Molekulare Charakterisierung der multiplen Antibiotikaresistenz in deutschen und europäischen *Salmonella enterica* Isolaten

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie

der Freien Universität Berlin



vorgelegt von

Dipl.-Biol. Janine Sandra Beutlich

aus Berlin

August 2011

Diese Dissertation wurde zwischen Februar 2008 und August 2011 am Bundesinstitut für Risikobewertung in der Abteilung 4 "Biologische Sicherheit", Fachgruppe 46 "Antibiotikaresistenz und Resistenzdeterminanten" unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Bernd Appel und Frau Dr. Beatriz Guerra angefertigt.

Diese Arbeit wurde vom Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR: 45-003, 45-004, 46-001) und vom EU Network of Excellence MedVetNet (WP 21 und 26) finanziert.

1. Gutachter: Prof. Dr. Bernd Appel

Bundesinstitut für Risikobewertung

Abteilung 4 "Biologische Sicherheit"

Diedersdorfer Weg 1

12277 Berlin

2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Freie Universität Berlin

Institut für Biologie; Arbeitsgruppe Mikrobiologie

Königin-Luise-Str. 12-16

14195 Berlin

Disputation am 13.01.2012

We are living in a bacterial world, a microbial world. Our evolution has taken place within that environment. Bacteria have seen dinosaurs come and dinosaurs go. They are not going to be destroyed.

(Stuart B. Levy)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Die Gattung Salmonella	2
1.1.1 Klassifikation und allgemeine Charakteristika	2
1.1.2 Epidemiologie	4
1.1.3 Nichttyphoidale Salmonellen als Krankheitserreger beim Menschen	5
1.1.4 Virulenzdeterminanten	7
1.1.4.1 Pathogenitätsinseln	7
1.1.4.2 Virulenzplasmide	
1.1.5 Typisierungsverfahren	10
1.1.5.1 Phänotypische Untersuchungsmethoden	10
1.1.5.1.1 Antimikrobielle Resistenzbestimmung	10
1.1.5.2 Molekularbiologische Untersuchungsmethoden	11
1.1.5.2.1 Plasmidanalyse	11
1.1.5.2.2 Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus	11
1.1.5.2.3 Pulsfeldgelelektrophorese	
1.1.5.2.4 Polymerase-Kettenreaktion	
1.1.5.2.5 Multilocus Variable Number Tandem Repeat Analyse	
1.1.5.2.6 Multilocus Sequence Typing	
1.2 Antibiotika und Antibiotikaresistenz	
1.2.1 Biochemische Grundlagen der Antibiotikaresistenz	16
1.2.1.1 Enzymatische Inaktivierung und Modifikation	16
1.2.1.1.1 Enzymatische inaktivierung von 5-Laktam-Antibiotika durch	17
D-Laktalliasell	17
1.2.1.1.2 Enzymatische Modifikation von Phenicolen	17
1.2.1.1.5 Enzymatische Mounikation von Friencolen	
1.2.1.2 Mounikation des Antioiotikataigets	19
1 2 1 2 2 Resistenz gegen Chinolone und Fluorchinolone	20
1 2 1 2 3 Resistenz gegen Aminoklykoside	21
1.2.1.3 Reduzierte intrazelluläre Akkumulation durch veränderte	
Zellpermeabilität und aktive Effluxsysteme	
1.2.1.3.1 Phenicol-Exporter	
1.2.1.3.2 Tetrazyclin-Effluxproteine	
1.2.2 Genetische Grundlagen der Antibiotikaresistenz	
1.2.2.1 Mutationen	
1.2.2.2 Horizontaler Transfer von Antibiotika-Resistenzgenen	
1.2.2.2.1 Integrons	
1.2.2.2.2 Transposons	
1.2.2.2.3 Plasmide	

1.2.2.2.4	Genomische Inseln	
]	Beispiel: Salmonella Genomic Island 1 (SGI1)	
1.3 Aufgabens	tellung und Themenübersicht dieser Arbeit	
1.3.1 Multire	esistenz in Deutschland	
1.3.2 Multire	esistenz in Europa	
1.3.3 Multire	esistenz-assoziierte Plasmide	
2 Material und N	Methoden	32
2.1 Material		
2.1.1 Nährm	edien, Puffer und Lösungen, Reaktionskits	
2.1.2 Oligon	ukleotide	
2.1.3 Softwa	are	
2.1.4 Stamm	auswahl	
2.1.4.1 Stän	nme zur Charakterisierung von S. Saintpaul Isolaten	
2.1.4.2 Stän	nme zur Charakterisierung von europäischen Salmonella	
Gen	omic Island 1 (SGI1) positiven Salmonella enterica Isolaten	41
2.1.4.3 Stän	nme zur Charakterisierung europäischer S. Newport Isolate	
2.1.4.4 Stän	nme zur Charakterisierung von Virulenz-Resistenz-Plasmiden.	
2.1.5 Refere	nzstämme	
2.2 Methoden.		
2.2.1 Phänot	typische Methoden	
2.2.1.1 Serc	otypie	
2.2.1.2 Phag	gentypisierung	
2.2.1.3 Stan	nmhaltung und Wachstumsbedingungen	
2.2.1.4 Anti	biotika-Empfindlichkeitsprufung mittels Bouillon-	4 5
	rodilution	
2.2.1.5 Anti	ibiotika-Empfindlichkeitsprufung mittels Agardiffusionstest	45
2.2.1.0 Allu Dilu	ibioura-Emplificationspruttung mittels Agar-	10
	iliolisiieulode	
2.2.1.7 Dou	infaktionsmittel Pasistenztest (Tricloson)	
2.2.1.0 Desi	istenztest gegen organische Lösungsmittel	
2.2.1.9 Kest	ularbiologische Methoden	
2.2.2 Work	rmale Zellyse Methode zur Extraktion genomischer DNA	
2.2.2.1 Pho	merase-Kettenreaktion (PCR)	51
2.2.2.3 Aga	rose-Gelelektrophorese	52
2.2.2.4 DN/	A-Sequenzierung und Sequenzanalyse	
2.2.2.5 Puls	sfeldgelelektrophorese (PFGE)	
2.2.2.5.1	Extraktion der genomischen DNA in Agarose-Blöckchen	
2.2.2.5.2	Restriktionsendonuklease-Verdau	
2.2.2.5.3	Pulsfeldgelelektrophorese	55
2.2.2.6 Plas	midanalyse	
2.2.2.6.1	Minipräparation nach Kado und Liu (1981)	
2.2.2.6.2	Minipräparation nach Birnboim und Doly (1979)	57
2.2.2.6.3	Maxipräparation	
2.2.2.6.4	Restriktionsanalyse (RFLP)	
2.2.2.6.5	S1-Nuklease-Verdau	
2.2.2.6.6	Inkompatibilitätsgruppen-Bestimmung	59
2.2.2.6.7	Konjugation	59
2.2.2.6.8	Triparental Mating	59

	2.2.2.6	5.9 Transformation	
	2.2.2.6	5.10 DNA-Sequenzierung mittels Primerwalking	61
2	2.2.2.7	DNA-DNA-Hybridisierung	61
	2.2.2.7	7.1 Southern Blot Methode	61
	2.2.2.7	7.2 DNA-Sondenpräparation	
	2.2.2.7	7.3 Prä-Hybridisierung und Hybridisierung	
	2.2.2.7	7.4 Post-Hybridisierung	
2	2.2.2.8	MLVA	
2	2.2.2.9	MLST	64
2.2.	.3 S	tatistische Methoden	
3 Erg	ebniss	e	66
3.1	Multi	resistenz in Deutschland	67
3.1	.1 N	Iultiresistente S. Saintpaul Isolate in deutschen Truthühnern	
	u	nd den daraus gewonnenen Lebensmitteln	67
3	3.1.1.1	Hintergrund der Studie	67
3	3.1.1.2	Phänotypische Charakterisierung der Antibiotikaresistenz	
3	3.1.1.3	Charakterisierung der Resistenz gegenüber organischen	
		Lösungsmitteln und Desinfektionsmitteln	
3	8.1.1.4	Genotypische Charakterisierung der Antibiotikaresistenz	71
3	3.1.1.5	Molekulare Typisierung	75
3	3.1.1.6	Aus dieser Studie hervorgegangene Veröffentlichungen	
3.2	Multi	resistenz in Europa: Studien an europäischen Salmonella	
	enteri	ca Isolaten im Rahmen des Exzellenznetzwerks MedVetNet	
3.2	.1 A	ntimikrobielle Resistenz und Virulenz-Determinanten in	
	e	uropäischen Salmonella Genomic Island 1 (SGI1) positiven	
	S	almonella enterica Isolaten unterschiedlicher Herkunft	
3	3.2.1.1	Hintergrund der Studie	
3	3.2.1.2	Phänotypische Charakterisierung der Antibiotikaresistenz	
3	3.2.1.3	Genotypische Charakterisierung der Antibiotikaresistenz	
3	3.2.1.4	Kartierung der SGI1-Region in "unkonventionellen" Isolaten	
3	3.2.1.5	Virulotyping	
3	8.2.1.6	Molekulare Typisierung	
3	3.2.1.7	Aus dieser Studie hervorgegangene Veröffentlichungen	
3.2	.2 Io	lentifizierung und Charakterisierung von multiresistenten	
	e	uropäischen S. Newport Isolaten (SGI1-positiv und –negativ)	
-	u	nterschiedlicher Herkunft	
3	3.2.2.1	Hintergrund der Studie und epidemiologische Daten	
3	3.2.2.2	Phänotypische Charakterisierung der Antibiotikaresistenz	
3	3.2.2.3	Genotypische Charakterisierung der Antibiotikaresistenz und	<u>.</u>
		Identifizierung von SGI1-Determinanten	
3	3.2.2.4	Molekulare Typisierung	
3	5.2.2.5	Aus dieser Studie hervorgegangene Veröffentlichung	
3.3	Multi	resistenz-assoziierte Plasmide: Studien an europäischen	
	Salmo Mady	<i>nella enterica</i> Isolaten im Kanmen des Exzelienznetzwerks	100
2.2		eliver aines DMOD übertragender	100
3.3	.1 A	maryse ennes FiviQK ubertragenden <i>qnrb</i> -Plasmids in einem SGII	100
2	p	Usitiven 5. 1 yphilliumun numan-isolat aus den Niederlanden	100
2	2.3.1.1	Desmid Analyse	100
3		1 Iashinu-Allatyst	100

3.3.1	.3 Sequenz-Analyse	101
3.3.1	.4 Aus dieser Studie hervorgegangene Veröffentlichungen	104
3.3.2	Identifizierung und Charakterisierung von Virulenz-Resistenz-	
	Plasmiden in multiresistenten S. Typhimurium Isolaten	105
3.3.2	.1 Hintergrund der Studie	105
3.3.2	.2 Identifizierung <i>bla</i> -positiver Isolate	106
3.3.2	.3 Charakterisierung bla_{OXA-1} -InH-like-positiver Isolate	107
3.3.2	.4 Charakterisierung <i>bla</i> _{TFM-1} - <i>dfrA12</i> -positiver Isolate	110
3.3.2	.5 Charakterisierung der Virulenz-Resistenz-Plasmide bei	
	<i>bla</i> _{TEM-1} - <i>dfrA12</i> -positiven Isolaten	110
3.3.2	.6 Aus dieser Studie hervorgegangene Veröffentlichungen	113
4 Diskus	sion	114
4.1 M	ultiresistenz in Deutschland	115
4.1.1	Multiresistente S. Saintpaul Isolate in deutschen Truthühnern und den	
	daraus gewonnenen Lebensmitteln	115
4.1.1	.1 Epidemiologische Bedeutung	115
4.1.1	.2 Das Problem der antimikrobiellen Multiresistenz	116
4.1.1	.3 Identifizierung und Charakterisierung einer klonalen Linie	118
4.1.1	.4 Abschließende Betrachtungen und Ausblick	119
4.2 M	ultiresistenz in Europa: Studien an europäischen Salmonella	
en	terica Isolaten im Rahmen des Exzellenznetzwerks MedVetNet	120
4.2.1	Antimikrobielle Resistenz und Virulenz-Determinanten in	
	europäischen Salmonella Genomic Island 1 (SGI1) positiven	
	Salmonella enterica Isolaten unterschiedlicher Herkunft	120
4.2.1	.1 Serovarspezifität versus Variabilität	120
4.2.1	.2 Identifizierung von <i>aadB</i> -assoziierten SGI1-Varianten	121
4.2.1	.3 Kartierung "unkonventioneller" Isolate	123
4.2.1	.4 Abschließende Betrachtungen und Ausblick	124
4.2.2	Identifizierung und Charakterisierung von multiresistenten	
	europäischen S. Newport Isolaten (SGI1-positiv und –negativ)	
	unterschiedlicher Herkunft	125
4.2.2	.1 Epidemiologische Bedeutung	125
4.2.2	.2 SGI-Varianten	126
4.2.2	.3 Abschließende Betrachtungen und Ausblick	127
4.3 M	ultiresistenz-assoziierte Plasmide: Studien an europäischen	
Sa	Imonella enterica Isolaten im Rahmen des Exzellenznetzwerks	
Μ	edVetNet	128
4.3.1	Analyse eines PMQR übertragenden qnrB-Plasmids in einem SGI1	
	positiven S. Typhimurium Human-Isolat aus den Niederlanden	128
4.3.1	.1 Identifizierung und Charakterisierung eines qnrB19-ColE-Plasmids	128
4.3.1	.2 Epidemiologie von qnrB19-ColE-Plasmiden	129
4.3.1	.3 Abschließende Betrachtungen und Ausblick	130
4.3.2	Charakterisierung von Virulenz-Resistenz-Plasmiden in	
	multiresistenten S. Typhimurium Isolaten	130
4.3.2	.1 Identifizierung und Epidemiologie von pUO-StVR2	130
4.3.2	.2 Identifizierung von $bla_{\text{TEM-1}}$ - $dfrA12$ -Plasmiden	132
4.3.2	.3 Abschließende Betrachtungen und Ausblick	133
4.4 Fa		134

5	Zusammenfassung	
6	Summary	
7	Literaturverzeichnis	141
8	Danksagung	162
9	Lebenslauf	
10	Anhang	

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Ein PCR-Zyklus in schematischer Darstellung13
Abbildung 1.2:	Antibiotikatargets und Resistenzmechanismen23
Abbildung 1.3:	Lineare Darstellung der kompletten SGI1
	und der flankierenden Regionen29
Abbildung 2.1:	Standard-Antibiogramm nach der Methode der
	Plattendiffusion46
Abbildung 2.2:	Schematische Darstellung der Antibiotika-
	Empfindlichkeisprüfung mittels Agar-Dilutionsmethode49
Abbildung 3.1:	XbaI-PFGE-Profile repräsentativer S. Saintpaul Isolate77
Abbildung 3.2:	BlnI-PFGE-Profile repräsentativer S. Saintpaul Isolate
Abbildung 3.3:	Dendrogramm der kombinierten XbaI-BlnI-Profile79
Abbildung 3.4:	Schematische Darstellung der SGI1 flankierenden Regionen83
Abbildung 3.5:	Plasmidprofile für eine Auswahl von 18 S. Typhimurium Isolaten86
Abbildung 3.6:	XbaI-PFGE-Profile (X) repräsentativer Isolate87
Abbildung 3.7:	Dendrogramm der MLVA-Profile der 23 S. Typhimurium Isolate88
Abbildung 3.8:	Minimal-spanning Tree aus den Allel-Profilen der
	Isolate (<i>n</i> = 39)
Abbildung 3.9:	Southern Blot/Hybridisierung der Plasmid-DNA des
	S. Typhimurium Isolats STSGI-15101
Abbildung 3.10:	Physikalische Karte von Plasmid pSGI15102
Abbildung 3.11:	Plasmidgrößenbestimmung durch S1-Nuklease-Verdau bei
	<i>bla</i> _{TEM-1} - <i>dfrA12</i> -positiven Isolaten111
Abbildung 3.12:	XbaI-PFGE-Profile (X) repräsentativer Isolate112
Abbildung 4.1:	SGI1-Varianten in Korrespondenz zu dem in den Isolaten
	detektierten Gen-Repertoire

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1:	Laborgeräte
Tabelle 2.2:	Verbrauchsmaterialien34
Tabelle 2.3:	Chemikalien und Enzyme34
Tabelle 2.4:	Nährmedien36
Tabelle 2.5:	Puffer und Lösungen37
Tabelle 2.6:	Reaktionskits
Tabelle 2.7:	Referenzstämme43
Tabelle 2.8:	Standard-Antibiogramm: Interpretationsstandard
	der Hemmhof-Durchmesser für Enterobacteriaceae47
Tabelle 2.9:	ß-Laktam-Antibiogramm: Interpretationsstandard
	der Hemmhof-Durchmesser für Enterobacteriaceae47
Tabelle 2.10:	Beispiel zur Herstellung von Agardilutionsplatten49
Tabelle 2.11:	Standardprogramm des Thermocyclers
Tabelle 3.1:	ß-Lactam Empfindlichkeitstests in deutschen
	S. Saintpaul Isolaten $(n = 55)$ 70
Tabelle 3.2:	Resistenz gegen einzelne Antibiotika und Prävalenz ausgewählter
	Resistenzgene in deutschen S. Saintpaul Isolaten $(n = 55)$
Tabelle 3.3:	Phäno- und Genotypische Determinanten der Antibiotikaresistenz
	in deutschen S. Saintpaul Isolaten $(n = 55)$
Tabelle 3.4:	Phänotypische Antibiotikaresistenz und molekulare Typisierung
	in deutschen S. Saintpaul Isolaten $(n = 55)$
Tabelle 3.5:	Detektion von SGI1, Virulenz- und Resistenz-Determinanten84
Tabelle 3.6:	Klasse 1 Integrons in den SGI1 positiven Isolaten ($n = 38$)85
Tabelle 3.7:	Molekulare Typisierung der 38 Salmonella Isolate dieser Studie89
Tabelle 3.8:	S. Newport Einsendungen der Projektpartnerinstitute ($n = 559$)
Tabelle 3.9:	Detektion von SGI1 und Resistenz-Determinanten
	in europäischen S. Newport Isolaten $(n = 51)$
Tabelle 3.10:	Molekulare Typisierung der 51 S. Newport Isolate dieser Studie97
Tabelle 3.11:	Virulenz-Resistenz-Plasmide und Resistenz-Determinanten
	in S. Typhimurium Isolaten108
Tabelle 3.12	Detektion von Virulenz-Resistenz-Plasmiden, Resistenz- und
	Virulenz-Determinanten in S. Typhimurium Isolaten109

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AAC	N-Acetyltransferasen
AFSSA	Agence Française de Sécurité Sanitare des Aliments [seit 1. Juli
	2010: Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation
	de l'environnement et du travail (ANSES)]
Δ1a	Alanin
	Amovicillin Cleuvlensöure
AMP	
ANI	O-Nucleotidyltransferasen
APH	O-Phosphotransferasen
Aqua bidest.	zweitach destilliertes Wasser
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
ATCC	engl. American Type Culture Collection
AZM	Aztreonam
BfR	Bundesinstitut für Risiokobewertung
BfT	Bundesverband für Tiergesundheit
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
С	Cvtosin
°C	Grad Celsius
ca	zirka
САТ	Chloramphenicol-O-Acetyltransferasen
CAZ	Ceftazidim
ccd	engl coupled cell division
CEE	Conhelothin
	Cepharounin
	engl. confidence interval
CIP	
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
cm	Zentimeter
COL	Colistin
CPD	Cefpodoxim
CRO	Ceftriaxon
CS	engl. conserved segment
CSB	engl. cell suspension buffer
CTX	Cefotaxim
CVI	Central Veterinary Institute
CXM	Cefuroxim
D	Deutschland
DHFR	Dihydrofolat-Reduktase
DHPS	Dihvdropterat-Synthetase
DI	Simpson's Index für Diversität
DIG	Digoxigenin
DK	Dänemark
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desovyribonukleinsäure
DNA	Desoxynoonukienisaure

dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DT	Definitiv Typ (Phagentypie-Schema von S. Typhimurium)
E	Spanien
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFSA	European Food Safety Authority
EMB	Eosin Methylenblau
ESBLs	Extended Spectrum B-Laktamasen
et al	lat et alij (und andere)
etc	et cetera
FII	Europäische Union
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Suscentibility Testing
EUCASI	European Committee on Antimicroolar Susceptionity Testing
Г ЕГО	
FLO	Coforitin
FUX	Celoxiuii
G	Guanin
g	Gramm
GALT	engl. gut-associated-lymphatic-tissue
GB	Großbritannien
GEN	Gentamicin
Gly	Glycin
Н	Ungarn
h	Stunde
HCL	Salzsäure
HPA	Health Protection Agency
Ι	Italien
i	intermediär
IfSG	Infektionsschutzgesetz
IMP	Imipenem
Inc	Inkompatibilitätsgruppe
IS	Insertionssequenzen
ISCIII	Instituto de Salud Carlos III
ISS	Istituto Superiore di Sanità
KAN	Kanamycin
kb	Kilohasen
KBE	koloniebildende Finheiten
	Lurio Bortoni
	Luria Dertain linka Salmonalla Conomia Island 1 Junction
LJ	Molor
	Morahaan
MD	
MDR	engi. multiple drug resistance
MHK	Minimale Hemmstoffkonzentration
min	Minuten
ml	Milliliter
MLST	Multilocus Sequence Typing
MLVA	Multilocus Variable Number Tandem Repeat Analyse
mM	Millimolar
mm	Millimeter
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid

NAL	Nalidixinsäure
NaOH	Natronlauge
nd	nicht durchgeführt
NEO	Neomycin
NL	Niederlande
NRL-Salm	Nationales Referenzlabor zur Durchführung von Analysen und
	Tests auf Zoonosen (Salmonellen)
NT	nicht typisierbar (Phagentypie)
OD	Optische Dichte
ORF	engl open reading frame
oriV	engl origin of vegetative replication
Penta	nhänotynische Pentaresistenz
Penta_R	genotypische Pentaresistenz
	and nolymerese chain reaction
rCK	eligi. poryinerase chain reaction
pej	plasmu-encoded mnomae
PFGE	Puisteidgeleiektrophorese
рН	pH-Wert (negativ dekadischer Logarithmus der
	Wasserstoffionenkonzentration)
Phe	Phenylalanin
PIP	Piperacillin
PL	Polen
pmol	Pikomol
PMQR	engl. plasmid mediated quinolone resistance
pSTV (auch pSLT)	Virulenzplasmid von S. Typhimurium LT2
PZH	Panstwowy Zaklad Higieny
QRDR	engl. quinolone resistance-determining region
R	resistent
rck	engl. resistance to complement killing
RDNC	engl. reaction did not conform
R-Gene	Resistenzgene
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RI	Resistenzintegrons
RJ	rechte Salmonella Genomic Island 1 Junction
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rnm	engl rounds per minute
rsk	regulation of serum killing
PT	Roumtemperatur
S S	sansibal
S C	Scholla entering subon entering Serouer
5.	Salmoneua emerica suosp. emerica Scioval
S	
sam	engl. Saimonella mutagenesis
	engl. Salmonella containing vesicles
SDS	engl. Sodiumdodecylsulfat
Ser	Serin
SGII	Salmonella Genomic Island I
SI	Superintegrons
SNP	engl. Single Nucleotide Polymorphism
SPE	Spectinomycin
SPI	Salmonella Pathogenitätsinseln
	-

spv	Salmonella plasmid virulence
ŜSC	Natriumcitrat
SSI	Statens Serum Institute
ST	Sequenztyp
STR	Streptomycin
SUL	Sulfamethoxazol
SXT	Trimethoprim-Sulfamethoxazol
Т	Tymin
T _A	Annealing Temperatur
T _e	Elongationszeit
T1SS	Typ-1-Sekretionssystem
T3SS	Typ-3-Sekretionssystem
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TET	Tetracyclin
TIC	Ticarcillin
TMP	Trimethoprim
Tn	Transposon
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
tRNA	transfer-RNA
TSR	engl. template supression reagent
Tyr	Tyrosin
U	Unit
u. a.	unter anderem
UK	United Kingdom
ити	engl. UV-induced mutagenesis
UPGMA	engl. unweighted pair group method with arithmetic averages
USA	United States of America
usw.	und so weiter
UV	Ultraviolett
V	Volt
vag	engl. virulence associated genes
VLA	Veterinary Laboratories Agency
VMRI	Veterinary Medical Research Institute
VNTR	engl. variable number of tandem repeats
VS	vermindert sensibel
WHO	World Health Organization
XNL	Ceftiofur
z. B.	zum Beispiel
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μΜ	Mikromolar
μm	Mikrometer

1 EINLEITUNG

1.1 Die Gattung Salmonella

1.1.1 Klassifikation und allgemeine Charakteristika

Die Gattung *Salmonella* wird systematisch der Familie der *Enterobacteriaceae*, Ordnung der *Enterobacteriales* und Klasse der *γ-Proteobakterien*, zugeordnet (Garitty *et al.*, 2004). Der erste mikroskopische Nachweis gelang Karl Joseph Ebert und Robert Koch im Jahr 1880 mit der Entdeckung des heute als *Salmonella* Typhi bekannten Erregers des Typhus abdominalis beim Menschen (Grimont *et al.*, 2000). Die heutige Bezeichnung *Salmonella* wurde erst 1900 von Lignieres zu Ehren des amerikanischen Bakteriologen D. E. Salmon eingeführt (Su und Chiu, 2007).

Salmonellen sind 0,7–1,5 x 2–5 µm große, gram-negative, sporenlose, kurze Stäbchen, die mit Ausnahme von *S*. Gallinarum und *S*. Pullorum durch peritriche Begeißelung beweglich sind. Die Größe des Chromosoms von z. B. *S*. Typhimurium LT2 liegt bei 4857 kb mit einem Guanin-Cytosin (GC) Gehalt von 53% (McClelland *et al.*, 2001). Auf einfachen Nährmedien im aeroben oder fakultativ anaeroben Milieu bilden Salmonellen in der Regel durchschnittlich 2 bis 4 mm große Kolonien (Le Minor, 1984). Sie zählen zu den mesophilen Bakterien, da sie in einem Temperaturbereich von 6 bis 45°C wachsen. Ihr Temperaturoptimum auf den üblichen bakteriologischen Nährböden liegt bei 37°C (D'Aoust, 1989; Selbitz *et al.*, 1995).

Die Nomenklatur von Salmonellen ist bis heute Gegenstand kontroverser Diskussionen und wurde des Öfteren verändert. Erfolgte in der Anfangsphase zunächst eine Zuordnung unter klinischen Gesichtspunkten, so wird das Genus heute basierend auf biochemischen Kriterien in zwei Spezies unterteilt: *Salmonella enterica* und *Salmonella bongori*. Bei der ersten Gruppe werden sechs Subspezies (ssp.) unterschieden: *enterica* (ssp. I), *salamae* (ssp. II), *arizonae* (ssp. IIIa), *diarizonae* (ssp. IIIb), *houtenae* (ssp. IV) und *indica* (ssp. VI) (Popoff *et al.*, 1994; Tindall *et al.*, 2005). Von diesen Gruppen ist hauptsächlich *enterica* mit Erkrankungen beim Menschen und warmblütigen Tieren assoziiert und somit von klinischer Relevanz (Porwollik *et al.*, 2004). *Salmonella bongori* wurde von Le Minor und Popoff (1987) zunächst als Gruppe V klassifiziert, dann jedoch als eigene Art anerkannt (Le Minor und Popoff, 1987; Reeves *et al.*, 1989).

Die serologische Klassifizierung von Salmonellen basiert auf dem immunologischen Nachweis antigener Determinanten auf der Bakterienzelloberfläche. Alle Salmonellen verfügen über somatische O-Antigene, flagellare H-Antigene und kapsuläre Vi-Antigene, die serovar-spezifische Variationen zeigen und somit eine Differenzierung ermöglichen (Popoff und Le Minor, 2001; Popoff *et al.*, 2004). Nach diesem System, dem Kauffmann-White-Le Minor Schema, werden heute mittels Objektträger-Agglutination mit unterschiedlichen Antiseren mehr als 2500 Serotypen unterschieden (Popoff und Le Minor, 2001; Grimont und Weill, 2007; Guibourdenche *et al.*, 2010).

O-Antigene (somatische Antigene) sind thermostabile Bestandteile der Lipopolysaccharide (LPS), die in der äußeren Membran der meisten gram-negativen Bakterien lokalisiert sind. Die LPS besteht aus drei wesentlichen Komponenten: i) Lipid A, bildet den inneren Bereich des LPS und dient der Verankerung in der äußeren Membran; ii) zentrales Oligosaccharid, bestehend aus verschieden Zuckern und Zucker-Derivaten und iii) O-Seitenkette, eine hoch polymorphische Polysaccharidkette, die das O-Antigen bildet und die serologische Spezifität bestimmt (Reeves *et al.*, 1996).

H-Antigene (Geißelantigene) sind hitzelabile Proteinbestandteile der Flagellen, die sich aus Flagellin-Untereinheiten zusammensetzen (Selbitz, 2002). Diese können von zwei verschiedenen chromosomalen Flagellin-Genen (*fli*C und *fli*B) kodiert werden. Die Expression dieser Gene wird durch den Mechanismus der "Phasenvariation" reguliert. Da die meisten *Salmonella* Serovare beide Gene (Phase 1 und Phase 2) exprimieren können, werden sie auch als **diphasisch** bezeichnet. Einige *Salmonella* Stämme sind dagegen **monophasisch** und exprimieren nur eine der beiden Phasen. Beispielsweise fehlt der monophasischen *S.* Typhimurium Variante 1,4,[5],12:i:- die Expression von Phase 2 Flagellen (Switt *et al.*, 2009). Der Nachweis der verschiedenen Phasen erfolgt mittels halbfester Nährmedien, so genannter Schwärmplatten nach Sven Gard. Diese fördern die Geißelausbildung, so dass ein "Schwärmen" auf dem Nährboden beobachtet werden kann. Davon wird die Bestimmung der H-Antigene mittels Objektträger-Agglutination durchgeführt. Die zweite Phase wird auf gleiche Weise mit Hilfe einer "Schwärmplatte" bestimmt, die ein homologes Antiserum zur Hemmung der ersten bekannten Phasen enthält (Koehn, 1970).

Virulenz (Vi)-Antigene (Kapselantigene) können nur von den Serovaren *S.* Typhi, *S.* Paratyphi und *S.* Dublin ausgebildet werden. Sie maskieren die O-Antigene, so dass diese erst nach Hitzeinaktivierung der Vi-Antigene agglutiniert werden können (Selbitz *et al.*, 1995).

Zur weiteren Differenzierung wird die Methode der Phagentypie angewendet, die auf der Eigenschaft von Bakterienviren (Phagen) beruht, spezifisch bestimmte Stämme einer Bakterienspezies zu lysieren. Durch den Einsatz einer Vielzahl verschiedener Phagen ergeben sich charakteristische Lysismuster, die die Identifizierung eines Phagentypen ermöglichen (Olsen *et al.*, 1993; Wichelhaus *et al.*, 2000). Mittlerweile existieren Phagentypie-Systeme für etliche *Salmonella* Serovare. Dennoch kommt diese Methode vor dem Hintergrund

epidemiologischer Fragestellungen insbesondere bei S. Enteritidis und S. Typhimurium zur Anwendung (Threlfall und Frost, 1990; Olsen *et al.*, 1993). Die Phagentypisierung wird normalerweise nur von Referenzlaboratorien und ähnlichen Einrichtungen eingesetzt (Yan *et al.*, 2003).

Eine ebenfalls vielfach eingesetzte Differenzierungsmethode bei Salmonellen ist das Prinzip der Biotypisierung. Es beruht auf den Fermentationseigenschaften der Bakterien und ermöglicht anhand verschiedener biochemischer Reaktionen eine Charakterisierung auf Genus- und Speziesebene (Le Minor, 1984; Wichelhaus *et al.*, 2000). Heute werden hierfür primär kommerziell-erhältliche Testsysteme, sogenannte "Bunte Reihen" eingesetzt. Bei deren Auswertung erhält man einen numerischen Code, mit dem dann mit Hilfe eines Profilindexes das Bakterium identifiziert werden kann (Bockemühl, 1992; Reissbrodt, 1995).

Basierend auf den Empfehlungen des World Health Organization (WHO) Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella* am Pasteur Institut (Paris, Frankreich) (Brenner *et al.*, 2000) wird der Einfachheit halber die Bezeichnung *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (z.B. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Typhimurium) in binominaler Form verwendet. Bei dieser folgt auf die Genusbezeichnung *Salmonella* (*S.*) direkt der Name des Serovars (z.B. *S.* Typhimurium). Die bionominale Bezeichnung wird daher ebenfalls im Text dieser Dissertation verwendet.

1.1.2 Epidemiologie

Die human- und veterinärmedizinische Bedeutung der verschiedenen *Salmonella* Serovare wird auch auf ihre unterschiedlichen Wirtsadaptionen zurückgeführt. Im Fokus von Infektionen bei Warmblütern stehen hauptsächlich die Serovare der Subspezies *enterica* (Brenner *et al.*, 2000; Selbitz, 2002), während *S. bongori* überwiegend bei wechselwarmen Tieren, insbesondere Reptilien, eine Rolle spielt (Selbitz, 2002). Allgemein können die Serovare in folgende epidemiologische Gruppen eingeteilt werden:

• Humanadaptierte Serovare:

Zu diesen gehören die hochvirulenten Serovare S. Typhi und S. Paratyphi A, B und C, die von Mensch zu Mensch übertragen werden und durch Septikämie schwere fieberhafte systemische Erkrankungen verursachen (Köhler und Mochmann, 1980). Die Aufnahme erfolgt oral, wobei die die Infektionsdosis für den erwachsenen Menschen bei 10^4-10^6 Keimen liegt (Robert Koch-Institut, 2009).

• Tieradaptierte Serovare:

Die hierzu zählenden Serovare *S.* Dublin (Rind), *S.* Cholereaesuis (Schwein), *S.* Gallinarum/Pullorum (Geflügel), *S.* Abortusequi (Pferd) und *S.* Abortusovis (Schaf) besitzen eine hohe Wirtspezifität und rufen bei der jeweiligen Tierart charakteristische Krankheitsbilder, wie z. B. septikämische Allgemeinerkrankungen oder Aborte hervor (Selbitz, 2002; Methner, 2005). Auch beim Menschen sind Infektionen mit diesen Serovaren möglich (Selbitz *et al.*, 1995).

• Sporadisch vorkommende, nicht wirtsadaptierte Serovare:

Zu dieser Gruppe gehören Serovare, wie u.a. S. Agona, S. Saintpaul, S. Derby und S. Hadar, die für Mensch und Tier gleichermaßen pathogen sein können (Blaha, 1993).

• Endemisch vorkommende, nicht wirtsadaptierte Serovare:

In den meisten Industrieländern sind *S*. Enteriditis und *S*. Typhimurium die Hauptursachen humaner Salmonellosen (Hendriksen *et al.*, 2011) und können u. a. zu seuchenhaften, enteritischen Infektionen bei Mensch und Tier führen (Selbitz, 2002).

1.1.3 Nichttyphoidale Salmonellen als Krankheitserreger beim Menschen

Alle *Salmonella* Spezies und Serovare gelten als grundsätzlich pathogen für Mensch und Tier. Nichttyphoidale Salmonellen gehören aufgrund der Häufigkeit ihres Auftretens zu den weltweit bedeutendsten Verursachern von infektiöser Gastroenteritis, auch bekannt als Salmonellose (Robert Koch-Institut, 2009). Die Übertragung erfolgt dabei entweder auf direktem Weg oder indirekt über tierische Lebensmittel (Robert Koch-Institut, 2006). Als primäre Infektionsquelle gelten landwirtschaftliche Nutztiere wie Geflügel, Rinder und Schweine sowie die daraus produzierten Lebensmittel. Aus diesem Grund gilt die Salmonellose als klassische Lebensmittelinfektion, die auf eine orale Aufnahme des Erregers

5

zurückzuführen ist. Sie wird vor allem über Rohei enthaltenen Speisen wie Cremes, Patisserie, Mayonnaise und Speiseeis oder häufig auch über rohe bzw. nicht ausreichend erhitzte Fleischerzeugnisse übertragen. Als weitere Infektionsursachen sind auch Kreuzkontaminationen, Übertragung durch Heimtiere oder Ansteckung von Mensch zu Mensch möglich. Beim erwachsenen Menschen liegt die Infektionsdosis nach Angaben des Robert Koch-Instituts (RKI) bei 10^4 bis 10^6 Keimen, während z. B. bei Kindern, älteren und immungeschwächten Personen schon weniger als 100 Keime zum Auslösen einer Erkrankung ausreichend sein können. Abhängig von Infektionsdosis und Serovar liegt die Inkubationszeit zwischen 6 und 72 Stunden. Die Symptome äußern sich in der Regel als akute Darmentzündung mit Durchfall, Kopf- und Bauchschmerzen, häufig auch mit leichtem Fieber, und dauern meist mehrere Tage an. Im Allgemeinen erfolgt bei gastroenteritischem Verlauf keine Antibiotikabehandlung, sondern lediglich ein Ausgleich des Flüssigkeits- und Elektrolytverlusts. Auf diese Weise werden sowohl die Entwicklung multiresistenter Stämme, als auch eine Verlängerung der Bakterienausscheidung verhindert. Bei typhösem Verlauf oder bei Patienten mit besonderer Disposition wird hingegen eine Chemotherapie mit β-Laktam-Antibiotika oder Fluorochinolonen eingeleitet. Die akute infektiöse Gastroenteritis gehört gemäß § 6 Abs. 1 Nr. 2 des Infektionsschutzgesetzes (IfSG) zu den meldepflichtigen Erkrankungen. In Deutschland wurden im Jahr 2008 insgesamt 45.401 Salmonellose-Fälle an das RKI übermittelt. Im Jahr 2006 waren es noch 52.575 Infektionen, während die Zahl der Erkrankungen 2010 nach SurvStat-Angaben (Stand: 23.2.2011; http://www3.rki.de/SurvStat/) auf 25.305 gesunken ist. Insgesamt kann demzufolge ein rückläufiger Trend beobachtet werden. Die beiden dominierenden Serovare sind bei Humaninfektionen S. Enteritidis (60 %) und S. Typhimurium (20 %) (Robert Koch-Institut, 2009). Auf europäischer Ebene sind laut European Food Safety Authority (EFSA) und European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) aufgrund der Daten aus 27 Ländern im Jahr 2009 insgesamt 108.614 humane Salmonella Infektionen gemeldet worden (European Food Safety Authority und European Centre for Disease Prevention and Control, 2011).

Als Voraussetzung zum Auslösen einer Infektion gilt das Eindringen in die Darmschleimhaut und ihre Vermehrung im darmassoziierten Lymphgewebe (GALT, "gut-associated-lymphatictissue") (Bäumler *et al.*, 2000), wobei die Adhäsion an das Darmepithel über die in den Peyerschen Plaques lokalisierten M-Zellen (Microfold-Zellen) erfolgt (Selbitz *et al.*, 1995; Jepson und Clark, 2001; Srinivasan und McSorley, 2006). Dieser Vorgang ist genetisch kodiert und verleiht invasiven Salmonellen die Fähigkeit zur Makropinozytose (Bäumler *et* *al.*, 2000). Anschließend wird in der Lamina propria eine Entzündungreaktion ausgelöst und die Salmonellen werden von Makrophagen aufgenommen (Fahy *et al.*, 2004). Durch die Expression verschiedener Virulenzdeterminanten wie unterschiedlicher Oberflächenproteine und protektiver Enzymsysteme wird das Überleben in den Wirtszellen gesichert (Jones und Falkow, 1996; Selbitz, 2002; Ohl und Miller, 2001). Die hierfür verantwortlichen Gene sind z. B. auf Plasmiden oder in chromosomalen Pathogenitätsinseln lokalisiert (Marcus *et al.*, 2000; Fierer und Guiney, 2001).

1.1.4 Virulenzdeterminanten

1.1.4.1 Pathogenitätsinseln

Bei *Salmonella* sind viele der Gene, die Virulenzfaktoren kodieren, im Genom in Clustern angeordnet, den sogenannten <u>Salmonella Pathogenitätsinseln (SPI)</u>. Diese Regionen können in ihrem GC-Gehalt vom restlichen Genom abweichen und sind oft in tRNA Gene inseriert. Aus diesem Grund wird vermutet, dass sie über horizontalen Gentransfer erworben werden (Marcus *et al.*, 2000). In der Literatur sind bisher insgesamt 10 verschiedene SPI Varianten (SPI1-10) beschrieben worden (Kelly *et al.*, 2009). Da in dieser Dissertation insbesondere die ersten fünf Inseln von Interesse sind, werden diese im Folgenden kurz vorgestellt.

SPI1 hat eine Größe von ca. 40 kb und kodiert ein <u>Typ-3-Sekretionssystem</u> (T3SS). Dieses bildet eine nadel-ähnliche Struktur, über die verschiedene Effektorproteine in die Wirtszelle abgegeben werden. Die SPI1 vermittelte Invasion von *Salmonella* in die Epithelzellen des Wirts wird durch die Translokation von bestimmten Effektoren (z.B. SopB, SopD und SopE) eingeleitet. Dieser Vorgang bewirkt eine temporäre Neuordnung des Cytoskeletts und induziert auf diese Weise die Aufnahme des Bakteriums durch Makropinozytose. Sobald *Salmonella* über die "*Salmonella* <u>containing vesicles"</u> (SCV) in die Wirtszelle eingedrungen ist, werden weitere Effektoren exprimiert, die die SCVs vor diversen Abwehrmechanismen des Wirts schützen. Das Effektorprotein AvrA spielt dabei eine wichtige Rolle bei der Inhibierung von Entzündungsreaktionen und Apoptose der Wirtszellen (Marcus *et al.*, 2000; Schmidt und Hensel, 2004; McGhie *et al.*, 2009; Ibarra und Steele-Mortimer, 2009).

