 5 unterschiedlichen Lebensmittelhandlungen in Berlin anhand eines selektiven Agars auf das Vorkommen ESBL – produzierender Bakterien untersucht. Die Proben, bei welchen die ESBL – Isolate phänotypisch bestätigt wurden, wurden durch molekularbiologische Methoden weiter typisiert und auf *bla*TEM, *bla*CTX – M und *bla*SHV getestet. Bei 88 % (44 von 50) der Geflügelfleischproben wurden ESBL – produzierende Keime identifiziert. Die meisten dieser Isolate (n = 34, 68 %) gehörten zur Spezies *Escherichia coli* und waren vom ESBL - Typ SHV - 12 (n = 18, 53 %), CTX – M - 1 (n = 14, 41 %) und SHV – 2 (n = 2, 6 %). Bei 4 der 18 SHV - 12 positiven Isolate wurde außerdem das Plasmid - vermittelte Colistinresistenzgens *mcr* – 1 identifiziert. Ebenso konnten ESBL – produzierende Enterobakterien in Rind- und Schweinehackfleischproben nachgewiesen werden, nicht jedoch in den übrigen Lebensmittelproben. ESBL – positive Erreger konnten weiterhin bei der Zubereitung leicht auf andere Lebensmittel übertragen werden (bei 11 der 25 Probendurchführungen).

In einem weiteren Schritt wurde mittels Kultur und repetitive extragenomic palindromic (rep) – PCR untersucht, ob ESBL - bildende Erreger bei der Verarbeitung von kontaminiertem Geflügelfleisch z.B. auf vorher unbelastetes Gemüse wie Salatgurken übertragen werden könnte. Dies war in 11 von 25 Versuchsdurchführungen der Fall.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen auf eine hohe Belastung von Hühnerfleisch mit ESBL – produzierenden *Enterobacteriaceae* hin. Dabei können ESBL – produzierenden *Enterobacteriaceae* durch eine unzureichende Küchenhygiene einfach auf andere Lebensmittel und möglicherweise auf den Konsumenten übertragen werden.

Due to an increased prevalence of extended – spectrum – beta - lactamase (ESBL) production in *Enterobacteriaceae* in veterinary and human medicine and an increase of infections caused by these bacteria worldwide, these organisms are becoming a focus of public interest and a transmission of these pathogens to humans via the food chain is discussed. The aim of this work is to determine the prevalence of ESBL production in *Enterobacteriaceae* in retail meat and vegetarian foods and whether these organisms can be transferred to kitchen devices or other foodstuffs when handling those that are contaminated with ESBL - producers and if by that way, a transfer of these organisms to the consumer could occur.

A total of 5 different types of vegetables, 3 different kinds of meat, fish and tofu (at least 50 samples each from 4 - 5 different supermarket chains in Berlin) were screened for ESBL production using a selective agar. Phenotypic ESBL isolates were characterized by biomolecular methods and tested for *bla*TEM, *bla*CTX – M and *bla*SHV. In 88 % (44 of 50) of the poultry meat samples, ESBL - producing organisms were identified. Most of these isolates (n = 34, 68 %) belonged to the species *Escherichia coli* and were of ESBL types SHV - 12 (n = 18, 53 %), CTX - M - 1 (n = 14, 41 %) and SHV - 2 (n = 2, 6 %). In 4 of the 18 SHV - 12 positive isolates, the plasmid - mediated colistin resistance gene *mcr* – 1 was identified. Likewise, ESBL - producing organisms were detected in beef and pork meat samples, whereas they could not be detected in the remaining food samples. Furthermore, ESBL - positive pathogens could easily be transferred to other foods during preparation. To analyse this further, it was investigated if ESBL - producing organisms can be transferred to previously unloaded vegetables such as cucumbers in the handling process of contaminated poultry meat. This could be shown in 11 of 25 examinations by using culture and repetitive extragenomic palindromic (rep) PCR.

The results of this work show a high load of ESBL - producing *Enterobacteriaceae* in poultry meat. Thereby ESBL - producing *Enterobacteriaceae* can easily be transferred to other foodstuffs and possibly to consumers by insufficient hygienic measures in the kitchen.

1 Einleitung

1.1 Betalaktam – Antibiotika

Der klinische Therapieerfolg des zuerst entdeckten Beta – Laktam – Antibiotikums, Penicillin G, führte zur Suche und Entwicklung weiterer Derivate. Heutzutage finden vier Wirkstoffgruppen von Beta – Laktam – Antibiotika klinische Anwendung (Abb. 1, Babic, Hujer et al. 2006). Diese besitzen als gemeinsames Strukturmerkmal den Betalaktamring als reaktive Gruppe, wobei deren Aktivität durch weitere Ringstrukturen beeinflusst wird (Donowitz und Mandell 1988).

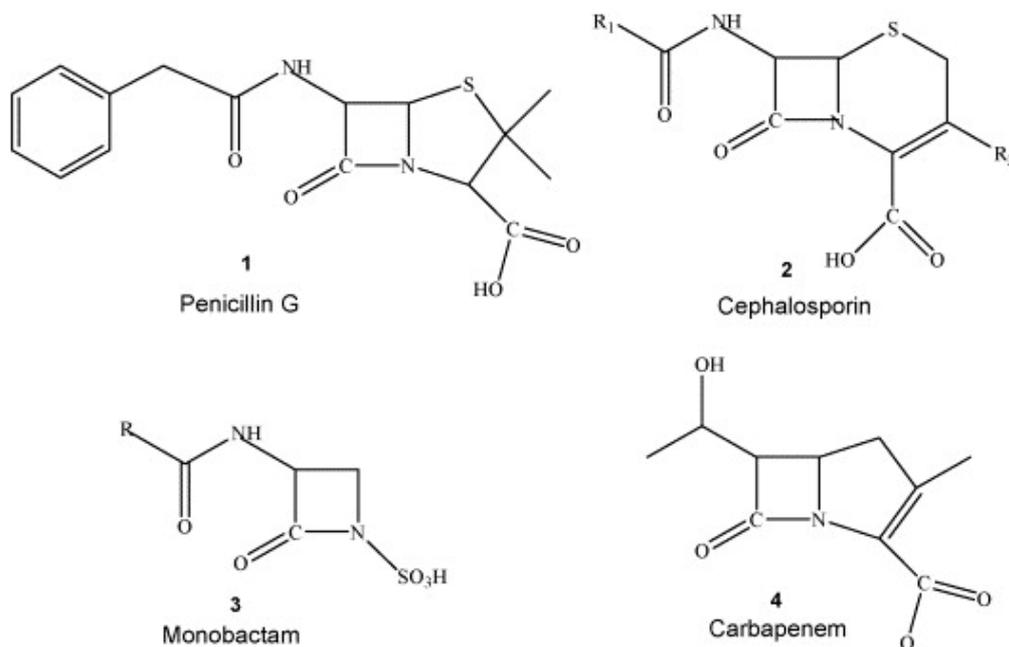


Abbildung 1: Die verschiedenen Gruppen der Betalaktam – Antibiotika. Abbildung übernommen aus (Babic, Hujer et al. 2006).

Tabelle 1: Einteilung der Betalaktam – Antibiotika (Tabelle angelehnt an (Brodth 2013))

Klasse	Wirkstoff	Spektrum / Sicherheit
Penicilline	Klassische Penicilline Penicillin G Benzylpenicillin Penicillin V Phenoxyethylpenicillin (säurestabil) Propicillin	Wirksam gegen Gram-positive Erreger, Gram-negative Kokken und <i>Pasteurella multocida</i>
	Penicillinasefeste Penicilline Methicillin Oxacillin	Mittel der Wahl gegen Staphylokokken

Klasse	Wirkstoff	Spektrum / Sicherheit
	Flucloxacillin	
	Aminopenicilline Ampicillin Amoxicillin u. a.	Wirksam auch gegen manche <i>Enterobacteriaceae</i>
	Carboxylpenicilline Carbenicillin Tivarcillin u. a.	Wirksam auch gegen viele <i>Enterobacteriaceae</i> und Pseudomonaden
	Acylureidopenicilline Mezlocillin Piperacillin	Wirksam auch gegen viele <i>Enterobacteriaceae</i> und Pseudomonaden Gute Penetrationsfähigkeit
Cephalosporine		Alle Cephalosporine sind gegen Enterokokken unwirksam
	1. Generation Cefalotin Cefazolin u. a.	Gut wirksam auf Staphylokokken und Streptokokken, schwach gegen Hämophilus, <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i>
	2. Generation Cefamandol Cefoxitin Cefuroxim Cefotiam	Im Vergleich zu 1. Generation verbesserte Wirkung gegen Gram-negative Erreger
	3a. Generation Cefotaxim Ceftriaxon	Sehr breites Wirkspektrum mit guter Wirkung gegen Gram-negative Bakterien, jedoch im Vergleich zu 1. und 2. Generation schwächere Wirkung gegen Gram-positive
	3b. Generation Ceftazidim Cefepim	Gute Aktivität gegen <i>P. aeruginosa</i>
	Orale Cephalosporine verschiedener Generationen 1. Generation: Cefaclor Cefadroxil Cefalexin 2. Generation: Cefpodoxim Cefuroxim	

Klasse	Wirkstoff	Spektrum / Sicherheit
	Cefixim	
Carbapeneme	Imipenem Meropenem Ertapenem	Oft wirksam bei Erregern, die gegen Cephalosporine resistent sind
Monobactame	Aztreonam	Wirksam gegen viele Gram-negative, nicht wirksam gegen Anaerobier
Oxalactame	Clavulansäure Sulbactam Tazobactam	Inhibitoren von Betalaktamasen; haben selbst nur sehr geringe antibakterielle Aktivitäten Kombination mit Amoxicillin und anderen Penicillinderivaten

1.1.1 Wirkungsweise

Die Betalaktam – Antibiotika stören die bakterielle Zellwandsynthese, indem sie die Transpeptidase - das Enzym, das für die Synthese der Zellwand (Quervernetzung des Mureins) zuständig ist - irreversibel hemmen. Dies geschieht durch Bindung des Antibiotikums an die Transpeptidase (auch Penicillinbindeprotein genannt). Das Enzym wird so in seiner Funktion gehemmt, der Zellwandaufbau wird gestört, die Wand wird schwach, durchlässig und labil. Durch die fehlerhafte Zellwand und den hohen osmotische Druck kommt es schließlich zur Lyse der Zelle (Goffin und Ghuysen 1998).

1.1.2 Resistenzentwicklung

Stellen Bakterien trotz des Einsatzes therapeutisch relevanter Konzentrationen eines Antibiotikums ihre Vermehrung nicht ein, spricht man von einer Bakterienresistenz. Diese ist abhängig von der erhöhten minimale Hemmkonzentration (MHK) des Antibiotikums für den Erreger, der Pharmakokinetik der Substanz und vom klinischen Ergebnis (Witte und Klare 1999).

Die Resistenz, also die Unempfindlichkeit des Bakteriums gegenüber der Wirksubstanz, kann natürlicherweise vorliegen oder erworben sein. Eine natürliche Resistenz liegt vor, wenn das Bakterium aufgrund seiner natürlichen Eigenschaften keinen Angriffspunkt für das Antibiotikum bietet und das Antibiotikum deshalb unwirksam ist. Die erworbene Resistenz wird mit der Antibiotikatherapie und dem damit assoziierten Selektionsdruck auf das Antibiotikum in Verbindung gebracht, sowie mit dem genetischen Potential zur Resistenzentwicklung (Witte, Strommenger et al. 2004).

Hierbei spielen zum einen die molekularen Resistenzmechanismen der Bakterien (siehe Punkt 1.1.3), zum anderen der Austausch von Resistenzgenen, welche in mobilen Elementen enthalten sein können, zwischen einzelnen Bakterienzellen eine wichtige Rolle (Witte, Strommenger et al. 2004). Zu solchen mobilen Elementen zählen Transposons und Plasmide (Witte und Klare 1999).

Transposons sind sogenannte springende Gene, die sich ins Chromosom integrieren und nach Annäherung zweier Bakterien und Zell – zu – Zell - Kontakt (Konjugation) von einer Bakterienzelle auf eine andere übertragen werden (McGregor 2003). Auf solchen

Genabschnitten können z.B. Antibiotikaresistenzen kodiert sein (Liebert, Hall et al. 1999).

Plasmide sind ringförmige, extrachromosomale DNA – Ketten, deren genetische Information weitgehend unabhängig von der chromosomalen Steuerung exprimiert wird (Clowes 1972). Sie tragen oft Gene für Virulenzfaktoren oder für Antibiotikaresistenzen (Thomas 1981, Diaz Ricci und Hernandez 2000, Schwarz, Kehrenberg et al. 2002) und können durch Konjugation auf andere Bakterien übertragen werden (Levy und Marshall 2004). Das bedeutet, dass durch die Übertragung einer plasmidkodierte Resistenz von einem Bakterium auf ein anderes, die Empfängerzelle alle Resistenzen des Plasmids übernimmt und auf diese Weise im Therapieverlauf auch andere Bakterienarten Resistenzen übernehmen können (Neu 1992, Schwarz, Kehrenberg et al. 2001).

Folglich ist eine Übertragung von Resistenzgenen zwischen kommensalen Bakterien und pathogenen Erregern möglich (Schwarz, Kehrenberg et al. 2002). Es ist zu berücksichtigen, dass der durch Antibiotika ausgeübte Selektionsdruck auch die Besiedlungsflora als ständiges Reservoir betrifft und nicht nur den jeweils zu eliminierenden Infektionserreger (Witte und Klare 1999).

1.1.3 Resistenzmechanismen

Verschiedene Mechanismen können zu Resistenzen gegenüber Beta – Laktamantibiotika führen (Babic, Hujer et al. 2006).

Hierbei stellt das Vorliegen von Beta – Laktamasen, welche den Betalaktamring der Antibiotika hydrolysieren und die Antibiotika somit enzymatisch inaktivieren, den am weitesten verbreiteten Resistenzmechanismus dar (Falagas und Karageorgopoulos 2009) (siehe Kapitel 2.2).

In Tabelle 2 sind die 4 wichtigsten Resistenzmechanismen gegen Betalaktam – Antibiotika dargestellt.

Tabelle 2: Mechanismen der Bakterien zur Ausbildung von Resistenzen

Mechanismus	Erklärung	Beispiel
Produktion von Beta – Laktamasen	Beta - Laktamasen als Beta - Laktamring spaltende Hydrolasen (Massova und Mobashery 1998, Witte und Mielke 2003) (siehe Punkt 1.2)	Extended – Spektrum – Beta – Laktamasen (ESBL) bei <i>Enterobacteriaceae</i> (Davies 1997) (siehe Punkt 1.3)
Vorliegen von Penicillinbindeproteinen (PBP)	PBP mit geringer Affinität zu Betalaktamantibiotika verhindern deren Wirkung (Witte und Mielke 2003, Babic, Hujer et al. 2006)	Veränderte PBP bei <i>Streptococcus pneumoniae</i> , zusätzliches PBP2a bei <i>Staphylococcus aureus</i> (Chambers 1997, Witte und Mielke 2003)
Fehlen von in der Zytoplasmamembran lokalisierten Proteinen (Außenmembranproteinen) bei gramnegativen Bakterien (Babic, Hujer et al. 2006)	Die in der Zytoplasmamembran lokalisierten Proteine befördern die eingedrungenen Antibiotika wieder aus der Zelle (Witte und Mielke 2003, Babic, Hujer et al. 2006)	Fehlen des Außenmembranproteins für die Aufnahme von Carbapenemen (<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>) (Witte und Mielke 2003)
Störung des aktiven	Efflux-Pumpen sind in der	Spezifische

Transports durch die Zytoplasmamembran der Bakterienzelle (Davies 1997)	Lage, eine Vielzahl von Substraten aus der Zelle zu transportieren (Poole 2004)	Effluxmechanismen (z. B. für Tetrazykline); ABC-Transporter (z.B. für Streptogramin – A - Substanzen); erhöhte Expression unspezifischer Transporter (Davies 1997)
---	---	--

1.2 Beta – Laktamasen

1.2.1 Definition

Beta - Laktamasen sind katalytische Enzyme, die die Betalaktam – Antibiotika inaktivieren, indem sie deren Betalaktam – Ring hydrolysieren (Ghuysen 1994, Handal und Olsen 2000).

In den 1960er Jahren wurden die ersten Beta – Laktamasen in *E. coli* und *K. pneumoniae* identifiziert, welche die Fähigkeit aufwiesen, Penicilline (Ampicillin) und Schmalspektrum - Cephalosporine (Cephalotin) zu hydrolysieren (Paterson und Bonomo 2005). Abraham und Chain (1988) beschreiben in einem Artikel, der vor fast 70 Jahren veröffentlicht wurde, die *E. coli* – Penicillinase.

Beta – Laktamasen stellen den Hauptmechanismus der bakteriellen Resistenz gegenüber den Beta – Laktam - Antibiotika dar (Babic, Hujer et al. 2006, Falagas und Karageorgopoulos 2009, Pfeifer, Ellter et al. 2013).

Die Enzyme kommen intrazellulär vor und werden von Gram-positiven und -negativen Bakterien gebildet (Bush, Jacoby et al. 1995, Livermore 1995). Die genetische Information der Beta – Laktamasen liegt entweder auf dem Bakterienchromosom (chromosomale Beta – Laktamasen) oder kommt auf Plasmiden kodiert vor (plasmidische Beta – Laktamasen) (Theuretzbacher 1998).

Während im Jahr 1998 190 verschiedene klinisch relevante Beta - Laktamasen beschrieben wurden (Theuretzbacher 1998), werden derzeit in der Lahey-Studie (<http://www.lahey.org/Studies> (Stand 23.12.2017, Website zuletzt aktualisiert am 17.11.2017) von über 190 Beta – Laktamasen vom Typ SHV, über 220 vom Typ TEM, über 490 vom Typ OXA und von über 170 Beta – Laktamasen vom Typ CTX – M berichtet. In der Lahey-Studie werden die bekannten und neu entdeckten Beta – Laktamasen aufgelistet, von denen viele ein erweitertes Substratspektrum aufweisen (Pfeifer, Eller et al. 2013) (siehe Punkt 1.3 Extended – Spectrum – Beta – Laktamasen).

1.2.2 Einteilung der Beta – Laktamasen

Es haben sich 2 Klassifizierungssysteme etabliert, welche die zahlreichen Beta - Laktamasen und ihre Eigenschaften in verschiedene Gruppen unterteilen.

1.2.2.1 Einteilung nach Ambler

Das im Jahr 1980 entwickelte Ambler – Schema teilt die Beta - Laktamasen nach ihrer Molekülstruktur in die Klassen A, B, C und D ein und beschreibt hierbei zwei Hauptgruppen von Beta – Laktamasen, die Serin – Beta – Laktamasen und die Metallo – Beta – Laktamasen (siehe Abbildung 2, Abbildung 3 gelb und Tabelle 3). Die häufigsten Enzyme gehören zur Klasse A, C und D der Serin – Beta – Laktamasen, welche eine Serin – Gruppe im aktiven Zentrum des Enzyms besitzen (in Abbildung 2

gelb dargestellt). Die Metallo – Beta – Laktamase weisen im reaktiven Zentrum ein Zinkatom auf (in Abbildung 2 grau dargestellt) und sind in der Klasse B zusammengefasst (Ambler 1980).

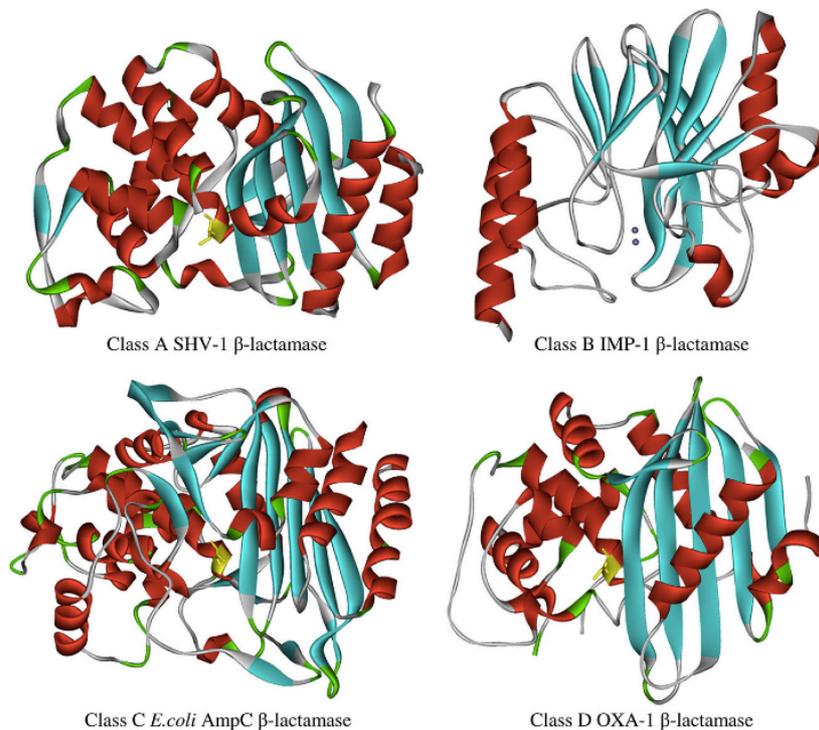


Abbildung 2: Strukturelle Gemeinsamkeiten der Ambler Klassen A, C, und D Serin – Beta – Laktamase (die aktive Serin – Gruppe ist gelb dargestellt); Ambler Klasse B Metallo Beta – Laktamase (die beiden Zn^{2+} Ionen sind grau dargestellt). Abbildung übernommen aus (Drawz und Bonomo 2010).

1.2.2.2 Einteilung nach Bush, Jacoby und Medeiros

Eine andere Klassifizierung der Beta – Laktamase stellt auf der Grundlage der Klassifizierung nach Ambler die im Jahr 1995 erfolgte Einteilung nach Bush, Jacoby und Medeiros (BJM) dar, welche die Beta – Laktamase nach ihrer Funktionalität (Substratprofil und Verhalten gegenüber Clavulansäure (CV) in die Gruppen 1 – 4 einteilt (Bush, Jacoby et al. 1995) (siehe Abbildung 3 blau und Tabelle 3).

Abbildung 3 und Tabelle 3 geben einen Überblick über die Klassifizierungssysteme nach Ambler (Ambler 1980) und nach BJM (Bush 1989a), (Bush, Jacoby et al. 1995).

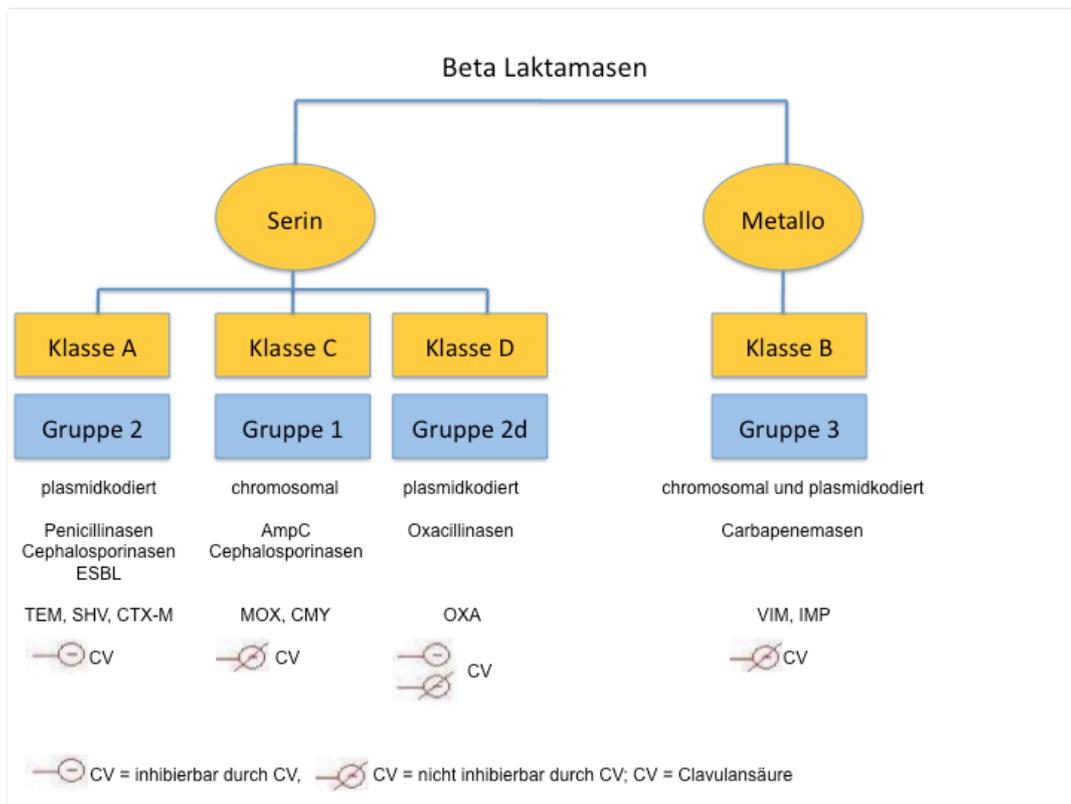


Abbildung 3: Einteilung der Beta – Laktamasen nach Ambler (gelb) und nach BJM (blau)

Tabelle 3: Einteilung der Beta – Laktamase nach Ambler (Ambler 1980) und nach BJM (Bush 1989a), (Bush 1989b), (Bush 1989c), (Bush, Jacoby et al. 1995)

Ambler Klasse	- Molekülstruktur	BMJ - Gruppe	Charakteristische Vertreter	Beta - Laktamase	Inhibierbar durch CV	chromosomal- oder plasmidkodiert	weitere Eigenschaften
A	Serin – Beta - Laktamase	2a	Penicillinase	<i>bla</i> TEM und <i>bla</i> SHV	ja	- plasmidkodiert	- kommen hauptsächlich bei Gram-positiven Bakterien vor -- - siehe Kapitel 1.3 --
		2b	Breitspektrum Beta - Laktamase				
		2be	Extended – Spektrum – Beta – Laktamase (ESBL)				
		2br	Penicillinase		nein		
		2c	Carbapenemase		ja		
		2e	Cephalosporinase				
B	Metallo – Beta - Laktamase	2f	Carbapenemase		schwach	- chromosomal- und plasmidkodiert	- werden durch EDTA gehemmt - hydrolysieren kein Monobactame
		3	Carbapenemase	<i>bla</i> IMP, <i>bla</i> VIM	nein		
C	Serin – Beta - Laktamase	1	AmpC – Beta – Laktamase, Cephalosporinase	<i>bla</i> MOX, <i>bla</i> CMY	nein	- hauptsächlich chromosomal kodiert	- hydrolysieren keine Carbapeneme - in der Regel induzierbar

Ambler Klasse	-	Molekülstruktur	BMJ - Gruppe	Charakteristische Vertreter	Beta - Laktamase	Inhibierbar durch CV	chromosomal- oder plasmidkodiert	weitere Eigenschaften
D		Serin – Beta - Laktamasen	2d	Oxacillinasen	<i>blaOXA</i>	schwach	- plasmidkodiert	- kommen hauptsächlich bei <i>Pseudomonas aeruginosa</i> vor - hydrolysieren Carbenicillin, Cloxacillin und Oxacillin
--		--	4	Penicillinasen, die keinen anderen Gruppen zugeordnet werden können	--	nein	--	--

Abkürzung: CV = Clavulansäure

1.2.3 Wirkungsweise

Die Beta – Laktamasen hydrolysieren durch einen nukleophilen Angriff am Carbonylkohlenstoffatom den Betalaktam – Ring der Betalaktam – Antibiotika (Handal und Olsen 2000).

Im Falle der Serin – Beta – Laktamasen (Klasse A, C und D nach Ambler) führt die Serin - Gruppe im aktiven Zentrum des Enzyms den nukleophilen Angriff auf das Carbonylkohlenstoffatom des Beta – Laktam - Ring aus, im Falle der Metallo – Beta – Laktamasen (Klasse B nach Ambler), führt ein an das Metallatom angelagertes Wassermolekül den nukleophilen Angriff aus (Ambler 1980, Babic, Hujer et al. 2006).

In beiden Fällen entsteht ein Enzym – Substrat – Komplex, welcher in einem nächsten Schritt gespalten wird. Der Beta – Laktam - Ring wird so geöffnet und das Antibiotikum inaktiviert (Ghuysen 1994).

Auf Abbildung 4 ist die hydrolytische Reaktion der Beta – Laktamase dargestellt.

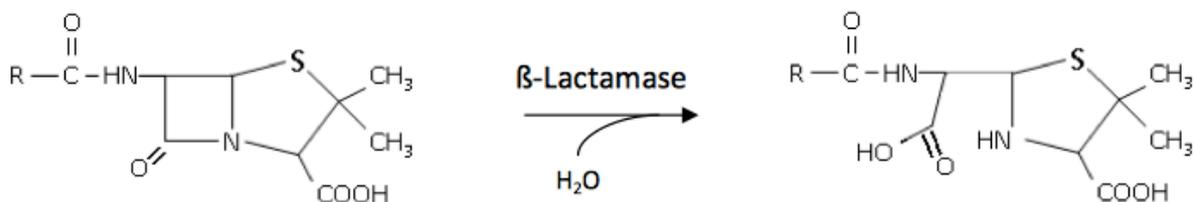


Abbildung 4: hydrolytische Reaktion der Beta – Laktamase. Abbildung übernommen aus (Mutschler, Geisslinger et al. 2008).

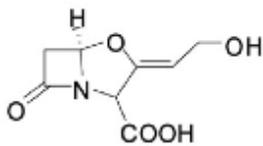
1.2.4 Beta – Laktamase – Inhibitoren

Zur Behandlung von schweren Infektionen, die beispielsweise durch *Enterobacteriaceae* ausgelöst werden, können zusätzlich zu den Betalaktam – Antibiotika die Beta – Laktamase – Inhibitoren Clavulansäure, Tazobactam oder Sulbactam eingesetzt werden (Drawz und Bonomo 2010) (siehe Abbildung 5).

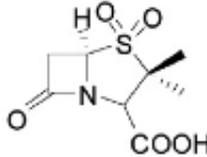
Diese haben eine schwache antibakterielle Wirkung und finden nur in Kombination mit den Betalaktam – Antibiotika klinische Anwendung. Sie verbessern die Wirksamkeit dieser Antibiotika, indem sie dem Hydrolyse - Mechanismus der Beta – Laktamasen entgegen wirken (Helfand, Totir et al. 2003, Padayatti, Helfand et al. 2004, Padayatti, Helfand et al. 2005). Hierbei weisen die Inhibitoren eine hohe Affinität für Beta – Laktamasen auf, binden fest an deren aktives Zentrum und inaktivieren die Enzyme auf diese Weise (Babic, Hujer et al. 2006).

Es besteht ein dringender Bedarf für wirksame Beta – Laktamase – Inhibitoren, da die Prävalenz klinisch relevanter Beta – Laktamasen, die keine Wirkung gegenüber den Inhibitoren zeigen, rasant steigt (Drawz und Bonomo 2010).

1) Clavulansäure



2) Sulbactam



3) Tazobactam

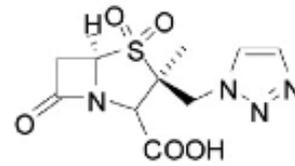


Abbildung 5: Beta – Laktamase – Inhibitoren. Abbildung übernommen aus (Drawz und Bonomo 2010).

1.3 Extended – Spektrum – Beta - Laktamasen

Die Extended – Spektrum - Beta - Laktamasen (ESBL) wurden mit der Einführung der Cephalosporine der 3. Generation in den 1980er Jahren beschrieben (Knothe, Shah et al. 1983, Friese und Rösler 2013) und von Philippon, Arlet, und Lagrange als plasmidkodierte Beta – Laktamasen definiert, welche in der Lage sind, Resistenzen gegenüber einem breiten Spektrum von Beta – Laktamantibiotika inkl. 3. Generationscephalosporinen zu übertragen (Philippon, Arlet et al. 1994). Hierbei werden durch eine zunehmende Anzahl von Punktmutationen (Aminosäureaustausch) verschiedene Varianten der klassischen Breitspektrum - Beta - Laktamasen kodiert, wodurch die Enzyme ihr Substratspektrum erweitern (Livermore 1995) und Penicilline, Cephalosporine der ersten, zweiten, dritten und vierten Generation, sowie Monobaktame hydrolysieren. Sie können durch Clavulansäure, Sulbactam und Tazobactam gehemmt werden (Jacoby 1994, Bradford, Petersen et al. 1999, Paterson und Bonomo 2005). Die Anzahl an ESBL – Varianten, die seit 1983 identifiziert wurden, nimmt ständig zu (Jacoby 1994, Witte und Mielke 2003), wobei Resistenzgene, die sich meist durch horizontalen Gentransfer über mobile genetische Elemente leicht unter Bakterien verbreiten, eine wichtige Rolle spielen (Epidemiologisches Bulletin 13. Juli 2007, Canton, Novais et al. 2008, Reich, Atanassova et al. 2013).

ESBL gehören zu den Serin – Beta – Laktamasen und wurden ursprünglich in der Ambler Klasse A und D und der Gruppe 2be nach Bush, Jacoby und Medeiros klassifiziert (Ambler 1980, Bush, Jacoby et al. 1995, Witte und Mielke 2003), wobei die erweiterte Definition Beta - Laktamasen der Klasse C sowie Carbapenemasen mit einschließt (Witte und Mielke 2003).

Die Anwesenheit von ESBL kommen in verschiedenen Mitgliedern der Enterobakterien - Familie, insbesondere *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) und *Escherichia coli* (*E. coli*) vor (Pitout und Laupland 2008, Friese und Rösler 2013). Sie können jedoch auch in nicht - fermentierenden Gram - negativen Bakterien, wie *Pseudomonas aeruginosa* und *Acinetobacter baumannii* nachgewiesen werden (Jacoby und Munoz-Price 2005).

Das Vorkommen von ESBL hat sich sowohl in der Human-, als auch in der Veterinärmedizin zu einem großen Problem entwickelt (Pfaller und Segreti 2006, Coque, Baquero et al. 2008) (siehe Punkt 1.4 und 1.5) und erfordert, um die weitere Ausbreitung zu verhindern, die rechtzeitige Identifizierung der Gene, sowie das Beachten von Hygienemaßnahmen (Witte und Mielke 2003) (siehe Punkt 5.3).

1.3.1 Epidemiologie von ESBL

Seit Ende der 1980er Jahre liegen Berichte über die epidemische Verbreitung von Resistenzen bei *Enterobacteriaceae* in Krankenhäusern vor (Witte und Mielke 2003), wobei schon Ende der 1980er und in den 1990er Jahren in den USA (Meyer, Urban et al. 1993) und in mehreren europäischen Ländern, wie beispielsweise in Frankreich (Sirot, Sirot et al. 1987), Griechenland (Vatopoulos, Philippon et al. 1990), Polen (Gniadkowski, Schneider et al. 1998) und Ungarn (Szabo, Filetoth et al. 1999) ESBL - positive Bakterien identifiziert werden konnten.

In den späten 1990er Jahren konnte eine Zunahme ambulant erworbener Infektionen, die mit ESBL assoziiert waren und hauptsächlich durch Stämme von *E. coli* ausgelöst wurden, beobachtet werden (Pitout, Nordmann et al. 2005, Tenaillon, Skurnik et al. 2010). Diese Tatsache wurde unter anderem mit dem gleichzeitigen Einsatz der Breitspektrum - Cephalosporine im öffentlichen Bereich und der Verwendung dieser als Generika in Verbindung gebracht (Pitout, Nordmann et al. 2005). Coque, Baquero et al. beschreiben im Jahr 2003 einen schnellen und globalen Anstieg von ESBL - positiven *E. coli*, die eine Resistenz gegenüber Oxyimino - Cephalosporinen aufweisen (Coque, Baquero et al. 2008). Kaase und Kern berichten von einer deutlichen Zunahme von ESBL - positiven *E. coli* in Deutschland seit ungefähr 2006 (Kaase und Kern 2012).

Es gibt nur wenige Studien, welche die Situation der Resistenzen und das Vorkommen von ESBL - positiven *Enterobacteriaceae* systematisch verfolgen. Es ist zudem schwierig, eine gültige Aussage zur Häufigkeit von ESBL - Bildnern in größeren geographischen Regionen zu treffen, da die Inzidenz zwischen den teilnehmenden Studieneinrichtungen auch lokal ganz erheblich variieren kann (Witte und Mielke 2003). Einem Review von Woerther, Burdet et al. aus dem Jahr 2013, in welchem Zahlen zur Trägerschaft in der Bevölkerung mit ESBL - positiven *Enterobacteriaceae* in verschiedenen Teilen der Welt (der WHO Mitgliedstaaten Afrika, Amerika, Europa, Südostasien, Ländern des östlichen Mittelmeers und des Westpazifik) verglichen werden, kann entnommen werden, dass die Trägerschaft mit ESBL - positiven *Enterobacteriaceae* insgesamt gestiegen ist. Es wird jedoch deutlich, dass sich diese nicht überall mit der gleichen Dynamik entwickelt haben. Es lassen sich große intra- und interregionale Unterschiede beobachten. So wird berichtet, dass die Trägerschaft von ESBL - positiven Bakterien in der Bevölkerung vor 2008 in den genannten verschiedenen Teilen der Welt immer unter 10 %, danach jedoch oft höher lag (Woerther, Burdet et al. 2013). So stieg beispielsweise die Trägerschaft von ESBL - positiven Bakterien in Thailand in der Bevölkerung im Jahr 2008 erstmals über 60 % (Sasaki, Hirai et al. 2010). Insgesamt können im westlichen Pazifik, dem östlichen Mittelmeer und in Südostasien die höchsten Trägerschaften mit ESBL - positiven *Enterobacteriaceae* und die auffälligsten steigenden Tendenzen beobachtet werden. In Amerika und Europa liegt die Trägerschaft mit ESBL - positiven *Enterobacteriaceae* weit davon entfernt (Woerther, Burdet et al. 2013).

1.3.2 TEM, SHV, CTX - M, RAHN - 1 und OXA

Die ESBL - Gene werden nach Sequenzhomologie in Gruppen eingeteilt, wobei ESBL in den 1980er und -90er Jahren meist von *Klebsiella spp.* und *Enterobacter spp.* produziert wurden und hierbei ESBL vom Typ TEM und SHV weit verbreitet waren, welche häufig klonale Ausbrüche bei hospitalisierten Patienten verursachten (Kliebe, Nies et al. 1985, Dechamps, Sirot et al. 1991, Falagas und Karageorgopoulos 2008, Falagas und Karageorgopoulos 2009).

Die Bezeichnung TEM stammt von dem Namen Temoniera einer griechischen Patientin, bei der das Enzym erstmals identifiziert werden konnte (Medeiros 1984).

ESBL vom TEM - Typ haben sich weltweit in der gesunden Bevölkerung verbreitet (Shanahan, Wylie et al. 1993, Shanahan, Thomson et al. 1994 a, Shanahan, Thomson et al. 1994 b, Shanahan, Thomson et al. 1995) und kommen hauptsächlich bei Bakterien der Spezies *E. coli* vor (Zeba 2005). Sie sind wahrscheinlich aus den weit verbreiteten, plasmidkodierten TEM – 1 - und TEM – 2 - Enzymen entstanden (Bush, Jacoby et al. 1995), wobei TEM - 1 eine bekannte plasmidkodierte Beta – Laktamase schmalen Spektrums ist (Datta und Kontomichalou 1965). TEM – 3 stellt die erste Beta – Laktamase vom TEM – Typ dar, die eine gesteigerte Aktivität gegenüber Breitspektrum - Cephalosporinen aufwies und erstmalig 1987 beschrieben wurde (Sougakoff, Goussard et al. 1988). Die wichtigen, das Substratspektrum erweiternden Mutationen liegen für TEM in der Position 164 (Medeiros 1997). Weitere Aminosäureaustausche, wie z. B. in Position 104 erhöhen die Interaktion mit der Oxyimino - Seitenkette von Ceftazidim. Die Mutation in Position 237 reduziert hingegen die Interaktion von TEM mit Ceftazidim, erhöht aber die mit Cefotaxim (Knox 1995).

ESBL vom SHV - Typ sind aus SHV – 1 Enzymen entstanden (Jacoby und Medeiros 1991), wobei SHV für Sulphydryl-Variable steht (Zeba 2005). Zunächst wurden diese ESBL - positiven Bakterien vom SHV - Typ in Europa, daraufhin auch in anderen Ländern gefunden (Philippon, Ben Redjeb et al. 1989) und konnten hauptsächlich bei Bakterien der Gattung *Klebsiella spp.* identifiziert werden (Zeba 2005). Stürenburg und Mack beschreiben eine Übertragung der ursprünglich chromosomal - kodierten SHV - 1 in *Klebsiella spp.* plasmid – vermittelt auf andere *Enterobacteriaceae* (Stürenburg und Mack 2003). Die wichtigen, das Substratspektrum erweiternden Mutationen liegen für SHV in der Position 179 und in der Position 238 und führen zu einer Erweiterung der Beta - Laktam - Bindungsstelle (Medeiros 1997).

Die Abkürzung CTX – M steht für Cefotaximase - Munich Beta - Laktamase, wobei sich die Bezeichnung auf die Fähigkeit, Cefotaxim zu hydrolysieren, bezieht (Bauernfeind, Casellas et al. 1992). Es wird angenommen, dass sich die CTX – M - Gene aus Chromosomen von Umweltbakterien mobilisiert haben (Overdevest, Willemsen et al. 2011, Canton, Gonzalez-Alba et al. 2012) und von chromosomal kodierten Beta – Laktamasen der *Kluyvera* – Arten abstammen (Bonnet 2004, Livermore und Hawkey 2005). Für die Beta – Laktamase CTX – M wird eine hydrolytische Aktivität gegenüber Cefotaxim beschrieben, wohingegen für die meisten der TEM und SHV - abgeleiteten ESBL von einer stärkeren hydrolytischen Aktivität gegenüber Ceftazidim und von einer schwächeren hydrolytischen Aktivität gegenüber Cefotaxim berichtet wird (Bauernfeind, Stemplinger et al. 1996). In einem Bericht aus dem Jahr 1992 von Barthelemy, Peduzzi et al. wird zudem hervorgehoben, dass die Aminosäuresequenz der CTX – M – 1 eine nur geringe Ähnlichkeit zu der der TEM - oder SHV – abgeleiteten ESBL aufweist (Barthelemy, Peduzzi et al. 1992).

Heutzutage ersetzen die Beta - Laktamasen vom Typ CTX - M die TEM - und SHV - Enzyme als die vorherrschende Art der ESBL (Livermore und Hawkey 2005, Falagas und Karageorgopoulos 2009), wobei von der Entwicklung einer globalen Pandemie die Rede ist (Woerther, Burdet et al. 2013). Dies kann auf die Ausbreitung von CTX – M - Genen unter den Bakterienspezies durch Plasmide, sowie der klonalen Expansion von epidemischen Stämmen, die diese Gene tragen zurückgeführt werden (Livermore und Hawkey 2005). So konnten bei Untersuchungen CTX - M - Allele für mehr als 90 % der ESBL - produzierenden Stämme bei Individuen der gesunden Bevölkerung gezählt werden (Woerther, Burdet et al. 2013) (siehe Punkt 1.5). Aber auch in Krankenhäusern haben die CTX - M - Enzyme TEM und SHV - abgeleitete ESBL rasch verdrängt (Coque, Baquero et al. 2008) (siehe Punkt 1.4). Das übliche Fehlen von klonaler Verwandtschaft zwischen Stämmen von verschiedenen Trägern legt nahe, dass CTX –

M - Gene überwiegend von genetischen Elementen getragen werden, die zwischen den Stämmen sehr mobil sind. Bemerkenswert ist hierbei, dass die ESBL vom CTX – M - 15 Typ, welche erstmals in Indien im Jahr 2001 identifiziert wurde (Kaase und Kern 2012), heutzutage nahezu weltweit verbreitet ist (Livermore und Hawkey 2005, Kaase und Kern 2012) und in den meisten Regionen am häufigsten vorkommt (Woerther, Burdet et al. 2013). Dieser CTX – M - 15 ESBL - Subtyp wird mit Pandemien in Verbindung gebracht und häufig mit dem *E. coli* Sequenztyp (ST) 131 verbreitet (Livermore und Hawkey 2005, Lau, Kaufmann et al. 2008, Hawkey und Jones 2009). Bei diesem hochvirulenten Stamm werden hauptsächlich ESBL CTX – M – 15 - Gene nachgewiesen (Coque, Novais et al. 2008, Nicolas-Chanoine, Blanco et al. 2008). Es wird berichtet, dass ESBL – bildende *E. coli* ST – 131 20 – 50 % aller ESBL – positiven - *E. coli* als Erreger von Harnwegsinfektionen und von Infektionen der Blutbahn, sowie als Erreger von Infektionen verschiedener Organe beim Menschen ausmachen, wohingegen beim Tier und bei Lebensmitteln CTX – M – 1 - *E. coli* und andere Sequenztypen sehr häufig sind, nur bei 1 – 5 % handelt es sich hier um CTX - M - 15 (Rogers, Sidjabat et al. 2011).

Weitere Faktoren, die zu einer rasanten Verbreitung der CTX - M – Varianten beitragen, stellen unter anderem der Selektionsdruck durch Antibiotika und die mittlerweile hohe menschliche Mobilität dar (Kaase und Kern 2012) (siehe Punkt 1.4 und 1.5).

Die chromosomal kodierte Beta - Laktamase RAHN - 1 wird in die Ambler Klasse A eingeteilt und konnte im Enterobakterium *Rhanella aquatilis* nachgewiesen werden (Izard, Gavini et al. 1979, Bellais, Poirel et al. 2001), welcher ein opportunistischer Krankheitserreger darstellt (Caroff, Chamoux et al. 1998) und eine weite Verbreitung in Wasser und Böden sowie in Lebensmitteln aufweist (Stock, Gruger et al. 2000). Es wird angenommen, dass die Beta – Laktamasen vom Typ RAHN - 1 Progenitoren plasmidkodierter ESBL darstellen. Dies wurde für die plasmid - kodierten Beta - Laktamasen SFO - 1 und CTX – M - 2 beschrieben, die mit den chromosomal kodierten Beta - Laktamasen von *Serratia fonticola* (*S. fonticola*) und *Kluyvera ascorbata* (*K. ascorbata*) assoziiert sind. Die Beta – Laktamase RAHN - 1 zeigte sich zu 76 % identisch zur plasmid – vermittelten Breitspektrum – Beta – Laktamase SFO – 1, die ursprünglich aus *S. fonticola* isoliert werden konnte (Peduzzi, Farzaneh et al. 1997, Matsumoto und Inoue 1999) und zu 73 % bzw. 71 % identisch zu den plasmid - vermittelten Breitspektrum – Beta - Laktamasen CTX – M - 2 und CTX – M - 1 (Barthelemy, Peduzzi et al. 1992, Bauernfeind, Stemplinger et al. 1996). Auch das Resistenzmuster der Beta - Laktamase RAHN – 1 wies starke Ähnlichkeit mit dem der SFO - 1 auf (Peduzzi, Farzaneh et al. 1997). Beim Vergleich der RAHN – 1 - Sequenz mit der von anderen ESBL der Ambler Klasse A, konnten mehrere Aminosäurereste identifiziert werden, die möglicherweise an der Hydrolyse von einem breiten beta-Laktam-Antibiotika-Spektrum beteiligt sind (Matagne, Lamotte-Brasseur et al. 1998). So wurde beispielsweise ein Serin - Rest in Position 237 nachgewiesen, der ebenso bei Beta – Laktamasen der Bakterien *S. fonticola* und *Proteus vulgaris* und bei ESBL vom CTX – M – Typ vorkam (Peduzzi, Reynaud et al. 1994, Tamaki, Nukaga et al. 1994, Peduzzi, Farzaneh et al. 1997, Tzouveleakis, Tzelepi et al. 2000). Das Hydrolyse - Spektrum der Beta – Laktamase RAHN - 1 ist ähnlich dem der CTX – M – Typ - Enzyme, die gegenüber Ceftazidim sensibel sind (Matsukura, Katayama et al. 1996).

Die Bezeichnung der ESBL vom Oxacillinase (OXA) – Typ leitet sich von der Fähigkeit der Enzyme ab, Oxacillin zu spalten (Paterson und Bonomo 2005) und wird nach Ambler in die Klasse D und funktional in die Gruppe 2d nach Bush, Jacoby und Medeiros eingeteilt (Ambler 1980, Bush, Jacoby et al. 1995) (siehe Punkt 1.2.2.1 und 1.2.2.2). Die Beta - Laktamasen vom OXA – Typ wurden unter allen Beta – Laktamasen

mit am frühesten entdeckt (Evans und Amyes 2014). So identifizierten Sykes und Matthew (1976) drei verschiedene Oxacillinasen namens OXA - 1 , OXA - 2 und OXA - 3, welche die Eigenschaft besitzen, Oxacillin und Methicillin zu hydrolysieren. Außerdem zeigen sie nur eine geringe Wirksamkeit gegenüber Cephalosporinen der ersten Generation und sprechen nicht oder nur gering auf Beta - Laktamase - Inhibitoren wie Clavulansäure an (Evans und Amyes 2014). Die meisten der Oxacillinasen konnten im Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* identifiziert werden (Evans und Amyes 2014), wobei in den 1980er Jahren dieser Organismus gut auf das Drittgenerations - Cephalosporin Ceftazidim ansprach. Im Jahr 1991 konnte jedoch bei einem Patienten in der Türkei ein *P. aeruginosa* isoliert werden, welcher multiresistente Eigenschaften, insbesondere eine Resistenz gegenüber Ceftazidim, aufwies (Hall, Livermore et al. 1993). Mit der OXA - 11 wurde schließlich die erste ESBL vom OXA - Typ beschrieben, die durch eine Mutation entsteht, welche die Bindung von Ceftazidim an das aktive Zentrum erhöht (Evans und Amyes 2014). Diese ESBL ist aus OXA - 10 - Typ Enzymen entstanden (Medeiros 1997), wobei neben OXA - 11 weitere ESBL vom OXA - Typ identifiziert werden konnten. Zu nennen sind hier beispielsweise die OXA - 13, OXA - 14 (Danel, Hall et al. 1995), OXA - 16 (Danel, Hall et al. 1998), OXA - 17 (Danel, Hall et al. 1999), OXA - 19 (Mugnier, Casin et al. 1998) und OXA - 28 (Poirel, Girlich et al. 2001). Diese ESBL konnten mit Ausnahme von *P. aeruginosa* -Isolaten kaum in anderen Spezies identifiziert werden und scheinen sich kaum zu verbreiten (Evans und Amyes 2014).

Neben den hier beschriebenen ESBL, welche die Mehrzahl der bekannten ESBL ausmachen, gibt es weitere (Bradford 2001). Zu nennen sind hier beispielsweise die Beta - Laktamasen *Pseudomonas extended resistance* (PER) - 1 (Nordmann, Ronco et al. 1993), PER - 2 (Bauernfeind, Stemplinger et al. 1996), Vietnamese extended - spectrum beta - lactamase (VEB) - 1 (Poirel, Naas et al. 1999) und *Chryseobacterium meningosepticum* (CME) - 1 (Rossolini, Franceschini et al. 1999), welche eine zu 40 bis 50 % identische Aminosäuresequenz aufweisen. Diese Enzyme zeigen alle eine Resistenz gegenüber Oxyimino - Cephalosporinen, hauptsächlich gegenüber Ceftazidim und Aztreonam (Bradford 2001).

1.4 Klinische Bedeutung der ESBL - produzierenden Enterobakterien bei Mensch und Tier

Das Auftreten und die zunehmende Verbreitung von ESBL - produzierenden *Enterobacteriaceae* hat sich zu einem ernst zu nehmenden gesundheitlichen Problem entwickelt. (Egea, Lopez-Cerero et al. 2011). Dies gilt insbesondere für die *Enterobacteriaceae* der Spezies *E. coli* und *K. pneumoniae*, bei welchen eine Resistenz gegen Drittgenerations - Cephalosporinen fast immer auf ESBL zurückzuführen ist (Kaase und Kern 2012).

Diese genannten Erreger sind als natürliche Bewohner der Darmflora bei gesunden Menschen zu finden und stellen eine wichtige Gruppe von fakultativ pathogenen Mikroorganismen dar, die Infektionen verursachen können und ein Reservoir für die weitere Verbreitung von ESBL - positiven *Enterobacteriaceae* in Kliniken oder in Nutztierbeständen darstellen (Friese und Rösler 2013, Blaak, van Hoek et al. 2014).

Auch in der gesunden Bevölkerung steigt die Anzahl der Personen, bei denen ESBL - produzierende Bakterien nachgewiesen werden können (Canton, Novais et al. 2008, Rodriguez-Bano, Lopez-Cerero et al. 2008) (siehe Punkt 1.5). Ob es zu Infektionen durch ESBL - positive *Enterobacteriaceae* kommt, hängt von der Virulenz des Erregers und von Risikofaktoren, wie zum Beispiel dem Immunstatus des Trägers ab (Friese und Rösler 2013).

