

Aus dem  
Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

**Molekulare Charakterisierung von ESBL-bildenden  
*Escherichia coli*-Isolaten aus Milchproben  
und Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft**

**Inaugural-Dissertation**  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Christin Clivia Maria Freitag**  
Tierärztin  
aus Limburg an der Lahn

Berlin 2020  
Journal-Nr.: 4238







Aus dem  
**Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen**  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

**Molekulare Charakterisierung von ESBL-bildenden *Escherichia coli*-Isolaten  
aus Milchproben und Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Christin Clivia Maria Freitag  
Tierärztin  
aus Limburg an der Lahn

Berlin 2020

Journal-Nr.: 4238

Gedruckt mit Genehmigung  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

<b>Dekan:</b>	Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
<b>Erster Gutachter:</b>	Univ.-Prof. Dr. Stefan Schwarz
<b>Zweiter Gutachter:</b>	PD Dr. Kristina Kadlec
<b>Dritter Gutachter:</b>	Univ.-Prof. Dr. Diana Meemken

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus): cattle, mastitis, milk, vegetables, *escherichia coli*, extended spectrum beta-lactamases, plasmids, food microbiology, foods, food hygiene, drug resistance, antimicrobial properties

**Tag der Promotion:** 28.10.2020

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	- 1 -
1 Abkürzungsverzeichnis.....	- 3 -
2 Liste der Tabellen und Abbildungen .....	- 6 -
3 Einleitung .....	- 7 -
4 Literatur .....	- 9 -
4.1 <i>Escherichia coli</i> .....	- 9 -
4.2 Antibiotikaresistenzen.....	- 12 -
4.3 Ausbreitung von Resistenzen .....	- 14 -
4.3.1 Plasmide .....	- 16 -
4.3.2 Transposons und Insertionssequenzen.....	- 16 -
4.3.3 Integrons.....	- 17 -
4.4 Resistenz gegenüber $\beta$ -Laktam-Antibiotika.....	- 17 -
4.4.1 Einteilung der $\beta$ -Laktamasen.....	- 18 -
4.4.2 $\beta$ -Laktamasen mit erweitertem Substratspektrum.....	- 19 -
4.5 Plasmid-lokalisierte $\beta$ -Laktam-Resistenz bei <i>Escherichia coli</i> .....	- 20 -
4.5.1 Inkompatibilitätsgruppen der Plasmide.....	- 20 -
4.5.2 Genetisches Umfeld der <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> -Gene .....	- 21 -
4.6 Weitere Plasmid-lokalisierte Antibiotikaresistenzen bei <i>Escherichia coli</i> .....	- 22 -
4.6.1 Resistenz gegenüber Phenicolen .....	- 22 -
4.6.2 Plasmid-vermittelte Resistenz gegenüber Chinolonen und Fluorchinolonen- 23 -	
4.6.3 Resistenz gegenüber Sulfonamiden.....	- 23 -
4.6.4 Resistenz gegenüber Trimethoprim.....	- 24 -
4.6.5 Resistenz gegenüber Aminoglykosiden.....	- 24 -
4.6.5.1 Resistenz gegenüber Streptomycin.....	- 24 -
4.6.5.2 Resistenz gegenüber Kanamycin und Neomycin .....	- 25 -
4.6.5.3 Resistenz gegenüber Amikacin und Gentamicin .....	- 25 -
4.6.6 Resistenz gegenüber Tetracyclinen .....	- 25 -

4.6.7	Resistenz gegenüber Fosfomycin .....	- 26 -
4.7	Verbreitung von ESBL-Genen .....	- 27 -
4.7.1	ESBL-Reservoir, Kontaminations- und Übertragungsmöglichkeiten .....	- 27 -
5	Publikationen.....	- 32 -
5.1	Publikation 1 .....	- 32 -
5.2	Publikation 2.....	- 39 -
6	Diskussion.....	- 47 -
6.1	ESBL-Vorkommen bei <i>E. coli</i> -Isolaten von Mastitis-Milchproben in Deutschland und anderen Ländern .....	- 47 -
6.2	ESBL-Vorkommen bei <i>E. coli</i> -Isolaten aus Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft in Deutschland und anderen Ländern .....	- 50 -
6.3	Molekulare Charakterisierung ESBL-bildender <i>E. coli</i> -Isolate .....	- 58 -
6.4	Charakterisierung der ESBL-Gen-tragenden Plasmide .....	- 60 -
6.5	Co-lokalisierte Resistenzgene ESBL-Gen-tragender Plasmide .....	- 61 -
6.6	Genetisches Umfeld ausgewählter Plasmide .....	- 65 -
7	Zusammenfassung .....	- 67 -
8	Summary .....	- 69 -
9	Literaturverzeichnis .....	- 71 -
10	Publikationsverzeichnis .....	- 88 -
10.1	Publikationen .....	- 88 -
10.2	Poster .....	- 88 -
11	Danksagung .....	- 90 -
12	Selbstständigkeitserklärung.....	- 92 -



## 1 Abkürzungsverzeichnis

<i>aac</i>	Aminoglykosid-Acetyltransferase-Gen
<i>aadA</i>	Streptomycin 3"-Adenyltransferase-Gen
Abb.	Abbildung
<i>aph</i>	Aminoglykosid-Phosphotransferase-Gen
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
<i>bla</i>	β-Laktamase-Gen
bp	Basenpaar(e)
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
<i>cat</i>	Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen
CC	clonal complex (dt.: Klonaler Komplex)
CTX-M	Cefotaxim-München β-Laktamase
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
dt.	deutsch
<i>dfrA</i>	Dihydrofolat Reduktase-Gen der Gruppe A
DGHM	Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie
DNA	desoxyribonucleic acid (dt.: Desoxyribonukleinsäure)
EAEC	Enter aggregative <i>E. coli</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
e. g.	example given (dt.: zum Beispiel)
EFSA	European Food Safety Agency
EHEC	Enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
EU	Europäische Union
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
ESBL	extended-spectrum β-lactamase (dt.: β-Laktamase mit erweitertem Substratspektrum)
ExPEC	extraintestinal pathogene <i>E. coli</i>

<i>floR</i>	Chloramphenicol/Florfenicol-Resistenzgen <i>floR</i>
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
<i>fosA3</i>	Fosfomycin-Resistenzgen <i>fosA3</i>
GM	genetisch modifiziert
HUS	Hämolytisch-Urämisches Syndrom
ICE	integrative and conjugative element (dt.: integratives und konjugatives Element)
Inc group	incompatibility group (dt.: Inkompatibilitätsgruppe)
InPEC	intestinal pathogene <i>E. coli</i>
<i>intI</i>	Integrase-Gen von Klasse 1 Integrons
IS	Insertionssequenz
kb	Kilobasenpaar(e)
KbE	Koloniebildende Einheit
MGE	mobiles genetisches Element
mL	Milliliter
MLST	Multilocus Sequenztypisierung
NACMCF	National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods
NDM	New Delhi Metallo- $\beta$ -Laktamase
$n_t$	nicht-typisierbar
Omp	outer membrane proteins (dt.: Proteine in der äußeren Zellwand)
<i>orf</i>	open reading frame (dt.: offener Leserahmen)
PCR	polymerase chain reaction (dt.: Polymerase-Kettenreaktion)
PFGE	Pulsfeld-Gel-Elektrophorese
PMQR	plasmid-mediated quinolone resistance (dt.: Plasmid-vermittelte Chinolonresistenz)
<i>qnr</i>	Chinolon-Resistenzgen <i>qnr</i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

s.	siehe
SHV	Sulfhydryl-variable $\beta$ -Laktamase
spp.	Spezies
ST	Sequenztyp
STEC	Shiga-Toxin-bildende <i>E. coli</i>
<i>str</i>	Streptomycin-Resistenzgen <i>str</i>
<i>stx</i>	Shiga-Toxin-Gen
<i>sul</i>	Sulfonamid-Resistenzgen <i>sul</i>
Tab.	Tabelle
TEM	Temoniera $\beta$ -Laktamase
<i>tet</i>	Tetracyclin-Resistenzgen <i>tet</i>
Tn	Transposon
WHO	World Health Organization
z. B.	zum Beispiel
°C	Grad Celsius
%	Prozent

## 2 Liste der Tabellen und Abbildungen

Tab. 1	Einteilung der CTX-M-Enzyme	- 20 -
Tab. 2	Übersicht über ESBL-bildende <i>E. coli</i> -Isolate und deren <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> -Gen-tragende Plasmide isoliert aus Mastitis-Milch des Rindes und aus Gemüse-Proben bzw. Gewürzen	- 54 -
Abb. 1	Schematische Darstellung der vertikalen a) und/oder horizontalen b) Verbreitung von antimikrobiellen Resistenzen	- 14 -
Abb. 2	Übertragungswege antibiotikaresistenter Bakterien	- 31 -

### 3 Einleitung

Das Vorkommen und auch die Verbreitung von antibiotikaresistenten Bakterien in verschiedenen Reservoirs stellt eine zunehmende Gefahr für die Gesundheit des Menschen dar (Ferri *et al.* 2017). Von immer größerer Bedeutung sind dabei *Enterobacteriaceae*, vor allem *Escherichia (E.) coli*, die  $\beta$ -Laktamasen mit erweitertem Substratspektrum, im angloamerikanischen Sprachgebrauch als extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) bezeichnet, bilden. Diese ESBL-bildenden *E. coli*-Isolate sind in verschiedenen Reservoirs weit verbreitet und stellen eine der häufigsten Ursachen von erworbenen humanen Infektionen innerhalb und außerhalb des Krankenhauses dar (Coque *et al.*, 2008). Die Übertragungswege innerhalb und zwischen den Reservoirs sind hier vielfältig, z. B. über direkten Kontakt, über Aerosole, über Kontakt mit erregerehaltigen Ausscheidungen, aber auch über die Lebensmittelkette (EFSA, 2011a). Hinzu kommt, dass sich ESBL-Gene häufig auf mobilen genetischen Elementen (MGEs) befinden und durch den Transfer von MGEs, wie z. B. Plasmiden, zwischen einzelnen Bakterienisolaten verbreitet werden können. Befinden sich weitere Antibiotika-Resistenzgene auf dem entsprechenden MGE, so werden diese in der Regel ebenfalls mit transferiert (Michael *et al.*, 2015).

In der Lebensmittelkette wurde das Vorkommen von ESBL-bildenden Bakterien bei Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft, wie zum Beispiel Salaten und Sprossen, bisher noch nicht sehr häufig untersucht (Zurfluh *et al.*, 2015; EFSA, 2011a; Kim *et al.*, 2015). Jedoch wird frisches Obst und Gemüse oft roh verzehrt und Waschen verringert lediglich die bakterielle Kontamination, beseitigt sie aber nicht vollständig (Hamilton-Miller und Shah, 2001). Daher scheint eine Gefahr der Übertragung auf den Menschen beim Verzehr gegeben. Eine Kontamination von angebauten pflanzlichen Lebensmitteln mit ESBL-bildenden Bakterien ist zum Beispiel bei der Düngung mit kontaminierter Gülle möglich (Heuer *et al.*, 2011). Die Kontamination der Gülle kann durch Faeces geschehen, aber auch durch Mastitis-Milch, da diese in der Regel in den Gülletank entsorgt und dann auf das Feld ausgetragen wird (Ibrahim *et al.*, 2016). Einer der häufigsten gramnegativen Erreger der Rindermastitis ist *E. coli* (Ombarak *et al.*, 2019). Zusätzlich besteht die Gefahr, dass Milch von an subklinischen Mastitiden erkrankten Kühen in die Lebensmittelkette gelangt. Da Rohmilch-Verzehr immer beliebter wird, besteht hier eine weitere Übertragungsmöglichkeit auf den Menschen. In Frankreich konnte gezeigt werden, dass *E. coli*-Isolate von Rindern und Menschen über weitgehend gleiche *bla*<sub>CTX-M-15</sub>-tragende Plasmide verfügen (Madec *et al.*, 2012).

Ziele dieses Projektes waren daher,

- (i) Informationen zum Vorkommen ESBL-bildender *E. coli* aus Milch- und Mastitis-Milchproben von Rindern, aber auch von Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft zu erarbeiten und eine vergleichende molekulare Charakterisierung der entsprechenden Isolate durchzuführen,
- (ii) Informationen zur phänotypischen und genotypischen antimikrobiellen Resistenz dieser *E. coli*-Isolate zu erarbeiten und
- (iii) molekulare Untersuchungen zum Vorkommen und zur Übertragbarkeit von ESBL-Genen durchzuführen und Informationen zu ESBL-tragenden Plasmiden inklusive anderer auf diesen Plasmiden co-lokalisierten Resistenzgenen zu gewinnen.

## 4 Literatur

### 4.1 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* ist ein Bakterium aus der Familie der darmbewohnenden *Enterobacteriaceae* benannt nach dem Kinderarzt Theodor Escherich (1857-1911), welcher dieses Bakterium aus dem Stuhl von Säuglingen isolierte. Zunächst von Escherich als „*bacterium coli commune*“ beschrieben, wurde es 1919 nach seinem Erstbeschreiber als *Escherichia coli* benannt. Es handelt sich um ein gramnegatives, peritrich begeißeltes Bakterium, welches als Kommensale den Darm von warmblütigen Tieren und Menschen besiedelt. Die meisten Angehörigen dieser Spezies sind apathogen, einige sind jedoch auch pathogen. Die intestinal pathogenen *E. coli* (InPEC) werden anhand des Vorhandenseins bestimmter Virulenzfaktoren eingeteilt in enterotoxische, enteropathogene, enteroinvasive, enterohämorrhagische und enteroaggregative *E. coli*. Andere pathogene *E. coli* sind unter anderem extraintestinal pathogene *E. coli* (ExPEC), welche bspw. Harnwegsinfektionen oder Meningitiden verursachen können. Pathogene *E. coli* gehören weltweit zu den wichtigsten Erregern ambulant erworbener und nosokomialer Infektionen, von denen insbesondere schwere extraintestinale Erkrankungen mit antimikrobiellen Wirkstoffen behandelt werden müssen. Die notwendigen Behandlungsoptionen können allerdings eingeschränkt sein, wenn das verursachende Bakterium resistent gegenüber den üblicherweise eingesetzten antimikrobiellen Wirkstoffen ist (Hammerum und Heuer, 2009).

*E. coli*-Isolate lassen sich anhand ihrer O-, K- und H-Antigene serotypisieren. Die O-Antigene werden auch als somatische Antigene bezeichnet, bestehen aus Polysacchariden und sind hitzestabil. Die K-Antigene stellen Kapselantigene dar, bestehen auch aus Polysacchariden, sind aber hitzeempfindlich. Die H-Antigene, auch als Geißelantigene bezeichnet, bestehen aus Proteinen und kommen nur bei begeißelten Isolaten vor. Für die Serotypisierung von *E. coli* werden in erster Linie O- und H-Antigene genutzt, die beide Polymorphismen zeigen (Wang *et al.*, 2003).

Eine Möglichkeit zur Differenzierung von *E. coli*-Isolaten in unterschiedliche Sequenztypen ist die Multilocus-Sequenztypisierung (MLST). Dabei werden verschiedene Abschnitte in definierten Haushaltsgenen (sogenannten „house-keeping genes“) mittels spezifischer PCR-Assays amplifiziert und anschließend sequenziert. Haushaltsgene sind weitgehend konserviert und an Stoffwechselfunktionen beteiligt, die für das Bakterium lebensnotwendig sind. Das meist verwendete System beruht auf den Arbeiten von Wirth *et al.* (2006) und basiert auf den sieben Haushaltsgenen *adk* (Adenylat-Kinase), *fumC* (Fumarat-Hydratase), *gyrB* (B-Untereinheit der DNA Gyrase), *icd* (Isocitrat/Isopropylmalat Dehydrogenase), *mdh* (Malatedehydrogenase), *recA* (Rekombinase A) und *purA* (Adenylosuccinat-Synthetase) (Wirth *et al.*, 2006; Rogers *et al.*, 2011). Die erhaltenen

Sequenzen werden mit einer online verfügbaren und frei zugänglichen Datenbank abgeglichen (<http://enterobase.warwick.ac.uk/species/index/ecoli>) und dem jeweiligen Sequenztyp (ST) zugeordnet. Die Bestimmung des Sequenztyps ist von langzeitepidemiologischer und phylogenetischer Bedeutung. Das Vorhandensein gleicher Allele der sieben Haushaltsgene ordnet die Isolate dem gleichen Sequenztyp zu. Isolate des gleichen Sequenztyps zeigen eine gewisse Ähnlichkeit und können, aber müssen nicht zwangsläufig gleich sein. Verwandte Sequenztypen, die mindestens fünf der sieben Allele gemeinsam haben, werden zu klonalen Komplexen (CC) nach dem eBurst Algorithmus zusammengefasst. Jeder klonale Komplex beherbergt mindestens drei Sequenztypen (Wirth *et al.*, 2006).

*E. coli*-Isolate werden gemäß Doumith *et al.* (2012) in vier phylogentische Hauptgruppen eingeteilt: A, B1, B2 und D. Zu den Gruppen B2 und D gehören viele virulente, extraintestinale *E. coli*, wohingegen kommensale *E. coli* vorwiegend zu den Gruppen A und B1 gehören (Naseer und Sundsfjord, 2011). Die phylogenetischen Gruppen A und D wurden bei erkrankten Nutztieren in Deutschland am häufigsten nachgewiesen (Michael *et al.* (2017), Schink *et al.*, 2013; Valat *et al.*, 2012). Zwischenzeitlich wurde dieses Phylotypisierungssystem um drei weitere Gruppen – C, E und F – erweitert (Clermont *et al.*, 2013). Allerdings zeigt die Zuordnung von *E. coli* zu bestimmten Phylogruppen basierend auf dem Protokoll von Doumith *et al.* (2012) eine bessere Korrelation zu den jeweiligen Multilocus-Sequenztypen, weshalb es als Protokoll der Wahl für die Phylotypisierung von *E. coli* empfohlen wurde (Turrientes *et al.*, 2014).

Eine weitere Methode zur Feintypisierung von *E. coli* über die Sequenztypen und Phylogruppen hinaus stellt die Makrorestriktionsanalyse mittels Pulsfeld-Gel-Elektrophorese (PFGE) dar (Rogers *et al.*, 2011). Die Makrorestriktionsanalyse basiert auf dem Verdau der genomischen DNA mittels eines selten schneidenden Restriktionsenzym und der anschließenden Auftrennung der großen Restriktionsfragmente mit Hilfe der PFGE. Hierbei entstehen isolatspezifische Fragmentmuster, anhand derer sich die Verwandtschaft von *E. coli*-Isolaten im Rahmen von kurzzeitepidemiologischen Fragestellungen, wie bspw. bei Ausbruchsfällen, klären lässt. Die Makrorestriktionsanalyse kann somit Isolate des gleichen Sequenztyps oder der gleichen Phylogruppe weiter differenzieren.

Ein bestimmter Sequenztyp konnte bisher zwar nicht einem bestimmten *bla*-Gen oder Reservoir zugeordnet werden, allerdings werden z. B. ST10, ST23, ST38, ST88, ST131, ST167, ST410 und ST648 häufiger bei ESBL-bildenden *E. coli* von Menschen und Tieren nachgewiesen (Poirel *et al.*, 2018). Als zurzeit am weitesten verbreiteter ST-Klon wird ST131 angesehen (O25:H4-B2-ST131), welcher weltweit vorkommt und mit vielen Infektionen des Menschen in Zusammenhang gebracht wird. Zudem tragen Vertreter dieses Klons oftmals ESBL-Gene vom Typ *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (Rogers *et al.*, 2011; Manges und Johnson, 2012; Zurfluh *et al.*, 2015), wodurch ST131 als für die weltweite Verbreitung dieses ESBL-Gens verantwortlich



angesehen wird (Carattoli, 2009; Coque *et al.*, 2008). ST131 wurde bereits bei Heimtieren, Nutztieren und in Lebensmitteln nachgewiesen (Rogers *et al.*, 2011). Der Sequenztyp ST10 in Verbindung mit dem ESBL-Gen *bla*<sub>CTX-M-1</sub> wurde in verschiedensten Wirten nachgewiesen, unter anderem bei Nutztieren, in Geflügelfleisch und bei gesunden Menschen (Müller *et al.*, 2016; Manges und Johnson, 2012). Diese Kombination ist der häufigste ESBL-bildende Klon bei *E. coli* von Nutztieren (Fischer *et al.*, 2014). Ein weiterer häufig beschriebener ST von *E. coli* ist ST117. Er wird als vogelpathogen angesehen (Mora *et al.*, 2012), wurde aber auch aus Blutproben bei humaner Sepsis, Urin bei humaner unterer Harnwegsinfektion und von Hähnchenfleisch aus dem Einzelhandel in Kanada isoliert (Manges und Johnson, 2012). Auch wurde er in den Niederlanden aus Isolaten von Puten- und Hähnchenfleisch aus dem Einzelhandel sowie klinischen Proben von Menschen nachgewiesen. Dies lässt eine Übertragung über die Lebensmittelkette vermuten (Leverstein-van Hall *et al.*, 2011).

Eine weitere Kombination von ST und ESBL-Gen ist *E. coli* ST410 mit *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. Er wurde häufig in China nachgewiesen (Falgenhauer *et al.*, 2016), z. B. in Mastitis-Milchproben (Ali *et al.*, 2017), ebenso in Deutschland bei Menschen und Tieren (Falgenhauer *et al.*, 2016; Fischer *et al.*, 2014) und in Curryblättern aus Indien (Zurfluh *et al.*, 2015). Auch ST38, ST393 und ST405 haben zur Verbreitung von Genen, die für CTX-M Enzyme kodieren, beigetragen (Cantón *et al.*, 2012).

*E. coli* dient bei Lebensmitteln als Hygieneindikator, also als ein Maß für die Verunreinigung in einem Lebensmittel durch darmbesiedelnde Bakterien. Wird ein Toleranzwert (z. B. Richtwert nach Deutscher Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM)) für das entsprechende Lebensmittel überschritten (z. B.  $10^2$  KbE/mL für Sprossen (DGHM, 2019)), ist die Ware als verunreinigt/kontaminiert anzusehen. Bei sehr hohen Keimzahlen bzw. Überschreitungen eines Warnwertes (z. B.  $10^3$  KbE/mL für Sprossen (DGHM, 2019)) ist das entsprechende Lebensmittel mit Hygienemangel zu beurteilen.

Bei einem Nachweis von pathogenen *E. coli* ist das Lebensmittel als inakzeptabel kontaminiert zu beurteilen, auch wenn eine spätere Erhitzung vorgesehen ist (bspw. Shiga-Toxin-bildende *E. coli* (STEC) in Lammfleisch) oder als gesundheitsschädlich zu beurteilen, wenn das Lebensmittel zum Rohverzehr gedacht ist (bspw. STEC in Sprossen (nach Artikel 14 Absatz 2 Buchstabe a) der Verordnung (EG) 178/2002 des europäischen Parlaments und des Rates). Als Ursache für die Kontamination eines Lebensmittels kommen bereits kontaminiertes Ausgangsmaterial (z. B. Kontamination während der Schlachtung (Hammerum und Heuer, 2009)), bei erhitzten Lebensmitteln eine Rekontamination (z. B. mangelnde Personalhygiene oder eine Unterbrechung der Kühlkette (sofern nicht nur kurzfristig zur weiteren Bearbeitung)) in Betracht.

Des Weiteren dient *E. coli* auch als Indikator für die Entwicklung von Antibiotikaresistenzen, da es ein weitverbreitetes Bakterium ist (Dai *et al.*, 2008; Ibrahim *et al.*, 2016), welches leicht Antibiotika-Resistenzgene aufnimmt und weitergibt (Ibrahim *et al.*, 2016).

## 4.2 Antibiotikaresistenzen

Eine Antibiotikaresistenz ist dann vorhanden, wenn die Konzentration eines antibakteriellen Chemotherapeutikums (Antibiotikum) am Infektionsort nicht ausreicht, um ein Bakterium abzutöten oder seine Vermehrung zu hemmen (Schwarz *et al.*, 2017).

Man unterscheidet zwischen natürlichen Resistenzen und erworbenen Resistenzen. Natürliche Resistenz (auch als intrinsische Resistenz bezeichnet) ist eine Eigenschaft, die stets bei allen Stämmen einer Bakterienart oder -gattung vorkommt. Sie beruht häufig auf dem Fehlen oder der Unzugänglichkeit der Zielstrukturen für die Antibiotika bei den jeweiligen Bakterien (Schwarz *et al.*, 2017). So haben z. B.  $\beta$ -Laktam-Antibiotika und Glykopeptide ihre Zielstruktur in der Zellwand – bei Bakterien ohne Zellwand wie *Mycoplasma* spp. fehlen diese Zielstrukturen und das Antibiotikum ist wirkungslos. Die Vancomycin-Resistenz bei gramnegativen Bakterien hingegen ist durch die dickere Zellwand der gramnegativen Bakterien gegeben, welche die Zugänglichkeit des Antibiotikums durch die äußere Zellmembran verhindert. Ein weiteres Beispiel ist die Fähigkeit von einigen Bakterien, wie z. B. Enterokokken, exogene Folsäure zu nutzen, statt auf die eigene Synthese von Folsäure angewiesen zu sein. Antibiotika die als Zielstruktur die Folsäuresynthese haben (z. B. Sulfonamide), sind somit wirkungslos (van Duijkeren *et al.*, 2018). Bei erworbenen Resistenzen hingegen handelt es sich um eine stammspezifische Eigenschaft, die nicht bei allen Stämmen einer Bakterienart oder -gattung vorkommt. Diese Form der Resistenz kann durch Mutationen oder durch die Aufnahme von mobilen Resistenzgenen erworben werden (Schwarz und Chaslus-Dancla, 2001). Es werden dabei generell drei Mechanismen unterschieden. Ein Mechanismus bei grampositiven und gramnegativen Bakterien ist die **Inaktivierung oder Modifizierung des Antibiotikums durch Enzyme**. Dazu bilden die Bakterien Enzyme, welche bestimmte Positionen des Antibiotikums chemisch modifizieren, indem sie Acetyl-, Adenyl- oder Phosphatgruppen daran anheften, wie z. B. bei Aminoglykosiden oder die Acetylierung von Chloramphenicol. Es können auch Enzyme gebildet werden, die das Antibiotikum inaktivieren indem sie direkt an das Antibiotikum binden, spezifische Bindungen hydrolytisch spalten und es dadurch zerstören (Schwarz *et al.*, 2017). Als Beispiel sind hier die  $\beta$ -Laktamasen zu nennen, die den  $\beta$ -Laktam-Ring der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika zerstören, indem sie die Amidbindung im Ring hydrolysieren (van Duijkeren *et al.*, 2018).

Ein weiterer Mechanismus ist die **reduzierte intrazelluläre Akkumulation des Antibiotikums**. Diese kann über zwei Wege erreicht werden: zum einen über eine reduzierte Aufnahme und zum anderen durch einen erhöhten Efflux des Antibiotikums. Die Aufnahme von Antibiotika in die Bakterienzelle erfolgt häufig über Porine (outer membrane proteins, Omp) in der äußeren Zellwand. Werden diese vermindert exprimiert, strukturell modifiziert oder durch Inaktivierung der für sie kodierenden Gene gar nicht mehr gebildet, so wird das Antibiotikum weniger bis gar nicht mehr aufgenommen (Schwarz *et al.*, 2017). Durch eine Strukturänderung des Porins OmpF ist es möglich, dass  $\beta$ -Laktam-Antibiotika die Zellwand von *E. coli* nicht mehr durchdringen können und dadurch eine Resistenz vorliegt (van Duijkeren *et al.*, 2018). Der Efflux des Antibiotikums wird durch unspezifische (für mehrere Antibiotika/Substanzen, „multidrug“) oder spezifische (ein bestimmtes Antibiotikum) Transporter als aktive Ausschleusung erreicht. „Multidrug“ Transporter haben den Zweck schädliche Abfallprodukte aus dem Zellstoffwechsel auszuschleusen und kommen daher nahezu bei allen Bakterien vor. Einige dieser Transporter können aber auch bestimmte Antibiotika ausschleusen und so zu einer erhöhten minimalen Hemmkonzentration führen. So kann z. B. der AcrAB/TolC „multidrug“ Transporter bei *E. coli* unter anderem  $\beta$ -Laktam-Antibiotika, Chloramphenicol, Tetracycline und Fluorchinolone ausschleusen. Spezifische Transporter, welche zu Resistenzen gegenüber Phenicolen führen, sind z. B. durch *floR* und *cmlA/B* kodiert (Schwarz *et al.*, 2017).