Die **SPI2** bildet eine Insertion von 40 kb im tRNA^{Val} kodierenden, Valin-spezifischen Gen *valV*. Ein Bereich von 25 kb des SPI2 kodiert ein T3SS, während die übrige 15 kb-Region wichtige Gene für Stoffwechselfunktionen enthält, wie für die an der anaeroben Respiration

beteiligte Tetrathionat-Reduktase. SPI2 ist in der *Salmonella* Pathogenese essentiell bei der Verursachung systemischer Infektionen und bei der Proliferation des Bakteriums in den Wirtsorganen (Schmidt und Hensel, 2004).

SPI3 ist eine 17 kb Insertion am *selC* tRNA Lokus. Sie kodiert die *mgtCB* Gene, die insbesondere zum Überleben in Mg^{2+} -armem Milieu, wie es in Makrophagen auftritt, wichtig sind (Marcus *et al.*, 2000).

SPI4 hat eine Größe von 25 kb und wird von den Genen *ssb* (kodiert ein Einzelstrangbindendes Protein an der DNA) und *soxSR* (Regulatorgene für die Stressantwort auf Superoxid) flankiert. Es wird vermutet, dass diese Insel ein Toxinsekretion vermittelndes Typ-1-Sekretionssystem (T1SS) besitzt, sowie ein Gen, das das Überleben in Makrophagen ermöglicht (Marcus *et al.*, 2000; Schmidt und Hensel, 2004).

Der **SPI5**-Lokus ist nur 7 kb groß und liegt neben dem Serin-spezifischen *serT* tRNA Gen. Er kodiert für einige Effektorproteine, wie z. B. SopB oder PipB, die über SPI1-T3SS und SPI2-T3SS sezerniert werden (Marcus *et al.*, 2000).

1.1.4.2 Virulenzplasmide

Innerhalb der mehr als 2500 in *Salmonella* identifizierten Serovare, wurden nur in wenigen der Spezies *enterica* angehörenden Typen Virulenzplasmide beschrieben. Diese Virulenzplasmide liegen in der Bakterienzelle in wenigen Kopien vor und sind in ihrer Größe und genetischem Potential serovar-spezifisch. Die wichtigsten Beispiele sind: pSAV, ~ 66 kb (*S.* Abortusovis); pSCV, 50 kb (*S.* Choleraesuis); pSDV, 80 kb (*S.* Dublin); pSEV, 60 kb (*S.* Enteritidis); pSPV, 86 kb (*S.* Gallinarum / *S.* Pullorum); und pSTV (auch als pSLT bezeichnet), 94 kb (*S.* Typhimurium) (Helmuth *et al.*, 1985; van Asten und van Dijk, 2005; Chu und Chiu, 2006).

Ihre genetische Zusammensetzung ist zwar ebenfalls variabel, dennoch besitzen alle Virulenzplasmide das *spv* (<u>Salmonella p</u>lasmid <u>v</u>irulence) Operon, das durch Steigerung der Replikationsrate des Bakteriums in den Wirtszellen eine wichtige Rolle bei der Expression der Virulenz eines Serovars spielt (van Asten und van Dijk, 2005; Chu und Chiu, 2006). Diese 7,8 kb große Region setzt sich aus fünf Genen (*spvRABCD*) zusammen, deren Expression über Wachstumsbedingungen, wie jenen im Innern eines Makrophagen, reguliert wird, wie z. B. über einen niedrigen pH-Wert und eine geringe Eisenkonzentration (Rotger und Casadésus, 1999; Chu und Chiu, 2006). Das Produkt von *spvR* ist ein positives Regulatorprotein, das essentiell für die Expression der anderen Gene des *spv* Operons ist. Das

Gen *spvB* kodiert eine ADP-Ribosyl-Transferase, die in der eukaryotischen Zelle für eine Konformationsänderung des Actins verantwortlich ist und auf diese Weise das Cytoskelett destablilisiert. Über die molekularen Mechanismen der anderen *spv* Gene ist bis dato noch wenig bekannt (van Asten und van Dijk, 2005; Chu und Chiu, 2006).

In dieser Arbeit ist insbesondere das oben beschriebene Virulenzplasmid von S. Typhimurium (pSTV) mit einer Größe von 94 kb von Interesse (McClelland et al., 2001; Rotger und Casadesús, 1999). Es gehört zu den Inkompatibilitätsgruppen IncFII und IncFIB und enthält den spvRABCD Locus und das pef (plasmid-encoded fimbriae) Operon einschließlich pefBACDI zur Biosynthese von Fimbrien zur Adhäsion von S. Typhimurium an das Darmepithel. Die pef Gene liegen in pSLT gefolgt von orf5 bis orf9, rck und orf11. Das rck (resistance to complement killing) Gen vermittelt Resistenz gegen die Zerstörung durch das Komplementsystem durch Inhibierung der Polymerisierung des C9-Proteins und somit der Formation des Membranangriffskomplexes. Es wurde gezeigt, dass dieses Gen sowie orf8, orf9 und orf11 in S. Typhimurium von einem chromosomal-kodierten Homologon des E. coli SdiA Proteins reguliert werden, welches ein Quorum-Sensor der LuxR Familie ist. Aus diesem Grund wurden orf8, orf9 und orf11 in srgA, srgB und srgC (SdiA regulated genes) umbenannt. IncFIIA/repA und IncFIB/repA2 spielen eine Rolle bei der autonomen Replikation des Plasmids. IncFIB besitzt ein Set direkter Repeatsequenzen (Iterons). Drei Iterons (B, C und D) korrespondieren mit der Sequenz des *rsk* (regulation of serum killing) Locus, der mit Serum-Resistenz assoziiert ist. Serovar-spezifische Virulenzplasmide liegen in geringer Kopienzahl vor (1-2 Kopien pro Chromosom), aber sind dennoch sehr stabil. pSLT enthält die parVP (partitioning) Region, die zwei verwandte, zur stabilen Vererbung erforderliche umfasst. Außerdem sich Systeme zeichnen serovar-spezifische Virulenzplasmide durch das Auftreten von Toxin-Antitoxin Genkassetten aus, einschließlich ccdAB (coupled cell division) und vagCD (virulence associated genes). Diese Gene kodieren ein labiles Antitoxin (CcdA/VagC) und ein stabiles Toxin (CcdB/VagD). Letzteres ist verantwortlich für die post-segregationale Abtötung der Tochterzellen, die das Plasmid nicht erhalten haben. Das Angriffsziel von CcdB ist die in die DNA-Replikation involvierte DNA-Gyrase. Von den serovar-spezifischen Virulenzplasmiden ist nur pSLT konjugativ, da es sowohl oriT als auch ein funktionelles Set an tra-trb Genen enthält. Des Weiteren besitzt pSLT Gene, die homolog zu an der DNA-Reparatur beteiligten Genen sind, wie samAB (Salmonella mutagenesis; homolog zu umuCD, UV-induced mutagenesis) (Rodicio et al., 2011).

1.1.5 Typisierungsverfahren

Typisierungsverfahren sind ein wichtiges Instrument bei infektionsepidemiologischen Untersuchungen, da sie die Differenzierung von Bakterien, wie z. B. Salmonellen, bis hin zur Serovar-Ebene ermöglichen. Im Rahmen der Infektionsüberwachung können mit ihrer Hilfe Verwandtschaftsbeziehungen von Isolaten dargestellt, Infektionsketten aufgedeckt und in der Folge entsprechende infektionshygienische Maßnahmen eingeleitet werden. Grundsätzlich lassen sich Typisierungsverfahren in zwei übergeordnete Kategorien einteilen. Phänotypische Methoden beinhalten die Charakterisierung des Erregers nach seiner Morphologie oder seinen biochemischen Eigenschaften. Molekularbiologische Untersuchungsmethoden andererseits analysieren die genomische Struktur und erlauben eine Differenzierung über DNA-Polymorphismen (Olsen *et al.*, 1993; Wichelhaus *et al.*, 2000).

1.1.5.1 Phänotypische Untersuchungsmethoden

Hierzu zählen ebenfalls die unter Abschnitt 1.1.1 beschriebenen Methoden der Serotypie, Phagentypie und Biotypisierung.

1.1.5.1.1 Antimikrobielle Resistenzbestimmung

Unter dem Begriff der Resistenzbestimmung versteht man die Ermittlung des Wachstumsverhaltens von Mikroorganismen in Anwesenheit antimikrobieller Substanzen. Sie ist einfach in der Durchführung und liefert schnell und effizient Hinweise auf Charakteristika eines Bakterienstamms. Bei epidemiologischen Untersuchungen ist diese Methode nur in Kombination mit anderen Typisierungsverfahren von Bedeutung, da verschiedene Stämme oft ein gleiches Resistenzprofil aufweisen, verwandte Stämme dagegen durch den Verlust oder den Erwerb von Resistenzdeterminanten auf mobilen genetischen Elementen durchaus abweichende Resistenzmuster zeigen können (Threlfall und Frost, 1990; Wichelhaus *et al.*, 2000).

Im Nationalen Referenzlabor zur Durchführung von Analysen und Tests auf Zoonosen (Salmonellen) [NRL-Salm, Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Berlin] bzw. seinen Vorläufereinrichtungen wurden bereits seit Ende der 60er Jahre standardisierte Resistenzbestimmungen von *Salmonella* Isolaten nach der Agardiffusionsmethode

durchgeführt. Die Anzahl der getesteten antimikrobiellen Substanzen variierte dabei im Laufe der Jahre je nach epidemiologischer Bedeutung und Zulassung. Parallel zu diesem Verfahren wurde im Jahr 2000 die Mikrodilutionsmethode eingeführt, die für jedes Isolat den sogenannten MHK-Wert (<u>Minimale Hemmstoff-Konzentration</u>) ermittelt. Diese Methode hat den Vorteil, dass nun für die Isolate eine definierte Empfindlichkeit gegenüber einer antimikrobiell-wirksamen Substanz angegeben werden kann. Da im Gegensatz zur Agardiffusion mehrere Konzentrationen getestet werden, sind die Angaben präziser und somit auch aussagekräftiger (Helmuth *et al.*, 2004; Schroeter *et al.*, 2004).

1.1.5.2 Molekularbiologische Untersuchungsmethoden

1.1.5.2.1 Plasmidanalyse

Die Methode der Plasmidanalyse erlaubt eine Charakterisierung der genetischen Eigenschaften eines Erregers, durch die gelelektrophoretische Auftrennung der Plasmide nach Anzahl und Größe (Wichelhaus *et al.*, 2000). Insbesondere bei Salmonellen ist sie ein wichtiges Instrument bei epidemiologischen Untersuchungen, da viele der Plasmide Überträger von Virulenz- und Resistenzeigenschaften sind (Helmuth *et al.*, 1985; Rychlik *et. al.*, 2006). Bei der Anwendung dieser Technik muss insbesondere beachtet werden, dass viele Bakterienarten keine Plasmide enthalten bzw. es sich bei Plasmiden um mobile genetische Elemente handelt, die leicht erworben aber auch verloren werden können. Aus diesem Grund können auch epidemiologisch verwandte Stämme unterschiedliche Plasmidprofile aufweisen (Helmuth *et al.*, 2009).

1.1.5.2.2 Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus

Bei der Typisierung mittels <u>R</u>estriktions<u>f</u>ragment<u>l</u>ängen<u>p</u>olymorphismus (RFLP) erfolgt erst ein DNA-Verdau mit einer Restriktionsendonuklease und anschließend die Separation der Fragmente über Agarose-Gelelektrophorese. Die Anzahl der entstehenden Banden ist abhängig von der Erkennungssequenz des eingesetzten Enzyms und dem Aufbau der DNA des zu untersuchenden Bakterienstamms. Anhand dieses Bandenmusters kann dann eine Differenzierung vorgenommen werden (Wichelhaus *et al.*, 2000; Yan *et al.*, 2003).

1.1.5.2.3 Pulsfeldgelelektrophorese

Die Methode der Pulsfeldgelelektrophorese (,,<u>P</u>ulsed <u>Field Gel Electrophoresis</u>", PFGE), basierend auf der Analyse bakterieller Genome, gilt in epidemiologischen Studien pathogener Mikroorganismen allgemein als Goldstandard und ist ein modernes Verfahren zur Feintypisierung verschiedener Erreger, wie z. B. Salmonellen (Olive und Bean, 1999).

Mittels der herkömmlichen Gelelektrophorese im Agarosegel können nur DNA-Moleküle bis zu einer Fragmentgröße von 30 bis 50 kb effektiv getrennt werden. Aus diesem Grund entwickelten Schwartz und Cantor 1984 an der Columbia Universität mit der PFGE eine Variation des Standardprotokolls. Die Verwendung eines nicht-linearen elektrischen Feldes, d. h. einer zeitlichen Änderung ("puls") der Richtung des elektrischen Feldes in einem spezifischen und gleichbleibenden Winkel zur Vertikalen, ermöglicht die Auftrennung weitaus größerer DNA-Fragmente von über 10 Mb. Hierzu wird eine selten schneidende Restriktionsendonuklease (z. B. XbaI oder BlnI) benötigt, die das Bakterienchromosom in eine spezifische Anzahl von Fragmenten zerlegt, welche anschließend mittels PFGE nach ihrer Länge aufgetrennt werden können. Das entstandene Fragmentlängenmuster im Bereich von 50 – 1000 kb wird auch als "genomischer Fingerabdruck" bezeichnet und entspricht dem Genotyp eines Stammes. Der Grad der Verwandtschaft von Stämmen einer Spezies kann anhand eines quantitativen Fragmentmustervergleichs ermittelt werden. Unterschiede im Längenmuster können sich aus verschiedenen genetischen Events wie Punktmutationen, Rekombinationen, Insertionen oder Deletionen ergeben (Tenover et al., 1995; Riley, 2004; Herschleb et al., 2007). Die PFGE kann sowohl dazu beitragen Infektionsquellen und Übertragungswege von bakteriellen Erregern zu identifizieren, als auch Diversität und klonale Struktur von Bakterienpopulationen zu ermitteln.

1.1.5.2.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die Methode der Poymerase-Kettenreaktion ("Polymerase Chain Reaction", PCR), die 1983 von Karry Banks Mullis entwickelt wurde, ermöglicht die exponenzielle Vervielfältigung (Amplifizierung) von definierten DNA-Abschnitten im Genom eines Untersuchungsstammes *in vitro*. Hierbei synthetisiert eine thermostabile DNA-Polymerase ausgehend von kurzen komplementären Oligonukleotiden (Primern) einen DNA-Strang in 5'-3'-Richtung. Die Primer werden so gewählt, dass die Synthese an den beiden Strängen antiparallel erfolgt und

somit nur der DNA-Bereich amplifiziert wird, der zwischen den beiden Primern liegt. Ein typischer PCR-Zyklus, wie in Abbildung 1.1 dargestellt, beginnt mit einem Denaturierungsschritt, wobei die doppelsträngige DNA zunächst längere Zeit durch Reaktionstemperaturen von ca. 94 °C stark erhitzt wird. Wenn die DNA in Einzelsträngen vorliegt, wird die Temperatur gesenkt und die Primer können mit den ihnen homologen Bereichen hybridisieren (Annealing). Die DNA-Polymerase kann nun an die freien 3'-OH-Enden der Primer Nukleotide anheften und somit einen komplementären Strang synthetisieren (Elongation). Die Analyse der entstandenen PCR-Produkte erfolgt mittels Agarose-Gelelektrophorese. Diese Methode dient der Auftrennung von DNA-Molekülen anhand ihrer Größe und Konformation, wobei mitgeführte Molekulargewichtsmarker eine Abschätzung der Fragmentlänge bzw. der Konzentration der zu charakterisierenden DNA erlauben. Hierzu wird ein elektrisches Feld verwendet, in dem die negativ geladene DNA in Richtung Anode wandert. Dabei legen kleine oder lineare Fragmente aufgrund der Struktur der Gelmatrix eine größere Strecke zurück, als größere bzw. ringförmig geschlossene Fragmente. Laufzeit und angelegte Spannung variieren je nach Größe und Konzentration des Gels (Sambrook et al., 1989; Olsen et al., 1993). Der Einsatz der PCR erfolgte in dieser Arbeit vorrangig zum Nachweis von Virulenz- und Resistenzgenen und diente als Grundlage für andere Typisierungsverfahren wie z. B. Multilocus Variable Number Tandem Repeat Analyse und Multilocus Sequence Typing.



Abbildung 1.1: Ein PCR-Zyklus in schematischer Darstellung.

1.1.5.2.5 Multilocus Variable Number Tandem Repeat Analyse

Bei der <u>Multilocus Variable Number Tandem Repeat Analyse (MLVA)</u> handelt es sich um eine hoch diskriminatorische molekulare Methode zur Typisierung, insbesondere von homogenen Stämmen wie *S*. Typhimurium DT104. Sie basiert auf der PCR-Amplifizierung und Fragmentgrößenanalyse von kurzen Sequenzwiederholungs-Motiven (VNTRs) innerhalb des bakteriellen Genoms und ihrer anschließenden Auftrennung mittels Kapillarelektrophorese (Lindstedt *et al.;* 2004; Lindstedt, 2005).

1.1.5.2.6 Multilocus Sequence Typing

Die Methode des <u>Multilocus Sequence Typing</u> (MLST) basiert auf der PCR-Sequenzanalyse eines definierten Sets von Haushaltsgenen ("housekeeping genes") im Genom des zu untersuchenden Organismus. Um eine hohe Diskriminierfähigkeit zu erreichen werden möglichst solche Gene ausgewählt, die über das gesamte Genom hinweg verteilt liegen, einerseits hoch konserviert sind, aber dennoch aufgrund von Mutationen oder Rekombinationen Variationen zeigen. Daher ist die MLST-Analyse besonders für phylogenetische und evolutions-theoretische Untersuchungen geeignet (Maiden *et al.*, 1998; Kidgell *et al.*, 2002).

1.2 Antibiotika und Antibiotikaresistenz

Die Einführung der ersten antimikrobiellen Substanzen in den 1930er Jahren und die fortwährende Entdeckung immer neuer Klassen von Antibiotika in den folgenden Jahrzehnten, bedeutete den Beginn einer neuen Ära in der medizinischen Behandlung von Bakterien verursachter Infektionskrankheiten (Wright, 2010; Davies und Davies, 2010). Die Verfügbarkeit von Antibiotika als Arzneistoffe ermöglichte nicht nur die Heilung von bis dato unbehandelbaren Krankheiten mit oft tödlichem Ausgang wie rheumatischem Fieber, Zellgewebsentzündungen oder bakterieller Pneumonie, sondern eröffnete völlig neue Perspektiven in der chirurgischen Medizin, wie Organtransplantationen und den Einsatz der Chemotherapie in der Krebsbehandlung (Wright, 2010). Einer Studie des Wissenschaftlichen Instituts der AOK (WIdO) aus dem Jahr 2006 zufolge, wurden hierzulande in 2004 etwa 250-300 Tonnen Antibiotika in der Humanmedizin im ambulanten Bereich eingesetzt (Anonym, 2008a). Der Bundesverband für Tiergesundheit (BfT) gab für 2005 in der Deutschen Veterinärmedizin einen Gesamt-Antibiotikaverbrauch von 784 Tonnen an (Schneidereit, 2006). In der EU einschließlich der Schweiz ermittelte die European Federation for Animal Health (Fedesa) für 1999 einen Antibiotika-Verbrauch von 13.288 Tonnen, wobei hiervon 65 % auf die Humanmedizin und 35 % auf die Veterinärmedizin entfielen (Kümmerer, 2003). Im Gegensatz zur Anwendung beim Menschen werden Antibiotika in der landwirtschaftlichen Nutztierhaltung nicht ausschließlich zur Therapie, sondern auch zur Prophylaxe und zur Metaphylaxe von Infektionskrankheiten verwendet und wurden lange Zeit auch als Wachstumsförderer eingesetzt (Schwarz und Chaslus-Dancla, 2001).

Doch der routinemäßige Einsatz von Antibiotika in der Human- und Veterinärmedizin führte bereits Ende der 1940er Jahre zu einer gesteigerten Selektion von resistenten Mikroorganismen und betrifft heute nahezu alle Arten von Bakterien (Helmuth, 2000). Der erhöhte Selektionsdruck begünstigt sowohl den horizontalen Transfer von Resistenzgenen in nicht intrinsisch-resistente Arten, als auch die vertikale Verbreitung innerhalb einer Population durch die Erhaltung evolutiv vorteilhafter Resistenzmutationen (Wright, 2010). Das Phänomen der Antibiotikaresistenz ist demnach vermutlich eines der besten Beispiele für die Darwin'sche Evolutionstheorie (Davies und Davies, 2010).

Nach Definition des "Official Journal of the European Union and European Food Safety Authority" ist Antibiotikaresistenz die Fähigkeit eines Mikroorganismus in Gegenwart einer bestimmten Antibiotika-Konzentration zu überleben, die normalerweise ausreichen würde denselben Organismus zu töten oder sein Wachstum zu inhibieren (Anonym, 2003a; Helmuth *et al.*, 2009).

Die stetige Zunahme von bakteriellen Resistenzen gegen alle Arten von Antibiotika wird sowohl im medizinischen als auch im agrarwirtschaftlichen Bereich weltweit mit Besorgnis beobachtet. Zudem besteht nachweislich das Risiko der Übertragung resistenter Isolate von landwirtschaftlichen Nutztieren auf den Menschen über die Lebensmittelkette. Insbesondere seit dem Auftreten der ersten Multiresistenzen (MDR) in enterischen Bakterien, wie *Escherichia coli* und *Salmonella*, in den späten 1950er Jahren, sieht sich das öffentliche

Gesundheitswesen mit dem wachsenden Problem immer ineffektiver werdender Antibiotikatherapien konfrontiert (McDermott *et al.*, 2002; Helmuth und Hensel, 2004; Levy und Marshall, 2004; White *et al.*, 2004; Bundesinstitut für Risikobewertung, 2010). Als Reaktion darauf wurden von verschiedenen Einrichtungen, wie der WHO, der Europäischen Kommission und auch der deutschen Regierung, Initiativen und Strategien zur Eindämmung der Antibiotikaresistenz eingeleitet (Anonym, 2008b; World Health Organization, 2001; Bronzwaer *et al.*, 2004).

1.2.1 Biochemische Grundlagen der Antibiotikaresistenz

Da der Begriff Antibiotika definitionsgemäß keine Stoffklasse beschreibt, werden auch solche antimikrobiell wirkenden Substanzen darunter zusammengefasst, die nicht natürlicher, sondern semi- oder vollsynthetischer Herkunft sind (Walsh, 2003; Davies und Davies, 2010). Generell können sie auf Mikroorganismen entweder wachstumshemmend (bakteriostatisch) oder abtötend (bakterizid) wirken. Ihre antimikrobielle Aktivität beruht hierbei auf der Inhibierung der Biosynthesewege essentieller Komponenten der Bakterienzelle: (i) Zellwand, (ii) Zellmembran, (iii) Proteinsynthese am Ribosom, (iv) DNA-und RNA-Synthese und (v) Folsäuresynthese (Walsh, 2003; Wright, 2010) (Abbildung 1.2). Dabei wirken verschiedene Antibiotika an unterschiedlichen Angriffszielen in der Zelle. Infolgedessen haben Bakterien verschiedene Arten von Resistenzmechanismen entwickelt. In den folgenden Abschnitten sind die wichtigsten dieser Mechanismen beschrieben (Guardabassi und Courvalin, 2006) (Abbildung 1.2).

1.2.1.1 Enzymatische Inaktivierung und Modifikation

Dieser Mechanismus beruht auf der Wirkungsweise spezifischer Enzyme, die durch Hydrolyse oder Modifikation in der Lage sind, eine antimikrobielle Substanz vor oder während ihres Eindringens in die Bakterienzelle zu inaktivieren (Wright, 2005). Innerhalb dieser Gruppe unterscheidet man verschiedene Arten von Enzymen, von denen hier einige ausgewählte Beispiele vorgestellt werden.

1.2.1.1.1 Enzymatische Inaktivierung von B-Laktam-Antibiotika durch B-Laktamasen

Die β -Laktame sind sowohl in der human- als auch in der veterinärmedizinischen Praxis die am häufigsten eingesetzte Antibiotikagruppe. Sie zeichnen sich in ihrer Strukturformel durch einen viergliedrigen β -Laktam-Ring aus und besitzen aufgrund ihrer Fähigkeit, die Peptidoglykansynthese beim Aufbau der Zellwand zu inhibieren, eine bakterizide Wirkung. Man unterscheidet heute vier verschiedene Klassen: Penicilline, Cephalosporine, Carbapeneme und Monobactame (Babic *et al.*, 2006; Bassetti *et al.*, 2008).

Die Hydrolyse von B-Laktam-Antibiotika durch die Bildung von B-Laktamasen ist der häufigste Resistenzmechanismus in gram-negativen Bakterien. Diese Enzyme hydrolysieren mit unterschiedlicher Effizienz den ß-Laktamring der Antibiotika in mikrobiologisch inaktive Derivate (Bush und Mobashery, 1998; Bush und Jacoby, 2010). Derzeit sind über 890 verschiedene B-Laktamasen beschrieben (http://www.lahey.org/Studies/), deren Klassifikation entweder basierend auf ihrer molekularen Struktur (Klassen A, B, C und D; Ambler et al., 1991) oder aufgrund ihrer funktionellen Charakteristika (Gruppen 1-3; Bush und Jacoby, 2010) erfolgt. Letztere Nomenklatur ermöglicht die Definition der klinischen Relevanz einer B-Laktamase, indem sie ihre Hydrolyse-Fähigkeit gegenüber spezifischen B-Laktam-Klassen sowie ihre Hemmbarkeit durch ß-Laktamase-Inhibitoren, wie Clavulansäure, beschreibt. Gruppe 1 umfasst die Chephalosporinasen vom Typ AmpC und ist normalerweise resistent gegen die inhibierende Wirkung von Clavulansäure. Zu Gruppe 2 gehören Enzyme, die sowohl Penicilline, Cephalosporine als auch Carbapeneme hydrolysieren können und im Allgemeinen sensibel auf Clavulansäure reagieren. Hierzu zählen u. a. die Penicillinasen TEM-1, PSE-1, OXA-1 und SHV-1 und die "Extended Spectrum β-Laktamasen" (ESBLs), wie CTX-M, die ein erweitertes Spektrum von ß-Laktam-Antibiotika spalten können. Gruppe 3 beinhaltet die Metallo-ß-Laktamasen, deren Aktivität auf der Gegenwart von Zink-Ionen beruht (Bush und Jacoby, 2010).

1.2.1.1.2 Enzymatische Modifikation von Aminoglykosiden

Die Aminoglykoside sind, mit Ausnahme des bakteriostatisch-wirkenden Spectinomycins, bakterizide Agenzien, die durch Bindung an die 30S Untereinheit des Ribosoms die Proteinbiosynthese hemmen. Ihre chemische Grundstruktur besteht aus einem Aminocyclitolring, der über glykosidische Bindungen an verschiedene Aminozucker gekoppelt ist.

Darauf basierend können Aminoglykoside in vier Klassen aufgeteilt werden: i) Streptidine: Streptomycin und Streptomycin-Derivate; ii) Streptamine: Spectinomycin; iii) 2-Deoxystreptamine (4,5): Neomycin und iv) 2-Deoxystreptamine (4,6): Kanamycin, Gentamicin, Amikacin und Tobramycin (Walsh, 2003; Alcaine *et al.*, 2007).

Resistenzen gegen diese Antibiotika werden, wie in *Salmonella*, hautsächlich über enzymatische Modifikationen vermittelt, die in einer verminderten Affinität für die ribosomale Bindungsstelle resultieren. Diese Enzyme werden entsprechend der Reaktionen, die sie katalysieren, in drei Typen eingeteilt: N-Acetyltransferasen (AAC), O-Phosphotransferasen (APH) und O-Nucleotidyltransferasen (ANT) (Jana und Deb, 2006). Dabei umfasst jede der Gruppen eine große Anzahl verschiedener Enzyme (Michael *et al.*, 2006; B. Aranda und B. Guerra, unveröffentlichte Daten).

Die N-Acetyltransferasen AAC(1), AAC(2'), AAC(3) und AAC(6') modifizieren die Aminogruppen des Aminoglykosid-Moleküls an verschiedenen Positionen. Ihre kodierenden Gene werden üblicherweise als *aac* bezeichnet und sind auf Integrons, Plasmiden und *Salmonella* Genomic Islands lokalisiert (Jana und Deb, 2006; Alcaine *et al.*, 2007). Sie vermitteln Resistenzen gegen Gentamicin, Kanamycin und Tobramycin (Mascaretti, 2003). Besondere Erwähnung verdient an dieser Stelle die Variante "cr" der Aminoglykosid-Acetyltransferase AAC(6')-Ib, die in der Lage ist auch Antibiotika der Familie der Chinolone zu inaktivieren (Robicsek *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2006).

O-Phosphotransferasen katalysieren die Phosphorylierung verschiedener Aminoglykosid-Hydroxylgruppen und werden in der Regel von *aph* Genen (z. B. *aphA1* und *aphA2*) kodiert.

Hier ist anzumerken, dass die Streptomycin-Resistenz vermittelnden Gene aph(3')-Ib und aph(6)-Id in der Literatur gebräuchlicherweise auch als *strA* und *strB* angegeben werden (Shaw *et al.*, 1993; Madsen *et al.*, 2000).

O-Nucleotidyltransferasen wirken ebenfalls an den Hydroxylgruppen. Gene, die diese kodieren, werden entweder mit *aad* (Aminoglykosid-Adenyltransferasen) oder auch mit *ant* (Aminoglykosid-Nucleotidyltransferasen) bezeichnet (Alcaine *et al.*, 2007). Bei *Salmonella* sind die häufigsten Gene dieser Gruppe *aadA* und *aadB*. Erstere vermitteln Resistenzen gegen Streptomycin und Spectinomycin. Letztere dagegen kodieren Resistenzen gegen Gentamicin, Kanamycin und Tobramycin. Des Weiteren lässt sich die *aadA*-Gruppe in mehrere Subtypen, wie u.a. *aadA1*, *aadA2* und *aadA7*, unterteilen (Michael *et al.*, 2006).

1.2.1.1.3 Enzymatische Modifikation von Phenicolen

Zur Gruppe der **Phenicole** gehören Chloramphenicol und Florfenicol. Chloramphenicol wurde erstmals 1948 aus *Streptomyces venezuelae* isoliert und wurde lange Zeit als Breitbandantibiotikum zur Medikation von Infektionen sowohl bei gram-negativen als auch gram-positiven Bakterien eingesetzt. Das Antibiotikum wirkt als Translationshemmer, indem es an das Peptidyltransferase-Zentrum der 50S Untereinheit des Ribosoms bindet und so die Verknüpfung von Peptidbindungen verhindert. Der Einsatz von Chloramphenicol ist in der Regel limitiert, da potentiell lebensbedrohliche Nebenwirkungen wie z. B. Schädigungen des Knochenmarks, sogenannte aplastische Anämien, auftreten können (Walsh, 2003; Alcaine *et al.*, 2007). Aufgrund dieses bestehenden Risikos ist seine Anwendung bei Lebensmittel liefernden Tieren in der Europäischen Union laut der Verordnung (EG) Nr. 37/2010 generell verboten (Anonym, 2010).

Hauptsächlich erfolgt die Inaktivierung dieser Antibiotka durch den Einsatz von Chloramphenicol-O-Acetyltransferasen (CAT) vom Typ A oder B, die eine Modifikation des Chloramphenicol-Moleküls bewirken. Die kodierenden *cat* Gene sind meist auf Plasmiden lokalisiert (Schwarz et al., 2004; Alcaine *et al.*, 2007).

1.2.1.2 Modifikation des Antibiotikatargets

1.2.1.2.1 Resistenz gegen Sulfonamide und Trimethoprim

Diese beiden antimikrobiellen Substanzen werden aufgrund ihres synergistischen Effekts seit 1968 im klinischen Gebrauch in Kombination eingesetzt. Sie wirken bakteriostatisch und blockieren verschiedene enzymatische Schritte in der Tetrahydrofolat-Biosynthese. Diese ist insbesondere für den Aufbau der Nukleinsäure-Bausteine Purin und Pyrimidin essentiell. Sulfonamide inhibieren kompetitiv die Dihydropterat-Synthetase (DHPS), während Trimethoprim erst in dem folgenden Reaktionsschritt eingreift, indem es die Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) blockiert (Walsh, 2003; Huovinen, 2001; Alcaine *et al.*, 2007).

Sulfonamid-Resistenzen beruhen auf Modifikationen der DHPS-Enzyme, die sie unempfindlich gegen das Antibiotikum werden lassen. Zurzeit sind drei in diesen Resistenzmechanismus implizierte Gene bekannt: *sul1*, *sul2*, und *sul3*. Das *sul1* Gen wurde bisher in einer Vielzahl von *Salmonella* Serovaren gefunden und ist oft mit Klasse 1 Integrons assoziiert. Das Gen *sul2* dagegen ist häufig auf Plasmiden lokalisiert und wurde bei Salmonellen in verschiedenen Serovaren beschrieben (Sköld, 2001; Schwarz und Chaslus-Dancla, 2001; Alcaine *et al.*, 2007). Das *sul3* Gen wurde sowohl in Plasmiden als auch in Integrons der Klasse 1 nachgewiesen (Guerra *et al.*, 2004a; Antunes *et al.*, 2005).

Ähnlich wie bei den Sulfonamiden, ist auch die Resistenz gegen Trimethoprim auf die Expression von modifizierten DHFR-Enzymen zurückzuführen. Bisher sind über 30 verschiedene Resistenzgene bekannt, die aufgrund ihrer Struktur in die zwei Typen *dfrA* und *dfrB* unterteilt werden (Michael *et al.*, 2006). Diese Gene treten meist in Integrons assoziiert mit *sul1* und *sul3* auf, aber auch in Plasmiden und *Salmonella* Genomic Islands (Sköld, 2001; Sørum und L'Abée-Lund, 2002; Alcaine *et al.*, 2007).

1.2.1.2.2 Resistenz gegen Chinolone und Fluorchinolone

Diese synthetisch hergestellte bakterizide Antibiotika-Stoffgruppe wird zur Behandlung eines großen Spektrums verschiedener Infektionskrankheiten sowohl in der Human- als auch Veterinärmedizin eingesetzt (Malorny *et al.*, 2003). Im Jahr 1962 wurde Nalidixinsäure als Chinolon der ersten Generation erstmals in der klinischen Praxis angewendet. Seitdem wurden mehrere Chinolon-Generationen mit immer besseren Wirkmechanismen gegen bakterielle Infektionen entwickelt, wie u. a. auch Ciprofloxacin aus der Gruppe der Fluorchinolone. Diese Antibiotikagruppe wirkt inhibierend auf die DNA Gyrase und die Topoisomerase IV und bewirkt somit die Hemmung der DNA-Replikation (Piddock, 2002; Alcaine *et al.*, 2007).

Der wesentliche Resistenzmechanismus in gram-negativen Bakterien beruht auf Veränderungen in den Targetstrukturen durch Punktmutationen in der "quinolone resistancedetermining region" (QRDR) der Gene gyrA, gyrB (Kodierung von DNA Gyrase-Untereinheiten), parC und parE (Kodierung von Topoisomerase IV-Untereinheiten) (Casin et al., 2003; Guerra et al., 2003; Ruiz, 2003; Michael et al., 2006; Alcaine et al., 2007). Die in Salmonella bisher am häufigsten beobachteten Aminosäurewechsel in gyrA sind Ser-83 (zu Phe, Tyr, oder Ala) oder Asp-87 (zu Gly, Asn, oder Tyr). Diese Mutationen bewirken die Ausbildung von Chinolon-Resistenzen, sowie eine verminderte Sensibilität gegen Fluorchinolone (Cloeckaert und Chaslus-Dancla, 2001).

Im Jahr 1998 wurde ein neuer plasmid-vermittelter Chinolon-Resistenzmechanismus (PMQR; engl. <u>plasmid mediated quinolone resistance</u>) in *Klebsiella pneumoniae* beschrieben (Martínez-Martínez *et al.*, 1998). Das verantwortliche Gen erhielt die Bezeichnung *qnr* (heute qnrA1) und besitzt die Fähigkeit, die Resistenz gegen Nalidixinsäure, Ciprofloxacin und andere Fluorchinolone zu steigern (Tran und Jacoby, 2002; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011). Es kodiert ein Protein, das an die DNA Gyrase und Topoisomerase IV bindet und diese so vor der Inhibierung durch Chinolone schützt (Jacoby, 2005). Bisher wurden fünf verschiedene Qnr-Protein Typen (QnrA, QnrB, QnrS, QnrC und QnrD) mit jeweils unterschiedlichen Varianten beschrieben. Ihre kodierenden Gene wurden auf Plasmiden mit unterschiedlichen Größen (2,7 – 320 kb), Inkompatibilitätsgruppen und assoziierten Resistenzen gefunden (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011).

1.2.1.2.3 Resistenz gegen Aminoklykoside

Die Modifikation durch Methylierung der 16S rRNA in der 30S Untereinheit des Ribosoms vermittelt in hohem Level Resistenzen gegen die meisten in der Klinik eingesetzten Aminoglykoside (Doi und Arakawa, 2007). Dieser Mechanismus wurde erstmals im Jahr 2003 in gram-negativen Humanpathogenen beschrieben. Das verantwortliche Gen *armA* kodierte eine Methyltransferase, die die posttranskriptionale Modifikation der 16S rRNA bewirkte und auf diese Weise die Bindung des Aminoglykosid-Moleküls an das Ribosom verhinderte (Galimand *et al.*, 2003). Mittlerweile wurden verschiedene 16S rRNA Methylasen identifiziert, die ebenfalls in Tierbeständen nachgewiesen werden konnten und mit zunehmender Frequenz weltweit detektiert werden (Doi und Arakawa, 2007).

1.2.1.3 Reduzierte intrazelluläre Akkumulation durch veränderte Zellpermeabilität und aktive Effluxsysteme

In gram-negativen Bakterien können hydrophile Substanzen über Porine und hydrophobe Substanzen über den Phospholipid-Bilayer in die bakterielle Zelle eindringen. Eine reduzierte Aufnahme bestimmter antimikrobieller Substanzen (z. B. von Chinolonen, ß-Lactamen) steht daher normalerweise in Verbindung zu Veränderungen in der äußeren Membran, wie dem Verlust oder der verminderten Expression von Porinen (Guardabassi und Courvalin, 2006). Dieser Mechanismus wird für gewöhnlich nicht durch Resistenzgene vermittelt (Helmuth *et al.*, 2009). Unter aktivem Efflux versteht man einen energieabhängigen Mechanismus, der die Konzentration einer antimikrobiellen Substanz im Cytoplasma reduziert. Allgemein ist die Substratspezifität von Effluxpumpen sehr variabel. Bisher wurden verschiedene Efflux-Protein kodierende Resistenzgene beschrieben (Helmuth *et al.*, 2009).

1.2.1.3.1 Phenicol-Exporter

Ein weiterer Phenicol-Resistenz vermittelnder Mechanismus beruht auf dem Einsatz von membran-assoziierten spezifischen Proteintransportern mit unterschiedlichem Substratspektrum. Bei *Salmonella* sind bisher zwei Effluxsysteme bekannt. Ersteres wird von dem Gen *cmlA* kodiert und bewerkstelligt ausschließlich den Transport von Chloramphenicol aus der Zelle. Der zweite Exporter befördert sowohl Chloramphenicol als auch Florfenicol und wird von dem mobilen Gen *floR* kodiert. Da dieses Gen auf verschiedenen Plasmiden und *Salmonella* Genomic Islands gefunden wurde, wird es oft mit dem Auftreten von Multiresistenzen assoziiert (Walsh, 2003; Michael *et al.*, 2006; Alcaine *et al.*, 2007).

1.2.1.3.2 Tetrazyclin-Effluxproteine

Die Familie der Tetracycline wurde erstmals in den 1940er Jahren bei der Entdeckung von Chlortetracyclin in *Streptomyces aureofaciens* beschrieben. Ihre molekulare Struktur besteht aus einem Grundgerüst von vier linear angeordneten sechsgliedrigen Ringen. Tetracycline wirken als Breitbandantibiotika bakteriostatisch auf gram-positive und gram-negative Bakterien, eingeschlossen Mykoplasmen und Chlamydien, sowie einige Protozoen wie z.B. *Plasmodium*. In der EU und der Schweiz gelten sie als die am häufigsten eingesetzten Antibiotika in der Veterinärmedizin. Ihre Wirkung beruht auf der Inhibierung der Proteinsynthese, indem sie an die 30S Untereinheit des Ribosoms binden und so die Anlagerung der tRNA verhindern (Walsh, 2003; Frech und Schwarz, 2000; Chopra und Roberts, 2001).

Bei gram-negativen Bakterien wird der am häufigsten beschriebene Resistenzmechanismus durch Effluxpumpen in der inneren Zellmembran vermittelt, die das Antibiotikum aus dem Cytoplasma entfernen. Zurzeit sind über 35 bakterielle Tetracyclin-Resistenzgene bekannt, die für diese Exportsysteme kodieren. In *Salmonella*-Isolaten wurden bisher nur einige davon, wie *tet*(A), *tet*(B), *tet*(C), *tet*(D), und *tet*(G) identifiziert. Alle diese Gene kodieren dabei jeweils ein aus 12 Segmenten bestehendes Transmembranprotein, das für den Export von Tetracyclin, Oxytetracyclin, Chlortetracyclin und Doxycyclin verantwortlich ist. Einzig das
TetB-Protein besitzt zusätzlich die Fähigkeit auch Minocyclin zu transportieren (Chopra und Roberts, 2001; Michael *et al.*, 2006; Alcaine *et al.*, 2007).