Bei hospitalisierten Patienten stellen Faktoren wie eine lange Dauer des Krankenhausaufenthaltes, der Aufenthalt auf einer Intensivstation, die Schwere der Grunderkrankung, invasive Maßnahmen wie beispielsweise Verweilkatheter, chirurgische Eingriffe, Organtransplantationen oder eine mechanische Beatmung ein Risiko für das Auftreten ESBL – positiver *Enterobacteriaceae* dar (Jacoby und Munoz-Price 2005, Pfaller und Segreti 2006). Ein weiterer Risikofaktor ist eine Antibiotikatherapie, insbesondere mit Aminopenicillinen, Cephalosporinen und / oder Fluorchinolonen (Rodriguez-Bano, Alcalá et al. 2008).

Bei den extraintestinalen Infektionen, die durch *E. coli* hervorgerufen werden, stehen sogenannte ExPEC (= extraintestinal pathogenic *E. coli*) im Vordergrund. Diese ExPEC werden von den sog. EPEC (enteropathogene *E. coli*) abgegrenzt, da sie Infektionen erst dann verursachen, wenn sie ihr gewohntes Reservoir im Magen – Darm – Trakt verlassen (Paterson und Bonomo 2005). Beim Menschen zeigen sich dann die Krankheitsbilder eines Harnwegsinfekts, intraabdominaler Infektionen und seltener Pneumonien, die auch bakteriämisch und klinisch als schwere Sepsis verlaufen können (Rottier, Ammerlaan et al. 2012). Zu den durch die ExPEC Stämme ausgelösten Infektionen zählen außerdem die neonatale Meningitis und extraintestinale Infektionen, die durch uropathogene *E. coli* ausgelöst werden (Manges und Johnson 2012). In der Tiermedizin kann *E. coli* zu Infektionen des Magen – Darm - Traktes und zu Infektionen der Milchdrüsen führen (Friese und Rösler 2013). Die Zahl der ESBL – positiven *Enterobacteriaceae* nimmt auch im nosokomialen Bereich stetig zu. Hier handelt es sich insbesondere um *Enterobacteriaceae* der Spezies *K. pneumoniae* (Falagas und Karageorgopoulos 2009).

Die Besiedlung mit ESBL – produzierenden Bakterien kann bei Risikopatienten lebensbedrohliche Infektionen zur Folge haben (Pfeifer und Eller 2012). Ein Beispiel hierfür stellt ein nosokomialer Ausbruch mit ESBL – produzierenden *Klebsiella pneumoniae* in der Neonatologie eines Bremer Krankenhauses dar. Hier waren insgesamt sieben Frühgeborenen von schweren Infektionen betroffen, drei der Fälle endeten letal (Tuffs 2011).

Darüber hinaus kam es in Deutschland im Jahr 2011 zu einem lebensmittelbedingten Ausbruch von Shiga - Toxin bildenden enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC), welcher in Europa als einer der folgenschwersten lebensmittelbedingten Ausbrüche der Nachkriegszeit gilt und auf den Verzehr von kontaminierten Bockshornklee - Sprossen zurückgeführt werden konnte (Buchholz, Bernard et al. 2011). Weltweit erkrankten 855 Menschen an einem hämolytisch urämischem Syndrom (HUS) (RKI 2011). Als Ausbruchsstamm konnte ein *bla*CTX – M – 15 tragender *E. coli* identifiziert werden, ein Stamm, der Resistenzen gegenüber einem weiten Spektrum an in der Humanmedizin eingesetzten Antibiotika aufweist (Fischer, Rodriguez et al. 2014). Die Schwere des Krankheitsverlaufs war jedoch nicht vorrangig auf das Vorhandensein von ESBL – positiven *Enterobacteriaceae* zurückzuführen, sondern auf das Vorliegen des Shiga – Toxins. Eine Antibiotikatherapie konnte den Toxin - bedingten Krankheitsverlauf nicht beeinflussen (BfR 2011).

1.4.1 Therapiemöglichkeiten bei ESBL - produzierenden Enterobakterien beim Menschen

Die therapeutischen Behandlungsmöglichkeiten bei Infektionen, die durch ESBL - positive *Enterobacteriaceae* verursacht werden, sind häufig noch durch Co - Resistenzen gegenüber verschiedenen Antibiotika – Klassen wie z.B. die Cephamycine, Fluorchinolone, Aminoglykoside, Tetracycline und Trimethoprim / Sulfamethoxazol zusätzlich beschränkt (Falagas und Karageorgopoulos 2009). Es

muss dadurch immer mehr auf Reserveantibiotika zurückgegriffen werden (Friese und Rösler 2013), wodurch sich weitere Resistenzen bilden können und dadurch schließlich immer weniger Antibiotika wirksam sind (French 2010). Dies birgt wiederum die Gefahr, dass Infektionen unzureichend therapiert werden, was eine erhöhte Sterblichkeit (Schwaber und Carmeli 2007, Rottier, Ammerlaan et al. 2012) und erhöhte Gesundheitskosten verursachen kann (Cosgrove 2006).

Die an den Einzelfall angepasste Auswahl der therapeutischen Behandlungsmöglichkeiten bei Infektionen, die durch ESBL - positive *Enterobacteriaceae* verursacht werden, ist unerlässlich. So trägt die Wahl einer geeigneten Antibiotika - Therapie dazu bei, Antibiotikaresistenzen zu verhindern (Kim, Sohn et al. 2008). Durch die Begrenzung der institutionellen Verwendung von Cephalosporinen der dritten Generation konnte beispielsweise erreicht werden, dass sich die Häufigkeit von ESBL - produzierenden Organismen verringert (Kim, Sohn et al. 2008).

Die Behandlungsstrategien und der Antibiotika - Einsatz sollten zudem überdacht werden, wenn ESBL - Produzenten weit verbreitet sind und / oder wenn der Patient ein hohes Risikoprofil aufweist (Ben-Ami, Rodriguez-Bano et al. 2009, Rodriguez-Bano, Picon et al. 2010). In solchen Situationen sollte der Rat eines Infektiologen oder eines Mikrobiologen eingeholt werden (Kaase und Kern 2012) (siehe Punkt 5.3).

Beim bloßen Nachweis ESBL - positiver Organismen in Urin, Wundabstrichen oder Bronchialsekreten ohne Infektionssymptomatik besteht keine Therapieindikation (Kaase und Kern 2012).

Cephalosporine

Die Meinung zum Einsatz und zur Wirksamkeit von Cephalosporinen gegen ESBL - produzierende Organismen ist gespalten. Bis vor einigen Jahren galt, basierend auf klinischen Erfahrungen und nach den Kriterien von der British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC), dem European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) und dem Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), die Annahme, dass alle ESBL - positiven Bakterien eine Resistenz gegenüber allen Cephalosporinen und Aztreonam aufweisen, unabhängig vom Testergebnis *in vitro*. Mittlerweile nehmen EUCAST und CLSI den Standpunkt ein, dass Cephalosporine als Therapiemöglichkeit in Frage kommen, wenn sich die ESBL - positiven Organismen *in vitro* als sensibel zeigen (Leclercq, Canton et al. 2013). Hierbei ist es z.B. gut möglich, dass Bakterienstämme mit ESBL vom CTX - M Typ *in vitro* noch sensibel gegenüber Ceftazidim sind (MHK $\leq 1 \mu\text{g/ml}$), da dieses Cephalosporin CTX - M - Betalaktamasen nur selten hydrolysiert wird (Kaase und Kern 2012). Es werden weitere Studien zu neuen effektiven Cephalosporin - Inhibitor - Kombinationen gegen ESBL - positive Organismen benötigt. Kommen diese bei schweren Infektionen, die durch ESBL - positive Bakterien verursacht werden, dennoch zum Einsatz, sind sie mit äußerster Vorsicht anzuwenden (Kaase und Kern 2012) und mit Clavulansäure zu kombinieren, da alle Breitspektrum - Cephalosporine die Aktivität in Gegenwart von Clavulansäure verbessern (Pfaller und Segreti 2006, Campbell, Lewis et al. 2012).

Cephamicine

Cephamicine, vor allem Cefoxitin, Cefotetan und Cefmetazol, werden nicht durch herkömmliche, plasmidkodierte Beta - Laktamasen hydrolysiert und bilden somit keine Substrate für die Hydrolyse durch die ESBL - positiven *Enterobacteriaceae* (Witte und Mielke 2003). Das Auftreten von Co - Resistenzen gegen diese Antibiotika - Klassen in ESBL - produzierenden *Enterobacteriaceae* kann jedoch beobachtet werden, was an

dem Verlust von Porinen oder dem gleichzeitigen Vorhandensein von AmpC - Beta - Laktamasen liegen kann (Paterson und Bonomo 2005). Es liegen wenige klinische Daten zum potenziellen Einsatz von Cephamycinen zur Behandlung von ESBL - assoziierten Infektionen vor (Pangon, Bizet et al. 1989, Bradford, Urban et al. 1997, Siu, Lu et al. 1999). Berichten zufolge kann das Auftreten von Resistenzen gegenüber dieser Substanzgruppe während der Therapie beobachtet werden (Paterson und Bonomo 2005, Lee, Chu et al. 2007).

Beta - Laktam / Beta – Laktamase – Inhibitor – Kombinationen

Die klinischen Belege für den Nutzen von Beta - Laktam / Beta – Laktamase – Inhibitor - Kombinationen für die Behandlung von ESBL - assoziierten Infektionen sind begrenzt. Einige Studien weisen bezüglich des Einsatzes von Piperacillin / Tazobactam erfolgreiche Ergebnisse auf (Burgess, Hall et al. 2003, Peterson 2008, Rodriguez-Bano, Navarro et al. 2012). So konnte beispielsweise in einer Studie aus Spanien gezeigt werden, dass die Behandlungsergebnisse von Infektionen durch ESBL – positive *E. coli* durch die Therapie mit Amoxicillin - Clavulansäure und Piperacillin – Tazobactam nicht schlechter waren als die Behandlungsergebnisse durch die Therapie mit Carbapenemen (Rodriguez-Bano, Navarro et al. 2012). Allerdings sind die meisten ESBL in Deutschland, anders als in Spanien, vom Typ CTX – M – 15, wobei das Gen dieser ESBL – Variante oft auf demselben Plasmid liegt wie das Gen einer weiteren Betalaktamase namens OXA – 1. Diese vermittelt Resistenzen gegenüber Piperacillin – Tazobactam. Sollen schwere Infektionen durch ESBL - positive Organismen mit dieser Substanzgruppe therapiert werden, ist also zur Vorsicht zu raten (Kaase und Kern 2012).

Fluorchinolone

In den letzten Jahren hat der Anteil der Mikroorganismen mit Resistenzen gegen Fluorchinolone zugenommen (Pfeifer 2007, Canton, Novais et al. 2008). So weisen ESBL – positive *E. coli* und *K. pneumoniae* gegenüber dieser Substanzklasse eine Sensibilität von nur 20 – 30 % auf (Kaase und Kern 2012). Zur Behandlung von schweren ESBL - assoziierten Infektionen sollten Fluorchinolone deshalb nur bedingt eingesetzt werden (Kim, Woo et al. 2002, Burgess, Hall et al. 2003, Endimiani, Luzzaro et al. 2004, Kang, Kim et al. 2004, Paterson, Ko et al. 2004)

Carbapeneme

Carbapeneme (Ertapenem, Imipenem, Meropenem) zeigen sich effektiv gegenüber ESBL – positiven – Organismen (Hawkey und Livermore 2012) und stellen bei schweren ESBL – assoziierten Infektionen die Therapie der Wahl dar (Pitout und Laupland 2008, Falagas und Karageorgopoulos 2009). Aus der Sorge, dass dies zum Anstieg von Carbapenem - Resistenzen führt und sich Carbapenemase - produzierende *Enterobacteriaceae* weiter ausbreiten, wird jedoch der Einsatz und die Neubewertung von Antibiotika, die in der Vergangenheit nur selten klinisch angewendet wurden, diskutiert (Kaase und Kern 2012, Friese und Rösler 2013).

Im Folgenden werden alternative Therapiemöglichkeiten erläutert, welche möglicherweise eine ebenso effektive Behandlungsmöglichkeit gegen ESBL – positive Mikroorganismen wie die mit Carbapenemen darstellt und durch deren Einsatz der Selektionsdruck auf Carbapeneme minimiert werden kann (Kaase und Kern 2012).

Polymyxine – Colistin

Die Polymyxine, von welchen derzeit die Antibiotika Colistin und Polymyxin B klinische

Anwendung finden, zeigen eine ausgezeichnete antimikrobielle Aktivität gegenüber ESBL – produzierenden Organismen (Gales, Jones et al. 2006). Jedoch liegen nur wenig Berichte über den Einsatz dieser Antibiotika zur klinischen Behandlung von Infektionen vor (Karageorgopoulos und Falagas 2008). Colistin weist starke Nebenwirkungen auf und sollte, auch wenn eine *in vitro* – Empfindlichkeit des Erregers vorliegt, als Monotherapie vermieden werden (Kaase und Kern 2012).

Fosfomycin und Nitrofurantoin

Fosfomycin und Nitrofurantoin weisen eine gute *in vitro* Sensibilität gegenüber ESBL – positiven *E. coli* auf (Falagas, Kanellopoulou et al. 2008, Prasad, Sun et al. 2012), sollten jedoch nur zur Therapie unkomplizierter Harnwegsinfektionen eingesetzt werden (Rodriguez-Bano, Alcalá et al. 2008, Kaase und Kern 2012). In Spanien konnten bei vermehrter Einnahme von Fosfomycin insbesondere bei ESBL vom Typ CTX – M – 15 erhöhte Resistenzraten beobachtet werden (Oteo, Bautista et al. 2010).

Tigecyclin

Tigecyclin ist ein Derivat von Minocyclin und das erste Antibiotikum der Glycylcyclin – Klasse (Falagas, Karageorgopoulos et al. 2009). Wie auch Tetracycline verhindern Tigecycline die Bindung der mit einer Aminosäure beladenen Aminoacyl – transfer – RNA (tRNA) an die jeweilige ribosomale Bindungsstelle und dadurch die Elongation von Polypeptidketten (Chopra und Roberts 2001). Obwohl die ribosomalen Bindungsstellen von Tigecyclinen mit denen von Tetracyclinen identisch sind, scheinen Tigecycline eine andere sterische Konformation einzunehmen als Tetracycline (Bauer, Berens et al. 2004). Dies führt zu einer hohen Bindungsaffinität von Tigecyclin an das Ribosom (Bergeron, Ammirati et al. 1996). Die genannten Eigenschaften von Tigecyclin führen schließlich zu einer hohen antimikrobiellen Aktivität gegenüber aeroben und anaeroben Gram – positiven und Gram - negativen Bakterien, sowie einer hohen antimikrobiellen Aktivität gegenüber ESBL - produzierenden *E. coli* und in geringerem Ausmaß gegenüber ESBL – produzierenden *K. pneumoniae* (Hoban, Bouchillon et al. 2005, Kelesidis, Karageorgopoulos et al. 2008). In einer Metaanalyse, die allerdings nicht speziell Infektionen durch ESBL – positive Organismen betrifft, wird von einer erhöhten Sterblichkeit unter Tigecyclin - Therapie im Vergleich zur Kontrollgruppe berichtet, die je nach Erkrankungsursache die Antibiotika Ampicillin – Clavulansäure ± Vancomycin oder ± Teicoplanin, Ampicillin – Sulbactam ± Vancomycin oder ± Teicoplanin, Ceftriaxon + Metronidazol, Ertapenem ± Vancomycin, Imipenem / Cilastatin ± Vancomycin oder ± Aminoglykoside, Levofloxacin, Linezolid oder Vancomycin + Aztreonam erhielt (Prasad, Sun et al. 2012). Ein Einsatz zur Behandlung von ESBL – assoziierten Infektionen ist deshalb nur dann zu empfehlen, wenn keine Alternativen mehr zur Verfügung stehen (Kaase und Kern 2012). Es sollte außerdem beachtet werden, dass Tigecyclin zur Behandlung von Kindern und schwangeren Frauen nicht empfohlen wird, da für diese eine potentielle Toxizität beschrieben wird (Falagas, Karageorgopoulos et al. 2009).

Cotrimoxazol (Trimethoprim / Sulfamethoxazol)

Das früher noch als Erstbehandlung für die empirische Therapie einer unkomplizierten Zystitis eingesetzte Cotrimoxazol gilt heute aufgrund hoher Resistenzraten und einem damit verbundenen höheren Therapieversagen nur noch als Mittel der 2. Wahl (AWMF-Leitlinien 2010). Laut eines Berichts von Kaase und Kern (2012) sind ESBL - positive *E. coli* und - *K. pneumoniae* gegenüber Cotrimoxazol zu nur 20 - 30 % sensibel. In einer Studie von Tabasi, Asadi Karam et al. (2015) wurden Patienten aus dem Nordiran, die

eine Harnwegsinfektion aufwies, auf das Vorkommen von ESBL – produzierende *Enterobacteriaceae* und das Resistenzprofil der Bakterien untersucht. Hierbei zeigten sich von den ESBL – produzierenden *Enterobacteriaceae* nur 14,3 % gegenüber Cotrimoxazol sensibel (Tabasi, Asadi Karam et al. 2015).

Temocillin

Temocillin ist in Belgien und Großbritannien erhältlich, wird parenteral verabreicht und findet Anwendung zur Behandlung von Harnwegsinfektionen einschließlich Pyelonephritiden. Etwa 75 % der ESBL – positiven *E. coli* und *K. pneumoniae* konnten *in vitro* als sensibel getestet werden (Titelman, Iversen et al. 2011).

Pivmecillinam

Pivmecillinam ist ein Präparat, das in Deutschland nicht zugelassen ist, in Österreich und Skandinavien jedoch zur Therapie von unkomplizierten Harnwegsinfektionen eingesetzt wird. Es zeigt eine zu 90 % *in vitro* Sensibilität gegenüber ESBL - positiven *E. coli* (Prasad, Sun et al. 2012).

1.4.2 Antibiotika – Einsatz in der Veterinärmedizin

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) wies bereits im Jahr 2012 darauf hin, dass der Einsatz von Antibiotika bei gesunden Tieren höher liegt als der Antibiotikaeinsatz bei kranken Menschen (WHO 2012). Pharmakonzerne sind erst seit 2010 verpflichtet, die Mengen an Antibiotika, welche in der Landwirtschaft eingesetzt werden, zu melden (Birkel 2013). Am 24. Februar 2010 wurde auf dieser Grundlage eine Arzneimittelverordnung des Deutschen Institutes für Medizinische Dokumentation und Information (DIMDI) verfasst. Pharmazeutische Unternehmen und Großhändler sind durch diese seit dem Jahr 2011 verpflichtet, die abgegebenen Mengen an Tierarzneimitteln, insbesondere Antibiotika, die sie jährlich an Tierärzte abgeben, an ein zentrales Register zu melden, wobei die Auswertung der Daten durch das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit in Berlin erfolgt (BVL 2015). So wird für das Jahr 2011 angegeben, dass Pharmakonzerne 1706 Tonnen (t) Antibiotika an Tierärzte lieferten (BVL 2016) (siehe Tabelle 4). Hierbei konnten Wallmann, Preuss et al. (2012) in einer Erfassung von Antibiotika - Abgabemengen gemäß DIMDI – AMV festhalten, dass die Antibiotikaabgabe an Tierärzte im Vergleich zum Einsatz in der Humanmedizin doppelt so hoch lag.

Laut Daten des niedersächsischen Landwirtschaftsministeriums im November 2011 wurden in 83 % der Hähnchenmästereien, in 92 % der Betriebe mit Putenaufzucht bzw. – mast, in 77 % der Anlagen für Schweinemast und bei 100 % der Mastbetriebe von Kälbern Antibiotika eingesetzt (LAVES 2011).

Der Einsatz von Antibiotika in der Viehwirtschaft ist dem überproportionalen Anstieg des Fleischverzehrs in den letzten 30 Jahren (Lawrence 2006) und den damit verbundenen Veränderungen der Lebensmittelproduktion, wie dem erhöhten Einsatz antimikrobieller Mittel zur Wachstumsförderung, Infektionsprävention, Futtermittelverwertung und Behandlung geschuldet (Committee on Drug Use in Food Animals 1999, Mesa, Blanc et al. 2006, Overdeest, Willemsen et al. 2011).

So wird die Antibiotikatherapie bei Lebensmittel liefernden Tieren aus Praktikabilität und der Prävention der schnellen Ausbreitung von Krankheiten unter den Tieren als sog. Metaphylaxe oft nicht nur bei den klinisch erkrankten angewendet, sondern oft die gesamte Tierherde über das Futter oder das Trinkwasser vorbeugend mit Antibiotika versorgt (Friese und Rösler 2013, verbraucherzentrale-niedersachsen 2013). Durch einen ungesteuerten Einsatz der Antibiotika wird die Entstehung antibiotikaresistenter

Bakterien gefördert (BVL 2011). So besteht eine Gefahr beispielsweise darin, dass nicht alle Tiere ausreichende Mengen an Antibiotika zu sich nehmen, wenn diese über das Futter oder Trinkwasser verabreicht werden (Hartung und Kietzmann 2012).

Ein Problem der Metaphylaxe stellt in der Praxis eine missbräuchliche prophylaktische Antibiotikatherapie bei gesunden Tieren zur Wachstumsförderung dar (EFSA 2011), wodurch gleichzeitig intensivere Haltungsbedingungen ermöglicht und Hygieneanstrengungen vermindert werden (Blaha und Sundrum 2011). Dies bedeutet einen finanziellen Anreiz und drängt das Tierwohl in den Hintergrund (Blaha und Sundrum 2011).

Auch bei Lebensmittel liefernden Tieren können ESBL – produzierende *Enterobacteriaceae* nachgewiesen werden, wobei unter anderem der Einsatz von Beta – Laktam - Antibiotika eine wichtige Rolle spielt (Grave, Torren-Edo et al. 2010).

Tabelle 4: Abgaben der Antibiotika von pharmazeutischen Unternehmen und Großhändlern an Tierärzte in Deutschland vom Jahr 2011 bis 2015. Tabelle übernommen aus © Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL 2016).

Wirkstoffklasse	Abgegebene Menge [t] 2011	Abgegebene Menge [t] 2012	Abgegebene Menge [t] 2013	Abgegebene Menge [t] 2014	Abgegebene Menge [t] 2015	Differenz [t] 2011 zu 2015
Aminoglykoside	47	40	39	38	25	- 22
Cephalosp., 1. Gen.	2,0	2,0	2,0	2,1	1,9	- 0,1
Cephalosp., 3.Gen.	2,1	2,5	2,3	2,3	2,3	+0,2
Cephalosp. 4. Gen.	1,5	1,5	1,5	1,4	1,3	- 0,2
Fenicole	6,1	5,7	5,2	5,3	5,0	- 1,1
Fluorchinolone	8,2	10,4	12,1	12,3	10,6	+2,8
Folsäureantagonisten	30	26	24	19	10	- 20
Fusidinsäure*						
Ionophore*						
Lincosamide	17	15	17	15	11	-6
Makrolide	173	145	126	109	52	- 121
Nitrofurane*						
Nitroimidazole*						
Penicilline	528	501	473	450	299	- 229
Pleuromutiline	14	18	15	13	11	- 3
Polypeptid-Antibiotika	127	124	125	107	82	- 45
Sulfonamide	185	162	152	121	73	- 112
Tetrazykline	564	566	454	342	221	- 343
Summe	1.706	1.619	1.452	1.238	805	- 901

Scheinbare Ungenauigkeiten oder Abweichungen bei den Mengenangaben sind durch Rundungseffekte bedingt.

*Wahrung des Geschäfts- und Betriebsgeheimnisses, Daten dürfen nicht veröffentlicht werden, da es i. d. R. nur einen Zulassungsinhaber gibt (nach § 6 IFG und § 9 Abs. 1 (3) UIG)

Der Tabelle 4 ist zu entnehmen, dass insgesamt die Menge der abgegebenen Antibiotika vom Jahr 2011 (1706 t) zum Jahr 2015 (805 t) um 53 % gesunken ist und insbesondere die abgegebenen Antibiotika vom Jahr 2014 auf das Jahr 2015 um 35 % zurückgegangen sind.

Im Jahr 2015, wie auch in den Vorjahren, wurden am häufigsten Penicilline (299 t), gefolgt von Tetrazyklinen (221 t) und Polypeptidantibiotika wie Colistin (82 t) an Tierärzte in Deutschland abgegeben, wobei die Abgaben dieser Antibiotika vom Jahr 2011 zum Jahr 2015 jeweils um 43 % (Penicilline), 61 % (Tetrazykline) und 35 % (Polypeptidantibiotika) gesunken sind (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit 2016).

Zwar ist die Abgabemenge der Antibiotikaklassen Fluorchinolone und Cephalosporine der 3. und 4. Generation vergleichsweise gering, jedoch ist festzuhalten, dass im Vergleich der abgegebenen Mengen vom Jahr 2011 zum Jahr 2015 ungefähr gleichbleibende Mengen Cephalosporinen der 3. und 4. Generation abgegeben wurden und die Abgabe von Fluorchinolonen sogar von 8,2 t im Jahr 2011 auf 10,6 t im Jahr 2015, also um 29 % gestiegen ist (Tab. 4, Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit 2016).

Diese Antibiotika werden von der WHO als sogenannte kritische Antibiotika eingestuft, da beide Antibiotikaklassen einen hohen Stellenwert in der Therapie beim Menschen einnehmen und einen häufigen Einsatz in der Humanmedizin finden (Gilbert 2012). Die europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA 2011) warnt vor den hohen Resistenzraten gegen diese Antibiotika. Seit dem Einsatz von Fluorchinolonen in der Tiermedizin wird eine vermehrte Übertragung von resistenten Erregern auf den Menschen beobachtet (EMA 2006). Das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) beschreibt in einer Auswertung der im Jahr 2014 erhobenen Abgabemengendaten für Antibiotika einen möglichen Transfer von antibiotikaresistenten Bakterien und / oder einen Transfer von Resistenzgenen zwischen Mensch und Tier. Es wird auch hier die Befürchtung geäußert, dass die Rate antibiotikaresistenter Bakterien weiter ansteigt und dadurch der Therapieerfolg sowohl in der Human- wie auch in der Tiermedizin gefährdet wird (BVL 2015).

Um die Verbreitung von ESBL – positiven *Enterobacteriaceae* einzudämmen, ist deshalb die Anwendung von Antibiotikarichtlinien in der Tierhaltung und beim Einsatz in anderen Bereichen der Umwelt (Grave, Torren-Edo et al. 2010), sowie ein klarer Rechtsrahmen und eine weitere Optimierung der Hygienebedingungen z.B. in Ställen unabdingbar (Frieße und Rösler 2013) (siehe Punkt 5.3).

1.5 ESBL - Vorkommen außerhalb des Krankenhauses

Die Übertragungswege von resistenten Bakterien zwischen Menschen, Tieren, Lebensmitteln und der Umwelt sind vielfältig und stellen deshalb eine komplexe Problematik dar (Fischer, Rodriguez et al. 2013), auf die im Folgenden näher eingegangen wird. Abbildung 6 gibt einen Überblick möglicher Übertragungswege ESBL – positiver *Enterobacteriaceae*.

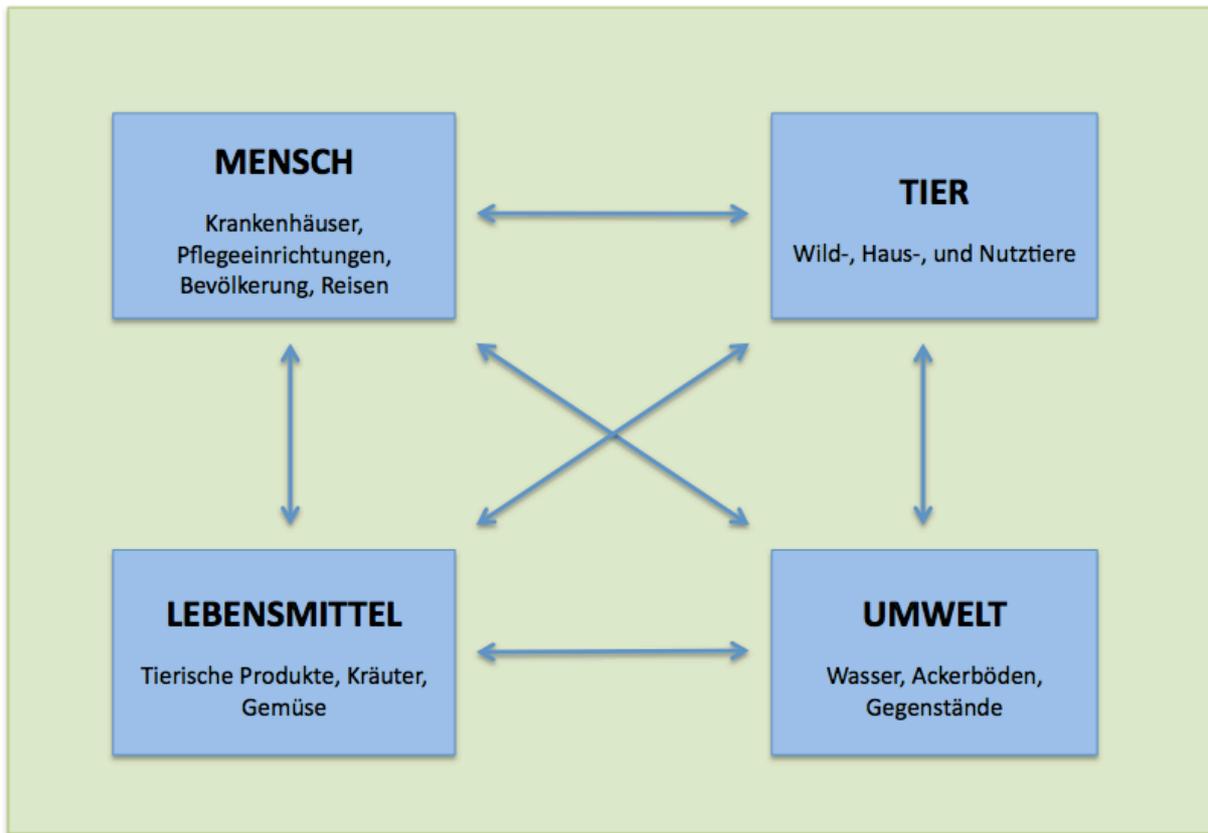


Abbildung 6: Mögliche Übertragungswege ESBL – positiver *Enterobacteriaceae* zwischen Menschen, Tieren, Lebensmitteln, sowie der Umwelt. Abbildung nach (Ewers, Bethe et al. 2012, Friese und Rösler 2013).

1.5.1 Menschen als Reservoir ESBL – positiver Enterobakterien

Wie bereits unter 1.4 „Klinische Bedeutung der ESBL - produzierenden *Enterobacteriaceae* bei Mensch und Tier“ erläutert, stellen der Aufenthalt bzw. die Behandlung in einem Krankenhaus ein Risiko für den Erwerb ESBL – positiver *Enterobacteriaceae* dar.

Doch auch bei Bewohnern von Pflegeheimen und ambulanten Pflegeeinrichtungen wird eine zunehmende Kolonisierung mit ESBL - produzierenden Organismen beobachtet (Nicolas-Chanoine, Jarlier et al. 2008, Arvand, Moser et al. 2013, Gruber, Heudorf et al. 2013). In einer Studie aus Hessen konnten bei 9,6 % von insgesamt 240 Bewohnern aus 11 unterschiedlichen Altenheimen eine Kolonisierung mit ESBL - produzierenden Organismen nachgewiesen werden (Arvand, Moser et al. 2013).

Weitere Studien beschreiben das Vorkommen ESBL – positiver *Enterobacteriaceae* zunehmend auch bei Personen, die keinen vorherigen Kontakt zu Krankenhäuser oder Pflegeeinrichtungen hatten (Mesa, Blanc et al. 2006, Kaase und Kern 2012). So wurde in unterschiedlichen Studien die Prävalenz von fäkalen ESBL - positiven *E. coli* bei gesunden Personen aus unterschiedlichen Bevölkerungsgruppen untersucht (Valverde, Coque et al. 2004, Rodriguez-Bano, Lopez-Cerero et al. 2008, Belmar Campos, Fenner et al. 2014). Dabei lag die Prävalenz in den beiden spanischen Studien bei 3,7 % (Valverde, Coque et al. 2004) bzw. bei 7,4 % (Rodriguez-Bano, Lopez-Cerero et al. 2008), während eine Studie aus Deutschland 4,1 % der gesunden Allgemeinbevölkerung mit ESBL - positiven - *E. coli* besiedelt waren (Belmar Campos, Fenner et al. 2014). Laut Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) ist derzeit nicht

abschätzbar, wie oft der Kontakt oder die Besiedlung mit ESBL - tragenden Bakterien beim gesunden Menschen zu einer Erkrankung führt. Studien berichten jedoch auch in der gesunden Bevölkerung von einer Zunahme von Infektionen durch ESBL – positive *Enterobacteriaceae* (Valverde, Coque et al. 2004, Friedmann, Raveh et al. 2009, Dubois, De Barbeyrac et al. 2010). Es wird zudem angenommen, dass in der gesunden Bevölkerung eine fäkale Trägerschaft mit ESBL – produzierenden Bakterien das wichtigste Reservoir zur Verbreitung dieser Organismen darstellt (Kluytmans, Overdeest et al. 2013).

In den letzten Jahren scheinen interkontinentale Reisen zur weiteren Verbreitung ESBL - positiver Erreger beizutragen (Murray, Mathewson et al. 1990, Johnson, Sannes et al. 2007, Laupland, Church et al. 2008, Hawser, Bouchillon et al. 2009, Tangden, Cars et al. 2010, Vincent, Boerlin et al. 2010, Leverstein-van Hall, Dierikx et al. 2011, Woodford 2011, Lausch, Fursted et al. 2013, Woerther, Burdet et al. 2013). So hat die fäkale Trägerschaft mit ESBL – positiven *Enterobacteriaceae* weltweit deutlich zugenommen (Bertrand und Dowzicky 2012). In einer prospektiven Fall – Kontroll - Studie aus dem Jahr 2008 wurde die Rate der Trägerschaft mit ESBL – positiven *Enterobacteriaceae* bei Personen, die keine Reise gemacht hatten, verglichen mit der von Personen, die zuvor innerhalb Europas gereist waren und mit denjenigen, die von einer Reise aus Indien, Afrika oder Asien zurückgekehrt waren. Die Raten unterschieden sich deutlich und betragen 4 % bei Nicht - Reisenden, 23 % bei innerhalb Europas Reisenden und 46 % bei Personen, die eine Reise nach Indien, Afrika oder Asien gemacht hatten (Peirano, Laupland et al. 2011). Auch Tham, Walder et al. (2012) berichten von drastisch erhöhten Raten mit ESBL – positiven *Enterobacteriaceae* bei Personen, die eine Reise nach Ägypten, Indien, Südostasien, Thailand oder den Mittleren Osten gemacht haben.

Eine immer größer werdende Rolle, welche die Verbreitung multiresistenter Keime weiter begünstigen kann, spielt auch der zunehmende Medizintourismus. Mehr als 450.000 Menschen reisen beispielsweise jedes Jahr aus Europa nach Indien, um sich dort einer Schönheitsoperation zu unterziehen (Walsh und Toleman 2011). Aus Deutschland liegen Berichte über das Vorkommen der Carbapenemase vom Typ Neu - Delhi - Metallo – Beta – Laktamase (NDM – 1) vor, wobei Bakterien, die dieses Enzym bilden, offensichtlich auf dem indischen Subkontinent endemisch sind (RKI 2010). Darüber hinaus führen möglicherweise die Migrationsbewegungen der letzten Jahre ebenfalls zur Verbreitung von multiresistenten Erregern in deutschen Krankenhäusern (RKI 2011).

1.5.2 Tiere als Reservoir ESBL – positiver Enterobakterien

Neben den Menschen stellen auch Tiere ein Reservoir für ESBL – positiver *Enterobacteriaceae* dar. Das Vorkommen dieser Erreger wird in zahlreichen Studien sowohl für wilde Tiere (Costa, Poeta et al. 2006, Friese und Rösler 2013), für Haustiere (Carattoli, Lovari et al. 2005, Ewers, Grobbel et al. 2010, Platell, Cobbold et al. 2011, Friese und Rösler 2013), als auch für Nutztiere (Hasman, Mevius et al. 2005, Liebana, Batchelor et al. 2006, Hunter, Dawson et al. 2010, Leverstein-van Hall, Dierikx et al. 2011) beschrieben.

Bemerkenswert ist der Nachweis von ESBL – positiven *Enterobacteriaceae* bei Wildvögeln, da die Erreger so über große Strecken verbreitet werden können (Costa, Poeta et al. 2006, Bonnedahl, Drobni et al. 2009, Literak, Dolejska et al. 2009, Bonnedahl, Drobni et al. 2010, Simoes, Poirel et al. 2010, Wallensten, Hernandez et al. 2011, Hernandez, Johansson et al. 2013).

Durch den engen Kontakt zum Menschen stellen Haustiere eine mögliche Quelle für ESBL – positive *Enterobacteriaceae* dar (Ewers, Grobbel et al. 2010, Platell, Cobbold et al. 2011): Fast 40 % der Hundebesitzer geben an, ihr Bett mit ihren Haustieren zu teilen, was eine Transmission der Keime deutlich erleichtern dürfte (Walther, Hermes et al. 2012).

Auch bei Nutztieren wird das Vorkommen ESBL – positiver *Enterobacteriaceae* beschrieben, zum Beispiel bei Hühnern (Ewers, Bethe et al. 2012), Rindern (Bradford, Petersen et al. 1999, Madec, Lazizzera et al. 2008, Wittum, Mollenkopf et al. 2010, Horton, Randall et al. 2011, Agerso, Aarestrup et al. 2012, Shin, Jung et al. 2015) und Schweinen (Blanc, Mesa et al. 2006, Cortes, Blanc et al. 2010, Agerso, Aarestrup et al. 2012). In vielen Ländern wird bei Nutztieren eine allgemein steigende Tendenz zum Vorkommen dieser Erreger beobachtet (Hasman, Mevius et al. 2005, Liebana, Batchelor et al. 2006, Hunter, Dawson et al. 2010, Leverstein-van Hall, Dierikx et al. 2011).

1.5.3 Lebensmittel als Reservoir ESBL – positiver Enterobakterien

Die Frage, ob der Verzehr von Lebensmitteln, welche mit ESBL – produzierenden *Enterobacteriaceae* kontaminiert sind, eine Ursache für das Vorkommen ESBL – positiver Isolate beim Menschen darstellen könnte, ist Gegenstand zahlreicher Studien (Doi, Paterson et al. 2010, Jakobsen, Kurbasic et al. 2010, Lopez-Cerero, Egea et al. 2011, Overdevest, Willemsen et al. 2011, Kluytmans, Overdevest et al. 2013, Reich, Atanassova et al. 2013) (siehe Punkt 5.2). Bei diesen wird das Vorkommen von ESBL – produzierenden *Enterobacteriaceae* in Lebensmitteln untersucht, wobei das Vorhandensein von ESBL – produzierenden Bakterien in verschiedenen Ländern hauptsächlich für Hühnerfleisch dokumentiert werden kann (Brinas, Moreno et al. 2003, Paterson und Bonomo 2005, Blanc, Mesa et al. 2006, Machado, Coque et al. 2008, Smet, Martel et al. 2008, Dierikx, van Essen-Zandbergen et al. 2010, Doi, Paterson et al. 2010, Leverstein-van Hall, Dierikx et al. 2011, Overdevest, Willemsen et al. 2011, Kola, Kohler et al. 2012, Dierikx, van der Goot et al. 2013). Doch auch für Rind- und Schweinefleisch (Carmo, Nielsen et al. 2014), sowie für Fisch (Jiang, Tang et al. 2012) wird das Vorkommen ESBL – produzierender *Enterobacteriaceae* beschrieben.

ESBL – positive *Enterobacteriaceae* wurden auch auf Kräutern (Veldman, Kant et al. 2014) und Gemüse (Mesa, Blanc et al. 2006, Ruimy, Brisabois et al. 2010, Hassan, Altalhi et al. 2011, Schwaiger, Helmke et al. 2011, Reuland, Al Naiemi et al. 2014) nachgewiesen (Viswanathan und Kaur 2001). In anderen Studien wird das Vorkommen von ESBL – produzierenden *Enterobacteriaceae* in Salat (Mesa, Blanc et al. 2006, Egea, Lopez-Cerero et al. 2011) oder Sprossen (Buchholz, Bernard et al. 2011) beschrieben.

1.5.4 Umwelt als Reservoir ESBL – positiver Enterobakterien

Ein wichtiges Reservoir für ESBL – positive *Enterobacteriaceae* stellt außerdem die Umwelt dar (Kummerer 2004, Costa, Poeta et al. 2006, Knapp, Dolfing et al. 2010, Manges und Johnson 2012, Woerther, Burdet et al. 2013).

So konnten ESBL – positive *Enterobacteriaceae* in Oberflächengewässern und Seen (Czekalski, Berthold et al. 2012, Zurfluh, Hachler et al. 2013), sowie in vielen Abwassersysteme, wie beispielsweise in Abwasser in Österreich (Reinthal, Feierl et al. 2010), England (Dhanji, Murphy et al. 2011), Portugal (Tacao, Correia et al. 2012), China (Lu, Zhang et al. 2010), Indien (Diwan, Chandran et al. 2012), Brasilien (Chagas, Seki et al. 2011), dem Kongo (De Boeck, Lunguya et al. 2012) und Tschechien

(Dolejska, Frolkova et al. 2011) nachgewiesen werden. Sogar in Meerwasser in Algerien (Alouache, Kada et al. 2012) und der Antarktis (Hernandez, Stedt et al. 2012) wurde das Vorkommen von ESBL – positiven *Enterobacteriaceae* beschrieben. Auch in Kläranlagen wurden diese Erreger identifiziert (Czekalski, Berthold et al. 2012, Zurfluh, Hachler et al. 2013). So ist es auch nicht verwunderlich, dass ESBL - positive Bakterien bei Ratten aus der Berliner Kanalisation nachgewiesen werden konnten (Guenther, Wuttke et al. 2013).

Des Weiteren wird in unterschiedlichen Studien berichtet, dass das Vorkommen von ESBL – produzierenden Erregern in Ackerböden in den letzten Jahren deutlich zugenommen hat (Kummerer 2004, Knapp, Dolfing et al. 2010). Kummerer (2004) weist darauf hin, dass hierbei der Einsatz von Antibiotika in der Viehwirtschaft eine wichtige Rolle spielen könnte. So könnten Antibiotika über den Kot der Tiere ausgeschieden werden, welcher schließlich als Düngemittel auf Ackerböden eingesetzt werden würde (Kummerer 2004).

ESBL – produzierende *Enterobacteriaceae* können sich auch durch den Gebrauch von kontaminierten Gegenständen weiterverbreiten. Dies zeigt eine Studie von Tschudin - Sutter, Frei et al. (2014), in welcher Handschuhe, die in einer Krankenhauskantine zur Zubereitung von rohem Hühnerfleisch getragen wurden, sowie Schneidebrettchen, die in Küchen aus Krankenhäusern und privaten Haushalten zur Zubereitung von rohem Fleisch benutzt wurden, untersucht wurden. Es konnte hierbei nachgewiesen werden, dass Küchenutensilien und Hände schnell mit ESBL - produzierenden *E. coli* kontaminiert werden, nachdem man mit diesen Erregern in Kontakt gekommen ist (Tschudin-Sutter, Frei et al. 2014). Dies bestätigt, dass ESBL – positive *Enterobacteriaceae* auf Gegenstände wie Handschuhe oder Schneidebrettchen übertragen werden und auf diesem Weg zu einer weiteren Verbreitung der Bakterien führen können. Selbst auf Mobiltelefonen von Krankenhauspersonal konnten ESBL – positive *Enterobacteriaceae* gefunden werden (Ustun und Cihangiroglu 2012).

2 Fragestellung

ESBL sind in der Lage, Resistenzen gegenüber einem breiten Spektrum von Beta – Laktamantibiotika inclusive 3. und 4. Generations - Cephalosporine (Ceftazidim, Cefotaxim, Cefepim) sowie Aztreonam zu übertragen (Pfeifer und Eller 2012). Hierbei spielen Resistenzgene, die sich meist durch horizontalen Gentransfer über mobile genetische Elemente leicht unter Bakterien verbreiten, eine wichtige Rolle (Epidemiologisches Bulletin 13. Juli 2007, Canton, Novais et al. 2008, Reich, Atanassova et al. 2013). Durch das Vorliegen solcher Resistenzen wird die Wirksamkeit von Antibiotika, die zur Therapie von Infektionen durch ESBL – positive Keime eingesetzt werden, erheblich eingeschränkt (Falagas und Karageorgopoulos 2009). Das Auftreten von Ausbrüchen, in denen die Behandlungsmöglichkeiten von Personen mit solchen Infektionen nicht möglich bzw. begrenzt sind, wird beschrieben (RKI 2011). In einem Bericht von Kaase und Kern (2012) wird außerdem davon ausgegangen, dass die klinische Entwicklung neuer Antibiotika gegen Gram - negative Bakterien noch Jahre dauern wird und zudem unsicher ist. Demzufolge hätte die Prävention multiresistenter Gram – negativer Bakterien einen hohen Stellenwert (Kaase und Kern 2012), wobei unter anderem der ungesteuerte Einsatz von Beta – Laktam - Antibiotika in der Human- (Levy und Marshall 2004) und Veterinärmedizin (Verbraucherzentrale Niedersachsen 2013) eine wichtige Rolle spielt.

Wie bedeutend der Beitrag von Lebensmitteln tierischen Ursprungs, Nutztieren sowie Nutztierbeständen in der Landwirtschaft für die ESBL - Problematik bei Erkrankungen des Menschen ist, kann laut BfR (2012) anhand der bisher vorliegenden Daten nicht abgeschätzt werden. Aus den Ergebnissen unterschiedlicher Studien lässt sich jedoch ableiten, dass ein Gesundheitsrisiko für den Menschen von ESBL - bildenden Bakterien aus der Tierhaltung und aus tierischen Lebensmitteln ausgehen kann (Leverstein-van Hall, Dierikx et al. 2011).

In anderen Studien wurde gezeigt, dass auch Vegetarier eine Besiedlung mit multiresistenten Bakterien aufweisen (Guinee, Ugueto et al. 1970, Elder, Roy et al. 1993, Sannes, Belongia et al. 2008, Koniger, Gastmeier et al. 2014). Dies lässt darauf schließen, dass auch Lebensmittel nicht – tierischen Ursprungs ein Reservoir ESBL – produzierender *Enterobacteriaceae* darstellen können. So wird auch in vegetarischen Lebensmitteln wie beispielsweise Gemüse das Vorkommen ESBL – positiver *Enterobacteriaceae* beschrieben (Reuland, Al Naiemi et al. 2014).

In der vorliegenden Arbeit wurden zwischen Oktober 2012 und Juli 2014 am Institut für Hygiene und Umweltmedizin der Charité - Universitätsmedizin in Berlin verschiedene tierische und vegetarische Lebensmittelproben auf das Vorkommen ESBL – positiver *Enterobacteriaceae* untersucht:

Neben Lachs und Tofu wurde Gemüse, das roh verzehrt werden kann, auf ESBL – produzierende *Enterobacteriaceae* untersucht, da unterschiedliche Studien belegen konnten, dass Vegetarier eine höhere Rate der Trägerschaft mit ESBL – positiven *Enterobacteriaceae* aufweisen als Fleischesser (Guinee, Ugueto et al. 1970, Elder, Roy et al. 1993, Sannes, Belongia et al. 2008).

Sprossen wurden untersucht, da nachgewiesen werden konnte, dass der Lebensmittelausbruch durch Shiga - Toxin bildende enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) in Deutschland im Jahr 2011 durch den Verzehr von Bockshornklee – Sprossen bedingt war (BfR 2011). Als Ausbruchsstamm konnte ein *bla*CTX – M – 15

tragender ESBL - produzierender *E. coli* identifiziert werden (Buchholz, Bernard et al. 2011, Fischer, Rodriguez et al. 2014) (siehe Punkt 1.4).

Radieschen, Zwiebeln und Frühlingszwiebeln wurden untersucht, da in unterschiedlichen Studien berichtet wurde, dass das Vorkommen von ESBL – produzierenden Keimen in Ackerböden in den letzten Jahren deutlich zugenommen hat (Kummerer 2004, Knapp, Dolfing et al. 2010) und das Ackergemüse durch die Kontaminierung des landwirtschaftlichen Umfelds mit ESBL – produzierenden *Enterobacteriaceae* kontaminiert sein könnte (Blaak, van Hoek et al. 2014).

Geflügel-, Rind- und Schweinefleisch wurden untersucht, da in unterschiedlichen Studien eine Kontaminierung mit ESBL – produzierenden *Enterobacteriaceae* bei Lebensmittel tierischen Ursprungs (Doi, Paterson et al. 2010, Leverstein-van Hall, Dierikx et al. 2011, Overdevest, Willemsen et al. 2011, Egea, Lopez-Cerero et al. 2012, Kola, Kohler et al. 2012), sowie eine Zunahme der durch ESBL verursachten Cephalosporin – Resistenzen in Dänemark, Deutschland, Frankreich, den Niederlanden und Spanien beschrieben wird (Canton, Novais et al. 2008, Carattoli 2008, Coque, Baquero et al. 2008, Egea, Lopez-Cerero et al. 2012).

Dem schließt sich die Frage an, ob es in der Küche beim Umgang mit Lebensmitteln, die mit ESBL - positiven Erregern kontaminiert sind, zur Übertragung auf Küchenutensilien und andere Lebensmittel kommen kann (da über diesen Weg auch eine Übertragung der ESBL - positiven Erreger auf den Konsumenten möglich sein könnte).

Schließlich wird anhand unterschiedlicher Studien die Frage diskutiert, ob über den Verzehr von Lebensmitteln, bei welchen das Vorkommen ESBL – positiver Erreger bestätigt werden kann, auch zu Infektionen des Menschen führen können und mit welchen Präventionsmaßnahmen man die Verbreitung von ESBL eindämmen kann.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Art und Umfang der Lebensmittelproben

Alle Lebensmittelproben wurden zwischen Oktober 2012 und Juli 2014 in Berlin eingekauft. Von jedem Lebensmittel wurden mindestens 10 Proben pro Händler bei jeweils 4 - 5 verschiedenen Lebensmittelhandlungen bzw. -märkten erworben, so dass von jeder Lebensmittelart insgesamt mindestens 50 Proben zur Verfügung standen.

Die bei demselben Händler erworbenen Proben mussten aus mindestens zwei verschiedenen Herstellungschargen stammen. Bei Lebensmitteln, bei denen keine Herstellungschargen angegeben waren, mussten die Proben bei mindestens zwei verschiedenen Einkäufen erworben werden.

Genauere Angaben zu den Lebensmittelproben können den Tabellen 5 - 14 entnommen werden.