Der dritte Mechanismus der erworbenen Resistenz ist die **Veränderung von Zielstrukturen der Antibiotika**. Dieser Mechanismus ist am breitesten gefächert. Dazu gehören mutagene und chemische Modifikationen, Schutz der Zielstrukturen, Austausch der Zielstrukturen und Überproduktion der sensiblen Zielstrukturen. Mutagene Veränderungen beispielsweise in einer bestimmten Region des Gens *gyrA* können zu Aminosäureaustauschen führen, die letztendlich bewirken, dass Fluorchinolone nicht mehr die entsprechende Gyrase funktionell inhibieren können. Bei chemischen Modifikationen, z. B. einer Methylierung der Zielstruktur, kann das Antibiotikum nicht mehr an seine Zielstruktur binden. Eine Methylierung der Adeninreste an den Positionen 2058 und 2059 in der 23S DNA durch die Methylase Erm(C), resultiert in einer kombinierten Resistenz gegenüber Makroliden, Lincosamiden und Streptogramin B-Antibiotika. Ein Schutz der Zielstruktur durch ribosomale Schutzproteine ist bei Tetracyclinen bekannt. Dabei binden diese Proteine an das Ribosom, beeinflussen aber nicht dessen Funktionalität, sondern schützen es dadurch vor der Inhibition durch Tetracycline. Für den Austausch von sensiblen Zielstrukturen durch resistente Strukturen seien hier als Beispiel die Gene *sul1*, *sul2* und *sul3* genannt, die für Sulfonamid-unempfindliche Dihydropteroat-Synthasen kodieren und somit eine Resistenz gegenüber Sulfonamiden vermitteln. Eine Sulfonamid-Resistenz kann auch durch eine Überproduktion von *p*-Aminobenzoessäure erreicht werden, z. B. bei *Staphylococcus* spp. und *Neisseria* spp.



Die **Transformation** beschreibt die Aufnahme von freier DNA durch ein Bakterium. Da DNA außerhalb von Bakterienzellen nicht sehr stabil ist und Bakterien meist nur während bestimmter Phasen ihres Lebenszyklus in der Lage sind, diese aufzunehmen, ist dieser Übertragungsweg in der Natur nicht von hoher Relevanz, stellt aber einen wichtigen Transferweg unter Laborbedingungen dar (Schwarz und Chaslus-Dancla, 2001).

Die **Transduktion** erfolgt unter Beteiligung von Bakteriophagen. Wenn Bakteriophagen ein Bakterium befallen, injizieren sie ihre DNA in das Bakterium. Die Bakteriophagen-DNA wird dann in die chromosomale DNA des Bakteriums integriert. Dort kann sie über längere Zeit verweilen, ohne dass sie aktiv wird (lysogener Zyklus). Wird die Bakteriophagen-DNA aber aktiviert (lytischer Zyklus), werden die diversen Bestandteile des Bakteriophagen in großer Menge produziert. Diese Bestandteile werden im Zytoplasma der Bakterienzelle zu kompletten Bakteriophagen zusammengesetzt. Dabei können anstatt der Bakteriophagen-DNA fälschlicherweise Plasmide, die ebenfalls im Zytoplasma vorliegen, in die Bakteriophagenköpfe verpackt werden. Die so entstandenen „Pseudophagen“ werden genau wie die regulären Bakteriophagen beim Platzen der Bakterienzelle freigesetzt und können dann wiederum andere Bakterienzellen infizieren. Wenn sie dies tun, injizieren sie die fehlverpackten Plasmide in die neue bakterielle Wirtszelle. In seltenen Fällen besteht auch die Möglichkeit, dass die Bakteriophagen-DNA in der unmittelbaren Nähe eines Resistenzgens in die chromosomale DNA des Bakteriums integriert. Bei ungenauer Exzision aus der chromosomalen DNA im Rahmen des lytischen Zyklus kann sie das betreffende Resistenzgen „mitnehmen“. Das betreffende Resistenzgen wird dann Bestandteil der Bakteriophagen-DNA und mit dieser verbreitet (Schwarz und Chaslus-Dancla, 2001; Schwarz *et al.*, 2017).

Unter **Konjugation** versteht man die Weitergabe von selbstübertragbaren (= konjugativen) MGEs (z. B. Plasmide, Transposons und integrative und konjugative Elemente (= ICEs)) von einem Bakterium (Spender) zu einem anderen (Empfänger). Das konjugative MGE verfügt dabei über alle Gene, die für diesen Transferweg notwendig sind und für den Transferapparat kodieren. Kleine nicht konjugative Plasmide oder auch Transposons können im Zuge der Konjugation ebenfalls mitübertragen werden. Diesen Vorgang bezeichnet man dann als **Mobilisierung**. Konjugation und Mobilisierung können auch über Art- und Gattungsgrenzen hinweg erfolgen. Ein enger Kontakt der beiden Partner-Bakterien ist dafür notwendig. Diese Art der Resistenzübertragung zwischen Bakterien spielt unter natürlichen Bedingungen eine wesentliche Rolle (Schwarz und Chaslus-Dancla, 2001; Schwarz *et al.*, 2017). Viele Plasmide, die über Antibiotika-Resistenzgene verfügen, sind konjugativ (Bennett, 2008). Die Konjugationseffizienzen bei diesen Plasmiden variieren, z. B. bei *bla*<sub>CTX-M</sub>-tragenden Plasmiden zwischen  $10^{-7}$  und  $10^{-2}$  pro Spender, was die effiziente Verbreitung der entsprechenden Plasmide erklärt (Bonnet, 2004).

#### 4.3.1 Plasmide

Plasmide gehören zu den MGEs (Michael *et al.*, 2015) und sind ringförmige, extrachromosomal gelegene, doppelsträngige DNA-Moleküle unterschiedlicher Größe, die sich eigenständig in einer Bakterienzelle replizieren und die bei entsprechender genetischer Ausstattung konjugativ sein können (Carattoli, 2009). Plasmide werden auf Grundlage ihrer Replikationskontrollsysteme in Inkompatibilitätsgruppen (Inc group) eingeteilt (Carattoli, 2013). Unterschiedliche Plasmide der gleichen Inkompatibilitätsgruppe können nicht stabil im gleichen Wirtsbakterium nebeneinander existieren. Bei *Enterobacteriaceae* sind IncI1, IncF, IncHI1, IncHI2 und IncN die häufigsten beschriebenen Inkompatibilitätsgruppen von Plasmiden (Carattoli, 2013).

#### 4.3.2 Transposons und Insertionssequenzen

Transposons stellen MGEs dar, die aus doppelsträngiger DNA bestehen und prinzipiell zum Ortswechsel (Transposition) befähigt sind. Im Gegensatz zu Plasmiden verfügen Transposons nicht über die Fähigkeit zur eigenständigen Vermehrung; sie sind daher immer auf ein vermehrungsfähiges Vektormolekül (chromosomale DNA oder Plasmide), in das sie integrieren, angewiesen. Transposons variieren in ihren Größen und in ihrem Aufbau und können ein oder mehrere Antibiotika-Resistenzgene tragen. Größere Transposons können ebenfalls Gene besitzen, deren Genprodukte einen eigenständigen Transfer via Konjugation in andere Bakterienzellen ermöglichen.

Insertionssequenzen – auch als IS-Elemente bezeichnet – stellen gewissermaßen die kleinsten Transposons dar. Sie variieren in einem Größenbereich von ungefähr 700 – 2500 bp und besitzen in der Regel ein Gen (gelegentlich auch zwei Gene), das/die für die Enzyme, sogenannte Transposasen, kodieren, welche für ihre Transposition (= Exzision aus einer genomischen Position und Integration in eine andere) notwendig sind. Insertionselemente tragen häufig perfekte oder imperfekte umgekehrte Sequenzwiederholungen an ihren Enden. Viele Insertionssequenzen generieren an ihrer Integrationsstelle charakteristische kurze direkte Sequenzwiederholungen. Dies basiert darauf, dass der DNA-Doppelstrang bei der Integration versetzt aufgeschnitten wird und die Reparatursysteme der Bakterienzelle nach der Integration der Insertionssequenz die entsprechenden Basen auffüllen. Die derzeit bekannten Insertionssequenzen finden sich in der Datenbank ISFinder (<https://isfinder.biotoul.fr>). Einige Insertionssequenzen, wie IS26 (Harmer und Hall, 2016) oder IS1216 (Yan *et al.*, 2020), können zusammengesetzte Transposons bilden, die an der Verbreitung von Antibiotika-Resistenzgenen beteiligt sind. Andere Insertionssequenzen, wie ISEcp1, sind in der Lage nachgeschaltete Resistenzgene, insbesondere *bla*<sub>CTX-M</sub>-Gene, zu mobilisieren und zu transponieren (Poirel *et al.*, 2003; Dhanji *et al.*, 2011). Insertionselemente

sind zudem mitunter an der Expression nachgeschalteter Resistenzgene beteiligt (Poirel *et al.*, 2003).

### 4.3.3 Integrons

Integrons enthalten typischerweise einen 5'-konservierten Bereich, eine variable Region sowie einen 3'-konservierten Bereich. Der 5'-konservierte Bereich umfasst das Integrase-Gen (*intI*), einen Rekombinationsbereich (*attI*) und Promotoren zur Transkription der Gene im variablen Bereich. Die Integrasegene variieren in Abhängigkeit vom vorhandenen Integron, z. B. *intI1* bei Klasse 1 Integrons oder *intI2* bei Klasse 2 Integrons. Der variable Bereich von Integrons enthält Genkassetten. Genkassetten sind kleine MGEs, die meist nur ein Gen – sehr häufig ein Resistenzgen – und eine Rekombinationsstelle, das sogenannte 59-Basen-Element, besitzen. Letzteres interagiert mit dem *attI*-Bereich im Rahmen der Integration von Genkassetten in ein Integron. Die Gene der Genkassetten besitzen in der Regel keine eigenen Promotoren. Für ihre Transkription sind Promotoren notwendig, die im 3'-terminalen Bereich der Integrasegene lokalisiert sind. Genkassetten können sich nicht eigenständig in andere Bakterien übertragen. Ein Transfer in andere Bakterienzellen erfolgt nur, wenn die Genkassette in einem Plasmid-lokalisiernten Integron vorliegt und das entsprechende Plasmid konjugativ oder zumindest mobilisierbar ist. Genkassetten tragen häufig *aadA*- und *dfrA*-Gene (Deng *et al.*, 2015). Am häufigsten findet man bei den Genkassetten von *E. coli*-Isolaten in Europa *dfrA1-aadA1* und *dfrA12-orfF-aadA2*, in Korea aber *dfrA17-aadA5* (Kadlec und Schwarz, 2008). Klasse 1 Integrons werden mit verschiedenen Insertionssequenzen in Verbindung gebracht, unter anderem IS26 (Fluit und Schmitz, 2004).

## 4.4 Resistenz gegenüber $\beta$ -Laktam-Antibiotika

Die  $\beta$ -Laktam-Antibiotika werden in vier große Gruppen unterteilt: Penicilline, Cephalosporine, Carbapeneme und Monobaktame, von denen die beiden letztgenannten Gruppen nicht für den Einsatz in der Veterinärmedizin zugelassen sind. Die  $\beta$ -Laktam-Antibiotika sind nach dem ihnen eigenen  $\beta$ -Laktam-Ring benannt. Die Resistenz gegenüber  $\beta$ -Laktam-Antibiotika kann auf verschiedenen Mechanismen beruhen. Am häufigsten erfolgt bei gramnegativen Bakterien eine enzymatische Spaltung des  $\beta$ -Laktam-Rings durch strukturell und funktionell unterschiedliche  $\beta$ -Laktamasen, wodurch die  $\beta$ -Laktam-Antibiotika ihre Wirksamkeit verlieren. Änderungen in oder der Verlust von spezifischen äußeren Membranproteinen, wie OmpF, OmpC oder OmpK36, die als Eintrittspforten für  $\beta$ -Laktam-Antibiotika in die Bakterienzelle dienen, können auch für Resistenz gegenüber  $\beta$ -Laktam-Antibiotika eine Rolle spielen. Zudem sind bei diversen gramnegativen Bakterien Multidrug-

Transporter bekannt, die  $\beta$ -Laktam-Antibiotika aus der Bakterienzelle ausschleusen können (van Duijkeren *et al.*, 2018).

#### 4.4.1 Einteilung der $\beta$ -Laktamasen

Die strukturellen und funktionellen Unterschiede der  $\beta$ -Laktamasen machte man sich bei ihrer Einteilung zunutze. Ambler (1980) erkannte bei den vorliegenden strukturellen Informationen zwei Gruppen, bemerkte aber schon, dass es Hinweise auf weitere Klassen gibt. So teilte er sie zunächst in zwei Klassen A und B ein und später kamen noch die Klassen C und D hinzu. Die Klassen A, C und D sind Serin- $\beta$ -Laktamasen, die untereinander Sequenzunterschiede aufzeigen. Die Klasse C ist auch bekannt unter AmpC- $\beta$ -Laktamasen und die Klasse D unter OXA- $\beta$ -Laktamasen. Bei Klasse B handelt es sich um Metallo- $\beta$ -Laktamasen, da sie ein divalentes (zweiwertiges) Metallion, meist zweiwertiges Zink ( $Zn^{2+}$ ) für ihre Aktivität benötigen. Die Klasse B wurde noch in drei Subgruppen eingeteilt: Subgruppe B1 und B2 mit Sequenzhomologien und Subgruppe B3, welche strukturelle, aber keine sequenzbasierten Ähnlichkeiten zu den anderen Subgruppen aufweist (Ambler, 1980; Hall und Barlow, 2005).

Ein zweites Einteilungsschema nach Bush und Jacoby (2010) beruht auf einer funktionellen Einteilung. Die  $\beta$ -Laktamasen werden über ihre Fähigkeit der Hydrolyse von  $\beta$ -Laktam-Antibiotika-Klassen und der Inaktivierbarkeit durch  $\beta$ -Laktamase-Inhibitoren, wie Clavulansäure, Sulbactam und Tazobactam, eingeteilt. Auf diese Weise sind drei Hauptgruppen mit diversen Untergruppen definiert worden. Die Hauptgruppe 1 beinhaltet die Cephalosporinasen, welche nicht durch  $\beta$ -Laktamase-Inhibitoren gehemmt werden. Die Hauptgruppe 2 beherbergt viele Untergruppen. Die Untergruppe 2a beinhaltet Penicillinasen, welche durch  $\beta$ -Laktamase-Inhibitoren gehemmt werden. Untergruppe 2b beinhaltet noch weitere Untergruppen. Zu 2b werden Breitspektrum  $\beta$ -Laktamasen, welche Penicilline und die Cephalosporine der ersten Generation hydrolysieren (z. B. TEM-1, TEM-2, SHV-1), zugeordnet und zu 2be gehören Cephalosporinasen mit erweitertem Substratspektrum, welche eine erhöhte Hydrolyse von Oxyimino- $\beta$ -Laktamen (z. B. Cefotaxim, Ceftazidim) vermitteln (z. B. TEM-3, SHV-2, CTX-M-15). Beide sind durch  $\beta$ -Laktam-Inhibitoren hemmbar. In diese Gruppe gehören auch  $\beta$ -Laktamasen, welche nicht durch  $\beta$ -Laktamase-Inhibitoren gehemmt werden (2ber, 2br). Auch existieren  $\beta$ -Laktamasen in dieser Gruppe, welche eine variable Hemmung durch  $\beta$ -Laktamase-Inhibitoren zeigen, z. B. Carbapenemasen (2df). Die Hauptgruppe 3 enthält die Metallo- $\beta$ -Laktamasen, welche die Fähigkeit haben, Carbapeneme zu hydrolysieren, aber im Unterschied zu Serin- $\beta$ -Laktamasen nicht durch  $\beta$ -Laktamase-Inhibitoren gehemmt werden. Sie zeigen aber eine Hemmung durch metallbindende Chelate wie Ethylendiamintetraacetat, EDTA (Bush und Jacoby, 2010).



#### 4.4.2 $\beta$ -Laktamasen mit erweitertem Substratspektrum

Neben  $\beta$ -Laktamasen mit einem engen Substratspektrum, welches nur Penicilline und Aminopenicilline beinhaltet, kennt man auch  $\beta$ -Laktamasen mit einem erweitertem Substratspektrum, welches zusätzlich auch Cephalosporine (inklusive solche der 3. und 4. Generation) und Monobaktame umfasst (Liebana *et al.*, 2013). Diese  $\beta$ -Laktamasen werden im angloamerikanischen Sprachgebrauch als extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, abgekürzt ESBLs, bezeichnet (Michael *et al.*, 2014, van Duijkeren *et al.*, 2018). Diese ESBLs wurden 1983 erstmalig beschrieben (SHV-2, ein Derivat von SHV-1) und entwickelten sich zu einer der wichtigsten erworbenen Resistenzen bei *Enterobacteriaceae* (Cantón *et al.*, 2008).

Die meisten ESBLs gehören als Serin- $\beta$ -Laktamasen zur Ambler Klasse A und sind funktionell in die Untergruppe 2be nach Bush und Jacoby eingeteilt (Ambler, 1980; Bush und Jacoby, 2010; Bonnet, 2004). Diese ESBLs vermitteln Resistenz gegenüber Penicillinen, Aminopenicillinen, Cephalosporinen (auch der 3. und 4. Generation, wie Cefquinom, Ceftiofur, Cefovecin) und werden durch  $\beta$ -Laktamase-Inhibitoren, z. B. Clavulansäure, gehemmt (Poirel *et al.*, 2018; van Duijkeren *et al.*, 2018). Sie werden in verschiedene Genfamilien eingeteilt. Die ESBL-Gene der Familien *bla*<sub>TEM</sub> und *bla*<sub>SHV</sub> wurden Anfang der 80er Jahre beschrieben, wobei zu bemerken ist, dass nicht alle *bla*<sub>TEM</sub> und *bla*<sub>SHV</sub> Subtypen ESBLs darstellen, wie z. B. TEM-1 und SHV-1 (Bradford, 2001; Cantón *et al.*, 2012). In den folgenden Jahren wurden weitere ESBL-Gene beschrieben, von denen die aus der Familie *bla*<sub>CTX-M</sub> (Bauernfeind *et al.*, 1990) eine besondere Bedeutung besitzen, da diese Gene allesamt ESBLs kodieren (Bradford, 2001; Cantón *et al.*, 2012). Die ESBLs der TEM (Temoniera) und SHV (sulfhydryl-variable) Familien sind durch Punktmutationen aus entsprechenden  $\beta$ -Laktamasen mit engem Substratspektrum entstanden, während die Gene für CTX-M (Cefotaxim-München) Enzyme aber durch horizontalen Gentransfer aus dem Genom von *Kluyvera* spp. mobilisiert wurden (Bradford, 2001; Michael *et al.*, 2015).

Die CTX-M Enzyme sind die derzeit am häufigsten vorkommenden ESBLs (Cantón und Coque, 2006) und es werden ständig weitere Untergruppen beschrieben. Dadurch erfolgte eine Einteilung gemäß den Ähnlichkeiten in ihren Aminosäuresequenzen in fünf Hauptgruppen (1, 2, 8, 9, 25) und weiteren Enzymuntergruppen, s. hierzu auch Tabelle 1 unten (Cantón *et al.*, 2012; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/antimicrobial-resistance/> (ehemals G. Jacoby and K. Bush, [www.lahey.org/studies/webt.htm](http://www.lahey.org/studies/webt.htm) bzw. <https://externalwebapps.lahey.org/>)).

CTX-M-Enzyme zeigen eine effizientere Hydrolyse von Cefotaxim im Vergleich zu Ceftazidim (Eckert *et al.*, 2006). Beide Wirkstoffe werden (allein und in Kombination mit Clavulansäure) für die diagnostische Bestätigung ESBL-bildender *Enterobacteriaceae* genutzt (CLSI, 2015; EUCAST, 2019; Michael *et al.*, 2014). *E. coli* ist die Bakterienspezies, bei der ESBL-Gene am häufigsten identifiziert werden (EFSA, 2011a). CTX M-bildende *E. coli* sind

häufig mit den phylogenetischen Gruppen D und B assoziiert (Naseer und Sundsfjord, 2011) und ESBL-Gene liegen bei *E. coli* entweder chromosomal oder Plasmid-lokalisiert vor (Livermore und Woodford, 2006).

Wie anfangs erwähnt umfassen die oben genannten ESBLs der Ambler Klasse A und der Untergruppe 2be nach Bush und Jacoby die meisten ESBLs. Daneben treten noch weitere Typen auf. So sind der Ambler Klasse C die AmpC- $\beta$ -Laktamasen mit erweitertem Substratspektrum (ESAC) zugeordnet. Sie vermitteln eine höhere Hydrolyse von Cephalosporinen als von Benzylpenicillinen und hydrolysieren auch Cephamycine. Von  $\beta$ -Laktamase-Inhibitoren werden sie nicht gehemmt. Somit gehören diese in die Hauptgruppe 1 nach Bush und Jacoby. Wichtige Vertreter dieser Gruppe sind CMY- $\beta$ -Laktamasen (Poirel *et al.*, 2018; Bush und Jacoby, 2010). Weitere  $\beta$ -Laktamasen mit erweitertem Substratspektrum sind der Ambler Klasse D zugeteilt und heißen OXA- $\beta$ -Laktamasen, abgeleitet von der Fähigkeit Oxacillin bzw. Cloxacillin zu hydrolysieren. Sie können auch Oxyimino- $\beta$ -Laktame (z. B. Cefotaxim) hydrolysieren. Die Hemmung durch  $\beta$ -Laktamase-Inhibitoren ist variabel. Sie sind funktionell in die Untergruppe 2dc eingeteilt. Ein Beispiel für  $\beta$ -Laktamasen dieser Gruppe ist der Typ OXA-11 (Bush und Jacoby, 2010).

**Tabelle 1: Einteilung der CTX-M-Enzyme**

CTX-M-Gruppe	Ursprung	CTX-M-Enzym, Beispiele
CTX-M-1	<i>Kluyvera cryocrencens</i>	CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-15, CTX-M-32, CTX-M-55
CTX-M-2	<i>Kluyvera ascorbata</i>	CTX-M-2
CTX-M-8	<i>Kluyvera georgina</i>	CTX-M-8
CTX-M-9	<i>Kluyvera georgina</i>	CTX-M-9, CTX-M-14, CTX-M-27, CTX-M-65, CTX-M-125
CTX-M-25	<i>Kluyvera georgina</i>	CTX-M-25, CTX-M-26
CTX-M-1/-9 Rekombinante	wahrscheinlich <i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub> und <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	CTX-M-64

nach Cantón *et al.*, 2008, 2012

## 4.5 Plasmid-lokalisierte $\beta$ -Laktam-Resistenz bei *Escherichia coli*

### 4.5.1 Inkompatibilitätsgruppen der Plasmide

Bei der Verbreitung von Antibiotikaresistenzen bei *E. coli* spielt die IncF Plasmidfamilie eine große Rolle (Villa *et al.*, 2010). Bei dieser Plasmidfamilie sind bisher hauptsächlich ESBL-Gene vom Typ *bla*<sub>CTX-M-15</sub> beschrieben worden, welche aber auch bei anderen Plasmidfamilien

vorkommen (Fortini *et al.*, 2015; Rogers *et al.*, 2011; Naseer und Sundsfjord, 2011). Im Gegensatz dazu wurden ESBL-Gene vom Typ *bla*<sub>CTX-M-1</sub> hauptsächlich auf IncN-Plasmiden beschrieben (Carattoli, 2013).

Bei *E. coli* von Tieren werden meist Plasmide der IncI1 Familie nachgewiesen (Timofte *et al.*, 2014), weshalb hier ein Reservoir in der Lebensmittelkette vermutet wird (Carattoli, 2013). So wurden in einer in Frankreich durchgeführten Studie bei *E. coli* von Rindern neben IncFII Plasmiden auch IncI1 Plasmide am häufigsten nachgewiesen (Madec *et al.*, 2012). IncN Plasmide sind weitverbreitet und werden häufiger bei Tieren als bei Menschen beschrieben (Carattoli, 2009), so werden sie z. B. sehr häufig bei kommensalen *E. coli* von Tieren nachgewiesen (García-Fernández *et al.*, 2011). Der vermehrte Nachweis von IncI1 und IncN Plasmiden könnte mit ihrer oft beobachteten Fähigkeit zur Konjugation zusammenhängen (Carattoli, 2013) und ihre Beteiligung bei der Übertragung des *bla*<sub>CTX-M-1</sub>-Genes lässt auf ein Reservoir bei Tieren schließen (Carattoli, 2009). Plasmide der Familie IncHI2 sind in Bakterienisolaten von Menschen und Tieren nachgewiesen worden (Novais *et al.*, 2006; Carattoli, 2009; EFSA, 2011a). Die Familien IncB/O, IncK, IncX, IncL/M und IncT wurden im Zusammenhang mit ESBL-Genen bislang selten beschrieben, IncK beherbergen dabei meist *bla*<sub>CTX-M-14</sub>, IncL/M dagegen *bla*<sub>CTX-M-3</sub> (Carattoli, 2013; Poirel *et al.*, 2018). Plasmide der Inkompatibilitätsgruppen IncN, IncI1 und IncL/M sind in mehreren Bakterienarten nachgewiesen worden (Cantón *et al.*, 2012).

Die Bestimmung der Inkompatibilitätsgruppen der Plasmide dient zusammen mit Serotypisierung und MLST der *E. coli*-Isolate sowie der Identifizierung vorliegender Resistenzgene als ein wichtiger Baustein für die Typisierung von Bakterien hinsichtlich ihrer Differenzierung und Verbreitung (Carattoli, 2013), vor allem in Hinblick auf die Feststellung der Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb einer Bakterienart bei Bakterienisolaten verschiedener Herkunft wie Mensch und Tier (Liebana *et al.*, 2013). Seit wenigen Jahren spielt die Gesamtgenomsequenzierung entsprechender Isolate eine wesentliche Rolle bei der Typisierung von Bakterien und der Identifizierung von Infektionsketten.

#### 4.5.2 Genetisches Umfeld der *bla*<sub>CTX-M</sub>-Gene

Das genetische Umfeld der Plasmid-lokalisierten *bla*<sub>CTX-M</sub>-Gene ist mitunter sehr divers. Die *bla*<sub>CTX-M</sub>-Gene werden aber oft von der Insertionssequenz *ISEcp1* umgeben (Cantón *et al.*, 2012). Diese Insertionssequenz ist in der Lage, flankierende DNA-Fragmente zu mobilisieren (Poirel *et al.*, 2003; 2005). *ISEcp1B* kann dazu eine breite Auswahl an DNA-Sequenzen nutzen, die seine flankierenden DNA-Fragmente beinhalten, bspw. auch unvollkommene gegenläufige Sequenzwiederholungen (imperfect right inverted repeats, IRR) (Poirel *et al.*, 2005). Auch zusätzliche IS-Elemente werden in der Umgebung von *bla*<sub>CTX-M</sub> Genen beschrieben, z. B. IS26 und IS903 (Eckert *et al.*, 2006). IS26 wurde als ein wichtiges Element

für die Mobilisation und Verbreitung von ESBL-Genen und dem Fosfomycin-Resistenzgen *fosA3* identifiziert (Ho *et al.*, 2013). Auch *IS903* und *ISEcp1* spielen möglicherweise eine wichtige Rolle in der Verteilung von ESBL-Genen (Eckert *et al.*, 2006).

#### **4.6 Weitere Plasmid-lokalisierte Antibiotikaresistenzen bei *Escherichia coli***

Auf großen Plasmiden (>30 kb) können mehrere Antibiotika-Resistenzgene vorhanden sein, kleinere Plasmide (<10 kb) tragen oft nur ein oder zwei Resistenzgene (Kehrenberg, 2000). Plasmide und andere MGEs mit co-lokalisierten Resistenzgenen können Resistenzen gegenüber mehreren Antibiotika-Klassen vermitteln. Von Multiresistenz spricht man beim Vorliegen von Resistenz gegenüber mindestens drei Antibiotika-Klassen (Schwarz *et al.*, 2010; Sweeney *et al.*, 2018), was den Erfolg von Antibiotikatherapien drastisch einschränken kann (Michael *et al.*, 2015). In den nachfolgenden Unterkapiteln wird kurz auf solche Co-Resistenzen eingegangen, die auf ESBL-Gen-tragenden Plasmiden von *E. coli* von Mastitis-Milchproben (Freitag *et al.*, 2017) oder frischem Gemüse (Freitag *et al.*, 2018) gefunden wurden. Im Einzelnen handelt es sich dabei um Resistenzen gegenüber Phenicolen, Fluorchinolonen, Sulfonamiden, Streptomycin, Spectinomycin, Tetracyclinen, Trimethoprim, und seltener Fosfomycin und Kanamycin (EFSA, 2011a; Freitag *et al.*, 2017; Freitag *et al.*, 2018).

##### **4.6.1 Resistenz gegenüber Phenicolen**

Phenicol sind Breitspektrumantibiotika und werden in nicht-fluorierte und fluorierte Phenicol eingeteilt (Poirel *et al.*, 2018). Resistenz gegenüber nicht-fluorierten Phenicolen (z. B. Chloramphenicol) wird häufig von Chloramphenicol-Acetyltransferasen (kodiert durch *cat*-Gene) vermittelt, die eine enzymatische Inaktivierung der Wirkstoffe bewirken. Zusätzlich gibt es auch Exporter, wie CmlA, die ebenfalls bevorzugt nicht-fluorierte Phenicol aus der Bakterienzelle ausschleusen (Schwarz *et al.*, 2004). Florfenicol ist ein fluoriertes Thiamphenicol-Derivat, das nicht durch Chloramphenicol-Acetyltransferasen inaktiviert werden kann. Entsprechend ist es auch wirksam gegenüber *cat*-Gen-exprimierenden Bakterien. Das *floR*-Gen kodiert für einen spezifischen Transporter und vermittelt somit über eine Ausschleusung des Wirkstoffes Resistenz sowohl gegenüber Chloramphenicol als auch gegenüber Florfenicol (Keyes *et al.*, 2000; Schwarz *et al.*, 2017). Es kann sowohl auf Plasmiden als auch chromosomal lokalisiert sein und wurde zum Beispiel bei *E. coli* von Rindern, Geflügel und Schweinen nachgewiesen. Florfenicol ist ausschließlich für die Anwendung bei Tieren zugelassen (Schwarz *et al.*, 2004). Des Weiteren ist noch die Methylierung der Zielstruktur durch eine rRNA Methylase beschrieben, welche durch das Multiresistenzgen *cfm* kodiert wird. Diese Methylase vermittelt Resistenz gegenüber fünf

Klassen von Antibiotika, darunter nicht-fluorierte und fluorierte Phenicole (Poirel *et al.*, 2018). Von den genannten Genen werden *catA1*, *cmIA* und *floR* oft auf Plasmiden bei *E. coli* nachgewiesen (Poirel *et al.*, 2018), wobei *cfR* bislang vornehmlich bei *E. coli* aus China nachgewiesen wurde (Zhang *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2014).