Abbildung 1.2: Antibiotikatargets und Resistenzmechanismen. Modifizierte Darstellung aus Wright *et al.*, 2010.

1.2.2 Genetische Grundlagen der Antibiotikaresistenz

Bakterielle Antibiotikaresistenz kann auf genetischer Ebene auf zwei Arten erlangt werden: entweder durch intrinsische oder durch akquirierte Mechanismen. **Intrinsische Mechanismen** kommen in Bakteriengruppen, wie z. B. Gattungen und Arten, vor und beruhen auf natürlich auftretenden strukturellen und funktionellen Eigenschaften, die Toleranz gegen verschiedene Antibiotika bzw. Antibiotikaklassen vermitteln und von chromosomalen Genen kodiert werden. Beispiele hierfür sind einige AmpC β-Laktamasen gram-negativer Bakterien und viele MDR Effluxsysteme. **Akquirierte Mechanismen** hingegen bewirken Veränderungen im bakteriellen Genom eines Stammes. Hierzu gehören Mutationen in antimikrobiellen Gentargets und der Erwerb von mobilen genetischen Elementen, die für die Übertragung von Resistenzdeterminanten verantwortlich sind (Guardabassi und Courvalin, 2006; Alekshun und Levy, 2007; Helmuth *et al.*, 2009). Allgemein wird dieser Austausch durch folgende Prozesse bewerkstelligt: Transduktion (via Bakteriophagen), Konjugation (via Plasmide und konjugative Transposons) und Transformation (via Inkorporation in das Chromosom von chromosomaler DNA und Plasmiden) (Levy und Marshall, 2004).

1.2.2.1 Mutationen

Unter Mutationen versteht man Veränderungen in der Genomsequenz, die bei der DNA-Replikation durch inkorrekte Basensubstitutionen entstehen. Dadurch können Bakteriengene oder ihre Regulatoren so modifiziert werden, dass es zur Entwicklung von Resistenzgenen (R-Gene) kommen kann und somit zur Entstehung von resistenten Organismen. Der Einsatz von Antibiotika führt zur Selektion der resistenten Varianten und folglich zu ihrer Erhaltung innerhalb der normalen Population. In den meisten Fällen wirken sich Mutationen nur auf eine einzige Antibiotikaklasse aus, dennoch können sie auch pleiotrope Effekte haben, wie die Beeinflussung von Permeabilität oder Effluxsystemen. Zudem können verschiedene Mutationen in einem Organismus zur Ausbildung eines MDR Phänotyps führen. Dieses Auftreten beruht auf der inkorrekten Funktion der DNA- Reparatursysteme (Cantón *et al.*, 2003; Livermore, 2003).

Mit dem therapeutischen Einsatz von Antibiotika, trat auch das Phänomen der MDR in Erscheinung. Die Annahme, dass ihr Auftauchen und ihre schnelle Verbreitung allein dem Mechanismus der Mutation zuzuschreiben wäre, stellte sich schon bald als falsch heraus. Der wissenschaftliche Fokus richtete sich daher auf die Übertragung von Resistenzgenen durch transferierbares genetisches Material und führte schließlich zur Entdeckung der ersten mobilen DNA-Elemente (Rowe-Magnus und Mazel, 2002).

1.2.2.2 Horizontaler Transfer von Antibiotika-Resistenzgenen

Die Persistenz eines mutierten R-Gens ist nicht allein auf eine bakterielle Population und den damit verbundenen vertikalen Transfer beschränkt, sondern kann sich über horizontalen Gentransfer auch auf andere Bakterien derselben ökologischen Nische übertragen. Dieser Mechanismus trägt mit hoher Effizienz zur Verbreitung antimikrobieller Resistenzen bei, zu dessen wichtigsten Vehikeln u. a. Integrons/Genkassetten, Transposons, Plasmide und genomische Inseln zählen (Cantón *et al.*, 2003; Helmuth *et al.*, 2009).

1.2.2.2.1 Integrons

Integrons sind natürliche Klonierungs- und Expressionssysteme, die "open reading frames" (ORFs) enthalten und diese in funktionelle Gene konvertieren. Prinzipiell unterscheidet man zwei verschiedene Hauptgruppen: Resistenzintegrons (RI) und Superintegrons (SI). Erstere kodieren dabei meist für Resistenzen gegen Antibiotika und Desinfektionsmittel und befinden sich entweder auf dem Chromosom oder auf Plasmiden. Letztere dagegen liegen auf dem Chromosom und enthalten eine große Vielzahl an Genkassetten mit den unterschiedlichsten Funktionen. Bisher wurden fünf verschiedene RI-Klassen identifiziert. Ihre Klassifizierung erfolgt basierend auf der Homologie der Integrase-kodierenden Aminosäuresequenzen, die zwischen 40 und 58 % variiert. In gram-negativen Bakterien wird besonders häufig das Auftreten der Klassen 1 und 2 beobachtet. Diese bestehen normalerweise aus zwei konservierten Segmenten (5'CS und 3'CS), die eine variable Region mit einer oder mehrere Genkassetten flankieren (Hall, 1997; Fluit und Schmitz, 2004; Mazel, 2006). Genkassetten sind kleine zirkuläre mobile genetische Elemente (< 2 kb), die ein einzelnes Antibiotikaresistenz-Gen und eine Rekombinationsschnittstelle (attC, oder auch "59-Basenelement") enthalten. attC kann in Länge und Sequenz stark variieren und ist daher in jeder Genkassette einzigartig. Trotz dieser Heterogenität sind ihre Endsequenzen hoch konserviert, die wie folgt benannt sind: inverse "core site" mit der Sequenz RYYYAAC (Y = C+T, R = A+G) am 3'Ende des ORF und die "core site" mit der Sequenz GTTRRRY am 5'Ende. Im Gegensatz zu Plasmiden und Transposons besitzen Genkassetten keine Replikations- bzw. Transpositionssysteme (Recchia und Hall, 1995; Schwarz und Chaslus-Dancla, 2001; Helmuth et al., 2009).

Bei Klasse 1 Integrons besteht das 5'CS aus drei wesentlichen Elementen: einem Integrasekodierenden Gen (*intI*) und einer "*primary recombination site*" (*attI*) zur Integration von Genkassetten in das Wirtsgenom; sowie einem Promoter zur Expression der integrierten Gene. Das 3'CS kodiert normalerweise das Sulfonamidresistenz-Gen *sul1* und das $qacE\Delta I$ Gen, das Resistenzen gegen die in Desinfektionsmitteln verwendete quaternären Ammoniumverbindungen vermittelt(Carattoli, 2001). Klasse 2 Integrons treten zwar seltener auf, sind aber ebenfalls in Gattungen gram-negativer Bakterien, wie Acinetobacter, Shigella (Fluit und Schmitz, 2004) und Salmonella (Orman et al., 2002; Miko et al., 2003; Antunes et al., 2006; van Essen-Zandbergen et al., 2007; Michael et al., 2008) beschrieben worden. Sie tragen ein *intI2* Gen mit einem internen Stop-Codon, eine Rekombinationsschnittstelle attI2 und eine Promotorregion und sind für gewöhnlich mit dem Transposon Tn7 assoziiert (Hansson et al., 2002; Miko et al., 2003). Dank ihrer einzigartigen Fähigkeit Resistenzgene zu clustern und zu exprimieren, spielen Integrons eine bedeutende Rolle bei der Entstehung von Multiresistenzen (Recchia und Hall, 1995; Carattoli, 2001; Schwarz et al., 2006). Zudem werden die Verbreitung von Resistenzgenen unter verschiedenen Replikons und ihr Austausch zwischen Plasmiden und bakteriellem Chromosom durch die Integration in transponierbare Elemente unterstützt (Partridge et al., 2001). Diese Verbindung von hoch effizienten Generfassungs- und Expressionssystemen zusammen mit der Eigenschaft der vertikalen und horizontalen Transmission von Resistenzgenen führt dazu, dass Bakterien den schädigenden Wirkungen von Antibiotika trotzen können (Carattoli, 2001).

1.2.2.2.2 Transposons

Bei Transposons handelt es sich um mobile genetische Elemente von variabler Größe (≤ 1 kb bis 60 kb), welche im Gegensatz zu Plasmiden jedoch nicht autonom replizieren können. Daher müssen sie sich in geeignete Vektormoleküle in der Zelle, wie die chromosomale DNA oder Plasmide, integrieren. Transposons können sich zwischen verschiedenen genetischen Strukturen bewegen, entweder intrazellulär oder konjugativ zwischen verschiedenen Bakterienzellen (Sørum und L'Abée-Lund, 2002; Schwarz und Chaslus-Dancla, 2001). Zwar können Transposons in ihrer Struktur variieren, doch für gewöhnlich besitzen sie ein Transposasegen, das für ihre Integration und Excision kodiert und in den meisten Fällen auch ein oder mehrere Resistenzgene (Schwarz *et al.*, 2006). Da oft verschiedene Transposons auf demselben Plasmid zusammen lokalisiert sind, kann es durch ein einziges Konjugationsevent zum Transfer von mehreren Resistenzdeterminanten kommen (Liebert *et al.*, 1999).

Aufgrund ihres Aufbaus und des Mechanismus der Transposition können Transposons in zwei Klassen eingeteilt werden. **Transposons der Klasse 1** werden von zwei Insertionssequenzen (IS) flankiert, die ihre Übertragung von Ort zu Ort ermöglichen. **Transposons der Klasse 2** hingegen werden zuerst repliziert und sind von kurzen "Inverted Repeat" Sequenzen flankiert. Aus dieser Gruppe sind bei gram-negativen Bakterien

insbesondere Transposons vom Typ Tn21 weit verbreitet (Brown und Evans, 1991; Bennett, 2000; Sørum und L'Abée-Lund, 2002).

1.2.2.2.3 Plasmide

Plasmide sind extrachromosomale, zirkuläre, doppelsträngige DNA-Elemente von variabler Größe (< 2 bis > 100 kb), die seit ihrer Entdeckung in den 1950er Jahren nahezu in allen Bakteriengattungen detektiert wurden. Da sie eigene Replikationssysteme besitzen, sind sie unabhängig von der chromosomalen DNA in der Bakterienzelle zur Replikation befähigt. Einige Plasmide besitzen aufgrund von sogenannten tra Genen die Fähigkeit von einer Donorzelle in einen Rezipienten transferiert zu werden (konjugative Plasmide), während andere ohne diese Region nur co-transferiert werden können oder gar nicht konjugativ sind (nicht-konjugative Plasmide). Ihre Integration kann sowohl in andere Plasmide, als auch in pars oder in toto in die chromosomale DNA erfolgen. Zudem dienen Plasmide als Vektoren für Transposons und Integrons/Genkassetten. Charakteristischerweise kodieren Plasmide nicht-essentielle Zellfunktionen (Antibiotikaresistenz, Virulenz, Stoffwechselvorgänge, etc.), aber sie tragen Gene, die ihnen einen selektiven Vorteil bei bestimmten Umweltbedingungen verschaffen können (Sørum und L'Abée-Lund, 2002; Schwarz und Chaslus-Dancla, 2001; Guerra et al., 2000a; Carattoli, 2003; Helmuth et al., 2009). Die Klassifikation von Plasmiden erfolgt üblicherweise basierend auf ihrer Replikationskontrolle nach dem Schema der Inkompatibilitätsgruppen (Inc), wobei in der Regel nur Plasmide unterschiedlicher Gruppen in derselben Bakterienzelle co-existieren können. Diese Methode ist ein wichtiges Instrument zur Verfolgung der Dissemination von plasmid-vermittelter Antibiotikaresistenz, sowie zum Verständnis der Evolution und Ausbreitung von neu aufkommenden Plasmiden (Carattoli et al., 2005).

1.2.2.2.4 Genomische Inseln Beispiel: Salmonella Genomic Island 1 (SGI1)

<u>Salmonella Genomic Island 1</u> (SGI1) (Abbildung 1.3) ist eine integrative mobilisierbare chromosomale Region mit einer Größe von 43 kb, die über horizontalen Gentransfer verbreitet werden kann. Bei *S. enterica* Serovaren ist sie zwischen den Genen *thdF* und *yidY* integriert bzw. bei *S.* Typhimurium zwischen *thdF* und *int2* der Retronsequenz (Boyd *et al.*, 2000; Doublet *et al.*, 2005). Im Jahr 2008 wurde eine zweite chromosomale Attachment-Site beschrieben. Hier erfolgt die Integration der Insel zwischen den Genen *sodB* und *purR* (Doublet *et al.*, 2008a).

SGI1 enthält ein Antibiotikaresistenzgen-Cluster, das sich auf einem komplexen Klasse 1 Integron von 13 kb befindet und als In104 bezeichnet wird (Boyd et al., 2000; Doublet et al., 2005; Levings et al., 2005). Dieses kodiert eine so genannte Pentaresistenz (Penta-R) gegen Ampicillin (kodierendes Gen: bla_{PSE-1}), Chloramphenicol/Florfenicol (floR), Streptomycin/Spectinomycin (aadA2), Sulfamethoxazol (sul1) und Tetrazyclin [tet(G)] (Boyd et al., 2001). Die Gene blapse-1 und aadA2 liegen jeweils auf den Klasse 1 Integrons InC und InD, deren variable Regionen jeweils eine Größe von 1,2 kb und 1,0 kb haben (Guerra et al., 2004b; Amar et al., 2008). Diese fünf Resistenzdeterminanten sind charakteristisch für den pandemischen S. Typhimurium definitiven Phagentyp (DT) 104, der seit den 1980er Jahren weltweit vorherrschender Grund für humane Salmonellosen war (Glynn et al., 1998; Threlfall et al., 2002; Doublet et al., 2005). Die erste Identifizierung von SGI1 erfolgte 2000 in einem kanadischen multi-resistenten S. Typhimurium DT104 Stamm mit dem oben beschriebenen Penta-R Phänotypen (Boyd et al., 2000). Seitdem wurden SGI1 sowie verschiedene variante SGI1-Antibiotikaresistenzgen-Cluster weltweit in unterschiedlichen Salmonella Serovaren und in Proteus mirabilis detektiert (Ahmed et al., 2007; Akiba et al., 2006; Doublet et al., 2004; Levings et al., 2005; Miko et al., 2005; Vo et al., 2006; Weill et al., 2005).



Abbildung 1.3: Lineare Darstellung der kompletten SGI1 und der flankierenden Regionen.

Die oberen Rechtecke kennzeichnen von rechts nach links transkribierte ORFs, während die unteren Rechtecke eine Transkriptionsrichtung von links nach rechts angeben. Gleiche Farben geben ORFs mit ähnlichen Funktionen an: grün, DNA-Rekombination; schwarz, DNA-Replikation; gelb, konjugativer Transfer; blau, regulatorisch; rot, Resistenz; weiß, unbekannt oder von anderer Funktion. Kopiert aus Boyd *et al.*, 2001.

1.3 Aufgabenstellung und Themenübersicht dieser Arbeit

Diese Arbeit versucht die Problematik des Auftretens multiresistenter *S. enterica* Isolate anhand ausgewählter aktueller Themenschwerpunkte unter verschiedenen molekularbiologischen Aspekten näher zu beleuchten.

Daher gliedert sich diese Dissertation in die drei allgemeinen Themenbereiche: 1) Multiresistenz in Deutschland, 2) Multiresistenz in Europa und 3) Multiresistenzassoziierte Plasmide.

Aus Übersichtlichkeitsgründen und zum besseren Verständnis werden die Hintergründe der einzelnen Studien im Ergebnisteil vorgestellt.

1.3.1 Multiresistenz in Deutschland

Dieses Thema wurde am Beispiel von *S.* Saintpaul Isolaten in deutschen Truthühnern und den daraus gewonnenen Lebensmitteln näher untersucht.

Zunächst sollten die phäno- und genotypischen Resistenz-Charakteristika ausgewählter in Deutschland während der Jahre 2000 bis 2007 isolierter Stämme untersucht werden. Anschließend sollten mittels molekularer Typisierungsmethoden eventuelle klonale Beziehungen identifiziert werden. Auch eine mögliche Übertragung auf den Menschen über die Lebensmittelkette sollte anhand von Vergleichsgruppen-Isolaten humaner Herkunft analysiert werden.

1.3.2 Multiresistenz in Europa

Unter diesem Punkt sind im Rahmen des Exzellenznetzwerks MedVetNet durchgeführte Studien in europäischen *Salmonella enterica* Isolaten zusammengefasst. Die erste Teilstudie beschäftigte sich mit dem Thema Antimikrobielle Resistenz und Virulenz-Determinanten in europäischen *Salmonella* Genomic Island 1 (SGI1) positiven *Salmonella enterica* Isolaten unterschiedlicher Herkunft.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der molekularen Eigenschaften von SGI1 tragenden *Salmonella* Serovare in einer europäischen Stammsammlung. Außerdem sollte die Frage geklärt werden, ob ein Zusammenhang zwischen Virulenz, Multiresistenz und der Präsenz von SGI1 besteht.

Die zweite Studie befasste sich mit der Identifizierung und Charakterisierung von multiresistenten europäischen *S.* Newport Isolaten (SGI1-positiv und –negativ) unterschiedlicher Herkunft. Hier sollte zunächst ein Überblick über das auftreten von *S.* Newport in den Teilnehmerländern gewonnen werden und anschließend multiresistente Isolate charakterisiert und auf die Präsenz von SGI1-Varianten analysiert werden.

1.3.3 Multiresistenz-assoziierte Plasmide

Innerhalb des Exzellenznetzwerks MedVetNet wurden des Weiteren zwei Plasmid-Studien durchgeführt. Die erste beschäftigte sich mit der Analyse eines *qnrB*-Plasmids in einem SGI1 positiven S. Typhimurium Human-Isolat aus den Niederlanden und die zweite mit der Identifizierung und Charakterisierung von Virulenz-Resistenz-Plasmiden in multiresistenten S. Typhimurium Isolaten.

MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

Die für diese Arbeit verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien, sind in den Tabellen 2.1 - 2.3 alphabetisch aufgeführt. Alle Reagenzien wurden in analytischer Qualität bezogen.

Gerät	Hersteller
ABI Prism Genetic Analyzer 310, Sequenzierer	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Andruckdispenser für Antibiotika-Testplättchen	Oxoid, Wesel, Deutschland
CHEF DRIII PFGE	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Densimat-Photometer	Biomérieux, Craponne, Frankreich
Digital-pH-Meter Lab850	Schott, Mainz, Deutschland
DNA-Gelelektrophorese Kammer, horizontal	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
DNA-Gelelektrophorese Kammer, vertikal	BfR, Berlin, Deutschland
EagleEye-II, Gel-Dokumentationssystem	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Folienschweißgerät	Audion Elektro, Weesp, Niederlande
Gene Pulser Xcell Elektroporationssystem	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
GeneQuant, Photometer	GE Healthcare, München, Deutschland
Glasbecher, -flaschen, -kolben	Schott, Mainz, Deutschland
Glaspipetten	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Klett-Photometer	Klett-Summerson, Philadelphia, USA
Kühlzentrifuge Eppendorf 5810R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Magnetrührer Heidolph MR 3001	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Messzylinder	Schott, Mainz, Deutschland
Multikanalpipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Multipipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetboy Pipetus-Akku	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Pipetten Eppendorf Research	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
PowerPac™ Basic Netzgerät	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Präzisionswaage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Replikator, 48 Pins	V&P Scientific, Inc., San Diego, CA, USA
Schüttelwasserbad	Köttermann Labortechnik, Uelze-Hänigsen, Deutschland
Sensititre Autoinoculator INO2	Trek Diagnostic Systems, East Grinstead, UK
Sensititre Sensitouch System, halbautomatisch	Trek Diagnostic Systems, East Grinstead, UK
Sicherheitswerkbank DNA/RNA UV-cleaner box UVC/T-AR	Lab4you GmbH, Berlin, Deutschland
SpeedVac Eppendorf 5301	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sterilwerkbank HeraSafe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermocycler Modell 9700	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Thermocycler Modell 2720	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Tischzentrifuge Eppendorf 5415D	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Transilluminator	Biostep GmbH, Jahnsdorf, Deutschland
Vakuumblotter Model 785	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Vortex Mixer	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Wasserbad	Köttermann Labortechnik, Uelze-Hänigsen, Deutschland

Tabelle 2.1: Laborgeräte

Tabelle 2.2:	Verbrauchsmaterialien
--------------	-----------------------

Material	Hersteller
ABI Prism Genetic Analyzer Sample tubes 0,5 ml	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
ABI Prism 310 Genetic Analyzer Kapillare, 47 cm x 50 μ m	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Drygalskispatel, aus Glas	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Einmalküvetten, 1,5-3 ml	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Elektroporationsküvetten, 2 mm	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Falcon Röhrchen, 15 ml und 50 ml	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Filterpapier Whatmann No.1	Omnilab, Bremen, Deutschland
Impfösen, steril 10 μl	VWR International, Dresden, Deutschland
Mikrotiterplatten NLMV1A	Trek Diagnostic Systems, East Grinstead, UK
Mikrotiterplatten, 96-well, U-Boden	VWR International, Dresden, Deutschland
Millipore-Membran Filter, 25 mm, 0,45 μm	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Nunc-Kryoröhrchen	Renner, Dannstadt, Deutschland
Nylon mebrane posively charged	Roche, Grenzach, Deutschland
Parafilm	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Petrischalen, rund Ø 90 mm	VWR International, Dresden, Deutschland
Petrischalen, quadratisch 120x120x17 mm	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen mit Filter	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
PFGE Plug Molds	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Reaktionsgefäße, 0,2 ml	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Reaktionsgefäße, 1,5 ml und 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Spritzen, 5 ml	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Spritzenvorsatzfilter, 0,2 und 0,45 μm	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Wattestäbchen, steril, Kopf: 4-5,5 mm	VWR International, Dresden, Deutschland

Tabelle 2.3: Chemikalien und Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
ABI Template Supression Reagent (TSR)	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
ABI 10x Puffer mit EDTA, Elektrophoreselaufpuffer	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
ABI Performance Optimized Polymer 4, POP4	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Agar	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Agarose Electrophoresis Grade	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Agarose - Standard Low (für Plasmid-Gele)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Agarose - Biozym LE GP (Seakem) (für PFGE-Gele)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Antibiotika-Pulver	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Antibiotika-Testplättchen	Oxoid, Wesel, Deutschland
Anti-Digoxigenin-AP	Roche, Mannheim, Deutschland
Bacto-Hefeextrakt (Difco)	Voigt Global Distribution, Lawrence, USA
Bacto-Trypton (Difco)	Voigt Global Distribution, Lawrence, USA
BlnI (AvrII) (10 U/μI) mit 10x SuRE Cut Buffer Η (10 U/μΙ)	Roche, Mannheim, Deutschland
Borsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Chloroform	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DIG Easy Hyb granules	Roche, Mannheim, Deutschland
DNA Hyperladder II	Bioline, Luckenwalde, Deutschland
DNA Molecular Weight Marker II, DIG-labeled	Roche, Mannheim, Deutschland
dNTP-Set (A, T, C, G), je 2 mM	Roth, Karlsruhe, Deutschland

DyNAzyme II DNA Polymerase (2 U/μl)	Finnzym
mit 10x Optimized DyNAzyme™ Buffer	
EDTA	Fluka, Bı
Eosin-Methylen-Blau Agar	Merck K
Ethanol	Roth, Ka
E-Test Streifen	Invernes
Essigsäure	Roth, Ka
Ethidiumbromidlösung, 10 mg/ml (w/v)	Sigma, D
Ficoll FM 400	GE Healt
Gassner Agar	Merck K
Isopropanol (2-Propanol)	Merck K
Glucose	Merck K
Glycerin	Roth, Ka
Lambda Ladder PFG Marker	New Eng
Müller-Hinton Agar (Oxoid)	Oxoid, V
Natriumacetat	Roth, Ka
Natriumchlorid	Merck K
Natronlauge	Merck K
NBT/BCIP Stock Solution	Roche, N
N-Lauroyl-Sarcosine	Serva, H
PCR DIG Labeling Mix	Roche, N
PCR-Wasser (LiChrosolv [®])	Merck K
Phenol	Gibco, Li
Proteinase K (> 600 mAU/ml)	Qiagen,
Pstl (10 U/μl)	Ferment
Rnase A (100 mg/ml)	Qiagen,
Roti [®] - Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Roth, Ka
S1 Nuklease (100 U/ μ l) mit 10x S1 Nuclease Buffer	Takara, S
Sall (10 U/µl)	Ferment
Salzsäure	Merck K
SDS	Serva, H
SphI (PaeI) (10 U/µI)	Ferment
Thioharnstoff, 100 μM	Roth, Ka
Tris	Merck K
XbaI (10 U/µl) mit 10x SuRE Cut Buffer H	Roche, N

innzymes, Espoo, Finnland

	Fluka, Buchs, Schweiz
	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
	Roth, Karlsruhe, Deutschland
	Inverness Medical, Köln, Deutschland
	Roth, Karlsruhe, Deutschland
/v)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
	Roth, Karlsruhe, Deutschland
	New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland
	Oxoid, Wesel, Deutschland
	Roth, Karlsruhe, Deutschland
	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
	Roche, Mannheim, Deutschland
	Serva, Heidelberg, Deutschland
	Roche, Mannheim, Deutschland
	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
	Gibco, Langley, LA, USA
	Qiagen, Hilden, Deutschland
	Fermentas, Leon-Rot, Deutschland
	Qiagen, Hilden, Deutschland
ohol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
uclease Buffer	Takara, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
	Fermentas, Leon-Rot, Deutschland
	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
	Serva, Heidelberg, Deutschland
	Fermentas, Leon-Rot, Deutschland
	Roth, Karlsruhe, Deutschland
	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
er H	Roche, Mannheim, Deutschland

2.1.1 Nährmedien, Puffer und Lösungen, Reaktionskits

Alle in dieser Arbeit verwendeten Nährmedien, Puffer und Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, mit sterilem Aqua bidest. hergestellt. Puffer und Lösungen wurden sterilfiltriert. Ihre Zusammensetzungen sind in Tabellen 2.4 und 2.5 angegeben. Alle Nährmedien wurden, mit Ausnahme des M9 Minimalmediums, aus der zentralen Nährbodenküche des BfR bezogen und durch Autoklavieren bei 121 °C mit 1 Bar für 20 min sterilisiert. Die Zubereitung der Medien erfolgte unter Akkreditierungsbedingungen basierend auf den Arbeitsvorschriften (AVs) der Organisationseinheit (OE) Mikrobiologie des BfR in Ergänzung zu den OE-Standardsarbeitsanweisungen (SOPs) 037 und 038.

Tabelle 2.4: Nährmedien

Medium	Zuammensetzung in Aqua bidest. pro 1000 ml
Eosin Methylenblau (EMB) Agar (Merck KGaA)	10,0 g Pepton
	10,0 g Laktose
	2,0 g di-Kaliumhydrogenphosphat
	0,4 g Eosin
	0,07 g Methylenblau
	13,5 g Agar
	pH 7,0 ± 0,2
Gassner Agar (Merck KGaA)	14.0 g Pepton
	5,0 g NaCl
	43,0 g Laktose
	0,62 g Methylblau
	1,25 g Metachromgelb
	13,0 g Agar
	рН 7,2 ± 0,2
Luria-Bertani (LB) Nährlösung und Nährmedium (Oxoid)	10.0 g Trypton
	5,0 g Hefeextrakt
	10,0 g NaCl
	(12,0 g Agar)
	pH 7,0 ± 0,2
LB Medium für Resistenztests gegen organische Lösungsmittel	400 ml LB Agar
	2 ml Glukose-Lösung (20%)
	4 ml MgSO4-Lösung (1M)
60% Givcerol-LB-Lösung	600 ml Glycerol
	400 ml LB-Nährlösung
Müller-Hinton Agar (Oxoid)	17.5 g. Caseinhydrolysat
	2,0 g Rindfleischextrakt
	1,5 g Stärke
	17,0 g Agar
	pH 7,4 ± 0,2
M9 Minimalmedium (Sambrook <i>et al</i> ., 1989)	15 g Agar
	200 ml M9-Salz-Lösung (5x)
	nach dem Autoklavieren wurden folgende
	Komponenten steril zugefügt:
	2 ml MgSO ₄ -Lösung (1M)
	0,1 ml CaCl ₂ -Lösung (1M)
	20 ml Glukose-Lösung (20%)
Nutrient Agar (Difco)	5.0 g Penton
	3.0 g Rindfleischextrakt
	15.0 g Agar
	pH 6,8 ± 0,2
SOC-Medium	20 g Trypton
Joc-weulum	20 g Πγρισπ 5 g Hefeevtrakt
	0.5 g NaCl
	10 ml KCl-Lösung (250 mM)
	nach dem Autoklavieren wurden folgende
	Komponenten steril zugefügt:
	10 ml MgSO₄-Lösung (1M)
	10 ml CaCl2-Lösung (1M)
	150 ml Glukose-Lösung (20%)

Tabelle 2.5: Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zuammensetzung	Bemerkung
0,5 M EDTA (pH 8)	37,2 g Na ₂ EDTA x 21 ad 200 ml Aqua bidest.	H ₂ O 20 min bei 121°C autoklaviert; steril pH-Einstellung mit 5 N NaOH
1 M Tris-HCl (pH 8)	12,1 g Tris ad 200 ml Aqua bidest.	20 min bei 121°C autoklaviert; steril pH-Einstellung mit 5 N HCl
250 mM Tris-HCl (pH8)	3,03 g Tris ad 200 ml Aqua bidest.	20 min bei 121°C autoklaviert; steril pH-Einstellung mit 5 N HCl
Tris-EDTA (TE) Puffer (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA)	10 ml 1 M Tris-HCl 2 ml 0,5 M EDTA (ad 1000 ml Aqua bidest.	(pH 8) 20 min bei 121°C autoklaviert (pH 8) steril
10 x Tris-Borat-EDTA (TBE) Stammlösung (pH ≈ 8,3)	109 g Tris 55,6 g Borsäure 9,3 g Na ₂ EDTA x 21 ad 1000 ml Aqua bidest.	20 min bei 121°C autoklaviert H ₂ O steril
1 x TBE Puffer	200 ml 10 x TBE Puff 1800 ml Aqua bidest.	fer steril
0,5 x TBE Puffer	25 ml 10 x TBE Pufl 475 ml Aqua bidest.	fer steril
1 M Glucose-Lösung	19,8 g Glucose ad 100 ml Aqua bidest.	steril
0,25 N HCI	25 ml 5 N HCl ad 500 ml Aqua bidest.	steril
0,85% NaCl-Lösung	8,5 g NaCl ad 1000 ml Aqua bidest.	steril
0,5 N NaOH	50 ml 5 N NaOH ad 500 ml Aqua bidest.	steril
20 x SSC (3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat)	175 g NaCl 88,2 g Natriumcitra ad 1000 ml Aqua bidest.	20 min bei 121°C autoklaviert t steril
10 % SDS-Lösung	10 g SDS ad 100 ml Aqua bidest.	steril
15% SDS-Lösung	15 g SDS ad 100 ml Aqua bidest.	steril

Birnboim Lösung 1 (25 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; 50 mM Glucose)	2,5 2 5 ad 100	ml ml ml	1 M Tris-HCl (pH 8) 0,5 M EDTA (pH 8) 1 M Glucose-Lösung Aqua bidest. steril	
Birnboim Lösung 2 (0,2 N NaOH; 1% SDS)	200 100 ad 100	μl μl ml	1 N NaOH 10% SDS Aqua bidest. steril	
Birnboim Lösung 3 (3 M NaOAc; pH 5,2-4,8)	24,6 ad 100	g ml	NaOAc Aqua bidest. steril	pH-Einstellung mit Essigsäure
KADO-Puffer (50 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA)	1 0,04 ad 20	ml ml ml	1 M Tris-HCl (pH 8) 0,5 M EDTA (pH 8) Aqua bidest. steril	
KADO-Lysemix (15% SDS; 250 mM Tris; 5 N NaOH)	4 5 0,3 10,4	ml ml ml ml	15% SDS 250 mM Tris-HCl (pH 8) 5 N NaOH Aqua bidest. steril	vor Gebrauch frisch angesetzt
PCR-Ladepuffer	10 0,25	ml ml	15% Ficoll 5% Bromphenolblau	
PFGE Zell-Lyse-Puffer (5 mM Tris-HCl; 5 mM EDTA; 1% (w/v) Sarkosyl)	25 50 5 ad 500	ml ml g ml	1 M Tris-HCl (pH 8) 0,5 M EDTA (pH 8) N-Lauroyl-Sarcosine Aqua bidest. steril	
PFGE Zellsuspensionspuffer (CSB) (100 mM Tris-HCl; 100 mM EDTA)	100 200 ad 1000	ml ml ml	1 M Tris-HCl (pH 8) 0,5 M EDTA (pH 8) Aqua bidest. steril	20 min bei 121°C autoklaviert
Post-Hybridisierungs-Waschlösung 1	10 100 ad 100	ml µl ml	20 x SSC 10% SDS Aqua bidest. steril	
Post-Hybridisierungs-Waschlösung 2	1 200 ad 200	ml µl ml	20 x SSC 10% SDS Aqua bidest. steril	
5 x M9-Salz-Lösung	64 15 2,5 5 ad 1000	g g g g ml	Natriumphosphat-Pentahydrat Kaliumphosphat NaCl Ammoniumchlorid Aqua bidest. steril	20 min bei 121°C autoklaviert

Bezeichnung	Bestandteile	Hersteller
illustra™ GFX™ PCR DNA and	Capture Buffer Type 3	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Gel Band Purification Kit	Wash Buffer Type 1	
	Elution Buffer Type 4	
	Elution Buffer Type 6	
	illustra™ GFX™ MicroSpin™ Columns	
	Collection Tubes	
DIG Wash and Block Buffer Set	10 x Blocking Solution	Roche, Mannheim, Deutschland
	10 x Detection Buffer	
	10 x Maleic Acid Buffer	
	10 x Washing Buffer	
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	QIAGEN-tip 500	Qiagen, Hilden, Deutschland
	Buffer P1	
	Buffer P2	
	Buffer P3	
	Buffer QBT	
	Buffer QC	
	Buffer QF	

Tabelle 2.6: Reaktionskits

2.1.2 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide (Primer) für die PCR wurden von der Firma Metabion (Martinsried, Deutschland) bezogen. Die Primer-DNA war bei der Lieferung lyophilisiert und wurde nach Angaben des Herstellers in pyrogenfreiem Wasser gelöst, um eine 100 pmol Konzentration zu erhalten. Die Primer wurden in einer 1:10-Verdünnung (10 pmol) mit sterilem PCR-Wasser (LiChrosolv[®]; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) in die PCRs eingesetzt. Alle verwendeten Oligonukleotid-Sequenzen sind in den Tabellen A1a und A1b im Anhang aufgeführt.

2.1.3 Software

- ABI Prism GeneScan Analysis Software Version 3.1.2 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
- Bionumerics Version 5.1 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgien)
- CorelDraw Version 13 (Corel Corporation, Ottawa, ON, Kanada)
- DNAStar Lasergene 8.0 (DNAStar Inc., Madison, WI, USA)
- Microsoft Office Edition 2003 (Microsoft, Redmond, WA, USA)
- Microsoft Windows XP (Microsoft, Redmond, WA, USA)

- Reference Manager Version 12.0 (Thomas Reuters, Carlsbad, CA, USA)
- BLAST-Search-Programm des National Center for Biotechnology Information (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)
- Multivariate Statistics Package for PCs (MVSP) Version 3.1 (RockWare Inc., Golden, CO, USA)

2.1.4 Stammauswahl

2.1.4.1 Stämme zur Charakterisierung von S. Saintpaul Isolaten

Insgesamt wurde eine Anzahl von 55 S. Saintpaul Stämmen untersucht, die in Deutschland in den Jahren 2000 bis 2007 isoliert wurden. Alle Isolate stammten von Truthühnern (33 Kot-Isolate) oder Truthühner-assoziierten Lebensmittelprodukten (22 Lebensmittel-Isolate), die das NRL-Salm zur Serotypisierung und Resistenztestung erhalten hatte. Die Stammauswahl erfolgte aus der Datenbank des NRL-Salm. Um eine möglichst epidemiologisch unabhängige Stammsammlung zu erhalten, wurden für diese Studie nur Isolate ausgesucht, die entweder unterschiedlicher geographischer Herkunft waren oder zu unterschiedlichen Zeitpunkten isoliert wurden. Basierend auf ihrer Herkunft wurden die Isolate in drei verschiedene Sampling-Gruppen unterteilt. Gruppe 1 bestand aus 16 Stämmen, die im Rahmen der EU-Prävalenzstudie für Salmonellen in Truthühnerherden (2006-2007) aus Kotproben isoliert wurden. Elf dieser Stämme wurden als S. Saintpaul typisiert. Fünf S. Subspec. I Rauform zugeordnete Isolate konnten erst nach Anwendung molekularer Methoden als S. Saintpaul identifiziert werden. Diese Stämme repräsentierten, unter Ausschluss von Duplikaten, die während der Prävalenzstudie in Deutschland gesammelten 19 S. Saintpaul und 12 S. Subspec. I Rauform Isolate. Gruppe 2 setzte sich aus 17 Putenkot-Isolaten zusammen, die stichprobenweise aus Routineeinsendungen ausgewählt wurden. Darunter waren 11 von insgesamt 167 S. Saintpaul Kotproben-Isolaten, die das NRL-Salm zwischen 2002 und 2003 erhielt und 6 von 46 Kotproben-Isolaten, die zwischen 2005 und 2006 eingesendet wurden. Gruppe 3 beinhaltete 22 Isolate aus Putenfleisch-Produkten aus Routineeinsendungen der Jahre 2000 bis 2007. Alle Stämme wurden stichprobenartig ausgewählt und zeigten ein repräsentatives Bild der unterschiedlichen Resistenzphänotypen, die innerhalb dieser drei definierten Sampling-Gruppen auftraten. Zu Vergleichszwecken wurden zusätzlich insgesamt 24 S. Saintpaul Stämme als Vergleichsgruppe in die Studie integriert. Acht dieser Isolate stammten aus humanen Stuhlproben (isoliert in 2006 und 2007) und wurden vom Robert Koch-Institut (RKI; Wernigerode, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Zwei weitere ebenfalls deutsche Isolate aus der Stammsammlung des NRL-Salm stammten aus Hühnerkotproben (2006). Vierzehn niederländische *S*. Saintpaul Isolate aus Geflügel und Geflügelfleisch-Produkten (2006-2008) wurden vom Central Veterinary Institute, Lelystad, Niederlande bereitgestellt. Alle Stamminformationen sind in Tabelle A2a im Anhang aufgelistet.

2.1.4.2 Stämme zur Charakterisierung von europäischen *Salmonella* Genomic Island 1 (SGI1) positiven *Salmonella enterica* Isolaten

Die folgenden Institute stellten SGI-1 positive S. enterica Isolate zur Verfügung: Agence Française de Sécurité Sanitare des Aliments [AFSSA; seit 1. Juli 2010: Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES)], Maisons-Alfort, Frankreich; Central Veterinary Institute (CVI), Lelystad, Niederlande; Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Berlin, Deutschland; Istituto Superiore di Sanità (ISS), Rom, Italien; Statens Serum Institute (SSI), Kopenhagen, Dänemark; Panstwowy Zaklad Higieny (PZH), Warschau, Polen; Veterinary Laboratories Agency (VLA), Weybridge, UK und Veterinary Medical Research Institute (VMRI), Budapest, Ungarn. In einer vorhergehenden von Amar et al. (2008) innerhalb des Med-Vet-Net Arbeitspackets 21 durchgeführten Projektstudie analysierte das Labor für Enteropathogene der Health Protection Agency (HPA; Colindale, UK) zwischen Mai 2006 und März 2007 eine europäische Sammlung von 445 Bakterienisolaten auf die Präsenz von SGI1. In dieser Studie wurden insgesamt 152 Salmonella Isolate positiv gestestet. Davon wurden 38 zur weiteren molekularen Analyse an das BfR geschickt. Diese Auswahl umfasste folgende SGI1 positive Isolate: i) alle Isolate, die zu anderen Serovaren als S. Typhimurium gehörten: S. Agona (1 Isolat), S. Kentucky (1), S. Paratyphi B dT+ (S. Java) (1), S. Albany (3), S. Newport (4), S. Derby (5); ii) S. Typhimurium non-DT104 (18); iii) und zu Vergleichszwecken S. Typhimurium DT104 (5). Die Stämme wurden zwischen 2002 und 2006 in 8 europäischen Ländern aus Menschen (19 Isolate), Tieren (10) und Lebensmitteln (9) isoliert. Unter den Stämmen dieser Studie befanden sich insgesamt 15 Isolate, denen charakteristische SGI1 Marker fehlten und die somit atypische SGI1-Eigenschaften in den von Amar et al. (2008) durchgeführten Analysen zeigten. Aus diesem Grund werden diese Isolate hier als "unkonventionell" bezeichnet (siehe Tabelle 3.5 im Ergebnisteil). Alle Stamminformationen sind in Tabelle A2b im Anhang aufgelistet.