Tabelle 5: Salatgurken

Proben-nr.	Kaufort	Kaufdatum	MHD	Produktbezeichnung	Vertrieb	Herkunft	n
1.1 - 1.5	Bio Company	26.10.12	k.A.	k.A.	k.A.	Malta	5
1.6-1.10	Bio Company	29.10.12	k.A.	k.A.	k.A.	Malta	5
2.1-2.5	Kaisers	03.11.12	k.A.	k.A.	k.A.	Niederlande	5
2.6-2.10	Kaisers	06.11.12	k.A.	k.A.	k.A.	Niederlande	5
3.1-3.5	Netto	10.11.12	k.A.	k.A.	k.A.	Spanien	5
3.6-3.10	Netto	12.11.12	k.A.	k.A.	k.A.	Spanien	5
4.1-4.4	Chamisso-markt	17.11.12	k.A.	k.A.	k.A.	Niederlande	4
4.5-4.7	Markt am Maibachufer	16.11.12	k.A.	k.A.	k.A.	Spanien	3
4.8-4.10	Markt in der Marheinekenhalle	15.11.12	k.A.	k.A.	k.A.	Spanien	3
5.1-5.5	Satici	08.12.12	k.A.	k.A.	k.A.	Spanien	5
5.6-5.10	Satici	11.12.12	k.A.	k.A.	k.A.	Spanien	5

k.A.: keine Angabe

Tabelle 6: Lachs (geräuchert, ungewürzt, aus Aquakultur)

Proben- nr.	Kaufort	Kauf- datum	MHD	Produktbe- zeichnung	Vertrieb	Herkunft	n
1.1-1.3	Kaisers	19.10.12	28.11.12	Delifish Räucher- lachs Salmon Salar	Polar- meer- Deli- katessen GmbH, Herne	Norwegen	3
1.4	Kaisers	19.10.12	28.11.12	Starfish Räucher- lachs 4*	Polar- meer- Deli- katessen GmbH, Herne	Norwegen	1
1.5-1.6	Kaisers	19.10.12	21.11.12	Starfish Räucher- lachs 4*	Polar- meer- Deli- katessen GmbH, Herne	Norwegen	2
1.7-1.8	Kaisers	19.10.12	29.11.12	Bio- Räucher- lachs Norfisk Deli- katessen	Norfisk Berlin GmbH, Berlin	Norwegen	2
1.9-1.10	Kaisers	19.10.12	03.12.12	Küsten- gold Wildlachs Premium Qualität	Küsten- gold Handels- gesell- schaft mbH, Leer	Pazifischer Ozean, Nordost- pazifik, Alaska	2
2.1-2.2	Netto	21.11.12	26.11.12	Suempol Premium- qualität	Suempol Deutsch- land GmbH, Wismar	Norwegen	2
2.3-2.5	Netto	21.11.12	28.11.12	Suempol Premium- qualität	Suempol Deutsch- land GmbH, Wismar	Norwegen	3
2.6-2.10	Netto	27.11.12	03.12.12	Suempol Premium-	Suempol Deutsch-	Norwegen	5

Proben-nr.	Kaufort	Kaufdatum	MHD	Produktbezeichnung	Vertrieb	Herkunft	n
				qualität	land GmbH, Wismar		
3.1-3.5	Bio Company	21.11.12	29.11.12	Irischer Atlantik-Lachs	ISANA GmbH & Co, Eresing / Ammersee	Irische Atlantik-küste	5
3.6-3.9	Bio Company	27.11.12	06.12.12	Irischer Atlantik-Lachs	ISANA GmbH & Co, Eresing / Ammersee	Irische Atlantik-küste	4
3.10	Bio Company	27.11.12	01.12.12	Irischer Atlantik-Lachs	ISANA GmbH & Co, Eresing / Ammersee	Irische Atlantik-küste	1
4.1-4.3	Frische-theke Fischfeinkost Dogan	28.11.12	k.A.	Lachsfilet	k.A.	Norwegen	3
4.4-4.5	Frische-theke Fischfeinkost Dogan	28.11.12	k.A.	Bio Lachsfilet	k.A.	Schottland	2
4.6-4.7	Frische-theke Fischfeinkost Dogan	11.12.12	k.A.	Lachsfilet	k.A.	Norwegen	2
4.8-4.10	Frische-theke Fischfeinkost Dogan	11.12.12	k.A.	Bio Lachsfilet	k.A.	Schottland	3
5.1-5.2	Kaisers	06.12.12	12.12.12	Starfish Räucherlachs 4*	Polar-meer Deli-	Norwegen	2

Proben-nr.	Kaufort	Kauf-datum	MHD	Produktbe-zeichnung	Vertrieb	Herkunft	n
					katessen GmbH, Herne		
5.3-5.4	Kaisers	06.12.12	16.12.12	Delifish Räucherlachs Salmon Salar	Pola-meer Deli-katessen GmbH, Herne	Norwegen	2
5.5-5.7	Kaisers	06.12.12	12.12.12	Bio-Räucherlachs Norfisk Deli-katessen	Norfisk Berlin GmbH, Berlin	Norwegen	3
5.8	Kaisers	06.12.12	14.12.12	Küsten-gold Wildlachs Premium Qualität	Küsten-gold Handels-gesell-schaft mbH, Leer	Pazifischer Ozean, Nordost-pazifik, Alaska	1
5.9-5.10	Kaisers	06.12.12	16.12.12	Küsten-gold Wildlachs Premium Qualität	Küsten-gold Handels-gesell-schaft mbH, Leer	Pazifischer Ozean, Nordost-pazifik, Alaska	2

Tabelle 7: Sprossengemüse

Proben-nr.	Kaufort	Kauf-datum	MHD	Produktbe-zeichnung	Vertrieb	Herkunft	n
1.1-1.4	Rewe	28.11.12	02.12.12	Kicher-erb-sprossen, Deiters + Florin So gut! Frische Sprossen & Keimlinge aus	Deiters & Florin GbR, Hamburg	Hamburg	4

Proben- nr.	Kaufort	Kauf- datum	MHD	Produktbe- zeichnung	Vertrieb	Herkunft	n
				Hamburg Vierlande Pfannen Trio Sprossen- Mix			
1.5-1.8	Rewe	28.11.12	02.12.12	Adzuki- bohnen- sprossen, Deiters + Florin So gut! Frische Sprossen & Keimlinge aus Hamburg Vierlande Pfannen Trio Sprossen- Mix	Deiters & Florin GbR, Hamburg	Hamburg	4
1.9-1.12	Rewe	28.11.12	02.12.12	Grüne Erbsen- sprossen, Deiters + Florin So gut! Frische Sprossen & Keimlinge aus Hamburg Vierlande Pfannen Trio Sprossen- Mix	Deiters & Florin GbR, Hamburg	Hamburg	4
1.13- 1.18	Rewe	28.11.12	30.11.12	Mungo- bohn- keimlinge, Deiters + Florin So gut!	Deiters & Florin GbR, Hamburg	Hamburg	6

Proben- nr.	Kaufort	Kauf- datum	MHD	Produktbe- zeichnung	Vertrieb	Herkunft	n
				Frische Sprossen & Keimlinge aus Hamburg Vierlande Pfannen Trio Sprossen- Mix			
1.19- 1.21	Rewe	28.11.12	30.11.12	Rote Rettich- sprossen, Deiters + Florin So gut! Frische Sprossen & Keimlinge aus Hamburg Vierlande Pfannen Trio Sprossen- Mix	Deiters & Florin GbR, Hamburg	Hamburg	3
1.22- 1.24	Rewe	28.11.12	30.11.12	Radies- chen- sprossen, Deiters + Florin So gut! Frische Sprossen & Keimlinge aus Hamburg Vierlande Pfannen Trio Sprossen- Mix	Deiters & Florin GbR, Hamburg	Hamburg	3
2.1-2.3	Kaisers	30.11.12	07.12.12	Alfalfa-	Sprossenm	Berlin	3

Proben-nr.	Kaufort	Kauf-datum	MHD	Produktbe-zeichnung	Vertrieb	Herkunft	n
				sprossen / Luzerne	anufaktur GbR, Berlin		
2.4-2.5	Kaisers	30.11.12	07.12.12	Alfalfa- + Radies- chen- sprossen, Milde Mischung	Sprossen- manufaktur GbR, Berlin	Berlin	2
2.6-2.7	Kaisers	11.12.12	14.12.12	Alfalfa- + Radies- chen- sprossen, Milde Mischung	Sprossen- manufaktur GbR, Berlin	Berlin	2
2.8-2.10	Kaisers	11.12.12	14.12.12	Alfalfa- sprossen / Luzerne	Sprossen- manufaktur GbR, Berlin	Berlin	3
3.1-3.4	Go Asia	31.05.13	k.A.	Mungo- bohnens- sprossen	k.A.	k.A.	4
3.5-3.8	Go Asia	03.06.13	k.A.	Mungo- bohnens- sprossen	k.A.	k.A.	4
4.1-4.3	Bio Com- pany	17.08.13	25.08.13	Alfalfa- sprossen / Luzerne	Sprossen- manufaktur GbR, Berlin	Berlin	3
4.4	Bio Com- pany	17.08.13	23.08.13	Alfalfa- sprossen / Luzerne	Sprossen- manufaktur GbR, Berlin	Berlin	1
4.5	Bio Com- pany	17.08.13	23.08.13	Alfalfa- + Radies- chen- sprossen, Milde Mischung	Sprossen- manufaktur GbR	Berlin	1
4.6	Bio Com- pany	17.08.13	24.08.13	Luzerne-, Linsen-, Rettich-, Senf- sprossen,	Sprossen- manufaktur GbR	Berlin	1

Proben-nr.	Kaufort	Kauf-datum	MHD	Produktbe-zeichnung	Vertrieb	Herkunft	n
				Friedrichs-hainer Bunte			
4.7-4.8	Bio Com-pany	17.08.13	25.08.13	Mungo-bohnen-, Linsen-, Radies-chen-sprossen, Gourmet-Mischung	Sprossen-manufaktur GbR	Berlin	2

Tabelle 8: Tofu (abgepackt, ungewürzt)

Proben-nr.	Kaufort	Kauf-datum	MHD	Produktbe-zeichnung	Vertrieb	Herkunft	n
1.1-1.5	Vinh Loi	30.11.12	05.01.13	Tofu natur	Three Coconut Tree, Hamburg	Hamburg	5
1.6-1.8	Vinh Loi	30.11.12	07.12.12	Unicurd Yakko Tofu	Unicurd Food Company, Singapore	Singapore	3
1.9-1.10	Vinh Loi	30.11.12	k.A.	Satono Yuki Tofu	JA! Vertrieb durch JFC Deutschland GmbH, Düsseldorf	Japan	2
2.1-2.2	Kaisers	30.11.12	31.01.13	Bio Tofu Soja So Lecker	Soja Food GmbH, Rietberg	Rietberg	2
2.3-2.5	Kaisers	30.11.12	05.02.13	Bio Tofu Soja So Lecker	Soja Food GmbH, Rietberg	Rietberg	3
2.6-2.10	Kaisers	04.12.12	05.02.13	Bio Tofu Soja So Lecker	Soja Food GmbH, Rietberg	Rietberg	5
3.1-3.3	Bio Company	05.12.12	11.01.13	Tofu 100% Bio & Vegan	Taifun Life Food GmbH, Freiburg	Freiburg	3

Proben-nr.	Kaufort	Kauf-datum	MHD	Produktbe-zeichnung	Vertrieb	Herkunft	n
3.4-3.6	Bio Company	05.12.12	29.12.12	Tofu 100% Bio & Vegan	Taifun Life Food GmbH, Freiburg	Freiburg	3
3.7-3.10	Bio Company	05.12.12	13.01.13	Demeter Seidentofu Taifun	Taifun Life Food GmbH, Freiburg	Freiburg	4
4.1-4.3	Netto	05.12.12	09.02.13	BioBio Tofu Natur schnittfest und zart	Netto Marken Discount AG & Co, Maxhütte-Haidhof	Deutschland	3
4.4-4.10	Netto	11.12.12	12.04.13	BioBio Tofu Natur schnittfest und zart	Netto Marken Discount AG & Co, Maxhütte-Haidhof	Deutschland	7
5.1-5.3	Hit	03.06.13	02.07.13	Tofu natur aus Soja-bohnen aus Österreich	Alnatura GmbH, Bickenbach	Deutschland	3
5.4-5.10	Hit	06.06.13	08.07.13	Tofu natur aus Soja-bohnen aus Österreich	Alnatura GmbH, Bickenbach	Deutschland	7

Tabelle 9: Radieschen (im Bund)

Proben-nr.	Kaufort	Kauf-datum	MHD	Produktbe-zeichnung	Vertrieb	Herkunft	n
1.1-1.5	Bio Company	05.08.13	k.A.	k.A.	k.A.	Aus der Region	5
1.6-1.10	Bio Company	06.08.13	k.A.	k.A.	k.A.	Aus der Region	5
2.1-2.5	Kaisers	17.08.13	k.A.	k.A.	k.A.	Deutschland	5
2.6-2.10	Kaisers	19.08.13	k.A.	k.A.	k.A.	Deutschland	5
3.1-3.5	Satici	17.08.13	k.A.	k.A.	k.A.	Deutschland	5

Proben-nr.	Kaufort	Kauf-datum	MHD	Produktbe-zeichnung	Vertrieb	Herkunft	n
3.6-3.10	Satici	19.08.13	k.A.	k.A.	k.A.	Deutschland	5
4.1-4.5	Markt in der Marheinekenhalle	17.08.13	k.A.	k.A.	k.A.	Deutschland	5
4.6-4.10	Markt in der Marheinekenhalle	19.08.13	k.A.	k.A.	k.A.	Deutschland	5
5.1-5.5	Netto	17.08.13	k.A.	k.A.	k.A.	Deutschland	5
5.6-5.10	Netto	19.08.13	k.A.	k.A.	k.A.	Deutschland	5

Tabelle 10: Zwiebeln

Proben-nr.	Kaufort	Kauf-datum	MHD	Produktbe-zeichnung	Vertrieb	Herkunft	n
1.1-1.5	Bio Company	07.08.13	k.A.	k.A.	k.A.	Aus der Region	5
1.6-1.10	Bio Company	10.08.13	k.A.	k.A.	k.A.	Aus der Region	5
2.1-2.5	Kaisers	07.08.13	k.A.	k.A.	k.A.	Neuseeland	5
2.6-2.10	Kaisers	10.08.13	k.A.	k.A.	k.A.	Neuseeland	5
3.1-3.5	Satici	07.08.13	k.A.	k.A.	k.A.	Aus der Region	5
3.6-3.10	Satici	10.08.13	k.A.	k.A.	k.A.	Aus der Region	5
4.1-4.6	Markt in der Marheinekenhalle	12.08.13	k.A.	k.A.	k.A.	Deutschland	5
4.6-4.10	Markt in der Marheinekenhalle	14.08.13	k.A.	k.A.	k.A.	Deutschland	5
5.1-5.5	Rewe	12.08.13	k.A.	k.A.	k.A.	Deutschland	5
5.6-5.10	Rewe	14.08.13	k.A.	k.A.	k.A.	Deutschland	5

Tabelle 11: Frühlingszwiebeln (im Bund)

Proben-nr.	Kaufort	Kauf-datum	MHD	Produktbe-zeichnung	Vertrieb	Herkunft	n
1.1-1.5	Bio Company	07.08.13	k.A.	k.A.	k.A.	Aus der Region	5
1.6-1.10	Bio Company	10.08.13	k.A.	k.A.	k.A.	Aus der Region	5
2.1-2.5	Kaisers	07.08.13	k.A.	k.A.	k.A.	Deutschland	5
2.6-2.10	Kaisers	10.08.13	k.A.	k.A.	k.A.	Deutschland	5
3.1-3.5	Satici	07.08.13	k.A.	k.A.	k.A.	Deutschland	5
3.6-3.10	Satici	10.08.13	k.A.	k.A.	k.A.	Deutschland	5
4.1-4.6	Markt in der Marheinekenhalle	12.08.13	k.A.	k.A.	k.A.	Deutschland	5
4.6-4.10	Markt in der Marheinekenhalle	14.08.13	k.A.	k.A.	k.A.	Deutschland	5
5.1-5.5	Rewe	12.08.13	k.A.	k.A.	k.A.	Deutschland	5
5.6-5.10	Rewe	14.08.13	k.A.	k.A.	k.A.	Deutschland	5

Tabelle 12: Hähnchenbrustfilet

Proben-nr.	Kaufort	Kauf-datum	MHD	Produktbe-zeichnung	Vertrieb	Herkunft	n
1.1-1.3	Netto	13.04.13	18.04.13	Hähnchenbrustfilet Heidegold Frisch-geflügel	Netto Marken Discount AG & Co, Maxhütte - Haidhof	Märkische Geflügelhof - Spezialitäten GmbH & Co. KG (Wiesenhof) Königs Wusterhausen, Niederlehme	3
1.4-1.5	Netto	13.04.13	19.04.13	Hähnchenbrustfilet Heidegold Frisch-geflügel	Netto Marken Discount AG & Co, Maxhütte - Haidhof	Märkische Geflügelhof - Spezialitäten GmbH & Co. KG (Wiesenhof) Königs Wusterhausen,	

Proben-nr.	Kaufort	Kauf-datum	MHD	Produktbe-zeichnung	Vertrieb	Herkunft	n
						Niederlehme	
1.6-1.8	Netto	15.04.13	19.04.13	Hähnchen-brustfilet Heidegold Frisch-geflügel	Netto Marken Discount AG & Co, Maxhütte - Haidhof	Märkische Geflügelhof - Spezialitäten GmbH & Co. KG (Wiesenhof) Königs Wusterhausen, Niederlehme	3
1.9-1.10	Netto	15.04.13	20.04.13	Hähnchen-brustfilet Heidegold Frisch-geflügel	Netto Marken Discount AG & Co, Maxhütte - Haidhof	Märkische Geflügelhof - Spezialitäten GmbH & Co. KG (Wiesenhof) Königs Wusterhausen, Niederlehme	2
2.1-2.5	Aldi	15.04.13	22.04.13	Hähnchen-brustfilet	GEKA frisch + frost Handels GmbH & Co. KG, Visbek	Märkische Geflügelhof - Spezialitäten GmbH & Co. KG (Wiesenhof) Königs Wusterhausen, Niederlehme	5
2.6	Aldi	22.04.13	26.04.13	Hähnchen-brustfilet	GEKA frisch + frost Handels GmbH & Co. KG, Visbek	Märkische Geflügelhof - Spezialitäten GmbH & Co. KG (Wiesenhof) Königs Wusterhausen, Niederlehme	1
2.7-2.8	Aldi	22.04.13	27.04.13	Hähnchen-brustfilet	GEKA frisch + frost Handels GmbH & Co. KG, Visbek	Märkische Geflügelhof - Spezialitäten GmbH & Co. KG (Wiesenhof) Königs Wusterhausen,	2

Proben-nr.	Kaufort	Kaufdatum	MHD	Produktbezeichnung	Vertrieb	Herkunft	n
						Niederlehme	
2.9-2.10	Aldi	22.04.13	29.04.13	Hähnchenbrustfilet	GEKA frisch + frost Handels GmbH & Co. KG, Visbek	Märkische Geflügelhof - Spezialitäten GmbH & Co. KG (Wiesenhof) Königs Wusterhausen, Niederlehme	2
3.1-3.5	Kaisers	15.04.13	18.04.13	Birkenhof Hähnchenbrustfilet	Birkenhof GmbH & Co, Schönwalde Glien	Birkenhof GmbH & Co. KG - Fachfleischerei Perwenitz, Schönwalde	5
3.6-3.10	Kaisers	20.04.13	24.04.13	Birkenhof Hähnchenbrustfilet	Birkenhof GmbH & Co, Schönwalde Glien	Birkenhof GmbH & Co. KG - Fachfleischerei Perwenitz, Schönwalde	5
4.1-4.2	Rewe	22.04.13	28.04.13	Hähnchen-Minutenschnitzel aus dem Brustfilet Astenhof Frischgeflügel	Hainspitz für Wilhelm Brandenburg GmbH & Co, Frankfurt	Astenhof Frischgeflügel Produktions- und Handels GmbH, Hainspitz (Firma Sprehe Geflügel- und Tiefkühlfeinkost Handels GmbH & Co. KG)	2
4.3-4.5	Rewe	22.04.13	28.04.13	Hähnchenbrustfilet Astenhof Frischgeflügel	Hainspitz für Wilhelm Brandenburg GmbH & Co, Frankfurt	Astenhof Frischgeflügel Produktions- und Handels GmbH, Hainspitz (Firma Sprehe Geflügel- und Tiefkühlfeinkost Handels GmbH & Co. KG)	3

Proben-nr.	Kaufort	Kauf-datum	MHD	Produktbe-zeichnung	Vertrieb	Herkunft	n
						KG)	
4.6-4.10	Rewe	06.05.13	12.05.13	Hähnchen-brustfilet Astenhof Frisch-geflügel	Hainspitz für Wilhelm Branden- burg GmbH & Co, Frankfurt	Astenhof Frischgeflügel Produktions- und Handels GmbH, Hainspitz (Firma Sprehe Geflügel- und Tiefkühlfein- kost Handels GmbH & Co. KG)	5
5.1	Lidl	22.04.13	27.04.13	Landjunker Hähnchen- innenfilet aus dem Hähnchen- brustfilet	Land- geflügel FG Vertriebs- gesell- schaft mbH, Haren	Celler Land Frischgeflügel GmbH & Co, Wietze (Firma Emsland Frischgeflügel GmbH)	1
5.2-5.3	Lidl	22.04.13	29.04.13	Landjunker Hähnchen- brustfilet	Land- geflügel FG Vertriebs- gesell- schaft mbH, Haren	Celler Land Frischgeflügel GmbH & Co, Wietze (Firma Emsland Frischgeflügel GmbH)	2
5.4-5.5	Lidl	22.04.13	30.04.13	Landjunker Hähnchen- mini- steaks aus dem Hähnchen- brustfilet	Land- geflügel FG Vertriebs- gesell- schaft mbH, Haren	Celler Land Frischgeflügel GmbH & Co, Wietze (Firma Emsland Frischgeflügel GmbH)	2
5.6	Lidl	06.05.13	10.05.13	Landjunker Hähnchen- innenfilet aus dem Hähnchen- brustfilet	Land- geflügel FG Vertriebs- gesell- schaft mbH, Haren	Celler Land Frischgeflügel GmbH & Co, Wietze (Firma Emsland Frischgeflügel GmbH)	1

Proben-nr.	Kaufort	Kauf-datum	MHD	Produktbe-zeichnung	Vertrieb	Herkunft	n
5.7-5.8	Lidl	06.05.13	10.05.13	Landjunker Hähnchen-mini-steaks aus dem Hähnchen-brustfilet	Land-geflügel FG Vertriebs-gesell-schaft mbH, Haren	Celler Land Frischgeflügel GmbH & Co, Wietze (Firma Emsland Frischgeflügel GmbH)	2
5.9-5.10	Lidl	06.05.13	11.05.13	Landjunker Hähnchen-brustfilet	Land-geflügel FG Vertriebs-gesell-schaft mbH, Haren	Celler Land Frischgeflügel GmbH & Co, Wietze (Firma Emsland Frischgeflügel GmbH)	2

Tabelle 13: Rinder - Hackfleisch

Proben nr.	Kaufort	Kauf-datum	MHD	Produktbe-zeichnung	Vertrieb	Herkunft	n
1.1-1.5	Satici	31.05.14	k.A.	k.A.	Bay GmbH Fleisch-groß und Einzel-handel, Nuthe-Urstrom-tal	Franken-förde GmbH i.G., Franken-förde	5
1.6-1.10	Satici	02.06.14	k.A.	k.A.	Bay GmbH Fleisch-groß und Einzel-handel, Nuthe-Urstrom-tal	Franken-förde GmbH i.G., Frankenförd e	5
2.1-2.5	Edeka	31.05.14	04.06.14	k.A.	West-fleisch eG, Münster	Westfleisch e.G., Fleischcent er Lübbecke	5
2.6-2.10	Edeka	02.06.14	06.06.14	k.A.	West-	Westfleisch	5

Proben nr.	Kaufort	Kaufdatum	MHD	Produktbezeichnung	Vertrieb	Herkunft	n
					fleisch eG, Münster	e.G., Fleischcenter Lübbecke	
3.1-3.5	Lidl	31.05.14	04.06.14	Oldenländer Rinderhackfleisch	Westfalen-land Fleischwaren GmbH, Münster	Westfalen-land Fleischwaren GmbH, Münster	5
3.6-3.10	Lidl	02.06.14	06.06.14	Oldenländer Rinderhackfleisch	Westfalen-land Fleischwaren GmbH, Münster	Westfalen-land Fleischwaren GmbH, Münster	5
4.1-4.5	Rewe	02.06.14	05.06.14	Wilhelm Brandenburg Rinderhackfleisch	Wilhelm Brandenburg GmbH & Co, Frankfurt	Wilms Weißwasser GmbH & Co, Weißwasser	5
4.6-4.10	Rewe	03.06.14	09.06.14	Wilhelm Brandenburg Rinderhackfleisch	Wilhelm Brandenburg GmbH & Co, Frankfurt	Wilms Weißwasser GmbH & Co, Weißwasser	5
5.1-5.5	Netto	02.06.14	08.06.14	Gut Ponholz Rinderhackfleisch	Netto Marken Discount AG & Co, Maxhütte - Haidhof	Steinemann GmbH & Co. KG, Steinfeld	5
5.6-5.10	Netto	18.06.14	24.06.14	Gut Ponholz Rinderhackfleisch	Netto Marken Discount AG & Co, Maxhütte - Haidhof	Steinemann GmbH & Co. KG, Steinfeld	5
6.1	Frischetheke LPG	18.06.14	k.A.	k.A.	k.A.	Ludwigs-luster Fleisch- und Wurstspezialitäten	1

Proben nr.	Kaufort	Kaufdatum	MHD	Produktbezeichnung	Vertrieb	Herkunft	n
						GmbH & Co. KG, Ludwigslust	
6.2	Frische- theke LPG	23.06.14	k.A.	k.A.	k.A.	Ludwigs- luster Fleisch- und Wurst- spezialitäten GmbH & Co. KG, Ludwigslust	1
6.3	Frische- theke LPG	30.06.14	k.A.	k.A.	k.A.	Ludwigs- luster Fleisch- und Wurst- spezialitäten GmbH & Co. KG, Ludwigslust	1
6.4	Frische- theke Kaisers	18.06.14	k.A.	k.A.	Birkenhof GmbH & Co. KG, Schön- walde Glien	Birkenhof GmbH & Co. KG, Schönwalde Glien- Perwenitz	1
6.5	Frische- theke Kaisers	21.06.14	k.A.	k.A.	Birkenhof GmbH & Co. KG, Schön- walde Glien	Birkenhof GmbH & Co. KG, Schönwalde Glien- Perwenitz	1
6.6	Frische- theke Kaisers	26.06.14	k.A.	k.A.	Birkenhof GmbH & Co. KG, Schön- walde Glien	Birkenhof GmbH & Co. KG, Schönwalde Glien- Perwenitz	1
6.7	Frische- theke Kaisers	30.06.14	k.A.	k.A.	Birkenhof GmbH & Co. KG, Schön- walde Glien	Birkenhof GmbH & Co. KG, Schönwalde Glien- Perwenitz	1
6.8	Frische-	18.06.14	k.A.	k.A.	NEU-	Fleischerei	1

Proben nr.	Kaufort	Kaufdatum	MHD	Produktbezeichnung	Vertrieb	Herkunft	n
	theke Marheineken Markthalle				LAND GmbH, Bad Bevensen	Hoffmann, Teltow	
6.9	Frische- theke Marheineken Markthalle	21.06.14	k.A.	k.A.	NEU- LAND GmbH, Bad Bevensen	Fleischerei Hoffmann, Teltow	1
6.10	Frische- theke Marheineken Markthalle	26.06.14	k.A.	k.A.	NEU- LAND GmbH, Bad Bevensen	Fleischerei Hoffmann, Teltow	1

Tabelle 14: Schweine - Hackfleisch

Proben- nr.	Kaufort	Kaufdatum	MHD	Produktbezeichnung	Vertrieb	Herkunft	n
1.1-1.5	Edeka	31.05.14	k.A.	Bauerngut Exclusiv	West- fleisch eG, Münster	Westfleisch e.G., Fleischcenter Lübbecke	5
1.6-1.10	Edeka	02.06.14	06.06.14	Bauerngut Exclusiv	West- fleisch eG, Münster	Westfleisch e.G., Fleischcenter Lübbecke	5
2.1	Lidl	31.05.14	03.06.14	Olden- länder Schweine- hackfleisch	West- falenland Fleisch- waren GmbH, Münster	Westfalenland Fleischwaren GmbH, Münster	1
2.2-2.4	Lidl	31.05.14	04.06.14	Olden- länder Schweine- hackfleisch	West- falenland Fleisch- waren GmbH, Münster	Westfalenland Fleischwaren GmbH, Münster	3
2.5-2.10	Lidl	02.06.14	06.06.14	Olden- länder	West- falenland	Westfalenland Fleischwaren	6

Proben- nr.	Kaufort	Kauf- datum	MHD	Produktbe- zeichnung	Vertrieb	Herkunft	n
				Schweine- hackfleisch	Fleisch- waren GmbH, Münster	GmbH, Münster	
3.1-3.5	Rewe	02.06.14	05.06.14	Schweine- hack Gut Erkenloh	Fleisch- vertriebs GmbH, Ruppiche roth	Gut Erkenloh Fleischvertrieb GmbH, Ruppichteroth	5
3.6-3.8	Rewe	16.06.14	20.06.14	Schweine- hack Gut Erkenloh	Fleisch- vertriebs GmbH, Ruppiche roth	Gut Erkenloh Fleischvertrieb GmbH, Ruppichteroth	3
3.9-3.10	Rewe	16.06.14	19.06.14	Schweine- hack Gut Erkenloh	Fleisch- vertriebs GmbH, Ruppiche roth	Gut Erkenloh Fleischvertrieb GmbH, Ruppichteroth	2
4.1-4.5	Netto	02.06.14	08.06.14	Gut Ponholz Schweine Hackfleisch	Netto Marken Discount AG & Co, Max- hütte- Haidhof	Steinemann GmbH & Co. KG, Steinfeld	5
4.6-4.10	Netto	16.06.14	19.06.14	Gut Ponholz Schweine Hackfleisch	Netto Marken Discount AG & Co, Max- hütte- Haidhof	Steinemann GmbH & Co. KG, Steinfeld	5
5.1	Frische- theke LPG	18.06.14	k.A.	k.A.	k.A.	Ludwigsluster Fleisch- und Wurstspeziali- täten GmbH & Co. KG, Ludwigslust	1
5.2	Frische- theke LPG	23.06.14	k.A.	k.A.	k.A.	Ludwigsluster Fleisch- und Wurstspeziali- täten GmbH & Co. KG,	1

Proben- nr.	Kaufort	Kauf- datum	MHD	Produktbe- zeichnung	Vertrieb	Herkunft	n
						Ludwigslust	
5.3	Frische- theke LPG	30.06.14	k.A.	k.A.	k.A.	Ludwigsluster Fleisch- und Wurstspeziali- täten GmbH & Co. KG, Ludwigslust	1
5.4	Frische- theke Kaisers	18.06.14	k.A.	k.A.	Birkenhof GmbH & Co. KG, Schön- walde Glien	Birkenhof GmbH & Co. KG, Schönwalde- Glien- Perwenitz	1
5.5	Frische- theke Kaisers	21.06.14	k.A.	k.A.	Birkenhof GmbH & Co. KG, Schön- walde Glien	Birkenhof GmbH & Co. KG, Schönwalde- Glien- Perwenitz	1
5.6	Frische- theke Kaisers	26.06.14	k.A.	k.A.	Birkenhof GmbH & Co. KG, Schön- walde Glien	Birkenhof GmbH & Co. KG, Schönwalde- Glien- Perwenitz	1
5.7	Frische- theke Kaisers	30.06.14	k.A.	k.A.	Birkenhof GmbH & Co. KG, Schön- walde Glien	Birkenhof GmbH & Co. KG, Schönwalde- Glien- Perwenitz	1
5.8	Frische- theke Marhei- neken- halle	18.06.14	k.A.	k.A.	NEU- LAND GmbH, Bad Beven- sen	Fleischerei Hoffmann, Teltow	1
5.9	Frische- theke Marhei- neken- halle	21.06.14	k.A.	k.A.	NEU- LAND GmbH, Bad Beven- sen	Fleischerei Hoffmann, Teltow	1
5.10	Frische-	26.06.14	k.A.	k.A.	NEU-	Fleischerei	1

Proben-nr.	Kaufort	Kaufdatum	MHD	Produktbezeichnung	Vertrieb	Herkunft	n
	theke Marheinen- halle				LAND GmbH, Bad Bevensen	Hoffmann, Teltow	

3.1.2 Geräte

Die eingesetzten Geräte sind in Tabelle 15 aufgeführt.

Tabelle 15: Geräteliste

Gerät	Typ	Hersteller
Agilent 2100	270709U	Biomerieux, Deutschland
Bio Photometer	-	Eppendorf, Deutschland
Brutschrank	VT 5042 EK/ N2	Heraeus, Deutschland
Densicheck Plus	SN OAO14455 und SN OAO15320	BioMerieux, Deutschland
Disc Master Dispenser	MDD62	Mast Diagnostika, Deutschland
Dispensette	3	Brand, Deutschland
Kühlschrank	Labstar	National Lab, Deutschland
Maxwell ® 16 DNA- Aufreinigungssystem	310045	Promega, Deutschland
PCR-Kühlblock	-	Eppendorf, Deutschland
Pipette 2-20µl	Reference	Eppendorf, Deutschland
Pipette 10-100µl	Reference	Eppendorf, Deutschland
Pipette 100-1000µl	Reference	Eppendorf, Deutschland
Sterilwerkbank	CA / RE 4	Clean Air, Deutschland
Thermocycler	Tpersonal 48	Biometra, Deutschland
Vitek 2 Compact	3133191	BioMerieux, Deutschland
Vortexer	MS3BS36	IKA Labortechnik, Deutschland
Vortexer	VF 2	IKA Labortechnik, Deutschland
Waage	1544004	Sartorius AG, Deutschland
Zentrifuge	Pico 17	Heraeus, Deutschland

3.1.3 Verbrauchsmaterialien, Nährmedien, Chemikalien, Lösungen und Puffer

3.1.3.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 16: Eingesetzte Verbrauchsmaterialien

Material	Bestellnummer	Hersteller
Biosphere Filter Tips 0,5-20µl	70116210	Sarstedt, Deutschland
Biosphere Filter Tips 2- 100µl	70760212	Sarstedt, Deutschland
Biosphere Filter Tips 100-1000µl	70762211	Sarstedt, Deutschland
Cryobank TM	CRY0GIR	Mast Diagnostika, Deutschland
Disposable Scalpel No. 20	200130020	Feather, Deutschland
Eco Wipes	00.915.EEW001/ 002	Dr Schumacher GmbH, Deutschland
Einmalhandschuhe	PZN 7418582	Sempermed, Österreich
Einmal-Petrischalen, steril	633180	Greiner Bio - One GmbH, Deutschland
Impföse, 1 µl	6.129.352	VWR, Italien
Microbank Storage Box	PL 170/Y	ProLabDiagnostics, Canada
PCR Tubes, grün, 0,2 ml	710953	Biozym, Deutschland
Plattierungsspatel	3200363605	Sarstedt, Deutschland
Polypropylene Conical Tube 50ml	352070	Falcon, USA
Kunststoffröhrchen, 5 ml, für Vitek	55.476	Sarstedt, Deutschland
Safe-Lock Tubes 1,5 ml	710963	Biozym, Deutschland
Sterile Wattetupfer 150 x 2,2 mm	4302	Assistent, Deutschland
Transystem Amies Agar Gel Medium With Charcoal	0123	Copan, Italien
Uvette	00300 106.300	Eppendorf, Deutschland

3.1.3.2 Nährmedien

Tabelle 17: Eingesetzte Nährmedien

Nährmedium	Bestellnummer	Hersteller
ChromID-ESBL-Agar	43481	BioMerieux, Deutschland
Columbia-Agar	413162	BioMerieux, Deutschland
McConkey-Agar	43149 / 43141	BioMerieux, Deutschland

Müller-Hinton-Agar	43309	BioMerieux, Deutschland
TSB Bouillon, 1 l	221092 / 93	BioMerieux, Deutschland

3.1.3.3 Chemikalien, Lösungen und Puffer

Tabelle 18: Eingesetzte Chemikalien, Lösungen und Puffer

Chemikalie, Lösung, Puffer	Bestellnummer	Hersteller
AmpliAq DNA Polymerase mit <ul style="list-style-type: none"> • GeneAmp 10 x PCR buffer 	N808-006	Applied Biosystems, Deutschland
• Mc Farland Standards	70900	BioMerieux, Deutschland
• NaCl 5ml 0,85%	20230	BioMerieux, Deutschland
Bactident Oxidase	1133000001	Merck, Deutschland
CareFusion Dispensette (NaCl 0,45%)	CN4510	BioMerieux, Deutschland
DiversiLab Fingerprinting Kit Escherichia mit <ul style="list-style-type: none"> • REP-PCR-Mix MM1 432 µl • Primer-Mix (spezifisch für den Erreger) 55 µl • Positive Control C3 8 µl • Negative Control 8 µl 	410980	BioMerieux, Deutschland
DL Fingerprinting Kit Serratia mit <ul style="list-style-type: none"> • REP-PCR-Mix MM1 432 µl • Primer-Mix (spezifisch für den Erreger) 55 µl • Positive Control C3 8 µl • Negative Control 8 µl 	410990	BioMerieux, Deutschland
ESBL-Plättchen-Set: <ul style="list-style-type: none"> • Cefpodoxim-Plättchen 30 µg (CPD30) • Cefpodoxim 30 µg+ Clavulansäure 10 µg (CPD-CV) • Ceftazidim 30 µg (CAZ30) • Ceftazidim 30 µg + Clavulansäure 10 µg (CAZ-CV) • Cefotaxim 30 µg (CTX30) 	202232 (171055)	Mast Diagnostika, Deutschland

Chemikalie, Lösung, Puffer	Bestellnummer	Hersteller
<ul style="list-style-type: none"> Cefotaxim 30 µg + Clavulansäure 10 µg (CTX-CV) 		
Incidin Extra N (0,5%)	6042824	Ecolab, Deutschland
LabChip (Gel)	270670	BioMerieux, Deutschland
Maxwell 16 Tissue LEV Purification Kit	AS1220X	Promega, Deutschland
MoBio Ultra Clean Microbial DNA Isolation Kit	410946	BioMerieux, Deutschland
Nukleasefreies Wasser	P115C	Promega, Deutschland
2- Propanol (70%)	PZN 8505455	Braun, Deutschland
Vitek 2 Testkarten GN	21341	BioMerieux, Deutschland
Vitek 2 Testkarte AST N 223	413110	BioMerieux, Deutschland
Wasser für Mikrobiologie	115.333	Merck, Deutschland

3.1.4 Antibiotika

Die Antibiotika - Empfindlichkeit der Bakterienisolate wurde mittels eines Vitek 2 Compact – Gerätes (BioMerieux, Nürtingen, Deutschland) als Bestimmung der Minimalen - Hemmstoff – Konzentration (MHK) im Mikrodilutionsverfahren durchgeführt. Zum Einsatz kam dabei die VitekTestkarte AST N223, in welcher die in Tabelle 19 aufgelisteten 17 Wirkstoffe bzw. Wirkstoffkombinationen in lyophilisierter Form in den angegebenen Konzentrationen vorliegen.

Die Konzentrationen sind so ausgewählt, dass sie die Breakpoints für das jeweilige Antibiotikum erfassen. In der Tabelle ist außerdem der Messbereich der jeweiligen minimalen Hemmkonzentration (MHK) angegeben.

Tabelle 19: Wirkstoffe bzw. Wirkstoffkombinationen der VitekTestkarte AST N223

Antibiotikaklasse	Antibiotikum	Konzentration	MHK Bereich von/bis [mg/l]
Penicilline	Ampicillin	4, 8, 32	2-32
	Ampicillin/ Sulbactam	4, 16, 32	2-32
	Piperacillin	4, 16, 32, 64	4-128
	Piperacillin/ Tazobactam	2/4, 8/4, 24/4, 32/4, 32/8, 48/8	4/4-128/4
Cephalosporine	Cefuroxim	2, 8, 32	1-64
	Cefpodoxim	0,5, 1, 4	0.25-8
	Cefotaxim	1, 4, 16, 32	1-64
	Ceftazidim	1, 2, 8, 32	1-64
Cephalosporin ESBL-Test	Cefepim	1	-
	Cefotaxim	0,5	-
	Ceftazidim	0,5	-
	Cefepim / Clavulansäure	1/10	-

Antibiotikaklasse	Antibiotikum	Konzentration	MHK Bereich von/bis [mg/l]
	Cefotaxim / Clavulansäure	0,5/4	-
	Ceftazidim / Clavulansäure	0,5/4	-
Carbapeneme	Ertapenem	0,5, 1, 6	0,5-8
	Imipenem	1, 2, 6, 12	0.25-16
	Meropenem	0,5, 2, 6, 12	0.25-16
Aminoglykoside	Gentamicin	4, 16, 32	1-16
Fluorchinolone	Ciprofloxacin	0,5, 2, 4	0.25-4
	Moxifloxacin	0,25, 1, 4	0.25-8
Tetracycline	Tigecycline	0,75, 2, 4	0,5-8
Folsäureantagonisten	Trimethoprim/ Sulfamethoxazol	1/19, 4/76, 16/304	20(1/19)-320 (16/304)

3.2 Methoden

3.2.1 Verarbeitung der Lebensmittelproben zur Kultivierung von ESBL - produzierenden Enterobakterien

Tag 1:

Bis zur Verarbeitung wurden die Proben bei 4°C gelagert. Die Verarbeitung der Proben erfolgte vor Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums. Vor Beginn der Probenverarbeitung wurde die Arbeitsfläche mit Incidin Extra N (0,5%) - getränkten EcoWipe – Tüchern (Dr. Schumacher GmbH, Deutschland) desinfiziert.

Von jeder Lebensmittelprobe wurden 5 g mithilfe einer sterilen Edelstahlpinzette und eines Einmalskalpelles (Feather, Deutschland) entnommen und auf einer sterilen Petrischale (Greiner Bio-One GmbH, Deutschland) mit dem Skalpell weiter zerkleinert.

Pinzetten, Einmalskalpelle und Petrischalen wurden immer nur für das Verarbeiten einer einzigen Probe verwendet. Skalpelle und Petrischale wurden anschließend verworfen, die Edelstahlpinzetten vor Wiederverwendung gereinigt und autoklaviert. Nur beim Versuch zur Übertragung von ESBL - positiven Erregern bei der Verarbeitung von Lebensmittelproben unter 3.2.6 wurden diese Utensilien erneut verwendet.

Nach dem Zerkleinern wurden die Lebensmittelproben in sterile 50 ml – Kunststoffröhrchen (Polypropylene Conical Tube, Falcon, USA) mit 25 ml Tryptic – Soja - Bouillon (TSB, BioMerieux, Deutschland) überführt und über Nacht bei 37°C bebrütet (Brutschrank Typ VT 5042 EK / N2, Heraeus, Deutschland).

Tryptic – Soja - Bouillon (TSB) ist ein nährstoffreiches Medium und fördert das Wachstum einer Vielzahl von Mikroorganismen (MacFaddin 1985).

Vor Verarbeitung der nächsten Lebensmittelprobe wurde die Arbeitsfläche erneut desinfiziert.

Tag 2:

Von den Über – Nacht – TSB - Kulturen wurden 100 µl entnommen und auf ChromID – ESBL - Agarplatten (BioMerieux, Deutschland) ausplattiert. Die beimpften ChromID – ESBL - Agarplatten wurden weitere 24 h bei 37°C bebrütet.

Der ChromID - ESBL Agar ermöglicht die selektive Detektion ESBL - produzierender Mikroorganismen, indem durch eine im Agar enthaltene Antibiotikamischung (darunter das 3. Generationscephalosporin Cefpodoxim) das Wachstum der Begleitflora (Gram - positive Bakterien, Hefen, Gram - negative 3. Generationscephalosporin - sensible Bakterien) unterdrückt wird.

Zudem enthält der Agar eine Mischung chromogener Substrate, die durch Erregerspezifische Enzyme der ESBL - produzierenden Enterobakterien gespalten werden und dann unlösliche, farbige Komponenten freisetzen. Dadurch zeigen sich bei Wachstum von 3. Generationscephalosporin - resistenten *Escherichia coli* rote Kolonien, bei *Klebsiella* grüne, bei *Enterobacter* und *Citrobacter* metallisch blaue Kolonien und bei *Proteus* erscheinen Kolonien mit braunem Hof.

Tag 3:

Verdächtig wachsende Kolonien wurden mit einer sterilen Einmalöse (VWR, Italien) vom ChromID – ESBL - Agar abgenommen und auf Columbia- und McConkey – Agar - Platten (BioMerieux, Deutschland) fraktioniert ausgestrichen, um nach einer weiteren Über – Nacht - Bebrütung bei 37°C Reinkulturen für die weiteren Testungen zu erhalten.

Tag 4:

Bei den jetzt vorliegenden Reinkulturen wurde vom Columbia - Agar ein Oxidase - Test durchgeführt: Hierzu wurde mittels einer sterilen Einmalöse eine Einzelkolonie auf das Testfeld des Oxidase - Teststreifens (Bactident Oxidase, Merck, Deutschland) gebracht. Wies der Teststreifen innerhalb von 60 Sekunden eine Blaufärbung auf, so deutete dies auf eine positive Oxidasereaktion hin.

Nur Oxidase - negative Kolonien wurden weiter auf das Vorhandensein von ESBL untersucht. Hierzu wurde in der Folge der „Combination disc“ – Test durchgeführt.

3.2.2 Phänotypische Bestätigung der ESBL - Produktion mit der Combination disc – Methode

ESBL werden durch Clavulansäure inaktiviert. Das führt zu einer Aufhebung der Resistenz gegenüber 3. Generationscephalosporinen. Zur Unterscheidung von den β – Lactamasen, die durch β - Lactamase – Inhibitoren, wie Clavulansäure oder Sulbactam, nicht oder kaum gehemmt werden (Klasse C β - Lactamasen), wird ein Parallelansatz mit Zusatz von Clavulansäure durchgeführt. In Gegenwart der Clavulansäure zeigen ESBL - Bildner in der Dilutionsprüfung eine mindestens um 3 Verdünnungsstufen geringere MHK für Cefpodoxim, Ceftazidim oder Cefotaxim, im Agardiffusionstest einen um mindestens 5 mm bzw. ≥ 50 % des Durchmessers größeren Hemmhof für diese Antibiotikakombination.

Bei der Combination disc – Methode werden Testplättchen mit den 3. Generationscephalosporinen Cefpodoxim (30 μ g, CPD30), Ceftazidim (30 μ g, CAZ30) und Cefotaxim (30 μ g, CTX30) sowie Testplättchen, in denen die genannten 3. Generationscephalosporine in Kombination mit Clavulansäure (10 μ g, CV) enthalten sind, verwendet.

Zunächst wurden mit einem sterilen Wattetupfer 2 - 3 Einzelkolonien von der Columbia - oder McConkey – Agarplatte abgenommen, in ein mit 5 ml 0,85 % NaCl befülltes Röhrchen (BioMerieux, Deutschland) eingerührt und gevortext (Vortexer Typ VF 2, IKA Labortechnik, Deutschland), um ein Inokulum entsprechend McFarland Standard 0,5 einzustellen. Ein weiterer Wattetupfer wurde mit diesem Inokulum befeuchtet und

kreuzweise auf eine Müller - Hinton Agar - Platte (BioMerieux, Deutschland) ausgestrichen, um einen gleichmäßigen Bakterienrasen zu erhalten.

Auf diese Platte wurden nun mit einem Dispenser (Typ MDD62, Mast Diagnostika) die oben beschriebenen Testplättchen appliziert und mit einer sterilen Pinzette leicht angedrückt.

Die Müller - Hinton Agarplatten wurden 24h bebrütet und das Ergebnis am nächsten Tag abgelesen.

Zeigten die Hemmhofgrößen um die Testplättchen mit den Einzelsubstanzen CPD30, CAZ30 oder CTX30 im Vergleich zu den Testplättchen mit Clavulansäure (CPD30CV, CAZ30CV oder CTX30CV) mindestens einmal einen um 5 mm bzw. 50 % des Hemmhofes kleineren Durchmesser, galt die ESBL - Bildung als phänotypisch bestätigt.

3.2.3 Biochemische Identifizierung und Resistenztestung mit dem Vitek 2 Compact (BioMerieux, Deutschland)

Beim Vitek 2 Compact handelt es sich um ein Gerät, mit dem die Identifizierung und die Antibiotika-Empfindlichkeitstestung von Bakterien halbautomatisch durchgeführt werden kann.

Je nachdem, welche Mikroorganismen getestet werden sollen, kommen unterschiedliche Testkarten zum Einsatz. Für die Identifizierung von Gram - negativen Bakterien ist die Identifizierungskarte GN vorgesehen, die 64 Vertiefungen mit darin vorgelegten Substraten für biochemische Reaktionen besitzt. Werden die zu testenden Mikroorganismen in einer standardisierten Konzentration hinzugegeben, entstehen bei der Verstoffwechslung der Substrate typische Reaktionsmuster, die mit Farbindikatoren sichtbar gemacht werden, photometrisch gemessen werden und eine Identifizierung der getesteten Erreger zulassen.

Zur Antibiotika - Empfindlichkeitstestung wurde die Testkarte AST N223 verwendet, die neben den in Tabelle 19 aufgeführten Antibiotika zusätzlich eine phänotypische Testung der ESBL - Produktion ermöglicht (parallele Testung von Cefipim, Cefotaxim und Ceftazidim als Einzelsubstanzen und in Kombination mit Clavulansäure). In den Vertiefungen der Testkarte sind die Antibiotika so vorgelegt, dass zusammen mit der zu testenden Bakteriensuspension die zu überprüfende Endkonzentration entsteht. Anschließend wird das Wachstum der zugefügten Bakterien densitometrisch überprüft und so die Minimale Hemmstoffkonzentration (also die niedrigste Konzentration eines Antibiotikums, die das Bakterienwachstum hemmen kann) ermittelt. Durch eine parallele Wachstumskontrolle wird sichergestellt, dass die getestete Bakteriensuspension ohne die Zugabe von Antibiotika ungehemmt wachsen kann und eine beobachtete Wachstumshemmung auch auf die Zugabe des jeweiligen Antibiotikums zurückzuführen ist.

Sowohl für die Identifizierungs- als auch für die Resistenzkarte musste zunächst von jedem zu testenden Isolat eine Bakteriensuspension hergestellt werden. Alle zu prüfenden Isolate mussten hierzu in einer frischen Über - Nacht Reinkultur auf Columbia - Agar vorliegen.

Zur Herstellung der Bakteriensuspensionen wurde jeweils ein 5 ml - Kunststoffröhrchen (Sarstedt, Deutschland) mittels einer Dispensette (Braun, Deutschland) mit 3 ml 0,45 % NaCl - Suspensionsmedium befüllt. Für die Identifizierungskarte wurde von der frischen Über-Nacht Reinkultur mit einem sterilen Wattetupfer in das erste NaCl - Röhrchen übertragen und mit Hilfe des Densitometers „Densichek Plus (Typ SN OAO14455 oder Typ SN OAO15320, BioMerieux, Deutschland) auf einen McFarland Standard von 0,5 bis 0,63 eingestellt.

Von der so eingestellten Bakteriensuspension wurden 145 µl mit einer Pipette Typ Reference (10-100µl, Eppendorf, Deutschland) in ein zweites NaCl - Röhrchen pipettiert, um die Bakteriensuspension für die Resistenzkarte herzustellen. Außerdem wurde aus der ersten Bakteriensuspension mittels einer 1 µl – Einmalöse eine Columbia-Agarplatte beimpft, um die Reinheit der Ausgangssuspension zu kontrollieren.

Die beiden Röhrchen mit den Bakteriensuspensionen wurden nun in einen Vitek - Carrier gestellt. Neben das erste Röhrchen wurde eine Identifizierungskarte GN im Carrier platziert, neben das zweite Röhrchen die Resistenzkarte AST N223. Beide Karten besitzen ein sogenanntes Transferröhrchen, das in die zugehörige Bakteriensuspension ragen musste. Dieser Vorgang wurde für jedes zu testende Isolat wiederholt.

Anschließend wurde der fertig beladene Vitek - Carrier in die Fülleinheit des Vitek 2 – Gerätes gestellt. In dieser wird ein Vakuum erzeugt, wodurch die Bakteriensuspensionen durch die Transferröhrchen in die Vitek - Testkarten gesaugt werden. Die Fülleinheit signalisiert optisch und akustisch, wann der Befüllungsvorgang abgeschlossen ist und die Carrier wieder entnommen und in die Ladeinheit des Gerätes umgesetzt werden können. In der Ladeinheit wurden dann die Barcodes des Carriers und der Testkarten automatisch eingescannt und in der Software des Gerätes mit der dazugehörigen Probenbezeichnung verknüpft. Außerdem wurden in der Ladeinheit die Transferröhrchen der Vitek-Karten durch einen erhitzten Draht abgetrennt und versiegelt. Die Carrier mit den gescannten und versiegelten Vitekkarten wurden dann automatisch in das Gerätekarusell umgesetzt, in welchem die Karten bebrütet und alle 15 Minuten vor die Ableseoptik gedreht wurden. In den Identifizierungskarten wurden dabei die Farbumschläge der verschiedenen Substratreaktionen vermessen, in den Resistenzkarten die durch das Bakterienwachstum entstandene Trübung. Der gesamte Testvorgang war für Identifizierungskarten nach maximal 8, für Resistenzkarten nach maximal 18 h abgeschlossen. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte durch die Geräte-Software.

3.2.4 Lagerung der Bakterienisolate

Die aus den Lebensmittelproben isolierten ESBL - produzierenden Bakterien wurden in Cryobankbehälter (Cryobank TM, Mast Diagnostica) in der Microbank Storage Box (ProLab Diagnostics, Kanada) bei - 70 °C eingefroren. Die Cryoröhrchen wurden mit der Probennummer des zu lagernden Stammes beschriftet. Die Röhrchen enthielten jeweils 25 Glaskügelchen und 1 ml hypertonische Cryo - Konservierungslösung. Mit einer sterilen Impföse wurden 2 - 3 Bakterienkulturen von der Columbia - Agar Platte genommen und in den Behälter gerührt, sodass diese an den Glaskügelchen haften blieben. Nach gutem Durchmischen wurde mit einer Eppendorfpipette die Cryokonservierungslösung entfernt, der Behälter verschlossen und in den Gefrierschrank (National Lab, Deutschland) gestellt.