#### 4.6.2 Plasmid-vermittelte Resistenz gegenüber Chinolonen und Fluorchinolonen

Chinolone und Fluorchinolone sind wichtige Breitspektrumantibiotika bei Tieren und Menschen (Poirel *et al.*, 2018). Die Plasmid-vermittelte Chinolonresistenz (plasmid-mediated quinolone resistance, PMQR) wird seit 1998 beschrieben und vermittelt verminderte Empfindlichkeit bzw. erhöhte minimale Hemmkonzentrationen gegenüber Fluorchinolonen, welche allerdings zu einer Selektion der co-lokalisierten Resistenzgene führen kann (Carattoli, 2013). PMQR wird auch in Verbindung mit ESBL-Bildnern beschrieben (Poirel *et al.*, 2012). Gene, die diese Resistenz vermitteln, fallen häufig in die Gruppen *qnr*, *qep* aber auch *aac(6′)-Ib-cr*, wobei letzteres Gen kombinierte Resistenz gegenüber ausgewählten Fluorchinolonen und Aminoglykosiden vermittelt (Carattoli, 2013). Das Gen *aac(6′)-Ib-cr* kodiert für ein Ciprofloxacin-modifizierendes Enzym (Koo und Woo, 2012) und ist mit *bla<sub>CTX-M</sub>*-tragenden Plasmiden assoziiert (Cantón und Coque, 2006), hier vor allem mit *bla<sub>CTX-M-15</sub>* und IncFII Plasmiden (Strahilevitz *et al.*, 2009). Die Gruppe der *qnr*-Gene kann in unterschiedliche Familien aufgeteilt werden, welche bei klinischen *Enterobacteriaceae*-Isolaten von Menschen keine große Rolle spielen. Sie werden aber häufig bei Isolaten aus Gewässerproben gefunden. Bei diesen Proben konnten z. B. *qnrS* und *aac(6′)-Ib-cr* auf ESBL-tragenden IncF Plasmiden von *Enterobacteriaceae*-Isolaten nachgewiesen werden (Zurfluh *et al.*, 2014), wobei *qnrS1* häufig auf Plasmiden der IncN Gruppe vorkommt (Carattoli, 2013). Da IncN Plasmide öfter bei Tieren auftreten als beim Menschen, könnte das *qnrS1* Gen in die entsprechenden Plasmide von tierischen Isolaten integriert worden sein (Carattoli, 2009).

Eine Resistenz gegenüber (Fluor-)Chinolonen ist auch über chromosomale Mutationen in den Genen für die Zielstrukturen Gyrase (besteht aus je zwei Untereinheiten GyrA und GyrB) und Topoisomerase IV (besteht aus je zwei Untereinheiten ParC und ParE) möglich. So sind einzelne Mutationen im *gyrA*-Gen für Resistenzen gegenüber Chinolonen ausreichend, für Resistenzen gegenüber Fluorchinolonen sind weitere Mutationen im *gyrA*-Gen und/oder *parC*-Gen notwendig (Poirel *et al.*, 2018).

#### 4.6.3 Resistenz gegenüber Sulfonamiden

Sulfonamide sind synthetische antimikrobielle Wirkstoffe, welche verschiedene Stufen der Folsäuresynthese hemmen. In Kombination mit Trimethoprim spricht man von „potenzierten“ Sulfonamiden (Poirel *et al.*, 2018). Resistenz gegenüber Sulfonamiden wird bei *E. coli* von den Genen *sul1*, *sul2* und *sul3* vermittelt, die für Sulfonamid-unempfindliche Dihydropteroat-Synthasen kodieren. Von diesen Genen wird *sul3* selten nachgewiesen. Beim

Menschen und bei Lebensmittel liefernden Tieren kommt das Gen *sul2* häufiger vor als das Gen *sul1*. Durch diese Häufung lässt sich eine Beteiligung der Lebensmittelkette an der Verbreitung dieser Resistenz nicht ausschließen (Machado *et al.*, 2013). Das Gen *sul2* ist oft in Verbindung mit den Streptomycin-Resistenzgenen *strA-strB* auf nicht-konjugativen und konjugativen Plasmiden beschrieben (van Duijkeren *et al.*, 2018). Das Gen *sul1* ist Bestandteil des 3'-konservierten Bereichs von Klasse 1 Integrons und wird somit häufig in Verbindung mit Co-Resistenzen beschrieben (Recchia und Hall, 1995; Poirel *et al.*, 2018).

#### **4.6.4 Resistenz gegenüber Trimethoprim**

Die Resistenz gegenüber Trimethoprim wird durch Trimethoprim-unempfindliche Dihydrofolatreduktasen (kodiert durch *dfr*-Gene) vermittelt. Die Gene für entsprechende Dihydrofolatreduktasen von gramnegativen Bakterien werden in die zwei Hauptgruppen *dfrA* und *dfrB* eingeteilt, abhängig von den chemischen Grundstrukturen ihrer Produkte (Michael *et al.*, 2006). Die *dfrA*- und *dfrB*-Gene gramnegativer Bakterien sind häufig Bestandteil von Genkassetten in Klasse 1 und Klasse 2 Integrons. Die Genkassetten-Kombination *dfrA1-aad1* wird regelmäßig bei Klasse 1 Integron-tragenden *E. coli*-Stämmen aus verschiedenen Herkunft (Tiere, Menschen, Lebensmittel) in Europa und Asien nachgewiesen (Kadlec und Schwarz, 2008; Koo und Woo, 2012; Poirel *et al.*, 2018). Im Gegensatz dazu wurden *dfrB*-Gene selten bei *E. coli*-Isolaten von Tieren nachgewiesen (Poirel *et al.*, 2018).

#### **4.6.5 Resistenz gegenüber Aminoglykosiden**

##### **4.6.5.1 Resistenz gegenüber Streptomycin**

Streptomycin ist ein Breitspektrumantibiotikum natürlichen Ursprungs und ist für die Anwendung bei Menschen und Tieren zugelassen (Poirel *et al.*, 2018). Eine Resistenz wird unter anderem über *aadA*-Gene vermittelt, die sich häufig in Genkassetten der Klasse 1- und Klasse 2- Integrons befinden. Die vermittelte Resistenz ist eine kombinierte Resistenz gegenüber Streptomycin und Spectinomycin. Die Gene *strA* und *strB* kodieren für die Aminoglykosid-Phosphotransferasen APH(6)-Ia und APH(6)-Id (Poirel *et al.*, 2018) und vermitteln nur Resistenz gegenüber Streptomycin (Michael *et al.*, 2006). Bei letzteren Genen ist *strA* das dominante Resistenzgen. Untersuchungen an Isolaten mit vollständigen *strA*-Genen aber funktionell inaktiven inkompletten *strB*-Genen haben gezeigt, dass diese Isolate trotzdem resistent gegenüber Streptomycin sind (Kehrenberg und Schwarz, 2001). Ist jedoch das *strA*-Gen funktionell inaktiv, beispielsweise durch die Insertion einer *dfrA14*-Genkassette, zeigen die entsprechenden Isolate Empfindlichkeit gegenüber Streptomycin (Ojo *et al.*, 2002; Kikvi *et al.*, 2007). Die Gene *strA-strB* kommen oft zusammen mit dem *sul2*-Gen auf konjugativen oder nicht-konjugativen Plasmiden vor (van Duijkeren *et al.*, 2018). Sie sind die am häufigsten beschriebenen Resistenzgene bei *E. coli* von Tieren weltweit (Poirel *et al.*, 2018).

#### 4.6.5.2 Resistenz gegenüber Kanamycin und Neomycin

Die eher selten beschriebene Resistenz gegenüber Kanamycin und Neomycin wird über eine Aminoglykosid-Phosphotransferase, kodiert durch das Gen *aph(3')-IIa* (auch als *aphA-2* bezeichnet), vermittelt (Ramirez und Tolmasky, 2010; Shaw *et al.*, 1993). Das Resistenzgen *aph(3')-IIa* dient als ein Selektivmarker für genetisch modifizierte Organismen und Pflanzen und wurde bisher in der Umwelt (Bodenproben, Tiere, Menschen) selten nachgewiesen (Woegerbauer *et al.*, 2015), möglicherweise weil es in nichtkultivierbaren Bakterien vorkommt (Smalla *et al.*, 1993).

#### 4.6.5.3 Resistenz gegenüber Amikacin und Gentamicin

Das Resistenzgen *aac(6')* kodiert für eine Aminoglykosid-Acetyltransferase, die Resistenz gegenüber Amikacin und Gentamicin (und weitere Aminoglykoside wie z. B. Tobramycin) vermittelt. Bei den *aac(6')-I* Aminoglykosid-Resistenzgenen ist *aac(6')-Ib* klinisch gesehen wahrscheinlich am relevantesten (Ramirez und Tolmasky, 2010).

Eine andere Aminoglykosid-Acetyltransferase (kodiert durch das Gen *aac(3)-I*) vermittelt Resistenz gegenüber Gentamicin (und Fortimicin) und ist bei *Enterobacteriaceae* weit verbreitet (Ramirez und Tolmasky, 2010).

#### 4.6.6 Resistenz gegenüber Tetracyclinen

Tetracycline sind Breitspektrumantibiotika. Die Resistenz gegenüber diesen Antibiotika wird durch Tetracyclin-Resistenzgene (*tet*) vermittelt, von welchen bereits mindestens 62 verschiedene *tet*-Gene sowie zusätzliche 11 Mosaikgene charakterisiert sind. Entsprechend der Funktion ihrer Genprodukte werden diese in die Gruppen Efflux-Proteine (n = 35), ribosomale Schutzproteine (n = 13) und inaktivierende Enzyme (n = 13) eingeteilt, wobei bei einem Gen, *tet(U)*, der von ihm vermittelte Resistenzmechanismus unbekannt ist (<https://faculty.washington.edu/marilynr/tetweb1.pdf>; van Duijkeren *et al.*, 2018). Die Efflux-Proteine kodieren einen Energie-abhängigen Efflux von Tetracyclinen. Die ribosomalen Schutzproteine kodieren zytoplasmatische Proteine, welche durch Interaktion mit dem Ribosom dieses vor dem Einfluss von Tetracyclinen schützen. Die inaktivierenden Enzyme modifizieren und inaktivieren Tetracycline, z. B. über Redoxreaktionen von Oxidoreduktasen (van Duijkeren *et al.*, 2018). Die Mehrheit der *tet*-Gene befindet sich auf Plasmiden oder Transposons (inklusive konjugativer Plasmide und Transposons) vieler verschiedener Bakterien, isoliert von Menschen, Tieren und aus Umweltproben (Chopra und Roberts, 2001). Die bei *E. coli* am häufigsten zu findenden *tet*-Gene sind *tet(A)* und *tet(B)*. Beide sind Bestandteil kleiner nicht-konjugierbarer Transposons, die häufig in konjugative (und nicht-konjugative) Plasmide integriert werden. Durch das Vorkommen von mehreren *tet*-Genen in einem Isolat und dem regelmäßigen Vorkommen von *tet*-Genen auf Plasmiden und anderen MGEs vermutet man, dass das entsprechende Isolat diese Gene zu verschiedenen Zeiten und

unter verschiedenen Umständen, z. B. bei vorliegender Multiresistenz über Selektionsdruck durch andere Antibiotika, erworben hat (Poirel *et al.*, 2018).

#### 4.6.7 Resistenz gegenüber Fosfomycin

Die weite Verbreitung von multiresistenten *Enterobacteriaceae* hat alte antimikrobielle Wirkstoffe wie Fosfomycin wieder in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. Fosfomycin wird immer häufiger zur Therapie von ESBL-bildenden *E. coli* bei Harnwegsinfektionen vorgeschlagen und eingesetzt (Giske, 2015; Cantón und Coque, 2006). Fosfomycin hemmt durch irreversible Alkalisierung des Enzymes MurA die Peptidoglykan-Synthese (van Duijkeren *et al.*, 2018). Die Resistenz gegenüber Fosfomycin ist eine enzymatische Inaktivierung, wird durch verschiedene Enzyme erreicht (van Duijkeren *et al.*, 2018) und liegt chromosomal oder Plasmid-lokalisiert vor (Riccobono, 2015). Hauptsächlich werden die Metallo-Enzyme FosA, FosB (beides Thiol Transferasen) und FosX (eine Hydrolase) und die Kinasen FomA und FomB beschrieben. Die Metallo-Enzyme öffnen den Oxiran-Ring von Fosfomycin und machen es damit unwirksam. So integrieren z. B. FosA-Enzyme als Glutathion-S-Transferasen Glutathion mit zweiwertigem Mangan ( $Mn^{2+}$ ) und einwertigem Kalium ( $K^+$ ) als Cofaktoren in den Oxiran-Ring von Fosfomycin, öffnen den Ring dadurch und inaktivieren das Antibiotikum (van Duijkeren *et al.*, 2018). Die *fos*-Gene auf Plasmiden werden häufig von IS26 flankiert (Riccobono, 2015). Die genetische Umgebung beinhaltet auch andere Insertionssequenzen wie IS10, *ISEcp1* und IS903 (Ho *et al.*, 2013). Eine Plasmid-lokalisierte Fosfomycin-Resistenz in Verbindung mit *bla*<sub>CTX-M</sub> ist in Europa bei Lebensmitteln noch nicht nachgewiesen worden (Giske, 2015). Allerdings konnte das Gen *fosA3* bisher auf einem *bla*<sub>NDM-1</sub>-tragenden Multiresistenz-Plasmid von *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Corvallis isoliert werden. Dieses Isolat stammte von einem wilden Zugvogel (Villa *et al.*, 2015). Auch in Frankreich wurde ein *bla*<sub>CTX-M-55</sub> Plasmid mit *fosA3* in einer Studie im Verdauungstrakt eines Rindes nachgewiesen (Lupo *et al.*, 2018). In China, Japan und Korea wird *fosA3* allerdings immer häufiger auch in unterschiedlichen tierischen Reservoirs und vor allem auf Plasmiden in Verbindung mit ESBL-Genen beschrieben (Ho *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2017a; Hou *et al.*, 2013), hier vor allem mit *bla*<sub>CTX-M-55</sub>, *bla*<sub>CTX-M-65</sub> und *bla*<sub>CTX-M-14</sub> (Yang *et al.*, 2014). Hierbei ist zu vermerken, dass Fosfomycin in den genannten Ländern nicht zur Therapie von Lebensmittel liefernden Tieren zugelassen ist (Rao *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2017a; Lupo *et al.*, 2018). Die steigende Häufigkeit des Nachweises von *fosA3* liegt vermutlich an der Verbreitung von Inc11 und IncN Plasmiden und nicht an einer klonalen Verbreitung eines spezifischen Stammes (Villa *et al.*, 2015) oder durch Co-Selektion bei Multiresistenz-Plasmiden auch ohne den Einsatz von Fosfomycin, sondern anderen Antibiotika (Lupo *et al.*, 2018). Durch die Möglichkeit einer Verbreitung von Resistenzen über Lebensmittel oder Tiere



auf den Menschen ist der Nachweis von *fosA3* als eine potenzielle Gefahr für den Menschen anzusehen (Hou *et al.*, 2013).

## 4.7 Verbreitung von ESBL-Genen

ESBL-Gene sind bei Vertretern der Familie *Enterobacteriaceae* sehr weit verbreitet. Dies deutet auf ein Reservoir in der Umwelt hin, welches über Wasser, Lebensmittelverzehr oder direkten Kontakt mit Tieren zu einer Übertragung auf den Menschen beitragen kann (Hartmann *et al.*, 2012). Über kontaminierte verzehrfertige Lebensmittel können ESBL-bildende *E. coli* in den Verdauungstrakt von Menschen gelangen und diesen kolonisieren. Resistenzgene sind leicht übertragbar, wenn sie auf Plasmiden und anderen mobilen genetischen Elementen von Bakterien liegen, welche im gleichen Milieu leben (Schwarz und Chaslus-Dancla, 2001). Der konjugative Transfer eines *bla*<sub>TEM-52</sub>-tragenden Plasmids von aviären *E. coli* auf humane *E. coli* konnte in einem Model, welches die Situation im menschlichen Dickdarm simulierte, nachgewiesen werden (Smet *et al.*, 2011). Knudsen und Kollegen (2018) untersuchten die genetische Verwandtschaft *bla*<sub>CTX-M-1</sub>-tragender Plasmide von *E. coli*-Isolaten aus dem menschlichen Darm mittels Gesamtgenomanalysen. Dabei konnte gezeigt werden, dass strukturell engverwandte Plasmide bei *E. coli*-Isolaten verschiedener Sero- und Sequenztypen vorkamen. Knudsen und Kollegen (2018) stellten die These auf, dass der Transfer der Plasmide im menschlichen Darm erfolgte.

### 4.7.1 ESBL-Reservoir, Kontaminations- und Übertragungsmöglichkeiten

Viele Reservoirs sind bereits gründlich auf das Vorkommen von ESBL-bildenden *E. coli* untersucht worden, z. B. Krankenhäuser und Lebensmittel liefernde Tiere, hier vor allem Geflügel. Zu Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft existieren nur wenige Studien hinsichtlich des Vorkommens ESBL-bildender *E. coli* (Ben Said *et al.*, 2015), bei Milch- und Milchprodukten wurden nur wenige Vorkommen von ESBL-bildenden *E. coli* beschrieben (Hartmann *et al.*, 2012).

Das Essverhalten der Bevölkerung hat sich durch die Ernährungsempfehlung von Gesundheitsorganisationen zu Gunsten pflanzlicher Lebensmittel hin verändert (DuPont, 2007). Es ist generell wenig bekannt über das Vorkommen von *E. coli* in verschiedenen verzehrfertigen Lebensmitteln (= vorgefertigte Lebensmittel, die ohne weitere Behandlung direkt verzehrt werden können). Sofern aus derartigen Lebensmitteln *E. coli* isoliert wurden, gibt es nur wenige Untersuchungen zu deren antimikrobieller Resistenz (Ryu *et al.*, 2012).

Die Kontamination pflanzlicher Lebensmittel mit antibiotikaresistenten Bakterien ist bei ihrer Vielzahl immer abhängig von der Art der Anzucht, der Ernte und der weiteren Behandlung (z. B. offenes Feld/Folienabdeckung/Gewächshaus, auf Erde/ohne Erde, Temperatur,

Jahreszeit, Umgebung, Verpackung). Eine Kontamination kann früh in der Lebensmittelkette schon vor der Ernte erfolgen (s. **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**), z. B. bei Freilandanzucht auf Erde durch Düngen mit bakterienhaltiger tierischer Gülle oder bei jedem Anzuchtssystem durch Bewässerung mit kontaminiertem Wasser (Söderqvist *et al.*, 2016). Gülle stellt ein Reservoir für resistente Bakterien und zum Teil auch noch funktionell aktive Antibiotika dar. Die Verwendung von Gülle auf Äckern bewirkt einen signifikanten Anstieg des Vorkommens von Antibiotika-Resistenzgenen und eine Selektion von resistenten Bakterienpopulationen im Erdboden (Heuer *et al.*, 2011). Hartmann *et al.* (2012) konnten in ihrer Studie belegen, dass ein Jahr nach Düngung des Bodens mit Gülle aus einem Stall, bei welchem vorher im Rinderkot CTX-M-bildende *E. coli* isoliert wurden, noch genotypisch gleiche CTX-M-bildende *E. coli*-Isolate in der Erde nachgewiesen werden konnten. Gülle ist eine der Hauptquellen für die Kontamination des Erdbodens mit antibiotikaresistenten Bakterien (Ibrahim *et al.*, 2016). Lebensmittel pflanzlicher Herkunft, die dicht am Erdboden wachsen, können mit Bakterien kontaminiert werden, z. B. über aufspritzende Erde beim Gießen oder Regen (Monaghan und Hutchison, 2012). Für die Kontamination des Erdbodens mit antibiotikaresistenten Bakterien kommt neben Gülle auch Oberflächenwasser in Betracht, da auch in diesem, meist zum Bewässern verwendetem Wasser, bla<sub>CTX-M-15</sub>-tragende *E. coli* nachgewiesen werden konnten (Franz *et al.*, 2015). Zudem wird es als mögliche Übertragungsquelle dieser Bakterien auf Pflanzen angesehen (Iseppi *et al.*, 2018). Die Gefahr der Übertragung der ESBL-Resistenzgene von Saprophyten auf pathogene Bakterien konnte bei Kopfsalat (Bezanson *et al.*, 2008) und Spinat (Walia *et al.*, 2013) schon demonstriert werden (zitiert nach Bhutani *et al.*, 2015). Des Weiteren sind pathogene Bakterien dazu fähig, durch das Wurzelsystem der Pflanze in deren essbare Bereiche zu gelangen oder durch Kolonisation von frischen Gemüsepflanzenzellen in diese einzudringen (Bhutani *et al.*, 2015; Solomon *et al.*, 2002). Bei genetisch modifizierten (GM) Pflanzen wurden Bedenken erhoben, dass möglicherweise Antibiotika-Resistenzmarkergene von den GM Pflanzen auf autochthone Bakterien z. B. über die Erde übertragen werden, was von verschiedenen Studien unterstrichen wird (Ma *et al.*, 2011, Smalla *et al.*, 1993).

Weitere Kontaminationsmöglichkeiten sind bei Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft je nach Anzuchtweise in Betracht zu ziehen: die Auswahl des Feldes (nah an Landwirtschaft bzw. einer Kontaminationsquelle, Zugangsmöglichkeit von Wildtieren/Insekten), Saatgut/Samen (selbst kontaminiert durch die hier aufgeführten Punkte und wie oben aufgeführt Wasser und Gülle), Agrarmanagement (Feldhygiene, Arbeiterhygiene, Sanitäreinrichtungen (Toiletten (Art/Ort), Handwaschbecken), Gerätschaften und Transportboxen, Verarbeitungsprozesse und Verpackung (EFSA, 2013; FAO/WHO, 2008; NACMCF, 1999). Sprossen werden auf Grund ihrer Anzuchtweise als ein besonders problematisches Lebensmittel hinsichtlich der Lebensmittelsicherheit angesehen

V:\Anlagenbuchhaltung (Abadias *et al.*, 2008; NACMCF, 1999). Während der Produktion können sich Bakterien gut vermehren, da die Anzuchtbedingungen ein ideales Klima für Bakterien bilden: die Samen werden erst in Wasser eingelegt und dann in einer warmen (je nach Art, im Schnitt 25°C) und feuchten Umgebung (Bewässerung bei Alfalfa z. B. alle 10-15 Minuten) über mehrere Tage (durchschnittlich 3-7 Tage) hochgezogen (NACMCF, 1999). Daher sind sie oft hochkontaminiert mit Bakterien, wohingegen Salat meist eine geringe Kontamination aufweist – dies wird durch Studienergebnisse wie bei Kim *et al.* (2015) unterstützt. Da viele Lebensmittel pflanzlicher Herkunft roh verzehrt werden, können diese bei entsprechender bakterieller Kontamination ein Infektionsrisiko für den Menschen darstellen (Iseppi *et al.*, 2018).

Sprossen als Risiko-Lebensmittel und die Möglichkeit einer Erkrankung durch den Verzehr von Lebensmitteln, welche mit ESBL-bildenden Bakterien kontaminiert sind, wurden 2011 durch das Ausbruchsgeschehen mit dem enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) Serotyp O104:[H4], ST678, welcher auch über das ESBL-Gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> verfügte, untermauert (Fischer *et al.*, 2014; EFSA, 2013). Dieser seltene Serotyp zeigte Eigenschaften eines enteroaggregativen *E. coli* (EAEC) O104:H4, sowie eines EHEC-Stammes (*stx2*-Gen). Das Ausbruchsgeschehen betraf 3842 Menschen, davon waren 855 am hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS) erkrankt und 53 der Infizierten starben. Es wurde sehr wahrscheinlich durch den Verzehr von Bockshornklee-Sprossen, kontaminiert mit dem oben genannten ESBL-bildenden EHEC-Stamm, verursacht. Dieser Serotyp wurde vorher noch nicht bei Lebensmitteln nachgewiesen, wohingegen das Vorkommen Shiga-Toxin-bildender *E. coli* anderer Serotypen schon seit vielen Jahren bei Rohfleischzubereitungen, Wildfleisch und Rohmilchkäse bekannt ist. Vereinzelt wurden Nachweise in der EU auch bei pflanzlichen Lebensmitteln gemeldet (BfR Wissenschaft, 2011).

Eine Übertragung auf den Menschen ist somit durch die kontaminierte Umwelt oder durch direkten Personenkontakt und auch Tierkontakt (Haustiere und Lebensmittel liefernde Tiere) möglich.

ESBL-Bildner wurden bei Lebensmittel liefernden Tieren in vielen Teilen Europas isoliert, dabei wurden auch vermehrt ESBL-bildende Isolate bei Lebensmitteln tierischen Ursprungs gefunden (Liebana *et al.*, 2013). Diese Zunahme wird als Gefahr für die öffentliche Gesundheit angesehen (Fischer *et al.*, 2014). Als Beispiel für Lebensmittel liefernde Tiere wird im Folgenden auf die Milchkuh näher eingegangen.

Die Rindermastitis ist eine der meist verbreiteten und ökonomisch relevantesten Krankheiten bei Milchkühen (Dahmen *et al.*, 2013). Rindermastitiden können subklinisch oder klinisch verlaufen, die Fälle von subklinischen Mastitiden sind allerdings häufiger (Su *et al.*, 2016). Akute und perakute Verläufe werden häufig von *E. coli* verursacht (Timofte *et al.*, 2014), sehr wahrscheinlich in Folge einer fäkalen Kontamination des Euters (Srinivasan *et al.*, 2007).

Die Behandlung erfolgt mit antimikrobiellen Wirkstoffen, dabei werden am häufigsten  $\beta$ -Laktame eingesetzt (Feßler *et al.*, 2012). Eine schwere klinische Mastitis verändert das Erscheinungsbild der Milch (z. B. flockige Konsistenz, Farbänderungen) und wird von Symptomen einer Entzündung und der Störung des Allgemeinbefindens der Kuh begleitet. Normalerweise werden an Mastitis erkrankte Kühe zuletzt gemolken und die Milch in den Gülletank entsorgt (Ibrahim *et al.*, 2016). Eine Gefahr für den direkten Eintrag der Mastitis-Erreger in die Lebensmittelkette sollte bei einer schweren klinischen Mastitis somit nicht gegeben sein.

Gelangt kontaminierte Milch als Rohmilch in den Verkauf oder über die Rohmilchverarbeitung in die Lebensmittelkette, kann es zu lebensmittelbedingten Infektionen beim Menschen kommen. Erfolgt die Pasteurisierung kontaminierter Milch ungenügend oder fehlerhaft (Oliver *et al.*, 2005; Timofte *et al.*, 2014), ist diese Gefahr ebenfalls gegeben - wie ein Infektionsgeschehen mit *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Typhimurium gezeigt hat (Walker *et al.*, 2000). Des Weiteren kann auch ordnungsgemäß thermisch behandelte Milch kontaminiert werden, sei es durch Beimischung kontaminierter Rohmilch (Batabyal *et al.*, 2018), durch bakterielle Biofilme auf den bei der Verarbeitung verwendeten Gerätschaften (Oliver *et al.*, 2005) oder durch das Personal bei Behandlung und Bearbeitung bei der Käseherstellung (Kousta *et al.*, 2010).

Tierkörper können während der Schlachtung und dem anschließenden Zerlegeprozess mit ESBL-bildenden Bakterien kontaminiert werden (Michael *et al.*, 2015). Findet eine Kontamination statt, besteht die Gefahr eines Eintrags von ESBL-bildenden *E. coli* in die Lebensmittelkette bis hin zum Verbraucher.