2.1.4.3 Stämme zur Charakterisierung europäischer S. Newport Isolate

Im Rahmen des Med-Vet-Net Arbeitspackets 21 erfolgte die Durchführung eines Teilprojekts zum Nachweis von SGI1 in S. Newport Isolaten. Insgesamt beteiligten sich folgende zehn Partnerinstitute aus neun europäischen Ländern an dieser Studie: Agence Française de Sécurité Sanitare des Aliments [AFSSA; seit 1. Juli 2010: Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses)], Maisons-Alfort, Frankreich; Central Veterinary Institute (CVI), Lelystad, Niederlande; Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Berlin, Deutschland; Health Protection Agency (HPA), Colindale, UK; Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spanien; Istituto Superiore di Sanità (ISS), Rom, Italien; Statens Serum Institute (SSI), Kopenhagen, Dänemark; Panstwowy Zaklad Higieny (PZH), Warschau, Polen; Veterinary Laboratories Agency (VLA), Weybridge, UK Veterinary Medical Research Institute (VMRI), Budapest, und Ungarn. Alle Projektpartnerinstitute wurden im April 2009 gebeten, ihre Daten bezüglich der in ihren Laboratorien in den Jahren 2007 und 2008 isolierten S. Newport Stämme in Form einer Excel-Tabelle zur Verfügung zu stellen. Sofern vorhanden, wurden basierend auf dem Selektionskriterium "Multiresistenz" aus insgesamt 559 Isolaten pro Institut jeweils fünf multiresistente Isolate sowie ein sensibler Stamm als Kontrolle ausgewählt. Die Einsendungen der selektierten Stämme am BfR erfolgte zwischen Juni und Juli 2009. Insgesamt bestand die ausgewählte Stammsammlung dieser Studie aus 51 S. Newport Stämmen verschiedenster Herkunft, die zwischen 2005 und 2009 in neun europäischen Ländern isoliert worden waren. Alle Stamminformationen sind in Tabelle A2c im Anhang aufgelistet.

2.1.4.4 Stämme zur Charakterisierung von Virulenz-Resistenz-Plasmiden

Unter den in der Arbeit von Amar *et al.* (2008) analysierten Stämmen waren 66 *S.* Typhimurium Isolate, deren Resistenzphänotyp zwar die Präsenz von SGI1 vermuten lies, die aber negativ für diese Struktur getestet wurden. Insgesamt wurden davon 15 Isolate ausgewählt, die mindestens Resistenzen gegen Ampicillin, Tetrazyclin und Sulfamethoxazol sowie volle oder intermediäre Resistenz gegen Streptomycin aufwiesen. Elf dieser Stämme zeigten die SGI1 typische Pentaresistenz plus eventuellen zusätzlichen Resistenzen gegen Trimethoprim, Gentamicin, und/oder Kanamycin. Die Isolate dieser Studie waren entweder humaner (6 Isolate) oder porciner (9) Herkunft und wurden verschiedenen Untersuchungen zur Identifizierung und Charakterisierung von Virulenz-Resistenz-Plasmiden unterzogen. Sie wurden von folgenden Projektpartnern zur Verfügung gestellt: Istituto Superiore di Sanità (ISS), Rom, Italien; Statens Serum Institute (SSI), Kopenhagen, Dänemark und Veterinary Laboratories Agency (VLA), Weybridge, UK. Alle Stamminformationen sind in Tabelle A2d im Anhang aufgelistet.

2.1.5 Referenzstämme

Für die in dieser Arbeit angewendeten mikro- und molekularbiologischen Methoden wurden die in den Tabellen 2.7 aufgeführten Kontrollstämme eingesetzt.

Stammbezeichnung	Organismus	Methode	Quelle
1B ⁻	4.5.12:i:-	PCR	Universidad de Oviedo, Asturias, Spanien
 DH5α-sul3	S. Typhimurium	PCR	Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin, Deutschland
DMC9	S Virchow	PCB	Middle Fast Technical University Ankara Türkei
F467	E. coli	PCR	Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin, Deutschland
E. coli β-20	E. coli	PCR	EU Reference Laboratory for Antimicrobial Resistance, Lingby, Dänemark
E. coli MUR050 (armA)	E. coli	PCR	Universidad Coplutense de Madrid. Madrid. Spanien
J53-pMG252	E. coli	PCR	Universidad de Sevilla, Sevilla, Spanien
Kb anrB ⁺	Klebsiella pneumoniae	PCR	Université Paris, Paris, Frankreich
LT2	S. Typhimurium	PCR	Bayer Pharma-Forschungszentrum, Wuppertal, Deutschland
Lucia	S. Typhimurium	PCR	Universidad de Oviedo, Asturias, Spanien
NRL-99-2175	S. Derby	PCR	Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin, Deutschland
NRL-99-4068	S. Typhimurium	PCR	Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin, Deutschland
NRL-00-419	S. Typhimurium	PCR	Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin, Deutschland
NRL-00-2933	S. Typhimurium	PCR	Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin, Deutschland
P20	S. Paratyphi B dT+	PCR	Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin, Deutschland
P304	S. Panama	PCR	Universidad de Oviedo, Asturias, Spanien
p2007057	E. coli	PCR	Technical University of Denmark, Denmark
T25	S. Typhimurium	PCR	Universidad de Oviedo, Asturias, Spanien
T31	S. Typhimurium	PCR	Universidad de Oviedo, Asturias, Spanien
T51	S. Typhimurium	PCR	Universidad de Oviedo, Asturias, Spanien
ATCC [®] E. coli 25922	E. coli	Agardiffusionstest zur Antibiotika-Empfindlichkeitsprüfung	American Type Culture Collection, Manassas, USA
ColE1	E. coli	Plasmid-Analyse (Kado und Liu, 1981)	National Collection of Type Cultures, HPA, Colindale, UK
R27	E. coli	Plasmid-Analyse (Kado und Liu, 1981)	National Collection of Type Cultures, HPA, Colindale, UK
R1	E. coli	Plasmid-Analyse (Kado und Liu, 1981)	National Collection of Type Cultures, HPA, Colindale, UK
RP4	E. coli	Plasmid-Analyse (Kado und Liu, 1981)	National Collection of Type Cultures, HPA, Colindale, UK
S. Braenderup H9812	S. Braenderup	PFGE	American Type Culture Collection, Manassas, USA
L700	S. Typhimurium	Triclosan-Resistenztest	University of Birmingham, Birmingham, UK
L701	S. Typhimurium	Triclosan-Resistenztest	University of Birmingham, Birmingham, UK
L702	S. Typhimurium	Triclosan-Resistenztest	University of Birmingham, Birmingham, UK
F. coli 153	E coli	Konjugation (Bezinient)	Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, Spanien
(mit Natriumazid-Resistenz)	2.000	Konjugation (Rezipient)	
E. coli A/C	E. coli	Replikontyping	Istituto Superiore di Sanità, Rom, Italien
E. coli B/O	E. coli	Replikontyping	Istituto Superiore di Sanità, Rom, Italien
E. coli F	E. coli	Replikontyping	Istituto Superiore di Sanità, Rom, Italien
E. coli FIA	E. coli	Replikontyping	Istituto Superiore di Sanità, Rom, Italien
E. coli FIB	E. coli	Replikontyping	Istituto Superiore di Sanità, Rom, Italien
E. coli FIC	E. coli	Replikontyping	Istituto Superiore di Sanità, Rom, Italien
E. coli FIIAs	E. coli	Replikontyping	Istituto Superiore di Sanità, Rom, Italien
E. coli HI1	E. coli	Replikontyping	Istituto Superiore di Sanità, Rom, Italien
E. coli HI2	E. coli	Replikontyping	Istituto Superiore di Sanità, Rom, Italien
E. coli 11	E. coli	Replikontyping	Istituto Superiore di Sanità, Rom, Italien
E. coli K	E. coli	Replikontyping	Istituto Superiore di Sanità, Rom, Italien
E. coli L/M	E. coli	Replikontyping	Istituto Superiore di Sanità, Rom, Italien
E. coli N	E. coli	Replikontyping	Istituto Superiore di Sanità, Rom, Italien
E. coli P	E. coli	Replikontyping	Istituto Superiore di Sanità, Rom, Italien
E. coli T	E. coli	Replikontyping	Istituto Superiore di Sanità, Rom, Italien
E. coli W	E. coli	Replikontyping	Istituto Superiore di Sanità, Rom, Italien
E. coli X	E. coli	Replikontyping	Istituto Superiore di Sanità, Rom, Italien
E. coli Y	E. coli	Replikontyping	Istituto Superiore di Sanità, Rom, Italien

Tabelle 2.7: Referenzstämme

2.2 Methoden

2.2.1 Phänotypische Methoden

2.2.1.1 Serotypie

Die Serotypisierung der *Salmonella* Isolate erfolgte in der Routinediagnostik des NRL-Salm nach dem White-Kauffmann-Le Minor Schema (Grimont und Weill, 2007). Die Untersuchung wurde mittels Objektträger-Agglutination mit den für die O- (Oberflächen) und H- (Flagellen)-Antigen spezifischen kommerziell erhältlichen Antiseren (Sifin GmbH, Berlin, Deutschland) durchgeführt. Die zu überprüfende Bakterienkolonie wurde gemeinsam mit einem Tropfen spezifischen Antiserums auf einem Objektträger vermischt. Wurde durch die Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes eine Ausklumpung beobachtet, wurde die Reaktion als positiv bewertet. Eine homogene Suspension zeigte ein negatives Ergebnis an.

2.2.1.2 Phagentypisierung

Die Phagentypisierung der *S*. Typhimurium Isolate wurde in der Routinediagnostik des NRL-Salm durchgeführt. Hierbei wurde nach dem Phagentypie-Schema von Callow (1959) erweitert durch Anderson *et al.* (1977) gearbeitet. Die eingesetzten Phagen wurden vom WHO Collaborative Centre for phage typing of *Salmonella* (HPA, Colindale, UK) bezogen. Die Oberfläche einer Nutrient-Agarplatte wurde mit einem homogenen Bakterienrasen des Teststamms versehen und anschließend mittels eines Stempels mit ca. 0,004 – 0,01 ml jeder Phagensuspension benetzt. Nach Trocknung und Inkubation bei 37 °C für ca. 18 Stunden erfolgte die Auswertung des Lysemusters. Der Phagentyp wurde durch Vergleich mit dem jeweiligen Phagenschema bestimmt. In diesem Schema nicht erfasste Lysemuster wurden mit RDNC bezeichnet ("<u>R</u>eaction <u>did not c</u>onform").

2.2.1.3 Stammhaltung und Wachstumsbedingungen

Alle untersuchten Stämme wurden bei -20 °C (Gebrauchskulturen) und -80 °C (Langzeitaufbewahrung) in Form von Glycerinkulturen gelagert. Hierzu wurde zunächst von

einer Reinkultur auf Gassner-Agar eine Einzelkolonie in 3 ml LB-Medium überimpft und für 18 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden 800 µl der Übernachtkultur im Verhältnis 1:1 mit einer 60 %igen Glycerol-LB-Lösung gemischt und in verschraubbaren Nunc-CryoTubes[™] aufbewahrt.

2.2.1.4 Antibiotika-Empfindlichkeitsprüfung mittels Bouillon-Mikrodilution

Alle in dieser Arbeit analysierten Stämme wurden in der Routinediagnostik des NRL-Salm auf ihre Empfindlichkeit gegenüber 17 antimikrobiellen Wirkstoffen geprüft. Die Durchführung der **Bouillon-Mikrodilution** der minimalen zur Bestimmung Hemmkonzentration (MHK) erfolgte nach Vorgaben des Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M7-A7, 2006 (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006a). Dabei wurde eine Kolonie des Teststamms von Müller-Hinton Agar in 5 ml NaCl-Lösung (0,85 %) resuspendiert und auf den McFarland-Trübungsstandard 0,5 (entspricht 1-2 x 10⁸ KBE/ml; für E.coli ATCC[®] 25922) eingestellt. Ein 50 µl Aliquot dieser Suspension wurde mit dem Sensititre Autoinokulator INO2 in kommerziell erhältlicher Mikrotiterplatten (TREK Diagnostic Sytems, East Grinstead, UK) gegeben, die lyophilisierte Antibiotika verschiedener Konzentration enthielten. Die Platten wurden mit einer Folie verschlossen und 18 Stunden bei 37°C bebrütet. Die Empfindlichkeit der Bakterien gegenüber den verschiedenen antimikrobiellen Substanzen wurde anhand ihres Wachstums durch ein halbautomatisches Sensitouch-System (TREK Diagnostic Sytems, East Grinstead, UK) bestimmt und abgelesen. Als MHK-Wert wird die niedrigste Antibiotikakonzentration, bei der kein Zellwachstum mehr festgestellt werden kann, definiert. Die getesteten Antibiotika und die verwendeten MHK-Breakpoints sind in Tabelle A3a im Anhang aufgeführt.

2.2.1.5 Antibiotika-Empfindlichkeitsprüfung mittels Agardiffusionstest

Diese Methode wurde zur Überprüfung der durch Bouillon-Mikrodilution ermittelten Resistenzen und zur Testung zusätzlicher antimikrobieller Substanzen, die nicht im Standard-Panel des NRL-Salm getestet werden, eingesetzt. Die Durchführung erfolgte nach den vorgegebenen Standards M2-A9 des CLSI durchgeführt (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006b). Mit Hilfe eines sterilen Tupfers wurden 3 bis 5 gut isolierte Kolonien von einer Müller-Hinton Agarplatte in ein mit 4 ml NaCl (0, 85%) gefülltes FlachbodenReagenzglas überführt. Da bei der Durchführung von Empfindlichkeitstests Standardinokula verwendet werden müssen, wurde der McFarland-Trübungsstandard 0,5 mittels Densimat-Photometer (Biomérieux, Frankreich) eingestellt. Zur Funktionskontrolle wurde eine BaSO₄-Vergleichslösung (Biomérieux, Frankreich) verwendet. Die standardisierte Zellsuspension wurde mit einem frischen Tupfer auf quadratischen Müller-Hinton Agarplatten (Oxoid, Deutschland) netzartig ausgestrichen. Die Durchführung des Plattendiffusionstests erfolgte mit zwei unterschiedlichen Antibiotika-Testreihen: dem 1) Standard-Antibiogramm mit 16 verschiedenen Antibiotika-Testplättchen zur Bestätigung der durch Bouillon-Mikrodilution ermittelten Resistenzphänotypen (Abbildung 2.1, Tabelle 2.8) und dem 2) ß-Laktam-Antibiogramm mit 15 verschiedenen Antibiotika-Testplättchen (Tabelle 2.9). Die Antibiotika-Testplättchen (Ø 6 mm) wurden mit Hilfe eines 16-Kartuschen-Andruckdispensers (Oxoid, Frankreich) aufgebracht. Als Kontrolle wurde der *E.coli* Stamm ATCC[®] 25922 mitgeführt, der bei korrekter Funktion der Disks für alle Antibiotika sensibel sein sollte. Nach der Inkubationszeit von 18 h bei 37 °C im Brutschrank wurden die Platten anhand der Durchmesser der Hemmhöfe ausgewertet. Die verwendeten Antibiotika sowie die zur Auswertung herangezogenen CLSI-Breakpoints M31-A3 (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008a) und M100-S18 (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008b) sind in den Tabellen 2.8 und 2.9 aufgeführt.





Abbildung 2.1: Standard-Antibiogramm nach der Methode der Plattendiffusion.

Plattengröße: 120 x 120 x 17 mm; nach CLSI Standards M2-A9 (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006b).

Tabelle2.8:Standard-Antibiogramm:InterpretationsstandardderHemmhof-DurchmesserfürEnterobacteriaceae.NachCLSIStandardsM31-A3(Clinical and LaboratoryStandardsInstitute, 2008a)undM100-S18(Clinical and LaboratoryStandardsInstitute, 2008b).R: resistent, I: intermediär, S: sensibel.

Antimikrobielle	Disk-	Hemmhof-Durchmesser Breakpoints (mm)		
Substanz	Inhalt (µg)	R	I	S
AMP	10	≤13	14-16	≥17
CHL	30	≤ 12	13-17	≥ 18
FLO	30	≤ 14	15-18	≥ 19
GEN	10	≤ 12	13-14	≥ 15
KAN	30	≤ 13	14-17	≥ 18
NEO	10		nicht definie	rt
CIP	5	≤ 15	16-20	≥ 21
NAL	30	≤ 13	14-18	≥ 19
AMC	30	≤ 13	14-17	≥ 18
TET	30	≤ 11	12-14	≥ 15
STR	10	≤ 11	12-14	≥ 15
SPE	100	≤ 10	11-13	≥ 14
SUL	300	≤ 12	13-16	≥ 17
ТМР	5	≤ 10	11-15	≥ 16
SXT	25	≤ 10	11-15	≥16
XNL	30	≤ 17	18-20	≥ 21

Tabelle2.9:B-Laktam-Antibiogramm:InterpretationsstandardderHemmhof-DurchmesserfürEnterobacteriaceae.Nach CLSI StandardsM31-A3 (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008a) undM100-S18 (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008b). R: resistent, I: intermediär, S: sensibel.

ß-Laktam	Disk-	Hemmhof-Durchmesser Breakpoints (mm)		
Antibiotika	Inhalt (µg)	R	I	S
Ampicillin (AMP)	10	< 12	14 16	> 17
Centralothin (CEE)	30	≤ 15 < 14	14-10	≥17 >18
Cefuroxim (CXM)	30	< 14	15-17	≥ 18 > 18
Ticarcillin (TIC)	75	< 14	15-19	> 20
Piperacillin (PIP)	100	` ≤ 17	18-20	≥21
Ceftiofur (XNL)	30	≤ 17	18-20	≥21
Ceftriaxon (CRO)	30	≤ 13	14-20	≥21
Imipenem (IMP)	10	≤ 13	14-15	≥16
Cefotaxim (CTX)	30	≤ 14	15-22	≥ 23
Amoxycillin-Clavulansäure (AMC)	30	≤ 13	14-17	≥ 18
Ceftazidim (CAZ)	30	≤ 14	15-17	≥ 18
Aztreonam (AZM)	30	≤ 15	16-21	≥ 22
Cefpodoxim (CPD)	10	≤ 17	18-20	≥21
Cefoxitin (FOX)	30	≤ 14	15-17	≥18
Cefepime	30	≤ 14	15-17	≥18

2.2.1.6 Antibiotika-Empfindlichkeitsprüfung mittels Agar-Dilutionsmethode

Die Durchführung dieser Methode zur Bestimmung der MHK-Werte für sechs ausgewählte Cephalosporine der ersten (Cephalothin), zweiten (Cefuroxim) und dritten (Cefoxitin, Cefotaxim, Ceftiofur, Ceftazidim) Generation erfolgte nach den vorgegebenen Standards M7-A7 des CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006a, siehe Abbildung 2.2). Für die Herstellung der Lösungen der antimokrobiellen Substanzen wurde zunächst die Anzahl der verschiedenen zu testenden Konzentrationen bestimmt. Diese wurden so gewählt, dass sie die interpretativen Breakpoints der antimikrobiellen Substanzen umfassten (für Ceftiofur 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8 µg/ml; für alle anderen 1; 2; 4; 8; 16; 32 µg/ml). Die Antibiotika-Pulver (Sigma-Aldrich, Deutschland) wurden mit einer Feinwaage abgewogen und in den vom Hersteller empfohlenen Lösungsmitteln gelöst. Die Herstellung der jeweiligen Stammlösung erfolgte entsprechend CLSI Vorgaben entweder mit einer Konzentration von 1280 µg/ml oder 10 x der höchsten zu testenden Konzentration. Ausgehend von dieser Stammlösung wurde eine Verdünnungsreihe erstellt. Zur Herstellung der Agar-Dilutionsplatten wurde eine entsprechende Menge Müller-Hinton Agar (25 ml pro Petrischale mit Ø 10 cm) für 30 Minuten bei 100 °C im Autoklaven erhitzt und anschließend im Wasserbad auf 50 °C temperiert (Tabelle 2.10). Nach Zugabe der Antibiotika-Lösungen wurde das Gemisch kurz geschwenkt und unter Vermeidung von Luftblasen in die Petrischalen gegossen. Nach Erstarren und Trocknen des Agars bei Raumtemperatur wurden die Platten entweder sofort verwendet oder in Plastiktüten verschlossen bei 4 °C im Kühlraum gelagert. Zur Erstellung des Inokulums wurden die zu testenden Stämme zunächst auf nicht-selektive Agarplatten wie z. B. LB überimpft und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Als Postivkontrolle wurde S. Paratyphi B Res-07-04825 mitgeführt und als Negativkontrolle E. coli ATCC 25922. Von den Agarplatten wurde mit einer Einwegimpföse jeweils eine Einzelkolonie gepickt und in 4 ml NaCl-Lösung überführt. Mittels Densimat-Photometer wurde die Suspension auf einen McFarland-Wert von 0,5 eingestellt (entspricht ca. 1-2 x 10⁸ KBE/ml) und anschließend auf Eis gekühlt. Ebenfalls auf Eis erfolgte der Transfer von 100 µl jeder Suspension in eine Mikrotiterplatte. Da die Pins des Replikators ≥ 1 mm waren, wurde die Suspension entsprechend CLSI Vorgaben in einer weiteren Mikrotiterplatte 1:10 in 0,85 % NaCl verdünnt. Zur Inokulation der Agarplatten wurde der Replikator vorsichtig in die Mikrotiterplatte eingetaucht und anschließend die Agaroberfläche beimpft (ca. 10⁴ KBE/Spot). Beginnend mit der niedrigsten Antibiotikakonzentration wurden die Platten der Reihe nach entsprechend inokuliert. Zusätzlich wurden jeweils zu Beginn und am Schluss eine Kontrollplatte ohne Antibiotikazusatz beimpft, um Kontaminationen oder Carry-Over ausschließen zu können. Die beimpften Platten wurden so lange bei Raumtemperatur stehengelassen bis die Spots getrocknet waren. Anschließend wurden die Platten invertiert für 18-20 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Bei der Auswertung der Ergebnisse wurde die niedrigste Antibiotikakonzentration, die vollständig das Bakterienwachstum inhibierte, als MHK-Wert notiert.

	п・・ı	TT / 11	A 1º1 /*	1 44
Tabelle 2.10:	Beispiel zur	Herstellung von	Agardilutions	platten.

Konzentration der Antibiotika-Lösung (µg/ml)*	Herstellung der Agardilutionsplatten	Finale Antibiotika-Konzentration in der Agarplatte (μg/ml)	
1280	2,5 ml Antibiotika-Lösung + 97,5 ml Müller-Hinton Agar	32	
640	II	16	
320	н	8	
160	н	4	
80	н	2	
40	п	1	

* Zur Herstellung der Verdünnungsreihe wurden beginnend von der Stammlösung (1280 µg/ml) sukzessive 1:2 Verdünnungen mit sterilem Aqua bidest. angelegt.



Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Antibiotika-Empfindlichkeisprüfung mittels Agar-Dilutionsmethode.

2.2.1.7 Double-Disk Synergy Test

Diese Methode zur Bestätigung von ESBLs wurde nach einem MedVetNet Protokoll (http://www.medvetnet.org/pdf/Reports/Appendix_2_Workpackage_9.doc) durchgeführt. Wie beim Agardiffusionstest wurde eine Kolonie des Teststamms in 4 ml NaCl überführt, der McFarland auf einen Wert von 0,5 eingestellt und die Zellsuspension auf einer Müller-Hinton-Agarplatte ausgestrichen. Dann wurde ein Testplättchen mit Amoxicillin-Clavulansäure (30 μ g) 30 mm entfernt von jeweils einem Ceftazidim- (30 μ g) und Cefotaxim-

Testplättchen (30 μ g) aufgebracht. Die Auswertung erfolgte nach der Inkubation von 18 Stunden bei 37 °C. Ein Größenzuwachs in der Cephalosporinzone nahe des ß-Laktamase-Inhibitor enthaltenen Testplättchens (Synergie) zeigte die Gegenwart von ESBLs an.

2.2.1.8 Desinfektionsmittel Resistenztest (Triclosan)

Die Bestimmung der Resistenz gegen Triclosan (Irgasan, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) erfolgte nach der in 2.6a.6 beschriebenen Methode der Agar-Dilution. Die in MHA getesteten Konzentration reichten von 0,015 bis 64 µg/ml. Die Isolate wurden nach Webber *et al.* (2008) in folgende Resistenzstufen eingeordnet: high-level resistent (MHK, >32 µg/ml), medium-level resistent (MHK, 16-32 µg/ml), low-level resistent (MHK, 4-8 µg/ml) und sensibel (MHK, < 4 µg/ml). Isolate mit MHK-Werten zwischen 0.125 und 2 µg/ml wurden als "vermindert sensibel" betrachtet. Als Kontrollen wurden drei *S*. Typhimurium Stämme L700, L701 und L702 verwendet (Webber *et al.*, 2008).

2.2.1.9 Resistenztest gegen organische Lösungsmittel

Die Resistenz gegenüber den organischen Lösungsmitteln *n*-Hexan und Cyclohexan wurde nach Protokollen von Asako et al. (1997) und Liebana et al. (2002) durchgeführt. Die Übernachtkulturen wurden in Mikrotiterplatten angesetzt. Hierzu wurde eine Einzelkolonie des zu analysierenden Isolats in 100 µl einer LB/Glukose-Lösung überimpft und die Platte über Nacht bei 30 °C im Brutschrank inkubiert. Als Kontrollen wurden die beiden E. coli Stämme AG100 (Wildtyp E. coli K-12) und AG102 (marR1 Mutante von AG100; Cyclohexan-resistent) (White 1997) mitgeführt. Die Agarplatten wurden wie folgt vorbereitet: 400 ml flüssiger LB-Agar wurden mit 2 ml 20 %iger Glukose und 4 ml MgSO4 (1M) versetzt und davon jeweils 60 ml in Glas-Petrischalen eingefüllt. Nach Trocknung bei RT wurde ein Replikator in die Übernachtkulturen in der Mikrotiterplatte eingetaucht und die Oberfläche von insgesamt drei Agarplatten vorsichtig beimpft. Anschließend wurden zwei der Platten bodendeckend (≈ 10 ml) mit *n*-Hexan bzw. Cyclohexan übergossen, dann verschlossen und mit Parafilm abgedichtet über Nacht bei 30 °C in den Brutschrank gestellt. Die dritte Platte wurde lediglich als Kontrolle mitgeführt. Die Auswertung erfolgte direkt am nächsten Tag, wobei ein Wachstum der Isolate in Cyclohexan die Existenz von Effluxpumpen vermuten ließ.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Thermale Zellyse Methode zur Extraktion genomischer DNA

Bei der Extraktion der genomischen Bakterien-DNA, die als Template in allen durchgeführten PCRs diente, wurde nach der "Boiling Method" (Sambrook *et al.*, 1989) gearbeitet. Hierbei wurde zunächst 1 ml einer Übernachtkultur (Inkubation für 16-18 h im Brutschrank bei 37 °C) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 6 min bei 13.200 rpm zentrifugiert. Nach vorsichtigem Entfernen des Überstands mittels einer Pipette wurde das Pellet in 300 µl sterilem TE Puffer resuspendiert, im Wasserbad bei 100 °C für 10 min inkubiert und anschließend für ca. 2 min auf Eis abgekühlt. Nach kurzem Vortexen wurden die Proben bei 13.200 rpm für 2 min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung der gekochten DNA erfolgte bei -20 °C.

2.2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei allen Analysen wurden GeneAmp Thermal Cycler der Modelle 2720 und 9700 eingesetzt (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland), deren Standardeinstellungen in Tabelle 2.11 aufgeführt sind. Die eingesetzten Primer sind in Tabellen A1a und A1b im Anhang aufgelistet. Bei jedem PCR-Lauf wurden zwei Kontrollen mitgeführt: eine Positivkontrolle mit einer ausreichenden Anzahl von Kopien der Zielsequenz und eine Negativkontrolle, die anstatt DNA steriles Aqua bidest. enthielt.

Die Annealing-Temperatur (T_a) ist abhängig von der Länge und Basenzusammensetzung der eingesetzten Primer und kann wie folgt näherungsweise berechnet werden (Suggs *et al.*, 1981):

$$T_{a}(^{\circ}C) = [4(\Sigma G + \Sigma C) + 2(\Sigma A + \Sigma T)]$$

Die Elongationszeit (t_e) hängt von der erwarteten Größe (in Basenpaaren; bp) des PCR-Amplifikats ab. Für ein Produkt mit einer Fragmentlänge von ≤ 500 bp wurden für t_e 30 s festgelegt, bei 500-800 bp 40 s und ≥ 1000 bp 60 s usw.

Ansatz für eine Simplex-PCR-Reaktion

25 μl	Gesamt
2,5 µl	Template-DNA
0,5 µl	DyNAzyme II DNA-polymerase (2U/ μ l)
2,5 µl	10x PCR-Puffer
2,5 µl	dNTP Mix (200 µM)
2,5 µl	Reverse-Primer (10 pmol/µl)
2,5 µl	Forward-Primer (10 pmol/µl)
12 µl	steriles Aqua bidest.

Für Multiplex-PCRs und Sequenzierungen wurde in der Regel ein Gesamtvolumen von 50 μ l mit jeweils 5 μ l jeder Komponente einschließlich Template-DNA und 1 μ l Enzym eingesetzt. Das Volumen an sterilem Aqua bidest. wurde entsprechend reduziert.

Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Initialisierung (hot start)	94°C	5 Minuten	1
Denaturierung	94°C	30 Sekunden	٦
Annealing	x°C	30 Sekunden	> 30
Elongation	72°C	x Sekunden	
Finale Elongation	72°C	5 Minuten	1
Lagerung	4°C	∞	

2.2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

In dieser Arbeit wurden zur Auftrennung von allen PCR-Produkten 1,5 %ige Agarosegele verwendet. Als Puffersystem diente 1x TBE Puffer. Alle DNA-Proben (Gesamtvolumen: 10 μ l) wurden vor dem Auftragen in die Geltaschen mit 2 μ l Bromphenolblau versetzt. Die beiden äußeren Taschen wurden jeweils mit einem DNA-Größenstandard versehen.

Die Gelelektrophorese wurde zu Beginn für ca. 5-10 min bei einer Spannung von 50 V durchgeführt und anschließend je nach Größe der Elektrophoresekammer auf 80 – 120 V erhöht (Stromgeber: PowerPac 300, Bio-Rad, USA). Der Lauf wurde beendet, wenn die Bromphenolblau-Bande das letzte Geldrittel erreicht hatte. Das Gel wurde für 15 min in einem Ethidiumbromid-Färbebad (0,5 μ g/ml) inkubiert und dann über denselben Zeitraum in Aqua bidest. equilibriert. Da Ethidiumbromid in der DNA-Helix interkaliert, konnten die DNA-Banden mittels Geldokumentationssystem (EagleEye-II, USA) unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert werden.

2.2.2.4 DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse

Die DNA-Sequenzanalyse wurde im Rahmen dieser Dissertation zum Nachweis von Genen, zur Detektion von Mutationen in der Bakterien-DNA und zur Plasmid-Charakterisierung durchgeführt. Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mit Hilfe des illustraTM GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kits (GE Healthcare, UK) nach den Angaben des Herstellers. Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde in 50 µl Elution Buffer Type 6 (Wasser für die Sequenzierung) eluiert. Zur Sequenzierung wurde die Template-DNA mit 1 µl Primer (10 pmol/µl) gemischt, auf ein Volumen von 6 µl aufgefüllt und an den QIAGEN Sequencing Service (Hilden, Deutschland) geschickt. Für eine Sequenzierungsreaktion wurde eine DNA-Menge von 10 ng pro 100 bp PCR-Produkt als Template-DNA benötigt. Die Ergebnisse wurden über das Software-Programmpaket Lasergene 8 (DNAStar Inc., Madison, WI, USA) mit den Programmen SeqMan Pro und MegAlign sowie mit dem BLAST-Search-Programm des National Center for Biotechnology Information (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) analysiert.

2.2.2.5 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

Um einen internationalen Vergleich der molekularen Daten zu gewährleisten, wurden alle PFGE Experimente nach den standardisierten Vorgaben von PulseNet (http://www.cdc.gov/pulsenet/protocols/ecoli_salmonella_shigella_protocols.pdf) durchgeführt. Bei allen Analysen wurde nach der CHEF-Methode (<u>C</u>ontour-clamped <u>homogeneous electric field</u>) (Chu *et al.*, 1986) mit integrierter PACE-Technologie (<u>programmable autonomously c</u>ontrolled <u>e</u>lectrophoresis) (Clark *et al.*, 1988; Birren, *et al.*, 1989) gearbeitet.

2.2.2.5.1 Extraktion der genomischen DNA in Agarose-Blöckchen

Die Bakterienstämme wurden von einer Glycerinkultur auf LB-Agarplatten überimpft und für ca. 14-18 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Kulturen mittels einer sterilen Impföse in 4 ml CSB-Puffer suspendiert und die Zelldichte auf eine OD_{610nm} von 1,3-1,4 eingestellt (Ultraspec 2000 Spectrophotometer; Amersham Pharmacia Biotech. Inc., Schweden). Für die Präparation der Agarose-Blöckchen wurden jeweils 300 µl jeder Zellsuspension in markierte 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und jeder Probe 15 µl einer 20 mg/ml Proteinase K-Lösung (Endkonzentration: 1 mg/ml), sowie 300 µl einer im Wasserbad auf 55-60 °C vorgewärmten, frisch angesetzten 1 % SeaKem: 1 % SDS-Agarose-Lösung hinzugefügt. Diese Bakterien-Agarose-Mischung wurde in PFGE Plug-molds (Bio-Rad, Deutschland) transferiert und zum Auskühlen für ca. 10 min bei 4 °C in den Kühlschrank gestellt. Die Blöckchen wurden dann mit Hilfe eines sterilen Spatels in 50 ml-Falcon Röhrchen mit konischem Boden überführt, die jeweils 5 ml Zell-Lyse-Puffer enthielten. Die Lyse erfolgte für 2 Stunden im Schüttelwasserbad (175-200 rpm) bei einer Temperatur von 54 °C. Anschließend wurden die Blöckchen in neue 50 ml-Falcon Röhrchen gegeben, die 10-15 ml steriles, auf 50 °C vorgewärmtes Aqua bidest. enthielten und für 15 min bei 50 °C im Schüttelwasserbad (175-200 rpm) inkubiert. Dieser Waschschritt wurde einmal wiederholt. Die drei folgenden Waschschritte (in 15 Minuten-Intervallen bei 50°C) wurden mit 10-15 ml auf 50 °C vorgewärmten TE-Puffer durchgeführt.

2.2.2.5.2 Restriktionsendonuklease-Verdau

Für den Restriktionsendonuklease-Verdau wurden die Agarose-Blöckchen mit einem Skalpell in vier gleich dicke Scheiben (jeweils ca. 3 mm) geschnitten. Pro Teststamm wurde jeweils eine Scheibe für 10-15 min in 120 μ l einer 1:10 SureCut H-buffer-Verdünnung bei Raumtemperatur äquilibriert. Der Restriktionspuffer wurde verworfen und durch 100 μ l frischen Puffer mit 0,425 U/ μ l Restriktionsenzym (XbaI oder BlnI) pro Ansatz ersetzt. Die Inkubation erfolgte für 4 Stunden bei 37 °C unter sanftem Schütteln. Zum Abstoppen der Enzymreaktion wurde die Enzymlösung abpipettiert und 300 μ l 0,5 x TBE-Puffer hinzugefügt.

2.2.2.5.3 Pulsfeldgelelektrophorese

Nach Zusammensetzen der Gelkammer (13 x 14 cm oder 14 x 21 cm) wurde der Elektrophoresekamm horizontal auf die Tischoberfläche gelegt und die Blöckchenscheiben mittels eines sterilen Spatels jeweils am unteren Rand der Kammzähne positioniert. Jeweils auf den äußeren Kammzähnen wurden der XbaI-verdaute PulseNet-Referenzstamm *S.* Braenderup H9812 und/oder der Lambda Ladder PFG Marker (New England Biolabs, Frankfurt am Main) als Molekulargewichtsmarker eingesetzt. Überschüssiger Puffer wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen. Danach wurde der Kamm vorsichtig in die Gelkammer eingesetzt und die auf 56 °C temperierte SeaKem Agarose (1 %)-0,5 x TBE vorsichtig in die Gelkammer um die Scheiben gegossen. Bei einer Gelkammergröße von 13 x 14 cm wurde eine Agarosevolumen von 100 ml eingesetzt, bei 14 x 21 cm 150 ml. Nach einer Polymerisationszeit von 30 min wurde der Kamm entfernt und das Gel in der Elektrophorese-Kammer platziert. Um eine mögliche Degradierung der DNA zu verhindern, wurden die 2,2 1 Laufpuffer (0,5 x TBE) mit 16 mg Thioharnstoff versetzt.

Der PFGE-Lauf wurde unter folgenden Bedingungen unter Verwendung des CHEF-DRIII SYS220/240 Systems (Bio-Rad Laboratories, München) durchgeführt:

	<u>XbaI</u>	<u>BlnI</u>	
Temperatur	14 °C		
Spannung	6 V/cm (200 V)		
Winkel	120°		
Pulszeiten	2-64 s	20-80 s	
Laufzeit	20 h	22 h	

Nach Beenden wurde das Agarosegel für 20 min in Ethidiumbromid-Lösung (0,5 µg/ml) angefärbt und dann für 30 min in Aqua bidest. entfärbt. Zur Dokumentation wurde das Gel unter UV-Licht mit dem System EagleEye-II (Stratagene, USA) fotografiert.

Die Analyse der PFGE-Bandenmuster erfolgte mit den Software-Programmen Bionumerics Version 5.1 (Applied Maths, Belgien) und MVSP Version 3.1 (Multivariate Statistics Package for PCs, RockWare Inc., USA). Bei dieser Auswertung wurde die Präsenz bzw. das Fehlen aller Fragmente \geq 33 kb erfasst. Profile, die Unterschiede in zwei oder mehr Banden zeigten, wurden numerisch bezeichnet (z.B. X1, X2, etc., oder B1, B2, etc.). Ähnliche Muster mit nur einer Bande Unterschied wurden mit Kleinbuchstaben versehen (z.B. X1, X1a, und X1b). Die Bestimmung der genetischen Ähnlichkeit zwischen PFGE-Profilen (XbaI, BlnI, oder XbaI-BlnI kombiniert) erfolgte mittels "unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA)" und dem Jaccard's Koeffizienten.

2.2.2.6 Plasmidanalyse

2.2.2.6.1 Minipräparation nach Kado und Liu (1981)

Die Plasmidpräparation erfolgte nach Kado und Liu (1981) modifiziert zur schnellen Gewinnung geringer Mengen bakterieller Plasmid-DNA. Mittels einer sterilen Impföse wurde eine einzelne Bakterienkolonie von einer Müller-Hinton Agarplatte abgenommen, in 2 ml LB-Medium überführt und für ca. 18 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 1,5 ml der Übernachtkulturen in 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert und bei 13.200 rpm (RT) für 5 min zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstands und Trocknen der Pellets, wurden in 20 µl KADO-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 100 µl des frisch angesetzten Lysemix wurde die Zellsuspension durch Invertieren vorsichtig gemischt und zur Lyse für 27 min bei 58 °C inkubiert. Die lysierten Zellen wurden mit 100 µl Phenol/Chloroform (1:1) versetzt und anschließend für 30 min bei 13.200 rpm (RT) zentrifugiert. Von der oberen Phase wurden 90 µl abgenommen und mit 20 µl Bromphenolblau in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Die gelelektrophoretisch Auftrennung der Plasmid-DNA (25 µl) erfolgte in einem 0,9 %igen Vertikalagarosegel bei 100 V für 3 Stunden. Als molekularer Größenstandard wurde ein Pool (50 µl) mit Plasmiden definierter Größe der E.coli Stämme R27 (Plasmidgröße: 169 kb), R1 (94 kb), RP₄ (55 kb) und ColE₁ (6 kb) mitgeführt. Nach Beenden wurde das Agarosegel für 15 min in Ethidiumbromid-Lösung (0,5 µg/ml) angefärbt und dann für weitere 10 min in Aqua bidest. entfärbt. Zur Dokumentation wurde das Gel unter UV-Licht mit dem System EagleEye-II (Stratagene, USA) fotografiert.

2.2.2.6.2 Minipräparation nach Birnboim und Doly (1979)

Diese Methode der Minipräparation wurde nach Birnboim & Doly (1979) modifiziert durchgeführt und diente zur Gewinnung von Plasmid-DNA für Restriktionsanalysen und Transformations-Experimenten. Dafür wurden 1,5 ml Übernachtkultur pelletiert, in 100 µl eisgekühlter Birnboim-Lösung 1 durch Vortexen resuspendiert und dann für 5 min auf Eis gehalten. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 13.200 rpm. Nach Zugabe von 200 µl Birnboim-Lösung 2 (Lyse) und vorsichtigem Mischen wurden die Zellen erneut 5 min auf Eis gekühlt. Zur Neutralisierung wurden 150 µl eisgekühlter Birnboim-Lösung 3 beigefügt, vorsichtig vermischt und 15 min auf Eis gehalten. Anschließend wurden die Proben für weitere 15 min zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Dann wurde im Verhältnis 1:1 (~ 450 µl) Roti[®]-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol zugegeben, vorsichtig gemischt und 5-7 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß abgenommen, mit Chloroform (1:1) gewaschen und 5 min zentrifugiert. Wieder wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 3 µl RNAse (1 mg/ml) wurde die Probe 15 min bei 37 °C inkubiert. Zur Fällung der Nukleinsäuren über Nacht bei -20 °C wurden 900 µl eisgekühlten Ethanols beigemischt. Anschließend wurde für 20-30 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das DNA-Pellet so gut wie möglich getrocknet. Dann wurde das Pellet in 500 µl Ethanol (70 %) gewaschen und 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und Ethanolreste in einer SpeedVac (Eppendorf, Deutschland) entfernt. Das trockene Pellet wurde in 20 µl TE resuspendiert. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte in einem 0,7 %igen horizontalen Agarosegel, das mit 10 µl Bromphenol-versetzter Plasmid-DNA beladen wurde. Als molekularer Standard wurden der "Digoxigenin-labeled DNA Molecular Weight Marker II" (Roche, Deutschland) oder mit PstI verdaute Lambda-Phagen-DNA mitgeführt. Der Lauf wurde beendet, wenn die Proben den unteren Rand des Gels erreicht hatten. Das Agarosegel wurde für 15 min in Ethidiumbromid-Lösung (0,5 µg/ml) angefärbt und dann für weitere 10 min in Aqua bidest. entfärbt. Zur Dokumentation wurde das Gel unter UV-Licht mit dem System EagleEye-II (Stratagene, USA) fotografiert.