Die eingefrorenen Bakterienstämme konnten zu jeder Zeit rekultiviert werden, indem mit einer sterilen Impföse ein Kügelchen aus dem Behälter entfernt und auf einer geeigneten Agar Platte ausgestrichen wurde.

3.2.5 Molekularbiologische Typisierung der ESBL - positiven Isolate

Durch molekularbiologische Typisierungsmethoden können bakterieller Erreger derselben Spezies, die sich hinsichtlich ihrer phänotypischen Eigenschaften (z.B. ihrer

Morphologie oder ihres Antibiogramms) nicht unterscheiden lassen, weiter differenziert werden. Zur weiteren Charakterisierung der aus den Lebensmittelproben isolierten ESBL - positiven Erreger wurden diese mittels rep - PCR molekularbiologisch typisiert.

3.2.5.1 Isolierung der bakteriellen DNA

Zunächst musste die DNA der aus den Lebensmittelproben isolierten ESBL - produzierenden Bakterien präpariert werden. Hierzu wurde das Maxwell 16 DNA - Aufreinigungssystem (Promega, Deutschland) eingesetzt.

In diesem Gerät können bis zu 16 Proben parallel automatisch verarbeitet werden. Die DNA - Präparation erfolgt in vorgefertigten Kartuschen, die aus 7 bereits mit Reagenzien befüllten Röhrcchen bestehen. Der Transport der DNA von einem Röhrcchen zum nächsten erfolgt mithilfe von paramagnetischen Silicapartikeln (MagneSil® Paramagnetic Particles, PMP), an die die DNA bindet, eines sogenannten Einmal - „Stößels“, der sich in einem der Kartuschenröhrcchen befindet, und einer Magnetschiene innerhalb des Gerätes, die den Stößel und die daran haftenden Silicapartikel aufnimmt und weiter zum nächsten Kartuschenröhrcchen transportiert.

Zur Präparation bakterieller DNA wird vom Hersteller die Verwendung des „Tissue LEV (low elution volume) Total RNA Purification KIT“ (Promega, Deutschland) empfohlen, bestehend aus der vorgefüllten Kartusche mit den benötigten Reagenzien (Lysispuffer, verschiedene Waschpuffer, RNA - freies Wasser zur Aufnahme der präparierten DNA), den PMP, dem Stößel und einem Elutionsgefäß.

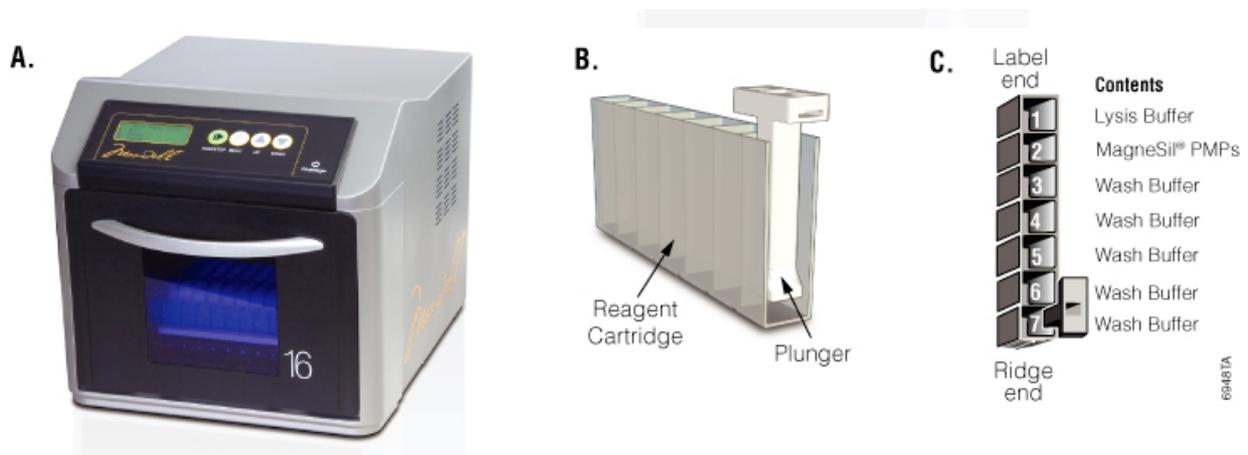


Abbildung 7: Maxwell® DNA Aufreinigung (aus Maxwell® 16 Technisches Handbuch, 2013)

Vor der DNA - Aufbereitung wurde die benötigte Anzahl Kartuschen des Maxwell 16 Tissue LEV Purification Kit in den Kartuschenrahmen des Geräts gesetzt und die Verschlussfolie von den Kartuschen entfernt.

Der im Kit enthaltene Einmal-Stößel wurde in das Kartuschenröhrcchen Nr. 7 eingesetzt. Das im Kit enthaltene 0,5 ml Elutionsgefäß wurde nach Zugabe von 100 µl RNA - freiem Wasser vor der Kartusche im Kartuschenrahmen aufgestellt.

Anschließend wurde ½ Impföse Bakterienmaterial von frischen Kulturoislaten einer bei 37°C über Nacht bebrüteten Blutagarplatte in den chaotropen Lysepuffer im Kartuschenröhrcchen Nr. 1 direkt eingerieben.

Nachdem so alle benötigten Kartuschen vorbereitet worden waren, wurde der Kartuschenrahmen in das Gerät gesetzt. Das Gerät wurde gestartet und das Programm „Aufbereitung von DNA“ auf dem Display ausgewählt. Auf dem Bildschirm wurde

angezeigt, wann die Tür des Geräts geöffnet werden konnte. Die Maxwell – 16 - Plattform wurde ausgefahren und der Kartuschenrahmen so in das Gerät eingesetzt, dass sich die Elutions - Gefäße vorne in Richtung der Tür befanden. Nach Einfahren der Plattform mit dem Kartuschenrahmen und Schließen der Gerätetür startete das Programm automatisch.

Die Magnetschiene nahm den Einmalstößel aus dem Kartuschenröhrchen Nr. 7 auf und transportierte ihn in das Röhrchen Nr. 2 mit den PMP, die dort vom Stößel aufgenommen und in das Röhrchen Nr. 1 transportiert wurden. Im Röhrchen Nr. 1 konnte die DNA der lysierten Bakterien nun an die PMP binden und mit den PMP am Einmal - Stößel weiter durch die verschiedenen Waschpuffer transportiert werden, bis die präparierte und gereinigte DNA schließlich mit dem RNA - freien Wasser von den PMP eluiert und im Elutionsgefäß aufgenommen wurde.

Auf dem Gerätedisplay wurden die einzelnen Arbeitsschritte (z.B. „Lyse“, „Probenaufreinigung“) und die Restlaufzeit angezeigt. Ein akustisches Signal zeigte nach ca. 20 Minuten das Programmende an. Nach einer visuellen Kontrolle, ob sich der Stößel, dieses Mal mit den PMP, wieder im Röhrchen Nr. 7 befand, konnte der Kartuschenrahmen aus dem Gerät entfernt werden. Die Elutionsgefäße mit der DNA wurden entnommen und bei 4 °C für 24 h aufbewahrt, Kartuschen und Stößel wurden verworfen.

Befanden sich nach Ablauf des Programms keine PMP am Stößel oder befand sich der Stößel in einem anderen als im 7. Röhrchen, musste die Präparation wiederholt werden, da das Programm nicht fehlerfrei abgelaufen sein konnte.

3.2.5.2 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA

Bevor die aus den ESBL - produzierenden Bakterien präparierte DNA in der Typisierung – rep - PCR (DiversiLab) eingesetzt werden konnte, mussten die Konzentration und Reinheit der gewonnenen DNA bestimmt werden. Dies erfolgte mit einem BioPhotometer (Eppendorf, Deutschland).

Um die DNA - Konzentration mittels Photometer zu bestimmen, wird mit Licht einer Wellenlänge von 260 nm (OD260) gemessen. Die gelöste DNA wird in eine Küvette pipettiert, welche in den Lichtstrahl des Photometers gestellt wird. Die Absorption des Lichtstrahls lässt auf die Konzentration der DNA schließen. Grundlage hierzu ist das Lambert Beer'sche Gesetz: $A = c * d * \epsilon$ (A: Absorption, c: DNA - Konzentration, d: Schichtdicke (1 cm), ϵ : Extinktionskoeffizient doppelsträngiger DNA bei 260 nm). Nach diesem entspricht eine Absorption von 1 einer DNA - Konzentration von 50 $\mu\text{g} / \text{ml}$.

Eine etablierte Methode zur Bestimmung der Reinheit der DNA ist es, den Quotienten der Extinktionen OD260 / OD280 zu bilden. Dieser gibt das Verhältnis der Nukleinsäure - Absorption zur Protein - Absorption an und sagt aus, wie stark eine DNA - Lösung durch beispielsweise Proteine verunreinigt ist. Liegt der Quotient bei 1,8 - 2, so ist die DNA rein. Werte < 1,8 sprechen für eine Verunreinigung durch Proteine oder Phenol. Zusätzlich wurde der Quotient der Extinktionen bei 260 / 230 nm bestimmt, mit dem sich Verunreinigungen durch Polysaccharide, Salze oder organische Lösungsmittel bestimmen lassen und dessen Wert > 2,0 sein soll.

Vor der Durchführung der photometrischen Messung der DNA wurde eine nur mit A. dest. (ohne darin gelöster DNA) gefüllte Küvette (UVette, Eppendorf, Deutschland) als Leerwert in das Gerät gestellt, um dieses zu kalibrieren. Die gelöste DNA wurde mit einem Vortexer (Typ MS3BS36, IKA Labortechnik, Deutschland) durchmischt um Konzentrationsschwankungen auszugleichen. Mit einer Pipette wurden 50 μl der gevortexten DNA - Lösung in die Küvette luftblasenfrei überführt. Diese wurde in das Photometer gestellt und die Extinktion der DNA - Lösung bei 260, 230 und 280 nm

gemessen, die Angabe der DNA -Konzentration und der Quotienten OD 260 / OD230 und OD260 / OD280 erfolgte automatisch durch das Gerät.

Für die Verwendung in der rep - PCR wurde die gemessenen DNA - Konzentration mit Nuklease - freiem Wasser (Promega, Deutschland) auf eine Konzentration von 25 - 50 µg / ml eingestellt.

3.2.5.3 Genotypisierung mittels der repetitive extragenomic palindromic (rep) - PCR

Bei der Polymerasekettenreaktion wird eine Ziel - DNA *in vitro* vervielfältigt (Amplifikation) und durchläuft hierbei einen bestimmten Zyklus, der aus den folgenden drei Schritten besteht und sich ca. 30 Mal wiederholt:

1. Denaturierung:

Die doppelsträngige DNA wird bei 96 °C durch Aufbrechen von Wasserstoffbrücken in zwei Einzelstränge getrennt.

2. Primerhybridisierung:

An jeden der beiden DNA - Einzelstränge wird am 3'-Ende der Zielsequenz ein spezifischer (zur Ziel - DNA komplementärer) Primer angelagert. Die optimale Reaktionstemperatur (Annealingtemperatur) für die Primeranlagerung (Annealing) sollte ca. 10°C unter dem Schmelzpunkt der Primer liegen (meist zwischen 55 – 65°C). Die Primer dienen als Ansatzpunkte für die DNA - Polymerase.

3. Elongation:

Es folgt bei ca. 70°C die Verlängerung des DNA - Stränge in 3'→ 5'Richtung, indem sich die hitzestabile *Taq* - Polymerase aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus* an das 3' - Ende des Primers anlagert und die Startsequenz des Primers mit zur Ziel - DNA komplementären Basen verlängert.

Auf diese Weise entstehen aus den beiden DNA - Einzelstränge zwei DNA - Doppelstränge, die dann wiederum erneut die drei beschriebenen PCR - Zyklen durchlaufen.

Grundlage der repetitive extragenomic palindromic (rep) - PCR bilden repetitive chromosomale Sequenzen (Insertionselemente, Ribosomenbindungsstellen), die im Bakteriengenom variabel über das gesamte Chromosom verteilt sind. Sind zwei solcher Sequenzen benachbart, lässt sich das dazwischenliegende „Interrepeat“ - Fragment mit Repeat - spezifischen Primern amplifizieren. Je nach Anzahl und Lokalisation der repetitiven Sequenzen entstehen von Stamm zu Stamm unterschiedliche Fragmentmuster (Genotypen), die typisch für die untersuchten Stämme sind. Die auf diese Weise bestimmten Genotypen lassen Aussagen zur Epidemiologie der untersuchten Isolate zu.

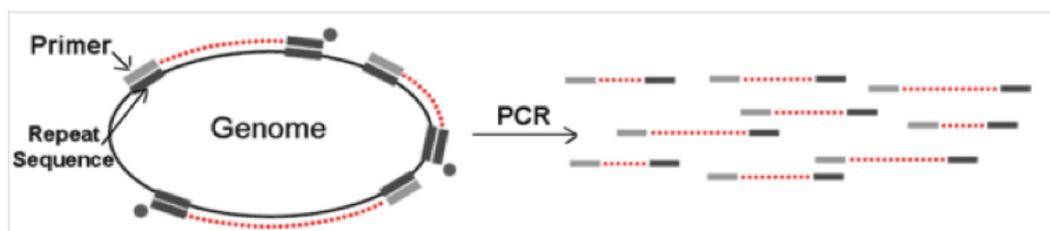


Abbildung 8: Prinzip der rep - PCR (aus BioMerieux Technisches Handbuch, 2009)

Informationen zum Diversilab – System

Das Diversilab - System (BioMerieux) bietet zum einen standardisierte Protokolle und Reagenzien zur Durchführung der rep - PCR, zum anderen mit dem Agilent 2100 Electrophoresis Bioanalyser ein System zur Detektion der PCR - Fragmente, die dann schließlich mithilfe der Diversilab - Software analysiert werden können.

Vorbereitung der Proben und Reagenzien zur Durchführung der rep - PCR

Zunächst wurde die DNA der aus den Lebensmittelproben isolierten ESBL - produzierenden Bakterien aufgetaut, gevortext und zentrifugiert (Zentrifuge Typ Pico 17, Heraeus, Deutschland).

Je nach Erregerart wurden für den Ansatz des PCR - Mix verschiedene Diversilab Fingerprinting - Kits (BioMerieux, Deutschland) eingesetzt: Für *E. coli* und *E. fergusonii* das Escherichia - Kit, für *S. fonticola* das Serratia - Kit. Jedes Kit bestand aus dem rep - PCR - Mix MM1, dem für den Erreger spezifischen Primer - Mix, einer Positivkontrolle mit einem definierten Kontrollstamm und einer Negativkontrolle. Für den Ansatz des PCR - Mix wurden außerdem die AmpliTaq DNA Polymerase (Applied Biosystems) und der GeneAmp 10 x PCR buffer (Applied Biosystems) benötigt. Die Reagenzien wurden, mit Ausnahme der AmpliTaq - Polymerase, aus dem Tiefkühler auf Raumtemperatur gebracht. Zunächst erfolgte die Herstellung des Master - Mix im Prä - PCR - Raum. Die hierzu benötigten Reagenzien sind in Tabelle 20 aufgelistet. Um den beim Pipettieren auftretenden Volumenverlust auszugleichen, wurde der Mastermix für eine Probe mehr als eigentlich erforderlich ($n \text{ Proben} + 1$) angesetzt.

Tabelle 20: Zusammensetzung des Master - Mix

Reagenzien	Menge/Probe (μl /Ansatz)
AmpliAq DNA Polymerase	0,5 μl
GeneAmp 10X PCR buffer	2,5 μl
Primer Mix (spezifisch für den Erreger)	2 μl
Rep-PCR MM1	18 μl

Pro Probe wurden mit einer Eppendorfpipette 23 μl von diesem Master Mix in ein 1,5 ml nukleasefreies Reaktionsgefäß (Biozym, Deutschland) gegeben, kurz gevortext und zentrifugiert.

Anschließend wurde unter einer Laminar Air Flow – Werkbank (Typ CA / RE 4, Clean Air, Deutschland) 1 μl der präparierten Bakterien - DNA (siehe Abschnitt 3.2.6.1) hinzu pipettiert. Zur Qualitätskontrolle wurde statt der präparierten Bakterien - DNA in ein Reaktionsgefäß die im Kit enthaltene Positivkontrolle und in ein anderes die Negativkontrolle pipettiert. Die Reaktionsgefäße befanden sich während der gesamten Zeit, in der die PCR - Ansätze angesetzt wurden, in einem Kühlblock (Eppendorf, Deutschland).

Auftrennung und Detektion der DNA - Fragmente nach rep - PCR

Die PCR - Reaktionsgefäße wurden in den auf 94°C vorgeheizten Thermocycler gestellt und die PCR gestartet. Die verschiedenen Reaktionsschritte der PCR sind Tabelle 21 zu entnehmen.

Tabelle 21: Reaktionsschritte der PCR

Reaktionsschritt	Temperatur (°C)	Zeit (Sec)	Zyklus
Erste Denaturierung	94°C	120 sec	1 Zyklus
Denaturierung	94°C	30 sec	35 Zyklen
Annealing	50°C (Escherichia Kit) bzw. 65°C (Serratia Kit)	30 sec	
Extension	70°C	90 sec	
Finale Extension	70°C	180 sec	1 Zyklus
Hold	4 °C	--	

Im letzten Schritt der PCR kühlte der Thermocycler auf 4°C herunter, so dass die DNA bis zur weiteren Bearbeitung gekühlt wurde.

Auftrennung und Detektion der DNA - Fragmente nach rep - PCR

Die Auftrennung und Detektion der in der rep - PCR amplifizierten DNA - Fragmente erfolgte mithilfe von Microfluid - Chips und dem Agilent 2100 Bioanalyzer (BioMerieux, Deutschland).

Die Microfluid - Chips besitzen 13 Vertiefungen (Wells) zur Probenaufnahme und ein System von Mikrokanälen, die mit einem Gel – Farbstoff - Gemisch (Gel – Dye - Mix) gefüllt werden und zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA - Fragmenten einer Größe von 200 bp bis über 2000 bp dienen. Bei der elektrophoretischen Auftrennung werden die DNA - Fragmente durch den interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff markiert und können so im Agilent 2100 Bioanalyzer detektiert und sowohl als Banden in einem Gelbild als auch als Peaks in einem Elektropherogramm dargestellt werden.

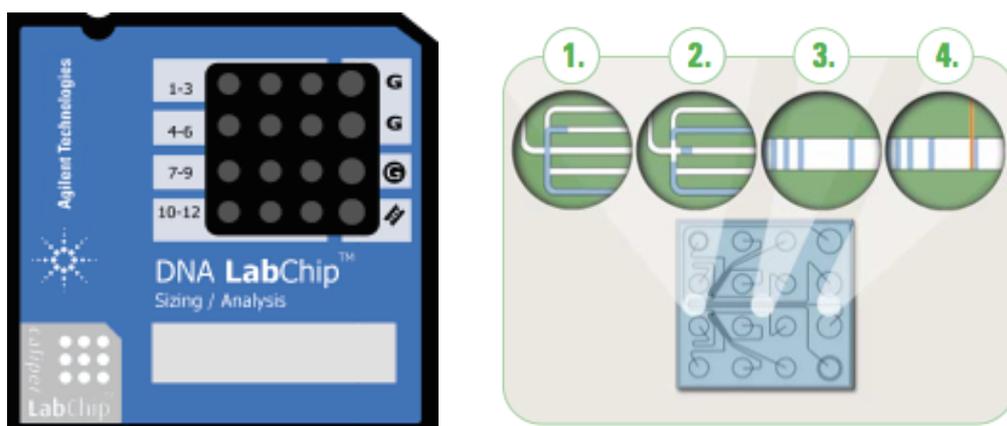


Abbildung 9 a und 9 b: Prinzip der vom Agilent 2100 Bioanalyzer verwendeten Mikrofluid - Chips (aus Agilent Technologies Technisches Handbuch, 2007)

9 a:

1 - 12 Vertiefung für die 12 Proben

G1 - G3 Vertiefungen zur Befüllung mit Gel

Leiter - Symbol: Vertiefung für den DNA - Marker

9 b:

1 und 2: Die Proben werden nacheinander durch die Mikrokanäle in den Trennkanal transportiert.

3: Die Probenkomponenten werden elektrophoretisch getrennt

4: Die Komponenten werden durch eingelagerten Fluoreszenzfarbstoff detektiert und in gelartige Bilder (Banden) und Elektropherogramme (Peaks) übersetzt

Der Agilent 2100 Bioanalyzer (BioMerieux, Deutschland) wurde mindestens 30 Minuten vor dem Lauf eingeschaltet. Mithilfe der DiversiLab - Software wurde ein Datenblatt zu Erfassung der zu analysierenden Proben erstellt.

Alle für die Chipbeladung benötigten Reagenzien wurden ebenfalls 30 Minuten vor dem Ansatz aus dem Kühlschrank genommen und auf Raumtemperatur gebracht. Wegen der Lichtempfindlichkeit des Fluoreszenzfarbstoffs musste die Aufbewahrungsbox des Gel - Dye - Mixes dabei geschlossen bleiben.

Zunächst wurde der Gel - Dye - Mix vorbereitet: Die DNA - Gelmatrix und das DNA - Dye - Konzentrat wurden kurz gevortext und zentrifugiert. Anschließend wurden 200 µl DNA - Gelmatrix und 10 µl DNA - Dye - Konzentrat in einem 1,5 ml Eppendorf - Tube gemischt und für 5 - 10 Sekunden gevortext. Der Mix wurde in einen Spin - Filter überführt und bei 1,500 g für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Der zu beladende Chip wurde in die Chip - Priming - Station eingelegt. In das für die Gelbeladung vorgesehene erste, mit „G“ bezeichnete Well wurden luftblasenfrei 9 µl Gel - Dye - Mix pipettiert. Der Deckel der Chip - Priming - Station wurde geschlossen und der Stempel einer mit der Priming - Station verbundenen luftgefüllten 1 ml - Spritze heruntergedrückt und mit einer Klammer für 30 Sekunden arretiert. Durch den dabei entstehenden Luftdruck wurde der Gel - Dye - Mix in den Mikrokanälen verteilt. Nachdem der Spritzenstempel nach Lösen der Arretierung selbsttätig wieder in seine Startposition zurückgekehrt war, wurden die beiden übrigen „G“ - Wells mit 9 µl Gel - Mix verschlossen und der Chip aus der Priming - Station entfernt.

In alle 12 Probenwells des Chips wurden dann zunächst 5 µl des zum Kit gehörenden DNA - Markers pipettiert und anschließend je 1 µl des zu untersuchenden PCR - Produktes. In das 13. Well des Chips wurden zunächst ebenfalls 5 µl DNA - Marker und dann 1 µl eines DNA - Größenstandards (Fragmentgrößen von 150 bp bis 7,000 bp) pipettiert. Sowohl der in alle Wells pipettierte DNA - Marker als auch der Größenstandard dienten zur Kontrolle und Standardisierung der Gelläufe.

Schließlich wurde der Chip exakt 1 Minute mithilfe eines Adapters gevortext und zuletzt in den Agilent 2100 Bioanalyzer gesetzt. Sobald nach Schließen der Analyzer - Klappe eine Chip - Abbildung auf dem PC - Bildschirm erschien, wurde die von der DiversiLab - Software vergebene Chip - Nummer eingetragen und der Gellauf gestartet. Nach ca. 60 Minuten konnte der Gellauf beendet werden. Abschließend wurde der Bioanalyzer mithilfe eines Reinigungschips, in den 350 µl steriles Nuklease - freies Wasser pipettiert wurden, 1 Minute gereinigt, bevor das Gerät entweder ausgeschaltet oder mit einem neuen Chip beladen wurde.

Beurteilung der Bandenmuster und Elektropherogramme mithilfe der Diversilab - Software

Die beim Chip - Gellauf detektierten Banden bzw. Peaks wurden vom Agilent 2100 Bioanalyzer in die Auswertungs - Software des DiversiLabs - Systems übertragen. Zunächst wurde jeder Probenlauf einer automatischen Qualitätskontrolle unterzogen: Die Intensität der Banden bzw. Höhe der Peaks für die Probenfragmente musste mindestens 50 Fluoreszenz - Einheiten betragen, die Position der beiden Markerpeaks

musste bei ca. 1000 bis 1500 bzw. 3000 bis 3500 Datenpunkten liegen, die Höhe der beiden Markerpeaks musste mindestens 300 Fluoreszenz - Einheiten betragen und der Fluoreszenz - Hintergrund musste geringer als die Fluoreszenz der DNA - Fragmente sein. Nur wenn alle diese Kriterien erfüllt waren, konnte das detektierte Bandenmuster / Elektropherogramm auch für die Analyse freigegeben werden. Wurden die Qualitätskriterien nicht erfüllt, musste der Probenlauf wiederholt werden.

Die Übereinstimmung der Bandenmuster / Elektropherogramme zweier Proben wurde mittels der Pearsons - Korrelation durch die DiversiLab - Software berechnet. Dabei gehen sowohl die Intensität der Banden / Höhe der Peaks als auch die Position der Banden / Peaks in die Beurteilung ein.

Der Grad der Übereinstimmung zweier Proben wurde von der DiversiLab - Software folgendermaßen angegeben:

- Als Anteil der sowohl in Intensität als auch in der Position übereinstimmenden Banden / Peaks in Prozent
- Graphisch als Dendrogramm, wobei Proben, die in ihrem Bandenmuster / Elektropherogramm starke Übereinstimmungen zeigen, im Dendrogramm nahe beieinander abzweigen, während Proben mit geringer Übereinstimmung weit voneinander entfernt abzweigen. Proben, die eine große Übereinstimmung im Bandenmuster / Elektropherogramm zeigen und von einem gemeinsamen Punkt abzweigen, werden dabei als Cluster bezeichnet.
- Als Ähnlichkeits - Matrix, in der die Probenisolate als Kästchen angezeigt werden. Zeigen die Proben in ihrem Bandenmuster / Elektropherogramm eine große Übereinstimmung, liegen die Kästchen nahe beieinander. Ist die Übereinstimmung zwischen zwei Probenisolaten gering, liegen die Kästchen weit voneinander entfernt. Der Grad der Übereinstimmung wird zusätzlich durch eine Farbkodierung angezeigt:
 - Dunkelrot: 95 – 100 % Übereinstimmung
 - Hellrot: 90 – 95 % Übereinstimmung
 - Blau: 80 – 90 % Übereinstimmung
 - Gelb: 70 – 80 % Übereinstimmung
 - Grau: < 70 % Übereinstimmung

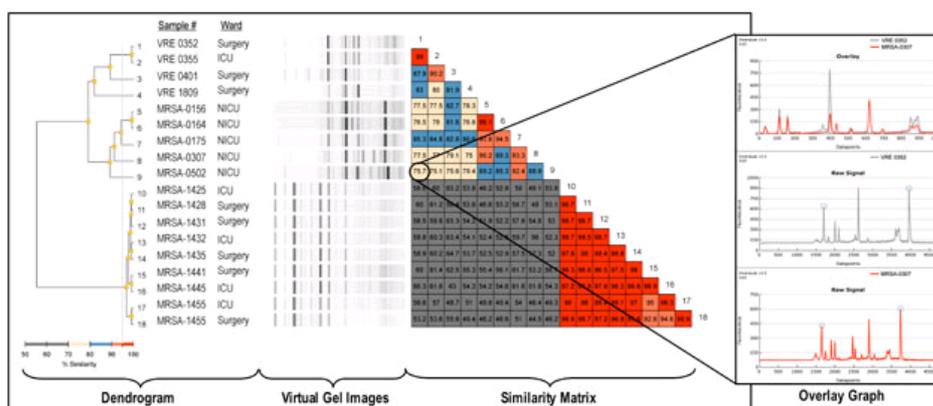


Abbildung 10: Darstellung der rep - PCR Ergebnisse im DiversiLab System

Um die Reproduzierbarkeit des DiversiLab - Systems zu überprüfen, wurde bei jedem Chip derselbe ATCC - Kontrollstamm für die zu untersuchende Erregerspezies mitgeführt (*E. coli* ATCC 25922 für *Escherichia spp.* bzw. *S. marcescens* ATCC 8100 für *S. fonticola* – Untersuchungen). Der Vergleich der Untersuchungsergebnisse für

diese Referenzstämme sollte außerdem dazu dienen, einen Cut – off - Wert für den Übereinstimmungsgrad bei identischen Isolaten dieser Erregerspezies festzulegen.

3.2.6 Versuch zur Übertragung von ESBL - positiven Erregern bei der Verarbeitung von Lebensmittelproben

Beim Umgang mit Lebensmitteln, die mit ESBL - positiven Erregern kontaminiert sind, könnte es in der Küche zur Übertragung auf Küchenutensilien und andere Lebensmittel kommen. Dies könnte beim Verzehr von Lebensmitteln, die anschließend nicht mehr erhitzt und roh verzehrt werden, auch zur Übertragung der ESBL - positiven Erreger auf den Konsumenten führen. Mit dem folgenden Versuch sollte diese theoretische Übertragungsmöglichkeit ESBL - bildender Bakterien praktisch überprüft werden. Dazu wurde zunächst von frischen und rohen Hähnchenbrustproben, die bei der ersten Untersuchung auf ESBL - bildende Erreger positiv getestet worden waren, erneut wie unter Punkt 3.2.1 beschrieben 5 g mit einem sterilen Skalpell und einer sterilen Pinzette entnommen und auf einer sterilen Petrischale zerkleinert. Das zerkleinerte Hähnchenfleisch wurde wie unter Punkt 3.2.1 beschrieben in TSB bei 37°C über Nacht bebrütet und weiter untersucht.

Das verwendete Skalpell, die verwendete Pinzette und die verwendete Petrischale wurden anschließend jedoch nicht wie unter Punkt 3.2.1 verworfen bzw. aufbereitet, sondern für die Verarbeitung der nächsten Lebensmittelprobe weiter benutzt (so, wie in der Küche auch Messer und Schneidebrett möglicherweise weiterverwendet werden).

Hierzu wurden erst 5 g von einer frischen, rohen Salatgurke mit einer neuen sterilen Pinzette und einem neuen sterilen Skalpell entnommen und dann mit den zum Zerkleinern des Hähnchenfleisches verwendeten Skalpell und Pinzette und auf der zuvor für das Hähnchenfleisch verwendeten Petrischale zerkleinert.

In einem Kontrollansatz wurden 5 g derselben Salatgurke mit neuen und sterilen Instrumenten auf einer neuen sterilen Petrischale zerkleinert.

Die zerkleinerten Salatgurkenproben wurden ebenfalls in TSB überführt und wie beschrieben auf ESBL - positive Erreger untersucht.

Dieser Versuch wurde insgesamt 25 Mal durchgeführt.

Wurden sowohl bei einer Hähnchenbrustprobe als auch bei der anschließend mit denselben Utensilien (Skalpell, Pinzette, Petrischale) zerkleinerten Salatgurkenprobe ESBL - positive Erreger derselben Bakteriespezies kultiviert, wurden die Isolate zunächst asserviert.

Zu einem späteren Zeitpunkt schloss sich eine repetitive extragenomic palindromic (rep) – PCR - Untersuchung beider Isolate an, um die Identität der Erreger zu überprüfen.

4 Ergebnisse

4.1 Nachweis von ESBL - produzierenden Erregern in den Lebensmittelproben

ESBL - produzierende Enterobakterien wurden ausschließlich in den untersuchten Fleischproben nachgewiesen.

Bei den 50 untersuchten Hähnchenbrustfilets gelang der kulturelle Nachweis und die anschließende phänotypische Bestätigung von ESBL - positiven Bakterien mittels der Combination disc - Methode in 44 der Proben (88 %, Tabelle 22). Unterschiede bezüglich der Herkunft der untersuchten Proben konnten nicht festgestellt werden, alle 5 untersuchten Supermärkte waren gleichermaßen betroffen. Die Identifizierung der nachgewiesenen ESBL - positiven Erreger mit dem Vitek - Automaten ergab bei 34 Proben den Nachweis von *E. coli* (davon bei 6 Proben zusammen mit *S. fonticola*), zusätzlich in 8 Proben den Nachweis von *S. fonticola* und in 2 weiteren Proben den Nachweis von *E. fergusonii*.

Tabelle 22: Nachweis von ESBL - positiven Erregern in Hähnchenbrustproben

Supermarkt	Anzahl der Proben	Anzahl der ESBL-positiven Proben	Nachgewiesene Erregerspezies
Aldi	10	9	<ul style="list-style-type: none"> in 7 Proben <i>E. coli</i> (in einer Probe zusammen mit <i>S. fonticola</i>)
			<ul style="list-style-type: none"> in 2 Proben <i>S. fonticola</i> allein
Kaisers	10	9	<ul style="list-style-type: none"> in 8 Proben <i>E. coli</i> (in 3 Proben zusammen mit <i>S. fonticola</i>)
			<ul style="list-style-type: none"> in einer Probe <i>S. fonticola</i> allein
Lidl	10	8	<ul style="list-style-type: none"> in 4 Proben <i>E. coli</i>
			<ul style="list-style-type: none"> in 4 Proben <i>S. fonticola</i>
Netto	10	9	<ul style="list-style-type: none"> in 7 Proben <i>E. coli</i> (in 2 Proben zusammen mit <i>S. fonticola</i>)
			<ul style="list-style-type: none"> in 2 Proben <i>E. fergusonii</i>
Rewe	10	9	<ul style="list-style-type: none"> in 8 Proben <i>E. coli</i>
			<ul style="list-style-type: none"> in einer Probe <i>S. fonticola</i>

Bei den Rinderhackfleischproben wurde in 7 der insgesamt 60 untersuchten Proben (12 %) ESBL - positive Erreger nachgewiesen (Tabelle 23). Da 5 der 7 positiven Proben aus demselben Supermarkt (Satici) stammten (4 *E. coli* – Isolate und 1 *S. fonticola* – Isolat) wurden abweichend vom üblichen Vorgehen zur Kontrolle 60 statt 50 Hackfleischproben untersucht. Bei den zwei übrigen Nachweisen handelte es sich um *S. fonticola* - Isolate (in jeweils einer Probe von Netto und einem Fleischer aus der Marheineken - Markthalle).

Tabelle 23: Nachweis von ESBL - positiven Erregern in Rinderhackfleischproben

Supermarkt	Anzahl der Proben	Anzahl der ESBL positiven Proben	Nachgewiesene Erregerspezies
Edeka	10	0	--
Frischetheke Marheineken-Markthalle	10	1	• in einer Probe <i>S. fonticola</i>
Lidl	10	0	--
Netto	10	1	• in einer Probe <i>S. fonticola</i>
Rewe	10	0	--
Satici	10	5	• in 4 Proben <i>E. coli</i>
			• in einer Probe <i>S. fonticola</i>

Beim Schweinehackfleisch wurden in 7 der 50 (14 %) untersuchten Proben ESBL - produzierende Bakterien nachgewiesen (Tabelle 24). Es handelte sich dabei in 6 Fällen um *E. coli* – Isolate (in 5 Proben von REWE und einer Probe von Netto) und in einem Fall um ein *S. fonticola* – Isolat (in einer Probe aus der Frischetheke eines LPG - Supermarktes).

Tabelle 24: Nachweis von ESBL - positiven Erregern in Schweinehackfleischproben

Supermarkt	Anzahl der Proben	Anzahl der ESBL - positiven Proben	Nachgewiesene Erregerspezies
Edeka	10	0	--
Frischetheke LPG	10	1	• in einer Probe <i>S. fonticola</i>

Supermarkt	Anzahl Proben	der	Anzahl der ESBL - positiven Proben	Nachgewiesene Erregerspezies
Lidl	10		0	--
Netto	10		1	• in einer Probe <i>E. coli</i>
REWE	10		5	• in 5 Proben <i>E. coli</i>

In den übrigen Lebensmittelproben (Salatgurken, Lachs, Sprossengemüse, Tofu, Radieschen, Zwiebeln und Frühlingszwiebeln) konnten keine ESBL - produzierenden Erreger nachgewiesen werden.

Eine detaillierte und probenbezogene Einzeldarstellung der Untersuchungsergebnisse kann den Tabellen 37 bis 40 entnommen werden.

4.2 Antibiotikaresistenzen der aus den Lebensmittel isolierten ESBL - positiven Erreger

4.2.1 Antibiotikaresistenzen der *E. coli* – Isolate

4.2.1.1. *E. coli* – Isolate aus Hühnerbrustproben

Von den 35 phänotypisch nachgewiesenen ESBL - produzierenden *E. coli* – Isolaten aus den Hähnchenbrustfilets wiesen alle 35 eine Resistenz (MHK intermediär oder resistent) gegenüber Ampicillin, 18 (51 %) gegenüber Ampicillin / Sulbactam, 35 (100 %) gegenüber Piperacillin, 27 (77 %) gegenüber Cefuroxim, 27 (77 %) gegenüber Cefuroxim – Axetil, 35 (100 %) gegenüber Cefpodoxim, 27 (77 %) gegenüber Cefotaxim, 19 (54 %) gegenüber Ceftazidim, 12 (34 %) gegenüber Ciprofloxacin, 20 (57 %) gegenüber Moxifloxacin und 18 (51 %) gegenüber Trimethoprim / Sulfamethoxazol auf.

Alle 35 ESBL - produzierenden *E. coli* - Isolate aus den Hähnchenbrustfilets zeigten sich gegenüber der Antibiotikakombination Piperacillin / Tazobactam und den Einzelsubstanzen Ertapenem, Imipenem, Meropenem, Gentamicin und Tigecyclin sensibel (siehe Tabelle 25).

Tabelle 25: Resistenzergebnisse der *E. coli* – Isolate aus Hühnerbrustproben

Proben- nr.	MHK-Wert [mg / l]																
	AMP	ASU	PIP	PTA	CRX	CAX	CPD	CTX	CAZ	ETP	IMI	MEM	GEN	CIP	MOX	TIG	SXT
G 1.1	≥32	≤2	≥128	≤4	4	4	2	≤1	4	≤0,5	≤0,25	≤0,25	≤1	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤20
G 1.2	≥32	16	≥128	≤4	≥64	≥64	≥8	8	≤1	≤0,5	≤0,25	≤0,25	≤1	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≥320
G 1.3	≥32	16	≥128	≤4	≥64	≥64	≥8	8	≤1	≤0,5	≤0,25	≤0,25	≤1	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≥320
G 1.4.1	≥32	≤2	≥128	≤4	4	4	≥8	≥64	16	≤0,5	≤0,25	≤0,25	≤1	≥4	≥8	≤0,5	≥320
G 1.6.1	≥32		≥128	≤4	≥64	≥64	≥8	8	≤1	≤0,5	≤0,25	≤0,25	≤1	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤20
G 1.7	≥32	≤2	≥128	≤4	4	4	≥8	≤1	16	≤0,5	≤0,25	≤0,25	≤1	≥4	≥8	≤0,5	≥320
G 1.9	≥32	≤2	16	≤4	4	4	≥8	≤1	4	≤0,5	≤0,25	≤0,25	≤1	≥4	≥8	≤0,5	≥320
G 2.4	≥32	≤2	≥128	≤4	4	4	≥8	≤1	4	≤0,5	≤0,25	≤0,25	≤1	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≥320
G 2.5.1	≥32	≤2	64	≤4	16	16	≥8	≤1	≤1	≤0,5	≤0,25	≤0,25	≤1	≥4	≥8	≤0,5	≥320
G 2.6	≥32	≤2	≥128	≤4	4	4	2	≤1	≤1	≤0,5	≤0,25	≤0,25	≤1	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≥320
G 2.7	≥32	16	≥128	≤4	≥64	≥64	≥8	8	≤1	≤0,5	≤0,25	≤0,25	≤1	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤20
G 2.8	≥32	16	≥128	≤4	≥64	≥64	≥8	16	≤1	≤0,5	≤0,25	≤0,25	≤1	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤20
G 2.9	≥32	16	≥128	≤4	≥64	≥64	≥8	16	≤1	≤0,5	≤0,25	≤0,25	≤1	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤20
G 2.10	≥32	16	≥128	≤4	≥64	≥64	≥8	8	≤1	≤0,5	≤0,25	≤0,25	≤1	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤20
G	≥32	16	≥128	≤4	≥64	≥64	≥8	≥64	≤1	≤0,5	≤0,25	≤0,25	≤1	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≥320

Proben-nr.	MHK-Wert [mg / l]																
	AMP	ASU	PIP	PTA	CRX	CAX	CPD	CTX	CAZ	ETP	IMI	MEM	GEN	CIP	MOX	TIG	SXT
3.1.1																	
G 3.3.1	≥32	≤2	≥128	≤4	≥64	≥64	≥8	≥64	≤1	≤0,5	≤0,25	≤0,25	≤1	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≥320
G 3.5.1	≥32	≤2	≥128	≤4	≥64	≥64	≥8	≥64	≤1	≤0,5	≤0,25	≤0,25	≤1	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≥320
G 3.6	≥32	≤2	≥128	≤4	32	32	≥8	≥64	≥64	≤0,5	≤0,25	≤0,25	≤1	0,5	2	≤0,5	≤20
G 3.7	≥32	≤2	≥128	≤4	16	16	≥8	≥64	≥64	≤0,5	≤0,25	≤0,25	≤1	≤0,25	2	≤0,5	≤20
G 3.8	≥32	≤2	≥128	≤4	32	32	≥8	≥64	≥64	≤0,5	≤0,25	≤0,25	≤1	0,5	2	≤0,5	≤20
G 3.9	≥32	≤2	≥128	≤4	32	32	≥8	≥64	≥64	≤0,5	≤0,25	≤0,25	≤1	≤0,25	2	≤0,5	≤20
G 3.10	≥32	8	≥128	≤4	≥64	≥64	≥8	8	16	≤0,5	≤0,25	≤0,25	≤1	2	≥8	≤0,5	≤20
G 4.1	≥32	16	≥128	≤4	≥64	≥64	≥8	16	≤1	≤0,5	≤0,25	≤0,25	≤1	≤0,25	1	≤0,5	≥320
G 4.4	≥32	≤2	≥128	≤4	4	4	2	≤1	4	≤0,5	≤0,25	≤0,25	≤1	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤20
G 4.5	≥32	16	≥128	≤4	≥64	≥64	≥8	≥64	≤1	≤0,5	≤0,25	≤0,25	≤1	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤20
G 4.6	≥32	16	≥128	≤4	16	16	≥8	4	16	≤0,5	≤0,25	≤0,25	≤1	≥4	≥8	≤0,5	≥320
G 4.7	≥32	≤2	≥128	≤4	≥64	≥64	≥8	4	16	≤0,5	≤0,25	≤0,25	≤1	≤0,25	1	≤0,5	≤20
G 4.8	≥32	16	≥128	≤4	16	16	≥8	4	16	≤0,5	≤0,25	≤0,25	≤1	≥4	≥8	≤0,5	≥320
G 4.9	≥32	16	≥128	≤4	16	16	≥8	4	16	≤0,5	≤0,25	≤0,25	≤1	≥4	≥8	≤0,5	≥320
G 4.10	≥32	16	≥128	≤4	16	16	≥8	4	16	≤0,5	≤0,25	≤0,25	≤1	≥4	≥8	≤0,5	≥320

Proben- nr.	MHK-Wert [mg / l]																
	AMP	ASU	PIP	PTA	CRX	CAX	CPD	CTX	CAZ	ETP	IMI	MEM	GEN	CIP	MOX	TIG	SXT
G 5.2	≥32	16	≥128	≤4	≥64	≥64	≥8	8	≤1	≤0,5	≤0,25	≤0,25	≤1	≤0,25	1	≤0,5	≥320
G 5.4	≥32	≤2	≥128	≤4	4	4	4	≤1	4	≤0,5	≤0,25	≤0,25	≤1	1	0,5	≤0,5	≤20
G 5.5	≥32	16	≥128	≤4	≥64	≥64	≥8	16	≤1	≤0,5	≤0,25	≤0,25	≤1	≤0,25	0,5	≤0,5	≥320
G 5.8	≥32	16	≥128	≤4	16	16	≥8	4	16	≤0,5	≤0,25	≤0,25	≤1	≤0,25	2	≤0,5	≤20
G 5.10	≥32	16	≥128	≤4	16	16	≥8	4	16	≤0,5	≤0,25	≤0,25	≤1	≤0,25	2	≤0,5	≤20

AMP, Ampicillin; ASU, Ampicillin / Sulbactam; PIP, Piperacillin; PTA, Piperacillin / Tazobactam; CRX, Cefuroxim; CAX, Cefuroxim-Axetil; CPD, Cefpodoxim; CTX, Cefotaxim; CAZ, Ceftazidim; ETP, Ertapenem; IMI, Imipenem; MEM, Meropenem; GEN, Gentamicin; CIP, Ciprofloxacin; MOX, Moxifloxacin; TIG, Tigecyclin; SXT, Trimethoprim / Sulfamethoxazol
 Interpretation (EUCAST 2017) Grau: resistent (R); hellgrau: intermediär (I); weiß: sensibel (S)

4.2.1.2. *E. coli* – Isolate aus Rinderhackfleischproben

Von den 4 phänotypisch nachgewiesenen ESBL - produzierenden *E. coli* – Isolaten aus den Rinderhackfleischproben wiesen alle 4 eine Resistenz gegenüber Ampicillin, Ampicillin / Sulbactam, Piperacillin, Cefuroxim, Cefuroxim – Axetil, Cefpodoxim und Cefotaxim auf. Gegen Gentamicin, Ciprofloxacin, Moxifloxacin und Trimethoprim / Sulfamethoxazol wurden 3 Isolate (75 %) resistent getestet. Alle 4 *E. coli* – Isolate zeigten sich gegenüber der Antibiotikakombination Piperacillin / Tazobactam und den Einzelsubstanzen Ceftazidim, Ertapenem, Imipenem, Meropenem und Tigecyclin sensibel (siehe Tabelle 26).

Tabelle 26: Resistenzergebnisse der ESBL - positiven *E. coli* - Isolate aus Rinderhackfleischproben

Proben- nr.	MHK-Wert [mg / l]																
	AMP	ASU	PIP	PTA	CRX	CAX	CPD	CTX	CAZ	ETP	IMI	MEM	GEN	CIP	MOX	TIG	SXT
R 1.1	≥32	16	≥128	≤4	≥64	≥64	≥8	8	≤1	≤0,5	≤0,25	≤0,25	≥16	≥4	≥8	≤0,5	≥320
R 1.3	≥32	16	≥128	≤4	≥64	≥64	≥8	≥64	≤1	≤0,5	≤0,25	≤0,25	≤1	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤20
R 1.4	≥32	16	≥128	≤4	≥64	≥64	≥8	8	≤1	≤0,5	≤0,25	≤0,25	≥16	≥4	≥8	≤0,5	≥320
R 1.5	≥32	16	≥128	≤4	≥64	≥64	≥8	8	≤1	≤0,5	≤0,25	≤0,25	≥16	≥4	≥8	≤0,5	≥320

AMP, Ampicillin; ASU, Ampicillin / Sulbactam; PIP, Piperacillin; PTA, Piperacillin / Tazobactam; CRX, Cefuroxim; CAX, Cefuroxim-Axetil; CPD, Cefpodoxim; CTX, Cefotaxim; CAZ, Ceftazidim; ETP, Ertapenem; IMI, Imipenem; MEM, Meropenem; GEN, Gentamicin; CIP, Ciprofloxacin; MOX, Moxifloxacin; TIG, Tigecyclin; SXT, Trimethoprim / Sulfamethoxazol
 Interpretation ((EUCAST (2017)): Grau: resistant (R); weiß: sensibel (S)

4.2.1.3. *E. coli* – Isolate aus Schweinehackfleischproben

Von den 6 phänotypisch nachgewiesenen ESBL - produzierenden *E. coli* – Isolaten aus den Schweinehackfleischproben wiesen alle 6 eine Resistenz (MHK intermediär oder resistent) gegenüber Ampicillin, Ampicillin / Sulbactam, Piperacillin, Cefuroxim, Cefuroxim – Axetil, Cefpodoxim und Cefotaxim, sowie jeweils 1 Isolat (17 %) gegenüber Ceftazidim, Ertapenem und Trimethoprim / Sulfamethoxazol auf. Alle 6 ESBL - produzierenden *E. coli* - Isolate aus den Schweinehackfleischproben zeigten sich gegenüber der Antibiotikakombination Piperacillin / Tazobactam und den Einzelsubstanzen Imipenem, Meropenem, Gentamicin, Ciprofloxacin, Moxifloxacin und Tigecyclin sensibel (siehe Tabelle 27).

Tabelle 27: Resistenzergebnisse der ESBL - positiven *E. coli* - Isolate aus Schweinehackfleischproben

Proben- nr.	MHK-Wert [mg / l]																
	AMP	ASU	PIP	PTA	CRX	CAX	CPD	CTX	CAZ	ETP	IMI	MEM	GEN	CIP	MOX	TIG	SXT
S 3.1	≥32	16	≥128	≤4	≥64	≥64	≥8	8	≤1	≤0,5	≤0,25	≤0,25	≤1	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≥320
S 3.2	≥32	16	≥128	≤4	≥64	≥64	≥8	8	≤1	≤0,5	≤0,25	≤0,25	≤1	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤20
S 3.3	≥32	16	≥128	≤4	≥64	≥64	≥8	16	≤1	≤0,5	≤0,25	≤0,25	≤1	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤20
S 3.4	≥32	16	≥128	≤4	≥64	≥64	≥8	8	2	1	≤0,25	≤0,25	≤1	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤20
S 3.5	≥32	16	≥128	≤4	≥64	≥64	≥8	8	≤1	≤0,5	≤0,25	≤0,25	≤1	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤20
S 4.4	≥32	16	≥128	≤4	≥64	≥64	≥8	≥64	≤1	≤0,5	≤0,25	≤0,25	≤1	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤20

AMP, Ampicillin; ASU, Ampicillin / Sulbactam; PIP, Piperacillin; PTA, Piperacillin / Tazobactam; CRX, Cefuroxim; CAX, Cefuroxim-Axetil; CPD, Cefpodoxim; CTX, Cefotaxim; CAZ, Ceftazidim; ETP, Ertapenem; IMI, Imipenem; MEM, Meropenem; GEN, Gentamicin; CIP, Ciprofloxacin; MOX, Moxifloxacin; TIG, Tigecyclin; SXT, Trimethoprim / Sulfamethoxazol
 Interpretation (EUCAST (2017)): Grau: resistant (R); hellgrau: intermediär (I); weiß: sensibel (S)

4.2.2 Antibiotikaresistenzen der *S. fonticola* – Isolate

4.2.2.1 *S. fonticola* – Isolate aus Hühnerbrustproben

Von den 14 phänotypisch nachgewiesenen ESBL - produzierenden *S. fonticola* - Isolaten aus den Hähnchenbrustfiletproben wiesen alle 14 eine Resistenz (MHK intermediär oder resistent) gegenüber Ampicillin, Cefuroxim, Cefuroxim – Axetil und Cefpodoxim auf sowie 2 (14 %) Isolate gegenüber Cefotaxim. Alle 14 ESBL – produzierenden *S. fonticola* – Isolate aus den Hähnchenbrustfiletproben zeigten sich gegenüber der Antibiotikakombinationen Ampicillin / Sulbactam, Piperacillin / Tazobactam, Trimethoprim / Sulfamethoxazol und den Einzelsubstanzen Piperacillin, Ceftazidim, Ertapenem, Imipenem, Meropenem, Gentamicin, Ciprofloxacin, Moxifloxacin und Tigecyclin sensibel (siehe Tabelle 28).