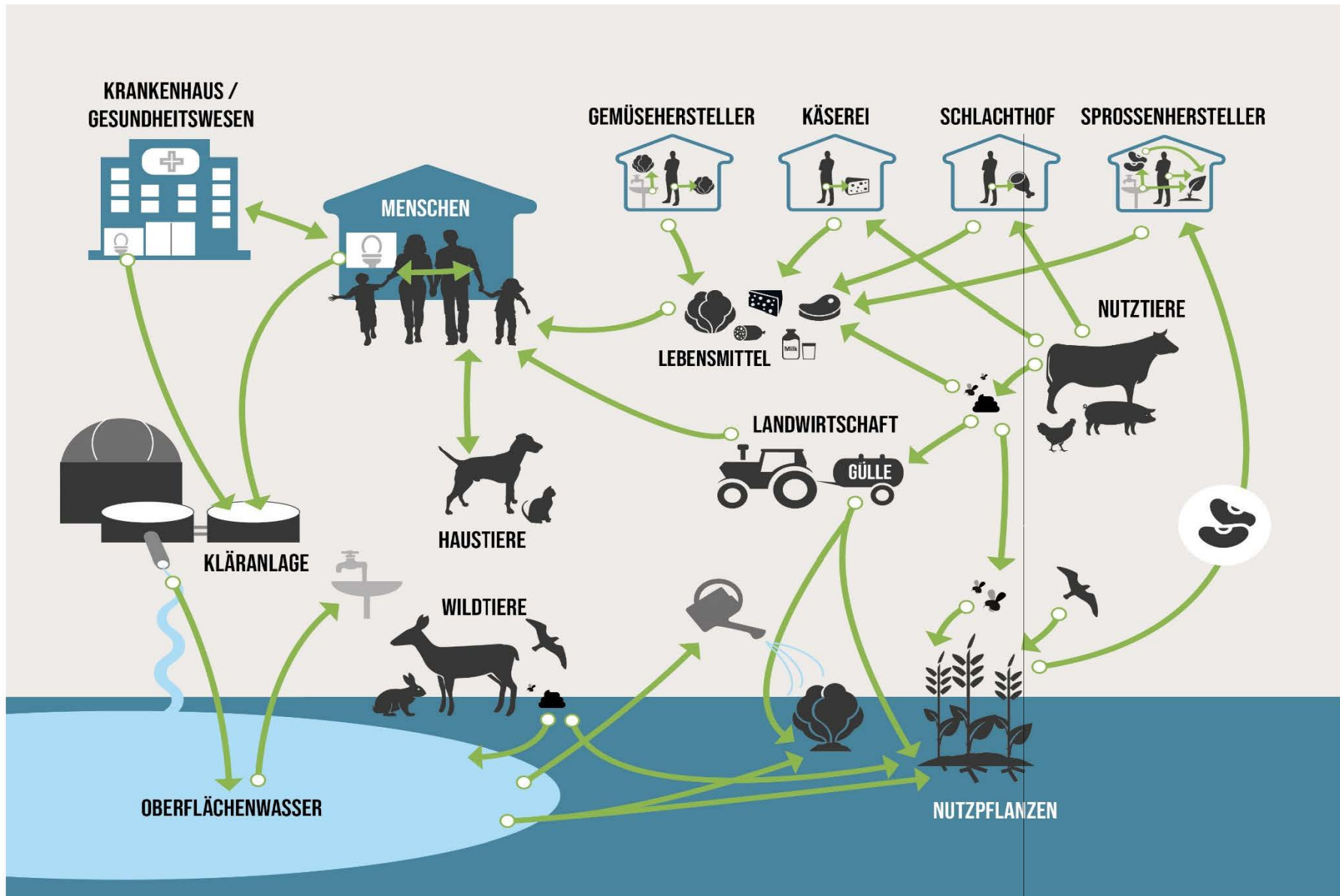


Abb. 2: Übertragungswege antibiotikaresistenter Bakterien

## 5 Publikationen

### 5.1 Publikation 1

Christin Freitag, Geovana Brenner Michael, Kristina Kadlec, Melanie Hassel and  
Stefan Schwarz.

**Detection of plasmid-borne extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) genes in  
*Escherichia coli* isolates from bovine mastitis.**

Vet. Microbiol. 2017; 200: 151-156.

<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.08.010>

**You have to purchase this part online.**

## 5.2 Publikation 2

Christin Freitag, Geovana Brenner Michael, Jun Li, Kristina Kadlec, Yang Wang,  
Melanie Hassel and Stefan Schwarz.

**Occurrence and characterisation of ESBL-encoding plasmids among *Escherichia coli*  
isolates from fresh vegetables.**

Vet. Microbiol. 2018; 219: 63-69.

<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.03.028>

**You have to purchase this part online.**

## 6 Diskussion

### 6.1 ESBL-Vorkommen bei *E. coli*-Isolaten von Mastitis-Milchproben in Deutschland und anderen Ländern

Bei *E. coli*-Isolaten von Lebensmittel liefernden Tieren und Lebensmitteln in der EU dominieren ESBLs der Gruppe CTX-M-1 (EFSA, 2011a; Madec *et al.*, 2012). Dabei sind die Gene *bla*<sub>CTX-M-1</sub> und vor allem *bla*<sub>CTX-M-15</sub> beim Menschen weit verbreitet, werden aber auch bei Lebensmittel liefernden Tieren in wenigen EU-Ländern beschrieben (Madec *et al.*, 2012; Liebana *et al.*, 2013). So konnten auch in der Publikation 1 (Kapitel 5.1) *bla*<sub>CTX-M-1</sub>-Gene als häufigste ESBL-Gene bei *E. coli*-Isolaten von Milchkühen, die an Mastitiden litten, nachgewiesen werden.

Insgesamt 75 % der ESBL-bildenden *E. coli* (n = 12; 1,4 % der 878 *E. coli*-Isolate) der Publikation 1 aus Mastitis-Milchproben verfügten über Gene, die ESBLs der Gruppe CTX-M-1 kodierten. Fünf Isolate (41,7 %) trugen das Gen *bla*<sub>CTX-M-1</sub> und vier Isolate (33,3 %) das Gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. Die weiteren bei diesen Isolaten nachgewiesenen ESBL-Gene umfassten Gene, die für ESBLs der Gruppen CTX-M-2 (zwei Isolate mit *bla*<sub>CTX-M-2</sub>-Genen; 16,7 %) und CTX-M-9 (ein Isolat mit einem *bla*<sub>CTX-M-14</sub> Gen; 8,3 %) kodierten. Das *bla*<sub>CTX-M-14</sub>-Gen ist bei *E. coli* von Menschen und Tieren weit verbreitet und bei Rindern das häufigste ESBL-Gen (Timofte *et al.*, 2014; Dahmen *et al.*, 2013), was in Publikation 1 nicht belegt werden konnte. Hier waren *bla*<sub>CTX-M-14</sub>-tragende Isolate am seltensten nachweisbar. Weiterhin war in der Publikation 1 feststellbar, dass fünf der 12 ESBL-Gen-tragenden Isolate – die beiden *bla*<sub>CTX-M-2</sub>-bildenden und drei der vier *bla*<sub>CTX-M-15</sub>-bildenden Isolate – zusätzlich das Gen *bla*<sub>TEM-1</sub>, welches für eine  $\beta$ -Laktamase mit engem Substratspektrum kodiert, aufwiesen.

Die in Publikation 1 beobachtete Verteilung der CTX-M-Gruppen konnte auch in anderen Studien über ESBL-Vorkommen bei *E. coli* aus Fällen von Mastitiden bestätigt werden. So fanden Ali *et al.* (2017) und auch Yang *et al.* (2018) in China mit 63 % bzw. 66 % am häufigsten das Gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, weit dahinter gefolgt von *bla*<sub>CTX-M-14</sub> mit nur 9 % bzw. 11 %. Ali *et al.* (2017) konnten zusätzlich bei den CTX-M-Gruppen die Gene *bla*<sub>CTX-M-55</sub> (9 %), *bla*<sub>CTX-M-3</sub> (4 %) und *bla*<sub>CTX-M-1</sub> (2 %) nachweisen, Yang *et al.* (2018) die Gene *bla*<sub>CTX-M-55</sub> (10 %), *bla*<sub>CTX-M-64</sub> (6 %), *bla*<sub>CTX-M-65</sub> (4 %) und *bla*<sub>CTX-M-3</sub> (1 %). Auch die Kombination von ESBL-Genen mit *bla*<sub>TEM-1</sub> (n = 16; 41 % bzw. n = 50; 68 %) konnte hier gezeigt werden (Ali *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2018). Das Vorkommen ESBL-bildender *E. coli* aus Mastitis-Fällen auf dem asiatischen Kontinent ist weit höher als in Publikation 1 und beträgt 23-25% (im Gegensatz zu 1,4 % in Publikation 1). Bei Ali *et al.* (2017) lag die ESBL-Prävalenz bei 25,4 % (46 ESBL-bildende *E. coli* / 181 *E. coli*-Isolate / 1440 Mastitis-Milchproben), bei Yang *et al.* (2018) bei 23,0 % (73 ESBL-bildende *E. coli* / 318 *E. coli*-Isolate / 2897 Mastitis-Milchproben).



Ebenso wurden in Japan (Ohnishi *et al.*, 2013) bei 58 Mastitis-Milchproben 13 ESBL-bildende *E. coli* isoliert. Bei 10 (77 %) der 13 ESBL-bildenden *E. coli* wurde das Gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> nachgewiesen, gefolgt von *bla*<sub>CTX-M-14</sub> (zwei Isolate, 15 %) und *bla*<sub>CTX-M-2</sub> (ein Isolat, 8 %). Auch in dieser Studie verfügten fünf ESBL-Genträger (38,5 %) über das Gen *bla*<sub>TEM-1</sub> (Ohnishi *et al.*, 2013). In Südtaiwan konnte hingegen eine geringe Häufigkeit von 10,5 % ESBL-bildender *E. coli* bei Mastitiden des Rindes gefunden werden, wobei am häufigsten das ESBL-Gen *bla*<sub>CTX-M-55</sub> nachweisbar war (4 Isolate), gefolgt von *bla*<sub>CTX-M-15</sub> und *bla*<sub>CTX-M-14</sub> (je ein Isolat) (Su *et al.*, 2016).

Auch in Indien wurde insgesamt eine geringere Häufigkeit ESBL-bildender *E. coli* aus Mastitis-Fällen beschrieben. Bei 182 Milchproben wurden nur 22 *E. coli* isoliert, von denen zwölf (5,5 %) ESBL-Bildner waren und der Gruppe CTX-M zugeordnet werden konnten. Eine weitere Differenzierung der ESBL-Gene fand nicht statt (Batabyal *et al.*, 2018).

Die Ergebnisse zweier afrikanischer Studien sind unterschiedlich, eine entspricht eher denen der vorliegenden Studie (Publikation 1). Bei 452 Mastitis-Milchproben aus Tunesien konnten 118 *E. coli* isoliert werden, von denen drei (2,5 %) Isolate ESBL-Bildner waren und das Gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> trugen (Saidini *et al.*, 2018). Bei der anderen Studie (Ombarak *et al.*, 2019) wurden 568 Viertelgmelks-Proben getestet und nur 14 *E. coli* isoliert, von denen lediglich ein Isolat (7,1 %) ein ESBL-Bildner war. Dieses Isolat verfügte über das ESBL-Gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> zusammen mit einem *bla*<sub>TEM</sub>-Gen (ohne weitere Differenzierung). Beprobte wurden laut Ombarak *et al.* (2019) drei Dörfer und zwei Milchviehfarmen in einem unbekanntem Zeitraum, bei Saidini *et al.* (2018) waren es 244 verschiedene Farmen über knapp zwei Jahre hinweg. Die geringe Farmzahl bei Ombarak *et al.* (2019) könnte die geringe Anzahl an nachgewiesenen *E. coli* erklären, da möglicherweise genau die Farmen herausgesucht wurden, die keine hohe Anzahl an *E. coli*-Mastitis-Fällen im Allgemeinen haben.

Zeitgleich (2009 bis 2011) zu Publikation 1 wurden auch in Frankreich *E. coli*-Mastitis-Milchisolate hinsichtlich ESBL-Vorkommen analysiert. Hier konnten bei 1745 *E. coli*-Isolaten fünf ESBL-bildende *E. coli* (0,3 %) nachgewiesen werden (Dahmen *et al.*, 2013), was der vorliegenden Verteilung (1,4 %) aus Publikation 1 relativ nahekommt. Die Zuordnung der entsprechenden ESBL-Gene zu den Gruppen CTX-M-9 (n = 3) und CTX-M-1 (n = 2) war relativ ausgeglichen.

Zu einem späteren Zeitpunkt (2013 bis 2014) konnte in Serbien bei neun *E. coli*-Isolaten aus Mastitis-Fällen ein ESBL-Bildner mit einem *bla*<sub>CTX-M-1</sub>- und *bla*<sub>TEM-1</sub>-tragenden Plasmid (11,1 %) nachgewiesen werden (Todorović *et al.*, 2018). In dieser Studie wurden 104 Mastitis-Milchproben untersucht. Dieses Ergebnis ist sehr ähnlich zu den Resultaten einer Studie von Randall und Mitarbeitern (2014) in England und Wales, bei welcher 103 Proben von Milch, welche nicht zum Verzehr für den Menschen geeignet ist (bspw. Kolostrum-, Mastitis-, Wartezeit-Milch), untersucht wurden. Von den 25 nachgewiesenen *E. coli*-Isolaten waren fünf

ESBL-Bildner (20,0 %), welche den Gruppen CTX-M-1 ( $bla_{CTX-M-15}$   $n = 2$ ;  $bla_{CTX-M-1}$   $n = 2$ ) und CTX-M-9 ( $bla_{CTX-M-14}$   $n = 1$ ) zugeordnet wurden (Randall *et al.*, 2014).

In einer deutschen Studie aus Bayern wurden zwischen 2014 bis 2016 *E. coli* ( $n = 490$ ) aus einer nicht näher angegebenen Zahl von Mastitis-Milchproben isoliert (Eisenberger *et al.*, 2018). Die nachgewiesenen 22 ESBL-bildenden *E. coli* (4,5%) umfassten die ESBL-Gene  $bla_{CTX-M-14}$  ( $n = 10$ ),  $bla_{CTX-M-1}$  ( $n = 6$ ),  $bla_{CTX-M-15}$  ( $n = 4$ ),  $bla_{CTX-M-2}$  und  $bla_{CTX-M-32}$  (je ein Isolat). Bei 13 der 22 Isolate war ebenfalls das Gen  $bla_{TEM-1}$  nachweisbar. Der vergleichbar höhere Nachweis als in anderen Studien könnte an einer unterschiedlichen Antibiotikaexposition, einer abweichenden Herdendichte der untersuchten Farmen oder verschiedenen Hygienestandards liegen (Eisenberger *et al.*, 2018).

Weitere Studien haben zwar die mikrobiologische Qualität von Mastitis-Milch (z. B. Ahmed und Shimamoto, 2011/Ägypten; Tenhagen *et al.*, 2006/Deutschland) untersucht, jedoch nicht hinsichtlich des Vorkommens ESBL-bildender *E. coli*. Andere Studien wiesen keine *E. coli*-Isolate oder ESBL-bildende *E. coli*-Isolate bei Mastitis-Milchproben nach (Saini *et al.*, 2012/Kanada; Srinivasan *et al.*, 2007/Vereinigte Staaten von Amerika).

Somit liegt das Vorkommen der ESBL-bildenden *E. coli*-Isolate aus Mastitis-Milchproben im Vergleich zu nicht ESBL-bildenden Isolaten in den Kontinenten ungleich verteilt vor: in Europa bei 0,3 bis 20 % (Mittelwert 7,5 %), in Asien bei 11-55 % (Mittelwert: 28,5 %) und in Afrika bei 2,5 bis 7,1 % (Mittelwert 4,8 %). Publikation 1 befindet sich mit ihren Ergebnissen im unteren Bereich. Die Studien in Asien haben vergleichbar hohe Prozentzahlen an ESBL-bildenden *E. coli*-Isolaten. Ein hoher Antibiotikaeinsatz führt zur Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen (Ewers *et al.*, 2012). Durch den hohen Antibiotikaverbrauch in China und Indien (Kakkar *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2018) steigt somit auch das Vorkommen von Antibiotikaresistenzen. Zum Teil werden Antibiotika auch noch als Wachstumsförderer genutzt (Qu *et al.*, 2019), wobei einzelne Verbote mittlerweile erlassen wurden (z. B. Colistin in China im April 2017), dagegen sind in Europa Wachstumsförderer mit antibiotischer Wirkung seit 2006 generell verboten (van Duijkeren *et al.*, 2018). Zu einem gesteigerten Vorkommen der Antibiotikaresistenzen tragen auch Antibiotika in der Umwelt bei, so wurden z. B. in Abwässern der pharmazeutischen Industrie in Indien und in deren Nähe befindlichen Brunnen und Flüssen, von denen Wasser zum Teil als Trinkwasserquellen genutzt wird, Antibiotika nachgewiesen (Fick *et al.*, 2009).

Anhand der veröffentlichten Studien kann ein vermehrtes Aufkommen von  $bla_{CTX-M-55}$ ,  $bla_{CTX-M-64}$  und  $bla_{CTX-M-65}$  in Asien als in den restlichen Ländern vermutet werden. Diese ESBL-Gene wurden in den Studien in Europa und Afrika nicht nachgewiesen. Auch von Rao *et al.* (2014) wurden CTX-M-55 und CTX-M-65 als häufigste Enzyme bei *E. coli*-Isolaten von Tieren in China beschrieben – gegensätzlich zu Europa, wo CTX-M-1 und CTX-M-15 die häufigsten Enzyme bei *E. coli* von Rindern darstellen (Ewers *et al.*, 2012). Diese Verteilung wird durch

den erwähnten höheren Antibiotikaverbrauch in China und Indien und den dadurch erzeugten Selektionsdruck ermöglicht, da z. B. die neueren CTX-M-Enzyme (wie z. B. CTX-M-55) eine um 60 % höhere katalytische Effizienz gegenüber Ceftazidim haben als die zuerst beschriebenen CTX-M Enzyme (Cantón *et al.*, 2012; Bonnet *et al.*, 2004; Novais *et al.*, 2008). Ceftazidim ist in China verfügbar und stellt als Cephalosporin der 3. Generation eine der fünf am häufigsten benutzten Antibiotika-Klassen in China dar (Wu *et al.*, 2018). Das vermehrte Aufkommen mehrerer CTX-M-Enzyme nebeneinander könnte das Auftreten neuer CTX-M-Enzyme begünstigt haben. So ist das Gen *bla*<sub>CTX-M-64</sub> durch Rekombination von Genen der Gruppen CTX-M-1 und CTX-M-9, wahrscheinlich aus den weltweit am häufigsten vorkommenden *bla*<sub>CTX-M-14</sub> und *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, entstanden (Cantón *et al.*, 2012).

## 6.2 ESBL-Vorkommen bei *E. coli*-Isolaten aus Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft in Deutschland und anderen Ländern

Die sieben ESBL-bildenden *E. coli*-Isolate, die bei Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft nachgewiesen wurden, stammten von Salat und Sprossen (Salat n = 2, Sprossen n = 5 von 4 verschiedenen Proben). Alle sieben Isolate verfügten über *bla*<sub>CTX-M</sub>-Gene, wobei drei Isolate zusätzlich das Gen *bla*<sub>TEM-1</sub> trugen. Die hierbei nachgewiesenen ESBL-Gene kodierten für Enzyme, die zu den Gruppen CTX-M-9, CTX-M-1 und CTX-M-2 gehörten: *bla*<sub>CTX-M-14</sub> (n = 2) sowie *bla*<sub>CTX-M-65</sub> und *bla*<sub>CTX-M-125</sub> (je n = 1), bzw. *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (n = 2) und *bla*<sub>CTX-M-2</sub> (n = 1). Somit wurden Enzyme der Gruppe CTX-M-9 etwas häufiger (57,1 %) nachgewiesen als die der Gruppe CTX-M-1 (28,6 %) bzw. CTX-M-2 (14,3 %).

In der Studie von Zurfluh *et al.* (2015) konnten bei importiertem Gemüse aus der Dominikanischen Republik, Indien, Thailand und Vietnam insgesamt 26 ESBL-bildende *E. coli* isoliert werden. Die entsprechenden ESBLs waren mit 65,8 % und 30,8 % den Gruppen CTX-M-1 bzw. CTX-M-9 zuzuordnen, am häufigsten wurden *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (38,5 %), *bla*<sub>CTX-M-55</sub> (19,2 %) und *bla*<sub>CTX-M-65</sub> (11,5 %) nachgewiesen. Das Ergebnis der Verteilung der Häufigkeit von ESBLs unterschiedlicher CTX-M Gruppen spiegelt die Verteilung der ESBLs in den verschiedenen Kontinenten wider. In Asien (Indien, Thailand, Vietnam) ist neben *bla*<sub>CTX-M-14</sub> das Gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> bei klinischen Isolaten am häufigsten verbreitet, allerdings wird *bla*<sub>CTX-M-55</sub> zunehmend häufiger nachgewiesen (Rao *et al.*, 2014). Das ESBL-Gen *bla*<sub>CTX-M-65</sub> (eine Variante von *bla*<sub>CTX-M-14</sub>) ist ebenfalls fast nur in China und Korea bei Menschen und gesunden Tieren (Rao *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2012) schon seit längerer Zeit beschrieben. In den USA wurde dieses ESBL-Gen bei *E. coli* ab 2017 nachgewiesen (Tate *et al.*, 2017; Brown *et al.*, 2018; Vinueza-Burgos *et al.*, 2019). In Publikation 2 wurden Salate und Sprossen aus den Niederlanden und Deutschland untersucht, unter anderem wurde auch

hier das ESBL-Gen *bla*<sub>CTX-M-65</sub> nachgewiesen, was ungewöhnlich für Europa ist. Ein weiterer Nachweis dieses ESBL-Gens bei Bakterien aus europäischen Lebensmitteln, wie in Publikation 2, ist der Autorin zurzeit nicht bekannt. Allerdings ist eine häufige Kontaminationsursache von Sprossen deren Samen (NACMCF, 1999) - und die Herkunft der Samen war nicht bekannt.

Es wurden bereits Studien in den Niederlanden durchgeführt, welche die in Europa typisch verteilten ESBL-Gene nachwies. Eine Studie in den Niederlanden untersuchte das Vorkommen von ESBL- und AmpC-bildenden *Enterobacteriaceae* bei Gemüse im Einzelhandel (van Hoek *et al.*, 2015), aber es wurde lediglich ein SHV-12-bildender *E. coli* aus Bleichsellerie nachgewiesen (0,8 %) (van Hoek *et al.*, 2015). Auch Reuland *et al.* (2014) untersuchten das Vorkommen von ESBL-bildenden *Enterobacteriaceae* bei rohem Gemüse in den Niederlanden. In dieser Studie waren Mungobohnensprossen enthalten, die keine *E. coli* aufwies, aber andere Vertreter der Familie *Enterobacteriaceae* (n = 4; 6 % der Gesamtproben, 50 % der Isolate von Mungobohnensprossen), die über die Gene *bla*<sub>SHV-12</sub> (n = 1), *bla*<sub>CTX-M-14</sub> (n = 2) und *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (n = 1) verfügten.

Ebenso ungewöhnlich wie der Nachweis von *bla*<sub>CTX-M-65</sub> ist der Nachweis von *bla*<sub>CTX-M-125</sub> in Publikation 2. Dieses Gen wurde bisher selten beschrieben und weiter analysiert, so zum Beispiel bei einem *Enterobacter cloacae*-Isolat aus menschlichem Urin (Datenbank-Zugangsnr.: JQ724542) und in einer Studie von Wang *et al.* (2017b) bei einem *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Typhimurium-Isolat einer Durchfallprobe. Letztere Studie erwähnt auch eine weitere Publikation, bei der dieses Gen bei einem *E. coli* nachgewiesen werden konnte, allerdings ist der Ursprung dieses Isolates unbekannt. Xu *et al.* (2015) wiesen *bla*<sub>CTX-M-125</sub> bei drei *E. coli*-Isolaten von Absetzferkeln mit Durchfall nach und Xia *et al.* (2014) beschreiben *bla*<sub>CTX-M-125</sub> bei *E. coli*-Isolaten von Menschen in China.

Dass Sprossen oft in hohem Maße bakteriell kontaminiert sind, während Salate ein geringes Kontaminationsniveau aufweisen, konnte bereits gezeigt werden. In Südkorea untersuchten Kim *et al.* (2015) ESBL-bildende *E. coli* bei Gemüse im Einzelhandel. Drei Sprossenproben waren positiv getestet worden (3,3 %), zwei trugen das ESBL-Gen *bla*<sub>CTX-M-55</sub> und ein *bla*<sub>CTX-M-14</sub>-Gen. Sie konnten auch ESBL-bildende *Klebsiella pneumoniae* auf Sprossen und in gemischtem Salat nachweisen. Die restlichen Gemüse waren negativ für ESBL-bildende Bakterien. Sprossen zeigten in dieser Studie mit 3,3 % positiven Proben eine höhere Nachweisrate für *E. coli* als Salat mit 0 %.

In einer Studie von Egea *et al.* (2011) in Spanien konnte bei einer Salatprobe (3 %) ein ESBL-bildendes *E. coli*-Isolat nachgewiesen werden. Dieses Isolat trug ein *bla*<sub>SHV-12</sub>-Gen. ESBL-Gene vom Typ *bla*<sub>SHV-12</sub> sind in Spanien weitverbreitet bei *E. coli* von Menschen, Begleittieren, Lebensmittel liefernden Tieren, Lebensmitteln tierischer Herkunft sowie wildlebenden Tieren (Alonso *et al.*, 2017). Sprossen wurden in der Studie von Egea *et al.*

(2011) nicht untersucht. Mesa *et al.* (2006) untersuchten ESBL-Bildner unter anderem in rohem Essen in Spanien und konnten bei zwei Salatproben *E. coli* (1,3 %) nachweisen, wobei keine weitere Analyse der *E. coli*-Isolate erfolgte. Ben Said *et al.* (2015) ermittelten bei zwei Proben (4,4 %) des untersuchten Markt-Gemüses ESBL-bildende *E. coli*: auf je einer Probe Tomate (*bla*<sub>CTX-M-1</sub>) und Petersilie (*bla*<sub>CTX-M-14</sub>).

In Italien führten Iseppi *et al.* (2018) eine Studie durch, bei der sie das Vorkommen von ESBL-Bildnern auf frischem Gemüse und verzehrfertigem Salat untersuchten. Sie wiesen 54 *E. coli*-Isolate und davon acht ESBL-bildende Isolate bei insgesamt 312 Proben von Eisbergsalat, gemischtem Salat (aus vier verschiedenen Sorten) und Rucola nach. Die entsprechenden *E. coli*-Isolate trugen die ESBL-Gene *bla*<sub>SHV-12</sub> (n = 5; 9,3 %) und *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (n = 3; 5,6 %). In Südafrika wurde ebenfalls frisches Gemüse auf ESBL-Bildner untersucht. Hier wurden 19 ESBL-bildende *E. coli* von Spinat, Tomaten und grünen Bohnen isoliert (3,5 %). Die Genotypen waren divers und es wurden bis zu drei Gene in Kombination in einem Isolat identifiziert: *bla*<sub>SHV-1</sub>, *bla*<sub>SHV-11</sub>, *bla*<sub>SHV-18</sub>, *bla*<sub>CTX-M-14</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>CTX-M-27</sub>, *bla*<sub>CTX-M-55</sub>, *bla*<sub>TEM-3</sub>, *bla*<sub>TEM-215</sub> (Richter *et al.*, 2019).

Auch in Indien wurden Salat und nicht-pasteurisierte Milch auf ESBL-bildende *E. coli* untersucht. Zwei der Salatproben waren positiv (6,7 %), die Milchproben negativ. Eine Untersuchung der ESBL-Gene fand allerdings nicht statt (Rasheed *et al.*, 2014). In den Niederlanden wurden aus Südwest-Asien importierte, frische Küchenkräuter auf das Vorhandensein von gegenüber Cephalosporinen der 3. Generation resistenten *Enterobacteriaceae* untersucht. ESBL-bildende *E. coli* konnten in Wasserspinaat (*bla*<sub>CTX-M-15</sub>/chromosomal kodiert), Tigergras (*bla*<sub>CTX-M-15</sub>) und Betelpfeffer (*bla*<sub>CTX-M-14</sub>) nachgewiesen werden (Veldman *et al.*, 2014).

Marti *et al.* (2013) haben antibiotikaresistente Bakterien bei der Gemüseernte in Kanada untersucht. Das Gemüse wurde für die Studie angepflanzt und je mit Gülle von Schwein und Rind behandelt. Die Gülle wurde zwar vorher auf das Vorkommen von antibiotikaresistenten coliformen Bakterien untersucht, allerdings fehlte bei den verwendeten Antibiotika Cefotaxim. Des Weiteren untersuchten sie die Gülle von Rindern und Schweinen und die mit entsprechender Gülle behandelte Erde hinsichtlich des Vorkommens von Resistenzgenen, darunter auch *bla*<sub>CTX-M</sub>. Das Gen wurde in beiden Güllen nachgewiesen und bei 50 % bzw. 40 % der mit Gülle vom Rind bzw. Schwein behandelten Erde gefunden, allerdings auch bei 50 % nicht mit Gülle behandelte Kontrollerde. Sie fanden zwar *E. coli* auf zwei Gurken, die von mit jeweils Gülle vom Schwein oder vom Rind gedüngten Böden stammten, allerdings war keines der beiden *E. coli*-Isolate ein ESBL-Bildner. Randall *et al.* (2017) suchten nach ESBL-bildenden *E. coli* unter anderem in Obst und Gemüse, entnommen im Vereinigten Königreich (Herkunft aus der EU). Bei 400 Proben konnte bei einer Karotte *E. coli* isoliert werden. Dieses Isolat war jedoch kein ESBL-Bildner. Auch Campos *et al.* (2013) konnten zwar *E. coli* auf

verzehrfertigem Salat in Portugal nachweisen, wobei aber die entsprechenden Isolate keine ESBL-Bildner waren. Ganz ähnliche Ergebnisse erarbeiteten Nüesch-Inderbinen und Mitarbeiter (2015) bei der Untersuchung von Salaten und Sprossen aus der Schweiz, Spanien und Italien. Allerdings wurden in der Studie auch zwei Proben von Wasser, gedacht für die Bewässerung von Kulturpflanzen untersucht und dort ESBL-bildende *E. coli* nachgewiesen. Ein Isolat gehörte der hochvirulenten und pandemischen Linie B2:ST131 an und wies das ESBL-Gen *bla*<sub>CTX-M-27</sub> auf, bei dem anderen Isolat A:ST88 wurde *bla*<sub>CTX-M-3</sub> nachgewiesen (Nüesch-Inderbinen *et al.*, 2015).