2.2.2.6.3 Maxipräparation

Zur Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA wurde das QIAGEN Plasmid Maxi Kit (QIAGEN, Deutschland) verwendet. Bei der Präparation wurde genau nach den Angaben des Herstellers verfahren. Das Volumen der Starterkultur betrug 10 ml. Im letzten Schritt wurde die DNA in 50 µl TE Puffer resuspendiert.

2.2.2.6.4 Restriktionsanalyse (RFLP)

Die Restriktionsanalyse wurde zur Charakterisierung von Virulenz-Resistenz-Plasmiden angewandt. Dabei wurden folgende Restriktionsendonukleasen verwendet: PstI, SalI und SphI. In einem Gesamtvolumen von 20 μ l wurden 1 μ l Enzym, 2 μ l des entsprechenden Puffers, 2 μ l Aqua bidest. und 15 μ l Plasmid-DNA (siehe Abschnitt 2.2.2.6.3) eingesetzt. Der Restriktionsverdau wurde bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur im Wasserbad durchgeführt. Im Anschluss wurden 8 μ l des Restriktionsprodukts mit 2 μ l Bromphenolblau in einem 0,8 %igen horizontalen Agarosegel aufgetrennt.

2.2.2.6.5 S1-Nuklease-Verdau

Die Durchführung dieser Methode modifiziert nach Barton *et al.* (1995) und Miko *et al.* (2005) erfolgte zur genauen Größenbestimmung der bakteriellen Plasmide. Durch die Behandlung mit S1-Nuklease wurden die Plasmide erst linearisiert und dann zur Auftrennung einer PFGE wie in Abschnitt 2.2.2.5.3 beschrieben unterzogen. Zunächst wurde ein Viertel eines PFGE-Agaroseblöckchens für 20 min bei RT in 200 μ l des S1-Nuklease-Puffers equilibriert. Anschließend wurde der Puffer abgenommen und 8 U der S1-Nuklease in 100 μ l des gleichen Puffers zugefügt und für 45 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 μ l 0,5 M EDTA (pH 8,0) gestoppt. Bei der PFGE wurden dieselben Lauf-Bedingungen wie für XbaI verwendet. Zur molekularen Größenbestimmung wurde ein Lambda Ladder PFG Marker (New England Biolabs, Deutschland) mitgeführt.
2.2.2.6.6 Inkompatibilitätsgruppen-Bestimmung

Die Bestimmung von insgesamt 20 Plasmid-Inkompatibilitätsgruppen erfolgte nach dem Prinzip des PCR-basierten Replikontypings nach Carattoli *et al.* (2005) und García-Fernández *et al.* (2009). Grundlage dieser Methode war das Verfahren der wie in Abschnitt 2.2.2.2 beschriebenen Simplex-PCR. Als Positivkontrollen wurde Plasmid-DNA bekannter Inkompatibilitätsgruppen mitgeführt, die von A. Carattoli (Istituto Superiore di Sanità, Rom, Italien) zur Verfügung gestellt wurden. Die verwendeten Primer und die entsprechenden PCR-Bedingungen sind in Tabelle A1b im Anhang aufgelistet.

2.2.2.6.7 Konjugation

Als Rezipient für die Konjugationsanalyse wurde ein Natriumazid-resistenter E. coli J53 Stamm verwendet. Jeweils 500 µl Übernachtkultur der Donor- und Rezipientenstämme wurden in 10 ml LB-Flüssigmedium in Nasenkolben gegeben und im Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert bis die Zelldichte eine Klett-Einheit von 90 erreichte ($\approx 1,2 \times 10^8$). Es wurden parallel zwei Konjugationsversuchsreihen mit jeweils doppelten Ansätzen durchgeführt. 1) Bei der Konjugation in flüssigem Medium wurden 100 µl Donor und 200 µl Rezipient mit 700 µl LB-Flüssigmedium gemischt, wobei ein Ansatz bei 37 °C im Brutschrank und der andere bei RT inkubiert wurden. 2) Bei der Konjugation auf festem Medium wurden 100 µl Donor und 200 µl Rezipient auf einer Filtermembran (0,45 µm Porengröße), die auf einer LBoder M9-Platte platziert wurde, verteilt. Auch hier erfolgte die Inkubation wieder sowohl bei 37 °C als auch bei RT. Dann wurden die Filter in 1 ml LB-Medium gewaschen. Anschließend wurde von jedem Ansatz eine Verdünnungsreihe hergestellt und jeweils 200 µl der einschließlich der Original-Übernachtkultur, auf EMB-Platten Verdünnungsstufen, ausplattiert, die zur Selektion der Transkonjuganten Natriumazid (100 µg/ml) und ein entsprechendes selektives Antibiotikum enthielten. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und am nächsten Tag ausgewertet.

2.2.2.6.8 Triparental Mating

Diese Variante der bakteriellen Konjugation wurde eingesetzt, wenn mit der oben beschriebenen Methode keine Transkonjuganten erhalten werden konnten. In diesem Fall wurde ein Helper-Stamm eingesetzt, dessen konjugatives Plasmid den Transfer eines mobilisierbaren Plasmids eines anderen Stammes unterstützen sollte. Hierfür wurden Übernachtkulturen von Donor, Rezipient (*E. coli* J53 mit Natriumazid-Resistenz) und Helper (*E. coli* "helper" mit Kanamycin-Resistenz; Figurski und Helinski, 1979) mit entsprechenden selektiven Antibiotika angelegt. Von jeder dieser Übernachtkulturen wurden 100 µl in einem Eppendorfgefäß gepoolt ($V_E = 300 \mu$ l). Dann wurde 5 min bei 13.200 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 100 µl Aqua bidest. resuspendiert. Dieses Volumen wurde auf einer LB-Platte ausgestrichen und für 4-6 h bei 37 °C inkubiert. Die Kolonien wurden vorsichtig in 2 ml LB-Medium abgeschwemmt. Anschließend wurde wie oben beschrieben auf EMB-Platten ausplattiert, die die entsprechenden selektiven Antibiotika enthielten.

2.2.2.6.9 Transformation

Die Transformation von durch Konjugation nicht transferierbarer Plasmid-DNA erfolgte mittels Elektroporation. Zur Herstellung der elektrokompetenten Zellen wurden 50 ml LB-Medium mit 50 µl Übernachtkultur des Natriumazid-resistenten E. coli J53 angeimpft und inkubiert, bis sie eine OD588 von 0,6–0,7 erreicht hatten. Nach Überführen der Kultur in ein vorgekühltes Falcon Röhrchen folgte eine Inkubation auf Eis für 20 min. Die Zellen wurden bei 2600 × g und 4 °C pelletiert und in 25 ml eiskaltem Aqua bidest. resuspendiert. Der Zentrifugations und Waschschritt wurde zweifach wiederholt und die Zellen schließlich in 1 ml Aqua bidest. resuspendiert. Die kompetenten Zellen konnten nun gleich verwendet oder nach Zugabe von 70 µl DMSO bei -80 °C bis zu drei Monaten gelagert werden. Für die Elektroporation wurde 1 µl Plasmid-DNA mit 40 µl kompetenten Zellen (E. coli J53 mit Natriumazid-Resistenz) vermischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette gegeben. Die Durchführung erfolgte mit dem Biorad Gene Pulser Xcell Elektroporationssystem in 0,2 cm Küvetten bei einer Spannung von 2500 V, einem Widerstand von 200 Ω und einer Kapazität von 25 µF. Sofort nach dem erfolgten Stromimpuls wurde 1 ml SOC-Medium hinzugegeben und der Ansatz in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach einer Stunde Inkubationszeit bei 37 °C wurden die Bakterien auf Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht erneut bei 37 °C bebrütet.

2.2.2.6.10 DNA-Sequenzierung mittels Primerwalking

Die vollständige Nukleotidsequenz des Plasmids pSGI15 wurde durch die Primerwalking-Methode ermittelt. Das erste DNA-Fragment wurde dabei mit dem *qnrB* forward und reverse Primer (Jacoby *et al.*, 2006) sequenziert. Die anschließende Auswertung erfolgte mit dem Bioinformatic Tool (ORF Finder, blastp, blastn) der NCBI Homepage (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/).

2.2.2.7 DNA-DNA-Hybridisierung

Die Durchführung der Hybridisierung und aller vorbereitenden Schritte erfolgte nach Sambrook *et al.* (1989) sowie den Angaben des "DIG System User's Guide for Filter Hybridization" herausgegeben von Roche Molecular Biochemicals (1995).

2.2.2.7.1 Southern Blot Methode

Zunächst wurde die DNA eines PFGE- oder Plasmidgels in einem Depurinierungsschritt für 15 min in ca. 250 ml HCl (0,25 N) auf einem Wippschüttler bei RT geschwenkt und anschließend für 5 min in Aqua bidest. gewaschen. Dies bewirkte im nachfolgenden alkalinen Denaturierungsschritt ein Aufbrechen des DNA-Strangs in den depurinierten Bereichen, was einen leichteren Transfer der DNA-Fragmente zur Folge hatte. Hierzu wurde das Gel für 30 min in ca. 250 ml NaOH (0,5 N) bei RT geschwenkt und anschließend wieder kurz in Aqua bidest. gewaschen. Anschließend wurde das Gel auf dem Vakuumblotter (Model 785, Bio-Rad, Deutschland) platziert, so dass es direkt auf einer positiv-geladenen Nylonmembran (Roche, Deutschland) und einem darunterliegenden Filterpapier auflag. Das Blotten der DNA wurde in einer 10 x SSC Lösung (\approx 500 ml) bei 5 Hg Vakuum über 2 Stunden durchgeführt. Zum Abschluss wurde die Membran in 2 x SSC Lösung kurz geschwenkt und dann zur Fixierung der DNA für 2 min einem UV-Crosslinking unterzogen. Die Membran konnte nun entweder direkt für die Hybridisierung verwendet oder trocken in einer Plastiktasche bei RT gelagert werden.

2.2.2.7.2 DNA-Sondenpräparation

Zur Herstellung einer Sonde wurde ein entsprechendes DNA-Fragment unter Verwendung von Digoxigenin-markierten dNTPs (PCR-DIG Labbelling Mix; Roche, Deutschland) mittels PCR (Gesamtvolumen von 200 μ l), wie in Abschnitt 2.6b.2 beschrieben, amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt und für 15 min in Ethidiumbromid-Lösung (0,5 μ g/ml) angefärbt. Dann wurde die entsprechende Bande mit einem Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kits (GE Healthcare, UK) gereinigt und in 50 μ l TE eluiert. Die Aufbewahrung der DNA-Sonde erfolgte bei -20 °C.

2.2.2.7.3 Prä-Hybridisierung und Hybridisierung

Allgemein bewirkt die Prä-Hybridisierung der Membran die Blockierung von unspezifischen Nukleinsäure-Bindungsstellen und sorgt somit für eine geringere Hintergrundreaktion. Zuerst wurde die Membran zusammen mit je nach Membrangröße 20-30 ml der Prä-Hybridisierungslösung (DIG Easy Hyb granules, Roche, Deutschland) in eine Plastiktasche eingeschweißt und dann für 30-60 min im Schüttelwasserbad bei 42 °C inkubiert. Kurz vor Ablauf der Inkubationszeit wurden 4 μ l der DNA-Sonde mit 90 μ l Prä-Hybridisierungslösung gemischt, bei ≈ 100 °C für 5 min denaturiert und anschließend auf Eis gehalten, um ein erneutes Annealing der DNA-Stränge zu verhindern. Dann wurde die Sonde sofort in die Prä-Hybridisierungslösung zu der Membran pipettiert. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42 °C im Schüttelwasserbad.

2.2.2.7.4 Post-Hybridisierung

Im Anschluss an die Hybridisierung wurde die Membran einer Reihe von Waschschritten jeweils unter leichtem Schütteln unterzogen. Zuerst wurde die Membran für 2 x 5 min bei RT mit der Post-Hybridisierungs-Waschlösung 1 (~ 50 ml) gewaschen. Dann wurde sie zusammen mit \approx 30 ml Post-Hybridisierungs-Waschlösung 2 in eine frische Plastiktasche überführt und bei 68 °C im Wasserbad gewaschen. Dieser Schritt wurde danach einmal wiederholt. Für alle weiteren Waschschritte wurde das kommerzielle Hybridisierungskit DIG Wash and Block Buffer Set (Roche, Deutschland) verwendet. Es folgte ein kurzer Waschschritt von 2 min bei RT in 1 x Waschpuffer. Die Membran wurde dann in 100 ml 1 x Blocking-Reagenz für mindestens 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde weiteren 100 ml 1 x Blocking-Reagenz eine Anti-Digoxigenin-AP Antikörperlösung (Roche, Deutschland) im Verhältnis 1:5000 beigefügt, die Membran wurde darin überführt und für weitere 30 min bei RT inkubiert. Zum Entfernen der Antikörperlösung wurden zwei weitere Waschschritte für jeweils 15 min bei RT mit 1 x Waschpuffer durchgeführt. Die Membran wurde dann in ~ 90 ml Detektionspuffer für 2 min bei RT equilibriert und in eine frische Plastiktasche überführt. Zur kolorimetrischen Detektierung wurden 10 ml Detektionspuffer 200 µl NBT/BCIP Mix beigefügt und in die Plastiktasche gegeben. Die Farbentwicklung wurde bei RT, im Dunkeln und ohne Schütteln durchgeführt. Nach vollständiger Entwicklung der Membran wurde die Reaktion durch einen Waschschritt mit sterilem Aqua bidest. Unterbrochen. Anschließend konnte die Membran in einer neuen Plastiktasche in TE bei 4 °C gelagert werden.

2.2.2.8 MLVA

Die Durchführung dieser Methode erfolgte modifiziert nach Lindstedt *et al.* (2004). Zur Typisierung wurden fünf VNTR-Loci eingesetzt: STTR3, STTR5, STTR6, STTR9 und STTR10pl. Als Template-DNA für eine Multiplex-PCR mit Primerpaaren (siehe Tabelle A1a, Anhang) für alle fünf Loci wurde eine Zellsuspension aus drei bis vier Einzelkolonien des Teststamms in 150 µl Aqua bidest. verwendet.

PCR-Ansatz für MLVA

12,5 µl	Gesamt
1,0 µ1	Template-DNA
0,125 µl	STTR10pl-F/R (5 pmol/µl)
0,125 µl	STTR9-F/R (5 pmol/µl)
0,125 µl	STTR5-F/R (5 pmol/µl)
0,25 µl	STTR6-F/R (5 pmol/µl)
0,25 µl	STTR3-F/R (5 pmol/µl)
1,25 µl	Q-Solution (Qiagen)
6,25 µl	2 x Multiplex PCR Mastermix (Qiagen)
2,25 µl	steriles Aqua bidest.

Während der PCR erfolgte die Markierung der DNA für die Kapillarelektrophorese mit HEX-(STTR3, STTR5), FAM- (STTR6, STTR9) und TET- (STTR10pl) Fluoreszenz-markierten Oligonukleotiden. Folgenden Laufbedingungen wurden eingesetzt: 95 °C für 15 min, dann 25 Zyklen von jeweils 94 °C für 30 s, 60 °C für 90 s und 72 °C für 90 s, endend mit einer finalen Elongation bei 72 °C für 10 min.

Von jedem PCR-Produkt wurde eine 1:10-Verdünnung mit Aqua bidest. erstellt. Davon wurden jeweils 1 μ l mit 12 μ l TSR und 1 μ l des internen Größenmarkers GenFloTM 625 versehen. Anschließend wurde dieser Mix bei 95 °C für 2 min denaturiert, 1 min auf Eis gekühlt und dann kapillarelektrophoretisch mit dem ABI Prism Genetic Analyzer 310 (Applied Biosystems, USA) aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde bei 60 °C für 33 min unter Verwendung des POP4 Polymers (Applied Biosystems, USA) mit einer Injektionsspannung von 15 kV für 5 s und einer Laufspannung von 15 kV durchgeführt. Die Fragmentgrößen wurden mittels der ABI Prism GeneScan Software Version 3.1.2 (Applied Biosystems, USA) bestimmt. Jeder Fragmentgröße wurde dann nach dem Schema von Larsson *et al.* (2009) eine Allelnummer zugeordnet. Die Ergebnisse wurden mit der Bionumerics Software (Version 5.1.; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) ausgewertet. Für die Cluster-Analyse wurde ein UPGMA Dendrogramm-Typ unter Benutzung der Pearson-Korrelation erstellt.

2.2.2.9 MLST

Diese Methode wurde nach Kidgell et al. (2002) und dem MLST-Protokoll für Salmonella Database enterica der MLST des University College Cork, Irland (http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica/documents/primersEnterica_html) durchgeführt. Für jeden Teststamm wurden die sieben Haushaltsgene aroC, dnaN, hemD, hisD, purE, sucA und thrA mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert (siehe Kapitel PCR und Sequenzierung). Die verwendeten Primer sind in Tabelle A1a im Anhang aufgeführt. Die DNA-Sequenzen wurden mit der Software SeqMan Pro (DNAStar Inc., USA) bearbeitet und anschließend die Allele und Sequenztypen (ST) mit Hilfe der Webseite http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica/ ermittelt. Aus den Allel-Profilen der untersuchten Isolate wurde mittels Bionumerics Version 5.1 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgien) ein Minimal-spanning Tree zur Identifizierung von ST-Komplexen generiert.

2.2.3 Statistische Methoden

Zur Bestimmung der Diskriminierfähigkeit der Typisierungsmethode PFGE in der *S*. Saintpaul Studie mit XbaI, BlnI und beiden Enzymen in Kombination wurde der Simpson's Index für Diversität (DI) und das 95 % Konfidenzintervall (CI) bestimmt. Der Simpson's Index gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass zwei voneinander unabhängige Stämme einer Population der gleichen Typing-Gruppe zugeordnet werden (Grundmann *et al.*, 2001; Hunter *et al.*, 1988).

3 ERGEBNISSE

3.1 Multiresistenz in Deutschland

3.1.1 Multiresistente S. Saintpaul Isolate in deutschen Truthühnern und den daraus gewonnenen Lebensmitteln

3.1.1.1 Hintergrund der Studie

Insbesondere landwirtschaftliche Nutztiere werden als ein bedeutendes Reservoir für resistente Bakterien, wie Salmonella, betrachtet. Der weltweite Handel mit diesen Tieren und den aus ihnen gewonnenen Lebensmitteln trägt maßgeblich zur globalen Verteilung von zoonotischen Erregern und antimikrobieller Resistenz bei. Um in der Lage zu sein, dieses von Antibiotikaresistenzen ausgehende Risiko zukünftig bewerten zu können, wurden in den letzten Jahren verschiedene Monitoring-Maßnahmen ins Leben gerufen. Diese sollten grundlegende Data in Bezug auf das Auftreten von Antibiotikaresistenzen in aus Tierbeständen und tierischen Lebensmitteln isolierten Bakterien liefern (Bronzwaer et al., 2008). Nach Artikel 4 der Verordnung (EG) Nr. 2160/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 17. November 2003 zur Bekämpfung von Salmonellen und anderen durch Lebensmittel übertragbaren Zoonoseerreger, sollte ein Gemeinschaftsziel zur Senkung der Prävalenz von Salmonellen in Truthühnerbeständen festgelegt werden (Anonym, 2003b). In Konsequenz erfolgte die Veröffentlichung der Entscheidung der EU Kommission 2006/662/EC (Anonym, 2006) zur Grundlagenerhebung über die Prävalenz von Salmonella in Truthühnerherden, die beginnend am 1. Oktober 2006 in allen europäischen Ländern, eingeschlossen Deutschland, über den Zeitraum eines Jahres durchgeführt wurde (European Food Safety Authority, 2008). Das Hauptaugenmerk richtete sich bei dieser Studie auf die Abschätzung der Salmonella-Prävalenz in kommerziellen Truthühnerbeständen. Die ermittelten Daten zeigten, dass auf EU-Ebene S. Bredeney das aus Mastherden am häufigsten isolierte Serovar darstellte und in 17,2 % der für Salmonella positiv getesteten Herden auftrat (1084 positive Herden von insgesamt 3702). Diesem folgten S. Hadar, S. Derby und S. Saintpaul, die in jeweils 14 %; 11,3 % und 10,4 % der Proben aus positiven Herden gefunden wurden. Insgesamt wurde das Auftreten von S. Saintpaul bei Mast-Truthühnern in 12 Ländern beobachtet und spiegelt seine weite geographische Verbreitung wieder.

Zusammenfassung Nach Enter-Net Report, einer der in den europäischen Referenzlaboratorien gesammelten Daten zu humanen Salmonella Isolaten, stand S. Saintpaul in der Top-15-Liste des vierten Quartals 2006 auf Platz vier (1,6%) und war so im Gegensatz zu den Vorjahren eine der häufigsten Ursachen humaner Salmonellosen in Europa. In den jeweils ersten Quartalen der Jahre 2007 und 2008 betrug seine Prävalenz unter den bei humanen Erkrankungen implizierten Salmonella Serovaren 1,2 % und 0.6 % (http://ecdc.europa.eu/ en/publications/Pages/Surveillance_Reports.aspx). In Deutschland standen nach Angaben des Robert Koch-Instituts (Berlin, Deutschland) in der Zeit von 2001 bis 2009 insgesamt 463 humane Salmonellose Fälle in Zusammenhang mit S. Saintpaul (Gesamtprävalenz: 0,09 %; Maximale Prävalenz in 2008 mit 0,15 %; 0,1 % in 2002, 2005, 2006 und 2009; 0,06 % in 2004; Minimale Prävalenz in 2007 mit 0,05 %) (www3.rki.de/SurvStat). S. Saintpaul rückte hierzulande besonders 1993 in Verbindung mit einem bundesweiten Lebensmittel-verursachten Ausbruch in das Licht der Öffentlichkeit (Lehmacher et al., 1995). Aber auch in anderen Ländern war dieses Serovar oft Ursache von Ausbrüchen, wie z. B. 2008 in mehreren US-Staaten in Assoziation mit verschiedenen Gemüsesorten (Centers for Disease Control and Prevention, 2008a).

Bisherige Untersuchungen haben gezeigt, dass *S.* Saintpaul Isolate oft Multiresistenzen aufweisen (Molla *et al.*, 2007; Nde und Logue, 2008). Über die dafür verantwortlichen molekularen Mechanismen oder über das pathogene Potential und die Epidemiologie der Isolate dieses Serovars ist dagegen bis dato nur wenig bekannt. Da insbesondere Truthühner ein bedeutendes Reservoir multiresistenter *S.* Saintpaul Isolate zu sein scheinen, richtet sich der Fokus dieser Studie auf diese mögliche Infektionsquelle. Die untersuchten Isolate stammten entweder aus Kotproben der deutschen Grundlagenerhebung zur Prävalenz von *Salmonella* in Truthühnerherden (2006-2007) oder aus Diagnostik-Proben, die aus Putenkot oder assoziierten Lebensmittelprodukten stammten. Außerdem erfolgte ein Vergleich dieser Stämme mit deutschen Humanisolaten sowie mit Geflügelisolaten aus Deutschland und den Niederlanden.

3.1.1.2 Phänotypische Charakterisierung der Antibiotikaresistenz

Alle 55 Isolate dieser Studie wurden mittels Bouillon-Mikrodilutionsmethode gegen ein Standard-Panel von 17 antimikrobiellen Substanzen getestet.

Die 16 Isolate der Gruppe 1 (EU-Prävalenzstudie für Salmonellen in Truthühnerherden, 2006/2007) zeigten insgesamt zwei unterschiedliche Antibiotikaresistenz-Profile, die beide dasselbe Kern-Resistenzmuster aufwiesen. Es umfasst volle Resistenz gegenüber Ampicillin, Streptomycin/Spectinomycin, Sulfamethoxazol und Nalidixinsäure, volle (r) oder intermediäre (i) Resistenz gegenüber Amoxicillin-Clavulansäure (MHK: 16-32 μ g/ml), Gentamicin (MHK: 8-32 μ g/ml), und Kanamycin (MHK: 32-64 μ g/ml) und intermediäre oder verminderte Sensibilität (vs) gegenüber Ciprofloxacin (MHK: respektiv 2 oder 1 μ g/ml); [AMP/AMC(i/r)-GEN(i/r)-KAN(i/r)-NAL-CIP(i/vs)-STR/SPE-SUL]. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird dieses Profil in Tabellen 3.3 und 3.4 mit [R] abgekürzt.

Zusätzlich zeigten alle Isolate mit diesem Profil intermediäre oder verminderte Sensibilität gegenüber Ceftiofur (MHK: 4-2 μ g/ml). Das Kern-Resistenzmuster trat ebenfalls als häufigstes Resistenzprofil in Gruppe 2 (Truthühner-Kotproben aus Routineeinsendungen, 2002/2003 und 2005/2006) und Gruppe 3 (Truthühner-assoziierte Lebensmittelproben aus Routineeinsendungen, 2000-2007) auf. Außerdem wurde es in 15 der insgesamt 24 Außengruppen-Isolate (deutsche Isolate aus Hühner- und Humankotproben und niederländische Isolate aus Geflügel und Geflügelfleisch-Produkten) nachgewiesen. Das Kern-Resistenzmuster trat innerhalb der Isolate sowohl alleine als auch in Verbindung mit anderen Resistenzen auf. In Gruppe 3 wurden außerdem weitere Resistenz-Phänotypen detektiert (Tabellen 3.3 und 3.4).

Zur Bestimmung der Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen β-Lactam Antibiotika wurden alle 55 *S.* Saintpaul Isolate dieser Studie mittels Agar-Dilutionsmethode oder Agardiffusionstest untersucht. Insgesamt waren 82 % der Isolate resistent gegenüber Penicillinen, 75 % gegenüber Cephalothin und 64 % gegenüber Cefuroxim. Bei letzterem wurden zusätzliche 36 % der Isolate intermediär bzw. vermindert sensibel getestet. Keines der Isolate zeigte volle Resistenz gegenüber den verschiedenen Cephalosporinen der dritten Generation. Aber es wurden intermediäre Resistenzen in 34,5 % der Isolate gegenüber Ceftiofur, in 14,5 % gegenüber Cefoxitin und in 11 % gegenüber Cepodoxim detektiert. Außerdem wurde verminderte Sensibilität in 73 % der Isolate gegenüber Cefoxitin, in 56 % gegenüber Ceftiofur und in 9 % gegenüber Ceftazidim nachgewiesen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.1 dargestellt. Der Double-Disk Synergy Test zur Detektierung von ESBLs fiel für alle Isolate negtiv aus.

	Antimikrobi	elle Substanzen	Anzahl der Isolate (%)						
Empfindlichkeits-			Getestete	Resistant	Intermediär	Consided ^b	Vermindert	Voll	
Test ^a	Unterklasse	Antibiotikum	Konzentrationen	Resistent	Internetia	Sensibel	Sensibel	Sensibel	
Agar-Dilution	Erste-Generation	Cephalothin	1-32 μg/ml	41 (74,5)	4 (7,3)		10 (18,2)		
(МНК)	Cephalosporine								
	Zweite-Generation	Cefuroxim	1-32 µg/ml	35 (63 <i>,</i> 6)	10 (18,2)		10 (18,2)		
	Cephalosporine								
	Dritte-Generation	Cefotaxim	1-64 µg/ml					55 (100)	
	Cephalosporine	Ceftazidim	1-32 µg/ml				5 (9,1)	50 (90,1)	
		Cefoxitin	1-32 µg/ml		8 (14,5)		40 (72,7)	7 (12,7)	
		Ceftiofur	0.5-8 μg/ml		19 (34,5)		31 (56,4)	5 (9,1)	
Agardiffusion	Penicilline	Ampicillin	10 µg	45 (81 <i>,</i> 8)	-	10 (18,2)			
(Hemmhof-Durchmesser)	Carboxypenicilline	Ticarcillin	75 μg	45 (81,8)	-	10 (18,2)			
	Acylaminopenicilline	Piperacillin	100 µg	45 (81,8)	-	10 (18,2)			
	ß-Lactamase Inhibitoren	Amoxicillin-Clavulansäure	30 µg	13 (23,6)	27 (49,1)	15 (27,3)			
	Dritte-Generation	Cefpodoxim	10 µg		6 (10,9)	49 (89,1)			
	Cephalosporine								
		Cetriaxon	30 µg			55 (100)			
	Vierte-Generation	Cefepime	30 µg			55 (100)			
	Cephalosporine								
	Carbapeneme	Imipenem	10 µg			55 (100)			
	Monobactame	Aztreonam	30 µg			55 (100)			

Tabelle 3.1: B-Lactam Empfindlichkeitstests bei deutschen S. Saintpaul Isolaten (n = 55).

^a Die Breakpoints für die Agar-Dilution sind in Tabelle A3b im Anhang und für die Agardiffusion in Tabelle 2.9 im Material und Methoden Teil definiert.

^b Enthält sowohl vermindert sensible als auch voll sensible Isolate.

3.1.1.3 Charakterisierung der Resistenz gegenüber organischen Lösungsmitteln und Desinfektionsmitteln

Chemische Gemische zur Hemmung bakteriellen Wachstums werden üblicherweise sowohl in privaten Haushalten als auch in der Lebensmittelverarbeitung eingesetzt (Webber *et al.*, 2008; Levy, 2001). Bei Triclosan handelt es sich z. B. um ein Chlorophenol, das oft als Inhaltsstoff in einer Reihe von Haushaltsprodukten wie Zahnpasta, Handwaschseifen und Kosmetika zu finden ist, aber auch zur Desinfektion von Oberflächen verwendet wird (Webber *et al.*, 2008). Wie auch Antibiotika, sind diese antibakteriellen Produkte in der Lage, für resistente Stämme zu selektieren (Levy, 2001). Um einen Eindruck über die Resistenzsituation bei den in dieser Arbeit untersuchten *S*. Saintpaul Stämmen gegenüber organischen Lösungsmitteln und Desinfektionsmitteln zu gewinnen, erfolgte eine Testung dieser Stämme auf ihre Reaktion gegenüber *n*-Hexan, Cyclohexan und Triclosan.

Der *E. coli* K-12 Wildtyp-Kontrollstamm AG100 entwickelte konfluentes Wachstum in der Gegenwart von *n*-Hexan, aber wuchs nicht unter Einwirkung von Cyclohexan. Der *E. coli* Stamm AG102 (Resistenzkontrolle) dagegen zeigte Wachstum sowohl in der Gegenwart von *n*-Hexan als auch von Cyclohexan (White *et al.*, 1997).

Alle 55 *S*. Saintpaul Isolate waren tolerant gegenüber *n*-Hexan, während 43 von ihnen (78 %) ebenfalls Toleranz gegenüber Cyclohexan aufwiesen.

Alle Isolate, eingeschlossen der Vergleichsgruppe, reagierten unter Befolgung der Vorgaben von Webber *et al.* (2008) sensibel auf Triclosan. Es ergaben sich folgende Verteilung der MHK-Werte: 0,06 μ g/ml (13 Isolate), 0,125 μ g/ml (8 Isolate), 0,25 μ g/ml (50 Isolate), 0,5 μ g/ml (7 Isolate), und 1 μ g/ml (1 Isolat).

3.1.1.4 Genotypische Charakterisierung der Antibiotikaresistenz

Alle 55 Isolate wurden mittels PCR entsprechend ihres phänotypischen Resistenzspektrums auf ausgewählte genetische Resistenz-Determinanten untersucht. Die Prävalenz der Resistenzgene und ihre Verteilung innerhalb der Gruppen 1 bis 3 sind in Tabellen 3.2 und 3.3 dargestellt. Ein Stamm konnte dabei für die Resistenz gegenüber derselben antimikrobiellen Substanz, mehrere Resistenzgene besitzen.

Mit der höchsten Frequenz wurden die Gene bla_{TEM-1}-like, aadB, aadA1-like, aadA2, und sul1, die respektiv Resistenz gegen Ampicillin, Gentamicin/Kanamycin, Streptomycin/Spectinomycin, und Sulfamethoxazol vermitteln, detektiert. Das aadB Gen wurde in 42 von 43 Isolaten mit intermediärer oder voller Resistenz gegen Gentamicin nachgewiesen. Vierzig dieser 42 Isolate zeigten intermediäre oder geringe Resistenz gegen Kanamycin (MHK für 36 Isolate: 32 µg/ml; MHK für 4 Isolate: 64 µg/ml). Weitere zwei Isolate enthielten zusätzlich das aphAl Gen und wiesen volle Kanamycin-Resistenz auf (MHK: >64 µg/ml). Alle 45 Ampicillin-resistenten Isolate (82 %) enthielten bla_{TEM-1}-like Gene. Die Sequenzanalyse der PCR-Produkte zeigte, dass es sich dabei um das ß-Lactamase kodierende Gen *bla*_{TEM-1} handelte.

Gegen Nalidixinsäure waren 45 der 55 (82 %) Isolate resistent (MHK: >128 μ g/ml) und wiesen intermediäre oder verminderte Sensibilität gegen Ciprofloxacin auf (MHK: 2-0,25 μ g/ml). Die übrigen 10 Isolate waren Nalidixinsäure-sensibel (MHK: $\leq 8 \mu$ g/ml), während ihr MHK-Wert für Ciprofloxacin bei $\leq 0,03 \mu$ g/ml lag. Durch Sequenzanalyse konnte gezeigt

werden, dass alle 45 Nalidixinsäure-resistenten Isolate eine Punktmutation im *gyrA* Gen aufwiesen. Dies hatte einen Wechsel von Ser83 zu Glu83 in 43 Isolaten (96 %) und von Ser83 zu Thr83 in 2 Lebensmittelisolaten (4 %) zur Folge. Alle 55 Isolate wurden negativ auf die Plasmid-kodierten Chinolonresistenz-Gene *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, und *qnrS* getestet.

Es wurde beobachtet, dass allen Isolaten, die das phänotypische Kern-Resistenzmuster [R] exprimierten, auch derselbe Genotyp zugrunde lag. Dieses genotypische Kern-Resistenzprofil umfasst die Gene [bla_{TEM-1} -aadB- $gyrA_{Ser83 \rightarrow Glu83}$ -aadA1-like/aadA2-sul1] und wird in Tabelle 3.3 mit der Abkürzung [R'] dargestellt.

Insgesamt enthielten 49 Isolate Integrons der Klasse 1. Integrons der Klasse 2 wurden nicht detektiert. Basierend auf der Amplikongröße und dem Inhalt der Genkassetten in der variablen Region wurden sechs verschiedene Klasse 1 Integrons identifiziert. Das am häufigsten auftretende Klasse 1 Integron mit einer variablen Region von 1700 kb wurde in 37 Isolaten (64 %) gefunden und enthielt die Genkassetten *aadB-aadA2*. In Tabelle 3.3 wird dieses Integron zu Übersichtszwecken mit [I] abgekürzt. Alle Isolate mit Klasse 1 Integrons waren ebenfalls positiv für das Gen $qacE\Delta 1$ (vermittelt Resistenz gegen quaternäre Ammoniumverbindungen) und mit Ausnahme von einem Isolat (mit einer variablen Region von 200 bp) auch für *sul1*.

Zur Lokalisierung des 1700 bp Klasse 1 Integrons wurden mit PFGE- und Plasmid-DNA Southern Blot/Hybridisierungen unter Verwendung einer *aadB*-Sonde durchgeführt. Das *aadB* Gen enthaltene Integron wurde auf chromosomalen XbaI Fragmenten mit Größen von 150 bis 245 kb kartiert. In allen Isolaten, die PFGE-Profile ähnlich des unten beschriebenen Musters X1 aufwiesen (Abbildung 3.1), war das Integron in kleineren Fragmente von ~150 kb inseriert. Das gleiche Hybridisierungsexperiment wurde für BlnI verdaute chromosomale DNA durchgeführt und zeigte, dass *aadB* in Fragmenten zwischen 470 und 600 kb lokalisiert war. Plasmid-DNA-Hybridisierung mit Sonden für *aadB* oder *bla*_{TEM-1} ergab ein negatives Ergebnis.

	Anzahl resistenter	Desister	Isolate mit Resistenzgenen			
Antimikrobielle Substanz	Isolate (%)	Resistenzgene	Anzahl (%)	Herkunft (Isolatanzahl) ^c		
β-Lactame						
Ampicillin	45 (82)	bla _{PSF-1}	1 (2)	G2 (1)		
		bla _{OXA-1} -like	0			
		<i>bla</i> TEM-1-like	45 (100)	G1 (16), G2 (15), G3 (14)		
		bla cty.M	0			
		bla _{SHV}	0			
Aminoglykoside						
Streptomycin	49 (89)	strA	3 (6)	G3(3)		
		aadA1 -like,	48 (98)	G1 (16), G2 (15), G3 (17)		
		aadA2	42 (86)	G1 (16), G2 (15), G3 (11)		
Gentamicin	43 (78) ^d	aacC2	0			
		aacC4	0			
		aadB	42 (98)	G1 (16), G2 (15), G3 (11)		
		armA	0	C2 (1)		
<i>u</i> ·		andere	1 (2)	G3 (1)		
капатусіп	42 (76)	aphAl aphAl (Kn)	2 (5)	G3 (2)		
		aac(6)-1h	0			
		00010/ 20	U U			
Phenicole						
Chloramphenicol	5 (9)	catA1	3 (3/5) ^g	G3 (3)		
		cmlA1	2 (2/5) ^g	G2 (2)		
		floR	0			
Folat-Stoffwechsel Inhibitoren						
Sulfamethoxazol	49 (89)	sul1	48 (98)	G1 (16), G2 (15), G3 (17)		
		sul2	3 (6)	G3 (3)		
		sul3	2 (4)	G2 (2)		
Trimethoprim	6 (11)	dfrA1 -like	4 (4/6) ^g	G3 (4)		
		dfrA7	0			
		dfrA12	0	22 (1)		
		dfrA14 dfrA17	1 (1/6)°	G3 (1)		
		andoro ^f	0 1 /1 /6\ ^g	C2 (1)		
		anuere	1 (1/0)	62 (1)		
Tetrazycline						
Tetrazyclin	17 (31)	tet (A)	5 (29)	G1 (1), G3 (4)		
		tet (B)	10 (59)	G2 (3), G3 (7)		
		tet (G)	0	Q4 (2) Q2 (4)		
		andere	3 (18)	61 (2), 63 (1)		
Chinolone und Fluorchinolone						
Nalidixinsäure und Ciprofloxacin	45 (82); 16 (29) ^h	qnrA	0			
		qnrB	0			
		qnrC	0			
		qnrD	0			
		ynrs	U			

Tabelle 3.2: Resistenz gegen einzelne Antibiotika und Prävalenz ausgewählter Resistenzgene in deutschen S. Saintpaul Isolaten $(n = 55)^{a}$

^a Fünf der ausgewählten 55 Isolate waren für alle getesteten Antibiotika sensibel. ^b Die Breakpoints für die Bouillon-Mikrodilutionsmethode sind in Tabelle A3a im Anhang definiert. ^c G1: Gruppe 1, Truthühner-Kotproben aus der EU-Prävalenzstudie (2006/2007); G2: Gruppe 2, Truthühner-Kotproben aus Routineeinsendungen (2002/2003, 2005/2006); G3: Gruppe 3, Truthühner-assoziierte Lebensmittelproben aus Routineeinsendungen (2000-2007). ^d Intermediäre oder volle Resistenz. ^e *aadB* vermittelt nach Zhao *et al.* (2005) auch geringe Kanamycin-Resistenz. ^f Die Resistenzmechanismen konnten in dieser Studie nicht identifiziert werden. ^g Aufgrund der geringen Anzahl an Isolaten (<10) werden hier absolute Zahlen angegeben. ^h Für Ciprofloxacin sind nur die Isolate mit intermediärer Resistenz (MHK: $2 \mu g/ml$) angegeben.