Tabelle 28: Resistenzergebnisse der *S. fonticola* – Isolate aus Hühnerbrustproben

Proben- nr.	MHK-Wert [mg / l]																
	AMP	ASU	PIP	PTA	CRX	CAX	CPD	CTX	CAZ	ETP	IMI	MEM	GEN	CIP	MOX	TIG	SXT
G 1.4.2	16	≤2	≤4	≤4	≥64	≥64	4	≤1	≤1	≤0,5	0,5	≤0,25	≤1	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤20
G 1.6.2	16	≤2	≤4	≤4	≥64	≥64	2	≤1	≤1	≤0,5	≤0,25	≤0,25	≤1	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤20
G 2.1	≥32	≤2	8	≤4	≥64	≥64	≥8	2	≤1	≤0,5	0,5	≤0,25	≤1	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤20
G 2.3	≥32	4	8	≤4	≥64	≥64	≥8	2	≤1	≤0,5	0,5	≤0,25	≤1	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤20
G 2.5.2	16	≤2	≤4	≤4	≥64	≥64	2	≤1	≤1	≤0,5	1	≤0,25	≤1	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤20
G 3.1.2	16	≤2	≤4	≤4	≥64	≥64	2	≤1	≤1	≤0,5	≤0,25	≤0,25	≤1	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤20
G 3.3.2	≥32	≤2	≤4	≤4	≥64	≥64	≥8	≤1	≤1	≤0,5	≤0,25	≤0,25	≤1	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤20
G 3.4	≥32	≤2	≤4	≤4	≥64	≥64	≥8	≤1	≤1	≤0,5	≤0,25	≤0,25	≤1	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤20
G 3.5.2	16	≤2	≤4	≤4	≥64	≥64	2	≤1	≤1	≤0,5	0,5	≤0,25	≤1	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤20

Proben-nr.	MHK-Wert [mg / l]																
	AMP	ASU	PIP	PTA	CRX	CAX	CPD	CTX	CAZ	ETP	IMI	MEM	GEN	CIP	MOX	TIG	SXT
G 4.3	≥32	≤2	≤4	≤4	≥64	≥64	≥8	≤1	≤1	≤0,5	1	≤0,25	≤1	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤20
G 5.1	16	≤2	≤4	≤4	≥64	≥64	2	≤1	≤1	≤0,5	0,5	≤0,25	≤1	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤20
G 5.6	16	≤2	≤4	≤4	≥64	≥64	2	≤1	≤1	≤0,5	0,5	≤0,25	≤1	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤20
G 5.7	16	≤2	≤4	≤4	≥64	≥64	2	≤1	≤1	≤0,5	0,5	≤0,25	≤1	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤20
G 5.9	16	≤2	≤4	≤4	≥64	≥64	2	≤1	≤1	≤0,5	0,5	≤0,25	≤1	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤20

AMP, Ampicillin; ASU, Ampicillin / Sulbactam; PIP, Piperacillin; PTA, Piperacillin / Tazobactam; CRX, Cefuroxim; CAX, Cefuroxim - Axetil; CPD, Cefpodoxim; CTX, Cefotaxim; CAZ, Ceftazidim; ETP, Ertapenem; IMI, Imipenem; MEM, Meropenem; GEN, Gentamicin; CIP, Ciprofloxacin; MOX, Moxifloxacin; TIG, Tigecyclin; SXT, Trimethoprim / Sulfamethoxazol
 Interpretation (EUCAST (2017)): Grau: resistent (R); hellgrau: intermediär (I); weiß: sensibel (S)

4.2.2.2 *S. fonticola* – Isolate aus Rinderhackfleischproben

Von den 3 phänotypisch nachgewiesenen ESBL - produzierenden *S. fonticola* - Isolaten aus den Rinderhackfleischproben wiesen alle 3 eine Resistenz gegenüber Ampicillin, Cefuroxim, Cefuroxim – Axetil und Cefpodoxim sowie 1 Isolat gegenüber Cefotaxim auf. Alle 3 *S. fonticola* - Isolate aus den Rinderhackfleischproben zeigten sich gegenüber der Antibiotikakombinationen Ampicillin / Sulbactam, Piperacillin / Tazobactam und Trimethoprim / Sulfamethoxazol und den Einzelsubstanzen Piperacillin, Ceftazidim, Ertapenem, Imipenem, Meropenem, Gentamicin, Ciprofloxacin, Moxifloxacin und Tigecylin sensibel (siehe Tabelle 29).

Tabelle 29: Resistenzergebnisse der *S. fonticola* – Isolate aus Rinderhackfleischproben

Proben- nr.	MHK-Wert [mg / l]																
	AMP	ASU	PIP	PTA	CRX	CAX	CPD	CTX	CAZ	ETP	IMI	MEM	GEN	CIP	MOX	TIG	SXT
R 1.7	≥32	≤2	≤4	≤4	≥64	≥64	4	≤1	≤1	≤0,5	1	≤0,25	≤1	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤20
R 3.7	≥32		≤4	≤4	≥64	≥64	4	≤1	≤1	≤0,5	0,5	≤0,25	≤1	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤20
R 6.10	≥32	≤2	≤4	≤4	≥64	≥64	≥8	4	≤1	≤0,5	0,5	0,5	≤1	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤20

AMP, Ampicillin; ASU, Ampicillin / Sulbactam; PIP, Piperacillin; PTA, Piperacillin / Tazobactam; CRX, Cefuroxim; CAX, Cefuroxim - Axetil; CPD, Cefpodoxim; CTX, Cefotaxim; CAZ, Ceftazidim; ETP, Ertapenem; IMI, Imipenem; MEM, Meropenem; GEN, Gentamicin; CIP, Ciprofloxacin; MOX, Moxifloxacin; TIG, Tigecyclin; SXT, Trimethoprim / Sulfamethoxazol
 Interpretation (EUCAST (2017)): Grau: resistant (R); weiß: sensibel (S)

4.2.2.2 *S. fonticola* – Isolate aus Schweinehackfleischproben

Das phänotypisch nachgewiesene ESBL - produzierende *S. fonticola* - Isolat aus der Schweinehackfleischprobe wies Resistenzen gegenüber Ampicillin, Cefuroxim, Cefuroxim – Axetil und Cefpodoxim auf und zeigte sich gegenüber der Antibiotikakombinationen Ampicillin / Sulbactam, Piperacillin / Tazobactam, Trimethoprim / Sulfamethoxazol und den Einzelsubstanzen Piperacillin, Cefotaxim, Ceftazidim, Ertapenem, Imipenem, Meropenem, Gentamicin, Ciprofloxacin, Moxifloxacin und Tigecyclin sensibel (siehe Tabelle 30).

Tabelle 30: Resistenzergebnis des *S. fonticola* – Isolats aus einer Schweinehackfleischprobe

Proben- nr.	MHK-Wert [mg / l]																
	AMP	ASU	PIP	PTA	CRX	CAX	CPD	CTX	CAZ	ETP	IMI	MEM	GEN	CIP	MOX	TIG	SXT
S 5.2	≥32	≤2	≤4	≤4	≥64	≥64	4	≤1	≤1	≤0,5	0,5	≤0,25	≤1	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤20

AMP, Ampicillin; ASU, Ampicillin / Sulbactam; PIP, Piperacillin; PTA, Piperacillin / Tazobactam; CRX, Cefuroxim; CAX, Cefuroxim - Axetil; CPD, Cefpodoxim; CTX, Cefotaxim; CAZ, Ceftazidim; ETP, Ertapenem; IMI, Imipenem; MEM, Meropenem; GEN, Gentamicin; CIP, Ciprofloxacin; MOX, Moxifloxacin; TIG, Tigecyclin; SXT, Trimethoprim / Sulfamethoxazol
 Interpretation (EUCAST (2017)): Grau: resistent (R); weiß: sensibel (S)

4.2.3 Antibiotikaresistenzen der *E. fergusonii* – Isolate

Von den 2 phänotypisch nachgewiesenen ESBL - produzierenden *E. fergusonii* - Isolaten aus den Hähnchenbrustfiletproben wiesen beide eine Resistenz gegenüber Ampicillin, Piperacillin, Cefuroxim, Cefuroxim – Axetil, Cefotaxim und Ceftazidim sowie jeweils 1 Isolat gegenüber Ampicillin / Sulbactam, Cefpodoxim und Moxifloxacin auf. Beide Isolate zeigten sich gegenüber der Antibiotikakombinationen Piperacillin / Tazobactam, Trimethoprim / Sulfamethoxazol und den Einzelsubstanzen Ertapenem, Imipenem, Meropenem, Gentamicin, Ciprofloxacin und Tigecyclin sensibel (siehe Tabelle 31).

Tabelle 31: Resistenzergebnisse der *E. fergusonii* – Isolate aus Hühnerbrustproben

Proben- nr.	MHK-Wert [mg / l]																
	AMP	ASU	PIP	PTA	CRX	CAX	CPD	CTX	CAZ	ETP	IMI	MEM	GEN	CIP	MOX	TIG	SXT
G 1.5	≥32	≤2	≥128	≤4	≥64	≥64	≥8	≥64	≥64	≤0,5	≤0,25	≤0,25	≤1	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤20
G 1.8	≥32	16	≥128	≤4	≥64	≥64	1	32	8	≤0,5	≤0,25	≤0,25	≤1	≤0,25	0,5	≤0,5	≥320

AMP, Ampicillin; ASU, Ampicillin/ Sulbactam; PIP, Piperacillin; PTA, Piperacillin / Tazobactam; CRX, Cefuroxim; CAX, Cefuroxim-Axetil; CPD, Cefpodoxim; CTX, Cefotaxim; CAZ, Ceftazidim; ETP, Ertapenem; IMI, Imipenem; MEM, Meropenem; GEN, Gentamicin; CIP, Ciprofloxacin; MOX, Moxifloxacin; TIG, Tigecyclin; SXT, Trimethoprim / Sulfamethoxazol
 Interpretation (EUCAST (2017)): Grau: resistant (R); weiß: sensibel (S)

4.3 Genotypisierung

4.3.1 Genotypische Untersuchung der ESBL - positiven Isolate mittels der Rep - PCR

Die rep - PCR - Elektropherogramme der insgesamt 65 ESBL - positiven Isolate wurden mithilfe der zum DiversiLab - System gehörenden Software für jede der drei nachgewiesenen Erregerspezies *E. coli* (45 Isolate), *S. fonticola* (18 Isolate) und *E. fergusonii* (2 Isolate) gesondert analysiert, wobei die Analyse der *E. coli* - Isolate nochmals nach Probenart getrennt (Huhn, Rind und Schwein) erfolgte.

Da auf jedem der Microfluid - Chips nur maximal 12 Proben untersucht werden können, wurden für die vergleichende Analyse der Isolate teilweise die Elektropherogramme mehrerer Chips zusammengeführt. Dabei wurden auch die rep - PCR - Elektropherogramme der auf jedem Chip mitgeführten ATCC - Kontrollstämme miteinander verglichen, um so einen Cut - off - Wert für die Übereinstimmung identischer Isolate für jede Erregerspezies festzulegen.

4.3.1.1 ATCC - Referenzstämme

Als Referenzstamm für die DiversiLab - Typisierung der *E. coli* - und *E. fergusonii* - Isolate diente der ATCC - Stamm *E. coli* 25922. Abb. 11 zeigt die aus den Elektropherogrammen von fünf unabhängig voneinander durchgeführten DiversiLab - Rep - PCR - und Agilent - Mikrochipläufen abgeleiteten Bandenmuster und das Ergebnis der Verwandtschaftsanalyse dieser fünf DiversiLab - Typisierungen als Dendrogramm bzw. Ähnlichkeitsmatrix für den *E. coli* - Stamm ATCC 25922 (intern als Referenzstamm 94 bezeichnet). Die Bandenmuster zeigten dabei eine Übereinstimmung von mindestens 96 %, woraus für *Escherichia* - Isolate ein Cut - off - Wert von 95 % Übereinstimmung für nicht - unterscheidbare (identische) Isolate abgeleitet wurde.



Abbildung 11: Verwandtschaftsanalyse für *E. coli* ATCC 25922 Kontrollstämme aus verschiedenen DiversiLab - Typisierungen

Als Referenzstamm für die DiversiLab - Typisierung der *S. fonticola* - Isolate diente der ATCC - Stamm *S. marcescens* 8100 (interne Bezeichnung: Referenzstamm 76). Der

Vergleich von fünf aus DiversiLab – Rep - PCR – und Agilent – Mikrochipläufen abgeleiteten Bandenmustern zeigt auch für diesen Kontrollstamm eine Übereinstimmung von mindestens 96 %, so dass für *Serratia* – Isolate ebenfalls ein Cut - off – Wert von 95 % Übereinstimmung für nicht - unterscheidbare (identische) Isolate abgeleitet wurde.



Abbildung 12: Verwandtschaftsanalyse für *S. marcescens* ATCC 8100 Kontrollstämme aus verschiedenen DiversiLab – Typisierungen

4.3.1.2 Genotypisierung der *E. coli* – Isolate

E. coli – Isolate aus Hühnerbrustproben

Durch die DiversiLab – Typisierung ließen sich die 35 *E. coli* – Isolate aus den Hähnchenbrustproben in 15 unterschiedliche Genotypen (A bis O) unterteilen (Abb. 13 und Tab. 41), wobei insgesamt 8 Cluster (C1 – C8) mit nicht - unterscheidbaren Genotypen (> 95 % Übereinstimmung der Elektropherogramme / Bandenmuster dieser Isolate) auftraten. Übereinstimmungen der Isolate bezüglich der Herkunft der Proben finden sich innerhalb der Cluster C1 (Lidl), C2 (Rewe), C5 (Kaisers), C6 (Netto) und C7 (Kaisers).

Abweichungen der Isolate bezüglich der Herkunft der Proben finden sich innerhalb der Cluster C3, C4 und C8.

Hierbei stammen die Isolate aus Cluster C3 (Isolate der Gruppe H) aus Proben von 4 unterschiedlichen Supermärkten (Aldi, Netto, Rewe und Lidl) und von 3 unterschiedlichen Produzenten, wobei die Proben von Aldi und Netto vom selben Produzenten stammen.

Die Isolate aus Cluster C4 (Isolate der Gruppe I) stammen aus Proben aus unterschiedlichen Supermärkten (Aldi und Netto), weisen jedoch denselben Produzenten auf.

Die Proben aus Cluster C8 (Isolate der Gruppe N) stammen sowohl aus unterschiedlichen Supermärkten (Rewe, Kaisers und Netto) als auch von unterschiedlichen Produzenten (zur Herkunft siehe auch Tabelle 32).

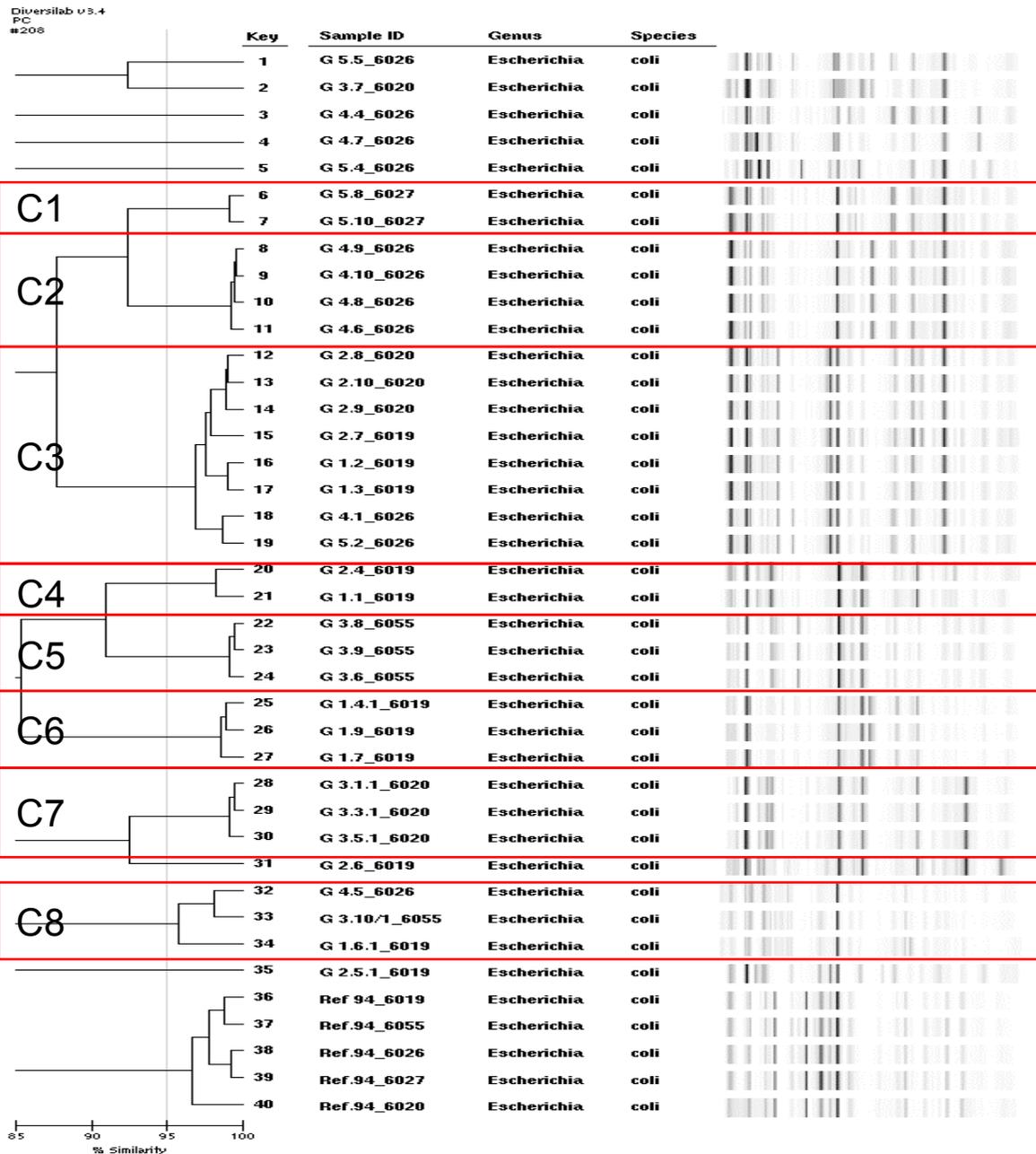


Abbildung 13: Verwandtschaftsanalyse der 35 mit dem DiversiLab System untersuchten *E. coli* – Isolate aus Hühnerbrustproben

C1 – C8: Cluster mit > 95 % Übereinstimmung der Elektropherogramme
Ref.94: *E. coli* ATTC 25922

Tabelle 32: Genotyp und Herkunft der ESBL - positiven *E. coli* – Isolate aus Hühnerbrustproben

Proben nr.	Genotyp	Cluster	Händler	Produzent
G 5.5	A	-	Lidl	Celler Land Frischgeflügel GmbH & Co, Wietze

Proben nr.	Genotyp	Cluster	Händler	Produzent
G 3.7	B	-	Kaisers	Birkenhof GmbH & Co. KG - Fachfleischerei Perwenitz, Schönwalde
G 4.4	C	-	Rewe	Astenhof Frischgeflügel Produktions- und Handels GmbH, Hainspitz
G 4.7	D	-	Rewe	Astenhof Frischgeflügel Produktions- und Handels GmbH, Hainspitz
G 5.4	E	-	Lidl	Celler Land Frischgeflügel GmbH & Co, Wietze
G 5.8	F	C1	Lidl	Celler Land Frischgeflügel GmbH & Co, Wietze
G 5.10			Lidl	Celler Land Frischgeflügel GmbH & Co, Wietze
G 4.9	G	C2	Rewe	Astenhof Frischgeflügel Produktions- und Handels GmbH, Hainspitz
G 4.10			Rewe	Astenhof Frischgeflügel Produktions- und Handels GmbH, Hainspitz
G 4.8			Rewe	Astenhof Frischgeflügel Produktions- und Handels GmbH, Hainspitz
G 4.6			Rewe	Astenhof Frischgeflügel Produktions- und Handels GmbH, Hainspitz
G 2.8	H	C3	Aldi	Märkische Geflügelhof - Spezialitäten GmbH & Co. KG Königs Wusterhausen, Niederlehme
G 2.10			Aldi	Märkische Geflügelhof - Spezialitäten GmbH & Co. KG Königs Wusterhausen, Niederlehme
G 2.9			Aldi	Märkische Geflügelhof - Spezialitäten GmbH & Co. KG Königs Wusterhausen, Niederlehme
G 2.7			Aldi	Märkische Geflügelhof - Spezialitäten GmbH & Co. KG Königs Wusterhausen, Niederlehme
G 1.2			Netto	Märkische Geflügelhof - Spezialitäten GmbH & Co. KG Königs Wusterhausen, Niederlehme
G 1.3			Netto	Märkische Geflügelhof - Spezialitäten GmbH & Co. KG (Wiesenhof) Königs Wusterhausen, Niederlehme
G 4.1			Rewe	Astenhof Frischgeflügel Produktions- und Handels GmbH, Hainspitz
G 5.2			Lidl	Celler Land Frischgeflügel GmbH & Co, Wietze
G 2.4			I	C4

Proben nr.	Genotyp	Cluster	Händler	Produzent
G 1.1			Netto	Märkische Geflügelhof - Spezialitäten GmbH & Co. KG Königs Wusterhausen, Niederlehme
G 3.8	J	C5	Kaisers	Birkenhof GmbH & Co. KG - Fachfleischerei Perwenitz, Schönwalde
G 3.9			Kaisers	Birkenhof GmbH & Co. KG - Fachfleischerei Perwenitz, Schönwalde
G 3.6			Kaisers	Birkenhof GmbH & Co. KG - Fachfleischerei Perwenitz, Schönwalde
G 1.4.1	K	C6	Netto	Märkische Geflügelhof - Spezialitäten GmbH & Co. KG Königs Wusterhausen, Niederlehme
G 1.9			Netto	Märkische Geflügelhof - Spezialitäten GmbH & Co. KG Königs Wusterhausen, Niederlehme
G 1.7			Netto	Märkische Geflügelhof - Spezialitäten GmbH & Co. KG Königs Wusterhausen, Niederlehme
G 3.1.1	L	C7	Kaisers	Birkenhof GmbH & Co. KG - Fachfleischerei Perwenitz, Schönwalde
G 3.3.1			Kaisers	Birkenhof GmbH & Co. KG - Fachfleischerei Perwenitz, Schönwalde
G 3.5.1			Kaisers	Birkenhof GmbH & Co. KG - Fachfleischerei Perwenitz, Schönwalde
G 2.6	M	-	Aldi	Märkische Geflügelhof - Spezialitäten GmbH & Co. KG Königs Wusterhausen, Niederlehme
G 4.5	N	C8	Rewe	Astenhof Frischgeflügel Produktions- und Handels GmbH, Hainspitz
G 3.10			Kaisers	Birkenhof GmbH & Co. KG - Fachfleischerei Perwenitz, Schönwalde
G 1.6.1			Netto	Märkische Geflügelhof - Spezialitäten GmbH & Co. KG Königs Wusterhausen, Niederlehme
G 2.5.1	O	-	Aldi	Märkische Geflügelhof - Spezialitäten GmbH & Co. KG Königs Wusterhausen, Niederlehme

***E. coli* – Isolate aus Rinderhackfleischproben**

Durch die DiversiLab – Typisierung ließen sich die 4 *E. coli* – Isolate aus den Rinderhackfleischproben in 2 unterschiedliche Genotypen (P und Q) unterteilen (Abb. 14, Tab. 42), wobei 3 der Isolate demselben Genotyp angehörten (Genotyp P, Cluster C1, > 95 % Übereinstimmung der Elektropherogramme / Bandenmuster dieser Isolate). Alle 4 *E. coli* – Isolate stammten aus Rinderhackfleischproben desselben Supermarktes (Satici) und vom selben Produzenten.

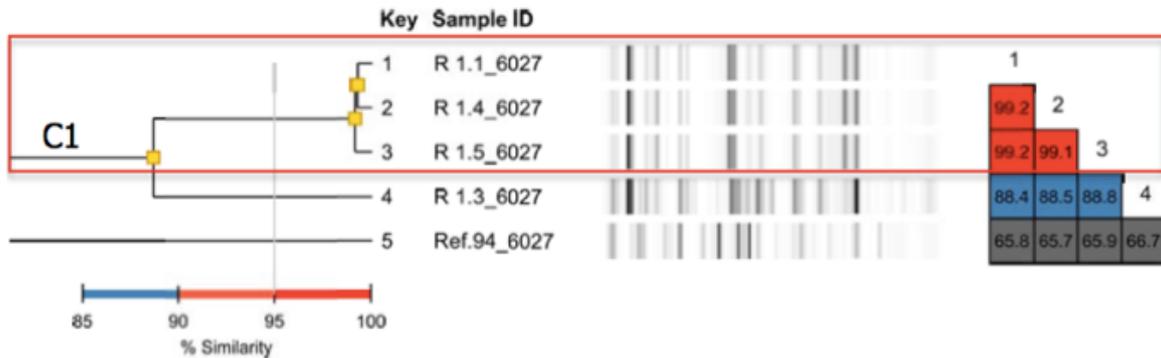


Abbildung 14: Verwandtschaftsanalyse und Ähnlichkeitsmatrix der 4 mit dem DiversiLab System untersuchten *E. coli* – Isolate aus Rinderhackfleischproben

C1: Cluster mit > 95 % Übereinstimmung der Elektropherogramme

Ref.94: *E. coli* ATTC 25922

Tabelle 33: Genotyp und Herkunft der ESBL - positiven *E. coli* – Isolate aus Rinderhackfleischproben

Proben nr	Genotyp	Cluster	Händler	Produzent
R 1.1	P	C1	Satici	Frankenförde GmbH i.G., Frankenförde
R 1.4			Satici	Frankenförde GmbH i.G., Frankenförde
R 1.5			Satici	Frankenförde GmbH i.G., Frankenförde
R 1.3	Q	-	Satici	Frankenförde GmbH i.G., Frankenförde

***E. coli* – Isolate aus Schweinehackfleischproben**

Durch die DiversiLab – Typisierung ließen sich die 6 *E. coli* – Isolate aus den Schweinehackfleischproben in 2 unterschiedliche Genotypen (R und S) unterteilen (Abb. 15, Tab. 43), wobei 5 der Isolate einen nicht - unterscheidbaren Genotyp (> 95 % Übereinstimmung der Elektropherogramme / Bandenmuster dieser Isolate) aufwiesen (Genotyp R, Cluster C1). Diese 5 Isolate stammten aus Proben, die beim selben Händler eingekauft worden waren und auch vom selben Produzenten kamen.

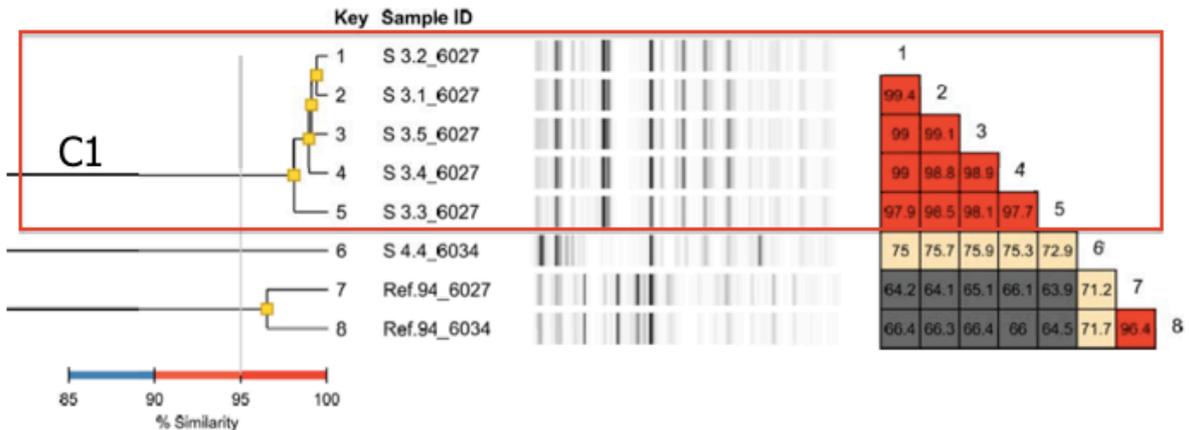


Abbildung 15: Verwandtschaftsanalyse und Ähnlichkeitsmatrix der 6 mit dem DiversiLab System untersuchten *E. coli* – Isolate aus Schweinehackfleischproben

C1: Cluster mit > 95 % Übereinstimmung der Elektropherogramme

Ref.94: *E. coli* ATTC 25922

Tabelle 34: Genotyp und Herkunft der ESBL - positiven *E. coli* – Isolate aus Schweinehackfleischproben

Probennr.	Genotyp	Cluster	Händler	Produzent
S 3.1	R	C1	Rewe	Gut Erkenloh Fleischvertrieb GmbH, Ruppicheroth
S 3.2			Rewe	Gut Erkenloh Fleischvertrieb GmbH, Ruppicheroth
S 3.3			Rewe	Gut Erkenloh Fleischvertrieb GmbH, Ruppicheroth
S 3.4			Rewe	Gut Erkenloh Fleischvertrieb GmbH, Ruppicheroth
S 3.5			Rewe	Gut Erkenloh Fleischvertrieb GmbH, Ruppicheroth
S 4.4	S	-	Netto	Steinemann GmbH & Co. KG, Steinfeld

4.3.1.3 Genotypisierung der *S. fonticola* - Isolate

S. fonticola – Isolate aus Hühnerbrust-, Rinderhackfleisch- und Schweinehackfleisch-proben

Durch die DiversiLab – Typisierung ließen sich die 18 *S. fonticola* – Isolate aus den Hühnerbrust-, Rinderhackfleisch- und Schweinehackfleischproben in 7 unterschiedliche Genotypen unterteilen (A bis G), wobei insgesamt 4 Cluster (C1 – C4) mit nicht -

unterscheidbaren Genotypen (> 95 % Übereinstimmung der Elektropherogramme / Bandenmuster dieser Isolate) auftraten (Abb. 16 und Tab. 44).

Übereinstimmungen der Isolate bezüglich der Herkunft der Proben finden sich innerhalb des Clusters C4 (Hühnerbrustproben von Lidl, Genotyp E).

Cluster C1 (Genotyp A) besteht hingegen aus 2 Isolaten aus Hühnerbrustproben desselben Supermarktes (Aldi) und desselben Produzenten, sowie einem Isolat aus einer Rinderhackfleischprobe, die aus einem anderen Supermarkt (Lidl) und von einem anderen Produzenten stammt. Bei genauer Betrachtung lassen sich 3 Banden Unterschied zwischen den Isolaten aus den Hühnerbrustproben (Genotyp A1) und dem Isolat aus dem Rinderhackfleisch (Genotyp A2) feststellen.

Die Isolate aus Cluster C2 (Genotyp B) stammen aus einer Rinderhackfleisch- und einer Schweinehackfleischprobe aus unterschiedlichen Supermärkten (Schweinehackfleischprobe von LPG und Rinderhackfleischprobe von Satici) und von unterschiedlichen Produzenten. Bei genauer Betrachtung weisen auch diese beiden Isolate geringfügige Abweichungen im Bandenmuster auf (Genotypen B1 und B2).

Cluster C3 (Genotyp D) besteht aus Isolaten aus Hühnerbrustproben von den Supermärkten Aldi (1 Probe), Kaisers (4 Proben), Lidl (2 Proben) und Rewe (1 Probe), die auch von unterschiedlichen Produzenten stammen.

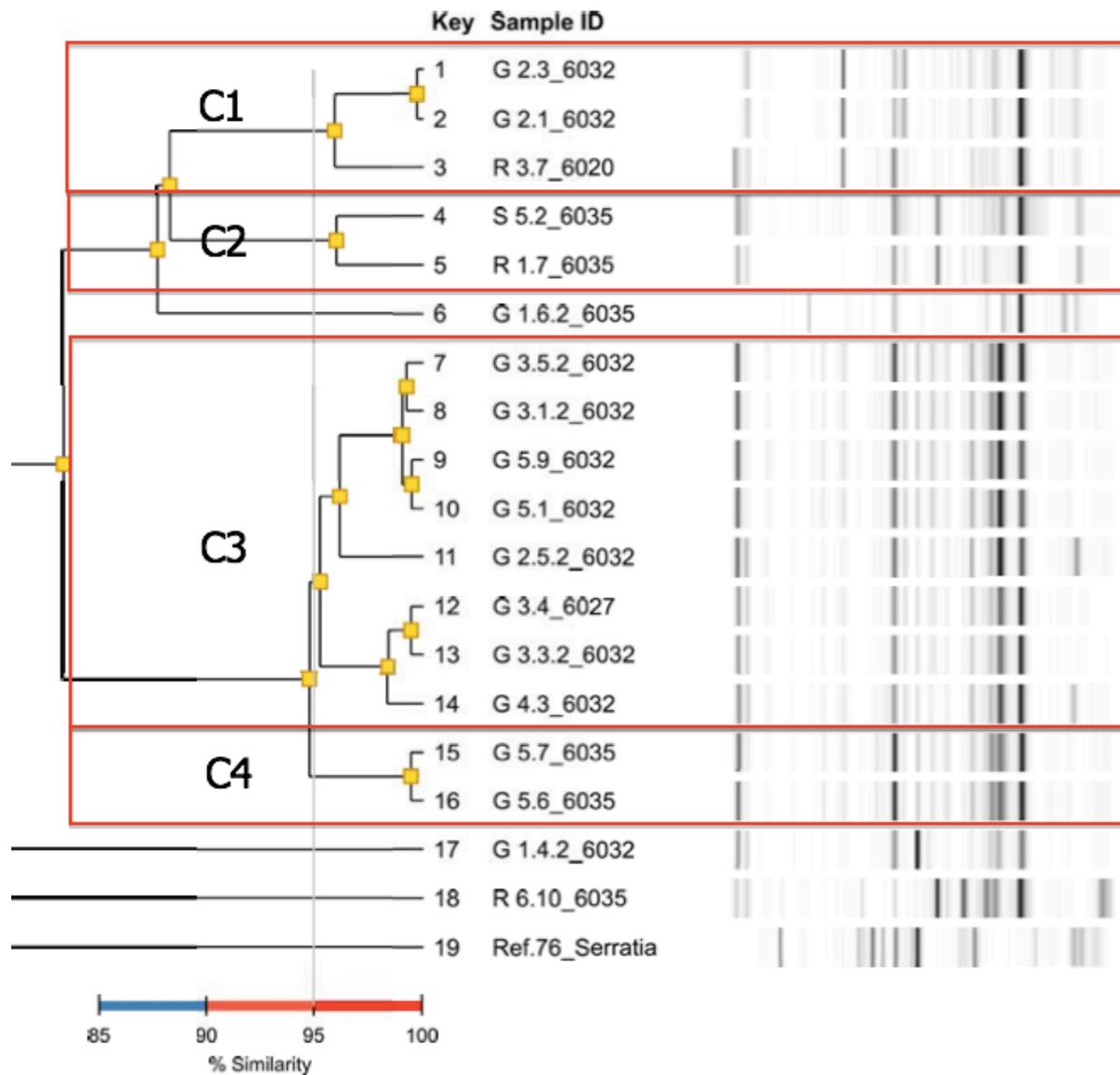


Abbildung 16: Verwandtschaftsanalyse der 18 mit dem DiversiLab System untersuchten *S. fonticola* – Isolate aus Hühnerbrust-, Rinderhackfleisch-, Schweinehackfleischproben

C1 – C4: Cluster mit > 95 % Übereinstimmung der Elektropherogramme
 Ref.76: *S. marcescens* ATTC 8100

Tabelle 35: Genotyp und Herkunft der ESBL - positiven *S. fonticola* – Isolate aus Hühnerbrust-, Rinderhackfleisch- und Schweinehackfleischproben

Probe nnr.	Genotyp	Cluster	Händler	Produzent
G 2.1	A1	C1	Aldi	Märkische Geflügelhof - Spezialitäten GmbH & Co. KG Königs Wusterhausen, Niederlehme
G 2.3			Aldi	Märkische Geflügelhof - Spezialitäten GmbH & Co. KG Königs Wusterhausen, Niederlehme
R 3.7			A2	Lidl
S 5.2	B1	C2	LPG	Ludwigsluster Fleisch- und Wurstspezialitäten GmbH & Co. KG, Ludwigslust
R 1.7	B2		Satici	Frankenförde GmbH i.G., Frankenförde
G 1.6.2	C	-	Netto	Märkische Geflügelhof - Spezialitäten GmbH & Co. KG Königs Wusterhausen, Niederlehme
G 3.1.2	D	C3	Kaisers	Birkenhof GmbH & Co. KG - Fachfleischerei Perwenitz, Schönwalde
G 3.5.2			Kaisers	Birkenhof GmbH & Co. KG - Fachfleischerei Perwenitz, Schönwalde
G 5.9			Lidl	Celler Land Frischgeflügel GmbH & Co, Wietze
G 5.1			Lidl	Celler Land Frischgeflügel GmbH & Co, Wietze
G 2.5.2			Aldi	Märkische Geflügelhof - Spezialitäten GmbH & Co. KG Königs Wusterhausen, Niederlehme
G 4.3			Rewe	Astenhof Frischgeflügel Produktions- und Handels GmbH, Hainspitz
G 3.3.2			Kaisers	Birkenhof GmbH & Co. KG - Fachfleischerei Perwenitz, Schönwalde
G 3.4			Kaisers	Birkenhof GmbH & Co. KG - Fachfleischerei Perwenitz, Schönwalde
G 5.6			E	C4
G 5.7	Lidl	Celler Land Frischgeflügel GmbH & Co, Wietze		
G 1.4.2	F	-	Netto	Märkische Geflügelhof - Spezialitäten GmbH & Co. KG Königs Wusterhausen, Niederlehme
R 6.10	G	-	Neuland	Fleischerei Hoffmann, Teltow

4.3.1.4 Genotypisierung der *E. fergusonii* – Isolate

E. fergusonii – Isolate aus Hühnerbrustproben

Durch die DiversiLab – Typisierung ließen sich bei den 2 *E. fergusonii* – Isolaten aus den Hühnerbrustproben 2 unterschiedliche Genotypen feststellen (Abb. 17, Tab. 45), obwohl diese aus demselben Supermarkt (Netto) und vom selben Produzenten stammten.

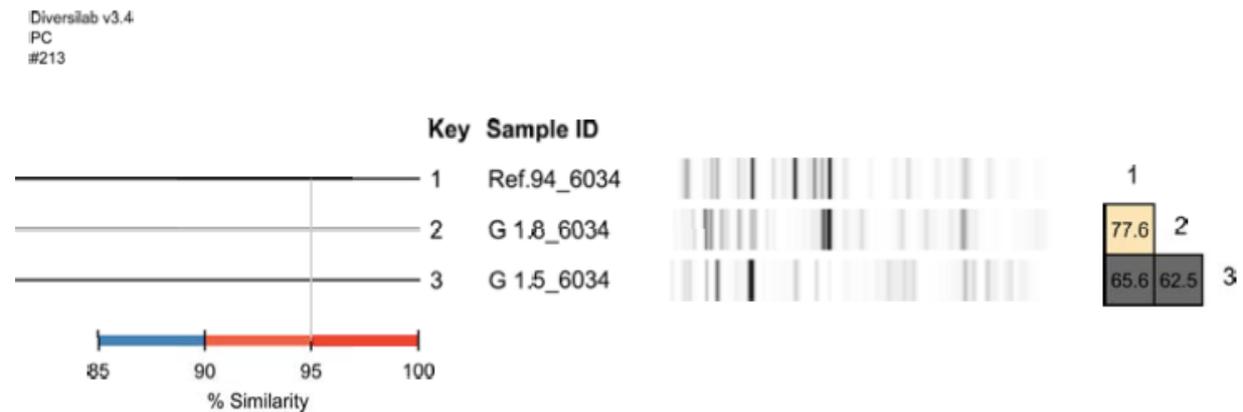


Abbildung 17: Verwandtschaftsanalyse und Ähnlichkeitsmatrix der 2 mit dem DiversiLab System untersuchten *E. fergusonii* – Isolate aus Hühnerbrustproben

Ref.94: *E. coli* ATTC 25922

Tabelle 36: Genotyp und Herkunft der ESBL - positiven *E. fergusonii* – Isolate aus Hühnerbrustproben

Proben nr.	Genotyp	Händler	Produzent
G 1.5	A	Netto	Märkische Geflügelhof - Spezialitäten GmbH & Co. KG Königs Wusterhausen, Niederlehme
G 1.8	B	Netto	Märkische Geflügelhof - Spezialitäten GmbH & Co. KG Königs Wusterhausen, Niederlehme

4.4 Molekularbiologische Untersuchungen der ESBL - Gene / Resistenz gegen 3. Generations - Cephalosporine

In Kooperation mit dem Robert Koch - Institut in Wernigerode wurden für die insgesamt 64 ESBL – positiven Isolate die ESBL – Typen bzw. die molekularbiologischen Grundlagen der 3. Generationscephalosporinresistenz mittels PCR und anschließender Sequenzierung der amplifizierten Genbereiche bestimmt. Für die *E. coli* – Isolate erfolgte außerdem die Ermittlung der Phylogruppen und bei Isolaten mit Colistinresistenz eine Untersuchung auf das Plasmid - vermittelte Colistinresistenzgen *mcr - 1*.

Handelte es sich um Isolate der gleichen Probenart (Huhn, Rind oder Schwein) desselben Händlers, welche zudem identische Genotypen aufwiesen (siehe Punkt 4.3),

so wurde jeweils nur eines der Isolate sequenziert und das Ergebnis für die anderen Isolate übernommen.

4.4.1 Sequenzanalyse der *E. coli* – Isolate

4.4.1.1 *E. coli* – Isolate aus Hühnerbrustproben

Durch die Sequenzanalyse ließen sich bei 18 (53 %) der insgesamt 34 *E. coli* – Isolate aus den Hühnerfleischproben ESBL vom SHV – 12 - Typ nachweisen, bei 14 (41 %) der Isolate ESBL vom CTX – M - 1 - Typ und bei 2 (6 %) der Isolate ESBL vom SHV – 2 – Typ. Bei 4 (12 %) der SHV - 12 positiven Isolate wurde außerdem das Plasmid - vermittelte Colistinresistenzgen *mcr* - 1 identifiziert (siehe Tab. 37).

Bei 12 (35 %) der *E. coli* – Isolate aus den Hühnerfleischproben wurde neben einer ESBL zusätzlich die Beta – Laktamase TEM – 1 nachgewiesen (siehe Tab. 37).

Abbildung 18 zeigt das Vorkommen der unterschiedlichen ESBL – Typen SHV – 12, CTX – M – 1 und SHV - 2, welche aus *E. coli* – Isolat aus Hühnerfleischproben nachgewiesen werden konnten, sowie die Proben, in welchen neben dem ESBL – Typ SHV - 12 das Colistinresistenzgen *mcr* - 1 identifiziert werden konnte, je Supermarkt.

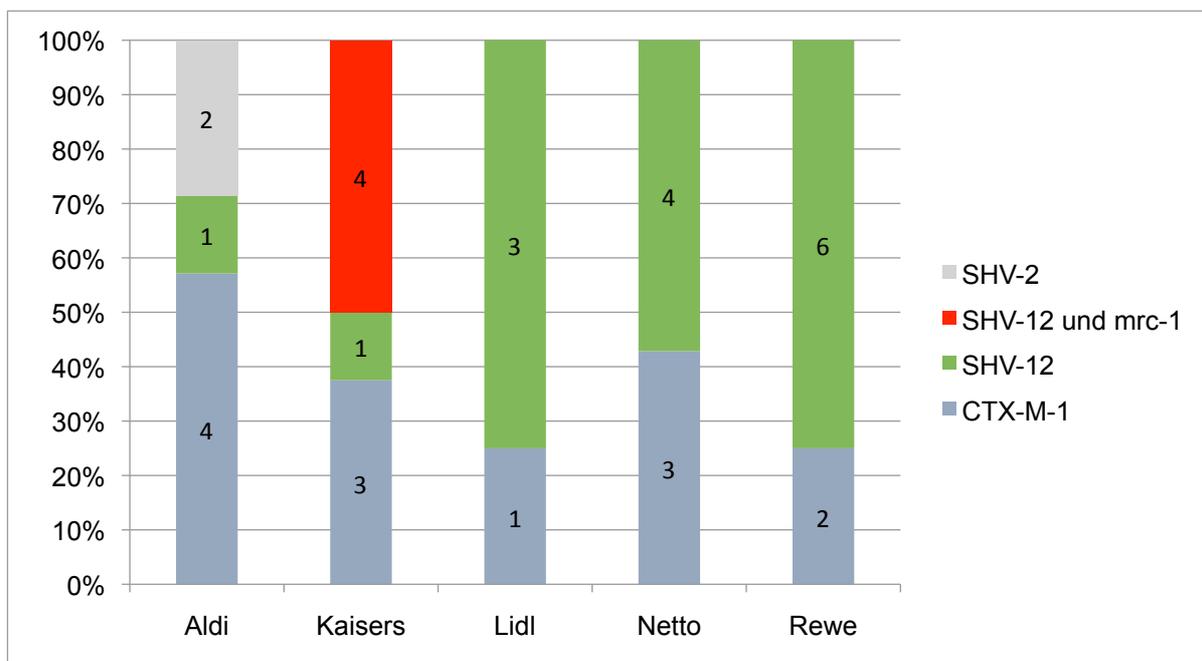


Abbildung 18: ESBL - Typen der *E. coli* – Isolate und *mcr* - 1 positive Proben aus Hühnerfleischproben je Supermarkt

Die 4 Proben, bei welchen neben der ESBL vom SHV – 12 – Typ auch das Plasmid - vermittelte Colistinresistenzgen *mcr* - 1 identifiziert werden konnte, stammten alle vom Supermarkt Kaisers.

Tabelle 37 lassen sich Informationen zu den unterschiedlichen Phylogruppen der insgesamt 34 *E. coli* – Isolate aus Hühnerfleischproben entnehmen. So ließen sich 13 (38 %) der *E. coli* – Isolate aus den Hähnchenbrustproben zur Phylogruppe B1, 10 (29 %) zur Phylogruppe D, 9 (27 %) zur Phylogruppe A und 2 (6 %) zur Phylogruppe B2 non – ST131 zuordnen.

Abbildung 19 stellt die Phylogruppen der ESBL - positiven *E. coli* – Isolate aus Hühnerfleischproben je Supermarkt dar. Die *E. coli* – Isolate aus den Hähnchenbrustproben der Supermärkte Aldi, Lidl und Rewe ließen sich mit jeweils 57 % (n = 4 von 7 Proben), 50 % (n = 4 von 8 Proben) und 63 % (n = 5 von 8 Proben) am häufigsten der Phylogruppe B1 zuordnen, Bei Kaisers und Netto gehörten 50 % (n = 4 von 8 Proben) bzw. 57 % (n = 4 von 7 Proben) zur Phylogruppe D. Die phylogruppen A und B1 traten in allen Supermärkten auf.

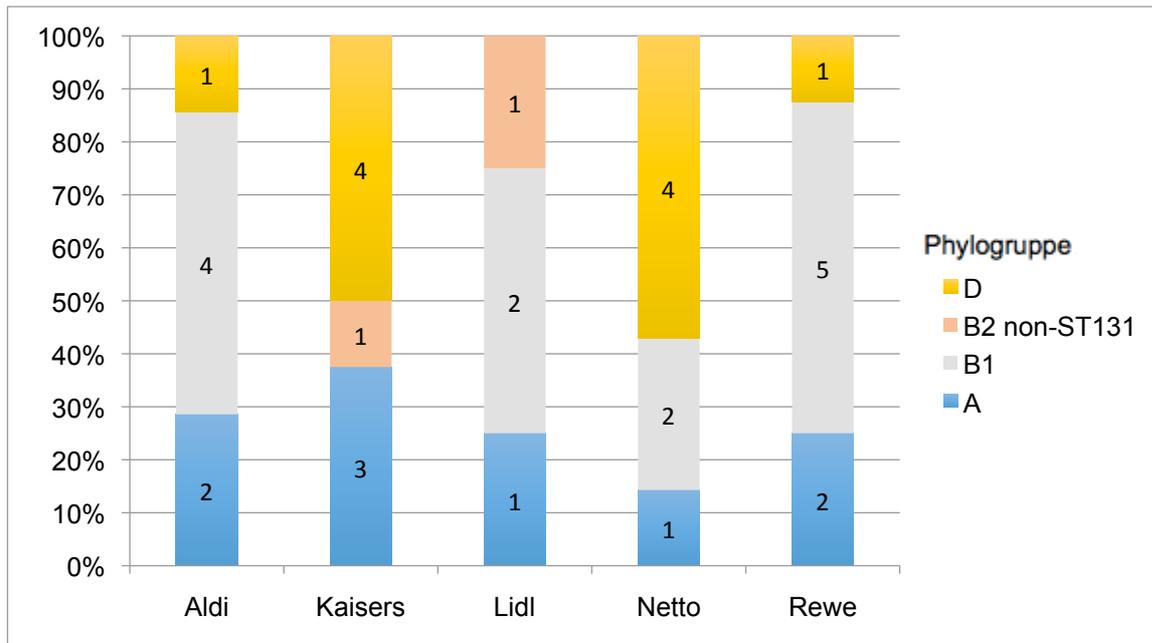


Abbildung 19: Phylogruppen der *E. coli* – Isolate aus Hühnerfleischproben je Supermarkt

Abbildung 20 veranschaulicht die Verteilung der unterschiedlichen ESBL – Typen und des Plasmid - vermittelten Colistinresistenzgen *mcr* – 1, welche aus den *E. coli* – Isolaten aus Hühnerfleischproben isoliert werden konnten, innerhalb der verschiedenen Phylogruppen.

Ein *mcr* - 1 tragendes Isolat gehörte dabei zur Phylogruppe B2 non - ST131, die drei weiteren zur Phylogruppe D.

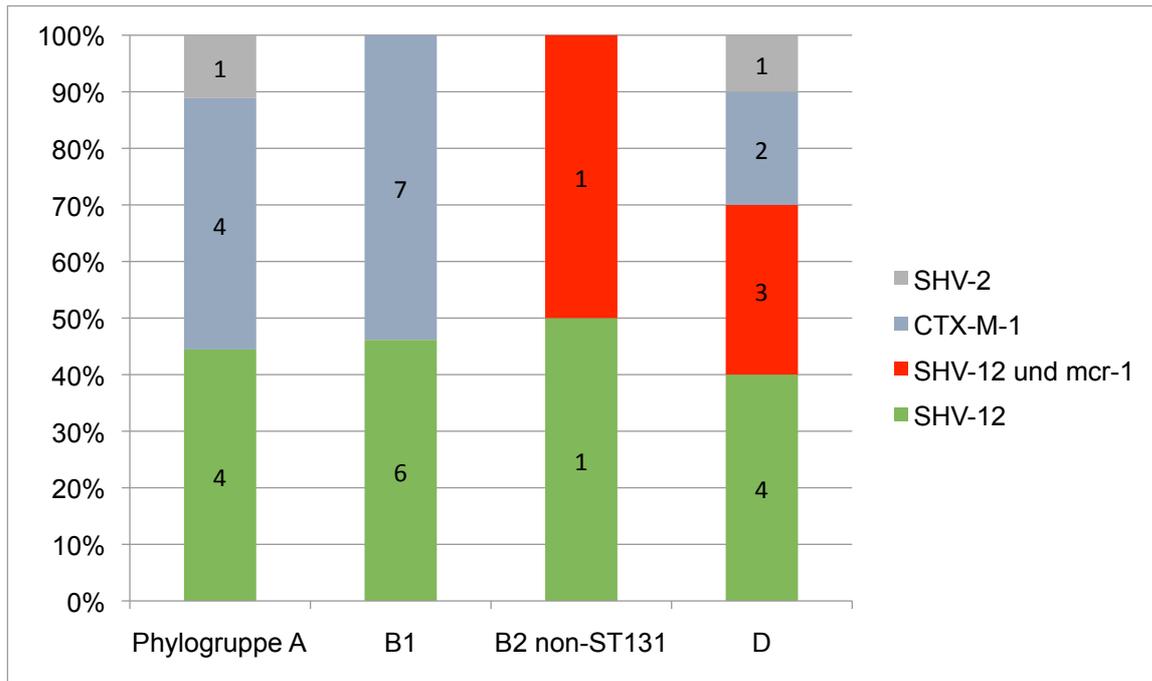


Abbildung 20: Phylogruppen der *E. coli* – Isolate aus Hühnerfleischproben mit Verteilung der jeweils unterschiedlichen ESBL – Typen und des Plasmid - vermittelten Colistinresistenzgen *mcr* – 1.