Weitere Studien haben zwar die mikrobiologische Qualität von Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft untersucht (z. B. Abadias *et al.*, 2008/Spanien; Hamilton-Miller und Shah, 2001/Vereinigtes Königreich, Ryu *et al.*, 2012/Korea), jedoch nicht hinsichtlich von ESBL-Vorkommen. Andere Studien wiesen keine *E. coli*-Isolate oder zumindest keine ESBL-bildenden *E. coli*-Isolate bei Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft nach (Althaus *et al.*, 2012/Schweiz; Blaak *et al.*, 2014/Niederlande; Bhutani *et al.*, 2015/Vereinigte Staaten von Amerika; Campos *et al.*, 2013/Portugal; Nüesch-Inderbinen *et al.*, 2015/Schweiz, Italien, Spanien; Randall *et al.*, 2017/Vereinigtes Königreich; Raphael *et al.*, 2011/Vereinigte Staaten von Amerika; Schwaiger *et al.*, 2011/Deutschland).

Der Nachweis von 9,3 % ESBL-bildenden *E. coli* bei Sprossen und 1 % bei Salaten in Publikation 2 in Bezug auf die Gesamtzahl der untersuchten Sprossen bzw. Salate, ist daher nicht überraschend und bestätigt die Ergebnisse anderer Studien. Eine höhere Kontamination bei Sprossen ist insofern zu erwarten, da bei einer Kontamination Bakterien durch die Anzuchtbedingungen der Sprossen ideale Bedingungen für ihre Vermehrung vorfinden (s. Kapitel 4.7.1). Hinzu kommt, dass die Samenherstellung für die Sprossenproduktion meist nur ein kleines Teilgebiet der Samenhersteller darstellt. Sie produzieren für mehrere Abnehmer (z. B. Landwirtschaft/Nutzpflanzen, Ölproduktion, Gartenbau, essbare Samen für Mensch und Tier, Sprossenherstellung). Auch wird in der Regel nicht vorher geplant, für welche Nutzung die Samen gewonnen werden sollen, sondern die Samen der Nutzpflanzen (in der Regel auf offenen Agrarflächen und nicht in Gewächshäusern angebaut) werden geerntet, gelagert und nach Bedarf und Nachfrage verkauft. Somit wird bei der Samengewinnung nicht bedacht, dass daraus ein Lebensmittel gewonnen wird und der Standard der guten landwirtschaftlichen Praxis nicht immer eingehalten, wobei in einigen Ländern extra für die Samengewinnung Verhaltenskodexe und Richtlinien existieren (EFSA, 2011b). Eine Kontamination der Samen scheint nach Untersuchungen von Ausbruchsgeschehen in Verbindung mit Sprossen die wahrscheinlichste Quelle der Kontamination der Sprossen zu sein, allerdings sollten weitere Kontaminationsmöglichkeiten nicht außer Acht gelassen werden (NACMCF, 1999).

**Tabelle 2: Übersicht über ESBL-bildende *E. coli*-Isolate und deren *bla*<sub>CTX-M</sub>-Gen-tragende Plasmide isoliert aus Mastitis-Milch des Rindes und Gemüse-Proben bzw. Gewürzen**

ESBL-Gen	Land	Jahr	Herkunft	n	Phylo.-Gruppe	MLST	Inc-Gruppe	Referenz
<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	Deutschland	2009+2013	Mastitis	5	A(3), D(2)	ST10, ST117(2), ST540, ST5447	N, F(4)	Freitag <i>et al.</i> , 2017
		2014-2016	Mastitis	6	A(4), B1(2)	-	-	Eisenberger <i>et al.</i> , 2018
	Frankreich	2010+2011	Mastitis	2	A, B1	ST23, ST58	I1+N+FIB+F; I1+Y+FIB+F	Dahmen <i>et al.</i> , 2013
	England, Wales	-	Kolostrum, Mastitis	1	-	-	-	Randall <i>et al.</i> , 2014
	Dominikanische Republik	07/08-2014	Curryblätter	1	B1	ST155/CC155	-	Zurfluh <i>et al.</i> , 2015
	China	2015-2016	Mastitis	1	A	ST58	FIB+FIC+K/B	Ali <i>et al.</i> , 2017
	Ägypten	-	Mastitis	1	-	-	-	Ombarak <i>et al.</i> , 2019
	Serbien	2014	Mastitis	1	B1	-	I1	Todorović <i>et al.</i> , 2018
	Tunesien	01/2012-06/2013	Tomate	1	D	ST117	I1+FIB+F	Ben Said <i>et al.</i> , 2015
<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>	Deutschland	2012+2013	Mastitis	2	B1(2)	ST1431(2)	HI2+P(2)	Freitag <i>et al.</i> , 2017
		2013	Salat	1	A	ST120	FIA-FIB	Freitag <i>et al.</i> , 2018
		2015	Mastitis	1	A	-	-	Eisenberger <i>et al.</i> , 2018
	Japan	2010	Mastitis	1	-	ST88/CC23	-	Ohnishi <i>et al.</i> , 2013
<i>bla</i> <sub>CTX-M-3</sub>	China	2013-2017	Mastitis	1	-	-	-	Yang <i>et al.</i> , 2018
		2015-2016	Mastitis	1	A	N <sub>t</sub>	FIA+I1	Ali <i>et al.</i> , 2017
	Südtaiwan	-	Mastitis	5	-	-	-	Su <i>et al.</i> , 2016
<i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub>	Deutschland	2011	Salat	1	D	ST973	K	Freitag <i>et al.</i> , 2018
		2013	Mastitis	1	D	ST362	F	Freitag <i>et al.</i> , 2017
		2015	Mastitis	10	A(7), B1, D(2)	ST10(2), -(8)	-	Eisenberger <i>et al.</i> , 2018
	Niederlande	2011	Sojasprossen	1	B1	ST527	HI2	Freitag <i>et al.</i> , 2018
	Frankreich	2009,2010,2011	Mastitis	3	A, A, B1	ST10, ST23, ST58	FIA-FIB+F; FIB+F+B/O; I1+F	Dahmen <i>et al.</i> , 2013
	England, Wales	-	Kolostrum, Mastitis	1	-	-	-	Randall <i>et al.</i> , 2014
	Schweiz	04/2011	Mastitis	1	-	-	-	Geser <i>et al.</i> , 2012

Diskussion

ESBL-Gen	Land	Jahr	Herkunft	n	Phylo.-Gruppe	MLST	Inc-Gruppe	Referenz	
<i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub>	Dominikanische Republik	07/08-2014	Curryblätter	1	D	ST38/CC38	-	Zurfluh <i>et al.</i> , 2015	
	Indien	07/08-2014	Okra	1	D	ST38/CC38	-	Zurfluh <i>et al.</i> , 2015	
	Thailand	07/08-2014	Akazien Triebe	1	B1	ST58/CC155	-	Zurfluh <i>et al.</i> , 2015	
			Curryblätter	1	B1	ST4679	-	Zurfluh <i>et al.</i> , 2015	
			Spargelbohne	1	A	ST3696	-	Zurfluh <i>et al.</i> , 2015	
		2011	Betelpfeffer	2	-	-	HI1(2)	Veldman <i>et al.</i> , 2014	
	Südwest Asien	2011	Akazien Blätter	2	-	-	n <sub>t</sub>	Veldman <i>et al.</i> , 2014	
	China	2015-2016	Mastitis	4	A(4)	ST58, ST410, ST2521, ST3951	FIA+FIB+Frep+P; FIB+Frep; FIB+HI2; I1+Y	Ali <i>et al.</i> , 2017	
	Japan	2007	Mastitis	2	-	ST23/CC23(2)	-	Ohnishi <i>et al.</i> , 2013	
	Südtaiwan	-	Mastitis	1	-	-	-	Su <i>et al.</i> , 2016	
	Tunesien	01/2012-06/2013	Petersilie	1	A	ST10/CC10	FIB+F+K+B/O	Ben Said <i>et al.</i> , 2015	
	Südafrika	09/2017-05/2018	Spinat	8	-	-	-	-	Richter <i>et al.</i> , 2019
			Tomate	2	-	-	-	-	Richter <i>et al.</i> , 2019
			Grüne Bohnen	2	-	-	-	-	Richter <i>et al.</i> , 2019
	Südkorea	10/2012-02/2013	Sprossen	1	-	-	-	Kim <i>et al.</i> , 2015	
<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	Deutschland	2010+2011+2015	Mastitis	4	A(3), B2	ST10(2), ST361, ST1508	FIA+FIB; I1(3)	Freitag <i>et al.</i> , 2017	
		2012	Sprossenmischung	1	B1	ST847	n <sub>t</sub>	Freitag <i>et al.</i> , 2018	
		2015	Mastitis	4	A(4)	-	-	Eisenberger <i>et al.</i> , 2018	
	Niederlande	2011	Alfalfa Sprossen	1	B1	ST410/CC23	FIB	Freitag <i>et al.</i> , 2018	
	England	2010	Mastitis	1	A	ST88	B/O+FIB+I1+F	Timofte <i>et al.</i> , 2014	
	Wales	-	Kolostrum, Mastitis	2	-	-	-	Randall <i>et al.</i> , 2014	
	Italien	10/2015-08/2016	Eisbergsalat	1	-	-	-	FIA	Iseppi <i>et al.</i> , 2018
			Gemischter Salat	2	-	-	-	FIA(2)	Iseppi <i>et al.</i> , 2018
	Dominikanische Republik	07/08-2014	Bittergurke, Chili	1,1	B2, D	ST131, ST405/CC405	-	Zurfluh <i>et al.</i> , 2015	



Diskussion

ESBL-Gen	Land	Jahr	Herkunft	n	Phylo.-Gruppe	MLST	Inc-Gruppe	Referenz	
<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	Indien	07/08-2014	Curryblätter, Okra, Erbsen	3,4,1	A(2), B1(6)	ST155/CC155, ST410/CC23, ST443/CC205, ST641/CC86, ST1881, ST4681, ST4682, ST4684	-	Zurfluh <i>et al.</i> , 2015	
	China	2015-2016	Mastitis	29	A(20), B1, B2(2), D(6)	ST58, ST88(2), ST117(3), ST361(3), ST410, ST468, ST540, ST744(2), ST761, ST906, ST1080, ST1121(2), FIA+ Frep; ST1221, ST2008(3), FIB+ FII+ Frep+ I1+ K/B; ST2035, ST3044, FIB+ Frep(4); ST3476, ST4085, FIB+ Frep+ HI2; ST6482, N <sub>t</sub> , FIB+ Frep+ HI2+ N; FIB+ Frep+ K/B; FIB+ K/B, FIB+ N; Frep(2); Frep+ HI2+ P+ Y; Frep+ K/B(2); HI2+ K/B+ Y; I1+ Y(2); FIB+ Frep+ P	FIA; FIA+ FIB+ Frep+ H2; FIA+ FIB+ Frep+ K/B(3); FIA+ FIB+ Frep+ N+ K/B; FIA+ FIB+ HI2+ N; FIA+ FIB+ HI2+ K/B; FIA+ FIB+ K/B;	Ali <i>et al.</i> , 2017	
		2013-2017	Mastitis	48	-	-	-	-	Yang <i>et al.</i> , 2018
	Japan	2007-2010	Mastitis	10	-	ST10/CC10(2), ST58/CC155(2), ST101/CC101, ST648, ST1126, ST1284, ST1415, ST3499	-	Ohnishi <i>et al.</i> , 2013	
	Vietnam	2011	Tigergras	1	-	-	F	Veldman <i>et al.</i> , 2014	
	Tunesien	2015-2017	Mastitis	3	A(3)	ST 167, ST617 (2)	-	Saidini <i>et al.</i> , 2018	
	Südafrika	09/2017-05/2018	Spinat	1	-	-	-	Richter <i>et al.</i> , 2019	

Diskussion

ESBL-Gen	Land	Jahr	Herkunft	n	Phylo.-Gruppe	MLST	Inc-Gruppe	Referenz
<i>bla</i> <sub>CTX-M-32</sub>	Südafrika	09/2017-05/2018	Spinat	2	-	-	-	Richter <i>et al.</i> , 2019
	Deutschland	2015	Mastitis	1	A	-	-	Eisenberger <i>et al.</i> , 2018
<i>bla</i> <sub>CTX-M-55</sub>	Thailand	07/08-2014	Akazien Triebe	2	A, D	ST167/CC10, ST393/CC31	-	Zurfluh <i>et al.</i> , 2015
			Koriander	2	A, B1	ST48/CC10, ST4680	-	Zurfluh <i>et al.</i> , 2015
			Knoblauchzehe	1	A	ST226/CC226	-	Zurfluh <i>et al.</i> , 2015
<i>bla</i> <sub>CTX-M-64</sub>	China	2015-2016	Mastitis	4	A(2), B1, D	ST215, ST410(2), ST5746	FIB+FIC+Frep, FIB+Frep+H2, FIB+Frep+N(2)	Ali <i>et al.</i> , 2017
		2013-2017	Mastitis	7	-	-	-	Yang <i>et al.</i> , 2018
	Südkorea	10/2012-02/2013	Sprossen	3	-	-	-	Kim <i>et al.</i> , 2015
	Südafrika	09/2017-05/2018	Spinat	1	-	-	-	Richter <i>et al.</i> , 2019
			Tomate	1	-	-	-	Richter <i>et al.</i> , 2019
<i>bla</i> <sub>CTX-M-64</sub>	China	2013-2017	Mastitis	4	-	-	-	Yang <i>et al.</i> , 2018
<i>bla</i> <sub>CTX-M-65</sub>	Niederlande	2011	Sojasprossen	1	A	ST10/CC10	N	Freitag <i>et al.</i> , 2018
	Dominikanische Republik	07/08-2014	Kleine Chilli	1	A	ST167/CC10	-	Zurfluh <i>et al.</i> , 2015
	Vietnam	07/08-2014	Basilikum	1	B1	ST4683	-	Zurfluh <i>et al.</i> , 2015
			Indisches Basilikum	1	B1	ST58/CC155	-	Zurfluh <i>et al.</i> , 2015
<i>bla</i> <sub>CTX-M-125</sub>	China	2013-2017	Mastitis	3	-	-	-	Yang <i>et al.</i> , 2018
<i>bla</i> <sub>CTX-M-125</sub>	Niederlande	2011	Sojasprossen	1	A	ST542	N	Freitag <i>et al.</i> , 2018

n: Anzahl, Phylo.-gruppe: Phylogenetische Gruppe, ST: Sequenz-Typ, CC: Klonaler Komplex, n<sub>t</sub>: nicht-typisierbar, -: keine Angaben verfügbar

### 6.3 Molekulare Charakterisierung ESBL-bildender *E. coli*-Isolate

Bei den zwölf ESBL-bildenden *E. coli*-Isolaten der Mastitis-Milchproben dominierte die **phylogentische Gruppe A** (n = 6; 50,0 %), gefolgt von D (n = 3; 25,0 %), B1 (n = 2; 16,7 %) und B2 (n = 1, 8,3 %). Der überwiegende Nachweis der Gruppen A und D bei den Mastitis-Milchproben stützt die Beobachtung von Michael *et al.* (2017), Schink *et al.* (2013) und Valat *et al.* (2012), dass diese Gruppen bei erkrankten Nutztieren in Deutschland am häufigsten nachgewiesen werden. Auch bei den sieben ESBL-bildenden *E. coli*-Isolaten von Salaten und Sprossen war ebenfalls am häufigsten die Gruppe A (n = 4; 57,1 %) vertreten, gefolgt von B1 (n = 2; 28,6 %) und D (n = 1; 14,3 %) während Isolate der Gruppe B2 nicht nachgewiesen wurden. Auch bei den anderen Studien, die die phylogenetischen Gruppen bestimmten, konnte gezeigt werden, dass die Vertreter der Gruppe A am häufigsten zu finden waren und Vertreter der Gruppe B2 selten vorkommen (Ali *et al.*, 2017; Ben Said *et al.*, 2015; Dahmen *et al.*, 2013; Eisenberger *et al.*, 2018; Saidini *et al.*, 2018; Timofte *et al.*, 2014; Todorović *et al.*, 2018; Zurfluh *et al.*, 2015).

Die insgesamt 19 ESBL-bildenden *E. coli*-Isolate aus den Publikationen 1 und 2 konnten einer Vielzahl unterschiedlicher **MLST**-Typen zugeordnet werden. Bei den Isolaten aus den Mastitis-Milchproben (Publikation 1) wurden folgende MLST-Typen nachgewiesen: ST10 (n = 3), ST117 (n = 2), ST361 (n = 1), ST362 (n = 1), ST540 (n = 1), ST1431 (n = 2), ST1508 (n = 1) und ST5447 (n = 1). Bei den Isolaten von Salaten und Sprossen (Publikation 2) wurden die MLST-Typen ST10 (n = 1), ST120 (n = 1), ST410 (n = 1), ST527 (n = 1), ST542 (n = 1), ST847 (n = 1) und ST973 (n = 1) identifiziert. Somit wurde lediglich ST10 bei mehreren Isolaten von Mastitis-Milchproben und Sprossenproben nachgewiesen. In den anderen Studien, die MLST-Typen bestimmt haben, wurde ebenfalls eine große Verteilung festgestellt. Insgesamt konnten in mehreren Studien, auch über Kontinente hinweg, einzelne STs häufiger (n > 3) bestimmt werden.

Bei den Mastitis-Milch-Studien von Ali *et al.* (2017) [1], Dahmen *et al.* (2013) [2], Eisenberger *et al.* (2018) [3], Saidini *et al.* (2018) [4] und Timofte *et al.* (2014) [5] wurden folgende STs häufiger (n > 3) nachgewiesen: ST10 (n = 1 [2], n = 2 [3]), ST58 (n = 2 [2]; n = 3 [1]), ST88 (n = 1 [5], n = 2 [1]), ST117 (n = 3 [1]), ST167 (n = 1 [4], n = 1 [3]), ST410 (n = 4 [1], n = 1 [3]), ST471 (n = 4 [4]), ST617 (n = 2 [4]), ST744 (n = 2 [1], n = 1 [3]), ST2008 (n = 3 [1]) und ST4085 (n = 4 [1]). Hierbei ist zu vermerken, dass Eisenberger *et al.* (2018) nur bei *bla*<sub>CTX-M-14</sub>-tragenden Isolaten der phylogenetischen Gruppe A den MLST-Typen bestimmt haben.

Bei den Studien an Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft von Ben Said *et al.* (2015) [6] und Zurfluh *et al.* (2015) [7] konnten ST10 (n = 1 [6]), ST117 (n = 1 [6]), ST410 (n = 1 [7]) nachgewiesen werden, welche auch bei den ESBL-bildenden *E. coli*-Isolaten aus den Mastitis-Milchproben (Gesamtheit aller oben erwähnten Studien: ST10 = 8, ST117 = 6, ST410 = 7)

beschrieben wurden. ST131 und ST678 (ST des EHEC O104:[H4]-Stammes aus dem Ausbruch 2011) wurden in keiner Studie nachgewiesen. Die STs ST38, ST393 und ST405, welche an der Verbreitung von *bla*<sub>CTX-M</sub>-Genen beteiligt sind (Cantón *et al.*, 2012), wurden ebenfalls nicht nachgewiesen. ST117 konnte bei Mastitis-Milchproben in Publikation 1 nachgewiesen werden und bei einer anderen Studie (Ben Said *et al.*, 2015) auch bei Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft. Eine Transmission über die Lebensmittelkette lässt sich somit – wie schon von Leverstein-van Hall *et al.* (2011) postuliert – nicht ausschließen. Dieses Postulat kann auch für Isolate des ST410 aufgestellt werden, welche in Deutschland bei *E. coli* von Menschen und Tieren (Falgenhauer *et al.*, 2016; Fischer *et al.*, 2014), bei *E. coli* aus Mastitis-Milchproben in China (Ali *et al.*, 2017), von Curryblättern aus Indien (Zurfluh *et al.*, 2015) und in Publikation 2 bei Alfalfa-Sprossen aus den Niederlanden nachgewiesen wurde.

Die **Makrorestriktionsanalyse** ermöglichte bei den zwölf ESBL-bildenden *E. coli*-Isolaten aus Mastitis-Milchproben eine Differenzierung von zehn Hauptmustern in der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE). Zwei Isolate zeigten nicht unterscheidbare Muster (Publikation 1, Abb. 5, XbaI Muster 10) und den gleichen Sequenztyp (ST10), wurden aber von Tieren verschiedener Herden isoliert. Zwei weitere Proben, beide ST1431 und ebenfalls von verschiedenen Herden, zeigten sehr ähnliche Muster (Publikation 1, Abb. 5, XbaI Muster 6a und 6b). Durch den Nachweis unterschiedlicher *E. coli*-Isolate von Tieren der gleichen Herden (15-1 und 680-1/-2 sowie 776-1 und 444-1) kann man darauf schließen, dass in der gleichen Herde unterschiedliche ESBL-bildende *E. coli*-Isolate für Mastitiden verantwortlich sind. Aus einer Milchprobe konnten zwei Isolate gewonnen werden, welche der gleichen phylogenetischen Gruppe angehörten und das gleiche Plasmid enthielten, aber unterschiedliche MLST-Typen aufwiesen und auch in der Makrorestriktionsanalyse unterschiedliche Muster zeigten (Publikation 1, Abb. 5, XbaI Muster 3 und 4). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass Plasmide *in vivo* ausgetauscht werden. Zwei weitere Studien haben eine Makrorestriktionsanalyse ihrer ESBL-bildenden *E. coli*-Isolate von Mastitiden durchgeführt. Bei beiden wurden ausschließlich unterschiedliche Muster nachgewiesen (Dahmen *et al.*, 2013; Todorović *et al.*, 2018).

Die ESBL-bildenden *E. coli*-Isolate der Sprossen und Salate wiesen allesamt verschiedene Makrorestriktionsmuster und verschiedene Sequenztypen auf, sogar die beiden Isolate, die von der gleichen Probe stammten (Publikation 2, Abb. 1, Tabelle 2, Isolate 1978-1 und 1978-4). Auch in einer anderen Studie, die von den aufgeführten als einzige bei ESBL-bildenden *E. coli*-Isolaten von Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft ebenfalls eine Makrorestriktionsanalyse durchgeführt hat, wurden für alle *E. coli*-Isolate verschiedene Muster nachgewiesen (Veldman *et al.*, 2014).

#### 6.4 Charakterisierung der ESBL-Gen-tragenden Plasmide

Alle in den Publikationen 1 und 2 nachgewiesenen ESBL-Gene befanden sich auf Plasmiden unterschiedlicher Größe (35 bis 245 kb). Bis auf das *bla*<sub>CTX-M-2</sub>-tragende Plasmid eines Isolates von einer Salatmischung waren alle Plasmide mit unterschiedlichen Effizienzen konjugierbar ( $1,24 \times 10^{-1}$  bis  $6,8 \times 10^{-7}$ ). Die **Replikon-Typisierung** erbrachte bei den Plasmiden der Isolate aus den Mastitis-Milchproben die Inkompatibilitätsgruppen IncF (n = 5), IncFIA + IncFIB (n = 1), IncI1 (n = 3), IncHI2 + P (n = 2) oder IncN (n = 1). Bei den Plasmiden der Isolate von den Salaten und Sprossen konnte bei einem Isolat keine Inkompatibilitätsgruppe bestimmt werden, während bei den anderen IncFIA-FIB (n = 1), IncFIB (n = 1), IncHI2 (n = 1), IncK (n = 1) oder IncN (n = 2) nachgewiesen wurden. Bei den Plasmiden der Isolate von Salaten und Sprossen wurde keine dominierende Gruppe nachgewiesen, wohingegen IncF und IncI1 bei den Plasmiden der Isolate aus den Mastitis-Milchproben am häufigsten zu finden waren.

Auch in der Studie von Ali *et al.* (2017) wurde als häufigste Inkompatibilitätsgruppe IncF nachgewiesen und eine Konjugation wurde hier nur bei ausgesuchten Plasmiden durchgeführt, wobei sich alle getesteten ESBL-Gen-tragenden Plasmide als konjugativ erwiesen. Bei Timofte *et al.* (2014) wurden mehrere Inkompatibilitätsgruppen (IncF, IncB/O, IncFIB, IncI) bei den entsprechenden Plasmiden nachgewiesen. Hier waren nur die IncI Plasmide konjugierbar. In der Studie von Dahmen *et al.* (2013) zeigte sich, dass die ESBL-Gene *bla*<sub>CTX-M-1</sub> auf IncI1 Plasmiden und *bla*<sub>CTX-M-14</sub> auf IncF Plasmiden lokalisiert waren. Eine entsprechende Korrelation zwischen den unterschiedlichen *bla*<sub>CTX-M</sub>-Genen und den Inkompatibilitätsgruppen der jeweiligen Plasmide konnte in den Publikationen 1 und 2 nicht beobachtet werden. Auch bei den anderen Studien ist diese Korrelation nicht beschrieben. Eher war zu beobachten, dass keines der nachgewiesenen ESBL-Gene einem Plasmid einer bestimmten Inkompatibilitätsgruppe zugeordnet werden konnte (Ali *et al.*, 2017; Timofte *et al.*, 2014).

Ben Said *et al.* (2015) konnten auch bei den Plasmiden der ESBL-bildenden *E. coli*-Isolate von pflanzlichen Lebensmitteln IncI1, IncFIB und IncF als häufigste Inkompatibilitätsgruppen ermitteln. Entsprechende Untersuchungen von Veldman *et al.* (2014) wiesen IncF und IncHI1 nach, während bei Iseppi *et al.* (2018) alle Plasmide den Gruppen IncI1 und IncFIA zugeordnet werden konnten.

Diese Verteilung der Inkompatibilitätsgruppen in den verschiedenen Studien stützt die Vermutung, dass Plasmide der IncI1-Gruppe ein Reservoir bei *E. coli* in der Lebensmittelkette besitzen (Carattoli, 2013).

Dass *bla*<sub>CTX-M-1</sub>- und *bla*<sub>CTX-M-15</sub>-Gene bei *E. coli* vorwiegend auf IncN-Plasmiden beschrieben werden (Carattoli, 2013), konnte in den Publikationen 1 und 2 nicht bestätigt werden. Die nachgewiesenen IncN-Plasmide beherbergten *bla*<sub>CTX-M-9</sub>-Gene. IncN- und IncI1-

Plasmide zeigten eine gute Effizienz bei der Konjugation ( $1,17 \times 10^{-2}$  bis  $5,5 \times 10^{-4}$ ), so dass dieser vermehrte Nachweis tatsächlich der hohen Fähigkeit zur Konjugation geschuldet sein kann (Carattoli, 2013). Dies unterstützt der Nachweis von IncK, welches in der Natur selten vorkommt (Carattoli, 2013) und nur eine niedrige Konjugationsrate von  $1,80 \times 10^{-6}$  aufwies. Der Nachweis von IncI1 und die Konjugierbarkeit der meisten Plasmide lassen darauf schließen, dass diese eine Rolle bei der Verbreitung von ESBL-Genen, vor allem auch auf *E. coli*-Isolate humanen Ursprungs, spielen können.

## 6.5 Co-lokalisierte Resistenzgene ESBL-Gen-tragender Plasmide

Verfügen ESBL-Gen-tragende Plasmide über zusätzliche Resistenzgene, so werden diese beim Transfer des ESBL-Gen-tragenden Plasmids ebenfalls auf neue Bakterien übertragen. Des Weiteren werden diese zusätzlichen Resistenzgene unter dem Selektionsdruck, der durch die Anwendung von Penicillinen und Cephalosporinen entsteht, co-selektiert und entsprechende Resistenzgene persistieren, ohne dass ein direkter Selektionsdruck durch die Anwendung der jeweiligen antimikrobiellen Wirkstoffe vorhanden sein muss. Gleiches gilt im Umkehrschluss für die ESBL-Gene. So kann ein ESBL-Gen auf einem Multiresistenz-Plasmid, das bspw. über ein Tetracyclin-Resistenzgen oder ein Sulfonamid-Resistenzgen verfügt, unter dem Selektionsdruck, der durch die Anwendung von Tetracyclinen oder Sulfonamiden entsteht, co-selektiert werden und persistieren, selbst wenn keine Penicilline oder Cephalosporine angewendet werden.