Gruppe	Sruppe Herkunft Anzahl der Isolate		Anzahl der Herkunft Isolate Resistenz-Phänotyp ^a Resistenz-Genotyp		Klasse 1 Integron ^b	Region (Anzahl der Isolate) ^c	
1	Truthühner-Kotproben aus der EU-Prävalenzstudie (2006 und 2007)	16	[R] ^d	[R'] ^e	[1] ^f	Niedersachsen (13)	
			[R] ^d -TET	[R'] ^e -tet (A)	[1] ^f	Mecklenburg-Vorpommern Niedersachsen	
			[R] ^d -TET	[R'] ^e -tet (A)	[I] ^f + 1000 bp/aadA1	Niedersachsen	
2	Truthühner-Kotproben aus Routineeinsendungen (2002 und 2003, 2005 und 2006)	17	[R] ^d	[R'] ^e	[I] ^f	Baden-Württemberg Baden-Württemberg, Sachsen-Anhalt (3) unbekannt Berlin Hessen Berlin	
			[R] ^d	[R'] ^e	[I] ^f + 1000 bp/ <i>aadA1</i>	Berlin	
			[R] ^d -TET	[R'] ^e - <i>tet</i> (B)	[1] ^f	Nordrhein-Westfalen Baden-Württemberg, Niedersachsen	
			[R] ^d -CHL	[R'] ^e -sul3 -cmlA1	[I] ^f	Sachsen	
			[R] ^d -CHL-TMP/SXT	[R'] ^e -bla _{PSE-1} -sul3 -cmlA1- (unbekannt) ^h	[1] [†]	Berlin	
			Sensibel			Baden-Württemberg (2)	
3 Tr	uthühner-assoziierte Lebensmittelproben aus Routineeinsendungen (2000 bis 2007)	22	[R] ^d	[R'] ^e	[1] ^f	Niedersachsen Nordrhein-Westfalen Niedersachsen, Nordrhein-Westfalen	
			[R] ^{d,g}	[R'] ^e	1600 bp/dfrA1 -aadA1	Sachsen-Anhalt Niedersachsen	
			[R] ^d	[R'] ^e	[I] ^f + 1000 bp/ <i>aadA1</i>	Berlin	
			[R] ^d -TET	[R'] ^e -aphA1 -strA -(unbekannt) ^h	[I] ^f	Berlin	
			[R] ^d -TET-TMP/SXT	[R'] ^e -aphA1 -sul2-tet (A)-dfrA14	[I] ^f	Berlin	
			[R] ^d -CHL-TET-TMP/SXT	[R'] ^e -catA1-tet (B)-dfrA1-like	[I] ^f	Baden-Württemberg, Rheinland-Pfalz	
			AMP-TET-STR/SPE-SUL-TMP/SXT	<i>bla</i> _{TEM-1} - <i>tet</i> (A)/ <i>tet</i> (B)- <i>aadA1</i> - <i>sul1</i> - <i>dfrA1</i> -like	1950 bp/estX-aadA1 + 700 bp/estX	Berlin	
			TET-STR/SPE-SUL	tet (B)-aadA1 -sul1	1950 bp/estX-aadA1 + 700 bp/estX	Nordrhein-Westfalen	
			IEI-SIR/SPE-SUL	tet (B)-aadA1-sul1	1950 bp/estX -aadA1 1600 bp/dfrA1 -aadA1	Berlin (2) Schloswig Holstoin	
				bla = aurA = tot (A) strA sul2	200 bp/obpa Conkassatton	Nordrhain Wastfalan	
			NAL	Did TEM-1-GYTA Ser83 - Tyr83- CET (A)-STA-SUIZ	200 bp/onne Genkassetten	Radon Württemborg	
			GEN-NAL-TET-STR/SDE-SUI	gyr Ger83 - Tyr83	1000 bp/aadA1	Thüringen	
			Sensibel	שייא Ser83-אזערגע עריישטער -אטוג	1000 59/40471	Rheinland-Pfalz Nordrhein-Westfalen Sachsen	

Tabelle 3.3: Phäno- und Genotypische Determinanten der Antibiotikaresistenz in deutschen S. Saintpaul Isolaten (n = 55).

^a Die Breakpoints für die Bouillon-Mikrodilutionsmethode sind in Tabelle A3a im Anhang definiert. ^b Variable Region der Klasse 1 Integrons; angegeben werden Länge und inserierte Gen-Kassetten. ^c Sofern nicht anders angegeben, war die Anzahl der Isolate gleich eins. ^d [R] phänotypischer Kern-Resistenztyp [AMP/AMC(i/r)-GEN(i/r)-KAN(i/r)-CIP (i/vs)-STR/SPE-SUL]. ^e [R'], genotypischer Kern-Resistenztyp [*bla*_{TEM-1}-*aadB-gyrA*_{Ser83→Glu83}-*aadA1*-like/*aadA2-sul1*]. ^f [I], Klasse 1 Integron mit der variablen Region 1700 bp/*aadB-aadA2* wurde mittels PCR nicht nachgewiesen. ^h Keins der untersuchten Tetrazyklin-Resistenz kodierenden Gene wurde detektiert.

3.1.1.5 Molekulare Typisierung

In Tabelle 3.4 sind die Ergebnisse der Plasmidanalyse nach der Extraktionsmethode von Kado und Liu (Kado und Liu, 1981) zusammengefasst. Die Auswertung zeigt, dass 67 % (37 von 55) der Isolate Plasmide enthielten. Insgesamt wurden 26 unterschiedliche Profile ermittelt mit jeweils ein bis sieben Plasmiden in der Größenordnung von 6 bis 174 kb. In 13 Isolaten, davon 7 aus Lebensmitteln, wurden Plasmide \geq 50 kb gefunden. Die übrigen 33 % (18 von 55) der Isolate enthielten gar keine Plasmide, wobei die Hälfte von ihnen (9 Isolate) aus der EU-Prävalenzstudie für Salmonellen in Truthühnerherden (Gruppe 1) stammte.

Insgesamt wurden alle Isolate dieser Studie, einschließlich der Außengruppe, einer PFGE Analyse unterzogen. Informationen bezüglich der PFGE-Profile, der Gruppenverteilung, sowie der Isolationsorte und –jahre sind in Tabelle 3.4 und Abbildungen 3.1 bis 3.3 dargestellt. Alle Dendrogramme der PFGE-Analyse (Abbildungen 3.1 bis 3.3) wurden mit der MVSP Software Version 3.1 erstellt. Die 55 Isolate der Gruppen 1 bis 3 zeigten 17 XbaI-Profile (DI: 0.76 [CI: 0.64 bis 0.87]), 19 BlnI-Profile (DI, 0.86 [CI, 0.80 to 0.93]) und 22 kombinierte XbaI-BlnI-Profile (DI, 0.89 [CI, 0.83 to 0.95]) (Abbildungen 3.1 bis 3.3). Elf der XbaI-Muster und 12 der BlnI-Muster wurden von nur einem Isolat repräsentiert, während alle übrigen Profile von mindestens zwei Isolaten vertreten waren. Innerhalb der Isolate der Prävalenzstudie (Gruppe 1) wurden zwei verschiedene XbaI-Muster und vier BlnI-Muster identifiziert. Bei den Kotisolaten aus Routineeinsendungen (Gruppe 2) generierten beide Enzyme jeweils sieben Profile. Die größte Heterogenität mit 12 XbaI-Profile und 14 BlnI-Profilen wurde innerhalb der Lebensmittelisolate aus Routineeinsendungen (Gruppe 3) gefunden.

Crumpa	Harlough	Anzahl der		Region (Anzahl der Isolato) ^b		PFGE-P	rofile	Plasmidgrößen
Gruppe	Herkuntt	Isolate	Resistenz-Phanotyp	Region (Anzahl der Isolate)	Xbal	Bini	Anzahl der Isolate	(Anzahl der Isolate) ^b
1	Truthühner-Kotproben aus der	16	[R] ^c	Niedersachsen (13)	X1	B1	4	7 kb, zwei \leq 6 kb (2); 7 kb, \leq 6 kb; kein Plasmid
	EU-Prävalenzstudie				X1	B2	8	kein Plasmid (7); 41 kb, 16 kb
	(2006 und 2007)				X1	B1b	1	28 kb
			[R] ^c -TET	Mecklenburg-Vorpommern	X1	B1	1	≤ 6 kb
				Niedersachsen	X5	B2	1	kein Plasmid
			[R] ^c -TET	Niedersachsen	X1	B2a	1	100 kb, 16 kb
2	Truthühner-Kotproben aus	17	[R] ^c	Baden-Württemberg	X1	B1	1	16 kb
	Routineeinsendungen			Baden-Württemberg, Sachsen-Anhalt (3)	X1	B2	4	kein Plasmid (3); 54 kb
	(2002 und 2003, 2005 und 2006)			unbekannt	X1a	B2	1	≤ 6 kb
				Berlin	X14	B3	1	kein Plasmid
				Hessen	X3	B10	1	≤ 6 kb
				Berlin	X4	B4	1	16 kb
			[R] ^c	Berlin	X4	B4	1	100 kb, 49 kb
			[R] ^c -TET	Nordrhein-Westfalen	X1	B2	1	47 kb, ≤ 6 kb
				Baden-Württemberg, Niedersachsen	X4	B4	2	49 kb, ≤ 6 kb; 62 kb, ≤ 6 kb
			[R] ^c -CHL	Sachsen	X1	B2	1	69 kb, 16 kb
			[R] ^c -CHL-TMP/SXT	Berlin	X2	B2c	1	100 kb, 16 kb
			Sensibel	Baden-Württemberg (2)	X13a	B5	2	12 kb, drei ≤ 6 kb (2)
3 Т	Fruthühner-assoziierte Lebensmittelproben	22	[R] ^c	Niedersachsen	X1	B1	1	kein Plasmid
	aus Routineeinsendungen			Nordrhein-Westfalen	X1	B1a	1	kein Plasmid
	(2000 bis 2007)			Niedersachsen, Nordrhein-Westfalen	X1	B2	2	kein Plasmid (2)
			[R] ^{c,d}	Sachsen-Anhalt	X4	B4	1	≤ 6 kb
				Niedersachsen	X4	B14	1	≤ 6 kb
			[R] ^c	Berlin	X4	B4	1	100 kb, 16 kb
			[R] ^c -TET	Berlin	X11	B11	1	138 kb, 70 kb, 9 kb, 7 kb, drei ≤ 6 kb
			[R] ^c -TET-TMP/SXT	Berlin	X11	B11	1	174 kb, 77 kb, 37 kb
			[R] ^c -CHL-TET-TMP/SXT	Baden-Württemberg, Rheinland-Pfalz	X8	B2b	2	28 kb. \leq 6 kb: \leq 6 kb
			AMP-TET-STR/SPE-SUL-TMP/SXT	Berlin	X6	B6	1	41 kb, drei ≤ 6 kb
			TET-STR/SPE-SUL	Nordrhein-Westfalen	X6	B6	1	drei ≤ 6 kb
			TET-STR/SPE-SUL	Berlin (2)	X6	B6	2	drei ≤ 6 kb; 70 kb, drei ≤ 6 kb
			AMP-CHL-TET-STR/SPE-SUL-TMP/SXT	Schleswig-Holstein	X10	B8	1	kein Plasmid
			AMP/AMC(i/r)-NAL-TET-STR-SUL	Nordrhein-Westfalen	X7	B7	1	100 kb, zwei ≤ 6 kb
			NAL	Baden-Württemberg	X7a	B7	1	16 kb, zwei ≤ 6 kb
			GEN-NAL-TET-STR/SPE-SUL	Thüringen	X9	B9	1	138 kb, 70 kb
			Sensibel	Rheinland-Pfalz	X13a	B5	1	12 kb, drei ≤ 6 kb
				Nordrhein-Westfalen	X12	B12	1	74 kb
				Sachsen	X13	B13	1	zwei ≤ 6 kb

Tabelle 3.4: Phänotypische Antibiotikaresistenz und molekulare Typisierung von deutschen S. Saintpaul Isolaten (*n* = 55).

^a Die Breakpoints für die Bouillon-Mikrodilutionsmethode sind in den Tabellen X und X im Anhang definiert. ^b Sofern nicht anders angegeben, war die Anzahl der Isolate gleich eins. ^c [R] phänotypischer Kern-Resistenztyp [AMP/AMC(i/r)-GEN(i/r)-KAN(i/r)-CIP (i/vs)-STR/SPE-SUL].

Das Profil X1 war mit 47 % das mit der höchsten Frequenz detektierte XbaI-Muster. Es wurde von insgesamt 26 Isolaten der Gruppen 1 (15 Isolate), 2 (7 Isolate) und 3 (4 Isolate) generiert. Das basierend auf der XbaI-Analyse erstellte Dendrogramm zeigt für das Cluster der Profile X1 und X1a eine Ähnlichkeit von 93 % und umfasst insgesamt 27 Isolate. Davon gehören 15 Isolate zur Gruppe 1, 8 Isolate zur Gruppe 2 und 4 Isolate zur Gruppe 3 (Abbildung 3.1).

M X1 M M kb a 1135.0 452.7 244.4 138.9 33.3 b UPGMA Xbal Blnl Gruppe (Nr.) Isolationsiahr Isolationsort Referenz-Profil (Nr.) Profil (Nr.) (Nr.) (Nr.) stamm NRW 06-01242 X12 B12 G3 2006 X6 (4) B6 (4) G3(4) 2007 (4) B (3), NRW 07-00334 X7 B7 G3 2007 NRW 07-01360 X7a B7 G3 07-00039 2007 BW X10 **B**8 G3 2000 SH 00-03122 G2 (2), G3 X13a (3) B5 (3) 2005 (2), 2006 BW (2), RP 05-01959 X13 B13 G3 2007 SN 07-02022 TH R9 G3 2007 07-02208 X9 X11 (2) B11 (2) G3 (2) 2000, 2006 B(2) 00-02151 X8 (2) B2b (2) G3(2) 2004, 2006 BW, RP 06-04383 07-00303 X5 **B**2 G2 2003 B B4 (6), B14 G2 (4), G3 (3) 2002, 2003 (2), 2006 (3), 2007 X4 (7) ST, B (3), BW, NI (2) 06-01828 X3 B10 G2 ΗE 06-01822 2006 X2 G1 2007 NI 03-01845 B2c X14 Β3 G2 2003 В 03-00314 B2 G2 2003 03-01331 X1a unbekannt G1 (15), G2 (7), 2003 (7), 2005, 2006 (4), X1 (26) B1 (7), B1a, B1b NI (15), MV (2), BW (2), 06-04821 NRW (3), SN, ST (3) B2 (16), B2a G3 (4) 2007 (14) 0,28 0,4 0,52 0,64 0,76 0,88

Jaccard's Coefficient

Abbildung 3.1: XbaI-PFGE-Profile repräsentativer S. Saintpaul Isolate.

(a) Bei der Definition der Profile wurden nur Banden >33 kb ausgewertet. Ähnliche Profile mit nur einer Bande Unterschied wurden mit Kleinbuchstaben versehen. Profile mit Unterschieden in zwei oder mehr Banden wurden mit Nummern bezeichnet. Der schwarze Pfeil markiert die Position des *aadB* Gens. Die Gelspur M enthielt XbaI-verdaute DNA des Stamms *S*. Braenderup H9812 und wurde als Größenstandard verwendet. (b) Das Dendrogramm zeigt die genetische Ähnlichkeit zwischen den XbaI-Profilen, die mittels "unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA)" und Jaccard's Koeffizienten bestimmt wurde. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der Isolate an, wenn es sich um mehr als ein Isolat handelte. G1: Gruppe 1, Truthühner-Kotproben aus der EU-Prävalenzstudie (2006/2007); G2: Gruppe 2, Truthühner-Kotproben aus Routineeinsendungen (2002/2003, 2005/2006); G3: Gruppe 3, Truthühner-assoziierte Lebensmittelproben aus Routineeinsendungen (2000-2007). B: Berlin, BW: Baden-Württemberg, HE: Hessen, MV: Mecklenburg-Vorpommern, NI: Niedersachsen, NRW: Nortrhein-Westfahlen, RP: Rheinland-Pfalz, SH: Schleswig-Holstein, SN: Sachsen, ST: Sachsen-Anhalt, TH: Thüringen. Die grau unterlegte Fläche markiert verwandte klonale Profile mit einem Jaccard's Koeffizienten von 0,93.

Die Abbildung wurde in Applied and Environmental Microbiology publiziert (Beutlich et al., 2010).

Die am häufigsten durch BlnI-Verdau erhaltenen Profile waren B2 (18 Isolate) und B1 (8 Isolate). Das Profil B2 wurde in den Gruppen 1 (9 Isolate), 2 (7 Isolate) und 3 (2 Isolate) detektiert. Das auf der BlnI-Analyse beruhende Dendrogramm zeigt eine Clusterbildung von 7 BlnI-Profilen (B1, B1a, B1b, B2, B2a, B2b, und B2c) mit einer Ähnlichkeit von 75 %. Diesem Cluster gehören 31 Isolate der Gruppen 1 (16 Isolate), 2 (10 Isolate) und 3 (5 Isolate) an (Abbildung 3.2).



Jaccard's Coefficient

Abbildung 3.2: BlnI-PFGE-Profile repräsentativer S. Saintpaul Isolate.

(a) Bei der Definition der Profile wurden nur Banden >33 kb ausgewertet. Ähnliche Profile mit nur einer Bande Unterschied wurden mit Kleinbuchstaben versehen. Profile mit Unterschieden in zwei oder mehr Banden wurden mit Nummern bezeichnet. Die Gelspur M enthielt XbaI-verdaute DNA des Stamms *S*. Braenderup H9812 und wurde als Größenstandard verwendet. (b) Das Dendrogramm zeigt die genetische Ähnlichkeit zwischen den BlnI-Profilen, die mittels "unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA)" und Jaccard's Koeffizienten bestimmt wurde. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der Isolate an, wenn es sich um mehr als ein Isolat handelte. Die Abkürzungen für die Gruppen und Isolationsorte sind in Abbildung 3.1 erklärt. Die Profile B1, B1a, B1b, B2, B2a, B2b und B2c clusterten zusammen bei einem Jaccard's Koeffizienten von 0,75. Die Abbildung wurde in Applied and Environmental Microbiology publiziert (Beutlich *et al.*, 2010).

Das Dendrogramm der kombinierten XbaI-BlnI-Profile stellt für X1 und X1a in Kombination mit den Profilen B1, B1a, B1b, B2, und B2a eine klonale Beziehung unter insgesamt 27 Isolaten fest, die mit einer Ähnlichkeit von 90 % clustern. Von diesen Isolaten gehören 15 zur Gruppe 1, 8 zur Gruppe 2 und 4 zur Gruppe 3 (Abbildung 3.3). Dieselben Isolate bilden unter Verwendung der XbaI-Profile, wie oben beschrieben, ein Cluster bei 93 % (Abbildung 3.1).



Jaccard's Coefficient

Abbildung 3.3: Dendrogramm der kombinierten XbaI-BlnI-Profile.

Die genetische Ähnlichkeit wurde anhand der "unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA)" und des Jaccard's Koeffizienten ermittelt. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der Isolate an, wenn es sich um mehr als ein Isolat handelte. Die Abkürzungen für die Gruppen und Isolationsorte sind in Abbildung 3.1 erklärt. Die grau unterlegte Fläche markiert verwandte klonale Profile mit einem Jaccard's Koeffizienten von 0,90.

Die Analyse der Außengruppen-Isolate erfolgte ausschließlich mit XbaI. Dabei wurde das Profil X1 in einem niederländischen Lebensmittelisolat und zwei deutschen Humanisolaten identifiziert. Aber auch andere zuvor detektierte Profile wurden in der Außengruppe nachgewiesen, wie z.B. Profil X8 in den beiden deutschen Hühnerisolaten sowie 10 niederländischen Geflügelisolaten, Profil X4 in einem niederländischen Geflügelisolat, Profil X13a in drei deutschen Humanisolaten und Profil X6 in einem deutschen Humanisolat.

3.1.1.6 Aus dieser Studie hervorgegangene Veröffentlichungen

Publikationen

Beutlich, J., I. Rodríguez, A. Schroeter, A. Käsbohrer, R. Helmuth, and B. Guerra. 2010. A predominant multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Saintpaul clonal line in German turkey and related food products. Appl. Environ. Microbiol. **76**:3657-3667.

Kongressposter

Schroeter, A., **J. Beutlich**, A. Käsbohrer, B. Guerra, R. Helmuth. Phenotypic and Genotypic Characterisation of Antimicrobial Resistance in German *Salmonella* isolates from Turkey. ASM Conferences - Antimicrobial Resistance in Zoonotic Bacteria and Foodborne Pathogens, Kopenhagen, Dänemark, Juni 2008.

Rodríguez I., P. García, I. Montero, A. Herrero, N. Martínez, **J. Beutlich**, M. C. Martín, R. Rodicio, B. Guerra, M. C. Mendoza, M. R. Rodicio. Tn21-like transposons found in non-typhoidal *Salmonella enterica* isolates of clinical origin carrying class 1 integrons. 20th ECCMID, Wien, Österreich, April 2010.

3.2 Multiresistenz in Europa:

Studien an europäischen *Salmonella enterica* Isolaten im Rahmen des Exzellenznetzwerks MedVetNet

3.2.1 Antimikrobielle Resistenz und Virulenz-Determinanten in europäischen Salmonella Genomic Island 1 (SGI1) positiven Salmonella enterica Isolaten unterschiedlicher Herkunft

3.2.1.1 Hintergrund der Studie

In einem Vorgängerprojekt dieser Studie beschäftigten sich Amar *et al.* an der Health Protection Agency (HPA), Colindale, UK mit Untersuchungen zur molekularen Epidemiologie von SGI1 in enterischen Bakterien, die in keiner Verwandtschaftsbeziehung zu *S.* Typhimurium DT104 standen. Hierfür wurde eine europäische Sammlung von insgesamt 445 multiresistenten Stämmen (*S. enterica*, 277; *E. coli*, 116; *Shigella* spp., 43, and *Proteus* spp., 9) von Human-, Tier- und Lebensmittelproben aus den Jahren 2002 bis 2006 analysiert. Mittels konventioneller gel-basierender PCR Assays konnte SGI1 nur in 53 % der *Salmonella* Isolate detektiert werden, indem Fragmente der beiden typischen linken und rechten "SGI1 Junctions" amplifiziert wurden. Die Applikation von Real-Time PCR Experimenten zum Nachweis des für SGI1 typischen open reading frame (ORF) S004 identifizierte fünf weitere *Salmonella* Isolate als SGI1 positv. Diesen Stämmen fehlten entweder beide "SGI Junctions" (*S.* Agona, 1; *S.* Derby, 3) oder es wurde nur die linke "Junction" nachgewiesen (*S.* Typhimurium, 1) (Amar *et al.*, 2008).

Aufgrund der alarmierenden Verbreitung von Multiresistenzen in bakteriellen Populationen ist die Detektierung von SGI1 ein wichtiger öffentlicher Gesundheitsaspekt. Aus diesem Grund stellt die Charakterisierung von SGI1 tragenden Bakterien, wie sie in dieser Studie durchgeführt wurde, ein nützliches Tool zur Unterstützung der Bemühungen im Gesundheitssektor dar. Hierfür wurden aus der Stammsammlung von Amar *et al.* (2008) alle SGI1 positiven Stämme ausgewählt, die entweder zu anderen Serovaren als *S.* Typhimurium gehörten oder andere Phagentypen als DT104 aufwiesen. Um mehr Wissen über ihre phänotypischen und molekularen Hintergründe zu erlangen, wurden alle Isolate zunächst auf ihre Antibiotikaresistenz-Phänotypen und die ihnen zugrunde liegenden molekularen Mechanismen untersucht. Außerdem wurde ein Screening auf ausgewählte Virulenzgene durchgeführt und verschiedene molekulare Typisierungsmethoden angewandt.

3.2.1.2 Phänotypische Charakterisierung der Antibiotikaresistenz

Nach der Bouillon-Mikrodilutionsmethode wurden innerhalb der 38 untersuchten Isolate dieser Studie 14 verschiedene Resistenzprofile mit Resistenzen gegen mindestens vier antimikrobielle Substanzen identifiziert (Tabellen 3.5 und 3.7).

Die SGI1 typische phänotypische Pentaresistenz [Penta] wurde dabei durchgehend durch alle Serovare in 29 Isolaten detektiert. In einigen Stämmen wurden Variationen dieses Phänotyps festgestellt (Tabellen 3.5 und 3.7).

3.2.1.3 Genotypische Charakterisierung der Antibiotikaresistenz

Die durch PCR ermittelte Prävalenz von Resistenzgenen und ihre Verteilung innerhalb der verschiedenen *Salmonella* Serovare ist in Tabelle 3.5 dargestellt. Insgesamt wurden 25 Isolate positiv auf die fünf SGI1-charakteristischen Resistenzgene *bla*_{PSE-1}, *floR*, *aadA2*, *sul1* und *tet*(G) getestet. Diese genotypische Pentaresistenz wird in Tabelle 3.5 mit [Penta-R] abgekürzt. Auch hier wurden Variationen festgestellt (Tabelle 3.5). Das Gen *sul1* war in allen 38 analysierten Isolaten präsent. In einem Plasmid eines niederländischen *S*. Typhimurium Isolats wurde das Chinolon-Resistenz vermittelnde Gen *qnrB* gefunden. Dieses Isolat wurde in einer weiteren Studie näher untersucht (siehe Abschnitt 3.3.1).

Alle in dieser Studie analysierten Isolate enthielten Klasse 1 Integrons (Tabelle 3.5), während Klasse 2 Integrons in keinem der Isolate detektiert wurden. Basierend auf dem Inhalt ihrer Genkassetten in der variablen Region und ihrer Amplikongröße wurden neun verschiedene Klasse 1 Integron Typen identifiziert (Tabelle 3.6). Die beiden SGI1 typischen Klasse 1 Integrons, die PCR Amplikons von 1200 bp und 1000 bp generieren und jeweils die Genkassetten *bla*_{PSE-1} und *aadA2* enthalten, waren in 25 (66 %) der Isolate präsent. In Tabelle 3.5 werden sie mit [I] abgekürzt dargestellt. Zwei *S*. Typhimurium Isolate enthielten 3'CS defektive Integrons, die unter Verwendung der 5'CS/3'CS Primer nicht detektiert werden konnten. Durch einen Link des Integrase-Gens *int11* mit den entsprechenden Genkassetten war jedoch eine Identifizierung möglich. Eins dieser Isolate trug die für SGI1 Klasse 1

Integrons charakteristischen variablen Regionen aadA2 und bla_{PSE-1} gemeinsam mit einem zusätzlichen defektivem Integron mit der variablen Region dfrA12-aadA2-cmlA1-aadA1 (5). Das zweite Isolat trug die variable Region aadB und ein aadA2 enthaltendes defektives Integron (Tabellen 3.5 und 3.6).

Aufgrund dieser oben beschriebenen Unterschiede in der SGI1 MDR Region werden die folgende Isolate als Teil der "unkonventionellen" Isolate betrachtet: *S.* Albany (drei Isolate), *S.* Kentucky (1), *S.* Newport (4) und *S.* Typhimurium (2). Allgemein wurden alle Isolate, die bestimmte Gruppen von SGI1-Markern nicht amplifizierten als "unkonventionell" bezeichnet. Diesen Isolaten fehlten Gene innerhalb oder außerhalb der SGI1 MDR Region. In Tabelle 3.5 sind sie blau unterlegt dargestellt.

3.2.1.4 Kartierung der SGI1-Region in "unkonventionellen" Isolaten

In fünf weiteren Isolaten, einem S. Agona (08-02864), drei S. Derby (08-02866, 08-02867, 08-02868), und einem S. Typhimurium (08-02865), wurden entweder keine oder nur eine "SGI1 Junction" detektiert. Da der SGI1-Marker S004 jedoch präsent war, wurden bei diesen Isolaten die SGI1 flankierenden Regionen einer näheren PCR-Analyse unterzogen. In allen fünf Isolaten waren die normalen SGI1 Attachment Sites *thdF* und *yidY*, sowie alle up- und down-stream analysierten flankierenden Gene (*dnaN*, *dnaA*, *rpmH*, *rnpA*, *yidC*, *thdF*, *int12*, *urt*, *rt*, *yidY*, *yidZ*, *yieE*, *yieF*, *yieG* und *yieH*) präsent (Abbildung 3.4). Da es sich bei *int12* (*STM3844*), *urt* (*STM3845*), *rt* (*STM3846*) um Gene des kryptischen Retronphagenelements handelte, wurden diese nur im S. Typhimurium Isolat detektiert. Die Integration von SGI1 in eine zweite chromosomale Attachment-Site zwischen den Genen *sodB* und *purR* konnte ausgeschlossen werden, da alle Isolate ein PCR-Produkt von ca. 518 bp generierten.



Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der SGI1 flankierenden Regionen.

(A) Kartierung der primären chromosomalen Attachment-Site.

(B) Schematische Darstellung der sekundären chromosomalen Attachment-Site. PCR-Amplifikation mit den Primern sodB-F/purR-R schließt Integration von SGI1 aus.

Tabelle 3.5: Detektion von SGI1, Virulenz- und Resistenz-Determinanten.

Land ^a	NRL-Salm Nr. (Isolationsjahr)	Serovar	Herkunft	SGI1 ^b	Resistenz-Phänotyp ^c	Resistenz-Genotyp	Klasse 1 Integron	Virulenz-Genotyp
NL	08-02864 (04)	S. Agona	Mensch	S004	[Penta] ^d	[Penta-R] ^e	[1] ^f	[V-core] ^g -avrA
D	08-00310 (02)	S. Albany	Lebensmittel	LJ/RJ	AMP/AMC-CHL/FLO- STR(i) ^h -SUL-TET-TMP/SXT-NAL	bla _{PSE-1} -floR -sul1 -tet (G)-dfrA1 -gyrA _{Asp87→Asn87}	1200 bp/bla PSE-1 + 1250 bp/dfrA1-orf	[V-core] ^g -avrA
F	08-00265 (06)	S. Albany	Lebensmittel	LJ/RJ	AMP/AMC-CHL/FLO- STR(i)-SUL-TET-TMP/SXT-NAL	bla _{PSE-1} -floR-sul1-tet (G)-dfrA1-gyrA _{Asp87-Asn87}	1200 bp/bla PSE-1 + 1250 bp/dfrA1-orf	[V-core] ^g -avrA
F	08-00309 (06)	S. Albany	Lebensmittel	LJ/RJ	AMP/AMC-CHL/FLO- STR(i)-SUL-TET-TMP/SXT-NAL	bla _{PSE-1} -floR-sul1-tet (G)-dfrA1-gyrA _{Asp87→Asn87}	1200 bp/bla PSE-1 + 1250 bp/dfrA1-orf	[V-core] ^g -avrA
NL	08-00263 (04)	S. Derby	Mensch	LJ/RJ	[Penta] ^d -TMP/SXT-NAL	[Penta-R] ^e -dfrA10-gyrA _{Ser83-Ala83}	[1] ^f	[V-core] ^g -avrA
NL	08-00311 (04)	S . Derby	Mensch	LJ/RJ	[Penta] ^d -TMP/SXT	[Penta-R] ^e -dfrA10-gyrA _{Ser83→Ala83}	[1] ^f	[V-core] ^g -avrA
NL	08-02866 (05)	S. Derby	Mensch	S004	STR/SPE-SUL-TET	aadA2 -sul1 -tet (A)	1000 bp/aadA2	[V-core] ^g -avrA-sopE1
NL	08-02867 (05)	S . Derby	Mensch	S004	STR/SPE-SUL-TET	aadA2 -sul1 -tet (A)	1000 bp/aadA2	[V-core] ^g -avrA-sopE1
NL	08-02868 (05)	S. Derby	Mensch	S004	STR/SPE-SUL-TET	aadA2 -sul1 -tet (A)	1000 bp/aadA2	[V-core] ^g -avrA-sopE1
UK	08-00267 (04)	S . Paratyphi B dT+	Rind	LJ/RJ	[Penta] ^d	[Penta-R] ^e -sul2	[1] ^f	[V-core] ^g -sodC1
PL	08-00266 (03)	S. Kentucky	Mensch	LJ/RJ	AMP/AMC-STR/SPE-SUL-TET-GEN-NAL	bla _{TEM-1} -strA/aadA7 -sul1 -tet (A)-aac(3)-le -gyrA _{Ser83→Phe83}	1600 bp/aac(3)-Ie -aadA7	[V-core] ^g -avrA
DK	08-00268 (05)	S. Newport	Mensch	LJ/RJ	[Penta] ^d -GEN-KAN/NEO-TMP/SXT-NAL	bla _{PSE-1} -floR -strA/aadA7 -sul1 -tet (A)-tet (G)-aac(3)-le -aphA1 -dfrA15 -gyrA _{Asp87→Gly87}	750 bp/dfrA15 + 1200 bp/bla PSE-1+	<pre>[V-core]^g-avrA-sodC1-sopE1</pre>
							1600 bp/aac(3)-Ie-aadA7	
DK	08-00269 (05)	S. Newport	Mensch	LJ/RJ	[Penta] ^d -GEN-KAN/NEO-TMP/SXT-NAL	bla _{PSE-1} -floR -strA/aadA7 -sul1 -tet (A)-tet (G)-aac(3)-le -aphA1 -dfrA15 -gyrA _{Asp87→Gly87}	750 bp/dfrA15 + 1200 bp/bla PSE-1+	[V-core] ^g -avrA-sodC1-sopE1
							1600 bp/aac(3)-Ie-aadA7	
DK	08-00313 (05)	S. Newport	Mensch	LJ/RJ	[Penta] ^d -GEN-TMP/SXT-NAL	bla _{PSE-1} -floR -strA/aadA7 -sul1 -tet (G)-aac(3)-le -dfrA15 -gyrA _{Ser83→Phe83}	750 bp/dfrA15 + 1200 bp/bla PSE-1+	<pre>[V-core]^g-avrA-sodC1-sopE1</pre>
							1600 bp/aac(3)-Ie-aadA7	
DK	08-00314 (05)	S. Newport	Mensch	LJ/RJ	[Penta] ^d -GEN-KAN/NEO-TMP/SXT-NAL	bla _{PSE-1} -floR -strA/aadA7 -sul1 -tet (A)-tet (G)-aac(3)-le -aphA1 -dfrA15 -gyrA _{Asp87→Gly87}	750 bp/dfrA15 + 1200 bp/bla PSE-1 +	[V-core] ^g -avrA-sodC1-sopE1
							1600 bp/aac(3)-Ie-aadA7	
D	08-00325 (04)	S. Typhimurium	Wurstware	LJ/RJ+R	[Penta] ^d	[Penta-R] ^e -catA1	[1] ^f	[V-core] ^g -avrA-spvC-sodC1
D	08-00326 (05)	S. Typhimurium	Schwein	LJ/RJ+R	[Penta] ^d -TMP/SXT	[Penta-R] ^e - <i>catA1 -sul3</i> -(unbekannt) ⁱ	[1] ^f	[V-core] ^g -avrA-spvC-sodC1
D	08-00272 (05)	S. Typhimurium	Schwein	LJ/RJ+R	[Penta] ^d -GEN-TMP/SXT	[Penta-R] ^e -bla _{TEM-1} -like-catA1 -strA/aadA1 -sul2 -aacC4 -dfrA1	[I] ^f + 1600 bp/dfrA1 -aadA1	[V-core] ^g -avrA-spvC-sodC1
D	08-02885 (05)	S. Typhimurium	Kaninchen	LJ/RJ+R	GEN-STR/SPE-SUL	aadB-strA /aadA2-sul1	800 bp/aadB + Integron mit aadA2 ¹	[V-core] ^g -avrA-spvC-sodC1
D	08-02886 (05)	S. Typhimurium	Nagetier	LJ/RJ+R	AMP/AMC-CHL/FLO-SUL-TET-GEN-TMP/SXT	bla _{PSE-1} -floR -sul1 -tet (G)-ααdB -(unbekannt) ⁱ	800 bp/aadB + 1200 bp/bla PSE-1	[V-core] ^g -avrA-spvC-sodC1
NL	08-00264 (05)	S. Typhimurium	Huhn	LJ/RJ+R	[Penta] ^d -NAL	[Penta-R] ^e -gyrA ASP87→TYr87	[1] ^f	[V-core] ^g -avrA-spvC-sodC1
NL	08-02865 (05)	S. Typhimurium	Mensch	IJ	[Penta] ^d -GEN	[Penta-R] ^e -(unbekannt) ⁱ	[1] ^f	[V-core] ^g -avrA-spvC-sodC1
NL	08-00315 (05)	S. Typhimurium	Raps	LJ/RJ+R	[Penta] ^d	[Penta-R] ^e -bla _{TEM-1} -like	[1] ^f	[V-core] ^g -avrA-spvC-sodC1
NL	08-00312 (05)	S. Typhimurium	Mensch	LJ/RJ+R	[Penta] ^d	[Penta-R] ^e	[1] ^f	[V-core] ^g -avrA-spvC-sodC1
NL	08-00316 (04)	S. Typhimurium	Mensch	LJ/RJ+R	[Penta] ^d -(CIP-NAL) ^k	[Penta-R] ^e -catA1 -qnrB19	[1] ^f	<pre>[V-core]^g-avrA-spvC-gipA-sodC1</pre>
NL	08-00270 (04)	S. Typhimurium	Schwein	LJ/RJ+R	[Penta] ^d -TMP/SXT	[Penta-R] ^e -bla TEM-1-like-catA1 -sul2 -tet (A)-dfrA14	[1] ^f	[V-core] ^g -avrA-spvC-sodC1
NL	08-00317 (05)	S. Typhimurium	Schwein	LJ/RJ+R	[Penta] ^d	[Penta-R] ^e -bla _{TEM-1} -like-catA1 -tet (A)	[1] ^f	[V-core] ^g -avrA-spvC-sodC1
NL	08-00318 (05)	S. Typhimurium	Mensch	LJ/RJ+R	[Penta] ^d -GEN	[Penta-R] ^e -catA1 -strA -tet (B)-aacC4	[1] ^f	[V-core] ^g -avrA-spvC-sodC1
NL	08-00319 (05)	S. Typhimurium	Schwein	LJ/RJ+R	[Penta] ^d	[Penta-R] ^e -catA1	[1] ^f	[V-core] ^g -avrA-spvC-sodC1
1	08-00322 (04)	S. Typhimurium	Mensch	LJ/RJ+R	[Penta] ^d -TMP/SXT	[Penta-R] ^e -catA1 -sul2 -dfrA14	[1] ^f	[V-core] ^g -avrA-spvC-sodC1
1	08-00271 (04)	S. Typhimurium	Mensch	LJ/RJ+R	[Penta] ^d -KAN/NEO-NAL	[Penta-R] ^e - <i>catA1 -strA -sul2 -tet</i> (B)- <i>aphA1 -gyrA</i> _{Asp87→Asn87}	[1] ^f	[V-core] ^g -avrA-spvC-sodC1
DK	08-00323 (05)	S. Typhimurium	Mensch	LJ/RJ+R	[Penta] ^d -GEN	[Penta-R] ^e -catA1 -strA -aacC4	[1] ^f	[V-core] ^g -avrA-spvC-sodC1
DK	08-00324 (05)	S. Typhimurium	Mensch	LJ/RJ+R	[Penta] ^d -GEN	[Penta-R] ^e -catA1 -strA -aacC4	[1] ^f	[V-core] ^g -avrA-spvC-sodC1
UK	08-00320 (04)	S. Typhimurium	Schaf	LJ/RJ+R	[Penta] ^d	[Penta-R] ^e -catA1	[1] ^f	[V-core] ^g -avrA-spvC-sodC1
UK	08-00321 (05)	S. Typhimurium	Rind	LJ/RJ+R	[Penta] ^d	[Penta-R] ^e -catA1	[1] ^f	[V-core] ^g -avrA-spvC-sodC1
н	08-00327 (06)	S. Typhimurium	Gans	LJ/RJ+R	[Penta] ^d	[Penta-R] ^e - <i>bla</i> _{TEM-1} -like	[1] ^f	[V-core] ^g -avrA-sodC1
н	08-00328 (06)	S. Typhimurium	Gans	LJ/RJ+R	[Penta] ^d	[Penta-R] ^e	[1] ^f	[V-core] ^g -avrA-sodC1
Н	08-00329 (06)	S. Typhimurium	Fleischwurst	LJ/RJ+R	[Penta] ^d -GEN-TMP/SXT	[Penta-R] ^e -cmlA1 -strA -sul3 -aacC4 -dfrA12	[I] [†] + Integron mit dfrA12 -aadA2 -cmlA -aadA1 ¹	[V-core] ^g -avrA-spvC-sodC1

"Unkonventionelle" Isolate sind blau unterlegt. ^a Länderzeichen: D, Deutschland; DK, Dänemark; F, Frankreich; H, Ungarn; I, Italien; NL, Niederlande; PL, Polen; UK, Großbritannien. ^b SGI1-Marker: S004, SGI1 ORF außerhalb der MDR-Region; LJ, linke SGI1-Junction; RJ, rechte SGI1-Junction; R, Retronphagenelement.^c Die Breakpoints für die Bouillon-Mikrodilutionsmethode sind in Tabelle A3a im Anhang definiert. ^d [Penta], SGI1 charakteristische phänotypische Pentaresistenz [AMP/AMC-CHL/FLO-STR/SPE-SUL-TET]. ^e [Penta-R], SGI1 charakteristische genotypische Pentaresistenz [*bla*_{PSE-1}*floR-aadA2-sul1-tet*(G)]. ^f [I], SGI1 charakteristische Klasse 1 Integrons [1000 bp/*aadA2* + 1200 bp/*bla*_{PSE-1}]. ^g [V-core], in allen 38 Isolaten präsente Virulenzgene: *ssaQ, mgtC, spi4_D, sopB* und *bcfC*. ^h Intermediärer (i) Resistenz-Phänotyp für STR (MHK: 16 µg/ml) (Schroeter *et al.*, 2004). ⁱ unbekannt, es konnte keins der getesteten Gene detektiert werden. ^j Defektives Integron, mit 5'CS/3'CS Primern nicht detektierbar. PCR-Produkte entstanden mit follgenden Primer-Sets: 5'CS/aadA2-B, intI1-R/aadA2-R und intI1-R/qacAE-R. ^k Verminderte Sensibilität gegenüber CIP (MHK: 0,5 µg/ml) und NAL (MHK: 8 µg/ml) (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006c). ¹ Defektives Integron, mit 5'CS/3'CS Primern nicht detektierbar.