Tabelle 37: Genotyp, Herkunft und Ergebnisse der Sequenzanalyse der ESBL - positiven *E. coli* – Isolate aus Hühnerbrustproben

Proben- nr	Geno- typ	Cluster	Händler	Produzent	ESBL	Beta – Laktamase	andere Tests	Phylo- gruppe
G 5.5	A	-	Lidl	Celler Land Frischgeflügel GmbH & Co, Wietze	CTX-M- 1	TEM-1		A
G 3.7	B	-	Kaisers	Birkenhof GmbH & Co. KG - Fachfleischerei Perwenitz, Schönwalde	SHV-12	TEM-1	mcr-1	B2 non- ST131
G 4.4	C	-	Rewe	Astenhof Frischgeflügel Produktions- und Handels GmbH, Hainspitz	SHV-12	-		A
G 4.7	D	-	Rewe	Astenhof Frischgeflügel Produktions- und Handels GmbH, Hainspitz	SHV-12	TEM-1		A
G 5.4	E	-	Lidl	Celler Land Frischgeflügel GmbH & Co, Wietze	SHV-12	-		B2 non- ST131
G 5.8	F	C1	Lidl	Celler Land Frischgeflügel GmbH & Co, Wietze	SHV-12	TEM-1		B1
G 5.10			Lidl	Celler Land Frischgeflügel GmbH & Co, Wietze	SHV-12	TEM-1		B1
G 4.9	G	C2	Rewe	Astenhof Frischgeflügel Produktions- und Handels GmbH, Hainspitz	SHV-12	TEM-1		B1
G 4.10			Rewe	Astenhof Frischgeflügel Produktions- und Handels GmbH, Hainspitz	SHV-12	TEM-1		B1
G 4.8			Rewe	Astenhof Frischgeflügel Produktions- und Handels GmbH, Hainspitz	SHV-12	TEM-1		B1
G 4.6			Rewe	Astenhof Frischgeflügel Produktions- und Handels GmbH, Hainspitz	SHV-12	TEM-1		B1
G 2.8	H	C3	Aldi	Märkische Geflügelhof - Spezialitäten GmbH & Co. KG Königs Wusterhausen, Niederlehme	CTX-M- 1	-		B1

Proben- nr	Geno- typ	Cluster	Händler	Produzent	ESBL	Beta – Laktamase	andere Tests	Phylo- gruppe
G 2.10			Aldi	Märkische Geflügelhof - Spezialitäten GmbH & Co. KG Königs Wusterhausen, Niederlehme	CTX-M- 1	-		B1
G 2.9			Aldi	Märkische Geflügelhof - Spezialitäten GmbH & Co. KG Königs Wusterhausen, Niederlehme	CTX-M- 1	-		B1
G 2.7			Aldi	Märkische Geflügelhof - Spezialitäten GmbH & Co. KG Königs Wusterhausen, Niederlehme	CTX-M- 1	-		B1
G 1.2			Netto	Märkische Geflügelhof - Spezialitäten GmbH & Co. KG Königs Wusterhausen, Niederlehme	CTX-M- 1	-		B1
G 1.3			Netto	Märkische Geflügelhof - Spezialitäten GmbH & Co. KG (Wiesenhof) Königs Wusterhausen, Niederlehme	CTX-M- 1	-		B1
G 4.1			Rewe	Astenhof Frischgeflügel Produktions- und Handels GmbH, Hainspitz	CTX-M- 1	-		B1
G 2.4	I	C4	Aldi	Märkische Geflügelhof - Spezialitäten GmbH & Co. KG Königs Wusterhausen, Niederlehme	SHV-12	-		A
G 1.1			Netto	Märkische Geflügelhof - Spezialitäten GmbH & Co. KG Königs Wusterhausen, Niederlehme	SHV-12	-		A
G 3.8	J	C5	Kaisers	Birkenhof GmbH & Co. KG - Fachfleischerei Perwenitz, Schönwalde	SHV-12	-	mcr-1	D
G 3.9			Kaisers	Birkenhof GmbH & Co. KG - Fachfleischerei Perwenitz, Schönwalde	SHV-12	-	mcr-1	D
G 3.6			Kaisers	Birkenhof GmbH & Co. KG - Fachfleischerei Perwenitz, Schönwalde	SHV-12	-	mcr-1	D

Proben- nr	Geno- typ	Cluster	Händler	Produzent	ESBL	Beta – Laktamase	andere Tests	Phylo- gruppe
G 1.4.1	K	C6	Netto	Märkische Geflügelhof - Spezialitäten GmbH & Co. KG Königs Wusterhausen, Niederlehme	SHV-12	-		D
G 1.9			Netto	Märkische Geflügelhof - Spezialitäten GmbH & Co. KG Königs Wusterhausen, Niederlehme	SHV-12	-		D
G 1.7			Netto	Märkische Geflügelhof - Spezialitäten GmbH & Co. KG Königs Wusterhausen, Niederlehme	SHV-12	-		D
G 3.1.1	L	C7	Kaisers	Birkenhof GmbH & Co. KG - Fachfleischerei Perwenitz, Schönwalde	CTX-M- 1	TEM-1		A
G 3.3.1			Kaisers	Birkenhof GmbH & Co. KG - Fachfleischerei Perwenitz, Schönwalde	CTX-M- 1	-		A
G 3.5.1			Kaisers	Birkenhof GmbH & Co. KG - Fachfleischerei Perwenitz, Schönwalde	CTX-M- 1	-		A
G 2.6	M	-	Aldi	Märkische Geflügelhof - Spezialitäten GmbH & Co. KG Königs Wusterhausen, Niederlehme	SHV-2	TEM-1		A
G 4.5	N	C8	Rewe	Astenhof Frischgeflügel Produktions- und Handels GmbH, Hainspitz	CTX-M- 1	TEM-1		D
G 3.10			Kaisers	Birkenhof GmbH & Co. KG - Fachfleischerei Perwenitz, Schönwalde	SHV-12	-		D
G 1.6.1			Netto	Märkische Geflügelhof - Spezialitäten GmbH & Co. KG Königs Wusterhausen, Niederlehme	CTX-M- 1	-		D
G 2.5.1	O	-	Aldi	Märkische Geflügelhof - Spezialitäten GmbH & Co. KG Königs Wusterhausen, Niederlehme	SHV-2	-		D

4.4.1.2 *E. coli* – Isolate aus Rinderhackfleischproben

Durch die Sequenzierung der amplifizierten ESBL - Gene ließen sich bei allen 4 *E. coli* – Isolaten aus den Rinderhackfleischproben ESBL vom CTX – M - 1 – Typ nachweisen, sowie bei 3 der Proben zusätzlich die Beta – Laktamase TEM – 1. Alle 4 Proben stammten vom Satici - Supermarkt und gehörten zur Phylogruppe A (siehe Tab. 38).

Tabelle 38: Genotyp, Herkunft und Ergebnisse der Sequenzanalyse der ESBL - positiven *E. coli* – Isolate aus Rinderhackfleischproben

Proben nr	Genotyp	Cluster	Händler	Produzent	ESBL	Beta – Laktamase	Phylogruppe
R 1.1	P	C1	Satici	Frankenförde GmbH i.G., Frankenförde	CTX-M-1	TEM-1	A
R 1.4			Satici	Frankenförde GmbH i.G., Frankenförde	CTX-M-1	TEM-1	A
R 1.5			Satici	Frankenförde GmbH i.G., Frankenförde	CTX-M-1	TEM-1	A
R 1.3	Q	-	Satici	Frankenförde GmbH i.G., Frankenförde	CTX-M-1	-	A

4.4.1.3 *E. coli* – Isolate aus Schweinehackfleischproben

Durch die Sequenzanalyse der ESBL - Gene ließen sich bei 5 (83 %) der insgesamt 6 *E. coli* – Isolate aus den Schweinehackfleischproben eine ESBL vom CTX – M - 1 – Typ nachweisen und bei einer der Proben eine ESBL vom CTX – M - 3 - Typ. Keine der Proben produzierte eine weitere Beta – Laktamase. Alle 5 Isolate der Schweinehackfleischproben, bei welchen die ESBL vom CTX – M - 1 – Typ nachgewiesen werden konnten, stammten von REWE und gehörten zur Phylogruppe A. Das Isolat, bei welcher die ESBL vom CTX – M - 3 – Typ nachgewiesen werden konnte, stammte vom Supermarkt Netto und gehörte zur Phylogruppe B1 (siehe Tab. 39).

Tabelle 39: Genotyp, Herkunft und Ergebnisse der Sequenzanalyse der ESBL - positiven *E. coli* – Isolate aus Schweinehackfleischproben

Probennr	Genotyp	Cluster	Händler	Produzent	ESBL	Beta – Laktamase	Phylogruppe
S 3.1	R	C1	Rewe	Gut Erkenloh Fleischvertrieb GmbH, Ruppicheroth	CTX-M-1	-	A
S 3.2			Rewe	Gut Erkenloh Fleischvertrieb GmbH, Ruppicheroth	CTX-M-1	-	A
S 3.3			Rewe	Gut Erkenloh Fleischvertrieb GmbH,	CTX-M-1	-	A

Probennr	Genotyp	Cluster	Händler	Produzent	ESBL	Beta – Laktamase	Phylogruppe
				Ruppichteroth			
S 3.4			Rewe	Gut Erkenloh Fleischvertrieb GmbH, Ruppichteroth	CTX- M-1	-	A
S 3.5			Rewe	Gut Erkenloh Fleischvertrieb GmbH, Ruppichteroth	CTX- M-1	-	A
S 4.4	S	-	Netto	Steinemann GmbH & Co. KG, Steinfeld	CTX- M-3	-	B1

4.4.2 Sequenzanalyse der *S. fonticola* – Isolate

4.4.2.1 *S. fonticola* – Isolate aus Hühnerbrust-, Rinderhackfleisch- und Schweinehackfleischproben

Durch die Sequenzanalyse ließen sich bei keinen der insgesamt 18 *S. fonticola* – Isolate aus den Hühnerbrust-, Rinderhackfleisch- und Schweinehackfleischproben ESBL – Typen bestimmen. Dies lässt darauf schließen, dass wahrscheinlich Spezies - eigene Beta – Laktamasen (z.B. SFO - 1) für den Resistenzphänotyp verantwortlich sind (Matsumoto und Inoue 1999), die von den verwendeten PCR - Primern nicht erfasst wurden.

4.4.3 Sequenzanalyse der *E. fergusonii* – Isolate

E. fergusonii – Isolate aus Hühnerbrustproben

Durch die Sequenzanalyse ließ sich bei einem (50 %) der insgesamt 2 *E. fergusonii* – Isolate aus den Hühnerbrustproben die ESBL vom TEM – 52 Typ nachweisen. Die andere Probe lieferte bezüglich des ESBL – Typs ein unklares Ergebnis, da sich trotz positiven ESBL - Testes kein ESBL - Gen nachweisen ließ. Bei dieser Probe konnte aber die Beta – Laktamase TEM – 1 nachgewiesen werden (siehe Tab. 40).

Tabelle 40: Genotyp, Herkunft und Ergebnisse der Sequenzanalys der ESBL - positiven *E. fergusonii* – Isolate aus Hühnerbrustproben

Proben nr.	Genotyp	Händler	Produzent	ESBL	Beta – Laktamase
G 1.5	A	Netto	Märkische Geflügelhof Spezialitäten GmbH & Co. KG Königs Wusterhausen, Niederlehme	- TEM- 52	-
G 1.8	B	Netto	Märkische Geflügelhof Spezialitäten GmbH & Co. KG Königs Wusterhausen, Niederlehme	- unklar	TEM-1

4.5 Versuch zur Übertragung von ESBL - positiven Erregern bei der Verarbeitung von Lebensmittelproben

Inwiefern es bei der Verarbeitung von mit ESBL - positiven Erregern Hähnchenfleisch in der Küche zur Übertragung der Erreger auf andere Lebensmittel kommen kann, wurde mit dem unter 3.2.5 beschriebenen Übertragungsversuch untersucht, der insgesamt 25 - mal durchgeführt wurde. Dabei wurden bei 11 der 25 (44 %) Versuche in den Gurkenproben ESBL - produzierende Bakterien nachgewiesen, nachdem die Gurken mit denselben Utensilien (Skalpell, Pinzette, Petrischale) zerkleinert worden waren, welche zuvor auch für mit ESBL - positiven Erregern kontaminierten Hähnchenproben verwendet worden waren. In den parallel dazu mit neuen und sterilen Utensilien verarbeiteten Gurkenproben waren hingegen in keinem Fall ESBL - Produzenten nachzuweisen.

Die Übereinstimmung der sowohl aus den Hähnchen - als auch aus den Gurkenproben isolierten Erreger und damit die Übertragung der Erreger vom Hähnchenfleisch auf die Gurkenproben wurde wieder mittels des DiversiLab – rep – PCR – Systems nachgewiesen (siehe Abb. 21).

DiversiLab v3.4
PC
#147

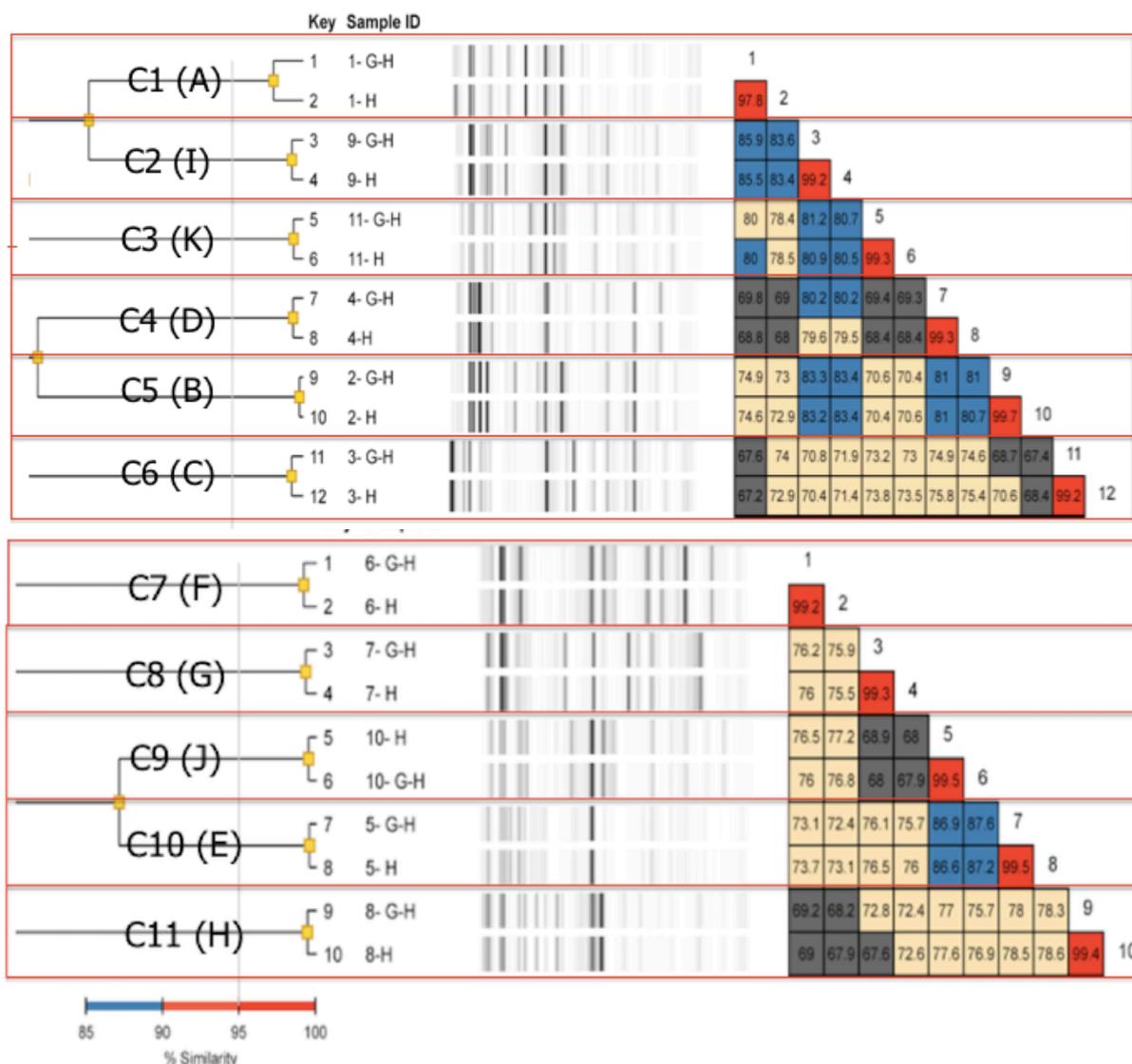


Abbildung 21: Verwandtschaftsanalyse und Ähnlichkeitsmatrix der Proben der mit dem DiversiLab System untersuchten *E. coli* – Isolate zum Versuch zur Übertragung von ESBL - positiven Erregern bei der Verarbeitung von Lebensmittelproben

C1 – C11: Cluster mit > 95 % Übereinstimmung der Elektropherogramme (Bezeichnung der Genotypen in Klammern); Abkürzungen: G - H = *E. coli* – Isolat aus Gurkenprobe nach Verwendung kontaminierter Utensilien Gurke - Huhn, H = *E. coli* – Isolat aus Hühnerfleischprobe

5 Diskussion

5.1 Interpretation der Ergebnisse und Vergleich mit anderen Studien

Ziel dieser Arbeit war es, das Vorkommen von ESBL - produzierenden Enterobakterien in verschiedenen Lebensmitteln zu untersuchen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der Arbeit, dass ESBL - produzierende *Enterobacteriaceae* ausschließlich in den untersuchten Fleischproben nachgewiesen wurden, *E. coli* dabei der vorherrschende Erreger (67 %) und hauptsächlich Hühnerfleisch (88 %) betroffen war.

In unterschiedlichen Studien wird ein großes Augenmerk auf das Vorkommen ESBL – produzierender *Enterobacteriaceae* in Geflügelfleisch gelegt (Mesa, Blanc et al. 2006, Smet, Martel et al. 2008, Costa, Vinue et al. 2009, Doi, Paterson et al. 2010, Leverstein-van Hall, Dierikx et al. 2011, Overdevest, Willemsen et al. 2011, Randall, Clouting et al. 2011, Kola, Kohler et al. 2012). In einer Studie von Kola, Kohler et al. (2012), die in Berlin und Greifswald im Jahr 2011 durchgeführt wurde, konnten bei 175 (43.9 %) der insgesamt 399 Isolate aus Hühnerfleischproben 185 ESBL – produzierende *Enterobacteriaceae* nachgewiesen werden. Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen aus der hier vorliegenden Arbeit, in welcher bei 50 Hähnchenbrustfilets, die im Jahr 2013 untersucht wurden, der kulturelle Nachweis und die anschließende phänotypische Bestätigung von ESBL - positiven Bakterien bei 44 der Proben gelang, so wird deutlich, dass das Vorkommen ESBL – positiver *Enterobacteriaceae* in Hühnerfleischproben hier mit 88 % höher liegt.

Eine Studie von Egea, Lopez - Cerero et al. (2012) bestätigt eine zunehmende Kontaminierung mit ESBL - produzierenden *Enterobacteriaceae* in rohem Geflügelfleisch auch in Sevilla, Spanien. Hier wurde das Vorkommen von ESBL - positiven *Enterobacteriaceae* in rohen Hühnerfleischproben aus dem Jahr 2007 mit Daten aus dem Jahr 2010 verglichen, wobei ein Anstieg von 62.5 % im Jahr 2007 auf 93.3 % im Jahr 2010 festgestellt werden konnte.

Verschiedene Studien haben rohe Fleischproben auf das Vorkommen ESBL – positiver Bakterien untersucht und bestätigen ESBL – produzierende *E. coli* als die dabei am häufigsten vorkommende Spezies (Kojima, Ishii et al. 2005, Costa, Vinue et al. 2009, Vinue, Saenz et al. 2009). Wie in der vorliegenden Arbeit werden in einer Studie von Ojer-Usoz, Gonzalez et al. (2013), in welcher Huhn-, Rind- und Schweinefleischproben auf das Vorkommen ESBL – produzierender *Enterobacteriaceae* untersucht wurden, ESBL – produzierende *E. coli* als die am häufigsten und - *S. fonticola* als die am zweithäufigsten auftretenden Spezies beschrieben.

Durch die Sequenzierung der in dieser Arbeit aus Hühnerbrustproben isolierten ESBL - positiven *E. coli* (n = 34), wurde *blaSHV* - 12 (n = 19, 58 %) als die häufigste ESBL, gefolgt von *blaCTX* – M - 1 (n = 13, 38 %,) und *blaSHV* - 2 (n = 2, 6 %) nachgewiesen.

In einer Studie von Kola, Kohler et al. (2012) wurden wie auch in dieser Arbeit, die aus den Hühnerfleischproben isolierten Erreger, bei welchen die phänotypische ESBL – Bildung bestätigt werden konnte, sequenziert, um die ESBL - Genotypen zu bestimmen. Bei den meisten ESBL – Genen (insgesamt n = 187) handelte es sich wie in dieser Studie um *blaSHV* - 12 (43.9 %, n = 82) und *blaCTX* – M - 1 (41.2 %, n = 77). Die *blaTEM* - 52, die in der Studie von Kola, Kohler et al. (2012) am dritthäufigsten vorkam (8.6 %, n = 16), kam in der vorliegenden Arbeit in nur einem ESBL - positiven *E. fergusonii* - Isolat vor.

Die beschriebenen ESBL – Gene *blaSHV* - 12, *blaCTX* – M - 1, *blaSHV* - 2 und *blaTEM* - 52 konnten in Isolaten aus Hühnerfleischproben in einigen weiteren Studien, die in den Niederlanden, Belgien, Frankreich und England durchgeführt wurden, nachgewiesen werden (Canton, Novais et al. 2008, Coque, Baquero et al. 2008, Overdevest, Willemsen et al. 2011).

Das Vorkommen von ESBL – positiven *Enterobacteriaceae* in Rinder- und Schweinehackfleischproben ist in dieser Arbeit und in weiteren Studien (Overdevest, Willemsen et al. 2011, Geser, Stephan et al. 2012) im Vergleich zu Hühnerfleisch gering.

Während in dieser Arbeit in 12 % der Rinderhackfleischproben (7 der insgesamt 60 untersuchten Proben) und in 14 % der Schweinehackfleischproben (7 der insgesamt 50 untersuchten Proben) ESBL - positive Erreger (beide hauptsächlich vom Typ *E. coli*) nachgewiesen werden konnten, konnten in der Studie von Geser, Stephan et al. (2012) keine ESBL - positiven *Enterobacteriaceae* in Hackfleischproben nachgewiesen werden.

In der Studie von Overdevest, Willemsen et al. (2011), in der insgesamt 262 Fleischproben, darunter neben Hühnerfleisch (n = 89) auch Rindfleisch (n = 85), Schweinefleisch (n = 57), sowie gemischtes Hackfleisch (n = 22), auf das Vorkommen ESBL – produzierender Bakterien untersucht wurden, konnte in 79.8 % (n = 71) der Hühnerfleischproben, in 4.7 % (n = 4) der Rindfleischproben, in 1.8 % (n = 1) der Schweinefleischproben und in 9.1 % (n = 2) der gemischten Hackfleischproben das Vorkommen ESBL – produzierender Bakterien bestätigt werden.

Damit übereinstimmende Ergebnisse wurden auch in einer Studie von Ojer-Usoz, Gonzalez et al. (2013) erzielt: Insgesamt wurden 141 Fleischproben, darunter Huhn (n = 45), Rind (n = 49) und Schwein (n = 47) auf das Vorkommen ESBL – produzierender *Enterobacteriaceae* untersucht. Bei 91 der 141 Proben (64.5 %) konnten diese Erreger nachgewiesen werden, wobei das Vorkommen in Hühnerfleischproben mit 84 % höher war als in Rind- (59 %) und Schweinefleischproben (55 %).

Die Gründe der hohen Kontaminierung von Geflügelfleisch im Vergleich zu anderen Fleischarten sind nicht abschließend geklärt (Birkel 2013). So ist der Einsatz von Cephalosporinen der 3. und 4. Generation in der EU bei Geflügel verboten, weshalb der verbotene Einsatz zur Infektionsprävention oder zur Behandlung von Bruteiern oder Eintagsküken diskutiert wird (EFSA 2011, Birkel 2013).

Das Vorkommen von ESBL - positiven Enterobakterien in Hühner-, Rind- und Schweinefleischproben könnte sich unter anderem aber auch durch den hohen Einsatz von Antibiotika in den Mastbetrieben erklären (Hughes, Hermans et al. 2008) (siehe Punkt 1.4.2). So kann der Einsatz anderer Antibiotikasubstanzen, wie beispielsweise der von Chinolonen, Tetracyclinen, Sulfonamiden, Trimethoprim oder Aminoglycosiden, zu einer Co - Selektion ESBL - positiver Bakterien führen, welche ihre Resistenzgene in den selben mobilen Elementen beherbergen (Costa, Vinue et al. 2009).

Vergleicht man die unterschiedlichen Stufen der Lebensmittelproduktion, so ergeben sich weitere mögliche Erklärungsansätze des im Vergleich zu Rind- oder Schweinefleischproben höheren Vorkommens ESBL - positiver Enterobakterien in Hühnerfleischproben:

Reinrassige Großelertierherden, die eine besondere Leistungsfähigkeit aufweisen, werden gekreuzt. Sie liefern Nachkommen, welche als Elterntierherde und „Kreuzungstiere“ weitere Nachkommen liefern, welche schließlich der Masthähnchenhaltung dienen (Friese und Rösler 2013).

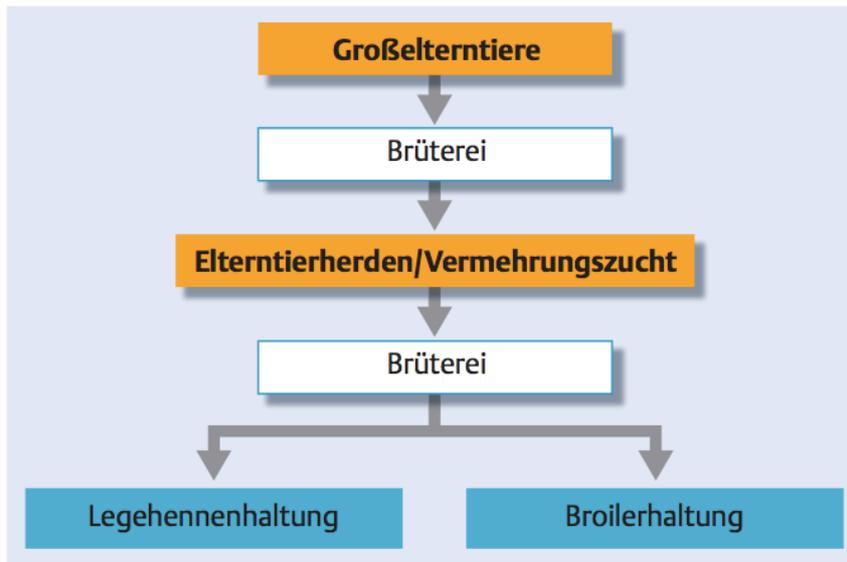


Abbildung 22: Aufbauschema: Struktur einer Geflügelproduktion. Entnommen aus (Friese und Rösler 2013).

Ein Faktor, der zur Verbreitung ESBL – produzierender Keime beitragen kann, stellt laut Friese und Rösler (2013) das Kreuzen von Küken verschiedener Elterntierherden dar, um neue Herden zu bilden. Dies birgt die Gefahr, dass durch diesen Schritt ESBL – produzierende Bakterien auf zuvor nicht mit ESBL – kontaminierte Küken übertragen werden. So konnte in einer Studie aus Dänemark von Mevius, Koene et al. (2009) gezeigt werden, dass bei nur 3,3 % der Küken von Masthähnchenherden ESBL – produzierende *Enterobacteriaceae* nachgewiesen werden konnten, wohingegen bei 22,5 % – 44 % der zum Aufbau von Großeltern-tierherden bestimmten Eintagsküken ESBL – produzierende *E. coli* nachgewiesen werden konnten. Andere Studien beschreiben jedoch ein höheres Vorkommen ESBL – produzierender Enterobakterien in Masthähnchenherden (Costa, Vinue et al. 2009, Geser, Stephan et al. 2012). Es sollte demzufolge ein r Eintrag ESBL – produzierender Erreger auf allen Stufen der Lebensmittelproduktion diskutiert werden. So können z.B. unzureichend desinfizierte Mastställe, zur Kontaminierung von Hühnern mit ESBL – produzierenden *E. coli* führen (Hiroi, Matsui et al. 2012). Eine Studie von Costa, Vinue et al. (2009) diskutiert auch eine hohe Tierdichte in den Herden als mögliche Ursache der Zunahme ESBL – produzierender *E. coli* bei Geflügel. Auch Mitarbeiter im Schlachtbetrieb könnten über kontaminierte Geräte oder Kleidung zu einer Verbreitung ESBL – produzierender Bakterien beitragen (Friese und Rösler 2013).

Bei Schweinen konnten ebenfalls schon bei neugeborenen Ferkeln ESBL – produzierende Enterobakterien nachgewiesen werden (Hansen, Damborg et al. 2013). Interessanterweise wurde in einer Studie von Hansen, Damborg et al. (2013) festgestellt, dass das Vorkommen ESBL – produzierender *Enterobacteriaceae* während des Mastverlaufes sinkt. Dies könnte an der Tatsache liegen, dass, anders als in der Geflügelproduktion, die unterschiedlichen Stufen der Produktion meist nicht in nur einem Betrieb durchgeführt werden (Friese und Rösler 2013). So beschreiben Friese und Rösler in der Schweineproduktion eine räumliche Trennung von Zucht- und Mastbetrieben. Dies minimiert die Gefahr einer Kontaminierung durch ESBL – produzierende Bakterien während der unterschiedlichen Stufen der Lebensmittelproduktion.

Wie unter Punkt „1.4.2 Antibiotika – Einsatz in der Veterinärmedizin“ beschrieben, trägt ein ungesteuerter Einsatz von Antibiotika bei Lebensmittel liefernden Tieren als sog. Metaphylaxe zu einer weiteren Verbreitung antibiotikaresistenter Bakterien bei (BfR 2011, Friese und Rösler 2013, Verbraucherzentrale Niedersachsen 2013). So wird die Antibiotikatherapie bei Lebensmittel liefernden Tieren aus Praktikabilität und zur Prävention der schnellen Ausbreitung von Infektionen oft nicht nur bei den klinisch erkrankten Tieren angewendet, sondern oft die gesamte Tierherde über das Futter oder das Trinkwasser vorbeugend mit Antibiotika versorgt (Friese und Rösler 2013, Verbraucherzentrale Niedersachsen 2013). Eine Gefahr besteht darin, dass nicht alle Tiere ausreichende Mengen an Antibiotika zu sich nehmen, wenn diese über das Futter oder Trinkwasser verabreicht werden (Hartung und Kietzmann 2012). Ein weiteres Problem der Metaphylaxe stellt in der Praxis eine missbräuchliche prophylaktische Antibiotikatherapie bei gesunden Tieren zur Wachstumsförderung dar (EFSA 2011), wodurch gleichzeitig intensivere Haltungsbedingungen ermöglicht und Hygieneanstrengungen vermindert werden (Blaha und Sundrum 2011). Dies bedeutet einen finanziellen Anreiz und drängt das Tierwohl in den Hintergrund (Blaha und Sundrum 2011). Es ist unabdingbar, in der Viehwirtschaft einen Fokus auf einen missbräuchlichen Einsatz von Antibiotika zur Wachstumsförderung, Infektionsprävention, Futterverwertung und Behandlung zu setzen (Committee on Drug Use in Food Animals 1999, Mesa, Blanc et al. 2006, Overdevest, Willemsen et al. 2011).

In einigen europäischen Studien werden unterschiedliche ESBL – Gene in humanen Isolaten und Isolaten tierischen Ursprungs beschrieben, wobei bei humanen Isolaten hauptsächlich der CTX – M - 15 – Typ, bei Isolaten tierischen Ursprungs der CTX – M – 1 – Typ nachgewiesen werden kann (Lartigue, Zinsius et al. 2007, Randall, Clouting et al. 2011, Geser, Stephan et al. 2012). Es werden dennoch auch gleiche Enzymvarianten bei Nutztieren und Menschen beschrieben (Ewers, Bethe et al. 2012). Egea, Lopez - Cerero et al. (2012) konnten in einer spanischen Studie sowohl in rohen Hühnerfleischproben als auch bei Patienten, die eine Harnwegsinfektion aufwiesen, ESBL - positive *E. coli* mit der Beta - Laktamase CTX – M - 15 nachweisen (Lopez-Cerero, Egea et al. 2011).

In einer Studie von Overdevest, Willemsen et al. (2011) ergaben genetische Analysen, dass der Großteil der ESBL – Gene von Isolaten aus rohen Fleischproben und von Isolaten, die bei rektalen Abstrichen bei Krankenhauspatienten aus derselben Region nachgewiesen wurden, nicht zu unterscheiden waren und darüber hinaus auch häufig in Blutkulturisolaten derselben Krankenhäuser gefunden werden konnten. In den rohen Hühnerfleischproben wurden dabei auch hier hauptsächlich ESBL – positive Isolate vom CTX - M - 1 – Typ (n = 50, 58.1 %) nachgewiesen. Dieser Genotyp – und nicht wie zu erwarten CTX – M - 15 - war auch in den Isolaten der rektalen Patientenabstriche (n = 22, 45.8 %) am häufigsten und am zweithäufigsten (n = 5, 20.8 %) bei den Blutkulturisolaten (Overdevest, Willemsen et al. 2011).

In einer weiteren Studie aus den Niederlanden von Kluytmans, Overdevest et al. (2013) konnten genetische Übereinstimmungen hinsichtlich mobiler Resistenzelemente, Virulenz- und ESBL – Genen bei ESBL – positiven *E. coli* - Isolaten aus rohen Hühnerfleischproben und ESBL – positiven *E. coli* – Isolaten, die beim Menschen nachgewiesen werden konnten in 40 % der Proben festgestellt werden. Mittels Amplified – Fragment – Length - Polymorphism (AFLP) und Pulsfeld - Gelelektrophorese (PFGE) konnte gezeigt werden, dass diese Isolate genotypisch nicht zu unterscheiden waren (Kluytmans, Overdevest et al. 2013).

Leverstein-van Hall, Dierikx et al. (2011) wiesen nach, dass große Ähnlichkeiten bezüglich des Multilocus – Sequenz – Typs (MLST), der Resistenzgene und der Plasmide von menschlichen ESBL – positiven Isolaten und ESBL – positiven Isolaten aus Hühnern und Hühnerfleisch bestehen: So enthielten 35 % der menschlichen Isolate und der Isolate vom Huhn identische ESBL – Gene. Darüber hinaus enthielten 19 % dieser nicht unterscheidbaren Isolate von Mensch und Huhn ESBL – Gene, die auf denselben Plasmiden lokalisiert waren (Leverstein-van Hall, Dierikx et al. 2011).

In einer Studie von Belmar Campos, Fenner et al. (2014) aus Hamburg wurden Stuhlproben von Patienten, die sich mit gastrointestinalen Beschwerden in der Notaufnahme der Universitätsklinik Hamburg vorgestellt hatten, auf ESBL – produzierende *Enterobacteriaceae* untersucht und anhand von Sequenzierungs- und Resistenzdaten mit ESBL – positiven Isolaten, die aus rohen Geflügelfleischproben aus der Hamburger Region isoliert werden konnten, verglichen. Hier fanden sich nun bezüglich der Sequenz- und Genotypen, sowie der Antibiotikaresistenzen deutliche Unterschiede, was eher gegen die Hypothese spricht, dass die Lebensmittelkette die Hauptursache einer Transmission dieser Keime auf den Menschen darstellt (Belmar Campos, Fenner et al. 2014).

Auch in einer Studie von Wu, Day et al. (2013) wurden ESBL – positive Isolate von Mensch, Tier und aus Lebensmitteln aus England, den Niederlanden und Deutschland hinsichtlich der Virulenz- und Resistenzgene sowie des MLST verglichen. Dabei fanden sich beim Vergleich des Erbgutes der humanen und tierischen Isolate große Unterschiede. Nur 1,2 % der verglichenen ESBL – positiven *E. coli* - Bakterien von Mensch und Tier zeigten bezüglich der Gene und des MLST - Komplexes eine Übereinstimmung von 70 %. Keines der Isolate von Mensch und Tier war demnach identisch. Die verschiedenen humanen Isolate zeigten jedoch eine große genetische Ähnlichkeit. Wu, Day et al. (2013) folgern, dass ESBL - positive *E. coli*, die bei Nutztieren und Lebensmitteln tierischen Ursprungs isoliert werden können, eher ein Reservoir von Virulenz- und Resistenzgenen, jedoch nicht die direkte Ursache für Infektionen beim Menschen darstellen und empfehlen daher Präventionsmaßnahmen, die eine Transmission dieser Erreger von Mensch – zu - Mensch minimieren.

In einer Studie von Nordstrom, Liu et al. (2013) wurde gezeigt, dass Infektionen, die durch extraintestinale pathogene *E. coli* (ExPEC) ausgelöst werden und mit dem Verzehr von Lebensmitteln assoziiert sind, wesentlich zu Harnwegsinfektionen beim Menschen beitragen können, sodass in dieser Studie sogar der Begriff einer „FUTI“ („foodborne urinary tract infection“) eingeführt wurde. Wie in Punkt 1.4 „Klinische Bedeutung der ESBL - produzierenden Enterobakterien bei Mensch und Tier“ dieser Arbeit bereits angesprochen, werden ExPEC von den sog. EPEC (enteropathogene *E. coli*) abgegrenzt, da sie Infektionen erst dann verursachen, wenn sie ihr gewohntes Reservoir im Magen – Darm – Trakt verlassen (Paterson und Bonomo 2005). Das Verlassen des gewohnten Reservoirs im Magen – Darm – Trakt beschreiben Nordstrom, Liu et al. als einen entscheidenden Wandel des Auftretens lebensmittelbedingter Infektionen. Da die Therapiemöglichkeiten bei durch ExPEC - ausgelöste Infektionen aufgrund zunehmender Resistenzraten begrenzt sind, wird auch in der Studie von Nordstrom, Liu et al. (2013) geraten, den Einsatz von Antibiotika zur Behandlung dieser Infektionen kritisch zu hinterfragen.

Ein wesentlicher Faktor zunehmender Resistenzraten spielt (siehe auch Punkt 1.1.2 „Resistenzentwicklung“) der Austausch von Resistenzgenen, welche mobile Elemente enthalten (Witte, Strommenger et al. 2004). Ein Beispiel hierfür stellt der *E. coli* - Sequenztyp (ST) 131 dar, der mit einem vermehrten Auftreten von Harnwegsinfektionen assoziiert ist und sich pandemisch ausgebreitet hat (Livermore

und Hawkey 2005, Lau, Kaufmann et al. 2008, Hawkey und Jones 2009, Rogers, Sidjabat et al. 2011) (siehe Punkt 1.3.2 „TEM, SHV, CTX - M, RAHN - 1 und OXA“). In den Ergebnissen dieser Arbeit konnte dieser Stamm bei keinen der ESBL – produzierenden Isolate nachgewiesen werden.

In einer systematischen Übersichtsarbeit von George und Manges (2010) wurden durch *E. coli* verursachte Krankenhausausbrüche vom Jahr 1950 bis 2009 zusammengefasst. Dabei wurden 12 Ausbrüche von Harnwegsinfektionen beschrieben. Zwar bleibt die definitive Ursache dieser Ausbrüche unklar, jedoch wird die Vermutung einer Übertragung von *E. coli* durch kontaminierte Lebensmittel auf den Menschen in dieser und weiteren Studien geäußert (Manges, Johnson et al. 2001, Pitout, Gregson et al. 2005, George und Manges 2010). So wurde in unterschiedlichen Studien nachgewiesen, dass *E. coli* – Isolate aus Lebensmittelproben und *E. coli* – Isolate, die bei Harnwegsinfektionen des Menschen nachgewiesen wurden, dieselben genetischen Fingerabdrücke besaßen (Johnson, Sannes et al. 2007, Vincent, Boerlin et al. 2010). Auch bezüglich antimikrobieller Resistenz- und Virulenzgenprofile zeigten diese Isolate große Ähnlichkeiten (Jakobsen, Garneau et al. 2011).

In einer Studie von Manges, Smith et al. (2007) wurde untersucht, ob der Verzehr von Geflügelfleisch mit dem Auftreten von Harnwegsinfektionen, bei welchen multiresistente *E. coli* die Ursache waren, assoziiert sein könnte. Festzustellen war, dass Frauen mit Harnwegsinfektionen durch multiresistente *E. coli* einen ca. 4 - mal häufigeren Verzehr von Hühnerfleisch angaben, als Frauen mit Harnwegsinfektionen, bei welchen jedoch keine multiresistenten *E. coli* nachgewiesen wurden (Manges, Smith et al. 2007).

Im Jahr 2010 berichtete das „National Antimicrobial Resistance Monitoring System“ (NARMS) der USA, dass bei mehr als 75 % der Isolate aus Hühner- und Putenfleisch, bei 59 % der Isolate aus Rinderhackfleisch und bei 40 % der Isolate aus Schweinefleisch eine Kontamination mit *E. coli* nachgewiesen werden konnte, wobei ein großer Teil dieser Isolate eine Multiresistenz aufwies (NARMS 2012). In einer Studie von Xia, Meng et al. (2011) wurden die durch NARMS untersuchten Proben hinsichtlich der enteropathogenen - und der extraintestinalen pathogenen - *E. coli* verglichen, wobei 20 % der Isolate aus Hühner- und Putenfleischs, 8,3 % der Isolate aus Schweinefleisch und 3,4 % der Isolate aus Rinderhackfleisch den ExPEC zugeordnet werden konnten. Viele dieser den ExPEC zugeordneten Isolate gehörten zu den Phylogruppen B2 und D. Die Phylogruppen B2 und D sind laut der Studie von Xia, Meng et al. (2011) die Phylogruppen, welche am häufigsten mit extraintestinalen Infektionen des Menschen assoziiert sind.

In einer Studie von Vincent, Boerlin et al. (2010) wurde gezeigt, dass *E. coli* - Isolate, die bei Patienten mit Harnwegsinfektionen nachgewiesen werden konnten und *E. coli* – Isolate, die in Geflügelfleisch nachgewiesen werden konnten, häufig zur Phylogruppe D gehören. Auch in dieser Arbeit konnten *E. coli* – Isolate aus Hähnchenbrustproben der Phylogruppe D zugeordnet werden (n = 10; 29 % siehe Punkt 4.4.1.1 „*E. coli* – Isolate aus Hühnerbrustproben“).

In einer Studie von Cortes, Blanc et al. (2010) wurden 59 in Katalonien, Spanien, identifizierte ESBL - produzierende *E. coli* – Isolate, die in Hühnerställen nachgewiesen werden konnten, und 27 ESBL - produzierenden *E. coli* – Isolate, die in Schweineställen nachgewiesen worden waren, hinsichtlich der phylogenetischen Gruppen miteinander verglichen (Blanc, Mesa et al. 2006, Mesa, Blanc et al. 2006). Gleichzeitig wurden die Ergebnisse mit 80 Isolaten von Patienten aus zwei Krankenhäusern in Galicien, Spanien, verglichen, bei welchen extraintestinale Infektionen aufgetreten waren (Cortes, Blanc et al. 2010). Die in Geflügel- und Schweineställen nachgewiesenen Isolate unterschieden sich in dieser Studie in der Zuordnung zu den phylogenetischen

Gruppen: Isolate, welche in Geflügelställen nachgewiesen wurden, konnten zu 22,8 % (n = 13) der Phylogruppe A, zu 38,6 % (n = 22) der Phylogruppe B1 und zu 31,6 % der Phylogruppe D (n = 18) zugeordnet werden. Demgegenüber gehörten die Isolate, welche in Schweineställen nachgewiesen wurden, zu 55,2 % (n = 16) zur Phylogruppe A, zu 34,5 % (n = 10) zur Phylogruppe B1 (34,5 %) und zu nur kleinen Prozentsätzen (jeweils 3,4 % (n = 1) und 6,9 % (n = 2)) zur Phylogruppe B2 und D (Cortes, Blanc et al. 2010). Von den 86 ESBL - produzierenden *E. coli* - Isolaten, die in Tierställen nachgewiesen werden konnten, trugen 23 (26,7 %) zwei oder mehr Virulenz - Gene, die typisch für extraintestinale pathogene *E. coli* (ExPEC) sind. Von diesen wurden 20 aus Geflügelmastbetrieben und nur 3 aus Schweinemastbetrieben isoliert. Dabei gehörten 10 der 23 Isolate zu den klassischen humanen ExPEC - Serotypen (Cortes, Blanc et al. 2010). Auf der Grundlage der Phylogruppenverteilung in dieser Studie ist anzunehmen, dass die Geflügelisolate im Vergleich zu den Schweineisolaten eher als pathogen anzusehen sind.

Auch die *E. coli* - Isolate aus Hühnerfleischproben in dieser Arbeit gehören hauptsächlich zu den Phylogruppen B1 (n = 13; 38 %), D (n = 10; 29 %) und A (n = 9; 27 %) und ebenso wie in der Studie von Cortes, Blanc et al. (2010) zu nur einem kleinen Prozentsatz zur Phylogruppe B2 (n = 2; 6 %). Ebenso wird in der vorliegenden Arbeit beobachtet, dass die *E. coli* - Isolate aus Schweinehackfleischproben wie in der Studie von Cortes, Blanc et al. (2010) hauptsächlich zur Phylogruppe A (n = 5; 83 %) gehören und nur zu einem kleineren Teil zur Phylogruppe B1 (n = 1; 17 %). Alle 5 genannten *E. coli* - Isolate der Schweinehackfleischproben dieser Arbeit stammen vom selben Supermarkt und weisen denselben CTX - M - Typ auf. Auch stammen alle Proben vom selben Produzenten (Gut Erkenloh Fleischvertrieb GmbH), was auf eine Kontamination auf derselben Stufe der Lebensmittelproduktion hinweist.

In einer Studie von Kluytmans, Overdevest et al. (2013), wurden die in der Studie von Overdevest, Willemsen et al. (2011) 145 nachgewiesenen ESBL - produzierenden *E. coli* - Isolate aus Hühnerfleischproben, Isolate von menschlichen Trägern (nachgewiesen in Stuhlproben) und Isolate aus Blutkulturen unter anderem in Hinblick auf die Phylogruppen miteinander verglichen. Es konnte hierbei gezeigt werden, dass die Isolate, die bei menschlichen Trägern nachgewiesen wurden, hauptsächlich den Phylogruppen A und B1 zugeordnet werden konnten und seltener der Phylogruppe B2. Auch *E. coli* - Isolate, die in Geflügelfleisch nachgewiesen wurden, gehörten hauptsächlich zu den Phylogruppen A und B1. Dies könnte auf eine Transmission ESBL - produzierender *Enterobacteriaceae* über den Verzehr von Geflügelfleisch hindeuten (Kluytmans, Overdevest et al. 2013). Demgegenüber gehörten die Isolate der Blutkulturen häufiger zur Phylogruppe B2 und seltener zur Phylogruppe B1. Dies steht in Übereinstimmung mit weiteren Autoren, die berichten, dass virulente extraintestinale - *E. coli* Stämme, die nosokomiale Infektionen beim Menschen verursachen können, hauptsächlich zur Gruppe B2 gehören (Clermont, Bonacorsi et al. 2000, Jakobsen, Kurbasic et al. 2010, Xia, Meng et al. 2011).

In der vorliegenden Studie weisen 2 von 34 (6 %) *E. coli* - Isolaten aus Hühnerfleischproben die Phylogruppe B2 auf. Damit ist der Anteil der *E. coli* - Isolate aus Hühnerfleischproben dieser Phylogruppe im Vergleich zu den anderen Phylogruppen gering. Die beiden Isolate der Phylogruppe B2 aus Hühnerfleischproben stammen von unterschiedlichen Supermärkten (Kaisers und Lidl). Eines der Isolate, welches der Phylogruppe B2 zugeordnet werden konnte, wies darüber hinaus ein *mcr* - 1- Resistenzgen auf. In Hinblick darauf, dass *E. coli* - Isolate der Phylogruppe B2 häufig zu den ExPEC gehören und Infektionen beim Menschen verursachen können, ist

dieser Tatsache besondere Beachtung zu schenken. Keines der *E. coli* – Isolate aus Rinder- oder Schweinehackfleischproben gehörte zur Phylogruppe B2.

Industriell betriebene Geflügelmast kann nicht nur für ESBL - Resistenzgene ein Reservoir sein:

In einer im November 2015 von Liu, Wang et al. (2016) veröffentlichten Studie aus China konnte erstmalig das Plasmid - vermittelte Colistin - Resistenzgen *mcr - 1* in verschiedenen *E. coli* - Isolaten aus Schweinen, aus Geflügel- und Schweinefleisch sowie bei je einem *E. coli* - und *K. pneumoniae* – Patientenisolat identifiziert werden.

Das *mcr - 1* Gen konnte dabei auf mehreren Plasmiden nachgewiesen werden. Dies weist darauf hin, dass die Verbreitung von diesem Resistenzgen mit multiplen genetischen Ereignissen korrespondiert, die in unterschiedlichen geografischen Regionen unabhängig voneinander auftreten und zur weiteren Verbreitung des Resistenzgens innerhalb von unterschiedlichen Bakterienarten beitragen können (Nordmann und Poirel 2016).

Dies stellt einen Paradigmenwechsel der Colistin – Resistenzmechanismen dar, welche bis vor Kurzem auf chromosomale Mutationen und eine vertikale Transmission beschränkt waren (Xavier, Lammens et al. 2016) und war der Anlass für eine nachträgliche Untersuchung der ESBL - positiven Isolate auf *mcr - 1*.

In 4 der 34 (11,8 %) im Rahmen dieser Arbeit aus Hühnerfleisch isolierten ESBL – produzierenden *E. coli* des SHV – 12 – Typs konnte zusätzlich das Plasmid – vermittelte Colistinresistenzgen *mcr - 1* nachgewiesen werden. Auch bei der Nachuntersuchung der 2011 aus in Berlin gekauften Hühnerfleisch isolierten ESBL - positiven *E. coli* (Kola, Kohler et al. 2012) konnte in vier Isolaten *mcr - 1* nachgewiesen werden.

Die 4 Isolate, bei welchen neben der ESBL vom SHV – 12 – Typ auch das Plasmid - vermittelte Colistinresistenzgen *mcr - 1* identifiziert werden konnte, stammten alle aus demselben Einkauf im selben Supermarkt (Kaisers). Hierbei waren 3 der Isolate identisch, wobei diese zur Phylogruppe D gehörten und denselben Genotypen (Genotyp J, Cluster C5) aufwiesen. Ein Isolat unterschied sich hingegen und gehörte zur Phylogruppe B2 non - ST131 und wies in der genotypischen Untersuchung mittels Rep – PCR einen anderen Genotyp (Genotyp B) auf (siehe Punkt „4.3.1.2 Genotypisierung der *E. coli* – Isolate“ und Punkt „4.4.1 Sequenzanalyse der *E. coli* – Isolate“).

Auch in einer Studie von Kluytmans - van den Bergh, Huizinga et al. (2016) konnte das *mcr - 1* Gen in 3 von 196 (1,5 %) ESBL – produzierenden *E. coli* - Isolaten aus Hühnerfleischproben aus niederländischen Supermärkten nachgewiesen werden, von der eine Probe aus dem Jahr 2009 und zwei aus dem Jahr 2014 stammten. Es konnte gezeigt werden, dass Plasmid - vermittelte *mcr - 1* positive - Isolate oft mehrere Resistenzgene tragen, einschließlich der Gene, welche für eine ESBL oder Carbapenemase kodieren (Skov und Monnet 2016).

Beunruhigend ist, dass *E. coli* den Hauptwirt des *mcr - 1* – Gens und damit auch die am weitverbreitetste Bakterienart darstellt, die leicht zwischen Mensch, Tier und Umwelt ausgetauscht werden kann.

In der Veterinärmedizin werden Polymyxine schon seit Jahrzehnten zur Behandlung von Infektionen eingesetzt (RKI 2016). Im Jahr 2012 wurde der Einsatz von Polymyxinen, hauptsächlich von Colistin, für jene 19 Mitgliedstaaten der Europäischen Union und des Europäischen Wirtschaftsraums dokumentiert, für welche Daten sowohl für den Verbrauch in der Nutztierhaltung, als auch in der Humanmedizin vorlagen. Hierbei war zu erkennen, dass der Einsatz von Colistin in der Nutztierhaltung im Durchschnitt mehr als 600 - mal höher war als beim Menschen (ECDC 2015).

Daten aus dem Jahr 2013 kann entnommen werden, dass sich der Einsatz von Colistin in verschiedenen Ländern des Europäischen Wirtschaftsraums deutlich unterscheidet. So ist u.a. in Finnland, Island und Norwegen der Einsatz im Vergleich zu Italien und Spanien niedrig (vgl. 0 mg pro kg tierische Biomasse vs bis über 20 mg pro kg tierische Biomasse) (EMA 2015). Abbildung 23 veranschaulicht die räumliche Verteilung der Verkäufe von Polymyxinen in mg / kg tierische Biomasse in 26 EU / EWR - Länder für das Jahr 2013 (EMA 2015).



Abbildung 23: Räumliche Verteilung der Verkäufe von Polymyxinen in mg / kg tierische Biomasse in 26 EU / EWR - Länder für das Jahr 2013 (entnommen aus (EMA 2015)).

Es wird diskutiert, dass der Einsatz von Polymyxinen in der Viehwirtschaft, hauptsächlich bei Schweinen, Hühnern und Rindern als Wachstumsförderer und zur Prophylaxe und Metaphylaxe eine entscheidende Rolle zur Verbreitung des *mcr – 1* - Resistenzgens beiträgt (Falagas, Rafailidis et al. 2010, Liu, Wang et al. 2016, Skov und Monnet 2016). Der Einsatz von Polymyxinen sollte aus diesem Grund in der Veterinärmedizin verboten werden und der Einsatz von Polymyxinen zur Prophylaxe und Metaphylaxe bei Tieren auf internationaler Ebene beschränkt werden (Nordmann und Poirel 2016).