Von den zwölf ESBL-bildenden *E. coli*-Isolaten aus Mastitis-Milchproben zeigten neun Isolate einen Multiresistenz-Phänotyp. Lediglich drei Isolate waren ausschließlich gegenüber Penicillinen und Cephalosporinen resistent. Die Analyse der entsprechenden ESBL-Gen-tragenden Plasmide ergab, dass bei vier Plasmiden lediglich das ESBL-Gen vorhanden war, während bei fünf Plasmiden neben dem ESBL-Gen noch ein weiteres Resistenzgen, das Chloramphenicol/Florfenicol Resistenzgen *floR* ( $n = 1$ ), das Sulfonamid-Resistenzgen *sul1* ( $n = 1$ ) oder das  $\beta$ -Laktamase-Gen *bla*<sub>TEM-1</sub> ( $n = 3$ ) zu finden war. Die verbleibenden drei Plasmide erwiesen sich als Multiresistenz-Plasmide. Die bei diesen Plasmiden co-lokaliserten Resistenzgene vermittelten Resistenz gegenüber Sulfonamiden [*sul1*, *sul2*], Tetracyclinen [*tet(A)*], Trimethoprim [*dfrA1*, *dfrA12*], Streptomycin/Spectinomycin [*aadA1*, *aadA2*] und reduzierte Empfindlichkeit gegenüber Kanamycin und Ciprofloxacin [*aac(6')-Ib-cr*]. Einige dieser Resistenzgene sind Bestandteile von Genkassetten in Klasse 1 Integrons mit den Arrays *dfrA12-orfF-aadA2* ( $n = 1$ ) und *dfrA1-aadA1* ( $n = 2$ ) (Publikation 1, Tabelle 1).

Die Expression der *aadA* Genkassetten wurde anhand der beobachteten Empfindlichkeit gegenüber Streptomycin (bei den Transkonjuganden) und Spectinomycin (bei den Elektrotransformanden) überprüft. Die Empfindlichkeit gegenüber Streptomycin wurde nicht

bei den Elektrotransformanden, sondern bei den Transkonjuganden getestet, da der Empfängerstamm für die Elektrotransformationsexperimente *E. coli* TOP10 war, welcher gegenüber Streptomycin resistent ist. Der Empfängerstamm für die Konjugationsexperimente, *E. coli* J53, besitzt diese Resistenz nicht. Die Transkonjuganden waren empfindlich gegenüber Streptomycin, so dass die vorhandenen *aadA1* und *aadA2* Genkassetten offenbar funktionell inaktiv waren. Solche "stillen" Gene wurden schon beschrieben. Eine niedrige bis fehlende Expression lässt sich mit der Situation in verschiedenen Wirtsbakterien, niedrigen Kopienzahlen der Plasmide, der Stärke des Integron-Promoters und der Position der Genkassette im Integron erklären (Sunde und Norström, 2005). Ein weiterer Grund für die ursprüngliche Resistenz gegenüber Streptomycin mancher Isolate, aber nicht ihrer Transkonjuganden, kann an zusätzlichen Streptomycin-Resistenzgenen, wie *strA-strB*, liegen, die chromosomal oder auf anderen Plasmiden lokalisiert sind. Die Gene *strA-strB* wurden in elf der zwölf Isolate nachgewiesen (nicht bei dem Isolat 904-15) und vermitteln höhere Resistenzniveaus gegenüber Streptomycin als die Genkassetten-assoziierten *aadA*-Gene (Sunde und Norström, 2005).

Alle ESBL-bildenden *E. coli*-Isolate von Salaten und Sprossen waren multiresistent (Publikation 2, Tabelle 1). Neben den ESBL-Genen wurden auf den entsprechenden Plasmiden Gene, die (i) Resistenzen gegenüber Chloramphenicol/Florfenicol [*floR*], Fosfomycin [*fosA3*], Gentamicin [*aac(3)-IVa*], Kanamycin [*aph(3')-IIa*, *aac(6')-Ib3*], Streptomycin [*strA*, *strB*], Sulfonamiden [*sul1*, *sul2*], Tetracyclinen [*tet(A)*] und Trimethoprim [*dhfrA14*] oder (ii) reduzierte Empfindlichkeit gegenüber (Fluor)Chinolonen [*aac(6')-Ib-cr*, *qnrS1*] vermitteln, nachgewiesen. Bei den Isolaten der Salate und Sprossen zeigten sich somit Resistenzen gegenüber einer größeren Anzahl an Wirkstoffklassen als bei den Mastitis-Milchisolaten. Auch beherbergte eine weitaus höhere Prozentzahl der ESBL-bildenden *E. coli*-Isolate von Salaten und Sprossen Multiresistenz-Plasmide (85 %; 6 von 7). Lediglich ein Isolat wies keine weiteren Resistenzgene auf dem *bla*<sub>CTX-M-14</sub>-tragenden IncK Plasmid (Publikation 2, Tabelle 2) auf. Auch bei den Isolaten der Salate und Sprossen wurden Integrons der Klasse 1 nachgewiesen, zwei *bla*<sub>CTX-M-2</sub>- und *bla*<sub>CTX-M-14</sub>-tragende Plasmide beherbergten ein Klasse 1 Integron, welches aus dem Integrase-Gen *int11* im 5'-konservierten Bereich, dem *sul1*-Gen im 3'-konservierten Bereich und einem variablen Teil bestand, welcher die Genkassetten *dhfrA17* und *aadA5* trug. Dies war auch der am häufigsten in einer anderen Studie nachgewiesene Genkassetten-Array bei Klasse 1 Integrons, welcher Resistenz gegenüber Trimethoprim und Streptomycin/Spectinomycin vermittelte (Wu *et al.*, 2015). Das *int11*-Gen wurde bei zwei weiteren Plasmiden gefunden. Die Tatsache, dass weder das *sul1*-Gen, noch der variable Teil des Klasse 1 Integrons mittels PCR nachgewiesen werden konnten, deutet darauf hin, dass diese Klasse 1 Integrons inkomplett sind. Bei einem Isolat konnte zusätzlich ein Klasse 1 Integron nachgewiesen werden, welches *dhfrA1-aadA1*-Genkassetten trug. Dieses Klasse 1

Integron war nicht auf dem ESBL-Gen-tragenden Plasmid lokalisiert, da es bei dem Elektrotransformanden nicht nachweisbar war.

Bei einem Isolat von Soja-Sprossen wurde das Kanamycin-Resistenzgen *aph(3')-IIa* nachgewiesen. Bisher wurde dieses Resistenzgen nur selten bei Umweltproben und Proben tierischer oder menschlicher Herkunft nachgewiesen, aber bisher noch nicht bei frischem Gemüse (ausgenommen ist hier genetisch modifiziertes Gemüse, da *aph(3')-IIa* bei diesem als Selektivmarker genutzt wird). Ein Grund dafür könnte sein, dass es bei nicht-kultivierbaren Bakterien vorkommt (Smalla *et al.*, 1993), s. Kapitel 4.6.5.2. Allerdings wurde es in dieser Studie auf einem Multiresistenz-Plasmid von *E. coli* nachgewiesen. Auf einem anderen Isolat der gleichen Probe konnte ein anderes Kanamycin-Resistenzgen, *aac(6')-Ib3*, nachgewiesen werden. Dieser Nachweis ist nicht ungewöhnlich, da dieses Gen bei *E. coli* und anderen Vertretern der Familie *Enterobacteriaceae* häufig vorkommt (Shaw *et al.*, 1993).

Nahezu zwei Drittel der in den Publikationen 1 und 2 beschriebenen ESBL-bildenden *E. coli*-Isolate (65 %) wiesen co-lokalisierte Resistenzen auf. Zum Teil waren diese auf den gleichen Plasmiden wie die ESBL-Gene zu finden, zum Teil aber auch chromosomal verankert. Diese Beobachtungen konnten auch in anderen Studien bestätigt werden. So fanden Zurfluh *et al.* (2015) bei 78 % der *Enterobacteriaceae*-Isolate aus Gemüse einen multiresistenten Phänotyp. Allerdings wurde in dieser Studie die Lokalisation der co-lokaliserten Resistenzen nicht weiter untersucht, sondern Empfindlichkeitsprüfungen der entsprechenden Isolate durchgeführt. Diese ergaben das Vorliegen von Resistenzen gegenüber Nalidixinsäure, Ciprofloxacin, Gentamicin, Kanamycin, Streptomycin, Trimethoprim, Tetracyclin und/oder Chloramphenicol. Veldman *et al.* (2014) haben nur PMQR-Gene auf den Plasmiden bestimmt, die sie von *Enterobacteriaceae*-Isolaten aus frischen Küchenkräutern gewonnen hatten. Sie konnten bei vorliegender Chinolonresistenz hauptsächlich das Gen *qnrS1* nachweisen. Dieses befand sich auf einem IncHI1-Plasmid. Bei den beiden Isolaten von Sprossen in der Publikation 2 war dieses Resistenzgen auf einem FIB-Plasmid bzw. einem Plasmid unbekannter Inc-Gruppe nachweisbar. Mastitis-Milchproben wurden auch schon auf das *qnrS1*-Gen untersucht, es konnte aber bei keinem ESBL-bildenden *E. coli*-Isolat als co-lokalisiertes Resistenzgen auf dem ESBL-Gen tragenden Plasmid nachgewiesen werden (Timofte *et al.*, 2014). Weiterhin wurden in einer Studie in Tunesien ESBL-Gen-tragende Plasmide von *E. coli*-Isolaten von Tomaten und Petersilie hinsichtlich co-lokalisierter Resistenzgene untersucht (Ben Said *et al.*, 2015). Das Petersilie-Isolat zeigte keine weiteren Resistenzgene, während bei dem *E. coli*-Isolat von einer Tomate co-lokalisierte Resistenzgene gegenüber Sulfonamiden [*sul2*] und Tetracyclinen [*tet(A)*] sowie ein Klasse 1 Integrase-Gen [*intl1*] nachgewiesen wurden. Die Resistenzgene *sul2* und *tet(A)* wurden ebenfalls als co-lokalisierte Resistenzgene bei je vier ESBL-Gen-tragenden Plasmiden von *E. coli*-Isolaten von Sprossen/Salaten der Publikation 2, aber auch bei je zwei der zwölf



Isolate aus den Mastitis-Milchproben in Publikation 1 nachgewiesen. Bei der Studie über ESBL-Bildner bei Mastitiden von Eisenberger *et al.* (2018) wurde das Resistenzgen *aac(6′)-Ib-cr* als co-lokalisiertes Resistenzgen auf zwei von den vier *bla*<sub>CTX-M-15</sub>-tragenden Plasmiden nachgewiesen. Auch wenn die Plasmid-vermittelte Chinolon-Resistenz häufiger in der Korrelation mit *bla*<sub>CTX-M-15</sub> und IncFII Plasmiden beschreiben wurde (Strahilevitz *et al.*, 2009), konnte dies bei Mastitis-Milchisolaten nur bei Eisenberger *et al.* (2018) beobachtet werden, Replikontypen wurden in dieser Studie aber nicht bestimmt. Bei *E. coli*-Isolaten aus pflanzlichen Lebensmitteln wurde dieses Gen nicht beschrieben, aber Ben Said *et al.* (2015) konnten bei einem *E. coli*-Isolat aus Erde ein *bla*<sub>CTX-M-15</sub>-tragendes Multireplikon-(Incl1, IncFIA, IncFIB, IncF und IncY) Plasmid nachweisen.

Im Gegensatz dazu haben Todorović *et al.* (2018) bei dem einen nachgewiesenen *E. coli*-Isolat von Mastitis-Milchproben keine weiteren Resistenzgene nachgewiesen. Zwei weitere Studien haben entweder keine weiteren Resistenzgene der ESBL-Plasmid-tragenden Transformanden oder Transkonjuganden bestimmt, sondern nur die Empfindlichkeitsphänotypen (Dahmen *et al.*, 2013) oder nur die Resistenzgene der *E. coli*-Isolate, aber nicht die der Plasmide (Saidini *et al.*, 2018).

Auch wenn es nur vergleichsweise wenige Studien mit der Angabe der co-lokalierten Resistenzgene gibt, so deuten die Ergebnisse aber darauf hin, dass viele unterschiedliche Resistenzgene auf ESBL-Gen-tragenden Plasmiden zu finden sein können. Wenn diese *E. coli*-Isolate als Kontaminanten bei Lebensmitteln auftreten, besteht die Möglichkeit zur Aufnahme von Multiresistenzen über die Lebensmittelkette (Reuland *et al.*, 2014).

Bei den Mastitis-Milchisolaten der Publikation 1 trugen die größeren Plasmide (170-225 kb) der Inkompatibilitätsgruppen IncHI2/IncP und IncFIA/IncFIB, eine höhere Anzahl an co-lokalierten Resistenzgenen und Klasse 1 Integrons. Sie zeigten dazu eine verminderte Konjugationsrate im Vergleich zu den kleineren Plasmiden der Inkompatibilitätsgruppen IncF, Incl1 und IncN. Auch wenn die Anzahl der untersuchten Plasmide sehr gering ist, scheint hier eine Korrelation zwischen Größe der Plasmide, der Anzahl der co-lokalierten Resistenzgene und der Konjugationsrate der Plasmide zu bestehen.

Bei den Plasmiden der Isolate von Salaten und Sprossen der Publikation 2 konnte dies nicht bestätigt werden. Ein schlecht konjugierbares IncK Plasmid ( $1,8 \times 10^{-6}$ ) war vergleichsweise kleiner (90 kb) und enthielt keine co-lokalierten Resistenzgene. Ein weiteres, vergleichsweise kleines Plasmid von 80 kb trug neun Resistenzgene, der Replikontyp war nicht bestimmbar. Ein anderes IncHI2 Plasmid war deutlich größer (245 kb), besaß ebenfalls neun Resistenzgene und war gut konjugierbar ( $7,09 \times 10^{-2}$ ). Die Effizienz des konjugativen Transfers scheint daher eher von der Art des Replikons, respektive der Inkompatibilitätsgruppe, abhängig zu sein, da IncN und Incl1 Plasmide eine gute Effizienz bei der Konjugation ( $1,17 \times 10^{-2}$  bis  $5,5 \times 10^{-4}$ ) aufwiesen und vermehrt in der Natur vorkommen,

wohingegen IncK-Plasmide schlechter konjugierbar sind und seltener in der Natur vorkommen (s. Kapitel 4.5 und Carattoli, 2013). So wurde auch die Verbreitung des ESBL-Gens *bla*<sub>CTX-M-65</sub> in der bolivischen Chaco Region einem bestimmten IncI1-Plasmid mit hoher Konjugationsrate zugeordnet (Riccobono *et al.*, 2015).

## 6.6 Genetisches Umfeld ausgewählter Plasmide

Das Plasmid pCTX48 eines *E. coli*-Isolates aus einer Sprossen-Probe wurde auf Grund des Nachweises der Resistenzgene *aph(3')-IIa*, *fosA3* und *bla*<sub>CTX-M-125</sub> und der seltenen Beschreibung dieses ESBL-Gens teilweise sequenziert. Auch das Plasmid pCTX64 wurde als Vertreter der häufig vorkommenden *bla*<sub>CTX-M-15</sub>-tragenden Plasmide sequenziert. Bei beiden Plasmiden konnte gezeigt werden, dass die ESBL-Gene in naher Umgebung zu den weiteren Resistenzgenen liegen.

Die genetische Umgebung des Gens *bla*<sub>CTX-M-125</sub> bei dem Plasmid pCTX48 stellte sich folgendermaßen dar:  $\Delta ISEcp1$ -*bla*<sub>CTX-M-125</sub>- $\Delta IS903B$ -*fosA3*-*orf1*- $\Delta orf2$ . Diese gesamte Region wurde von IS26 Elementen, die in gegenläufiger Orientierung vorlagen, flankiert. Die Verbindung von *fosA3*-Genen mit IS26 Flankierung ist bereits häufig beschrieben worden (Riccobono, 2015) und IS26 wurde als wichtiges Element für die Verbreitung von *fosA3*-Genen bereits identifiziert (Ho *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2017a). Das sequenzierte Fragment zeigte zu 99 % Nukleinsäuresequenz-Übereinstimmung zu anderen Plasmiden, wie pSE380T (Datenbankzugangsnr. KY401053.1) oder pN0863T (Datenbankzugangsnr. JQ823170.2), welche statt dem Gen *bla*<sub>CTX-M-125</sub> ein *bla*<sub>CTX-M-14</sub>-Gen trugen und in China von einem *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Enteritidis-Isolat vom Menschen (pSE380T) bzw. von einem *E. coli*-Isolat eines Hundes (pN0863T) isoliert wurden. Drei der sieben Plasmide der Isolate (43 %) von Salaten und Sprossen wiesen ein *fosA3*-Gen auf. Der Nachweis in Europa (bisher zwei Nachweise (Villa *et al.*, 2015; Lupo *et al.*, 2018)) und auf Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft (bisher kein Nachweis) ist allerdings ungewöhnlich. Auch die Co-Lokalisation mit *bla*<sub>CTX-M-125</sub> wurde noch nicht beschrieben. Die Kombination von *fosA3* mit anderen ESBL-Genen, wie *bla*<sub>CTX-M-55</sub>, *bla*<sub>CTX-M-65</sub> und *bla*<sub>CTX-M-14</sub> bei *Enterobacteriaceae* aus verschiedenen Herkünften ist allerdings aus Asien bekannt (Ho *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2017a; Yang *et al.*, 2014).

Bei dem *bla*<sub>CTX-M-15</sub>-tragenden Plasmid pCTX64 konnten in einer Multiresistenz-Region sechs Antibiotika-Resistenzgene identifiziert werden. Diese umfassten die Gene *sul2*, *strA*, *strB*, *bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub> und *qnrS1*. Die beste Übereinstimmung (99 % Nukleinsäuresequenz-Übereinstimmung) ergab sich im Vergleich mit dem Plasmid pPGRT46 (Datenbankzugangsnr. KM023153). Bei letzterem Plasmid war lediglich eine ISCro1-ähnliche Insertionssequenz aus der IS66 Familie zwischen  $\Delta Tn5393$  und  $\Delta Tn2$  integriert. Dieses Plasmid stammte von einem

nicht-klinischen *E. coli*-Isolat, isoliert aus der Stuhlprobe einer gesunden schwangeren Frau in Nigeria (Fortini *et al.*, 2015). Die direkte genetische Umgebung des ESBL-Gens von Plasmid pCTX64 zeigte sich wie folgt: *ISEcp1-bla<sub>CTX-M-15</sub>-orf477* mit vor- und nachgeschalteten direkten Sequenzwiederholungen (direct repeats, DR) durch die von *ISEcp1* vermittelte Transposition.

Die genetische Umgebung der untersuchten Plasmide zeigte somit den für *bla<sub>CTX-M</sub>*-Gene typischen Genabschnitt, bei welchem komplette oder partielle Insertionssequenzen wie *ISEcp1* vorgeschaltet oder *IS903* nachgeschaltet sind (Zhao und Hu, 2013).

Bei den ESBL-bildenden *E. coli*-Isolaten von Tomate und Petersilie wurde ebenfalls die genetische Umgebung der *bla<sub>CTX-M</sub>*-Gene untersucht und bei allen war ebenfalls *ISEcp1* vorgeschaltet (Ben Said *et al.*, 2015). Nachgeschaltet waren bei dem Plasmid des *E. coli*-Isolat von der Tomate ein *orf477* und bei dem der Petersilie ein *IS903*-Element: *ISEcp1-bla<sub>CTX-M-1</sub>-orf477* und *ISEcp1-bla<sub>CTX-M-14a</sub>-IS903*. Auch bei den Plasmiden der *E. coli*-Isolate von Sprossen in Südkorea wiesen Kim und Mitarbeiter (2015) bei allen *bla<sub>CTX-M</sub>*-Genen ähnliche flankierende Regionen nach: *ISEcp1-bla<sub>CTX-M-55</sub>-orf477* und *ISEcp1-bla<sub>CTX-M-14</sub>-IS903*. Bei einem Mastitis-Milch *E. coli*-Isolat wurde lediglich die dem *bla<sub>CTX-M-15</sub>*-Gen vorgeschaltete genetische Umgebung untersucht: *IS26-ISEcp1-bla<sub>CTX-M-15</sub>* (Timofte *et al.*, 2014). Da die genetische Umgebung der *bla<sub>CTX-M</sub>*-Gene oft die Insertionssequenzen *ISEcp1* und *IS903* zeigt (Eckert *et al.*, 2006), ist diese Häufung nicht verwunderlich. Man kann aber eine Korrelation der nachgeschalteten Sequenzen zu bestimmten CTX-M Gruppen erkennen. Bei ESBL-Genen der CTX-M-1-Gruppe findet sich häufig der *orf477* im Bereich nach dem ESBL-Gen (möglicherweise durch die Mobilisierung von *ISEcp1* zusammen mit *bla<sub>CTX-M</sub>* aus einem *Kluyvera* spp.-Genom), während bei ESBL-Genen der CTX-M-9-Gruppe häufig eine Insertionssequenz vom Typ *IS903* zu finden ist.

## 7 Zusammenfassung

Antibiotikaresistente Bakterien wurden in den letzten Jahren immer häufiger in verschiedenen Reservoiren beschrieben. Dabei sind Produzenten von  $\beta$ -Laktamasen mit erweitertem Substratspektrum (sogenannte ESBLs) von großer Bedeutung. *Escherichia coli* spielt nicht nur als Darmbewohner bei Menschen und Tieren, sondern auch als Erreger intestinaler und extraintestinaler Erkrankungen, aber auch als Lebensmittelkontaminant eine wichtige Rolle. Ziel dieser Dissertation war es, (i) Informationen zum Vorkommen ESBL-bildender *E. coli* aus Milch- und Mastitis-Milchproben von Rindern, aber auch von Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft zu erarbeiten und eine vergleichende molekulare Charakterisierung der entsprechenden Isolate durchzuführen, (ii) Informationen zur phänotypischen und genotypischen antimikrobiellen Resistenz dieser *E. coli*-Isolate zu erarbeiten und (iii) molekulare Untersuchungen zum Vorkommen und zur Übertragbarkeit von ESBL-Genen durchzuführen und Informationen zu ESBL-tragenden Plasmiden inklusive anderer auf diesen Plasmiden co-lokalisierten Resistenzgenen zu gewinnen.

Dazu wurden von 2009 bis 2013 insgesamt 21548 Rinder aus 1070 verschiedenen Milchviehbetrieben beprobt und die entsprechenden Milchproben ( $n = 75382$ ) auf das Vorhandensein von *E. coli* untersucht. Bei den nachgewiesenen 878 *E. coli*-Isolaten wurden 12 ESBL-Bildner identifiziert. Des Weiteren wurden bei insgesamt 245 Gemüse-Proben, die zwischen 2011 und 2013 von 43 Sprossen und 202 Blattsalaten genommen wurden, sieben ESBL-bildende *E. coli* in vier Sprossen-Proben (zwei Isolate stammten aus einer Probe) und zwei Blattsalat-Proben nachgewiesen. Der Nachweis der ESBL-Bildung erfolgte durch phänotypische Bestätigungstests. Die ESBL-Gene wurden durch spezifische PCR-Assays detektiert und durch Sequenzierung bestätigt.

Das Vorhandensein von Plasmiden wurde durch Erstellung von Plasmid-Profilen bestätigt und die Übertragbarkeit der Plasmide durch Transformation und Konjugation getestet. Die ESBL-Gen-tragenden Plasmide der Transformanden und/oder Transkonjuganden wurden mittels PCR-basierter Replikon-Typisierung näher charakterisiert. Sowohl die *E. coli*-Isolate als auch ihre Transformanden und/oder Transkonjuganden wurden hinsichtlich ihrer antimikrobiellen Empfindlichkeit mittels Bouillon-Mikrodilution untersucht und die entsprechenden Resistenzgene über spezifische PCR-Assays identifiziert. Ausgewählte Plasmide wurden partiell sequenziert.

Bei den 19 ESBL-Bildnern wurden folgende ESBL-Gene nachgewiesen: *bla*<sub>CTX-M-1</sub> ( $n = 5$ ), *bla*<sub>CTX-M-2</sub> ( $n = 3$ ), *bla*<sub>CTX-M-14</sub> ( $n = 3$ ), *bla*<sub>CTX-M-15</sub> ( $n = 6$ ), *bla*<sub>CTX-M-65</sub> ( $n = 1$ ) und *bla*<sub>CTX-M-125</sub> ( $n = 1$ ), davon acht in Kombination mit *bla*<sub>TEM-1</sub>. Bei den Isolaten von pflanzlichen Lebensmitteln wurde *bla*<sub>CTX-M-14</sub> und *bla*<sub>CTX-M-15</sub> je zweimal nachgewiesen, bei den Isolaten aus den Mastitis-Milchproben wurde *bla*<sub>CTX-M-15</sub> am häufigsten nachgewiesen. Alle ESBL-Gene waren auf Plasmiden unterschiedlicher Größen (35 bis 245 kb) lokalisiert. Die Replikon-

Typisierung ergab Plasmide unterschiedlicher Inkompatibilitätsgruppen: IncF, IncN, IncI1, IncK, IncFIA + IncFIB, IncFIB, IncHI2 sowie IncHI2 + IncP. Ein Plasmid war nicht typisierbar. Insgesamt 18 der 19 ESBL-Gen tragenden Plasmide erwiesen sich als konjugativ, wobei IncN- und IncI1-Plasmide die höchsten Konjugationsraten ( $1,17 \times 10^{-2}$  bis  $5,5 \times 10^{-4}$ ) zeigten.

Die ESBL-bildenden *E. coli*-Isolate wurden mittels PCR-basierter Bestimmung der phylogenetischen Gruppe, Multilocus-Sequenztypisierung (MLST) und Makrorestriktionsanalysen typisiert. Bei den phylogenetischen Gruppen dominierte die Gruppe A (n = 10), gefolgt von B1 und D (jeweils n = 4) sowie B2 (n = 1). Mittels MLST wurden viele verschiedene Sequenztypen (ST) identifiziert. Lediglich ST10 konnte bei mehreren Isolaten der Mastitis-Milchproben und Sprossenproben nachgewiesen werden. Vereinzelt wurden auch ST117 und ST410, welche häufiger bei Menschen und Lebensmittel beschrieben wurden, detektiert. Die Makrorestriktionsanalyse zeigte bei zwei Isolaten aus Mastitis-Milchproben verschiedener Herden nicht unterscheidbare Muster (bei ähnlichen Eigenschaften der Isolate/Plasmide) und bei zwei weiteren Mastitis-Milchisolaten unterschiedlicher Herden sehr ähnliche Muster (bei gleichen Eigenschaften der Isolate/Plasmide). Zwei sehr ähnliche Isolate einer Mastitis-Milchprobe wiesen unterschiedliche Muster auf. Die restlichen Isolate, inklusive der von den Salaten und Sprossen, wiesen allesamt verschiedene Makrorestriktionsmuster auf.

Von den 19 ESBL-bildenden *E. coli*-Isolaten zeigten 15 einen Multiresistenz-Phänotyp. Elf der ESBL-Gen-tragenden Plasmide wiesen co-lokalisierte Resistenzen auf, neun davon wurden als Multiresistenz-Plasmide klassifiziert. Die auf den ESBL-Gen-tragenden Plasmiden identifizierten Resistenzgene vermittelten (i) Resistenzen gegenüber Gentamicin, Kanamycin, Streptomycin, Chloramphenicol/Florfenicol, Fosfomycin, Tetracyclinen, Sulfonamiden oder Trimethoprim oder (ii) reduzierte Empfindlichkeit gegenüber (Fluor)Chinolonen. Zudem trugen sieben Plasmide Integrons der Klasse 1 mit den Genkassetten-Arrays *dfrA12-orfF-aadA2*, *dfrA1-aadA1* oder *dfrA17-aadA5*. Die partielle Sequenzierung zweier Plasmide (pCTX48 und pCTX64) zeigte, dass die vorhandenen co-lokaliserten Resistenzgene zum Teil in der Nähe der ESBL-Gene zu finden sind.

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation zeigen, dass ESBL-Gene bei *E. coli*-Isolaten von Mastitis-Milchproben und Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft zwar selten vorkommen, wenn dann aber meistens auf konjugativen Plasmiden unterschiedlicher Größen und Inkompatibilitätsgruppen, die zudem häufig co-lokalisierte Resistenzgene tragen. Dies leistet einer wechselseitigen Co-Selektion und der Persistenz der entsprechenden Resistenzgene Vorschub. Der Nachweis ESBL-bildender *E. coli* zeigt, dass die Lebensmittelkette, insbesondere Rohmilch und roh zu verzehrende Salate und Sprossen, ein mögliches Reservoir für die Verbreitung ESBL-bildender, multiresistenter *E. coli* und ihrer Resistenzgene darstellen kann.

## 8 Summary

### **Molecular characterisation of ESBL-producing *Escherichia coli* isolates originating from mastitis milk and fresh vegetables**

Antimicrobial-resistant bacteria have been increasingly reported in different reservoirs during the last years. Among them, producers of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) are of particular importance. *Escherichia coli* is a commensal bacterium in the intestinal tract of humans and animals but also plays an important role not only as causative agent of intestinal and extraintestinal infections, but also as a contaminant of food intended for human consumption. The aims of this doctoral thesis were (i) to compile information on the occurrence of ESBL-producing *E. coli* isolated from mastitis milk samples and raw vegetables and to submit the respective isolates to a comparative molecular characterisation, (ii) to determine the genotypic and phenotypic resistance profiles of the *E. coli* isolates, and (iii) to gain insight into the presence, transferability and plasmid location of the ESBL genes, but also to investigate the corresponding plasmids for the presence of other co-located resistance genes with regard to the co-selection of ESBL genes.