Größe der variablen Region ^a (bp)	Genkassetten [®]	Ν	Serovar
1000 + 1200	$aadA2 + bla_{PSE-1}$	23	S. Typhimurium (19), S. Derby (2),
			S. Agona, S. Paratyphi B dT+
1000 + 1200 + 1600	aadA2 + bla _{PSE-1} + dfrA1 -aadA1	1	S. Typhimurium
1000 + 1200 + defektives Integron ^b	aadA2 + bla _{PSE-1} + dfrA12 -aadA2 -cmlA -aadA1 ^b	1	S. Typhimurium
1200 + 1250	bla _{PSE-1} + dfrA1 -orf	3	S. Albany
1000	aadA2	3	S. Derby
1600	aac(3)-le - aadA7	1	S. Kentucky
1600 + 1200 + 750	aac(3)-le - aadA7 + bla _{PSE-1} + dfrA15	4	S. Newport
1200 + 800	$bla_{PSE-1} + aadB$	1	S. Typhimurium
800 + defektives Integron ^c	$aadB + aadA2^{c}$	1	S . Typhimurium

Tabelle 3.6: Klasse 1 Integrons in den SGI1 positiven Isolaten (n = 38).

^a Die Durchführung von PCR/Sequenzierung erfolgte unter Verwendung der 5'CS/3'CS Primer (Levesque *et al.*, 1995).

^b Defektives Integron, mittels 5'CS/3'CS Primer nicht detektierbar wie bei Antunes et al. (2007) beschrieben.

^c Defektives Integron, mittels 5'CS/3'CS Primer nicht detektierbar. Identifizierung von PCR-Produkten unter Verwendung folgender Primer-Sets: 5'CS/aadA2-B, intI1-R/aadA2-R, and intI1-R/qac Δ E-R.

3.2.1.5 Virulotyping

Alle Isolate wurden mittels PCR-Analyse auf die Präsenz von 10 ausgewählten Virulenzgenen untersucht.

Die SPI kodierten Gene *ssaQ*, *mgtC*, *spi4_D*, *sopB* und das Fimbrien-Gen *bcfC* wurden in allen Isolaten detektiert. Aus Übersichtsgründen werden diese fünf Virulenzgene in Tabelle 3.5 unter der Abkürzung [V-core] zusammengefasst. Mit Ausnahme des S. Paratyphi B dT+ Stamms wurden alle Isolate positiv auf das SPI1 lokalisierte Gen *avrA* getestet. Das *Salmonella* Virulenzplasmid kodierte Gen *spvC* war außer in zwei in allen S. Typhimurium Isolaten präsent. Das Bakteriophagen-lokalisierte *sodC1* Gen wurde in allen Isolaten der Serovare Typhimurium (23 Isolate), Newport (4) und Paratyphi B dT+ (1) identifiziert, während für *sopE1* nur die vier S. Newport und drei S. Derby Isolate positiv getestet wurden. Das *gipA* Gen wurde in nur einem S. Typhimurium Isolat detektiert.

Insgesamt wurden in dieser Stammsammlung sieben verschiedene Kombinationen von Virulenzgenen gefunden (Tabelle 3.5).

3.2.1.6 Molekulare Typisierung

Nach der Methode von Kado und Liu (1981) wurden in 33 der insgesamt 38 Isolate dieser Studie (87 %) jeweils ein bis fünf Plasmide in einem Größenbereich von ca. ≤ 6 bis 180 kb detektiert (Tabelle 3.7). Alle S. Typhimurium Isolate (n = 23) enthielten das serovarspezifische Virulenzplasmid pSTV mit einer Größe von 94 kb (Helmuth *et.al.*, 1985; McClelland *et al.*, 2001) (Abbildung 3.5). In fünf Isolaten der Serovare S. Newport (3 Isolate), S. Kentucky (1) und S. Derby (1) wurden keine Plasmide nachgewiesen.



Abbildung 3.5: Plasmidprofile für eine Auswahl von 18 S. Typhimurium Isolaten. Die Gelspur M enthält den molekularen Größenstandard bestehend aus einem Plasmid-Pool der *E. coli* Stämme R27 (Plasmidgröße: 169 kb), R1 (94 kb), RP₄ (55 kb) und ColE₁ (6 kb).

Die PFGE-Analyse unter Verwendung des Enzyms XbaI generierte insgesamt 26 Profile. Innerhalb der untersuchten Serovare ergab sich folgende Verteilung: 14 verschiedene Muster innerhalb der 23 *S*. Typhimurium Isolate, 4 Muster innerhalb der 5 *S*. Derby, 3 Muster innerhalb der 4 *S*. Newport und 2 Muster innerhalb der 3 *S*. Albany (siehe Abbildung 3.6).



Abbildung 3.6: XbaI-PFGE-Profile (X) repräsentativer Isolate.

Bei der Definition der Profile wurden nur Banden >33 kb ausgewertet. Ähnliche Profile mit nur einer Bande Unterschied wurden mit Kleinbuchstaben versehen. Profile mit Unterschieden in zwei oder mehr Banden wurden mit Nummern bezeichnet. Die Gelspur M enthielt XbaI-verdaute DNA des Stamms *S*. Braenderup H9812 und wurde als Größenstandard verwendet.

T, S. Typhimurium; Ag, S. Agona; Al, S. Albany; D, S. Derby; J, S. Paratyphi B dT+ (S. Java); K, S. Kentucky; N, S. Newport.

Die Bilder wurden in Applied and Environmental Microbiology publiziert (Beutlich et al., 2011).

Die MLVA Untersuchung der *S*. Typhimurium Isolate ordnete die 23 Isolate insgesamt 21 MLVA-Typen zu. Zwei dieser Typen mit den Allelnummern 3-13-8-24-311 und 3-11-5-NA-311 wurden jeweils von zwei in Deutschland und Ungarn isolierten Stämmen repräsentiert. Die Abkürzung "NA" zeigt an, dass der Locus nicht präsent war. Alle 23 Isolate trugen identische Allele für die Loci STTR-9 und STTR-3. Die größte Allel-Heterogenität zeigten die Loci STTR-6 (12 Varianten) und STTR-10 (13 Varianten) (Abbildung 3.7).

Pearson correlation		STTR9	STTR5	STTR6	STTR10	STTR3	NRL-Salm Nr.	Serovar	Land ^a
ىىتى		3	14	13	14	311	08-00272	S. Typhimurium	D
	l	3	14	14	14	311	08-00329	<i>S</i> . Typhimurium	Н
		3	15	14	16	311	08-00323	S. Typhimurium	DK
		3	15	12	15	311	08-00270	<i>S</i> . Typhimurium	NL
		3	14	14	13	311	08-00318	S. Typhimurium	NL
		3	14	15	14	311	08-00324	<i>S</i> . Typhimurium	DK
	ј ЦС	3	14	15	13	311	08-00326	<i>S</i> . Typhimurium	D
		3	14	16	13	311	08-00321	S. Typhimurium	UK
		3	11	18	17	311	08-00312	S. Typhimurium	NL
		3	10	17	14	311	08-00322	<i>S</i> . Typhimurium	I
		3	14	16	21	311	08-00271	S. Typhimurium	I
		3	14	15	21	311	08-00325	S. Typhimurium	D
		3	16	17	22	311	08-00315	S. Typhimurium	NL
Н		3	14	16	23	311	08-00319	S. Typhimurium	NL
		3	14	13	18	311	08-02865	S. Typhimurium	NL
		3	3	11	NA	311	08-00327	S. Typhimurium	Н
		3	3	11	NA	311	08-00328	S. Typhimurium	Н
		3	10	14	26	311	08-00317	S. Typhimurium	NL
		3	12	10	24	311	08-00264	S. Typhimurium	NL
		3	14	12	24	311	08-00320	<i>S</i> . Typhimurium	UK
		3	13	8	24	311	08-02885	S. Typhimurium	D
L	1 7	3	13	8	24	311	08-02886	S. Typhimurium	D
		3	17	6	23	311	08-00316	S. Typhimurium	NL

Abbildung 3.7: Dendrogramm der MLVA-Profile der 23 S. Typhimurium Isolate. ^a Abkürzungen siehe Tabelle 3.5. "NA", Locus nicht präsent. Die farbig unterlegten Flächen markieren die MLVA-Typen, die jeweils von zwei Stämmen repräsentiert werden. Das Dendrogramm wurde unter Verwendung der "unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA)" und der Pearson Korrelation ermittelt.

Land ^a	NRL-Salm Nr. (Isolationsiahr)	Serovar	Herkunft	Phagentyp	Resistenz-Phänotyp ^b	PFGE Profil	Plasmidgröße (kb)	MLVA-Typ STTR 9-5-6-10-3
NII	08 03864 (04)	6 Agona	Monsch	nd	[D]C	XAg1	()	nd
D	08-02804 (04)	S Albany	Lobonsmittel	nd		VAL1	<u> </u>	nd
5	08-00310 (02)	S. Albany	Lebensmittel	nd	AMP/AMC-CHL/FLO-STR(I) -SUL-TET-TMP/SXT-NAL	VAI1	<u> </u>	nd
, E	08-00203 (00)	S. Albany	Lebensmittel	nd	AMP/AMC-CHL/FLO-STR(I) -SUL-TET-TMP/SXT-NAL	VAI2	<u> </u>	nd
NI	08-00303 (00)	S Dorby	Monsch	nd	INP/ANC-CHL/FLO-SIN(I) -SOL-TET-INP/SAT-NAL		<u>110</u>	nd
NI	08-00203 (04)	S. Derby	Mensch	nd	[Penta] - TMP/SAT-NAL	XD1 XD2	kein Plasmid	nd
NI	08-02866 (05)	S Derby	Mensch	nd		XD2 XD3		nd
NI	08-02867 (05)	S. Derby	Mensch	nd	STR/SPE-SULTET	XD3a	15 < 6	nd
NI	08-02868 (05)	S Derby	Mensch	nd	STR/SPE-SUIL-TET	XD3a	30.8	nd
LIK	08-00267 (04)	S. Derby S. Paratynhi B. dT+	Rind	nd	[Ponta] ^c	XI1	110	nd
PI	08-00266 (03)	S Kentucky	Mensch	nd	ΔMP/ΔMC-STR/SPE-SUIL-TET-GEN-NΔI	XK1	kein Plasmid	nd
	08-00268 (05)	S. Newport	Mensch	nd		XN1	kein Plasmid	nd
DK	08-00268 (05)	S. Newport	Mensch	nd	[Penta] -GEN-KAN/NEO-INIP/SAI-NAL	XN2	kein Plasmid	nd
DK	08-00203 (05)	S Newport	Mensch	nd	[Penta] -GEN-KAN/NEO-TNIP/SAT-NAL	XN2	< 6	nd
DK	08-00313 (05)	S Newport	Mensch	nd		XN3	kein Plasmid	nd
D	08-00325 (04)	S Typhimurium	Wurstware	DT193		XT1	90 10 7 < 6	3-14-15-21-311
D	08-00326 (05)	S Typhimurium	Schwein	PDNC ^e	[Ponta] ^C TMP/SVT	XT2a	90,100,9,7 < 6	3-14-15-13-311
D	08-00272 (05)	S Typhimurium	Schwein	206	[Penta] ^C -GEN-TMP/SXT	XT20	90,100,3,7, <u>2</u> 0	3-14-13-14-311
D	08-02885 (05)	S Typhimurium	Kaninchen	DT104I	GEN-STR/SPF-SUI	XT3	90 < 6	3-13-8-24-311
D	08-02886 (05)	S Typhimurium	Nagetier	DT120	AMP/AMC-CHI/FLO-SUI-TET-GEN-TMP/SXT	хтз	90 55 < 6 < 6	3-13-8-24-311
NL	08-00264 (05)	S. Typhimurium	Huhn	DT104L	[Penta] ^c -NAI	XT3	90. 7. < 6	3-12-10-24-311
NL	08-02865 (05)	S. Typhimurium	Mensch	DT104B low	[Penta] ^c -GEN	XT3	90.20.<6	3-14-13-18-311
NL	08-00315 (05)	S. Typhimurium	Raps	DT104L	[Penta] ^c	XT7	90, 180	3-16-17-22-311
NL	08-00312 (05)	S. Typhimurium	Mensch	DT104L	[Penta] ^c	XT8	90. ≤ 6	3-11-18-17-311
NL	08-00316 (04)	S. Typhimurium	Mensch	NT	[Penta] ^c -NAL(i)	XT3	90, ≤ 6, ≤ 6, ≤ 6	3-17-6-23-311
NL	08-00270 (04)	S. Typhimurium	Schwein	U309	[Penta] ^c -TMP/SXT	XT4	90, 50, ≤ 6	3-15-12-15-311
NL	08-00317 (05)	S. Typhimurium	Schwein	U309	[Penta] ^c	XT9	130, 90, 9, 7, ≤ 6	3-10-14-26-311
NL	08-00318 (05)	S. Typhimurium	Mensch	206	[Penta] ^c -GEN	XT2	90. 150	3-14-14-13-311
NL	08-00319 (05)	S. Typhimurium	Schwein	RDNC ^e	[Penta] ^c	XT2a	90, 9, 7, ≤ 6	3-14-16-23-311
I	08-00322 (04)	S. Typhimurium	Mensch	NT ^f	[Penta] ^c -TMP/SXT	XT3	90, 25, ≤ 6, ≤ 6	3-10-17-14-311
I.	08-00271 (04)	S. Typhimurium	Mensch	U309	[Penta] ^c -KAN/NEO-NAL	XT3a	90	3-14-16-21-311
DK	08-00323 (05)	S. Typhimurium	Mensch	NT ^f	[Penta] ^c -GEN	XT5	95, 90, ≤ 6	3-15-14-16-311
DK	08-00324 (05)	S. Typhimurium	Mensch	DT92	[Penta] ^c -GEN	XT6	170, 90	3-14-15-14-311
UK	08-00320 (04)	S. Typhimurium	Schaf	DT193	[Penta] ^c	XT10	90	3-14-12-24-311
UK	08-00321 (05)	S. Typhimurium	Rind	DT151	[Penta] ^c	XT2a	90, ≤ 6	3-14-16-13-311
н	08-00327 (06)	S. Typhimurium	Gans	RDNC ^e	[Penta] ^c	XT11	90, 45, 30, 10, ≤ 6	3-11-5-NA ^g -311
н	08-00328 (06)	S. Typhimurium	Gans	RDNC ^e	[Penta] ^c	XT11	90, 30, ≤ 6	3-11-5-NA ^g -311
н	08-00329 (06)	S. Typhimurium	Fleischwurst	RDNC ^e	[Penta] ^c -GEN-TMP/SXT	XT2b	90, 100, 150	3-14-14-14-311

Tabelle 3.7: Molekulare Typisierung der 38 Salmonella Isolate dieser Studie.

nd, nicht durchgeführt. ^a Abkürzungen siehe Tabelle 3.5. ^b Die Breakpoints für die Bouillon-Mikrodilutionsmethode sind in Tabelle A3a im Anhang definiert. ^c [Penta], SGI1 charakteristische phänotypische Pentaresistenz [AMP/AMC-CHL/FLO-STR/SPE-SUL-TET]. ^d Intermediärer (i) Resistenz-Phänotyp für STR (MHK: 16 µg/ml) (Schroeter *et al.*, 2004). ^c RDNC, "reacts with phages but <u>d</u>oes <u>n</u>ot <u>c</u>onform with definite or provisorial types". ^f nicht typisierbar. ^g "NA", Locus nicht präsent.

3.2.1.7 Aus dieser Studie hervorgegangene Veröffentlichungen

Publikationen

Beutlich, J., S. Jahn, B. Malorny, E. Hauser, S. Hühn, A. Schroeter, M. R. Rodicio, B. Appel, J. Threlfall, D. Mevius, R. Helmuth, and B. Guerra on behalf of the Med-Vet-Net WP21 Project Group. 2011. Antimicrobial resistance and virulence determinants in European *Salmonella* Genomic Island 1 positive *Salmonella enterica* isolates from different origins. Appl. Environ. Microbiol. Epub ahead of print, doi:10.1128/AEM.00425-11.

Huehn, S., R. M. La Ragione, M. Anjum, M. Saunders, M. J. Woodward, C. Bunge, R. Helmuth, E. Hauser, B. Guerra, **J. Beutlich**, A. Brisabois, T. Peters, L. Svensson, G. Madajczak, E. Litrup, A. Imre, S. Herrera-Leon, D. Mevius, D. G. Newell, and B. Malorny. 2010. Virulotyping and Antimicrobial Resistance Typing of *Salmonella enterica* Serovars Relevant to Human Health in Europe. Foodborne Pathog Dis. **7**:523-35.

Vorträge

Beutlich, J., and B. Guerra. Molecular Characterization of Antimicrobial Resistance and Virulence Determinants in *"Salmonella* Genomic Island 1 (SGI-1)" positive *Salmonella enterica* Isolates collected within WP21. MedVetNet WP21/WP29 Final Meeting, Paris, Frankreich, 14-16 April 2009.

Beutlich, J., B. Malorny, R. Helmuth, A. Schroeter, B. Guerra. Molecular Characterisation of Antimicrobial Resistance and Virulotyping in *"Salmonella* Genomic Island 1" positive strains collected within WP21. MedVetNet WP21 Annual Meeting, Budapest, Ungarn, 25-26 Februar 2008.

Beutlich, J., S. Hühn, B. Malorny, B. Guerra. Virulotyping of *Salmonella* isolates positive for Genomic Island 1. MedVetNet 3rd Annual Scientific Meeting, Lucca, Italien, 27-30 Juni 2007.

Kongressposter

Beutlich, J., B. Malorny, S. Huehn, A. Schroeter, B. Appel, C. Amar, J. Threlfall, D. Mevius, R. Helmuth, B. Guerra on behalf of the WP21 Project Group. Antimicrobial Resistance and Virulotyping of "*Salmonella* Genomic Island 1" positive strains collected within the European Med-Vet-Net Project. 9th International Meeting on Microbial Epidemiological Markers 2010, Wernigerode, Deutschland, September 2010.

Beutlich, J., S. Jahn, C. Amar, M. R. Rodicio, M. C. Mendoza, A. Schroeter, J. Threlfall, D. Mevius, R. Helmuth, B. Guerra on behalf of the WP21 Project Group. Molecular Characterization of *Salmonella* Genomic Island 1 (SGI-1) variants found in unconventional isolates collected within Med-Vet-Net WP21. Med-Vet-Net 5th Annual Scientific Meeting, Madrid, Spanien, Juni 2009.

Beutlich, J., A. Gramatke, R. Helmuth, S. Schroeter, B. Malorny, C. Amar, J. Threlfall, D. Mevius, B. Guerra on behalf of the Med-Vet-Net WP21 Project Group. Molecular Characterisation of Antimicrobial Resistance in *Salmonella* Genomic Island 1 (SGI1) – positive strains collected within WP21. Med-Vet-Net 4th Annual Scientific Meeting, Saint-Malo, Frankreich, Juni 2008.

Beutlich, J., C. Amar, D. Mevius, E. Liebana, J. Threlfall, R. La Ragione., B. Malorny, R. Helmuth, B. Guerra. Virulotyping of *Salmonella* isolates positive for Genomic Island 1. Med-Vet-Net 3rd Annual Scientific Meeting, Lucca, Italien, Juni 2007.

3.2.2 Identifizierung und Charakterisierung von multiresistenten europäischen S. Newport Isolaten (SGI1-positiv und –negativ) unterschiedlicher Herkunft

3.2.2.1 Hintergrund der Studie und epidemiologische Daten

Die Analysen von Amar *et al.* (2008) und Beutlich *et al.* (2011) zur molekularen Epidemiologie von SGI1 in *Enterobacteriaceae* zeigten, dass insbesondere bei *S.* Newport Isolaten verschiedene neue Varianten der genomischen Insel auftraten. Da *S.* Newport außerdem in den letzten Jahren sowohl in den USA als auch in Europa eine häufige Ursache humaner Salmonellose-Erkrankungen darstellte (Centers for Disease Control and Prevention, 2008; Cobbold *et al.*, 2006; European Centre for Disease Prevention and Control, 2008), beschäftigte sich diese Teilstudie eingehender mit der Analyse dieses ausgewählten Serovars. Es wurde eine Sammlung europäischer *S.* Newport Isolate angelegt, die anschließend bezüglich Charakteristika und Prävalenz von SGI1-Varianten untersucht wurde.

Alle Projektpartnerinstitute wurden im April 2009 aufgefordert, ihre Daten bezüglich der in ihren Laboratorien in den Jahren 2007 und 2008 isolierten S. Newport Stämme in Form einer Excel-Tabelle zur Verfügung zu stellen. Diese Tabelle sollten Auskunft über Isolationsort, Isolationsdatum, Herkunft und Resistenzphänotyp geben. Als einziges Selektionskriterium wurde die Stammeigenschaft "Multiresistenz" festgelegt. Es wurde versucht, nur europäische Isolate auszuwählen, aber in vielen Fällen trat die Multiresistenz gekoppelt mit sogenannten "reise-assoziierte" Isolaten auf. Von diesen stammten die meisten aus Humanproben, die mit Afrikaaufenhalten, wie z. B. in Ägypten, verbunden waren. Insgesamt war die Inzidenz von S. Newport Isolaten in den ausgewählten Jahren mit weniger als 100 Einsendungen pro Jahr in allen teilnehmenden Instituten sehr gering. Sofern vorhanden, wurden anhand dieser Daten aus insgesamt 559 Isolaten pro Institut jeweils fünf multiresistente Isolate sowie ein sensibler Stamm als Kontrolle ausgewählt. Da dieser Serotyp insbesondere in Polen, Italien und Ungarn nur selten auftrat, wurden für diese Länder auch Isolate der Jahre 2005 und 2009 in die Studie integriert (siehe Tabelle 3.8). Aus diesen Isolaten wurde für diese Studie eine Sammlung von insgesamt 51 (40 resistenten und 11 sensiblen) S. Newport Stämmen unterschiedlichster Herkunft ausgewählt.

				Anzahl der Isolate			
Institut	Land	Isolationsjahr	Herkunft	Resistent	Sensibel	nicht getestet	Gesamt
BfR	Deutschland	2007		7	24	2	33
		2008	Tier, Lebensmittel	4	34		38
CVI	Niederlande	2007	Mensch	3	20		23
		2008	Mensch, Tier, Lebensmittel	6	16		22
HPA	Großbritannien	2007	Mensch, Tier, Lebensmittel	72	0	1	73
		2008	Mensch, Lebensmittel	47	0	1	48
VLA	Großbritannien	2007	Tier	18	28		46
		2008	Tier, Lebensmittel	4	56		60
SSI	Dänemark	2007	Monsch	7	16		23
		2008	Mensch	1	55		56
AFSSA	Frankreich	2007	Tier Lebensmittel	21	34		55
		2008	her, Lebensmitter	8	24		32
ISCIII	Spanien	2007	Monsch	0	15		15
		2008	Mensch	3	14		17
PZH	Polen	2005	Monsch	2	0		2
		2007	Mensch	2	0		2
ISS	Italien	2005		3	0		3
		2007	Mensch	0	3		3
		2008		0	1		1
VMRI	Ungarn	2008	Tier	1	0		1
		2009	i lei	6	0		6

Tabelle 3.8: S. Newport Einsendungen der Projektpartnerinstitute (n = 559).

3.2.2.2 Phänotypische Charakterisierung der Antibiotikaresistenz

Aus Standardisierungsgründen wurde für alle ausgewählten 51 *S.* Newport Isolate zu Beginn der Studie mittels Bouillon-Mikrodilutionsmethode nach dem Routineprotokoll des NRL-Salm eine einheitliche Antibiotikaresistenz-Testung durchgeführt. Nach dieser Methode wurden innerhalb der 40 resistenten Isolate dieser Studie 28 verschiedene Resistenzprofile detektiert (Tabellen 3.9 und 3.10).

Die Resistenzen mit der größten Prävalenz innerhalb der 40 Isolate wurden gegenüber Tetrazyclin (33 Isolate, 82,5 %), Ampicillin (28 Isolate, 70 %), Sulfamethoxazol (28 Isolate, 70 %) und Streptomycin (24 Isolate, 60 %) identifiziert. Jeweils 16 Isolate (40 %) exprimierten Resistenzen für Trimethoprim und Trimethoprim-Sulfamethoxazol. Gegenüber Kanamycin und Nalidixinsäure waren 14 der Isolate (35 %) resistent und gegenüber Spectinomycin 13 Isolate (32,5 %). Resistenzen gegenüber Chloramphenicol, Florfenicol und Gentamicin wurden in jeweils weniger als 10 Isolaten (25 %) detektiert. Die klassische SGI1 charakteristische phänotypische Pentaresistenz [Penta] wurde dabei nur in zwei französischen vom Rind und aus Käse stammenden Isolaten sowie einem britischen Humanisolat nachgewiesen.

3.2.2.3 Genotypische Charakterisierung der Antibiotikaresistenz und Identifizierung von SGI1-Determinanten

In einem ersten Schritte wurden alle 51 Isolate auf die Präsenz bzw. das Fehlen von SGI1 durch PCR-Screening der linken und rechten Junction untersucht. Nach dieser Methode wurden insgesamt 17 der Isolate (33%) als SGI1-positv eingestuft (Tabellen 3.9 und 3.10). Zehn Stämme aus den Niederlanden, Großbritannien und Dänemark (9 Humanisolate und ein Isolat aus Geflügel Produkten), wurden für beide Junctions positiv getestet. In sechs vom Tier und Lebensmittel stammenden Isolaten aus Frankreich und Großbritannien wurde ausschließlich die rechte Junction (104RJ/104D) detektiert. Ein weiteres britisches Humanisolat enthielt dagegen nur die linke Junction (U7L12/LJR1).

Die durch PCR ermittelte Prävalenz von Resistenzgenen ist in Tabelle 3.9 dargestellt. Keins der Isolate trug die fünf SGI1-charakteristischen Resistenzgene bla_{PSE-1} , *floR*, *aadA2*, *sul1* und *tet*(G). Während *aadA2* in keinem der Isolate detektiert wurde, wurden die Gene *bla*_{PSE-1}, *floR*, *sul1* und *tet*(G) gemeinsam nur in vier Isolaten identifiziert. In einem ungarischen SGI1-negativen Truthahn-Isolat (MHK: CIP = 0,5 µg/ml; NAL = 16 µg/ml) wurde ein PMQR vermittelndes *qnrB* Gen nachgewiesen. Abgesehen davon wurden keine weiteren PMQR übertragenden Determinanten detektiert.

Alle 51 Isolate dieser Studie wurden mittels PCR und Sequenzanalyse auf die Präsenz von Klasse 1 und 2 Integrons untersucht. Insgesamt enthielten 16 der Isolate (31%) ein bis drei Klasse 1 Integrons. Basierend auf dem Inhalt ihrer Genkassetten in der variablen Region und ihrer Amplikongröße wurden fünf verschiedene Typen identifiziert (Tabelle 3.9). Von den beiden SGI1 typischen Klasse 1 Integrons wurde nur InC 1200 bp/*bla*_{PSE-1} in fünf der SGI1-positiven Isolate mit rechter und linker Junction (LJ/RJ) gefunden. Ein Klasse 2 Integron mit einer variablen Region von 1000 bp und einer *aadA1* Genkassette wurde in vier tierischen Isolaten detektiert.
Tabelle 3.9: Detektion von	SGI1 und Resistenz-	Determinanten in euror	päischen S. New	port Isolaten $(n = 51)$.

Einsender (Land) ^a	NRL-Salm Nr. (Isolationsjahr)	Herkunft	SGI1 ^b	Resistenz-Phänotyp ^c	Resistenz-Genotyp	Klasse 1 Integron	Klasse 2 Integron
CVI (NL)	09-01969 (07)	Mensch	LJ/RJ	STR/SPE-SUL-GEN-NAL	aadA7-sul1-aac(3)-le -gyrA _{Asp87->Gly87}	1600 bp/aac(3)-Ie -aadA7	-
CVI (NL)	09-01971 (08)	Mensch	LJ/RJ	AMP-STR/SPE-SUL-TET-GEN-KAN/NEO-TMP/SXT	bla TEM-1-aadA7-sul1-tet (A)-aac(3)-le -aphA1-dfrA15	1600 bp/aac(3)-Ie-aadA7 + 750 bp/dfrA15	-
CVI (NL)	09-01973 (08)	Mensch	LJ/RJ	AMP-CHL/FLO-STR(i)-SUL-TET-KAN/NEO-TMP/SXT-NAL	bla _{PSE-1} floR -sul1 -tet (G)-aphA1 -dfrA15 -gyrA _{Ser83→Tyr83}	1200 bp/bla PSE-1 + 750 bp/dfrA15	-
CVI (NL)	09-01974 (08)	Geflügelfleisch	LJ/RJ	STR(i)-SUL-TET-KAN/NEO-NAL	aadA1-like -sul2 -tet (A)-aphA1 -gyrA _{Ser83 → Tvr83}	-	-
HPA (GB)	09-01975 (07)	Mensch	LJ/RJ	[Penta] ^d -GEN-KAN/NEO-TMP/SXT-NAL	bla PSE-1 floR -strA /aadA7 -sul1 -tet (A)/tet (G)-aac(3)-le -aphA1 -dfrA15 -gyrA Asp87 ->Gly87	1600 bp/aac(3)-le-aadA7 + 1200 bp/bla PSE-1 + 750 bp/dfrA15	-
HPA (GB)	09-01976 (08)	Mensch	LJ/RJ	CHL/FLO(i)-STR/SPE-SUL-TET-GEN-KAN/NEO-TMP/SXT-NAL	floR -strA /aadA7 -sul1 -tet (A)/tet (G)-aac(3)-le -aphA1 -dfrA15 -gyrA _{Ser83→Phe83}	1600 bp/aac(3)-Ie-aadA7 + 750 bp/dfrA15	-
SSI (DK)	09-02072 (07)	Mensch	LJ/RJ	AMP/AMC(i)-CHL/FLO-SUL-TET-KAN/NEO-TMP/SXT-NAL	bla _{PSE-1} -floR -sul1 -tet (G)-aphA1 -dfrA15 -gyrA _{Asp87→Gly87}	1200 bp/bla PSE-1 + 750 bp/dfrA15	-
SSI (DK)	09-02073 (07)	Mensch	LJ/RJ	AMP/AMC(i)-CHL/FLO-SUL-TET-KAN/NEO-TMP/SXT-NAL	bla _{PSE-1} -floR -sul1 -tet (G)-aphA1 -dfrA15 -gyrA _{Asp87→Gly87}	1200 bp/bla PSE-1 + 750 bp/dfrA15	-
SSI (DK)	09-02074 (07)	Mensch	LJ/RJ	AMP/AMC-CHL/FLO-SUL-TET-KAN/NEO-TMP/SXT-NAL	bla _{PSE-1} -floR -sul1 -tet (G)-aphA1 -dfrA15 -gyrA _{Asp87→Gly87}	1200 bp/bla PSE-1 + 750 bp/dfrA15	-
SSI (DK)	09-02075 (07)	Mensch	LJ/RJ	STR/SPE-SUL-TET-GEN-NAL	aadA7-sul1-tet (A)-aac(3)-le -gyrA Asp87→Gly87	1600 bp/aac(3)-Ie-aadA7	-
HPA (GB)	09-01977 (08)	Mensch	IJ	AMP-STR/SPE-SUL-TET-GEN	bla TEM-1-aadA7-sul1-tet (A)-aac(3)-le -aphA1	1600 bp/aac(3)-Ie-aadA7	-
Afssa (F)	09-02076 (07)	Käse	RJ	[Penta] ^d -KAN/NEO-TMP/SXT	bla TEM-1-catA1 -aadA1-sul1/sul2-tet (A)-aphA1-dfrA1	1600 bp/dfrA1-aadA1	-
Afssa (F)	09-02077 (07)	Rind	RJ	[Penta] ^d -KAN/NEO-TMP/SXT	bla TEM-1-catA1 -aadA1-sul1/sul2-tet (A)-aphA1-dfrA1	1600 bp/dfrA1-aadA1	-
VLA (GB)	09-02081 (07)	Truthahn	RJ	AMP-STR/SPE-SUL-TET-TMP/SXT	bla TEM-1-aadA1 -sul2 -tet (B)-dfrA14	-	1000 bp/ aadA1
VLA (GB)	09-02082 (07)	Truthahn	RJ	AMP-STR/SPE-SUL-TET-TMP/SXT	bla TEM-1-aadA1 -sul1 /sul2 -tet (A)-dfrA1	1600 bp/dfrA1-aadA1	-
VLA (GB)	09-02084 (07)	Rind	RJ	AMP-STR/SPE-SUL-TMP/SXT	bla TEM-1-aadA1 -sul2 -(unbekannt)*		1000 bp/ aadA1
VLA (GB)	09-02086 (08)	Truthahn	RJ	AMP-STR/SPE	bla _{TEM-1} -aadA1		1000 bp/ aadA1
BfR (D)	07-01171 (07)	Umwelt	-	STR-SUL-TET-KAN/NEO-NAL	aadA1-like -sul2 -tet (A)-aphA1 -gyrA _{Ser83->Tyr83}		-
BfR (D)	07-02304 (07)	Hühnerfleisch	-	STR(i)	•		-
BfR (D)	07-04307-2 (07)	Truthahnfleisch	-	STR(i)-SUL-TET-NAL	aadA1-like -sul2 -tet (A)-gyrA ser83-, Tyr83		-
BfR (D)	08-00672 (08)	Truthahnfleisch	-	AMP-STR(i)-TET	bla _{TEM-1} -tet (A)		-
BfR (D)	08-01563 (08)	Truthahnfleisch	-	STR-SUL-TET-KAN/NEO-NAL	aadA1-like -sul2 -tet (A)-aphA1 -gyrA _{Ser83→Tyr83}		-
CVI (NL)	09-01972 (08)	Mensch	-	AMP-STR-SUL-TET	bla _{TEM-1} -strA -sul2 -tet (A)		-
HPA (GB)	09-01978 (08)	Mensch	-	AMP-STR-SUL	bla _{TEM-1} -strA-sul2		-
HPA (GB)	09-01979 (08)	Mensch	-	CHL/FLO-STR-SUL-TET	floR -strA -sul2 -tet (A)		-
Afssa (F)	09-02078 (08)	Truthahnfleisch	-	AMP/AMC(i)-TET-NAL	bla TFM-1-tet (A)-gyrA Ser83-bTvr83		-
Afssa (F)	09-02079 (08)	Geflügelfleisch	-	AMP-STR(i)-TET	bla TEM-1-tet (A)		-
Afssa (F)	09-02080 (08)	Hühnerfleisch	-	GEN-STR/SPE-SUL	aacC4 -aadA1 -sul1	1000 bp/aadA1	-
VLA (GB)	09-02083 (07)	Truthahn	-	AMP-STR/SPE-SUL-TMP/SXT	bla _{TEM-1} -aadA1 -sul1 /sul2 -dfrA14	1000 bp/aadA1	1000 bp/ aadA1
PZH (PL)	09-02110 (05)	Mensch	-	STR/SPE-SUL-KAN/NEO	aadA1-like -sul2 -aphA1	-	-
PZH (PL)	09-02111 (07)	Mensch	-	STR(i)-SUL-TET-KAN/NEO-NAL	aadA1-like-sul2-tet (A)-aphA1-gyrA _{Ser83→Tyr83}		-
ISS (I)	09-02485 (05)	Mensch	-	AMP/AMC-SUL-TET-TMP/SXT	bla TFM-1-sul2 -tet (A)-dfrA14		-
ISCIII (E)	09-02543 (08)	Mensch	-	AMP-STR-SUL-TET-TMP/SXT	bla TEM-1-strA / aadA1-like -sul1 /sul2 -tet (A)-dfrA1	1600 bp/dfrA1-aadA1	-
VMRI (H)	09-02545 (08)	Truthahn	-	AMP-TET	bla _{TEM-1} -tet (A)		-
VMRI (H)	09-02546 (09)	Truthahn	-	AMP-TET	bla _{TEM-1} -tet (A)		-
VMRI (H)	09-02547 (09)	Truthahn	-	AMP-TET	bla _{TEM-1} -tet (A)		-
VMRI (H)	09-02548 (09)	Truthahn	-	AMP-TET	bla _{TEM-1} -tet (A)		-
VMRI (H)	09-02549 (09)	Truthahn	-	AMP-TET	bla _{TEM-1} -tet (A)		-
VMRI (H)	09-02550 (09)	Truthahn	-	AMP-TET	bla _{TEM-1} -tet (A)		-
VMRI (H)	09-02551 (09)	Truthahn	-	AMP-TET-(CIP-NAL) ^e	bla _{TEM-1} -tet (A)-qnrB		-
BfR (D)	07-00538 (06)	Truthahn	-	Sensibel			-
CVI (NL)	09-01970 (07)	Mensch	-	Sensibel			-
HPA (GB)	09-01980 (08)	Mensch	-	Sensibel			-
SSI (DK)	09-02071 (07)	Mensch	-	Sensibel			-
VLA (GB)	09-02085 (08)	Huhn	-	Sensibel		-	-
ISS (I)	09-02486 (08)	Mensch	-	Sensibel		-	-
ISCIII (E)	09-02540 (08)	Mensch	-	Sensibel		-	-
ISCIII (E)	09-02541 (08)	Mensch	-	Sensibel		-	-
ISCIII (E)	09-02542 (08)	Mensch	-	Sensibel		-	-
ISCIII (E)	09-02544 (08)	Mensch	-	Sensibel		-	-
Afssa (F)	09-02650 (08)	Umwelt	-	Sensibel			-

^a Abkürzungen siehe Abschnitt 2.1.4.3 und Tabelle 3.5; E, Spanien. ^b LJ, linke SGI1-Junction; RJ, rechte SGI1-Junction. ^c Die Breakpoints für die Bouillon-Mikrodilutionsmethode sind in Tabelle A3a im Anhang definiert. ^d [Penta], SGI1 charakteristische phänotypische Pentaresistenz [AMP-CHL-STR-SUL-TET]. ^e Verminderte Sensibilität gegenüber CIP (MHK: 0,5 μ g/ml) und intermediäre Resistenz gegenüber NAL (MHK: 16 μ g/ml) (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006c). * unbekannt, es konnte keins der getesteten Gene detektiert werden.

3.2.2.4 Molekulare Typisierung

Nach der Methode von Kado und Liu (1981) wurden in 34 der insgesamt 51 Isolate dieser Studie (67 %) jeweils ein bis sieben Plasmide in einem Größenbereich von ca. \leq 6 bis 160 kb detektiert (siehe Tabelle 3.10).

Die PFGE-Analyse unter Verwendung des Enzyms XbaI generierte insgesamt 39 Profile (siehe Tabelle 3.10). Sowohl regional als auch Matrix-assoziiert traten des Öfteren die gleichen Muster auf, wie z. B. XN18 in drei dänischen Humanisolaten oder XN33 bzw. XN33a in sechs ungarischen Truthühnerisolaten. Einige Profile wurden länderübergreifend detektiert, wie z. B. XN11 in einem britischen und einem dänischen SGI1-positiven Humanisolat oder XN4 in jeweils einem deutschen und einem ungarischen SGI1-negativen Truthühnerisolat. XN19 wurde in zwei französischen Stämmen nachgewiesen, die beide positiv für RJ getestet wurden, aber aus unterschiedlichen Quellen (Käse und Rind) isoliert worden waren. Das Profil XN35 dagegen wurde sowohl in einem niederländischen SGI1-positiven SGI1-negativen Humanisolat.

Tabelle 3.10: Molekulare Typisierung der 51 S. Newport Isolate dieser Studie.