Die schnelle Verbreitung bisheriger Resistenzmechanismen zeigt, dass das Vorkommen Plasmid - vermittelter Colistinresistenzen zu einer weiteren Progression von Antibiotikaresistenzen beiträgt, die eine globale Gefahr darstellt (Kumarasamy, Toleman et al. 2010, Liu, Wang et al. 2016).

Die Ausbreitung des *mcr - 1* Resistenzgens könnte damit dem gleichen Trend folgen, wie es bei der ESBL CTX – M vor zwei Jahrzehnten beobachtet werden konnte. So

wurde die ESBL vom Typ CTX – M hauptsächlich in *E. coli* nachgewiesen, anschließend auch in nosokomialen Bakterienspezies wie *K. pneumoniae* als Quelle von mehrfachen Ausbrüchen (Nordmann und Poirel 2016).

In einer Studie aus der Schweiz wurde das *mcr - 1* Resistenzgen in Patientenisolaten identifiziert, die für schwere Infektionen wie Bakteriämien verantwortlich waren (Nordmann, Lienhard et al. 2016). *Mcr – 1*- positive Isolate konnten außerdem bei Patienten nachgewiesen werden, die intraabdominelle Infektionen (Liu, Wang et al. 2016), sowie Infektionen der Haut (McGann, Snesrud et al. 2016) und des Harntraktes (Poirel, Kieffer et al. 2016) aufwiesen.

Das Auftreten von *mcr - 1* in klinischen Patientenisolaten ist insofern besorgniserregend, als dass durch die Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Colistin diese Behandlungsmöglichkeit nicht mehr gegeben ist. Aufgrund der eingeschränkten Auswahl von Antibiotika zur Behandlung von Infektionen durch multiresistente Erreger haben sich Polymyxine (Colistin, Polymyxin B) als Mittel der letzten Wahl, hauptsächlich bei Infektionen, die durch multiresistente *Enterobacteriaceae* verursacht werden, entwickelt (Falagas, Rafailidis et al. 2010, RKI 2016).

Aus diesem Grund nimmt die Anwendung von Polymyxinen zur Behandlung von Infektionen beim Menschen in Europa trotz großem Nebenwirkungsspektrum, wie der Gefahr einer Nephro- und Neurotoxizität, zu (Falagas, Rafailidis et al. 2010, ECDC 2017). So erhöhte sich der Verbrauch von Polymyxinen, vor allem von Colistin, im Gesundheitsbereich in Europa um 50 % zwischen 2010 und 2014, wenn auch mit großen Unterschieden bezüglich des Verbrauches je nach Land (ECDC 2017).

Sollte beim Menschen der Verzehr von Fleisch tatsächlich eine bedeutende Rolle bei der Besiedlung mit ESBL - positiven *Enterobacteriaceae* darstellen, so müssten Vegetarier deutlich seltener von diesem Problem betroffen sein. Diese Annahme konnte in einer Studie von Koniger, Gastmeier et al. 2014 nicht bestätigt werden. Bei Stuhluntersuchungen von Vegetariern und Fleischessern wurden keine Unterschiede hinsichtlich der Besiedlung mit ESBL – produzierenden *Enterobacteriaceae* gefunden (Koniger, Gastmeier et al. 2014). Dieser Befund korrespondiert mit einer Reihe von Studien, die belegen, dass Vegetarier sogar eine höhere Rate der Trägerschaft mit ESBL – positiven *Enterobacteriaceae* aufweisen können als Fleischesser (Guinee, Ugueto et al. 1970, Elder, Roy et al. 1993, Sannes, Belongia et al. 2008). Außerdem sind ESBL – positive Erreger in Ländern, in denen der Fleischkonsum gering ist, wie beispielsweise in Indien und Teilen Afrikas, in der Bevölkerung weitaus weiter verbreitet als in Europa, was weitere Ursachen für die Verbreitung ESBL - produzierender Erreger nahe legt (Walsh, Weeks et al. 2011, Woerther, Angebault et al. 2011).

Lebensmittelausbrüche durch mit pathogenen Bakterien kontaminiertem Gemüse, zum Beispiel durch den Verzehr von Sprossen, zeigen jedoch, dass Bakterien über die Lebensmittelkette auf den Menschen übertragen werden können (Taormina, Beuchat et al. 1999). So konnte nachgewiesen werden, dass der Lebensmittelausbruch durch Shiga - Toxin bildende enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) in Deutschland im Jahr 2011 bedingt war durch den Verzehr von Bockshornklee – Sprossen (BfR 2011). Als Ausbruchsstamm konnte ein *bla*CTX – M – 15 tragender ESBL - produzierender *E. coli* identifiziert werden (Fischer, Rodriguez et al. 2014) (siehe Punkt 1.4).

Vor diesem Hintergrund wurden in dieser Arbeit neben den Fleischproben zusätzliche Lebensmittel wie Radieschen, Salatgurken, Sprossengemüse, Tofu, Zwiebeln, Frühlingszwiebeln und Lachs untersucht. In keinem der genannten Lebensmittel wurden jedoch ESBL - positiven Enterobakterien gefunden.

In einer Studie von Nuesch-Inderbini, Zurfluh et al. (2015) aus der Schweiz wurden, wie auch in der vorliegenden Arbeit, bei keiner der untersuchten Sprossenproben das

Vorkommen ESBL – produzierender *Enterobacteriaceae* nachgewiesen. In einer Studie von Boehme, Werner et al. (2004) aus Deutschland wurde jedoch gezeigt, dass Sprossengemüse mit antibiotikaresistenten Keimen der Spezies *E. coli* kontaminiert sein kann und einen Pool für Resistenzgene darstellt (Boehme, Werner et al. 2004).

Darüber hinaus wurde in einer Studie von Reuland, Al Naiemi et al. (2014) aus Amsterdam rohes Gemüse, u.a. Rüben, Rosenkohl, Karotten, Blumenkohl, Sellerie, Chicoree, Gurken, Kopfsalat, Pilze, Pastinaken, Kartoffeln, Rettich, Spinat, Frühlingszwiebel und Sojasprossen (insgesamt 119 Proben) auf das Vorkommen von ESBL - positiven Enterobacteriaceae untersucht. Anders als bei der vorliegenden Arbeit konnten bei 4 der 15 Gemüsearten, nämlich bei Bohnensprossen (n = 4; 3 %), Radieschen (n = 1; 1 %), Frühlingszwiebeln (n = 1; 1 %) und Pastinaken (n = 1; 1 %), eine Kontamination mit ESBL - positiven Enterobakterien der Spezies *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *E. amnigenus*, *Citrobacter braakii* nachgewiesen werden. In der Studie fanden sich bei 3 der ESBL - positiven Proben *bla*CTX – M - 15, bei 2 der Proben *bla*CTX – M - 14, bei einer Probe *bla*CTX – M - 1 und bei einer Probe *bla*SHV – 12 (Reuland, Al Naiemi et al. 2014). Diese ESBL - Gene konnten auch in humanen *E. coli* - Isolaten nachgewiesen werden (van der Bij, Peirano et al. 2011, Reuland, Overdevest et al. 2013, Reuland, Al Naiemi et al. 2014) und somit ein Reservoir für mobile Resistenzgene darstellen, die auf *E. coli* Stämme des Magen – Darm - Traktes übertragen werden könnten (Canton und Coque 2006, Raphael, Wong et al. 2011).

Kann es aber zu einer Übertragung von kontaminiertem Fleisch auf andere Lebensmittel kommen, die evtl. nicht gegart, sondern roh verzehrt werden? Dieser Frage wurde mit dem im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten „Versuch zur Übertragung von ESBL - positiven Erregern bei der Verarbeitung von Lebensmittelproben“ (siehe Punkt 3.2.6) nachgegangen. Es konnte nachgewiesen werden, dass es beim Umgang mit Lebensmitteln, die mit ESBL - positiven Erregern kontaminiert sind, über die verwendeten Küchenutensilien auf andere Lebensmittel, die zuvor keine ESBL – positiven Keime aufwiesen, übertragen werden können. Dies könnte schließlich beim Verzehr von Lebensmitteln, die anschließend nicht mehr ausreichend erhitzt werden (z.B. Salat) zur Übertragung der ESBL - positiven Keime auf den Konsumenten führen.

In einer Studie von Calbo, Freixas et al. (2011) wird ein durch Lebensmittel verursachter Krankenhausausbruch mit ESBL - produzierenden *K. pneumoniae* im Jahr 2008 beschrieben, bei welchem 156 Patienten unterschiedlicher Stationen mit ESBL – produzierenden *Enterobacteriaceae* besiedelt waren. Eine Infektion wurde dadurch bei 35 (22,4 %) dieser Patienten verursacht. Bei Mitarbeitern des Krankenhauses oder auf Oberflächen der unbelebten Krankenhausumgebung konnten die Erreger nicht nachgewiesen werden. Bei einer Untersuchung der Krankenhausküche ließen sich aber bei bis zu 35 % der untersuchten Küchenoberflächen oder Lebensmittel ESBL – produzierende *Enterobacteriaceae* nachweisen. Zusätzlich wurden bei 6 von 44 (14 %) der in der Küche arbeitenden Personen eine rektale Besiedlung von ESBL - positiven Enterobakterien nachgewiesen. Diese Studie zeigt, dass die Lebensmittelkette ein Reservoir ESBL – produzierender *K. pneumoniae* darstellen kann und dass sich diese Erreger, ebenso wie in dem in dieser Arbeit durchgeführten Übertragungsversuch, über Küchenutensilien oder Lebensmittel verbreiten und schließlich ursächlich für einen Krankenhausausbruch sein können (Calbo, Freixas et al. 2011).

Eine weitere Studie aus Basel von Tschudin - Sutter, Frei et al. (2014) untersuchte den potentiellen Übertragungsweg ESBL - produzierender *Enterobacteriaceae*, unter anderem auch über Küchenutensilien und Personal in Krankenhausküchen. Hierbei wurden Utensilien wie Schneidebrettchen und Handschuhe, die im Krankenhaus zur

Zubereitung von rohem Hühnerfleisch benutzt bzw. getragen wurden und zusätzlich Schneidebrettchen aus privaten Haushalten auf das Vorkommen ESBL – produzierender *Enterobacteriaceae* untersucht.

Auf den Schneidebrettchen der Krankenhausküche konnten hierbei bei 6,5 % (10 von 154) ESBL - produzierende *E. coli*, hauptsächlich vom CTX – M – Typ, nachgewiesen werden. Des Weiteren wiesen 50 % (10 von 20) der Handschuhpaare ESBL – positive Enterobakterien der Spezies *E. coli* auf, die zu 60 % (6 von 10) zur Gruppe CTX – M und zu 40 % zur Gruppe SHV – 12 gehörten (Tschudin-Sutter, Frei et al. 2014). Auch bei 5 der zusätzlich untersuchten 144 Schneidebrettchen aus privaten Haushalten (3,5 %) konnten ESBL - positive Enterobakterien nachgewiesen werden: 2 der Proben gehörten zum *bla*CTX - M Typ, die übrigen 3 zum *bla*SVH - 12 Typ (Tschudin-Sutter, Frei et al. 2014).

Die Studie von Tschudin - Sutter, Frei et al. (2014), wie auch die Ergebnisse des Übertragungsversuches aus dieser Arbeit, zeigen, dass Küchenutensilien schnell mit ESBL - produzierenden *E. coli* kontaminiert werden können. Das Beachten von Hygienemaßnahmen in der Küche ist also nicht nur nach der Verarbeitung von rohem Hühnerfleisch, sondern auch nach dem Kontakt von Küchenutensilien, wie Schneidebrettchen, die zur Verarbeitung von rohem Hühnerfleisch verwendet werden, unabdingbar (Tschudin-Sutter, Frei et al. 2014) (siehe Punkt 5.2).

5.2 Zusammenfassung / Konsequenzen der Ergebnisse

Verschiedene Studien beschreiben eine Zunahme ESBL - produzierender *Enterobacteriaceae* sowohl in der Veterinär- als auch in der Humanmedizin (Witte und Mielke 2003, Falagas, Rafailidis et al. 2007, Woerther, Burdet et al. 2013), wobei u.a. auch eine Transmission der Erreger über die Lebensmittelkette angenommen wird (Leverstein-van Hall, Dierikx et al. 2011, Lopez-Cerero, Egea et al. 2011, Overdeest, Willemsen et al. 2011, Kluytmans, Overdeest et al. 2013, Nordstrom, Liu et al. 2013). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte zumindest bei Geflügelfleisch eine hohe Belastung mit ESBL – produzierender *Enterobacteriaceae* nachgewiesen werden. In einigen Fällen war sogar das erst vor kurzem erstmalig beschriebene Plasmid - vermittelte Colistinresistenzgen *mcr – 1* nachweisbar. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass ESBL – positive Erreger bei der Zubereitung leicht auf andere Lebensmittel übertragen werden können.

Im Gegensatz zu einigen anderen Studien (Mesa, Blanc et al. 2006, Ruimy, Brisabois et al. 2010, Hassan, Altalhi et al. 2011, Schwaiger, Helmke et al. 2011, Reuland, Al Naiemi et al. 2014) wurden ESBL – produzierende *Enterobacteriaceae* in keinem weiteren Lebensmittel nachgewiesen.

Die Übertragbarkeit ESBL – produzierender *Enterobacteriaceae* durch den Verzehr von Lebensmittel auf den Menschen kann in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden, da ausschließlich Lebensmittel untersucht wurden und der Vergleich zu menschlichen ESBL – produzierenden *E. coli* - Isolaten fehlt. Die Zugehörigkeit der in dieser Arbeit nachgewiesenen Isolate zu bestimmten phylogenetischen Gruppen, welche in weiteren Studien sowohl bei menschlichen Trägern, als auch bei Krankenhauspatienten mit Infektionen, nachgewiesen werden konnten (Kluytmans, Overdeest et al. 2013), lässt eine Transmission dieser Erreger auf den Menschen zumindest möglich erscheinen.

Um die Verbreitung antibiotikaresistenter Erreger zu verlangsamen bzw. zu stoppen, müssen dringend Präventionsmaßnahme ergriffen werden (Witte und Mielke 2003, Falagas, Rafailidis et al. 2007, Woerther, Burdet et al. 2013). Die

Präventionsmaßnahmen sollten zum Einen die Bereiche der Gesundheits- und Gemeinschaftseinrichtungen betreffen, zum Anderen sind Richtlinien in Bezug auf den Einsatz von Antibiotika in der Veterinär- und Humanmedizin und in anderen Bereichen der Umwelt erforderlich (Baquero, Martinez et al. 2008, Friese und Rösler 2013) (siehe Punkt 1.4).

Die Präventionsmaßnahmen in Gesundheitseinrichtungen, wie zum Beispiel in Krankenhäusern, zielen darauf ab, die Übertragung ESBL – produzierender Bakterien zwischen Krankenhauspersonal, Patienten, Besucher und über den Kontakt zur kontaminierten Umwelt, wie beispielsweise zu medizinischen Geräten, zu reduzieren (Paterson und Bonomo 2005, Falagas und Karageorgopoulos 2009). Hierbei spielt die Einhaltung von Standard – Hygienemaßnahmen eine wichtige Rolle (Siegel, Rhinehart et al. 2007). Hierzu zählen neben der Händedesinfektion eine konsequente Kittel- und Handschuhpflege, sowie die patientenbezogene Anwendung von Pflegeutensilien (Witte und Mielke 2003). Des Weiteren sollte der Nachweis eines ESBL - positiven Isolates bei Patienten schon im Einzelfall Anlass sein, dies in der Krankenakte und in Verlegungsberichten zu vermerken, sowie die epidemiologische Situation durch eine gezielte Beobachtung sorgfältig zu dokumentieren und das Antibiotikaregime zu überprüfen. Auf diese Weise können Erreger mit besonderen Resistenzen und Multiresistenzen schnell erfasst und bewertet und durch geeignete Maßnahmen der Verbreitung ESBL – positiver *Enterobacteriaceae* entgegengewirkt werden (Witte und Mielke 2003, Tschudin-Sutter, Frei et al. 2012, Pfeifer und Eller 2012, Lowe, Katz et al. 2013).

Doch nicht nur in Gesundheitseinrichtungen, sondern auch in Gemeinschaftseinrichtungen und im privaten Haushalt ist das Beachten von Hygienemaßnahmen unabdingbar, um die Verbreitung ESBL – produzierender Bakterien einzudämmen. So wird in unterschiedlichen Studien beschrieben, wie bedeutend eine richtige Küchenhygiene beim Umgang mit rohem Fleisch ist (Friese und Rösler 2013, Ojer-Usoz, Gonzalez et al. 2013). Auch bei dem in dieser Arbeit durchgeführten Versuch zur Übertragung von ESBL - positiven Erregern bei der Verarbeitung von Lebensmittelproben wird dies deutlich (siehe Punkt 4.5). Das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR 2015) empfiehlt aus diesem Grund unterschiedliche Maßnahmen beim Umgang mit rohem Fleisch. So sollten die vorher mit rohem Fleisch benutzten Arbeitsgeräte gründlich mit heißem Wasser gesäubert und unter fließendem Wasser abgespült werden. Bei der Zubereitung von rohem Fleisch sollte außerdem darauf geachtet werden, dieses abzuwaschen und anschließend abzutrocknen, sowie bei der Aufbewahrung und Zubereitung rohe tierische von pflanzlichen Lebensmitteln zu trennen. Tiefgefrorenes Fleisch sollte der Verbraucher in Ruhe auftauen lassen, das Abtauwasser sollte anschließend verworfen werden. In einem Bericht zur Lebensmittelsicherheit vom Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (2013) wird dem Verbraucher im Umgang mit rohem Fleisch zusätzlich dazu geraten, insbesondere die Kühlkette aufrechtzuerhalten und kurze Verbrauchsfristen festzulegen. Für rohe Fleischprodukte gilt laut Friese und Rösler (2013) grundsätzlich, dass ESBL - bildende *Enterobacteriaceae* bei einer Mindesttemperatur von 70 °C und bei einem Durchbraten von mindestens 10 Minuten abgetötet werden.

Um einer Vermehrung von ESBL – positiven *Enterobacteriaceae* in Fleischprodukten entgegenzuwirken, ist zudem der Gebrauch von Richtlinien für den Einsatz von Antibiotika in der Veterinärmedizin notwendig (Friese und Rösler 2013) (siehe Punkt 1.4.2). Neben dem von der Europäischen Union 2006 eingeführten antimikrobiellen Wachstumsförderungsverbot (Grave, Torren-Edo et al. 2010) werden schon seit Jahren

nachhaltige Tiergesundheitskonzepte für die Nutztierhaltung gefordert, um die Verbreitung von ESBL – positiven *Enterobacteriaceae* in der Veterinärmedizin einzudämmen (Friese und Rösler 2013). Ein besonderes Augenmerk wird hierbei auf die Erhaltung bzw. Verbesserung von Haltungs- und Hygienebedingungen, sowie auf die Reduzierung des Antibiotika - Einsatzes in der Veterinärmedizin, v. a. in der Nutztierhaltung, gerichtet (Friese und Rösler 2013). Zur Diskussion steht die Einrichtung einer zentralen bundeseinheitlichen Datenbank, in welcher die Menge der Arzneimittelanwendungen eines jeden Betriebes dokumentiert werden soll, die schließlich von den zuständigen Veterinärämtern eingesehen und ausgewertet werden kann. Eine Bewertung der Betriebe in Form eines Ampelsystem könnte von Vorteil sein, da so die Betriebe hinsichtlich der Arzneimittelanwendungen schnell erkannt, überprüft und mit anderen Betrieben verglichen werden könnten (Friese und Rösler 2013).

Mittels der Deutschen Antibiotika - Resistenzstrategie (DART) hat die Bundesregierung im Jahr 2008 bereits den Fokus auf eine Reduktion von Antibiotika – Resistenzen in der Human- und Veterinärmedizin gelegt. Dies beinhaltete das Ausbauen von Überwachungssystemen, die Intensivierung von Präventionsmaßnahmen, das Herstellen und Festigen einer regionalen, nationalen und internationalen Zusammenarbeit, sowie die Förderung von Forschung. Auch Gesetzesänderungen, wie beispielsweise die des Infektionsschutzgesetzes 2011 und des Arzneimittelgesetzes 2013 haben dazu geführt, die vorangehend genannten Strategien umzusetzen. Einen Erfolg dieser Maßnahmen kann laut der DART z.B. daran erkannt werden, dass seit drei Jahren die Infektionsraten mit MRSA sinken.

Für die Entwicklung weiterer Konzepte, welche Antibiotika – Resistenzen in der Human- und Veterinärmedizin reduzieren sollen, ist es laut DART wichtig zu erkennen, dass „die Gesundheit von Menschen und Tieren bei Infektionskrankheiten eng miteinander verwoben ist“. Forschung und eine interdisziplinäre Zusammenarbeit leisten einen wichtigen Beitrag, um die zunehmende Ausbreitung von Antibiotika – Resistenzen, sowie „neue Entwicklungen im Resistenzgeschehen“ zu beobachten, bewerten und eindämmen zu können.

Ein verstärktes Problembewusstsein und der interdisziplinäre Austausch auf unterschiedlichsten Ebenen - über Berufe im gesundheitlichen Sektor, in der Politik und der Allgemeinbevölkerung – ist unerlässlich. Hierbei haben regelmäßige Aus-, Fort- und Weiterbildungen in der Veterinär-, Humanmedizin und in anderen Gesundheitsberufen einen wichtigen Stellenwert (Bundesministerium 2015).

Literaturverzeichnis

- Abraham, E. P. und Chain, E. (1988). "An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940." Rev Infect Dis **10**(4): 677-678.
- Agero, Y., Aarestrup, F. M., Pedersen, K., Seyfarth, A. M., Struve, T., Hasman, H. (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.
- Alouache, S., Kada, M., Messai, Y., Estepa, V., Torres, C., Bakour, R. (2012). "Antibiotic resistance and extended-spectrum beta-lactamases in isolated bacteria from seawater of Algiers beaches (Algeria)." Microbes Environ **27**(1): 80-86.
- Ambler, R. P. (1980). "The structure of beta-lactamases." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **289**(1036): 321-331.
- Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) (2010). „S-3 Leitlinie Harnwegsinfektionen: Epidemiologie, Diagnostik, Therapie und Management unkomplizierter bakterieller ambulant erworbener Harnwegsinfektionen bei erwachsenen Patienten.“
- Arvand, M., Moser, V., Pfeifer, Y. (2013). "Prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and spread of the epidemic clonal lineage ST131 in nursing homes in Hesse, Germany." J Antimicrob Chemother **68**(11): 2686-2688.
- Babic, M., Hujer, A. M., Bonomo, R. A. (2006). "What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases." Drug Resist Updat **9**(3): 142-156.
- Baquero, F., Martinez, J. L., Canton, R. (2008). "Antibiotics and antibiotic resistance in water environments." Curr Opin Biotechnol **19**(3): 260-265.
- Barthelemy, M., Peduzzi, J., Bernard, H., Tancrede, C., Labia, R. (1992). "Close amino-acid-sequence relationship between the new plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase-bullet-men-1 and chromosomally encoded enzymes of *Klebsiella oxytoca*." Biochim Biophys Acta **1122**(1): 15-22.
- Bauer, G., Berens, C., Projan, S. J., Hillen, W. (2004). "Comparison of tetracycline and tigecycline binding to ribosomes mapped by dimethylsulphate and drug-directed Fe²⁺ cleavage of 16S rRNA." J Antimicrob Chemother **53**(4): 592-599.
- Bauernfeind, A., Casellas, J. M., Goldberg, M., Holley, M., Jungwirth, R., Mangold, P., Rohnisch, T., Schweighart, S., Wilhelm, R. (1992). "A new plasmidic cefotaximase from patients infected with *Salmonella typhimurium*." Infection **20**(3): 158-163.
- Bauernfeind, A., Stemplinger, I., Jungwirth, R., Ernst, S., Casellas, J. M. (1996). "Sequences of beta-lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other beta-lactamases." Antimicrob Agents Chemother **40**(2): 509-513.

- Bauernfeind, A., Stemplinger, I., Jungwirth, R., Mangold, P., Amann, S., Akalin, E., Ang, O., Bal, C., Casellas, J. M. (1996). "Characterization of beta-lactamase gene bla(PER-2,) which encodes an extended-spectrum class A beta-lactamase." Antimicrob Agents Chemother **40**(3): 616-620.
- Bellais, S., Poirel, L., Fortineau, N., Decousser, J. W., Nordmann, P. (2001). "Biochemical-genetic characterization of the chromosomally encoded extended-spectrum class A beta-lactamase from *Rahnella aquatilis*." Antimicrob Agents Chemother **45**(10): 2965-2968.
- Belmar Campos, C., Fenner, I., Wiese, N., Lensing, C., Christner, M., Rohde, H., Aepfelbacher, M., Fenner, T., Hentschke, M. (2014). "Prevalence and genotypes of extended spectrum beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* isolated from human stool and chicken meat in Hamburg, Germany." Int J Med Microbiol **304**(5-6): 678-684.
- Ben-Ami, R., Rodriguez-Bano, J., Arslan, H., Pitout, J. D., Quentin, C., Calbo, E. S., Azap, O. K., Arpin, C., Pascual, A., Livermore, D. M., Garau, J., Carmeli, Y. (2009). "A multinational survey of risk factors for infection with extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae in nonhospitalized patients." Clin Infect Dis **49**(5): 682-690.
- Bergeron, J., Ammirati, M., Danley, D., James, L., Norcia, M., Retsema, J., Strick, C. A., Su, W. G., Sutcliffe, J., Wondrack, L. (1996). "Glycylcyclines bind to the high-affinity tetracycline ribosomal binding site and evade Tet(M)- and Tet(O)-mediated ribosomal protection." Antimicrob Agents Chemother **40**(9): 2226-2228.
- Bertrand, X. und Dowzicky, M. J. (2012). "Antimicrobial susceptibility among gram-negative isolates collected from intensive care units in North America, Europe, the Asia-Pacific Rim, Latin America, the Middle East, and Africa Between 2004 and 2009 as part of the tigecycline evaluation and surveillance trial." Clin Ther **34**(1): 124-137.
- Van der Bij, A. K., Peirano, G., Goessens, W. H., van der Vorm, E. R., van Westreenen, M., Pitout, J. D. (2011). "Clinical and molecular characteristics of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* causing bacteremia in the Rotterdam Area, Netherlands." Antimicrob Agents Chemother **55**(7): 3576-3578.
- Birkel, K. (2013). "Masse statt Klasse - eine Haltung, die krank macht. Über den Antibiotikaeinsatz in der Tierhaltung und die Zunahme von resistenten Bakterien". (http://www.martin-haeusling.eu/images/BroschuereAntibiotika_Neu2015_WEB.pdf).
- Blaak, H., van Hoek, A. H., Veenman, C. Docters van Leeuwen, A. E. Lynch, G., van Overbeek, W. M., de Roda Husman, A. M. de (2014). "Extended spectrum beta-lactamase- and constitutively AmpC-producing *Enterobacteriaceae* on fresh produce and in the agricultural environment." Int J Food Microbiol **168-169**: 8-16.
- Blaah, T. und Sundrum, A. (2011). "Epidemiologische Studie zur Entwicklung von MRSA (Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*) in ökologisch wirtschaftenden Schweinebetrieben." Bundesprogramm Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft (BÖLN), Schlussbericht (http://orgprints.org/20112/1/20112-08OE182-09OE013-tiho-uni_kassel-blaaha-sundrum-2011-mrsa_in_schweinebestaenden.pdf).

Blanc, V., Mesa, R., Saco, M., Lavilla, S., Prats, G., Miro, E., Navarro, F., Cortes, P., Llagostera, M. (2006). "ESBL- and plasmidic class C beta-lactamase-producing *E. coli* strains isolated from poultry, pig and rabbit farms." Vet Microbiol **118**(3-4): 299-304.

De Boeck, H., Lunguya, O., Muyembe, J. J., Glupczynski, Y., Jacobs, J. (2012). "Presence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in waste waters, Kinshasa, the Democratic Republic of the Congo." European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases **31**(11): 3085-3088.

Boehme, S., Werner, G., Klare, I., Reissbrodt, R., Witte, W. (2004). "Occurrence of antibiotic-resistant enterobacteria in agricultural foodstuffs." Mol Nutr Food Res **48**(7): 522-531.

Bonnedahl, J., Drobni, M., Gauthier-Clerc, M., Hernandez, J., Granholm, S., Kayser, Y., Melhus, A., Kahlmeter, G., Waldenstrom, J., Johansson, A., Olsen, B. (2009). "Dissemination of *Escherichia coli* with CTX-M Type ESBL between humans and yellow-legged gulls in the south of France." PLoS One **4**(6).

Bonnedahl, J., Drobni, P., Johansson, A., Hernandez, J., Melhus, A., Stedt, J., Olsen, B., Drobni, M. (2010). "Characterization, and comparison, of human clinical and black-headed gull (*Larus ridibundus*) extended-spectrum beta-lactamase-producing bacterial isolates from Kalmar, on the southeast coast of Sweden." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **65**(9): 1939-1944.

Bonnet, R. (2004). "Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes." Antimicrob Agents Chemother **48**(1): 1-14.

Bradford, P. A. (2001). "Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat." Clin Microbiol Rev **14**(4): 933-951.

Bradford, P. A., Petersen, P. J., Fingerman, I. M., White, D. G. (1999). "Characterization of expanded-spectrum cephalosporin resistance in *E. coli* isolates associated with bovine calf diarrhoeal disease." J Antimicrob Chemother **44**(5): 607-610.

Bradford, P. A., Urban, C., Mariano, N., Projan, S. J., Rahal, J. J., Bush, K. (1997). "Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC beta-lactamase, and the loss of an outer membrane protein." Antimicrob Agents Chemother **41**(3): 563-569.

Brinas, L., Moreno, M. A., Zarazaga, M., Porrero, C., Saenz, Y., Garcia, M., Dominguez, L., Torres, C. (2003). "Detection of CMY-2, CTX-M-14, and SHV-12 beta-lactamases in *Escherichia coli* fecal-sample isolates from healthy chickens." Antimicrob Agents Chemother **47**(6): 2056-2058.

Brod, H. - R. (2013). Antibiotika Therapie: Klinik und Praxis der antiinfektiösen Behandlung, Schattauer.

Buchholz, U., Bernard, H., Werber, D., Bohmer, M. M., Remschmidt, C., Wilking, H., Delere, Y., an der Heiden, M., Adlhoch, C., Dreesman, J., Ehlers, J., Ethelberg, S., Faber, M., Frank, C., Fricke, G. (2011). "German outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 associated with sprouts." N Engl J Med **365**(19): 1763-1770.

Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) (2011). "Berichte zur Lebensmittelsicherheit 2010." Zoonosen-Monitoring. (http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/01_Lebensmittel/04_Zoonosen_Monitoring/Zoonosen_Monitoring_Bericht_2010.pdf?__blob=publicationFile&v=6).

Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) (2015). "Antibiotikaabgabe in der Tiermedizin sinkt weiter." (http://www.bvl.bund.de/DE/08_PresseInfothek/01_FuerJournalisten/01_Presse_und_Hintergrundinformationen/05_Tierarzneimittel/2015/2015_07_28_pi_Antibiotikaabgabemenge2014.html).

Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) (2015). "Berichte zur Lebensmittelsicherheit 2013." Zoonosen-Monitoring (https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/01_Lebensmittel/01_Im_mon_dokumente/01_Monitoring_Berichte/Imm_bericht_2013.html).

Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) (2016). "Menge der abgegebenen Antibiotika in der Tiermedizin halbiert." (http://www.bvl.bund.de/DE/08_PresseInfothek/01_FuerJournalisten/01_Presse_und_Hintergrundinformationen/05_Tierarzneimittel/2016/2016_08_03_pi_Antibiotikaabgabemenge2015.html).

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) (2011). "ESBL-bildende Bakterien in Lebensmitteln und deren Übertragbarkeit auf den Menschen."

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) (2012). "Antibiotikaresistente Keime auf Hähnchenfleisch-Proben sind nichts Neues."

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) (2015). "Schutz vor Lebensmittelinfektionen im Privathaushalt."

Bundesministerium für Gesundheit, Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, Bundesministerium für Bildung und Forschung (2015). "DART 2020 – Antibiotika-Resistenzen bekämpfen zum Wohl von Mensch und Tier." ([https://www.bundesgesundheitsministerium.de/service/publikationen/gesundheit/details.html?bmg\[pubid\]=2665](https://www.bundesgesundheitsministerium.de/service/publikationen/gesundheit/details.html?bmg[pubid]=2665))

Burgess, D. S., Hall, R. G., 2nd, Lewis, J. S., 2nd, Jorgensen, J. H., Patterson, J. E. (2003). "Clinical and microbiologic analysis of a hospital's extended-spectrum beta-lactamase-producing isolates over a 2-year period." Pharmacotherapy **23**(10): 1232-1237.

Bush, K. (1989a). "Characterization of beta-lactamases." Antimicrob Agents Chemother **33**(3): 259-263.

Bush, K. (1989b). "Classification of beta-lactamases - group-1, group-2a, group-2b, and group-2b'." Antimicrob Agents Chemother **33**(3): 264-270.

Bush, K. (1989c). "Classification of beta-lactamases - group-2c, group-2d, group-2e, group-3, and group-4." Antimicrob Agents Chemother **33**(3): 271-276.

- Bush, K., Jacoby, G. A., Medeiros, A. A. (1995). "A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure." Antimicrob Agents Chemother **39**(6): 1211-1233.
- Calbo, E., Freixas, N., Xercavins, M., Riera, M., Nicolas, C., Monistrol, O., Sole Mdel, M., Sala, M. R., Vila, J., Garau, J. (2011). "Foodborne nosocomial outbreak of SHV1 and CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology and control." Clin Infect Dis **52**(6): 743-749.
- Campbell, J. D., Lewis, J. S., 2nd, McElmeel, M. L., Fulcher, L. C., Jorgensen, J. H. (2012). "Detection of favorable oral cephalosporin-clavulanate interactions by in vitro disk approximation susceptibility testing of extended-spectrum-beta-lactamase-producing members of the *Enterobacteriaceae*." J Clin Microbiol **50**(3): 1023-1026.
- Canton, R., Gonzalez-Alba, J. M., Galan, J. C. (2012). "CTX-M enzymes: origin and diffusion." Frontiers in Microbiology **3**: 110.
- Canton, R., Novais, A., Valverde, A., Machado, E., Peixe, L., Baquero, F., Coque, T. M. (2008). "Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe." Clin Microbiol Infect **14 Suppl 1**: 144-153.
- Canton, R. und Coque, T. M. (2006). "The CTX-M beta-lactamase pandemic." Curr Opin Microbiol **9**(5): 466-475.
- Carattoli, A. (2008). "Animal reservoirs for extended spectrum beta-lactamase producers." Clin Microbiol Infect **14 Suppl 1**: 117-123.
- Carattoli, A., Lovari, S., Franco, A., Cordaro, G., Di Matteo, P., Battisti, A. (2005). "Extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Rome, Italy, from 2001 to 2003." Antimicrob Agents Chemother **49**(2): 833-835.
- Carmo, L. P., Nielsen, L. R., da Costa, P. M., Alban, L. (2014). "Exposure assessment of extended-spectrum beta-lactamases/AmpC beta-lactamases-producing *Escherichia coli* in meat in Denmark." Infect Ecol Epidemiol **4**.
- Caroff, N., Chamoux, C., Le Gallou, F., Espaze, E., Gavini, F., Gautreau, D., Richet, H., Reynaud, A. (1998). "Two epidemiologically related cases of *Rahnella aquatilis* bacteremia." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **17**(5): 349-352.
- Chagas, T. P., Seki, L.M., Cury J.C., Oliveira, J.A., Dávila, A.M., Silva, D.M., Asensi, M.D. (2011). "Multiresistance, beta-lactamase-encoding genes and bacterial diversity in hospital wastewater in Rio de Janeiro, Brazil." J Appl Microbiol **111**(3): 572-581.
- Chambers, H. F. (1997). "Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications." Clin Microbiol Rev **10**(4): 781-791.
- Chopra, I. und M. Roberts (2001). "Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance." Microbiol Mol Biol Rev **65**(2): 232-260 ; second page, table of contents.
- Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E. (2000). "Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group." Appl Environ Microbiol **66**(10): 4555-4558.

Clowes, R. C. (1972). "Molecular structure of bacterial plasmids." Bacteriol Rev **36**(3): 361-405.

Committee on Drug Use in Food Animals, Panel on Animal Health FSAPH, National Research Council. (1999). "The use of drugs in food animals: benefits and risks." Washington D.C.: National Academies Press.

Coque, T. M., Baquero, F., Canton, R. (2008). "Increasing prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Europe." Euro Surveill **13**(47).

Coque, T. M., Novais, A., Carattoli, A., Poirel, L., Pitout, J., Peixe, L., Baquero, F., Canton, R., Nordmann, P. (2008). "Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15." Emerg Infect Dis **14**(2): 195-200.

Cortes, P., Blanc, V., Mora, A., Dahbi, G., Blanco, J. E., Blanco, M., Lopez, C., Andreu, A., Navarro, F., Alonso, M. P., Bou, G., Blanco, J., Llagostera, M. (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.

Cosgrove, S. E. (2006). "The relationship between antimicrobial resistance and patient outcomes: mortality, length of hospital stay, and health care costs." Clin Infect Dis **42 Suppl 2**: S82-89.

Costa, D., Poeta, P., Saenz, Y., Vinue, L., Rojo-Bezares, B., Jouini, A., Zarazaga, M., Rodrigues, J., Torres, C. (2006). "Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum beta-lactamases of the CTX-M, TEM and SHV classes in faecal samples of wild animals in Portugal." J Antimicrob Chemother **58**(6): 1311-1312.

Costa, D., Vinue, L., Poeta, P., Coelho, A. C., Matos, M., Saenz, Y., Somalo, S., Zarazaga, M., Rodrigues, J., Torres, C. (2009). "Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates in faecal samples of broilers." Vet Microbiol **138**(3-4): 339-344

Czekalski, N., Berthold, T., Caucci, S., Egli, A., Burgmann, H. (2012). "Increased levels of multiresistant bacteria and resistance genes after wastewater treatment and their dissemination into Lake Geneva, Switzerland." Frontiers in Microbiology **3**.

Danel, F., Hall, L. M., Duke, B., Gur, D., Livermore, D. M. (1999). "OXA-17, a further extended-spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase, isolated from *Pseudomonas aeruginosa*." Antimicrob Agents Chemother **43**(6): 1362-1366.

Danel, F., Hall, L. M., Gur, D., Livermore, D. M. (1995). "OXA-14, another extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*." Antimicrob Agents Chemother **39**(8): 1881-1884.

Danel, F., Hall, L. M., Gur, D., Livermore, D. M. (1998). "OXA-16, a further extended-spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase, from two *Pseudomonas aeruginosa* isolates." Antimicrob Agents Chemother **42**(12): 3117-3122.

Datta, N. und Kontomichalou, P. (1965). "Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*." Nature **208**(5007): 239-241.

- Davies, J. E. (1997). "Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants." Ciba Found Symp **207**: 15-27; discussion 27-35.
- Dechamps, C., Sirot, D., Chanal, C., Poupart, M. C., Dumas, M. P., Sirot, J. (1991). "Concomitant dissemination of 3 extended-spectrum beta-lactamases among different *Enterobacteriaceae* isolated in a french hospital." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **27**(4): 441-457.
- Dhanji, H., Murphy, N. M., Akhigbe, C., Doumith, M., Hope, R., Livermore, D. M., Woodford, N. (2011). "Isolation of fluoroquinolone-resistant O25b:H4-ST131 *Escherichia coli* with CTX-M-14 extended-spectrum beta-lactamase from UK river water." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **66**(3): 512-516.
- Diaz Ricci, J. C. und Hernandez, M. E. (2000). "Plasmid effects on *Escherichia coli* metabolism." Crit Rev Biotechnol **20**(2): 79-108.
- Dierikx, C., van Essen-Zandbergen, A., Veldman, K., Smith, H. , Mevius, D. (2010). "Increased detection of extended-spectrum beta-lactamase producing *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolates from poultry." Vet Microbiol **145**(3-4): 273-278.
- Dierikx, C., van der Goot, J., Fabri, T., van Essen-Zandbergen, A., Smith, H., Mevius, D. (2013). "Extended-spectrum-beta-lactamase- and AmpC-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Dutch broilers and broiler farmers." J Antimicrob Chemother **68**(1): 60-67.
- Diwan, V., Chandran, S. P., Tamhankar, A. J., Stalsby Lundborg, C., Macaden, R. (2012). "Identification of extended-spectrum beta-lactamase and quinolone resistance genes in *Escherichia coli* isolated from hospital wastewater from central India." J Antimicrob Chemother **67**(4): 857-859.
- Doi, Y., Paterson, D. L., Egea, P., Pascual, A., Lopez-Cerero, L., Navarro, M. D., Adams-Haduch, J. M., Qureshi, Z. A., Sidjabat, H. E., Rodriguez-Bano, J. (2010). "Extended-spectrum and CMY-type beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in clinical samples and retail meat from Pittsburgh, USA and Seville, Spain." Clin Microbiol Infect **16**(1): 33-38.
- Dolejska, M., Frolkova, P., Florek, M., Jamborova, I., Purgertova, M., Kutilova, I., Cizek, A., Guenther, S., Literak, I. (2011). "CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clone B2-O25b-ST131 and *Klebsiella spp.* isolates in municipal wastewater treatment plant effluents." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **66**(12): 2784-2790.
- Donowitz, G. R. und Mandell, G. L. (1988). "Beta-Lactam antibiotics (1)." N Engl J Med **318**(7): 419-426.
- Drawz, S. M. und Bonomo, R. A. (2010). "Three decades of beta-lactamase inhibitors." Clin Microbiol Rev **23**(1): 160-201.
- Dubois, V., De Barbeyrac, B., Rogues, A. M., Arpin, C., Coulange, L., Andre, C., M'Zali, F., Megraud, F., Quentin, C. (2010). "CTX-M-producing *Escherichia coli* in a maternity ward: a likely community importation and evidence of mother-to-neonate transmission." J Antimicrob Chemother **65**(7): 1368-1371.
- Egea, P., Lopez-Cerero, L., Navarro, M. D., Rodriguez-Bano, J., Pascual, A. (2011). "Assessment of the presence of extended-spectrum beta-lactamase-producing

Escherichia coli in eggshells and ready-to-eat products." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **30**(9): 1045-1047.

Egea, P., Lopez-Cerero, L., Torres, E., Gomez-Sanchez Mdel, C., Serrano, L., Navarro Sanchez-Ortiz, M. D., Rodriguez-Bano, J., Pascual, A. (2012). "Increased raw poultry meat colonization by extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in the south of Spain." Int J Food Microbiol **159**(2): 69-73.

Elder, H. A., Roy, I., Lehman, S., Phillips, R. L., Kass, E. H. (1993). "Human studies to measure the effect of antibiotic residues." Vet Hum Toxicol **35 Suppl 1**: 31-36.

Endimiani, A., Luzzaro, F., Perilli, M., Lombardi, G., Coli, A., Tamborini, A., Amicosante, G., Toniolo, A. (2004). "Bacteremia due to *Klebsiella pneumoniae* isolates producing the TEM-52 extended-spectrum beta-lactamase: Treatment outcome of patients receiving imipenem or ciprofloxacin." Clinical Infectious Diseases **38**(2): 243-251.

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (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." (<http://ecdc.europa.eu/en/publications/publications/antimicrobial-resistance-jiacra-report.pdf>).

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2017). „Summary of the latest data on antibiotic consumption in the European Union ESAC-Net surveillance data November 2017.“ (https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/Final_2017_EAAD_ESAC-Net_Summary-edited%20-%20FINALwith%20erratum.pdf).

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (2017). "Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters." Version 7.1, 2017. (<http://www.eucast.org>).

European Food Safety Authority (EFSA) (2011). "Scientific opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum β -lactamases and/or AmpC β -lactamases in food and food-producing animals." EFSA Journal **9** (8): 2322[2395 pp.].

European Medicines Agency (EMA) (2006). "Reflection paper on the use of fluoroquinolones in food-producing animals in the European Union: development of resistance and impact on human and animal health." (http://www.emea.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Other/2009/10/WC500005155.pdf).

European Medicines Agency (EMA) (2015). "Sales of veterinary antimicrobial agents in 26 EU/EEA countries in 2013." (http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2015/10/WC500195687.pdf).

Evans, B. A. und Amyes, S.G.B. (2014). "OXA beta-lactamases." Clin Microbiol Rev **27**(2): 241-263.

Ewers, C., Grobbel, M., Stamm, I., Kopp, P. A., Diehl, I., Semmler, T., Fruth, A., Beutlich, J., Guerra, B., Wieler, L. H., Guenther, S. (2010). "Emergence of human pandemic O25:H4-ST131 CTX-M-15 extended-spectrum-beta-lactamase-producing

Escherichia coli among companion animals." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **65**(4): 651-660.

Ewers, C., Guenther, S., Stamm, I., Kopp, P. A., Janssen, T., Pfeifer, Y., Wieler, L. H., Bethe, A. (2012). "Extended-spectrum beta-lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective." Clinical Microbiology and Infection **18**(7): 646-655.

Falagas, M. E. und Karageorgopoulos, D. E. (2008). "Clinical microbiology and infectious diseases (ECCMID)--18th European Congress. Drug resistance among gram-negative and gram-positive bacteria." IDrugs **11**(6): 409-411.

Falagas, M. E. und Karageorgopoulos, D. E. (2009). "Extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms." J Hosp Infect **73**(4): 345-354.

Falagas, M. E., Karageorgopoulos, D. E., Dimopoulos, G. (2009). "Clinical significance of the pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics of tigecycline." Curr Drug Metab **10**(1): 13-21.

Falagas, M. E., Polemis, M., Alexiou, V. G., Marini-Mastrogiannaki, A., Kremastinou, J., Vatopoulos, A. C. (2008). "Antimicrobial susceptibility of multidrug-resistant gram negative bacteria to fosfomycin." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **27**(6): 439-443.

Falagas, M. E., Rafailidis, P. I., Kofteridis, D., Vitzili, S., Chelvatzoglou, F. C., Papaioannou, V., Maraki, S., Samonis, G., Michalopoulos, A. (2007). "Risk factors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections: a matched case control study." J Antimicrob Chemother **60**(5): 1124-1130.

Falagas, M. E., Rafailidis, P. I., Matthaiou, D. K. (2010). "Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options." Drug Resist Updat **13**(4-5): 132-138.

Fischer, J., Rodriguez, I., Baumann, B., Guiral, E., Beutin, L., Schroeter, A., Kaesbohrer, A., Pfeifer, Y., Helmuth, R., Guerra, B. (2014). "blaCTX-M-(1)(5)-carrying *Escherichia coli* and salmonella isolates from livestock and food in Germany." J Antimicrob Chemother **69**(11): 2951-2958.

Fischer, J., Rodriguez, I., Schmoger, S., Friese, A., Roesler, U., Helmuth, R., Guerra, B. (2013). "*Salmonella enterica subsp. enterica* producing VIM-1 carbapenemase isolated from livestock farms." J Antimicrob Chemother **68**(2): 478-480.

French, G. L. (2010). "The continuing crisis in antibiotic resistance." Int J Antimicrob Agents **36 Suppl 3**: S3-7.

Friedmann, R., Raveh, D., Zartzer, E., Rudensky, B., Broide, E., Attias, D., Yinnon, A. M. (2009). "Prospective evaluation of colonization with extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* among patients at hospital admission and of subsequent colonization with ESBL-producing *Enterobacteriaceae* among patients during hospitalization." Infection Control and Hospital Epidemiology **30**(6): 534-542.

Friese, A. und Rösler, U. (2013). "ESBL- und AmpC-produzierende Enterobakterien bei Tieren." Krankenhaushygiene up2date **08**(01): 49-63.

- Gales, A. C., Jones, R. N., Sader, H. S. (2006). "Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54 731 clinical isolates of gram-negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001-2004)." Clinical Microbiology and Infection **12**(4): 315-321.
- George, D. und Manges, A. (2010). "A systematic review of outbreak and non-outbreak studies of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* causing community-acquired infections." Epidemiol Infect. **138**(12): 1679-1690.
- Geser, N., Stephan, R., Hachler, H. (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.
- Geser, N., Stephan, R., Korczak, B. M., Beutin, L., Hachler, H. (2012). "Molecular identification of extended-spectrum-beta-lactamase genes from *Enterobacteriaceae* isolated from healthy human carriers in Switzerland." Antimicrob Agents Chemother **56**(3): 1609-1612.
- Ghuysen, J. M. (1994). "Molecular structures of penicillin-binding proteins and beta-lactamases." Trends Microbiol **2**(10): 372-380.
- Gilbert, N. (2012). "Rules tighten on use of antibiotics on farms." Nature **481**(7380): 125-125.
- Gniadkowski, M., Schneider, I., Jungwirth, R., Hryniewicz, W., Bauernfeind, A. (1998). "Ceftazidime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from three Polish hospitals: identification of three novel TEM- and SHV-5-type extended-spectrum beta-lactamases." Antimicrob Agents Chemother **42**(3): 514-520.
- Goffin, C. und Ghuysen, J. M. (1998). "Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs." Microbiol Mol Biol Rev **62**(4): 1079-1093.
- Grave, K., Torren-Edo, J., Mackay, D. (2010). "Comparison of the sales of veterinary antibacterial agents between 10 European countries." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **65**(9): 2037-2040.
- Gruber, I., Heudorf, U., Werner, G., Pfeifer, Y., Imirzalioglu, C., Ackermann, H., Brandt, C., Besier, S., Wichelhaus, T. A. (2013). "Multidrug-resistant bacteria in geriatric clinics, nursing homes, and ambulant care--prevalence and risk factors." Int J Med Microbiol **303**(8): 405-409.
- Guenther, S., Wuttke, J., Bethe, A., Vojtech, J., Schaufler, K., Semmler, T., Ulrich, R. G., Wieler, L. H., Ewers, C. (2013). "Is fecal carriage of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in urban rats a risk for public health?" Antimicrob Agents Chemother **57**(5): 2424-2425.
- Guinee, P., Ugueto, N., Vanleeuw, N. (1970). "*Escherichia coli* with resistance factors in vegetarians, babies, and nonvegetarians." Applied Microbiology **20**(4): 531-&.
- Hall, L. M., Livermore, D. M., Gur, D., Akova, M., Akalin, H. E. (1993). "OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*." Antimicrob Agents Chemother **37**(8): 1637-1644.

- Handal, T. und Olsen, I. (2000). "Antimicrobial resistance with focus on oral beta-lactamases." Eur J Oral Sci **108**(3): 163-174.
- Hansen, K. H., Damborg, P., Andreasen, M., Nielsen, S. S., Guardabassi, L. (2013). "Carriage and fecal counts of cefotaxime M-producing *Escherichia coli* in pigs: a longitudinal study." Appl Environ Microbiol **79**(3): 794-798.
- Hartung, J. und Kietzmann, M. (2012). "Use of antibiotics in animal production." (https://www.mri.bund.de/fileadmin/MRI/%C3%9Cber_das_MRI/Veranstaltungen/MRI_MRC2012_Abstracts.pdf).
- Hasman, H., Mevius, D., Veldman, K., Olesen, I., Aarestrup, F. M. (2005). "Beta-lactamases among extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-resistant salmonella from poultry, poultry products and human patients in the Netherlands." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **56**(1): 115-121.
- Hassan, S. A., Altalhi, A. D., Gherbawy, Y. A., El-Deeb, B. A. (2011). "Bacterial load of fresh vegetables and their resistance to the currently used antibiotics in Saudi Arabia." Foodborne Pathog Dis **8**(9): 1011-1018.
- Hawkey, P. M. und Jones, A. M. (2009). "The changing epidemiology of resistance." J Antimicrob Chemother **64** Suppl 1: i3-10.
- Hawkey, P. M. und Livermore, D. M. (2012). "Carbapenem antibiotics for serious infections." BMJ **344**: e3236.
- Hawser, S. P., Bouchillon, S. K., Hoban, D. J., Badal, R. E., Hsueh, P. R., Paterson, D. L. (2009). "Emergence of high levels of extended-spectrum-beta-lactamase-producing gram-negative bacilli in the Asia-Pacific region: Data from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) Program, 2007." Antimicrob Agents Chemother **53**(8): 3280-3284.
- Helfand, M. S., Totir, M. A., Carey, M. P., Hujer, A. M., Bonomo, R. A., Carey, P. R. (2003). "Following the reactions of mechanism-based inhibitors with beta-lactamase by raman crystallography." Biochemistry **42**(46): 13386-13392.
- Hernandez, J., Johansson, A., Stedt, J., Bengtsson, S., Porczak, A., Granholm, S., Gonzalez-Acuna, D., Olsen, B., Bonnedahl, J., Drobni, M. (2013). "Characterization and comparison of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) resistance genotypes and population structure of *Escherichia coli* isolated from Franklin's gulls (*Leucophaeus pipixcan*) and humans in Chile." PLoS One **8**(9): e76150.
- Hernandez, J., Stedt, J., Bonnedahl, J., Molin, Y., Drobni, M., Calisto-Ulloa, N., Gomez-Fuentes, C., Astorga-Espana, M. S., Gonzalez-Acuna, D., Waldenstrom, J., Blomqvist, M., Olsen, B. (2012). "Human-associated extended-spectrum beta-lactamase in the Antarctic." Appl Environ Microbiol **78**(6): 2056-2058.
- Hiroi, M., Matsui, S., Kubo, R., Iida, N., Noda, Y., Kanda, T., Sugiyama, K., Hara-Kudo, Y., Ohashi, N. (2012). "Factors for occurrence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in broilers." J Vet Med Sci **74**(12): 1635-1637.
- Hoban, D. J., Bouchillon, S. K., Johnson, B. M., Johnson, J. L., Dowzicky, M. J., TEST Program Grp (2005). "In vitro activity of tigecycline against 6792 gram-negative and gram-positive clinical isolates from the global Tigecycline Evaluation and Surveillance

Trial (TEST Program, 2004)." Diagnostic Microbiology and Infectious Disease **52**(3): 215-227.