For this purpose, 21,548 cattle from 1,070 different dairy farms were sampled during 2009 – 2013 and the milk samples taken ( $n = 51,263$ ) were examined for the presence of *E. coli*. Among the 878 *E. coli* isolates obtained, 12 were identified as ESBL-producers. Furthermore, among 245 vegetable samples, obtained between 2011 and 2013 and comprising 43 samples from sprouts and 202 from leaf lettuces, seven ESBL-producing *E. coli* were detected in four sprout samples (two isolates were from the same sample) and two leaf lettuce samples. ESBL-production was verified via phenotypic confirmatory tests. The ESBL-genes were detected by specific PCR assays and confirmed by sequencing.

The presence of plasmids was examined by plasmid profiling and the transferability of plasmids was tested by transformation and conjugation. The ESBL gene-carrying plasmids of the transformants and transconjugants were characterised using PCR-based replicon typing. Furthermore, the *E. coli* isolates and their transformants and/or transconjugants, were investigated for their antimicrobial susceptibility via broth microdilution and the corresponding resistance genes were identified using specific PCR-assays. Selected plasmids were in part sequenced.

Within the 19 ESBL producers, the following ESBL genes were detected: *bla*<sub>CTX-M-1</sub> ( $n = 5$ ), *bla*<sub>CTX-M-2</sub> ( $n = 3$ ), *bla*<sub>CTX-M-14</sub> ( $n = 3$ ), *bla*<sub>CTX-M-15</sub> ( $n = 6$ ), *bla*<sub>CTX-M-65</sub> ( $n = 1$ ), and *bla*<sub>CTX-M-125</sub> ( $n = 1$ ), eight of these genes in combination with *bla*<sub>TEM-1</sub>. Among the isolates from salads and sprouts, *bla*<sub>CTX-M-14</sub> and *bla*<sub>CTX-M-14</sub> were each detected twice, whereas *bla*<sub>CTX-M-15</sub> was most frequently detected among the isolates from mastitis milk samples. All ESBL genes

were located on plasmids of different sizes (35 to 245 kb). Replicon typing resulted in the identification of plasmids of various incompatibility groups, including IncF, IncN, IncI1, IncK, IncFIA + IncFIB, IncFIB, IncHI2, and IncHI2 + IncP. One plasmid was not typeable. Eighteen of the 19 plasmids proved to be conjugative with IncF and IncI1 plasmids showing the highest conjugation efficiency ( $1,17 \times 10^{-2}$  to  $5,5 \times 10^{-4}$ ).

The ESBL-producing *E. coli* isolates were investigated in more detail by PCR-based determination of the phylogenetic groups, multilocus sequence typing (MLST), and macrorestriction analysis. Group A (n = 10) was the most frequently found phylogenetic group, followed by B1 and D (n = 4, each) and B2 (n = 1). MLST identified many different sequence types (STs). Solely ST10 was detected in several isolates obtained from mastitis milk and sprout samples. Occasionally, ST117 and ST410, which were described more frequently in humans and food, were also detected. Macrorestriction analysis revealed indistinguishable patterns of two isolates from mastitis milk samples of different herds (with similar properties of the respective isolates/plasmids), and very similar patterns of another two isolates from mastitis milk samples of different herds (with the same properties of the isolates/plasmids). Two very similar isolates from the same mastitis milk sample showed different macrorestriction patterns. The remaining isolates, including those from salads and sprouts, all exhibited different macrorestriction patterns.

Of the 19 ESBL-producing *E. coli* isolates, 15 showed a multiresistance phenotype. Eleven of the ESBL gene-carrying plasmids showed co-localised resistances, with nine of them being classified as multiresistance plasmids. The resistance genes identified on these plasmids conferred (i) resistance to gentamicin, kanamycin, streptomycin, chloramphenicol/florfenicol, fosfomicin, tetracyclines, sulfonamides, or trimethoprim or (ii) reduced susceptibility to (fluoro)quinolones. In addition, seven plasmids carried class 1 integrons with the gene cassettes *dfrA12-orfF-aadA2*, *dfrA1-aadA1* or *dfrA17-aadA5*. Partial sequence analysis of two plasmids (pCTX48 and pCTX64) revealed that some of the co-located resistance genes were present in the close vicinity of the ESBL genes.

The results of this thesis showed that ESBL genes occur rarely among *E. coli* isolates from mastitis milk samples and foods of plant origin. However, if so, the ESBL genes are commonly located on conjugative plasmids of different sizes and incompatibility groups, which often harbor additional resistance genes. This latter aspect is of importance when considering aspects of co-selection and persistence of antimicrobial resistance genes. The identification of ESBL-producing *E. coli* from the aforementioned sources, however, suggests that the food chain, in particular raw milk and salads/sprouts, may represent a reservoir for the spread of ESBL-producing multiresistant *E. coli* isolates and their mobile resistance genes.

## 9 Literaturverzeichnis

- Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona, C., Viñas, I., 2008. Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *Int. J. Food Microbiol.* 123, 121-129. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.013
- Ahmed, A.M., Shimamoto, T., 2011. Molecular characterization of antimicrobial resistance in gram-negative bacteria isolated from bovine mastitis in Egypt. *Microbiol. Immunol.* 55, 318-327. doi:10.1111/j.1348-0421.2011.00323.x
- Ali, T., Ur Rahman, S., Zhang, L., Shahid, M., Han, D., Gao, J., Zhang, S., Ruegg, P.L., Saddique, U., Han, B., 2017. Characteristics and genetic diversity of multi-drug resistant extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis. *Oncotarget* 8, 90144-90163. doi:10.18632/oncotarget.21496
- Alonso, C.A., Michael, G.B., Li, J., Somalo, S., Simón, C., Wang, Y., Kaspar, H., Kadlec, K., Torres, C., Schwarz, S., 2017. Analysis of *bla*<sub>SHV-12</sub>-carrying *Escherichia coli* clones and plasmids from human, animal and food sources. *J. Antimicrob. Chemother.* 72, 1589-1596. doi:10.1093/jac/dkx024
- Althaus, D., Hofer, E., Corti, S., Julmi, A., Stephan, R., 2012. Bacteriological survey of ready-to-eat lettuce, fresh-cut fruit, and sprouts collected from the swiss market. *J. Food Prot.* 75, 1338-1341. doi:10.4315/0362-028X.JFP-12-022
- Ambler, R.P., 1980. The structure of  $\beta$ -lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 289, 321-331. doi:10.1098/rstb.1980.0049
- Batabyal, K., Banerjee, A., Pal, S., Dey, S., Joardar, S.N., Samanta, I., Isore, D.P., Singh, A.D., 2018. Detection, characterization, and antibiogram of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase *Escherichia coli* isolated from bovine milk samples in West Bengal, India. *Vet. World* 11, 1423-1427. doi:10.14202/vetworld.2018.1423-1427
- Bauernfeind, A., Grimm, H., Schweighart, S., 1990. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection* 18, 294-298. doi:10.1007/bf01647010
- Ben Said, L., Jouini, A., Klibi, N., Dziri, R., Alonso, C.A., Boudabous, A., Ben Slama, K., Torres, C., 2015. Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* in vegetables, soil and water of the farm environment in Tunisia. *Int. J. Food Microbiol.* 203, 86-92. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.023
- Bennett P.M., 2008. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br. J. Pharmacol.* 153 Suppl 1, 347-357. doi:10.1038/sj.bjp.0707607



- Bhutani, N., Muraleedharan, C., Talreja, D., Rana, S.W., Walia, S., Kumar, A., Walia, S.K., 2015. Occurrence of multidrug resistant extended spectrum  $\beta$ -lactamase-producing bacteria on iceberg lettuce retailed for human consumption. *Biomed Res. Int.* 2015, 547547. doi:10.1155/2015/547547
- Blaak, H., van Hoek, A.H.A.M., Veenman, C., Docters van Leeuwen, A.E., Lynch, G., van Overbeek, W.M., de Roda Husman, A.M., 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. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.006
- Bonnet, R., 2004. Growing group of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 1-14. doi:10.1128/AAC.48.1.1-14.2004
- 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, 933-951. doi:10.1128/CMR.14.4.933-951.2001
- Brown, A.C., Chen, J.C., Watkins, L.K.F., Campbell, D., Folster, J.P., Tate, H., Wasilenko, J., Van Tubbergen, C., Friedman, C.R., 2018. CTX-M-65 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Salmonella enterica* serotype Infantis, United States. *Emerg. Infect. Dis.* 24, 2284-2291. doi:10.3201/eid2412.180500
- Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) Wissenschaft, Appel, B., Böhl, G.F., Greiner, M., Lahrssen-Wiederholt, M., Hensel, A. (Hrsg.), 2011. EHEC-Ausbruch 2011 Aufklärung des Ausbruchs entlang der Lebensmittelkette. Berlin. ISSN 1614-3755 (Print), 1614-3841 (Online)
- Bush, K., Jacoby, G.A., 2010. Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 969-976. doi:10.1128/AAC.01009-09
- Campos, J., Mourão, J., Pestana, N., Peixe, L., Novais, C., Antunes, P., 2013. Microbiological quality of ready-to-eat salads: An underestimated vehicle of bacteria and clinically relevant antibiotic resistance genes. *Int. J. Food Microbiol.* 166, 464-470. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.08.005
- Cantón, R., Coque, T.M., 2006. The CTX-M  $\beta$ -lactamase pandemic. *Curr. Op. Microbiol.* 9, 466-475. doi:10.1016/j.mib.2006.08.011
- Cantón, 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, 144-153. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01850.x
- Cantón, R., González-Alba, J.M., Galán, J.C., 2012. CTX-M enzymes: Origin and diffusion. *Front. Microbiol.* 3, 110. doi:10.3389/fmicb.2012.00110
- Carattoli, A., 2009. Resistance Plasmid Families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53. 2227-2238. doi:10.1128/AAC.01707-08

- Carattoli, A., 2013. Plasmids and the spread of resistance. *Int. J. Med. Microbiol.* 303, 298-304. doi:10.1016/j.ijmm.2013.02.001
- Chopra, I., Roberts, M., 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65, 232-260. doi:10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001
- Clermont, O., Christenson, J.K., Denamur, E., Gordon, D.M., 2013. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ. Microbiol. Rep.* 5, 58-65. doi:10.1111/1758-2229.12019
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2015. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Third Informational Supplement. CLSI document VET01S. 3rd ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.
- Coque, T.M., Baquero, F., Cantón, R., 2008. Increasing prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Euro Surveill.* 13 (47).
- Dahmen, S., Métayer, V., Gay, E., Madec, J.Y., Haenni, M., 2013. Characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-carrying plasmids and clones of *Enterobacteriaceae* causing cattle mastitis in France. *Vet. Microbiol.* 162, 793-799. doi:10.1016/j.vetmic.2012.10.015
- Dai, L., Lu, L.M., Wu, C.M., Li, B.B., Huang, S.Y., Wang, S.C., Qi, Y.H., Shen, J.Z., 2008. Characterization of antimicrobial resistance among *Escherichia coli* isolates from chickens in China between 2001 and 2006. *FEMS Microbiol. Lett.* 286, 178-183. doi:10.1111/j.1574-6968.2008.01272.x
- Deng, Y., Bao, X., Ji, L., Chen, L., Liu, J., Miao, J., Chen, D., Bian, H., Li, Y., Yu, G., 2015. Resistance integrons: Class 1, 2 and 3 integrons. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 14, 45. doi:10.1186/s12941-015-0100-6
- Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), 2019. Richt- und Warnwerte für Keimlinge und Sprossen zur Abgabe an den Verbraucher. <https://www.dghm-richt-warnwerte.de/de/dokumente/frischgemuese-und-frischobst>
- Dhanji, H., Doumith, M., Hope, R., Livermore, D. M., Woodford, N., 2011. ISEcp1-mediated transposition of linked *bla*<sub>CTX-M-3</sub> and *bla*<sub>TEM-1b</sub> from the IncI1 plasmid pEK204 found in clinical isolates of *Escherichia coli* from Belfast, UK. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 2263-2265. doi:10.1093/jac/dkr310
- Doumith, M., Day, M.J., Hope, R., Wain, J., Woodford, N., 2012. Improved multiplex PCR strategy for rapid assignment of the four major *Escherichia coli* phylogenetic groups. *J. Clin. Microbiol.* 50, 3108-3110. doi:10.1128/JCM.01468-12
- DuPont, H.L., 2007. The growing threat of foodborne bacterial enteropathogens of animal origin. *Clin. Infect. Dis.* 45, 1353-61. doi:10.1086/522662

- Eckert, C., Gautier, V., Arlet, G., 2006. DNA sequence analysis of the genetic environment of various *bla*<sub>CTX-M</sub> genes, J. Antimicrob. Chemother. 57, 14-23. doi:10.1093/jac/dki398
- European Committee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST), 2019. EUCAST Guidance Documents in susceptibility testing. EUCAST technical guidance on the use of the combination disk test (CDT) for confirmation of ESBL in Enterobacterales. ([https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/General\\_documents/Miscellaneous/Guidance\\_document\\_Confirmation\\_of\\_ESBL.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Miscellaneous/Guidance_document_Confirmation_of_ESBL.pdf)).
- European Food Safety Authority (EFSA) Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) Panel, 2011a. Scientific opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and/or AmpC  $\beta$ -lactamases in food and food producing animals. EFSA J. 9, 1-95. doi:10.2903/j.efsa.2011.2322
- European Food Safety Authority (EFSA) Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), 2011b. Scientific Opinion on the risk posed by Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) and other pathogenic bacteria in seeds and sprouted seeds. EFSA J. 9, 1-101. doi:10.2903/j.efsa.2011.2424
- European Food Safety Authority (EFSA) Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) Panel, 2013. Scientific opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 1 (outbreak data analysis and risk ranking of food/pathogen combinations). EFSA J. 11, 1-3025. doi:10.2903/j.efsa.2013.3025
- Egea, P., López-Cerero, L., Navarro, M.D., Rodríguez-Baño, 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, 1045-1047. doi:10.1007/s10096-011-1168-3
- Eisenberger, D., Carl, A., Balsliemke, J., Kämpf, P., Nickel, S., Schulze, G., Valenza, G., 2018. Molecular characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from milk samples of dairy cows with mastitis in Bavaria, Germany. Microb. Drug Resist. 24, 505-510. doi:10.1089/mdr.2017.0182
- Ewers, C., Bethe, A., Semmler, T., Guenther, S., Wieler, L.H., 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. Clin. Microbiol. Infect. 18, 646-655. Doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03850.x

- Falgenhauer, L., Imirzalioglu, C., Ghosh, H., Gwozdziński, K., Schmiedel, J., Gentil, K., Bauerfeind, R., Kämpfer, P., Seifert, H., Michael, G.B., Schwarz, S., Pfeifer, Y., Werner, G., Pietsch, M., Roesler, U., Guerra, B., Fischer, J., Sharp, H., Käsbohrer, A., Goesmann, A., Hille, K., Kreienbrock, L., Chakraborty, T., 2016. Circulation of clonal populations of fluoroquinolone-resistant CTX-M-15-producing *Escherichia coli* ST410 in humans and animals in Germany. *Int. J. Antimicrob. Agents* 47, 457-465. doi:10.1016/j.ijantimicag.2016.03.019
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)/World Health Organization (WHO), 2008. Microbiological hazards in fresh leafy vegetables and herbs: Meeting Report. Microbiological Risk Assessment Series No. 14. Rome. 151pp. <http://www.fao.org/3/a-i0452e.pdf>;
- Feßler, A.T., Kaspar, H., Lindeman, C.J., Stegemann, M.R., Peters, T., Mankertz, J., Watts, J.L., Schwarz, S., 2012. A proposal of interpretive criteria for cefoperazone applicable to bovine mastitis pathogens. *Vet. Microbiol.* 157, 226-231. doi:10.1016/J.VETMIC.2011.11.032
- Ferri, M., Ranucci, E., Romagnoli P., Giaccone V., 2017. Antimicrobial resistance: A global emerging threat to public health systems. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 57:13, 2857-2876. doi:10.1080/10408398.2015.1077192
- Fick, J., Söderström, H., Lindberg, R.H., Phan, C., Tysklind, M., Larsson, D.G., 2009. Contamination of surface, ground, and drinking water from pharmaceutical production. *Environ. Toxicol. Chem.*, 28, 2522-2527. doi:10.1897/09-073.1
- Fischer, J., Rodríguez, I., Baumann, B., Guiral, E., Beutin, L., Schroeter, A., Käsbohrer, A., Pfeifer, Y., Helmuth, R., Guerra, B., 2014. *bla*<sub>CTX-M-15</sub> -carrying *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from livestock and food in Germany. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 2951-2958. doi:10.1093/jac/dku270
- Fluit, A.C., Schmitz, F.J., 2004. Resistance integrons and super-integrons. *Clin. Microbiol. Infect.* 10, 272-288. doi:10.1111/j.1198-743X.2004.00858.x
- Fortini, D., Fashae, K., Villa, L., Feudi, C., García-Fernández, A., Carattoli, A., 2015. A novel plasmid carrying *bla*<sub>CTX-M-15</sub> identified in commensal *Escherichia coli* from healthy pregnant women in Ibadan, Nigeria. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 3, 9-12. doi:10.1016/j.jgar.2014.12.002
- Franz, E., Veenman, C., van Hoek, A.H.A.M., Husman, A.D.R., Blaak, H., 2015. Pathogenic *Escherichia coli* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases isolated from surface water and wastewater. *Sci. Rep.* 5, 14372. doi:10.1038/srep14372
- García-Fernández, A., Villa, L., Moodley, A., Hasman, H., Miriagou, V., Guardabassi, L., Carattoli, A., 2011. Multilocus sequence typing of IncN plasmids. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 1987-1991. doi:10.1093/jac/dkr225

- Geser, N., Stephan, R., Hächler, 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. doi:10.1186/1746-6148-8-21
- Giske, C.G., 2015. Contemporary resistance trends and mechanisms for the old antibiotics colistin, temocillin, fosfomycin, mecillinam and nitrofurantoin. Clin. Microbiol. Infect. 21, 899-905. doi:10.1016/j.cmi.2015.05.022
- Hall, B.G., Barlow, M., 2005. Revised Ambler classification of  $\beta$ -lactamases. J. Antimicrob. Chemother. 55, 1050-1051. doi:10.1093/jac/dki130
- Hamilton-Miller, J.M., Shah, S., 2001. Identity and antibiotic susceptibility of enterobacterial flora of salad vegetables. Int. J. Antimicrob. Agents, 18, 81-83. doi:10.1016/s0924-8579(01)00353-3
- Hammerum, A.M., Heuer, O.E., 2009. Human health hazards from antimicrobial-resistant *Escherichia coli* of animal origin. Clin. Infect. Dis. 48, 916-921. doi:10.1086/597292
- Harmer, C.J., Hall, R.M., 2016. IS26-mediated formation of transposons carrying antibiotic resistance genes. mSphere, 1, e00038-16. doi:10.1128/mSphere.00038-16
- Hartmann, A., Locatelli, A., Amoureux, L., Depret, G., Jolivet, C., Gueneau, E., Neuwirth, C., 2012. Occurrence of CTX-M producing *Escherichia coli* in soils, cattle, and farm environment in France (Burgundy region). Front. Microbiol. 3, 83. doi:10.3389/fmicb.2012.00083
- Heuer, H., Schmitt, H., Smalla, K., 2011. Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. Curr. Opin. Microbiol. 14, 236-243. doi:10.1016/j.mib.2011.04.009
- Ho, P.L., Chan, J., Lo, W.U., Law, P.Y., Li, Z., Lai, E.L., Chow, K.H., 2013. Dissemination of plasmid-mediated fosfomycin resistance *fosA3* among multidrug-resistant *Escherichia coli* from livestock and other animals. J. Appl. Microbiol. 114, 695-702. doi:10.1111/jam.12099
- Hou, J., Yang, X., Zeng, Z., Lv, L., Yang, T., Lin, D., Liu, J.H., 2013. Detection of the plasmid-encoded fosfomycin resistance gene *fosA3* in *Escherichia coli* of food-animal origin. J. Antimicrob. Chemother. 68, 766-770. doi:10.1093/jac/dks465
- Ibrahim, D.R., Dodd, C.E.R., Stekel, D.J., Ramsden S.J., Hobman, J.L., 2016. Multidrug resistant, extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolated from a dairy farm. FEMS Microbiol. Ecol., 92, fiw013. doi:10.1093/femsec/fiw013
- Iseppi, R., de Niederhäusern, S., Bondi, M., Messi, P., Sabia, C., 2018. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, AmpC, and MBL-producing gram-negative bacteria on fresh vegetables and ready-to-eat salads sold in local markets. Microb. Drug Resist. 24, 1156-1164. doi:10.1089/mdr.2017.0198

- Kadlec, K., Schwarz, S., 2008. Analysis and distribution of class 1 and class 2 integrons and associated gene cassettes among *Escherichia coli* isolates from swine, horses, cats and dogs collected in the BFT- GERM-Vet monitoring study. *J. Antimicrob. Chemother.* 62, 469-473. doi:10.1093/jac/dkn233
- Kakkar, M., Chatterjee, P., Chauhan, A.S., Grace, D., Lindahl, J., Beeche, A., Jing, F., Chotinan, S., 2018. Antimicrobial resistance in South East Asia: time to ask the right questions. *Glob. Health Action* 11, 1483637. doi:10.1080/16549716.2018.1483637
- Kehrenberg, C., 2000. Molekulare Grundlagen der Tetracyclinresistenz von Isolatzen der Genera *Pasteurella* und *Mannheimia*: Identifizierung neuartiger Plasmide und Transposons. Hannover. Tierärztliche Hochschule. Abgerufen von [https://elib.tiho-hannover.de/receive/etd\\_mods\\_00003186](https://elib.tiho-hannover.de/receive/etd_mods_00003186)
- Kehrenberg, C., Schwarz, S., 2001. Occurrence and linkage of genes coding for resistance to sulfonamides, streptomycin and chloramphenicol in bacteria of the genera *Pasteurella* and *Mannheimia*. *FEMS Microbiol. Lett.* 205, 283-290. doi:10.1111/j.1574-6968.2001.tb10962.x
- Keyes, K., Hudson, C., Maurer, J.J., Thayer, S., White, D.G., Lee, M.D., 2000. Detection of florfenicol resistance genes in *Escherichia coli* isolated from sick chickens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 421-424. doi:10.1128/AAC.44.2.421-424.2000
- Kikvi, G.M., Schwarz, S., Ombui, J.N., Mitema, E.S., Kehrenberg, C., 2007. Streptomycin and chloramphenicol resistance genes in *Escherichia coli* isolates from cattle, pigs, and chicken in Kenya. *Microb. Drug Resist.* 13, 62-68. doi:10.1089/mdr.2006.9998
- Kim H.S., Chon, J.W., Kim, Y.J., Kim, D.H., Kim, M., Seo, K.H., 2015. Prevalence and characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in ready-to-eat vegetables. *Int. J. Food Microbiol.* 207, 83-86. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.049
- Knudsen, P.K., Gammelsrud, K.W., Alfsnes, K., Steinbakk, M., Abrahamsen, T.G., Müller, F., Bohlin, J., 2018. Transfer of a *bla*<sub>CTX-M-1</sub>-carrying plasmid between different *Escherichia coli* strains within the human gut explored by whole genome sequencing analyses. *Sci. Rep.* 8, 280. doi:10.1038/s41598-017-18659-2
- Koo, H.J., Woo, G.J., 2012. Characterization of antimicrobial resistance of *Escherichia coli* recovered from foods of animal and fish origin in Korea. *J. Food Prot.* 75, 966-972. doi:10.4315/0362-028X.JFP-11-003
- Kousta, M., Mataragas, M., Skandamis, P., Drosinos, E.H., 2010. Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. *Food Control.* 21, 805-815. doi:10.1016/j.foodcont.2009.11.015

- 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.M., Mevius, D.J., 2011. Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. *Clin. Microbiol. Infect.* 17, 873-830. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03497.x
- Liebana, E., Carattoli, A., Coque, T.M., Hasman, H., Magiorakos, A.P., Mevius, D., Peixe, L., Poriel, L., Schuepbach-Regula, G., Torneke, K., Torren-Edo, J., Torres, C., Threlfall, J., 2013. Public health risks of enterobacterial isolates producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases or AmpC  $\beta$ -lactamases in food and food-producing animals: An EU perspective of epidemiology, analytical methods, risk factors, and control options. *Clin. Infect. Dis.* 56, 1030-1037. doi:10.1093/cid/cis1043
- Livermore, D.M., Woodford, N., 2006. The  $\beta$ -lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends Microbiol.* 14, 413-420. doi:10.1016/j.tim.2006.07.008
- Lupo, A., Saras, E., Madec, J.Y., Haenni, M., 2018. Emergence of *bla*<sub>CTX-M-55</sub> associated with *fosA*, *rmtB* and *mcr* gene variants in *Escherichia coli* from various animal species in France. *J. Antimicrob. Chemother.* 73, 867-872. doi:10.1093/jac/dkx489
- Ma, B.L., Blackshaw, R.E., Roy, J., He, T., 2011. Investigation on gene transfer from genetically modified corn (*Zea mays* L.) plants to soil bacteria. *J. Environ. Sci. Health B.* 46, 590-599. doi:10.1080/03601234.2011.586598
- Madec, J.Y., Poirel, L., Saras, E., Gourguechon, A., Girlich, D., Nordmann, P., Haenni, M., 2012. Non-ST131 *Escherichia coli* from cattle harbouring human-like *bla*<sub>CTX-M-15</sub>-carrying plasmids. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 578-581. doi:10.1093/jac/dkr542
- Machado, E., Coque, T.M., Cantón, R., Sousa, J.C., Peixe, L., 2013. Commensal *Enterobacteriaceae* as reservoirs of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, integrons, and *sul* genes in Portugal. *Front. Microbiol.* 4, 80. doi:10.3389/fmicb.2013.00080
- Manges, A.R., Johnson, J.R., 2012. Food-borne origins of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. *Clin. Infect. Dis.* 55, 712-719. doi:10.1093/cid/cis502
- Marti, R., Scott, A., Tien, Y.C., Murray, R., Sabourin, L., Zhang, Y., Topp, E., 2013. Impact of manure fertilization on the abundance of antibiotic-resistant bacteria and frequency of detection of antibiotic resistance genes in soil and on vegetables at harvest. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 5701-5709. doi:10.1128/AEM.01682-13
- Mesa, R.J., Blanc, V., Blanch, A.R., Cortés, P., González, J.J., Lavilla, S., Miró, E., Muniesa, M., Saco, M., Tórtola, 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, 211-215. doi:10.1093/jac/dkl211

- Michael, G.B., Butaye, P., Cloeckart, A., Schwarz, S., 2006. Genes and mutations conferring antimicrobial resistance in *Salmonella*: an update. *Microbes Infect.* 8, 1898-1914. doi:10.1016/j.micinf.2005.12.019
- Michael, G.B., Freitag, C., Feßler, A.T., Wendlandt, S., Eidam, C., Entorf, M., Lopez, G.V., Riesenber, A., Blodkamp, S., Schwarz, S., Kadlec, K., 2014. Antimicrobial resistance, ESBL and MRSA – definitions and laboratory diagnostics. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 127, 339-348. doi:10.2376/0005-9366-127-339
- Michael, G.B., Freitag, C., Wendlandt, S., Eidam, C., Feßler, A.T., Lopes, G.V., Kadlec, K., Schwarz, S., 2015. Emerging issues in antimicrobial resistance of bacteria from food-producing animals. *Future Microbiol.* 10, 427-443. doi:10.2217/fmb.14.93
- Michael, G.B., Kaspar, H., Siqueira, A.K., de Freitas Costa, E., Corbellini, L.G., Kadlec, K., Schwarz, S., 2017. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolates collected from diseased food-producing animals in the GERM-Vet monitoring program 2008-2014. *Vet. Microbiol.* 200, 142-150. doi:10.1016/j.vetmic.2016.08.023
- Monaghan, J., Hutchison, M., 2012. Distribution and decline of human pathogenic bacteria in soil after application in irrigation water and the potential for soil-splash-mediated dispersal onto fresh produce. *J. Appl. Microbiol.* 112, 1007-1019. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05269.x
- Mora, A., López, C., Herrera, A., Viso, S., Mamani, R., Dhabi, G., Alonso, M.P., Blanco, M., Blanco, J.E., Blanco, J., 2012. Emerging avian pathogenic *Escherichia coli* strains belonging to clonal groups O111:H4-D-ST2085 and O111:H4-D-ST117 with high virulence-gene content and zoonotic potential. *Vet. Microbiol.* 156, 347-352. doi:10.1016/j.vetmic.2011.10.033
- Müller, A., Stephan, R., Nüesch-Inderbilen, M., 2016. Distribution of virulence factors in ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from the environment, livestock, food and humans. *Sci. Total Environ.* 541, 667-672. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.09.135
- Naseer, U., Sundsfjord, A., 2011. The CTX-M Conundrum: Dissemination of plasmids and *Escherichia coli* clones. *Microb. Drug Resist.* 17, 83-97. doi:10.1089/mdr.2010.0132
- National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (NACMCF), 1999. Microbiological safety evaluations and recommendations on sprouted seeds. I. *J. Food Microbiol.* 52, 123-153. doi:10.1016/S0168-1605(99)00135-X
- Novais, A., Cantón, R., Valverde, A., Machado, E., Galan, J.C., Peixe, L., Carattoli, A., Baquero, F., Coque, T.M., 2006. Dissemination and persistence of *bla*<sub>CTX-M-9</sub> are linked to class 1 integrons containing CR1 associated with defective transposon derivatives from Tn402 located in early antibiotic resistance plasmids of IncHI2, IncP1-alpha, and IncFI groups. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 2741-2750. doi:10.1128/AAC.00274-06