Horton, R. A., Randall, L. P., Snary, E. L., Cockrem, H., Lotz, S., Wearing, H., Duncan, D., Rabie, A., McLaren, I., Watson, E., La Ragione, R. M., Coldham, N. G. (2011). "Fecal carriage and shedding density of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in cattle, chickens, and pigs: Implications for environmental contamination and food production." Appl Environ Microbiol **77**(11): 3715-3719.

Hughes, L., Hermans, P., Morgan, K. (2008). "Risk factors for the use of prescription antibiotics on UK broiler farms." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **61**(4): 947-952

Hunter, P. A., Dawson, S., French, G. L., Goossens, H., Hawkey, P. M., Kuijper, E. J., Nathwani, D., Taylor, D. J., Teale, C. J., Warren, R. E., Wilcox, M. H., Woodford, N., Wulf, M. W., Piddock, L. J. V. (2010). "Antimicrobial-resistant pathogens in animals and man: Prescribing, practices and policies (vol 65, pg 13, 2010)." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **65**(5): 1078-1078.

Izard, D., Gavini, F., Trinel, P. A., Leclere, H. (1979). "*Rahnella aquatilis*, a new member of the *Enterobacteriaceae*." Ann Microbiol (Paris) **130**(2): 163-177.

Jacoby, G. A. (1994). "Genetics of extended-spectrum beta-lactamases." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **13 Suppl 1**: S2-11.

Jacoby, G. A. und Medeiros, A. A. (1991). "More extended-spectrum beta-lactamases." Antimicrob Agents Chemother **35**(9): 1697-1704.

Jacoby, G. A. und Munoz-Price, L. S. (2005). "The new beta-lactamases." N Engl J Med **352**(4): 380-391.

Jakobsen, L., Garneau, P., Kurbasic, A., Bruant, G., Stegger, M., Harel, J., Jensen, K., Brousseau, R., Hammerum, A., Frimodt-Møller, N. (2011). "Microarray-based detection of extended virulence and antimicrobial resistance gene profiles in phylogroup B2 *Escherichia coli* of human, meat and animal origin." J Med Microbiol. **60**(Pt 10): 1502-1511.

Jakobsen, L., Kurbasic, A., Skjot-Rasmussen, L., Ejrnaes, K., Porsbo, L. J., Pedersen, K., Jensen, L. B., Emborg, H. D., Agerso, Y., Olsen, K. E., Aarestrup, F. M., Frimodt-Møller, N., Hammerum, A. M. (2010). "*Escherichia coli* isolates from broiler chicken meat, broiler chickens, pork, and pigs share phylogroups and antimicrobial resistance with community-dwelling humans and patients with urinary tract infection." Foodborne Pathog Dis **7**(5): 537-547.

Jiang, H. X., Tang, D., Liu, Y. H., Zhang, X. H., Zeng, Z. L., Xu, L., Hawkey, P. M. (2012). "Prevalence and characteristics of beta-lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Escherichia coli* isolated from farmed fish in China." J Antimicrob Chemother **67**(10): 2350-2353.

Johnson, J. R., Sannes, M. R., Croy, C., Johnston, B., Clabots, C., Kuskowski, M. A., Bender, J., Smith, K. E., Winokur, P. L., Belongia, E. A. (2007). "Antimicrobial drug-resistant *Escherichia coli* from humans and poultry products, Minnesota and Wisconsin, 2002-2004." Emerg Infect Dis **13**(6): 838-846.

- Kaase, M. und Kern, W. V. (2012). "Was bedeutet ESBL?." Dtsch Med Wochenschr **137**(40): 2010-2013.
- Kang, C. I., Kim, S. H., Park, W. B., Lee, K. D., Kim, H. B., Kim, E. C., Oh, M. D., Choe, K. W. (2004). "Bloodstream infections due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: Risk factors for mortality and treatment outcome, with special emphasis on antimicrobial therapy." Antimicrob Agents Chemother **48**(12): 4574-4581.
- Karageorgopoulos, D. E. und Falagas, M. E. (2008). "Current control and treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections." Lancet Infect Dis **8**(12): 751-762.
- Kelesidis, T., Karageorgopoulos, D. E., Kelesidis, I., Falagas, M. E. (2008). "Tigecycline for the treatment of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*: A systematic review of the evidence from microbiological and clinical studies." J Antimicrob Chemother **62**(5): 895-904.
- Kim, B. N., Woo, J. H., Kim, M. N., Ryu, J., Kim, Y. S. (2002). "Clinical implications of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia." J Hosp Infect **52**(2): 99-106.
- Kim, J. Y., Sohn, J. W., Park, D. W., Yoon, Y. K., Kim, Y. M., Kim, M. J. (2008). "Control of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* using a computer-assisted management program to restrict third-generation cephalosporin use." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **62**(2): 416-421.
- Kliebe, C., Nies, B. A., Meyer, J. F., Tolxdorff-Neutzling, R. M., Wiedemann, B. (1985). "Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins." Antimicrob Agents Chemother **28**(2): 302-307.
- Kluytmans, J. A., Overdeest, I. T., Willemsen, I., Kluytmans-van den Bergh, M. F., van der Zwaluw, K., Heck, M., Rijnsburger, M., Vandenbroucke-Grauls, C. M., Savelkoul, P. H., Johnston, B. D., Gordon, D., Johnson, J. R. (2013). "Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from retail chicken meat and humans: Comparison of strains, plasmids, resistance genes, and virulence factors." Clin Infect Dis **56**(4): 478-487.
- Kluytmans-van den Bergh, M. F., Huizinga, P., Bonten, M. J., Bos, M., De Bruyne, K., Friedrich, A. W., Rossen, J. W., Savelkoul, P. H., Kluytmans, J. A. (2016). "Presence of mcr-1-positive *Enterobacteriaceae* in retail chicken meat but not in humans in the Netherlands since 2009." Euro Surveill **21**(9).
- Knapp, C. W., Dolfing, J., Ehlert, P. A. I., Graham, D. W. (2010). "Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940." Environmental Science & Technology **44**(2): 580-587.
- Knothe, H., Shah, P., Krcmery, V., Antal, M., Mitsuhashi, S. (1983). "Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*." Infection **11**(6): 315-317.

- Knox, J. R. (1995). "Extended-spectrum and inhibitor-resistant TEM-type beta-lactamases: Mutations, specificity, and three-dimensional structure." Antimicrob Agents Chemother **39**(12): 2593-2601.
- Kojima, A., Ishii, Y., Ishihara, K., Esaki, H., Asai, T., Oda, C., Tamura, Y., Takahashi, T., Yamaguchi, K. (2005). "Extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains isolated from farm animals from 1999 to 2002: Report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program." Antimicrob Agents Chemother **49**(8): 3533-3537.
- Kola, A., Kohler, C., Pfeifer, Y., Schwab, F., Kuhn, K., Schulz, K., Balau, V., Breitbach, K., Bast, A., Witte, W., Gastmeier, P., Steinmetz, I. (2012). "High prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in organic and conventional retail chicken meat, Germany." J Antimicrob Chemother **67**(11): 2631-2634.
- Koniger, D., Gastmeier, P., Kola, A., Schwab, F., Meyer, E. (2014). "Vegetarians are not less colonized with extended-spectrum-beta-lactamase-producing bacteria than meat eaters." J Antimicrob Chemother **69**(1): 281-282.
- Kumarasamy, K. K., Toleman, M. A., Walsh, T. R., Bagaria, J., Butt, F., Balakrishnan, R., Chaudhary, U., Doumith, M., Giske, C. G., Irfan, S., Krishnan, P., Kumar, A. V., Maharjan, S., Mushtaq, S., Noorie, T., Paterson, D. L., Pearson, A., Perry, C., Pike, R., Rao, B., Ray, U., Sarma, J. B., Sharma, M., Sheridan, E., Thirunarayan, M. A., Turton, J., Upadhyay, S., Warner, M., Welfare, W., Livermore, D. M., Woodford, N. (2010). "Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: A molecular, biological, and epidemiological study." Lancet Infect Dis **10**(9): 597-602.
- Kummerer, K. (2004). "Resistance in the environment." J Antimicrob Chemother **54**(2): 311-320.
- Lartigue, M. F., Zinsius, C., Wenger, A., Bille, J., Poirel, L., Nordmann, P. (2007). "Extended-spectrum beta-lactamases of the CTX-M type now in Switzerland." Antimicrob Agents Chemother **51**(8): 2855-2860.
- Lau, S. H., Kaufmann, M. E., Livermore, D. M., Woodford, N., Willshaw, G. A., Cheasty, T., Stamper, K., Reddy, S., Cheesbrough, J., Bolton, F. J., Fox, A. J., Upton, M. (2008). "UK epidemic *Escherichia coli* strains A-E, with CTX-M-15 beta-lactamase, all belong to the international O25:H4-ST131 clone." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **62**(6): 1241-1244.
- Laupland, K. B., Church, D. L., Vidakovich, J., Mucenski, M., Pitout, J. D. (2008). "Community-onset extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli*: Importance of international travel." J Infect **57**(6): 441-448.
- Lausch, K. R., Fuursted, K., Larsen, C. S., Storgaard, M. (2013). "Colonisation with multi-resistant *Enterobacteriaceae* in hospitalised Danish patients with a history of recent travel: A cross-sectional study." Travel Med Infect Dis **11**(5): 320-323.
- Lawrence, J. (2006). "Long Term Meat Production and Consumption Trends." (<http://www.thepoultrysite.com/articles/527/long-term-%20meat-production-and-consumption-trends/>).

Leclercq, R., Canton, R., Brown, D. F., Giske, C. G., Heisig, P., MacGowan, A. P., Mouton, J. W., Nordmann, P., Rodloff, A. C., Rossolini, G. M., Soussy, C. J., Steinbakk, M., Winstanley, T. G., Kahlmeter, G. (2013). "EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing." Clin Microbiol Infect **19**(2): 141-160.

Lee, C. H., Chu, C., Liu, J. W., Chen, Y. S., Chiu, C. J., Su, L. H. (2007). "Collateral damage of flomoxef therapy: In vivo development of porin deficiency and acquisition of blaDHA-1 leading to ertapenem resistance in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae* producing CTX-M-3 and SHV-5 beta-lactamases." J Antimicrob Chemother **60**(2): 410-413.

Leverstein-van Hall, M. A., Dierikx, C. M., Cohen Stuart, J., Voets, G. M., van den Munckhof, M. P., van Essen-Zandbergen, A., Platteel, T., Fluit, A. C., van de Sande-Bruinsma, N., Scharinga, J., Bonten, M. J., Mevius, D. J., National ESBL Surveillance Group (2011). "Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains." Clin Microbiol Infect **17**(6): 873-880

Levy, S. B. und Marshall, B. (2004). "Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses." Nat Med **10**(12 Suppl): S122-129.

Liebana, E., Batchelor, M., Hopkins, K. L., Clifton-Hadley, F. A., Teale, C. J., Foster, A., Barker, L., Threlfall, E. J., Davies, R. H. (2006). "Longitudinal farm study of extended-spectrum beta-lactamase-mediated resistance." J Clin Microbiol **44**(5): 1630-1634.

Liebert, C. A., Hall, R. M., Summers, A. O. (1999). "Transposon Tn21, flagship of the floating genome." Microbiol Mol Biol Rev **63**(3): 507-522.

Literak, I., Dolejska, M., Rybarikova, J., Cizek, A., Strejckova, P., Vyskocilova, M., Friedman, M., Klimes, J. (2009). "Highly variable patterns of antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* isolates from pigs, sympatric rodents, and flies." Microb Drug Resist **15**(3): 229-237.

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. (2016). "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.

Livermore, D. M. (1995). "Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance." Clin Microbiol Rev **8**(4): 557-584.

Livermore, D. M. und Hawkey, P. M. (2005). "CTX-M: Changing the face of ESBLs in the UK." J Antimicrob Chemother **56**(3): 451-454.

Lopez-Cerero, L., Egea, P., Serrano, L., Navarro, D., Mora, A., Blanco, J., Doi, Y., Paterson, D. L., Rodriguez-Bano, J., Pascual, A. (2011). "Characterisation of clinical and food animal *Escherichia coli* isolates producing CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase belonging to ST410 phylogroup A." Int J Antimicrob Agents **37**(4): 365-367.

Lowe, C. F., Katz, K., McGeer, A. J., Muller, M. P., Toronto ESBL Working Grp (2013). "Efficacy of admission screening for extended-spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae*." PLoS One **8**(4).

- Lu, S. Y., Zhang, Y. L., Geng, S. N., Li, T. Y., Ye, Z. M., Zhang, D. S., Zou, F., Zhou, H. W. (2010). "High diversity of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in an urban river sediment habitat." Appl Environ Microbiol **76**(17): 5972-5976.
- MacFaddin, J. F. (1985). "Media for the isolation – cultivation – maintenance of medical bacteria." J. Basic Microbiology **26**(4): 1521-4028.
- Machado, E., Coque, T. M., Canton, R., Sousa, J. C., Peixe, L. (2008). "Antibiotic resistance integrons and extended-spectrum beta-lactamases among *Enterobacteriaceae* isolates recovered from chickens and swine in Portugal." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **62**(2): 296-302.
- Madec, J. Y., Lazizzera, C., Chatre, P., Meunier, D., Martin, S., Lepage, G., Menard, M. F., Lebreton, P., Rambaud, T. (2008). "Prevalence of fecal carriage of acquired expanded-spectrum cephalosporin resistance in *Enterobacteriaceae* strains from cattle in France." J Clin Microbiol **46**(4): 1566-1567.
- Manges, A. R. und Johnson, J. R. (2012). "Food-borne origins of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections." Clin Infect Dis **55**(5): 712-719.
- Manges, A., Johnson, J., Foxman, B., O'Bryan, T., Fullerton, K., Riley, L. (2001). "Widespread distribution of urinary tract infections caused by a multidrug-resistant *Escherichia coli* clonal group." N Engl J Med. **345**(14): 1007-1013.
- Manges, A. R., Smith, S. P., Lau, B. J., Nuval, C. J., Eisenberg, J. N. S., Dietrich, P. S., Riey, L. W. (2007). "Retail meat consumption and the acquisition of antimicrobial resistant *Escherichia coli* causing urinary tract infections: A case-control study." Foodborne Pathog Dis **4**(4): 419-431.
- Massova, I. und Mobashery, S. (1998). "Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and beta-lactamases." Antimicrob Agents Chemother **42**(1): 1-17.
- Matagne, A., Lamotte-Brasseur, J., Frere, J. M. (1998). "Catalytic properties of class A beta-lactamases: Efficiency and diversity." Biochem J **330** (Pt 2): 581-598.
- Matsukura, H., Katayama, K., Kitano, N., Kobayashi, K., Kanegane, C., Higuchi, A., Kyotani, S. (1996). "Infective endocarditis caused by an unusual gram-negative rod, *Rahnella aquatilis*." Pediatr Cardiol **17**(2): 108-111.
- Matsumoto, Y. und Inoue, M. (1999). "Characterization of SFO-1, a plasmid-mediated inducible class A beta-lactamase from *Enterobacter cloacae*." Antimicrob Agents Chemother **43**(2): 307-313.
- McGann, P., Snesrud, E., Maybank, R., Corey, B., Ong, A. C., Clifford, R., Hinkle, M., Whitman, T., Lesho, E., Schaecher, K. E. (2016). "*Escherichia coli* harboring mcr-1 and blaCTX-M on a novel IncF plasmid: First report of mcr-1 in the United States." Antimicrob Agents Chemother **60**(7): 4420-4421.
- McGregor, A. (2003). "Transposon and transposome mutagenesis of plasmids, cosmids, and BACs." Methods Mol Biol **235**: 233-245.
- Medeiros, A. A. (1984). "Beta-lactamases." Br Med Bull **40**(1): 18-27.

Medeiros, A. A. (1997). "Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics." Clin Infect Dis **24 Suppl 1**: S19-45.

Mesa, R. J., Blanc, V., Blanch, A. R., Cortes, P., Gonzalez, J. J., Lavilla, S., Miro, E., Muniesa, M., Saco, M., Tortola, M. T., Mirelis, B., Coll, P., Llagostera, M., Prats, G., Navarro, F. (2006). "Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in different environments (humans, food, animal farms and sewage)." J Antimicrob Chemother **58**(1): 211-215.

Mevius, D. J. K., Koene, M. G. J., Witt, B., van Pelt, W., Bondt, W. (2009). "Monitoring of antimicrobial resistance and antibiotic usage in animals in the Netherlands in 2009." Central Veterinary Institute of Wageningen University and Research Centre, Wageningen, The Netherlands.

Meyer, K. S., Urban, C., Eagan, J. A., Berger, B. J., Rahal, J. J. (1993). "Nosocomial outbreak of *Klebsiella* infection resistant to late-generation cephalosporins." Ann Intern Med **119**(5): 353-358.

Mugnier, P., Casin, I., Bouthors, A. T., Collatz, E. (1998). "Novel OXA-10-derived extended-spectrum beta-lactamases selected in vivo or in vitro." Antimicrob Agents Chemother **42**(12): 3113-3116.

Murray, B. E., Mathewson, J. J., Dupont, H. L., Ericsson, C. D., Reves, R. R. (1990). "Emergence of resistant fecal *Escherichia coli* in travelers not taking prophylactic antimicrobial agents." Antimicrob Agents Chemother **34**(4): 515-518.

Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H. K., Ruth, P., Schäfer-Korting, M. (2008). Mutschler Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.

National Antimicrobial Resistance Monitoring System – Enteric Bacteria (NARMS) (2012). 2010 Executive Report." Rockville, MD: U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. (<https://www.fda.gov/downloads/animalveterinary/safetyhealth/antimicrobialresistance/nationalantimicrobialresistancemonitoringsystem/ucm312360.pdf>).

Neu, H. C. (1992). "The crisis in antibiotic resistance." Science **257**(5073): 1064-1073.

Nicolas-Chanoine, M. H., Blanco, J., Leflon-Guibout, V., Demarty, R., Alonso, M. P., Canica, M. M., Park, Y. J., Lavigne, J. P., Pitout, J., Johnson, J. R. (2008). "Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15." J Antimicrob Chemother **61**(2): 273-281.

Nicolas-Chanoine, M. H., Jarlier, V., La Collegiale de Bacteriologie-Virologie-Hygiene Hospitaliere de l'Assistance Publique, Hopitaux de Paris France (2008). "Extended-spectrum beta-lactamases in long-term-care facilities." Clin Microbiol Infect **14 Suppl 1**: 111-116.

Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) (2011). "Bericht über den Antibiotikaeinsatz in der landwirtschaftlichen Nutztierhaltung in Niedersachsen." (<https://www.ml.niedersachsen.de/download/62481>).

- Nordmann, P. und Poirel, L. (2016). "Plasmid-mediated colistin resistance: An additional antibiotic resistance menace." Clin Microbiol Infect **22**(5): 398-400.
- Nordmann, P., Lienhard, R., Kieffer, N., Clerc, O., Poirel, L. (2016). "Plasmid-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* in bacteremia in Switzerland." Clin Infect Dis **62**(10): 1322-1323.
- Nordmann, P., Ronco, E., Naas, T., Duport, C., Michel-Briand, Y., Labia, R. (1993). "Characterization of a novel extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*." Antimicrob Agents Chemother **37**(5): 962-969.
- Nordstrom, I., Liu, C. M., Price, L. B. (2013). "Foodborne urinary tract infections: A new paradigm for antimicrobial-resistant foodborne illness." Front Microbiol. **6**(4): 29.
- Nuesch-Inderbinnen, M., Zurfluh, K., Peterhans, S., Hachler, H., Stephan, R. (2015). "Assessment of the prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in ready-to-eat salads, fresh-cut fruit, and sprouts from the Swiss Market." J Food Prot **78**(6): 1178-1181.
- Ojer-Usoz, E., Gonzalez, D., Vitas, A. I., Leiva, J., Garcia-Jalon, I., Febles-Casquero, A., Escolano Mde, L. (2013). "Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in meat products sold in Navarra, Spain." Meat Sci **93**(2): 316-321.
- Oteo, J., Bautista, V., Lara, N., Cuevas, O., Arroyo, M., Fernandez, S., Lazaro, E., de Abajo, F. J., Campos, J., Spanish ESBL-EARS-Net Study Grp (2010). "Parallel increase in community use of fosfomycin and resistance to fosfomycin in extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli*." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **65**(11): 2459-2463.
- Overdevest, I., Willemsen, I., Rijnsburger, M., Eustace, A., Xu, L., Hawkey, P., Heck, M., Savelkoul, P., Vandenbroucke-Grauls, C., van der Zwaluw, K., Huijsdens, X., Kluytmans, J. (2011). "Extended-spectrum beta-lactamase genes of *Escherichia coli* in chicken meat and humans, The Netherlands." Emerg Infect Dis **17**(7): 1216-1222.
- Padayatti, P. S., Helfand, M. S., Totir, M. A., Carey, M. P., Carey, P. R., Bonomo, R. A., van den Akker, F. (2005). "High resolution crystal structures of the trans-enamine intermediates formed by sulbactam and clavulanic acid and E166A SHV-1 beta-lactamase." J Biol Chem **280**(41): 34900-34907.
- Padayatti, P. S., Helfand, M. S., Totir, M. A., Carey, M. P., Hujer, A. M., Carey, P. R., Bonomo, R. A., van den Akker, F. (2004). "Tazobactam forms a stoichiometric trans-enamine intermediate in the E166A variant of SHV-1 beta-lactamase: 1.63 Å crystal structure." Biochemistry **43**(4): 843-848.
- Pangon, B., Bizet, C., Bure, A., Pichon, F., Philippon, A., Regnier, B., Gutmann, L. (1989). "In vivo selection of a cephamycin-resistant, porin-deficient mutant of *Klebsiella pneumoniae* producing a TEM-3 beta-lactamase." J Infect Dis **159**(5): 1005-1006.
- Paterson, D. L. und Bonomo, R. A. (2005). "Extended-spectrum beta-lactamases: A clinical update." Clin Microbiol Rev **18**(4): 657-686.
- Paterson, D. L., Ko, W. C., Von Gottberg, A., Mohapatra, S., Casellas, J. M., Goossens, H., Mulazimoglu, L., Trenholme, G., Klugman, K. P., Bonomo, R. A., Rice, L. B.,

Wagener, M. M., McCormack, J. G., Yu, V. L. (2004). "Antibiotic therapy for *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: implications of production of extended-spectrum beta-lactamases." Clin Infect Dis **39**(1): 31-37.

Peduzzi, J., Farzaneh, S., Reynaud, A., Barthelemy, M., Labia, R. (1997). "Characterization and amino acid sequence analysis of a new oxyimino cephalosporin-hydrolyzing class A beta-lactamase from *Serratia fonticola* CUV." Biochim Biophys Acta **1341**(1): 58-70.

Peduzzi, J., Reynaud, A., Baron, P., Barthelemy, M., Labia, R. (1994). "Chromosomally encoded cephalosporin-hydrolyzing beta-lactamase of *Proteus vulgaris* RO104 belongs to Ambler's class A." Biochim Biophys Acta **1207**(1): 31-39.

Peirano, G., Laupland, K. B., Gregson, D. B., Pitout, J. D. (2011). "Colonization of returning travelers with CTX-M-producing *Escherichia coli*." J Travel Med **18**(5): 299-303.

Peterson, L. R. (2008). "Antibiotic policy and prescribing strategies for therapy of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: The role of piperacillin-tazobactam." Clin Microbiol Infect **14 Suppl 1**: 181-184.

Pfaller, M. A. und Segreti, J. (2006). "Overview of the epidemiological profile and laboratory detection of extended-spectrum beta-lactamases." Clin Infect Dis **42 Suppl 4**: S153-163.

Pfeifer, Y. (2007). "ESBL und AmpC: β -Laktamasen als eine Hauptursache der Cephalosporin-Resistenz bei Enterobakterien." Epidemiologisches Bulletin - RKI **28**: 247-250.

Pfeifer, Y. und Eller, C. (2012). "Aktuelle Daten und Trends zur β -Lactam-Resistenz bei gramnegativen Infektionserregern." Bundesgesundheitsblatt - RKI **55**: 1405–1409.

Pfeifer, Y., Eller, C., Leistner, R., Valenza, G., Nickel, S, Guerra, B., Fischer, J., Werner, G. (2013). "ESBL-Bildner als Infektionserreger beim Menschen und die Frage nach dem zoonotischen Reservoir." HygMed **38**(7/8): 294-299.

Philippon, A., Arlet, G., Lagrange, P. H. (1994). "Origin and impact of plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamases." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **13 Suppl 1**: S17-29.

Philippon, A., Ben Redjeb, S., Fournier, G., Ben Hassen, A. (1989). "Epidemiology of extended spectrum beta-lactamases." Infection **17**(5): 347-354.

Pitout, J. D., Gregson, D. B., Church, D. L., Elsayed, S., Laupland, K. B. (2005). "Community-wide outbreaks of clonally related CTX-M-14 beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains in the Calgary health region." J Clin Microbiol **43**(6): 2844-2849.

Pitout, J. D. und Laupland, K. B. (2008). "Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: An emerging public-health concern." Lancet Infect Dis **8**(3): 159-166.

Pitout, J. D., Nordmann, P., Laupland, K. B., Poirel, L. (2005). "Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community." J Antimicrob Chemother **56**(1): 52-59.

- Platell, J. L., Cobbold, R. N., Johnson, J. R., Heisig, A., Heisig, P., Clabots, C., Kuskowski, M. A., Trott, D. J. (2011). "Commonality among fluoroquinolone-resistant sequence type ST131 extraintestinal *Escherichia coli* isolates from humans and companion animals in Australia." Antimicrob Agents Chemother **55**(8): 3782-3787.
- Poirel, L., Girlich, D., Naas, T., Nordmann, P. (2001). "OXA-28, an extended-spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and its plasmid- and integron-located gene." Antimicrob Agents Chemother **45**(2): 447-453.
- Poirel, L., Kieffer, N., Liassine, N., Thanh, D., Nordmann, P. (2016). "Plasmid-mediated carbapenem and colistin resistance in a clinical isolate of *Escherichia coli*." Lancet Infect Dis. **16**(3): 281.
- Poirel, L., Naas, T., Guibert, M., Chaibi, E. B., Labia, R., Nordmann, P. (1999). "Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene." Antimicrob Agents Chemother **43**(3): 573-581.
- Poole, K. (2004). "Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria." Clin Microbiol Infect **10**(1): 12-26.
- Prasad, P., Sun, J., Danner, R. L., Natanson, C. (2012). "Excess deaths associated with tigecycline after approval based on noninferiority trials." Clin Infect Dis **54**(12): 1699-1709.
- Randall, L. P., Clouting, C., Horton, R. A., Coldham, N. G., Wu, G., Clifton-Hadley, F. A., Davies, R. H., Teale, C. J. (2011). "Prevalence of *Escherichia coli* carrying extended-spectrum beta-lactamases (CTX-M and TEM-52) from broiler chickens and turkeys in Great Britain between 2006 and 2009." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **66**(1): 86-95.
- Raphael, E., Wong, L. K., Riley, L. W. (2011). "Extended-spectrum beta-lactamase gene sequences in gram-negative saprophytes on retail organic and nonorganic spinach." Appl Environ Microbiol **77**(5): 1601-1607.
- Reich, F., Atanassova, V., Klein, G. (2013). "Extended-spectrum beta-lactamase- and AmpC-producing enterobacteria in healthy broiler chickens, Germany." Emerg Infect Dis **19**(8): 1253-1259.
- Reinthal, F. F., Feierl, G., Galler, H., Haas, D., Leitner, E., Mascher, F., Melkes, A., Posch, J., Winter, I., Zarfel, G., Marth, E. (2010). "ESBL-producing *E. coli* in Austrian sewage sludge." Water Research **44**(6): 1981-1985.
- Reuland, E. A., Al Naiemi, N., Raadsen, S. A., Savelkoul, P. H., Kluytmans, J. A., Vandenbroucke-Grauls, C. M. (2014). "Prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in raw vegetables." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **33**(10): 1843-1846.
- Reuland, E. A., Overdeest, I. T., Al Naiemi, N., Kalpoe, J. S., Rijnsburger, M. C., Raadsen, S. A., Ligtenberg-Burgman, I., van der Zwaluw, K. W., Heck, M., Savelkoul, P. H., Kluytmans, J. A., Vandenbroucke-Grauls, C. M. (2013). "High prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* carriage in Dutch community patients with gastrointestinal complaints." Clin Microbiol Infect **19**(6): 542-549.

Robert Koch Institut (RKI) (2007). "ESBL und AmpC: β -Laktamasen als eine Hauptursache der Cephalosporin-Resistenz bei Enterobakterien." Epidemiologisches Bulletin **28**:247.

Robert Koch Institut (RKI) (2010). "Zum Auftreten von multiresistenten Erregern mit der Carbapenemase NDM-1 ("Neu-Delhi Metallo-Beta-Laktamase")." (http://www.rki.de/clin_117/nn_206122/DE/Content/Infekt/Antibiotikaresistenz/NDM-1/NDM-1.html).

Robert Koch Institut (RKI) (2011). "Abschließende Darstellung und Bewertung der epidemiologischen Erkenntnisse im EHEC O104:H4 Ausbruch, Deutschland 2011." (https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/E/EHEC/EHEC_O104/EHEC-Abschlussbericht.pdf;jsessionid=9E2127EA6092B83DA4500AD56E03762B.2_cid290?_blob=publicationFile).

Robert Koch Institut (RKI) (2011). "ESBL-bildende Klebsiellen: Zu einem Ausbruch in einer neonatologischen Abteilung eines Bremer Krankenhauses." Epidemiologisches Bulletin **45**. (https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2011/Ausgaben/45_11.pdf?_blob=publicationFile).

Robert Koch Institut (RKI) (2011). "Zum Auftreten multiresistenter Erreger bei in EU-Ländern behandelten libyschen Patienten." Epidemiologisches Bulletin **41**: 379. (http://edoc.rki.de/documents/rki_fv/re5VVIWgMxWc/PDF/29YxYwLb1B3H6.pdf).

Robert Koch Institut (RKI) (2016). "Colistin-Resistenz bei Gram-negativen Bakterien – die Situation in Deutschland. Aktuelle Daten und Informationen zu Infektionskrankheiten und Public Health." Epidemiologisches Bulletin **46**. (https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2016/Ausgaben/46_16.pdf?_blob=publicationFile).

Rodriguez-Bano, J., Alcalá, J. C., Cisneros, J. M., Grill, F., Oliver, A., Horcajada, J. P., Tortola, T., Mirelis, B., Navarro, G., Cuenca, M., Esteve, M., Pena, C., Llanos, A. C., Canton, R., Pascual, A. (2008). "Community infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*." Arch Intern Med **168**(17): 1897-1902.

Rodriguez-Bano, J., Lopez-Cerero, L., Navarro, M. D., Diaz de Alba, P., Pascual, A. (2008). "Faecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: Prevalence, risk factors and molecular epidemiology." J Antimicrob Chemother **62**(5): 1142-1149.

Rodriguez-Bano, J., Navarro, M. D., Retamar, P., Picon, E., Pascual, A., Extended-Spectrum Beta-Lactamases-Red Espanola de Investigacion en Patologia Infecciosa/Grupo de Estudio de Infeccion Hospitalaria, Group (2012). "Beta-Lactam/beta-lactam inhibitor combinations for the treatment of bacteremia due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: A post hoc analysis of prospective cohorts." Clin Infect Dis **54**(2): 167-174.

Rodriguez-Bano, J., Picon, E., Gijon, P., Hernandez, J. R., Ruiz, M., Pena, C., Almela, M., Almirante, B., Grill, F., Colomina, J., Gimenez, M., Oliver, A., Horcajada, J. P., Navarro, G., Coloma, A., Pascual, A., Spanish Network for Research in Infectious Diseases (2010). "Community-onset bacteremia due to extended-spectrum beta-

lactamase-producing *Escherichia coli*: Risk factors and prognosis." Clin Infect Dis **50**(1): 40-48.

Rogers, B. A., Sidjabat, H. E., Paterson, D. L. (2011). "*Escherichia coli* O25b-ST131: A pandemic, multiresistant, community-associated strain." J Antimicrob Chemother **66**(1): 1-14.

Rossolini, G. M., Franceschini, N., Lauretti, L., Caravelli, B., Riccio, M. L., Galleni, M., Frere, J. M., Amicosante, G. (1999). "Cloning of a *Chryseobacterium (Flavobacterium) meningosepticum* chromosomal gene (blaA(CME)) encoding an extended-spectrum class A beta-lactamase related to the bacteroides cephalosporinases and the VEB-1 and PER beta-lactamases." Antimicrob Agents Chemother **43**(9): 2193-2199.

Rottier, W. C., Ammerlaan, H. S., Bonten, M. J. (2012). "Effects of confounders and intermediates on the association of bacteraemia caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* and patient outcome: A meta-analysis." J Antimicrob Chemother **67**(6): 1311-1320.

Ruimy, R., Brisabois, A., Bernede, C., Skurnik, D., Barnat, S., Arlet, G., Momcilovic, S., Elbaz, S., Moury, F., Vibet, M. A., Courvalin, P., Guillemot, D., Andremont, A. (2010). "Organic and conventional fruits and vegetables contain equivalent counts of gram-negative bacteria expressing resistance to antibacterial agents." Environ Microbiol **12**(3): 608-615.

Sannes, M. R., Belongia, E. A., Kieke, B., Smith, K., Kieke, A., Vandermause, M., Bender, J., Clabots, C., Winokur, P., Johnson, J. R. (2008). "Predictors of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* in the feces of vegetarians and newly hospitalized adults in Minnesota and Wisconsin." J Infect Dis **197**(3): 430-434.

Sasaki, T., Hirai, I., Niki, M., Nakamura, T., Komalamisra, C., Maipanich, W., Kusolsuk, T., Sa-nguankiat, S., Pubampen, S., Yamamoto, Y. (2010). "High prevalence of CTX-M beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in stool specimens obtained from healthy individuals in Thailand." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **65**(4): 666-668.

Schoevaerdt, D., Verroken, A., Huang, T. D., Frennet, M., Berhin, C., Jamart, J., Bogaerts, P., Swine, C., Glupczynski, Y. (2012). "Multidrug-resistant bacteria colonization amongst patients newly admitted to a geriatric unit: A prospective cohort study." J Infect **65**(2): 109-118.

Schwaber, M. J. und Carmeli, Y. (2007). "Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum beta-lactamase production in *Enterobacteriaceae* bacteraemia: A systematic review and meta-analysis." J Antimicrob Chemother **60**(5): 913-920.

Schwaiger, K., Helmke, K., Holzel, C. S., Bauer, J. (2011). "Antibiotic resistance in bacteria isolated from vegetables with regards to the marketing stage (farm vs. supermarket)." Int J Food Microbiol **148**(3): 191-196.

Schwarz, S., Kehrenberg, C. Frech, G. (2002). "Antimicrobial resistance." Landbauforschung Völkenrode Sonderheft **227**: 89-91.

- Schwarz, S., Kehrenberg, C., Walsh, T. R. (2001). "Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production." Int J Antimicrob Agents **17**(6): 431-437.
- Shanahan, P. M., Thomson, C. J., Amyes, S. G. (1994 a). "Beta-lactam resistance in aerobic faecal flora from general practice patients in the UK." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **13**(9): 760-763.
- Shanahan, P. M., Thomson, C. J., Amyes, S. G. (1994 b). "Beta-lactam resistance in aerobic commensal faecal flora." Int J Antimicrob Agents **3**(4): 259-266.
- Shanahan, P. M., Thomson, C. J., Amyes, S. G. (1995). "Beta-lactam resistance in normal faecal flora from South Africa." Epidemiol Infect **115**(2): 243-253.
- Shanahan, P. M., Wylie, B. A., Adrian, P. V., Koornhof, H. J., Thomson, C. J., Amyes, S. G. (1993). "The prevalence of antimicrobial resistance in human faecal flora in South Africa." Epidemiol Infect **111**(2): 221-228.
- Sharp, H., Valentin, L., Fischer, J., Guerra, B., Appel, B., Käsbohrer, A. (2014). "Estimation of the transfer of ESBL-producing *Escherichia coli* to humans in Germany." Berl Munch Tierarztl Wochenschr. **127**(11-12): 464-477.
- Shin, S. W., Jung, M., Shin, M. K., Yoo, H. S. (2015). "Profiling of antimicrobial resistances and plasmid replicon types in beta-lactamase producing *Escherichia coli* isolated from Korean beef cattle." J Vet Sci.
- Siegel, J. D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., Hlth Care Infect Control Practices (2007). "2007 guideline for isolation precautions: Preventing transmission of infectious agents in health care settings." Am J Infect Control **35**(10): S65-S164.
- Silva, J., Aguilar, C., Ayala, G., Estrada, M. A., Garza-Ramos, U., Lara-Lemus, R., Ledezma, L. (2000). "TLA-1: A new plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase from *Escherichia coli*." Antimicrob Agents Chemother **44**(4): 997-1003.
- Simoës, R. R., Poirel, L., Da Costa, P. M., Nordmann, P. (2010). "Seagulls and beaches as reservoirs for multidrug-resistant *Escherichia coli*." Emerg Infect Dis **16**(1): 110-112.
- Sirot, D., Sirot, J., Labia, R., Morand, A., Courvalin, P., Darfeuille-Michaud, A., Perroux, R., Cluzel, R. (1987). "Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: Identification of CTX-1, a novel beta-lactamase." J Antimicrob Chemother **20**(3): 323-334.
- Siu, L. K., Lu, P. L., Hsueh, P. R., Lin, F. M., Chang, S. C., Luh, K. T., Ho, M., Lee, C. Y. (1999). "Bacteremia due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a pediatric oncology ward: Clinical features and identification of different plasmids carrying both SHV-5 and TEM-1 genes." J Clin Microbiol **37**(12): 4020-4027.
- Skov, R. L. und Monnet, D. L. (2016). "Plasmid-mediated colistin resistance (mcr-1 gene): Three months later, the story unfolds." Euro Surveill **21**(9).
- Smet, A., Martel, A., Persoons, D., Dewulf, J., Heyndrickx, M., Catry, B., Herman, L., Haesebrouck, F., Butaye, P. (2008). "Diversity of extended-spectrum beta-lactamases

and class C beta-lactamases among cloacal *Escherichia coli* isolates in Belgian broiler farms." Antimicrob Agents Chemother **52**(4): 1238-1243.

Sougakoff, W., Goussard, S., Gerbaud, G., Courvalin, P. (1988). "Plasmid-mediated resistance to third-generation cephalosporins caused by point mutations in TEM-type penicillinase genes." Rev Infect Dis **10**(4): 879-884.

Spellberg, B., Gidos, R., Gilbert, D., Bradley, J., Boucher, H. W., Scheld, W. M., Bartlett, J. G., Edwards, J., Jr., Infectious Diseases Society of America (2008). "The epidemic of antibiotic-resistant infections: A call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America." Clin Infect Dis **46**(2): 155-164.

Stock, I., Gruger, T., Wiedemann, B. (2000). "Natural antibiotic susceptibility of *Rahnella aquatilis* and *R. aquatilis*-related strains." J Chemother **12**(1): 30-39.

Sturenburg, E. und Mack, D. (2003). "Extended-spectrum beta-lactamases: Implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control." J Infect **47**(4): 273-295.

Sykes, R. B. und Matthew, M. (1976). "The β -lactamases of gram-negative bacteria and their rôle in resistance to β -lactam antibiotics." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **2**(2): 115-157.

Szabo, D., Filetoth, Z., Szentandrassy, J., Nemedi, M., Toth, E., Jeney, C., Kispal, G., Rozgonyi, F. (1999). "Molecular epidemiology of a cluster of cases due to *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 extended-spectrum beta-lactamase in the premature intensive care unit of a Hungarian hospital." Journal of Clinical Microbiology **37**(12): 4167-4169.

Tabasi, M., Asadi Karam, M. R., Habibi, M., Yekaninejad, M. S., Bouzari, S. (2015). "Phenotypic assays to determine virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) isolates and their correlation with antibiotic resistance pattern." Osong Public Health Res Perspect **6**(4): 261-268.

Tacao, M., Correia, A., Henriques, I. (2012). "Resistance to broad-spectrum antibiotics in aquatic systems: anthropogenic activities modulate the dissemination of bla(CTX-M)-like genes." Appl Environ Microbiol **78**(12): 4134-4140.

Tamaki, M., Nukaga, M., Sawai, T. (1994). "Replacement of serine 237 in class A beta-lactamase of *Proteus vulgaris* modifies its unique substrate specificity." Biochemistry **33**(33): 10200-10206.

Tangden, T., Cars, O., Melhus, A., Lowdin, E. (2010). "Foreign travel is a major risk factor for colonization with *Escherichia coli* producing CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases: A prospective study with swedish volunteers." Antimicrob Agents Chemother **54**(9): 3564-3568.

Taormina, P. J., Beuchat, L. R., Slutsker, L. (1999). "Infections associated with eating seed sprouts: An international concern." Emerg Infect Dis **5**(5): 626-634.

Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., Denamur, E. (2010). "The population genetics of commensal *Escherichia coli*." Nat Rev Microbiol **8**(3): 207-217.

Tham, J., Walder, M., Melander, E., Odenholt, I. (2012). "Duration of colonization with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in patients with travellers' diarrhoea." Scand J Infect Dis **44**(8): 573-577.

Theuretzbacher, U. (1998). "Beta-Lactamasen und Beta-Lactamase-Inhibitoren." Chemotherapie Journal **7**(4).

Thomas, C. M. (1981). "Molecular genetics of broad host range plasmid RK2." Plasmid **5**(1): 10-19.

Titelman, E., Iversen, A., Kahlmeter, G., Giske, C. G. (2011). "Antimicrobial susceptibility to parenteral and oral agents in a largely polyclonal collection of CTX-M-14 and CTX-M-15-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*." APMIS **119**(12): 853-863.

Tschudin-Sutter, S., Frei, R., Dangel, M., Strandén, A., Widmer, A. F. (2012). "Rate of transmission of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* without contact isolation." Clin Infect Dis **55**(11): 1505-1511.

Tschudin-Sutter, S., Frei, R., Stephan, R., Hachler, H., Nogarth, D., Widmer, A. F. (2014). "Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae*: A threat from the kitchen." Infect Control Hosp Epidemiol **35**(5): 581-584.

Tuffs, A. (2011). "Poor hospital hygiene is blamed for deaths of three babies in Bremen." BMJ **343**(d7396).

Tzouveleki, L. S., Tzelepi, E., Tassios, P. T., Legakis, N. J. (2000). "CTX-M-type beta-lactamases: An emerging group of extended-spectrum enzymes." Int J Antimicrob Agents **14**(2): 137-142.

Valverde, A., Coque, T. M., Sanchez-Moreno, M. P., Rollan, A., Baquero, F., Canton, R. (2004). "Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* during nonoutbreak situations in Spain." J Clin Microbiol **42**(10): 4769-4775.

Vatopoulos, A. C., Philippon, A., Tzouveleki, L. S., Komninou, Z., Legakis, N. J. (1990). "Prevalence of a transferable SHV-5 type beta-lactamase in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Greece." J Antimicrob Chemother **26**(5): 635-648.

Veldman, K., Veldman, K., Kant, A., Dierikx, C., van Essen-Zandbergen, A., Wit, B., Mevius, D. (2014). "*Enterobacteriaceae* resistant to third-generation cephalosporins and quinolones in fresh culinary herbs imported from Southeast Asia." Int J Food Microbiol **177**: 72-77.

Verbraucherzentrale Niedersachsen (2013). "Antibiotika und antibiotikaresistente Keime (ESBL u. MRSA)." (<https://www.verbraucherzentrale-niedersachsen.de/themen/ernaehrung-lebensmittel/schadstoffe/antibiotika-antibiotikaresistente-keime-esbl-u-mrsa>).

Vincent, C., Boerlin, P., Daignault, D., Dozois, C. M., Dutil, L., Galanakis, C., Reid-Smith, R. J., Tellier, P. P., Tellis, P. A., Ziebell, K., Manges, A. R. (2010). "Food reservoir for *Escherichia coli* causing urinary tract infections." Emerg Infect Dis **16**(1): 88-95.

- Vinue, L., Saenz, Y., Martinez, S., Somalo, S., Moreno, M. A., Torres, C., Zarazaga, M. (2009). "Prevalence and diversity of extended-spectrum beta-lactamases in faecal *Escherichia coli* isolates from healthy humans in Spain." Clin Microbiol Infect **15**(10): 954-957.
- Viswanathan, P. und Kaur, R. (2001). "Prevalence and growth of pathogens on salad vegetables, fruits and sprouts." Int J Hyg Environ Health **203**(3): 205-213.
- Wallensten, A., Hernandez, J., Ardiles, K., Gonzalez-Acuna, D., Drobni, M., Olsen, B. (2011). "Extended spectrum beta-lactamases detected in *Escherichia coli* from gulls in Stockholm, Sweden." Infect Ecol Epidemiol **1**.
- Wallmann, J., Preuss, J., Bender, A. (2012). "Erfassung von Antibiotika-Abgabemengen gemäß DIMDI-AMV." (http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/07_Bundesamt/Veranstaltungen/Infotag_vortrag_wallmann.pdf?__blob=publicationFile&v=2.)
- Walsh, T. R. und Toleman M. A. (2011). "The new medical challenge: Why NDM-1? Why Indian?" Expert Rev Anti Infect Ther **9**(2): 137-141.
- Walsh, T. R., Weeks, J., Livermore, D. M., Toleman, M. A. (2011). "Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: An environmental point prevalence study." Lancet Infect Dis **11**(5): 355-362.
- Walther, B., Hermes, J., Cuny, C., Wieler, L. H., Vincze, S., Elnaga, Y., Stamm, I., Kopp, P. A., Kohn, B., Witte, W., Jansen, A., Conraths, F. J., Semmler, T., Eckmanns, T., Lubke-Becker, A. (2012). "Sharing more than friendship - nasal colonization with coagulase-positive staphylococci (CPS) and co-habitation aspects of dogs and their owners." PLoS One **7**(4).
- Witte, W. und Klare, I. (1999). "Antibiotikaresistenz bei bakteriellen Infektionserregern." Bundesgesundheitsbl - RKI **42**: 8-16.
- Witte, W. und Mielke, M. (2003). "Beta - Laktamasen mit breitem Wirkungsspektrum: Grundlagen, Epidemiologie, Schlussfolgerungen für die Prävention." Bundesgesundheitsbl - RKI **46**: 881-890.
- Witte, W., Strommenger, B., Klare, I., Werner, G. (2004). "Bakterielle Erreger von Krankenhausinfektionen mit besonderen Resistenzen und Multiresistenzen. Teil I: Diagnostik und Typisierung." Bundesgesundheitsbl - RKI **47**: 352-362.
- Wittum, T. E., Mollenkopf, D. F., Daniels, J. B., Parkinson, A. E., Mathews, J. L., Fry, P. R., Abley, M. J., Gebreyes, W. A. (2010). "CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases present in *Escherichia coli* from the feces of cattle in Ohio, United States." Foodborne Pathog Dis **7**(12): 1575-1579.
- Woerther, P. L., Angebault, C., Jacquier, H., Hugede, H. C., Janssens, A. C., Sayadi, S., El Mniai, A., Armand-Lefevre, L., Ruppe, E., Barbier, F., Raskine, L., Page, A. L., de Rekeneire, N., Andremont, A. (2011). "Massive increase, spread, and exchange of extended spectrum beta-lactamase-encoding genes among intestinal *Enterobacteriaceae* in hospitalized children with severe acute malnutrition in Niger." Clin Infect Dis **53**(7): 677-685.

Woerther, P. L., Burdet, C., Chachaty, E., Andremont, A. (2013). "Trends in human fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamases in the community: Toward the globalization of CTX-M." Clin Microbiol Rev **26**(4): 744-758.

Woodford, N. (2011). "Unwanted souvenirs: Travel and multi-resistant bacteria." J Travel Med **18**(5): 297-298.

World Health Organisation (WHO) (2012). "The evolving threat of antimicrobial resistance options for action." (http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44812/1/9789241503181_eng.pdf).

Wu, G., Day, M. J., Mafura, M. T., Nunez-Garcia, J., Fenner, J. J., Sharma, M., van Essen-Zandbergen, A., Rodriguez, I., Dierikx, C., Kadlec, K., Schink, A. K., Wain, J., Helmuth, R., Guerra, B., Schwarz, S., Threlfall, J., Woodward, M. J., Woodford, N., Coldham, N., Mevius, D. (2013). "Comparative analysis of ESBL-positive *Escherichia coli* isolates from animals and humans from the UK, The Netherlands and Germany." PLoS One **8**(9): e75392.

Xavier, B. B., Lammens, C., Ruhel, R., Kumar-Singh, S., Butaye, P., Goossens, H., Malhotra-Kumar, S. (2016). "Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, mcr-2, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016." Euro Surveill **21**(27).

Xia, X., Meng, J., Zhao, S., Bodeis-Jones, S., Gaines, S., Ayers, S., McDermott, P. (2011). "Identification and antimicrobial resistance of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from retail meats." J Food Prot. **74**(1): 38-44.

Zeba, B. (2005). "Overview of β -lactamase incidence on bacterial drug resistance." African Journal of Biotechnology **4** (13): 1559-1562.

Zurfluh, K., Hachler, H., Nuesch-Inderbinen, M., Stephan, R. (2013). "Characteristics of extended-spectrum beta-lactamase- and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* isolates from rivers and lakes in Switzerland." Appl Environ Microbiol **79**(9): 3021-3026.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Amelie Eisele, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Lebensmittel als Reservoir ESBL – produzierender Enterobakterien“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet. Es sind keine Publikationen aus dieser Dissertation hervorgegangen.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Entfällt

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

Ganz besonders gilt mein Dank Herrn PD Dr. med Kola für die professionelle wissenschaftliche und stets zuverlässige Betreuung, sowie für die Geduld, Motivation und hilfreichen Anregungen besonders bei der Korrektur dieser Arbeit.

Eine sehr große Unterstützung bei der Einarbeitung, Durchführung der Versuche, einem immer offenen Ohr für Fragen, sowie eine wertvolle Hilfestellung in allen Bereichen war mir insbesondere Frau Rose, der ich herzlich danken möchte. Die engagierte Arbeitsweise wird mir in wertvoller Erinnerung bleiben.

Auch Frau Sedlmair danke ich für ihre Ratschläge und die nette Arbeitsatmosphäre, indem wir zwischenzeitlichen am selben Arbeitsplatz gearbeitet hatten.

Es soll betont werden, dass mir meine Zeit, die ich am Institut für Hygiene und Umweltmedizin verbracht habe insgesamt sehr viel Freude bereitet hat. Ich habe mich von den Mitarbeitern stets verstanden, gut betreut und im Team integriert gefühlt. Insbesondere allen medizinisch-technischen Assistenzen gilt ein großes Dankeschön hierfür.

Ein weiterer Dank geht an meine Studienfreunde aus München und Berlin, welche mir die Studienzeit, in welcher unter anderem diese Arbeit entstanden ist, versüßt haben.

Abschließend möchte ich mich ganz besonders bei meinen Familien bedanken, die mich in allen Lebenslagen unterstützen, bestärken und mir stets Liebe, Kraft und Energie mit auf den Weg geben.