- Novais, A., Cantón, R., Coque, T.M., Moya, A., Baquero, F., Galán, J.C., 2008. Mutational events in cefotaximase extended-spectrum  $\beta$ -lactamases of the CTX-M-1 cluster involved in ceftazidime resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52, 2377-2382. doi:10.1128/AAC.01658-07
- Nüesch-Inderbilen, M., Zurfluh, K., Peterhans, S., Hächler, 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, 1178-1181. doi:10.4315/0362-028X.JFP-15-018
- Ohnishi, M., Okatani, A.T., Harada, K., Sawada, T., Marumo, K., Murakami, M., Sato, R., Esaki, H., Shimura, K., Kato, H., Uchida, N., Takahashi, T., 2013. Genetic characteristics of CTX-M-Type extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* involved in mastitis cases on Japanese dairy farms, 2007 to 2011. *J. Clin. Microbiol.* 51, 3117-3122. doi:10.1128/JCM.00920-13
- Oliver, S.P., Jayarao, B.M., Almeida, R.A., 2005. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: Food safety and public health implications. *Foodborne Pathog. Dis.* 2, 115-129. doi:10.1089/fpd.2005.2.115
- Omarak, R.A., Zayda, M.G., Awasthi, S.P., Hinenoya, A., Yamasaki, S., 2019. Serotypes, pathogenic potential and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from subclinical bovine mastitis milk samples in Egypt. *Jpn. J. Infect. Dis.* 72, 337-339. doi:10.7883/yoken.JJID.2018.538
- Ojo, K.K., Kehrenberg, C., Schwarz, S., Odelola, H.A., 2002. Identification of a complete *dfra14* gene cassette integrated at a secondary site in a resistance plasmid of uropathogenic *Escherichia coli* from Nigeria. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 46, 2054-2055. doi: 10.1128/aac.46.6.2054-2055.2002
- Poirel, L., Decousser, J.W., Nordmann, P., 2003. Insertion sequence *ISEcp1B* is involved in expression and mobilization of a *bla*<sub>CTX-M</sub>  $\beta$ -lactamase gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 2938-2945. doi:10.1128/aac.47.9.2938-2945.2003
- Poirel, L., Lartigue, M.F., Decousser, J.W., Nordmann, P., 2005. *ISEcp1B*-mediated transposition of *bla*<sub>CTX-M</sub> in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 447-450. doi:10.1128/AAC.49.1.447-450.2005
- Poirel, L., Cattoir, V., Nordmann, P., 2012. Plasmid-mediated quinolone resistance; interactions between human, animal, and environmental ecologies. *Front. Microbiol.* 3, 24. doi:10.3389/fmicb.2012.00024
- Poirel, L., Madec, J.Y., Lupo, A., Schink, A.K., Kieffer, N., Nordmann, P., Schwarz, S., 2018. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *Microbiol. Spectr.*, 6, 10.1128/microbiolspec.ARBA-0026-2017. doi:10.1128/microbiolspec.ARBA-0026-2017

- Qu, J., Huang, Y., Lv, X., 2019. Crisis of antimicrobial resistance in China: Now and the future. *Front. Microbiol.* 10, 2240. doi.org/10.3389/fmicb.2019.02240
- Ramirez, M.S., Tolmasky, M.E., 2010. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist. Updat.* 13, 151-171. doi:10.1016/j.drup.2010.08.003
- Randall, L., Heinrich, K., Horton, R., Brunton, L., Sharman, M., Bailey-Horne, V., Sharma, M., McLaren, I., Coldham, N., Teale, C., Jones, J., 2014. Detection of antibiotic residues and association of cefquinome residues with the occurrence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing bacteria in waste milk samples from dairy farms in England and Wales in 2011. *Res. Vet. Sci.* 96, 15-24. doi:10.1016/j.rvsc.2013.10.009
- Randall, L.P., Lodge, M.P., Elviss, N.C., Lemma, F.L., Hopkins, K.L., Teale, C.J., Woodford, N., 2017. Evaluation of meat, fruit and vegetables from retail stores in five United Kingdom regions as sources of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing and carbapenem-resistant *Escherichia coli*. *Int. J. of Food Microbiol.* 241, 283-290. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.036
- Rao, L., Lv, L., Zeng, Z., Chen, S., He, D., Chen, X., Wu, C., Wang, Y., Yang, T., Wu, P., Liu, Y., Liu, J.H., 2014. Increasing prevalence of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* in food animals and the diversity of CTX-M genotypes during 2003-2012. *Vet. Microbiol.* 172, 534-541. doi:10.1016/j.vetmic.2014.06.013
- Raphael, E., Wong, L.K., Riley, L.W., 2011. Extended-spektrum  $\beta$ -lactamase gene sequences in gram-negative saprophytes on retail organic and nonorganic spinach. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 1601-1607. doi:10.1128/AEM.02506-10
- Rasheed, M.U., Thajuddin, N., Ahamed, P., Teklemariam, Z., Jamil, K., 2014. Antimicrobial drug resistance in strains of *Escherichia coli* isolated from food sources. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 56, 341-346. doi:10.1590/s0036-46652014000400012
- Recchia, G.D., Hall, R.M., 1995. Gene cassettes: A new class of mobile element. *Microbiology* 141, 3015-3027. doi:10.1099/13500872-141-12-3015
- Reuland, E.A., Al Naiemi, N., Raadsen, S.A., Savelkoul, P.H.M., Kluytmans, J.A.J.W., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., 2014. Prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in raw vegetables. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 33, 1843-1846. doi:10.1007/s10096-014-2142-7
- Riccobono, E., Di Pilato, V., Di Maggio, T., Revollo, C., Bartoloni, A., Pallecchi, L., Rossolini, G.M., 2015. Characterization of IncI1 sequence type 71 epidemic plasmid lineage responsible for the recent dissemination of CTX-M-65 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in the Bolivian Chaco region. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 5340-5347. doi:10.1128/AAC.00589-15

- Richter, L., Du Plessis, E.M., Duvenage, S., Korsten, L., 2019. Occurrence, identification and antimicrobial resistance profiles of extended-spectrum and AmpC  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* from fresh vegetables retailed in Gauteng Province, South Africa. *Foodborne Pathog. Dis.* 16, 421-427. doi:10.1089/fpd.2018.2558
- Rogers, B.A., Sidjabat, H.E., Paterson, D.L., 2011. *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 1-14. doi:10.1093/jac/dkq415
- Ryu, S.H., Lee, J.H., Park, S.H., Song, M.O., Park, S.H., Jung, H.W., Park, G.Y., Choi, S.M., Kim, M.S., Chae, Y.Z., Park, S.G., Lee, Y.K., 2012. Antimicrobial resistance profiles among *Escherichia coli* strains isolated from commercial and cooked foods. *Int. J. Food Microbiol.* 159, 263-266. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.09.001
- Saidini, M., Messadi, L., Soudani, A., Daaloul-Jedidi, M., Châtre, P., Chehida, F.B., Mamlouk, A., Mahjoub, W., Madec, J.Y., Haenni, M., 2018. Epidemiology, antimicrobial resistance and extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in clinical bovine mastitis in Tunisia. *Microb. Drug Resist.* 24, 1242-1248. doi:10.1089/mdr.2018.0049
- Saini, V., McClure, J.T., Léger, D., Keefe, G.P., Scholl, D.T., Morck, D.W., Barkema, H.W., 2012. Antimicrobial resistance profiles of common mastitis pathogens on Canadian dairy farms. *J. Dairy Sci.* 95, 4319-4332. doi:10.3168/jds.2012-5373
- Schink, A.K., Kadlec, K., Kaspar, H., Mankertz, J., Schwarz, S., 2013. Analysis of extended-spectrum-  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates collected in the GERM-Vet monitoring programme. *J. Antimicrob. Chemother.* 68-1741-1749. doi:10.1093/jac/dkt123
- Schwaiger, K., Helmke, K., Hölzel, 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, 191-196. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.06.001
- Schwarz, S., Chaslus-Dancla, E., 2001. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Vet. Res.* 32, 201-225. doi:10.1051/vetres:2001120
- Schwarz, S., Kehrenberg, C., Doublet, B., Cloeckert, A., 2004. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol. Rev.* 28, 519-542. doi:10.1016/j.femsre.2004.04.001
- Schwarz, S., Silley, P., Simjee, S., Woodford, N., van Duijkeren, E., Johnson, A.P., Gaastra, W., 2010. Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *Vet. Microbiol.* 141, 1-4. doi:10.1016/j.vetmic.2009.12.013
- Schwarz, S., Loeffler, A., Kadlec, K., 2017. Bacterial resistance to antimicrobial agents and its impact on veterinary and human medicine. *Vet. Dermatol.* 28, 82-e19. doi:10.1111/vde.12362

- Shaw, K.J., Rather, P.N., Hare, R.S., Miller, G.H., 1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol. Rev.* 57, 138-163. PMID:PMC372903
- Smalla, K., Van Overbeek, L.S., Pukall, R., Van Elsas, J.D., 1993. Prevalence of *nptII* and Tn5 in kanamycin-resistant bacteria from different environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 13, 47-58. doi:10.1111/j.1574-6941.1993.tb00050.x
- Smet, A., Rasschaert, G., Martel, A., Persoons, D., Dewulf, J., Butaye, P., Catry, B., Haesebrouck, F., Herman, L., Heyndrickx, M., 2011. *In situ* ESBL conjugation from avian to human *Escherichia coli* during cefotaxime administration. *J. Appl. Microbiol.* 110, 541-549. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04907.x
- Söderqvist, K., Lambertz, S.T., Vågsholm, I., Boqvist, S., 2016. Foodborne bacterial pathogens in retail prepacked ready-to-eat mixed ingredient salads. *J. Food Prot.* 79, 978-985. doi:10.4315/0362-028X.JFP-15-515
- Solomon, E.B., Yaron, S., Matthews, K.R., 2002. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 397-400. doi:10.1128/aem.68.1.397-400.2002
- Srinivasan, V., Gillespie, B.E., Lewis, M.J., Nguyen, L.T., Headrick, S.I., Schukken, Y.H., Oliver, S.P., 2007. Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* isolated from dairy cows with mastitis. *Vet. Microbiol.* 124, 319-328. doi:10.1016/j.vetmic.2007.04.040
- Strahilevitz, J., Jacoby, G.A., Hooper, D.C., Robicsek, A., 2009. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 664-689. doi:10.1128/CMR.00016-09
- Su, Y., Yu, C.Y., Tsai, Y., Wang, S.H., Lee, C., Chu, C., 2016. Fluoroquinolone-resistant and extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* from the milk of cows with clinical mastitis in Southern Taiwan. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 49, 892-901. doi:10.1016/j.jmii.2014.10.003
- Sunde, M., Norström, M., 2005. The genetic background for streptomycin resistance in *Escherichia coli* influences the distribution of MICs. *J. Antimicrob. Chemother.* 56, 87-90. doi:10.1093/jac/dki150
- Sweeney, M.T., Lubbers, B.V., Schwarz, S., Watts, J.L., 2018. Applying definitions for multidrug resistance, extensive drug resistance and pandrug resistance to clinically significant livestock and companion animal bacterial pathogens. *J. Antimicrob. Chemother.* 73, 1460-1463. doi:10.1093/jac/dky043

- Tate, H., Folster, J.P., Hsu, C.H., Chen, J., Hoffmann, M., Li, C., Morales, C., Tyson, G.H., Mukherjee, S., Brown, A.C., Green, A., Wilson, W., Dessai, U., Abbott, J., Joseph, L., Haro, J., Ayers, S., McDermott, P.F., Zhao, S., 2017. Comparative analysis of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase CTX-M-65-producing *Salmonella enterica* serovar Infantis isolates from humans, food animals, and retail chickens in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61, e00488-17. doi:10.1128/AAC.00488-17
- Tenhagen, B.A., Köster, G., Wallmann, J., Heuwieser, W., 2006. Prevalance of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Gemany. *J. Dairy Sci.* 89, 2542-2551. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72330-X
- Timofte, D., Maciuca, I.E., Evans, N.J., Williams, H., Wattret, A., Fick, J.C., Williams, N.J., 2014. Detection and molecular characterization of *Escherichia coli* CTX-M-15 and *Klebsiella pneumoniae* SHV-12  $\beta$ -lactamases from bovine mastitis isolates in the United Kingdom. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 789-794. doi:10.1128/AAC.00752-13
- Todorović, D., Velhner, M., Grego, E., Vidanović, D., Milanov, D., Krnjaić, D., Kehrenberg, C., 2018. Molecular characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates from bovine clinical nastitis and pigs in the Vojvodina Province, Serbia. *Microb. Drug Resist.* 24, 95-103. doi:10.1089/mdr.2017.0016
- Turrientes, M. C., González-Alba, J. M., del Campo, R., Baquero, M. R., Cantón, R., Baquero, F., & Galán, J. C., 2014. Recombination blurs phylogenetic groups routine assignment in *Escherichia coli*: setting the record straight. *PloS one*, 9, e105395. doi:10.1371/journal.pone.0105395
- Valat, C., Auvray, F., Forest K., Métayer, V., Gay, E., De Garam, C.P., Madec, J.Y., Haenni, M., 2012. Phylogenetic grouping and virulence potential of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* strains in cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 4677-4682. doi:10.1128/AEM.00351-12
- Van Duijkeren, E., Schink, A.K., Roberts, M.C., Wang, Y., Schwarz, S., 2018. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Microbiol. Spectr.*, 6, 10.1128/microbiolspec.ARBA-0019-2017. doi:10.1128/microbiolspec.ARBA-0019-2017
- Van Hoek, A.H.A.M., Veenman, C., Van Overbeek, W.M., Lynch, G., De Roda Husman, A.M., Blaak, H., 2015. Prevalence and characterization of ESBL- and AmpC-producing *Enterobacteriaceae* on retail vegetables. *Int. J. Food Microbiol.* 204, 1-8. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.014
- 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. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.014

- Villa, L., García-Fernández, A., Fortini, D., Carattoli, A., 2010. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 2518-2529. doi:10.1093/jac/dkq347
- Villa, L., Guerra, B., Schmogger, S., Fischer, J., Helmuth, R., Zong, Z., García-Fernández, A., Carattoli, A., 2015. IncA/C plasmid carrying *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>CMY-16</sub>, and *fosA3* in a *Salmonella enterica* serovar Corvallis strain isolated from a migratory wild bird in Germany. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 6597-6600. doi:10.1128/AAC.00944-15
- Vinueza-Burgos, C., Baquero, M., Medina, J., De Zutter, L., 2019. Occurrence, genotypes and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* collected from broiler production chain within an integrated poultry company. *Int. J. Food Microbiol.* 299, 1-7. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2019.03.014
- Walker, R.A., Lawson, A.J., Lindsay, E.A., Ward, L.R., Wright, P.A., Bolton, F.J., Wareing, D.R., Corkish, J.D., Davies, R.H., Threlfall, E.J., 2000. Decreased susceptibility to ciprofloxacin in outbreak-associated multiresistant *Salmonella* Typhimurium DT104. *Vet. Rec.*, 147, 395-396. doi:10.1136/vr.147.14.395
- Wang, L., Rothmund, D., Curd, H., Reeves, P.R., 2003. Species-wide variation in the *Escherichia coli* flagellin (H-antigen) gene. *J. Bacteriol.* 185, 2936-2943. doi:10.1128/jb.185.9.2936-2943.2003
- Wang, X.M., Dong, Z., Schwarz, S., Zhu, Y., Hua, X., Zhang, Y., Liu, S., Zhang, W.J., 2017a. Plasmids of diverse Inc groups disseminate the fosfomycin resistance gene *fosA3* among *Escherichia coli* isolates from pigs, chickens, and dairy cows in Northeast China. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61, e00859-17. doi:10.1128/AAC.00859-17
- Wang, J., Li, Y., Xu, X., Liang, B., Wu, F., Yang, X., Ma, Q., Yang, C., Hu, X., Liu, H., Li, H., Sheng, C., Xie, J., Du, X., Hao, R., Qiu, S., Song, H., 2017b. Antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in Shanghai, China. *Front. Microbiol.* 8, 510. doi:10.3389/fmicb.2017.00510
- Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L.H., Karch, H., Reeves, P.R., Maiden, M.C.J., Ochman, H., Achtman, M., 2006. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol. Microbiol.* 60, 1136-1151. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05172.x
- Woegerbauer, M., Kuffner, M., Domingues, S., Nielsen K.M., 2015. Involvement of *aph(3')-IIa* in the formation of mosaic aminoglycoside resistance genes in natural environments. *Front. Microbiol.* 6, 442. doi:10.3389/fmicb.2015.00442
- Wu, H., Xia, S., Bu, F., Qi, J., Liu, Y., Xu, H., 2015. Identification of integrons and phylogenetic groups of drug-resistant *Escherichia coli* from broiler carcasses in China. *Int. J. Food Microbiol.* 211, 51-56. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.07.004

- Wu, G., Gong, S., Cai, H., Ding, Y., 2018. The availability, price and affordability of essential antibacterials in Hubei province, China. *BMC health services research*, 18, 1013. doi:10.1186/s12913-018-3835-x
- Xia, S., Fan, X., Huang, Z., Xia, L., Xiao, M., Chen, R., Xu, Y., Zhuo, C., 2014. Dominance of CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolated from patients with community-onset and hospital-onset infection in China. *PLoS One* 9, e100707. doi:10.1371/journal.pone.0100707
- Xu, G., An, W., Wang, H., Zhang, X., 2015. Prevalence and characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase genes in *Escherichia coli* isolated from piglets with post-weaning diarrhea in Heilongjiang province, China. *Front. Microbiol.* 6, 1103. doi:10.3389/fmicb.2015.01103
- Yan, H., Yu, R., Li, D., Shi, L., Schwarz, S., Yao, H., Li, X.S., Du, X.D., 2020. A novel multiresistance gene cluster located on a plasmid-borne transposon in *Listeria monocytogenes*. *J. Antimicrob. Chemother.* 75, 868-872. doi:10.1093/jac/dkz545
- Yang, F., Zhang, S., Shang, X., Wang, X., Wang, L., Yan, Z., Li, H., 2018. Prevalence and characteristics of extended spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* from bovine mastitis cases in China. *J. Integr. Agric.*, 17, 1246-1251. doi:10.1016/S22095-3119(17)61830-6
- Yang, X., Liu, W., Liu, Y., Wang, J., Lv, L., Chen, X., He, D., Yang, T., Hou, J., Tan, Y., Xing, L., Zeng, Z., Liu, J.H., 2014. F33: A- B-, IncHI2/ST3, and IncI1/ST71 plasmids drive the dissemination of *fosA3* and *bla*<sub>CTX-M-55/-14/-65</sub> in *Escherichia coli* from chickens in China. *Front. Microbiol.* 5, 688. doi:10.3389/fmicb.2014.00688
- Zhao, W.H., Hu, Z.Q., 2013. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in gram-negative bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* 39, 79-101. doi:10.3109/1040841X.2012.691460
- Zhang, W.J., Xu, X.R., Schwarz, S., Wang, X.M., Dai, L., Zheng, H.J., Liu, S., 2014. Characterization of the IncA/C plasmid pSCEC2 from *Escherichia coli* of swine origin that harbours the multiresistance gene *cfr*. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 385-389. doi:10.1093/jac/dkt355
- Zhang, W.J., Wang, X.M., Dai, L., Hua, X., Dong, Z., Schwarz, S., Liu, S., 2015. Novel conjugative plasmid from *Escherichia coli* of swine origin that coharbors the multiresistance gene *cfr* and the extended-spectrum- $\beta$ -lactamase gene *bla*<sub>CTX-M-14b</sub>. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 1337-1340. doi:10.1128/AAC.04631-14
- Zheng, H., Zeng, Z., Chen, S., Liu, Y., Yao, Q., Deng, Y., Chen, X., Lv, L., Zhuo, C., Chen, Z., Liu, J.H., 2012. Prevalence and characterisation of CTX-M  $\beta$ -lactamases amongst *Escherichia coli* isolates from healthy food animals in China. *Int. J. Antimicrob. Agents* 39, 305-310. doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.12.001

- Zurfluh, K., Abgottspon, H., Hächler, H., Nüesch-Inderbini, M., Stephan, R., 2014. Quinolone resistance mechanisms among extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* isolates from rivers and lakes in Switzerland. PLoS One 9, e95864. doi:10.1371/journal.pone.0095864
- Zurfluh, K., Nüesch-Inderbini, M., Morach, M., Berner, A.Z., Hächler, H., Stephan, R., 2015. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolated from vegetables imported from the Dominican Republic, India, Thailand, and Vietnam. Appl. Environ. Microbiol. 81, 3115-3120. doi:10.1128/AEM.00258-15



## 10 Publikationsverzeichnis

### 10.1 Publikationen

Michael, G.B., **Freitag, C.**, Feßler, A.T., Wendlandt, S., Eidam, C., Entorf, M., Lopez, G., Riesenber, A., Blodkamp, S., Schwarz, S., Kadlec, K., 2014. Antimicrobial resistance, ESBL and MRSA – Definitions and laboratory diagnostics. Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 127, Heft 339-348. doi:10.2376/0005-9366-127-339

Michael, G.B., **Freitag, C.**, Wendlandt, S., Eidam, C., Feßler, A.T., Lopes, G.V., Kadlec, K., Schwarz, S., 2015. Emerging issues in antimicrobial resistance of bacteria from food-producing animals. Future Microbiol. 10, 427-443. doi:10.2217/fmb.14.93

**Freitag, C.**, Michael, G.B., Kadlec, K., Hassel, M., Schwarz, S., 2016. Detection of plasmidborne extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) genes in *Escherichia coli* isolates from bovine mastitis. Vet. Microbiol. 200, 151-156. doi:10.1016/j.vetmic.2016.08.010

**Freitag, C.**, Michael, G.B., Li J., Kadlec, K., Wang Y., Hassel, M., Schwarz, S., 2018. Occurrence and characterisation of ESBL-encoding plasmids among *Escherichia coli* isolates from fresh vegetables. Vet. Microbiol. 219, 63-69. doi:10.1016/j.vetmic.2018.03.028

### 10.2 Poster

**Freitag, C.**, Michael, G.B., Kadlec, K., Hassel, M., Schwarz, S., 2014. Detection of plasmidborne extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) genes in *Escherichia coli* isolates from vegetables; Tagung der DVG Fachgruppe „Bakteriologie und Mykologie“ 26.-28.06.2014, Freising, Deutschland.

**Freitag, C.**, Michael, G.B., Kadlec, K., Hassel, M., Schwarz, S., 2015. Detection of plasmidborne extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) genes in *Escherichia coli* isolates from bovine mastitis; 6<sup>th</sup> Symposium on Antimicrobial Resistance in Animals and the Environment 29.06.-01.07.2015, Tours, Frankreich.

**Freitag, C.**, Michael, G.B., Kadlec, K., Hassel, M., Schwarz, S., 2016. Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolates from bovine mastitis, Tagung der DVG Fachgruppe „Bakteriologie und Mykologie“ 31.08.-02.09.2016, Jena, Deutschland.

**Freitag, C.**, Michael, G.B., Kadlec, K., Hassel, M., Schwarz, S., 2016. Characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and ESBL gene-carrying plasmids of isolates from bovine mastitis, National Symposium on Zoonoses Research, 13.-14.10.2016, Berlin, Deutschland.

**Freitag, C.**, Michael, G.B., Li, J., Kadlec, K., Wang, Y., Hassel, M., Schwarz, S., 2017. Occurrence and characterization of ESBL-producing plasmids among *Escherichia coli* isolates from fresh vegetables, 7<sup>th</sup> Symposium on Antimicrobial Resistance in Animals and the Environment 26.-28.06.2017, Braunschweig, Deutschland.

**Freitag, C.**, Michael, G.B., Li, J., Kadlec, K., Wang, Y., Hassel, M., Schwarz, S., 2017. Multidrug-resistant extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates originating from fresh vegetables, National Symposium on Zoonoses Research, 12.-13.10.2017, Berlin, Deutschland.

## 11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit unterstützt haben.

Meinem Doktorvater Professor Dr. Stefan Schwarz möchte ich für die hervorragende und stets konstruktive und engagierte Betreuung danken. Vor Allem aber auch für die große Hilfsbereitschaft auch im privaten Rahmen und die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, durch welche ich großartige Menschen kennenlernen durfte und wunderbare Freundschaften schließen konnte.

Frau Dr. Gabriele Luhofer danke ich, da sie die den Grundstein für die Doktorarbeit gelegt hat. Die Grundidee zu der Arbeit, den Vorschlag Stefan als Doktorvater zu wählen und die Kontaktherstellung mit ihm brachte den Stein ins Rollen. Herzlichen Dank dafür.

Ein großes Dankeschön möchte ich an Dr. Geovana Brenner Michael, PhD richten. Liebe Geovana, danke für deine perfekte Betreuung und immer freundliche Unterstützung und vor allem auch für die schöne Zeit, die ich mit dir auch im privaten Bereich verbringen durfte. Du warst immer für mich da und ein großes Vorbild für mich. Deine Motivation, Kraft und Ausdauer ist bemerkenswert und hat mich mitgerissen. Danke, dass du dies alles trotz deiner eigenen Arbeit für mich aufgebracht hast. Ich danke dir für deine Freundschaft und die schönen Abende mit deinen Freunden, die mich alle lieb aufgenommen haben.

Bedanken möchte ich mich auf diesem Wege auch bei PD Kristina Kadlec, PhD, da sie, ohne zu zögern, die zwischenzeitliche Betreuung der Arbeit in Mariensee übernommen hatte, als die Arbeitsgruppe um Stefan nach Berlin gezogen ist. Danke für deine Hilfe, deine Freundschaft und das Korrekturlesen.

Auch Anne-Kathrin Schink, PhD danke ich für ihre gewissenhafte Korrektur und die damit verbundene Zeit, die sie sich dafür genommen hat.

Ein besonderer Dank gilt auch Dr. Melanie Hassel für die Hilfe bei der Kontaktaufnahme mit Stefan, die Einarbeitung im LUA, ihren Einsatz und ihren Glauben an mich.

An dieser Stelle danke ich auch Frau Dr. Zeiher, die mir durch ihre Organisation im LUA eine Doktorarbeit neben meiner Anstellung ermöglicht hat.

Der Arbeitsgruppe im Institut für Nutztiergenetik des Friedrich-Loeffler-Instituts (Roswitha Becker, Ute Beermann, Julian Brombrach, Heinke Eylers, Vivian Hensel, Regina Ronge) und dem MiBi Team des LUA (Nathalie Becker, Christiane Dillenburger, Beate Esser, Sabine Faßbender, Ayten Haykir, Andrea Noetzel, Bärbel Rosner, Marietta Wloch und Stephanie Zimmermann) danke ich für die großartige Aufnahme und die Unterstützung beim Herstellen von Medien, Organisation von Proben, Einarbeitung in die Methoden und sonstige

Hilfe, auch wenn es „nur“ ein offenes Ohr und das Teilen von fröhlichen Laborstunden war. Vor allem ein Dank an Roswitha für die großartige Unterstützung und Einarbeitung im Labor, die lieben Gespräche und die Himbeersträucher, an denen ich mich immer noch erfreuen und dann an dich denken kann. Auch möchte ich in diesem Rahmen besonders Ute danken, ebenfalls für die unermüdliche Unterstützung und Hilfe im Labor und die Aufheiterungen durch dein herzliches Wesen und deine humorvolle Art. Dein „Moin“ hat immer dazu geführt, dass ich mich „daheim“ gefühlt habe.

Ich danke Dr. Andrea T. Feßler, PhD für die Ablenkung und schönen Abende neben der Arbeit. Das „triste“ Mariensee am Abend wurde dank dir sehr lustig.

Ein großer Teil meines Dankes gilt vor allem auch meinen Eltern, meiner Schwester und meinen Freunden, die mich alle stets unterstützt und Verständnis hatten, wenn ich mal wieder meine Abende und Wochenenden im Labor oder am Schreibtisch verbringen musste. Herausheben muss ich hier meine Eltern, danke einfach für alles und dass ihr immer für mich da seid. Jens, danke für dein Verständnis und die Hilfe durch die Krisen. Danke Ellen für den Erfahrungsaustausch mit deiner Zeit als voll im Berufsleben stehende externe Doktorandin. Dadurch hast du mir Sicherheit und Motivation verschafft und aus der Krise der Schreibblockade geholfen. Hannah, danke für deine tiefe Freundschaft seit dem Kindergarten und die Unterstützung bei der Grafik. Ich habe Euch alle sehr lieb.

Ihr alle habt dadurch, teils ohne es zu wissen, einen großen Teil dazu beigetragen, dass ich diese Arbeit erfolgreich abschließen konnte.

Ich danke Euch allen von ganzem Herzen, in dem Ihr immer einen Platz haben werdet.

## **12 Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 28.10.2020

Christin Clivia Maria Freitag