Einsender	NRL-Salm N	r.	Herkunft	SGI1 ^b	Resistenz-Phänotyp ^c	PFGE	MLST-Typ	Plasmidgröße
(Land)	(ISOIdUOIIS)	anr)				PIUIII		
CVI (NL)	09-01969	(07)	Mensch	LJ/RJ	STR/SPE-SUL-GEN-NAL	XN6	ST166	kein Plasmid
CVI (NL)	09-019/1	(08)	Mensch	LJ/KJ	AMP-STR/SPE-SUL-TET-GEN-KAN/NEO-TMP/SXT	XN8	51166	kein Plasmid
CVI (NL)	09-01973	(08)	Mensch	LJ/KJ	AMP-CHL/FLU-STR(I)-SUL-TET-KAN/NEU-TMP/SXT-NAL	XN10	51166	50
CVI (NL)	09-01974	(08)	Getlugelfleisch	LJ/KJ	STR(I)-SUL-TET-RAN/NEU-INAL	XN35	51166	40,≤6
HPA (GB)	09-01975	(07)	Mensch	LJ/RJ	[Penta] -GEN-KAN/NEO-TMP/SXT-NAL	XN11	51156	kein Plasmid
HPA (GB)	09-01976	(08)	Mensch	LJ/RJ	CHL/FLO(I)-STR/SPE-SUL-TET-GEN-KAN/NEO-TMP/SXT-NAL	XN12	51156	≤b
SSI (DK)	09-02072	(07)	Mensch	LJ/RJ	AMP/AMC(I)-CHL/FLO-SUL-TET-KAN/NEO-TMP/SXT-NAL	XN18	nd	kein Plasmid
SSI (DK)	09-02073	(07)	Mensch	LJ/KJ	AMP/AMC(I)-CHL/FLO-SUL-TET-KAN/NEO-TMP/SXT-NAL	XN18	51156	kein Plasmid
SSI (DK)	09-02074	(07)	Mensch	LJ/KJ	AMP/AMC-CHL/FLU-SUL-TET-KAN/NEU-TMP/SXT-NAL	XN18	na	kein Plasmid
SSI (DK)	09-02075	(07)	Mensch	Ш/КЈ	STR/SPE-SUL-TET-GEN-NAL	XN11	na	kein Plasmid
HPA (GB)	09-01977	(08)	Mensch	U N	AMP-STR/SPE-SUL-TET-GEN	XN13	51166	≤b
Afssa (F)	09-02076	(07)	Kase	KJ RJ	[Penta] ⁻ -KAN/NEO-TMP/SXT	XN19	ST166	$160, \le 6, \le 6, \le 6, \le 6$
Afssa (F)	09-02077	(07)	Rind	KJ RJ	[Penta] -KAN/NEO-TMP/SXT	XN19	nd	$160, \le 6, \le 6, \le 6, \le 6$
VLA (GB)	09-02081	(07)	Truthahn	RJ	AMP-STR/SPE-SUL-TET-TMP/SXT	XN23	ST166	65, 55, ≤ 6, ≤ 6, ≤ 6
VLA (GB)	09-02082	(07)	Truthahn	RJ	AMP-STR/SPE-SUL-TET-TMP/SXT	XN24	ST166	≤ 6, ≤ 6, ≤ 6
VLA (GB)	09-02084	(07)	Rind	RJ	AMP-STR/SPE-SUL-TMP/SXT	XN24a	ST166	$55, \le 6, \le 6, \le 6, \le 6$
VLA (GB)	09-02086	(08)	Truthahn	RJ	AMP-STR/SPE	XN27	ST166	55, ≤ 6, ≤ 6, ≤ 6
BfR (D)	07-01171	(07)	Umwelt	-	STR-SUL-TET-KAN/NEO-NAL	XN34	ST166	≤ 6
BfR (D)	07-02304	(07)	Hühnerfleisch	-	STR(i)	XN2	ST45	kein Plasmid
BfR (D)	07-04307-2	(07)	Truthahnfleisch	-	STR(i)-SUL-TET-NAL	XN3	ST166	≤ 6
BfR (D)	08-00672	(08)	Truthahnfleisch		AMP-STR(i)-TET	XN4	nd	55
BfR (D)	08-01563	(08)	Truthahnfleisch		STR-SUL-TET-KAN/NEO-NAL	XN5	ST166	≤ 6
CVI (NL)	09-01972	(08)	Mensch	-	AMP-STR-SUL-TET	XN9	ST46	140, 110, 10
HPA (GB)	09-01978	(08)	Mensch	-	AMP-STR-SUL	XN14	ST46	94
HPA (GB)	09-01979	(08)	Mensch	-	CHL/FLO-STR-SUL-TET	XN15	ST31	70
Afssa (F)	09-02078	(08)	Truthahnfleisch	-	AMP/AMC(i)-TET-NAL	XN20	ST166	80, 30, 10, ≤ 6 , ≤ 6 , ≤ 6 , ≤ 6
Afssa (F)	09-02079	(08)	Geflügelfleisch	-	AMP-STR(i)-TET	XN21	ST166	55
Afssa (F)	09-02080	(08)	Hühnerfleisch	-	GEN-STR/SPE-SUL	XN22	ST122	100, 90
VLA (GB)	09-02083	(07)	Truthahn	-	AMP-STR/SPE-SUL-TMP/SXT	XN25	ST166	55, ≤ 6, ≤ 6, ≤ 6
PZH (PL)	09-02110	(05)	Mensch	-	STR/SPE-SUL-KAN/NEO	XN35	nd	50, ≤ 6
PZH (PL)	09-02111	(07)	Mensch	-	STR(i)-SUL-TET-KAN/NEO-NAL	XN36	ST166	50, ≤ 6
ISS (I)	09-02485	(05)	Mensch	-	AMP/AMC-SUL-TET-TMP/SXT	XN28	ST45	50
ISCIII (E)	09-02543	(08)	Mensch	-	AMP-STR-SUL-TET-TMP/SXT	XN31	nd	kein Plasmid
VMRI (H)	09-02545	(08)	Truthahn	-	AMP-TET	XN33	nd	50, ≤ 6
VMRI (H)	09-02546	(09)	Truthahn	-	AMP-TET	XN4	ST166	50
VMRI (H)	09-02547	(09)	Truthahn	-	AMP-TET	XN33a	nd	50
VMRI (H)	09-02548	(09)	Truthahn	-	AMP-TET	XN33a	ST166	50
VMRI (H)	09-02549	(09)	Truthahn	-	AMP-TET	XN33a	nd	50
VMRI (H)	09-02550	(09)	Truthahn	-	AMP-TET	XN33	ST166	50, ≤ 6, ≤ 6
VMRI (H)	09-02551	(09)	Truthahn	-	AMP-TET-(CIP-NAL) ^e	XN33	nd	≤ 6
BfR (D)	07-00538	(06)	Truthahn	-	Sensibel	XN1	ST166	kein Plasmid
CVI (NL)	09-01970	(07)	Mensch	-	Sensibel	XN7	ST184	150, 100, 94,
HPA (GB)	09-01980	(08)	Mensch	-	Sensibel	XN16	ST121	kein Plasmid
SSI (DK)	09-02071	(07)	Mensch	-	Sensibel	XN17	ST31	kein Plasmid
VLA (GB)	09-02085	(08)	Huhn	-	Sensibel	XN26	ST45	55
ISS (I)	09-02486	(08)	Mensch	-	Sensibel	XN29	ST45	kein Plasmid
ISCIII (E)	09-02540	(08)	Mensch	-	Sensibel	XN30	ST122	≤ 6, ≤ 6
ISCIII (E)	09-02541	(08)	Mensch	-	Sensibel	XN31	ST45	kein Plasmid
ISCIII (E)	09-02542	(08)	Mensch	-	Sensibel	XN31	nd	kein Plasmid
ISCIII (E)	09-02544	(08)	Mensch	-	Sensibel	XN32	ST122	kein Plasmid
Afssa (F)	09-02650	(08)	Umwelt	-	Sensibel	XN5a	ST31	50

^a Abkürzungen siehe Tabelle 3.9. ^b LJ, linke SGI1-Junction; RJ, rechte SGI1-Junction. ^c Die Breakpoints für die Bouillon-Mikrodilutionsmethode sind in Tabelle A3a im Anhang definiert. ^d [Penta], SGI1 charakteristische phänotypische Pentaresistenz [AMP-CHL-STR-SUL-TET]. ^e Verminderte Sensibilität gegenüber CIP (MHK: 0,5 μ g/ml) und intermediäre Resistenz gegenüber NAL (MHK: 16 μ g/ml) (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006c).

Für die MLST-Typisierung wurden von den 51 Isolaten jeweils 39 Isolate als repräsentativ für jedes PFGE-Profil ausgewählt.

Innerhalb von *S.* Newport wurden bisher basierend auf der Allel-Kombination bei sieben Haushaltsgen-Fragmenten insgesamt 49 STs beschrieben (Sangal *et al.*, 2010). Innerhalb der Sammlung der hier untersuchten Isolate wurden davon acht verschiedene STs identifiziert (Tabelle 3.10). Zur Analyse der Gruppenstruktur unter diesen Isolaten wurde ein Minimalspanning Tree generiert (Abbildung 3.8). Es zeigte sich die Bildung dreier ST-Komplexe, die in Anlehnung an Sangal *et al.* (2010) als Newport-I, Newport-II und Newport-III bezeichnet wurden. Newport-I enthielt 62 % der getesteten Isolate und die beiden STs 156, der ausschließlich in Humanisolaten vorkam, und 166, der zu 65 % Geflügel-assoziiert auftrat. Zudem wurden alle SGI1-postiven Isolate dieser Gruppe zugeordnet. Newport-II enthielt 31 % der untersuchten Isolate und zeigte mit fünf STs die größte Diversität. Das Cluster Newport-III wurde von nur einem ST und drei Isolaten (zwei aus spanischen Humanproben, eins aus französischem Hühnerfleisch) repräsentatiert.



Abbildung 3.8: Minimal-spanning Tree aus den Allel-Profilen der Isolate (*n* = 39). Erstellt unter Verwendung von Bionumerics Version 5.1 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgien). Die Zahlen in den Knoten geben die Anzahl der Isolate an.

3.2.2.5 Aus dieser Studie hervorgegangene Veröffentlichung

Kongressposter

Beutlich J., M. Jaber, K. Thomas, A. Schroeter, S. A. Granier, S. Herrera Leon, K. Hopkins, I. Luzzi, E. Adrian, J. Szych, M. Torpdahl, K. Veldman, G. Wu, B. Appel, J. Threlfall, D. Mevius, R. Helmuth, B. Guerra. *Salmonella* Genomic Island 1 variants in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Newport isolates collected within the European Project Med-Vet-Net (WP21). International Symposium *Salmonella* and Salmonellosis, I3S, Saint Malo, Frankreich, Juni 2010.

3.3 Multiresistenz-assoziierte Plasmide: Studien an europäischen *Salmonella enterica* Isolaten im Rahmen des Exzellenznetzwerks MedVetNet

3.3.1 Analyse eines PMQR übertragenden *qnrB*-Plasmids in einem SGI1 positiven *S*. Typhimurium Human-Isolat aus den Niederlanden

3.3.1.1 Hintergrund der Studie

Innerhalb der europäischen Studie "Antimikrobielle Resistenz und Virulenz Determinanten in europäischen *Salmonella* Genomic Island 1 (SGI1) positiven *Salmonella enterica* Isolaten unterschiedlicher Herkunft" wurden in dem niederländische *S*. Typhimurium Humanisolat 08-00316 (auch STSGI-15) zusätzlich zur SGI1 charakteristischen Pentaresistenz (AMP/AMC-CHL/FLO-STR/SPE-SUL-TET) eine verminderte Sensibilität gegenüber Ciprofloxacin (MHK: 0,5 μ g/ml) und Nalidixinsäure (MHK: 8 μ g/ml) detektiert. Mutationen in der QRDR wurden jedoch nicht festgestellt. Der Phagentyp des Isolats konnte nicht bestimmt werden, aber das PFGE-Profil entsprach dem typischen Muster von DT104.

Da die PCR-Analyse unter Verwendung der Primer nach Jacoby *et al.* (2006) ein PMQR vermittelndes *qnrB* Gen Identifizierte, wurde dieser Stamm aufgrund der Aktualität des Themas weiteren Untersuchungen unterzogen.

3.3.1.2 Plasmid-Analyse

Nachdem durch Sequenzierung des PCR Amplikons (562 bp) die Präsenz eines Gens, das Ähnlichkeit mit *qnrB19* des *S*. Typhimurium Plasmids p61.9 (Accession Nr. FJ790886.1), des *Klebsiella pneumoniae* Plasmids pLRM24 (Accession Nr. EU624315.1) und des *E. coli* Plasmids pR4525 (Accession Nr. EU523120) aufwies, bestätigt wurde, erfolgte die Durchführung einer Plasmid-Analyse nach Birnboim und Doly (1979). Diese zeigte, dass das Isolat STSGI-15 mehrere Plasmide, einschließlich des *S*. Typhimurium 90 kb Virulenz-Plasmids, enthielt. Zur Bestätigung der extrachromosomalen Lage von *qnrB19* wurde die gesamte Plasmid-DNA mit einer *qnrB* Sonde des *Klebsiella pneumoniae* B1 Kontrollstamms hybridisiert (Abbildung 3.9).



Abbildung 3.9: Southern Blot/Hybridisierung der Plasmid-DNA des S. Typhimurium Isolats STSGI-15. Die DNA wurde auf einem 0,8% Agarosegel aufgetrennt und mit einer *qnrB*-Sonde hybridisiert. Die Abbildung wurde im Journal of Antimicrobial Chemotherapy publiziert (Hammerl *et al.*, 2010).

3.3.1.3 Sequenz-Analyse

Da es nicht möglich war, die Sequenz des *qnrB*-Plasmids direkt aus dem Isolat STSGI-15 zu bestimmen, wurde das Plasmid mittels Transformation in einen Naldixinsäure-sensiblen und Natriumazid-resistenten *E. coli* J53 Stamm überführt. Die Transformanten wurden auf 8 µg/ml Nalidixinsäure-haltigem MH-Agar selektiert. Diese Vorgehensweise ermöglichte eine Trennung des *qnrB19* tragenden Plasmids (pSGI15) von dem 90 kb *Salmonella* Virulenz-Plasmid. Anschließend wurde die komplette Nukleotidsequenz von pSGI15 mittels Primerwalking bestimmt, mit Hilfe bioinformatischer Tools (ORF Finder, blastp, blastn) der NCBI Homepage (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) analysiert und in der "European Molecular Biology Laboratory" (EMBL) Datenbank unter der Accession Nr. FN428572 hinterlegt.

Um die Möglichkeit ausschließen zu können, dass die Verwendung von Nalidixinsäure bei der Selektion der *E. coli* Transformanten das Auftreten von Mutationen in der Originalsequenz des *Salmonella qnrB* Gens begünstigt haben könnte, wurde das komplette Gen aus dem STSGI-15 Isolat sequenziert. Beide *qnrB* Sequenzen (Original und Transformante) waren identisch. Die Inkompatibilitätsgruppen-Bestimmung von pSGI15 nach dem Prinzip des PCR-basierten Replikontypings zeigte, dass dieses Plasmid genau wie das *S*. Typhimurium *qnrS1*-Plasmid pTPqnrS-1a (AM746977) zur ColE Variante ColE_{TP} gehörte

(PCR-Target 106 bp). Das Plasmid pSGI15 hatte eine Gesamtgröße von 2699 bp und einen durchschnittlichen G+C Gehalt von 50,3 %, der damit leicht unter den für das *S. enterica* Genom typischen 52 % lag. Die bioinformatische Analyse (Abbildung 3.10) zeigte vier ORFs mit gutem Kodierungspotential, das RNA-Basentriplett AUG als Startcodon und Shine-Dalgarno-Sequenzen. Die Plasmid-Sequenz bestand aus zwei Segmenten, die in enger verwandtschaftlicher Beziehung zum *Klebsiella pneumoniae* Plasmid pLRM24 (Accession Nr. EU624315.1) und zum *S.* Enteritidis Plasmid pK (Accession Nr. AY079200) stehen. Diese beiden Segmente wurden durch eine 0,6 kb Region getrennt, die keine signifikante Homologie zu Nukleotidsequenzen in der Datenbank aufwies.



Abbildung 3.10: Physikalische Karte von Plasmid pSGI15.

Die farbig unterlegten Pfeile kennzeichnen die ORFs mit gutem Kodierungspotential. Die Merkmale des ColE-like Replikons sind mit RNAI, RNAII und *oriV* angegeben. Die Plasmid-Positionen 1-806 und 2390-2699 (\approx 1,1 kb) sind zu 100 % identisch mit der qnrB19 Resistenzgen-Region des Plasmids pLRM24 und des S. Typhimurium Plasmids p61.9. Neben des Chinolon-Resistenzgens (ORF01; Accession Nr. ABC17628.1) kodiert diese Region ein weiteres Produkt (ORF04), ähnlich eines DNA-bindenden Transkriptionsaktivators (Accession Nr. EEH93140.1). Die Nukleotid-Position 1547-2357 (0,8 kb) enthält ORF03, dessen Produkt Verwandtschaft mit einem Replikations-Initiations-Protein (Accession Nr. YP_002332155.1) zeigt. Dieser ORF ist zu 91 % mit Plasmid pK und zu 80 % mit dem S. Borreze Plasmid pWQ799 (Accession Nr. L39794) identisch. Diese Region repräsentiert den ColE-like Backbone des Plasmids. Die "origin of vegetative replication" (oriV, Nukleotide 1881-1882) wird von Sequenzen flankiert, die identisch mit denen auf pWQ799 sind. Die Regionen, die die Nukleotide 1882-2427 (545 bp) und 2249-2386 (138 bp) umfassen, zeigten jeweils zu 83 % und zu 69 % Ähnlichkeiten mit den kodierenden Regionen der regulatorischen Elemente RNAII (auch Primär-Transkript genannt) und RNAI (Inkompatibilitäts-spezifischer Inhibitor der Primärstruktur) des ColE1 pWQ799 Plasmids. Das ORF02 Produkt ist ähnlich eines Proteins von S. Weltevreden (Accession Nr. ZP_02835362.1) unbekannter Funktion.

3.3.1.4 Aus dieser Studie hervorgegangene Veröffentlichungen

Publikation

Hammerl, J. A.[†], **J. Beutlich**[†], S. Hertwig, D. Mevius, E. J. Threlfall, R. Helmuth, and B. Guerra. 2010. pSGI15, a small ColE-like qnrB19 plasmid of a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strain carrying *Salmonella* genomic island 1 (SGI1). J. Antimicrob. Chemother. **65**:173-5.

[†] J. A. Hammerl und J. Beutlich haben zu gleichen Teilen zu dieser Arbeit beigetragen.

Teile dieser Arbeit wurden in folgendem Vortrag vorgestellt:

Beutlich, J., and B. Guerra. Molecular Characterization of Antimicrobial Resistance and Virulence Determinants in *"Salmonella* Genomic Island 1 (SGI-1)" positive *Salmonella enterica* Isolates collected within WP21. MedVetNet WP21/WP29 Final Meeting, Paris, Frankreich, 14-16 April 2009.

3.3.2 Identifizierung und Charakterisierung von Virulenz-Resistenz-Plasmiden in multiresistenten S. Typhimurium Isolaten

3.3.2.1 Hintergrund der Studie

Die erste Beschreibung plasmid-kodierter Virulenzgene in Salmonella als Verursacher systemischer Krankheiten geht zurück auf das Jahr 1982. Diese Virulenzplasmide sind serovar-spezifisch und wurden bisher in nur wenigen Serovaren, einschließlich klinisch relevanter S. Enteritidis und S. Typhimurium Isolate, nachgewiesen. Sie haben unterschiedliche Größen, aber besitzen alle das spv Operon zur Übertragung des Virulenzphänotyps (Rotger und Casadesús, 1999; Chu und Chiu, 2006). Bis in die 1980er Jahre besaß die Mehrzahl der Salmonella Stämme, wie S. Typhimurium LT2, keine Antibiotikaresistenzen. Seither geht der Trend jedoch immer mehr zur Entstehung multiresistenter Isolate (Threlfall, 2002; Threlfall et al., 2003). In S. Typhimurium DT104 erfolgt die Übertragung von Multiresistenz, wie bereits beschrieben, über die chromosomale Insel SGI1. Im Jahr 2002 charakterisierten Guerra et al. (2002) in Spanien multiresistente S. Typhimurium Isolate anderer Phagentypen, die denselben Resistenzphänotyp wie SGI1 positive DT104 zeigten, jedoch mit einem anderen Resistenzgenotyp [bla_{OXA-1}-catA1-aadA1sull-tet(B)] assoziiert waren. Zwei dieser Gene bildeten dabei die variable Region eines charakteristischen Klasse 1 Integrons [InH:2000 bp/bla_{OXA-1}-aadA1]. Dieser Genotyp wurde über ein konjugatives, von pSLT abstammendem Hybridplasmid übertragen, das man als pUO-StVR2 (~ 140 kb) bezeichnete (Guerra et al., 2002). Es besaß außerdem die für pSLTtypischen Virulenzgene spvC, rck, samA, traT, traX, repA und parA/B (Rotger und Casadesús, 1999; Rychlik et al., 2006). Allerdings fehlten diesem Plasmid der InFIB/repA2 Replikationsursprung und ein großer Teil des pef Operons. (Guerra et al., 2002; Herrero et al., 2006; Herrero et al., 2008a). Aktuelle Untersuchungen zeigen, dass sich das zunächst in Spanien endemisch auftretende pUO-StVR2 in Europa auszubreiten scheint. Das Plasmid wurde mittlerweile auch in Großbritannien nachgewiesen und wird aufgrund der Präsenz seines charakteristischen Klasse 1 Integrons auch in Portugal und Norwegen vermutet (Herrero et al., 2009). Diese Co-Existenz von Virulenz- und Resistenzgenen in demselben extrachromosomalen Element bedeutet für den Menschen eine ernsthafte gesundheitliche Bedrohung (Guerra et al., 2002).

Da sich unter den in der Arbeit von Amar *et al.* (2008) analysierten Stämmen u. a. auch *S*. Typhimurium Isolate befanden, die negativ für SGI1 getestet wurden, die aber aufgrund ihres Resistenzphänotyps verdächtigt wurden Virulenz-Resistenz-Plasmiden zu besitzen, beschäftigt sich ein Teil dieser Dissertation mit der weiterführenden Untersuchung dieser Isolate.

3.3.2.2 Identifizierung *bla*-positiver Isolate

Aus insgesamt 66 S. Typhimurium Isolaten der Studie von Amar *et al.* (2008) wurden 15 Isolate ausgewählt, die das Grundresistenzmuster AMP-TET-SUL-STR(i/r) aufwiesen. In einem ersten Analyseschritt wurden alle Stämme mittels PCR auf *bla* Gene, Integronprofile und die Präsenz des pSLT typischen *spvC* Gens getestet.

Zwölf Isolate generierten Amplikons für $bla_{\text{TEM-1}}$ (503 bp), während die übrigen drei für $bla_{\text{OXA-1}}$ (708 bp) positiv getestet wurden. Das Gen $bla_{\text{PSE-1}}$ wurde in keinem der Isolate identifiziert. Zur weiteren Charakterisierung wurden alle Stämme auf 27 weitere Resistenzgene getestet (Tabelle 3.11).

Vierzehn Isolate enthielten jeweils eines von insgesamt drei verschiedenen Klasse 1 Integron Profilen (Tabellen 3.11 und 3.12). InH: 2000/bla_{OXA-1}-aadA1 wurde in allen bla_{OXA-1}positiven Isolaten detektiert. Bei 10 der bla_{TEM-1}-positiven Isolate ergab das PCR-Screening mit den normalerweise zur Detektierung von Klasse 1 Integrons verwendeten 5'CS/3'CS Primern keine Amplifikationsprodukte. Da diese Isolate jedoch positiv für die Gene *int11*, *dfrA12*, *aadA2*, *cmlA1* und *sul3* getestet wurden, lag die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um ein von Antunes *et al.* (2007) neu beschriebenes, ursprünglich in Portugal entdecktes Klasse 1 Integron handeln könnte. Dieses Integron besitzt ein ungewöhnliches 3' konserviertes Segment und ist mit dem *sul3* Gen assoziiert. Diese Vermutung wurde durch PCR Amplifikationen bestätigt, indem Primersets für *int11/dfrA12* (1021 bp), *dfrA12/aadA2* (1697 bp) und *cmlA1/aadA1* (1577 bp) eingesetzt und Amplikons generiert wurden. Die Größe der zu erwartenden Amplikons wurde im Vorfeld anhand der Nukleotid-Sequenz des *sul3*-tragenden Integrons von Antunes *et al.* (2007) Accession Nr. EF051037 bestimmt.

Ein weiteres $bla_{\text{TEM-1}}$ -positives Isolat enthielt stattdessen ein Klasse 1 Integron mit einer variablen Region von 1600 bp und den Genkassetten *dfrA1-aadA1*.

Alle bla_{OXA-1} Varianten sowie alle bla_{TEM-1} Varianten mit *sul3*-assoziiertem Integron wurden positiv für das plasmid-kodierte Virulenzgen *spvC* getestet (Tabelle 3.12).

3.3.2.3 Charakterisierung *bla*_{OXA-1}-InH-like-positiver Isolate

Die Plasmid-Analyse nach Kado und Liu (1981) zeigte, dass die drei *bla*_{OXA-1}-InH-likepositiven Isolate jeweils ein großes Plasmid der Inkompatibilitätsgruppe IncFII enthielten, dessen Größe grob mit der für pUO-StVR2 (ca. 140 kb) erwarteten Größe übereinstimmte, neben ein oder zwei Plasmiden kleinerer Größe (Tabellen 3.11 und 3.12). Als Kontrollstamm wurde bei allen Experimenten der pUO-StVR2-tragende Kontrollstamm T31 mitgeführt. Keins der drei Isolate enthielt das für *S*. Typhimurium charakteristische 94 kb große Virulenzplasmid pSLT.

Alle IncFII Plasmide hybridisierten mit der *spvC*-Sonde. Das bla_{OXA-1} Gen wurde dagegen nur auf den Plasmiden der beiden italienischen DT120 Humanisolate kartiert. Auf diese Weise konnte nachgewiesen werden, dass diese beiden Stämme ein Hybridplasmid enthielten und der *S*. Typhimurium pUO-StVR2 Gruppe zuzuordnen waren. Für das dänische DT12 Humanisolat wurde gezeigt, dass bla_{OXA-1} auf dem Chromosom lokalisiert war. Auch weitere Resistenzgene wie *aadA1-like* und *tet*(B) konnten durch Hybridisierungsexperimenten nicht auf dem Plasmid detektiert werden. Die Plasmide dieses Isolats scheinen demnach in keiner Verwandtschaft zu pUO-StVR2 zu stehen.

Bei der Antibiotika-Empfindlichkeitsprüfung zeigten die beiden italienischen Isolate und der Stamm T31 denselben Resistenz-Phänotyp [AMP-AMC]-CHL-[STR(r/i)-SPE(r/i)]-TET-SUL und trugen beide die pUO-StVR2 typischen Gene *bla*_{OXA-1}, *catA1*, *aadA1*, *tet*(B) und *sul1*. Das dänische Isolat zeigte die gleichen Resistenzeigenschaften plus zusätzlicher Resistenzen gegenüber GEN, TMP und SXT mit den zusätzlichen Resistenzgenen *aacC2*, *aadA2* und *dfrA12* (Tabelle 3.11).

Im PCR-basierten Screening auf insgesamt 14 ausgewählte pSLT-typische Virulenzgene wurden die beiden Isolate der pUO-StVR2 Gruppe inklusive Kontrollstamm positiv auf die Gene *spvC*, *rck*, *pefI*, *samA*, *oriT*, *traT*, *traX*, *srgA*, *ccdAB* und *parA/B* getestet. Wie erwartet fehlten ein großer Teil des *pef* Operons sowie *rsk*. Auch das dänische Isolat besaß diese Virulenzgene. Im Gegensatz zu den pUO-StVR2 Stämmen war das gesamte *pef* Operon hier jedoch intakt und auch *rsk* konnte detektiert werden (Tabelle 3.12).

Alle drei *bla*_{OXA-1}-InH-like positiven Isolate wurden außerdem einer PFGE-Analyse mit XbaI unterzogen. Aufgrund dieser Methode konnten die Isolate zwei eng verwandten XbaI-Profilen zugeordent werden: X12 und X12a. Der pUO-StVR2-Kontrollstamm T31 zeigte ebenfalls den XbaI-Typ X12. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 3.11 und 3.12 zusammengefasst dargestellt.

Land ^a	NRL-Salm Nr. (Isolationsjahr)	Herkunft	Phagentyp	Plasmid- größe (≈kb) ^b	Resistenz-Phänotyp ^c	Resistenz-Genotyp	Klasse 1 Integrongrößen (bp) und/oder und/oder Genkassetten
I	08-02878 (05)	Mensch	DT120	140 , 120, 40	[AMP-AMC]-CHL-[STR(i)-SPE(i)]-TET-SUL	bla _{OXA-1} -catA1 -aadA1 -tet (B)-sul1	2000/bla _{OXA-1} -aadA1
L	08-02879 (05)	Mensch	DT120	140 , 40	[AMP-AMC]-CHL-[STR-SPE]-TET-SUL	bla _{OXA-1} -catA1 -aadA1 -tet (B)-sul1	2000/bla _{OXA-1} -aadA1
DK	08-02884 (05)	Mensch	DT12	140 , 60	[AMP-AMC(i)]-CHL-GEN-[STR-SPE]-TET-SUL-TMP-SXT	bla _{OXA-1} -catA1 -aacC2 -[aadA1 -aadA2]-tet (B)-sul1 -dfrA12	2000/bla _{OXA-1} -aadA1
E	T31 (93)	Mensch	DT120	140 (pUO-StVR2)	AMP-CHL-[STR-SPE]-TET-SUL	bla _{OXA-1} -catA1 -[strA-aadA1]-tet(B)-[sul1-sul2]	2000/bla _{OXA-1} -aadA1
UK	08-02869 (04)	Schwein	U288	135 , 50	AMP-CHL-[STR-SPE]-TET-SUL-TMP-SXT	bla _{TEM-1} -cmlA1 -[strA-aadA1-aadA2]-tet (A)-[sul2-sul3]-dfrA12	int1-dfrA12-aadA2-cmlA1-aadA1 ^d
UK	08-02870 (04)	Schwein	DT193	110	AMP-CHL-[STR-SPE]-TET-SUL-TMP-SXT	bla _{TEM-1} -cmlA1 -[strA-aadA1-aadA2]-tet (A)-[sul2-sul3]-dfrA12	int1-dfrA12-aadA2-cmlA1-aadA1 ^d
UK	08-02871 (04)	Schwein	DT193	150	AMP-CHL-[STR-SPE]-TET-SUL-TMP-SXT	bla _{TEM-1} -cmlA1 -[strA-aadA1-aadA2]-tet (A)-[sul2-sul3]-dfrA12	int1-dfrA12-aadA2-cmlA1-aadA1 ^d
UK	08-02874 (05)	Schwein	NT	160 (pUK-StVR42)	AMP-CHL-[STR-SPE]-TET-SUL-TMP-SXT	bla _{TEM-1} -cmlA1 -[strA-aadA1-aadA2]-tet (A)-[sul2-sul3]-dfrA12	int1-dfrA12-aadA2-cmlA1-aadA1 ^d
I	08-02881 (05)	Mensch	RDNC	150 (pl-StVR49)	AMP-CHL-[STR-SPE]-TET-SUL-TMP-SXT	bla _{TEM-1} -cmlA1 -[strA-aadA1-aadA2]-tet (A)-[sul2-sul3]-dfrA12	int1-dfrA12-aadA2-cmlA1-aadA1 ^d
UK	08-02875 (06)	Schwein	U288	120	AMP-CHL-[STR-SPE]-TET-SUL-TMP-SXT	bla _{TEM-1} -cmlA1 -[strA-aadA1-aadA2]-tet (A)-[sul2-sul3]-dfrA12	int1-dfrA12-aadA2-cmlA1-aadA1 ^d
UK	08-02876 (06)	Schwein	U311	115 , andere < 30	AMP-CHL-[STR-SPE]-TET-SUL-TMP-SXT	bla _{TEM-1} -cmlA1 -[strA-aadA1-aadA2]-tet (A)-[sul2-sul3]-dfrA12	int1-dfrA12-aadA2-cmlA1-aadA1 ^d
UK	08-02877 (06)	Schwein	NT	110, andere < 30	AMP-CHL-[STR-SPE]-TET-SUL-TMP-SXT	bla _{TEM-1} -cmlA1 -[strA-aadA1-aadA2]-tet (A)-[sul2-sul3]-dfrA12	int1-dfrA12-aadA2-cmlA1-aadA1 ^d
UK	08-02872 (05)	Schwein	DT193	135 , 50	AMP-CHL-KAN-[STR-SPE]-SUL-TMP-SXT	bla _{TEM-1} -cmlA1 -aphA1 -[aadA1-aadA2]-sul3 -dfrA12	int1-dfrA12-aadA2-cmlA1-aadA1 ^d
UK	08-02873 (05)	Schwein	U288	140 (pUK-StVR41), andere < 30	AMP-CHL-KAN-NAL-[STR-SPE] -TET-SUL-TMP-SXT	bla _{TEM-1} -cmlA1 -aphA1 -[strA-aadA1-aadA2]-tet (A)-[sul2-sul3]-dfrA12	int1-dfrA12-aadA2-cmlA1-aadA1 ^d
I	08-02880 (05)	Mensch	U302	< 30	AMP-STR-TET-SUL	bla _{TEM-1} -strA -tet (B)-sul2	ohne Integron
I	08-02883 (05)	Mensch	NT	< 30	AMP-GEN-STR-TET-SUL-TMP-SXT	bla TEM-1-aacC2 -[strA-aadA1]-tet (B)-[sul1-sul2]-dfrA1	1600/dfrA1-aadA1

 Tabelle 3.11: Virulenz-Resistenz-Plasmide und Resistenz-Determinanten in S. Typhimurium Isolaten.

^a Länderzeichen: DK, Dänemark; E, Spanien; I, Italien; UK, Großbritannien.

^b Virulenz-Resistenz-Plasmide sind dick unterlegt.

^c Die Breakpoints für die Bouillon-Mikrodilutionsmethode sind in Tabelle A3a im Anhang definiert.

^d Defektives Integron nach Antunes et al. (2007), mit 5'CS/3'CS Primern nicht detektierbar.

Land ^a	NRL-Salm Nr. (Isolationsjahr)	Herkunft	Phagentyp	Plasmid- größe (≈ kb) ^b	PFGE Profil	Virulenz-Genotyp
I	08-02878 (05)	Mensch	DT120	140 , 120, 40	XT12	spvC-rck-pefl-traT-traX-oriT-samA-parA-parB-ccdAB-srgA
I	08-02879 (05)	Mensch	DT120	140 , 40	XT12a	spvC-rck-pefl-traT-traX-oriT-samA-parA-parB-ccdAB-srgA
DK	08-02884 (05)	Mensch	DT12	140 , 60	XT12a	spvC-rck-pefA-pefB-pefD-pefI-traT-rsk-traX-oriT-samA-parA-parB-ccdAB-srgA
E	T31 (93)	Mensch	DT120	140 (pUO-StVR2)	XT12	spvC-rck-pefl-traT-traX-oriT-samA-parA-parB-ccdAB-srgA
UK	08-02869 (04)	Schwein	U288	135 , 50	XT13	spvC-rck-pefA-pefB-pefD-pefI-traT-rsk-traX-oriT-samA-parA-parB-ccdAB
UK	08-02870 (04)	Schwein	DT193	110	XT14	spvC-rck-pefl-traT-traX-oriT-samA-parA-parB-ccdAB
UK	08-02871 (04)	Schwein	DT193	150	XT15	spvC-rck-pefA-pefB-pefD-pefI-traT-rsk-traX-oriT-samA-parA-parB-ccdAB
UK	08-02872 (05)	Schwein	DT193	135 , 50	XT16	spvC-rck-pefA-pefB-pefD-pefI-traT-rsk-traX-oriT-samA-parA-parB-ccdAB
UK	08-02873 (05)	Schwein	U288	140 (pUK-StVR41), andere < 30	XT12	spvC-rck-pefA-pefB-pefD-pefI-traT-rsk-traX-oriT-samA-parA-parB-ccdAB
UK	08-02874 (05)	Schwein	NT	160 (pUK-StVR42)	XT12b	spvC-rck-pefA-pefB-pefD-pefI-traT-rsk-traX-oriT-samA-parA-parB-ccdAB
I.	08-02881 (05)	Mensch	RDNC	150 (pl-StVR49)	XT12c	spvC-rck-pefA-pefB-pefD-pefI-traT-traX-oriT-samA-parA-parB-ccdAB-srgA
UK	08-02875 (06)	Schwein	U288	120	XT17	spvC-rck-pefA-pefB-pefD-pefI-traT-rsk-traX
UK	08-02876 (06)	Schwein	U311	115 , andere < 30	XT18	spvC-rck-pefA-pefB-pefD-pefI-traT-rsk-traX-oriT-ccdAB-srgA
UK	08-02877 (06)	Schwein	NT	110, andere < 30	XT19	spvC-rck-pefA-pefB-pefD-pefI-traT-rsk-traX-ccdAB-srgA
I.	08-02880 (05)	Mensch	U302	< 30	nd	pefl-traX-ccdAB
<u> </u>	08-02883 (05)	Mensch	NT	< 30	nd	pefI-traX-ccdAB

Tabelle 3.12 Detektion von Virulenz-Resistenz-Plasmiden, Resistenz- und Virulenz-Determinanten in S. Typhimurium Isolaten.

^a Länderzeichen: DK, Dänemark; E, Spanien; I, Italien; UK, Großbritannien.

^b Virulenz-Resistenz-Plasmide sind dick unterlegt.

3.3.2.4 Charakterisierung *bla*_{TEM-1}-*dfrA12*-positiver Isolate

Alle 10 $bla_{\text{TEM-1}}$ -positiven Isolate mit *sul3*-assoziiertem Integron enthielten, neben verschiedenen kleinerern Plasmiden, ein IncFII-Plasmid ≥ 110 kb. Die genauen Plasmid-Größen wurden mittels S1-Nuklease-Verdau und anschließender PFGE bestimmt (Abbildung 3.11). Die IncFII-Plasmide hybridisierten alle mit Sonden für das Virulenzgen *spvC* und für die Integron-Genkassette *dfrA12*. In keinem dieser Isolate wurde pSLT detektiert. Neun Isolate stammten vom Schwein aus Großbritannien und gehörten unterschiedlichen Phagentypen an, während ein italienisches Isolat humaner Herkunft war. Zwei weitere Isolate wurden zwar auch positiv für *bla*_{TEM-1} getestet, enthielten aber nur Plasmide < 30 kb und wurden beide *spvC*-negativ getestet.

Unter den 10 Virulenz-Resistenz-Plasmid enthaltenen Isolaten wurden insgesamt drei verschiedene Resistenz-Phänotypen und entsprechende Genotypen beobachtet. Alle Stämme zeigten dabei den gemeinsamen Kern-Resistenz-Phäno-/Genotyp AMP-CHL-[STR-SPE]-SUL-TMP-SXT/*bla*_{TEM-1}-*cmlA1-[aadA1-aadA2]-sul3-dfrA12*. Zusätzlich wurden in einigen Isolaten Resistenzen für KAN und TET detektiert, übertragen durch die Gene *aphA1* bzw. *tet*(A). Insgesamt wurden in diesen 10 Isolaten fünf unterschiedliche Virulenzgenotypen identifiziert. Alle Stämme wurden jedoch positiv für folgende Gene getestet: *spvC*, *rck*, *pefI*, *traT* und *traX*. Das *pef* Operon war in allen Isolaten mit einer Ausnahme in intaktem Zustand. Die XbaI-PFGE-Analyse ergab für jedes Isolat ein anderes Profil. In drei Stämmen wurde das in den *bla*_{OXA-1}-InH-like positiven Isolaten vorkommende Muster X12 sowie die eng verwandten Profile X12b und X12c detektiert. Alle Ergebnisse sind in den Tabellen 3.11 und 3.12 zusammengefasst dargestellt.

3.3.2.5 Charakterisierung der Virulenz-Resistenz-Plasmide bei *bla*_{TEM-1}-*dfrA12*positiven Isolaten

Diese drei Stämme (08-02873, 08-02874 und 08-02881) mit gleichem bzw. ähnlichem XbaI-PFGE-Profil wie das der pUO-StVR2 enthaltenen Isolate wurden einer näheren Charakterisierung unterzogen.

Zunächst erfolgte die weitere Analyse der Plasmid-DNA durch Hybridisierungsexperimente mit Sonden für *aadA1-like*, *cmlA* und *strA*. Es zeigte sich, dass alle drei Resistenzgene auf den IncFII-Virulenz-Resistenz-Plasmiden lokalisiert waren. Diese Plasmide wurden als pUK- StVR41, pUK-StVR42 (<u>p</u>lasmid <u>U</u>nited <u>K</u>ingdom-<u>S</u>. <u>Typhimurium v</u>irulence and <u>r</u>esistance) und pI-StVR49 (<u>p</u>lasmid <u>I</u>taly-<u>S</u>. <u>Typhimurium v</u>irulence and <u>r</u>esistance) (Tabellen 3.11 und 3.12) bezeichnet.

Die folgenden Untersuchungen konzentrierten sich ausschließlich auf das ca. 160 kb große Plasmid pUK-StVR42. Zur Analyse des Transferpotentials von pUK-StVR42 wurden verschiedene Konjugationsexperimente angesetzt. Die Selektion der Transkonjuganten erfolgte auf EMB-Platten, die Natriumazid (100 μ g/ml) und AMP (100 μ g/ml) bzw. CHL (30 μ g/ml) enthielten. Das Plasmid war bei keiner der durchgeführten Methoden, weder in flüssigem LB-Medium noch auf festem LB-oder M9-Medium, konjugativ.



Abbildung 3.11: Plasmidgrößenbestimmung durch S1-Nuklease-Verdau bei $bla_{\text{TEM-1}}$ -dfrA12-positiven Isolaten.

M1, Lambda Ladder PFG Marker (New England Biolabs); M2, *S*. Braenderup H9812 (PulseNet Standard). Die blauen Rechtecke zeigen die Hybridisierungsorte der Sonden für *dfrA12* und *spvC* an.



Abbildung 3.12: XbaI-PFGE-Profile (X) repräsentativer Isolate.

Bei der Definition der Profile wurden nur Banden >33 kb ausgewertet. Ähnliche Profile mit nur einer Bande Unterschied wurden mit Kleinbuchstaben versehen. Profile mit Unterschieden in zwei oder mehr Banden wurden mit Nummern bezeichnet. Die Gelspur M enthielt XbaI-verdaute DNA des Stamms *S*. Braenderup H9812 und wurde als Größenstandard verwendet. T, *S*. Typhimurium; A, Profil von LT2; B, Profil des *S*. Typhimurium DT104 Isolats 07-00531.

3.3.2.6 Aus dieser Studie hervorgegangene Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden in folgender Publikation verwendet:

Rodicio, M. R., A. Herrero, I. Rodríguez, P. García, I. Montero, **J. Beutlich**, R. Rodicio, B. Guerra and M. C. Mendoza. 2011. Acquisition of antimicrobial resistance determinants by virulence plasmids specific of non-typhoid serovars of *Salmonella enterica*. Rev. Med. Microbiol. **22**:55-65.

Vortrag

Beutlich, J., M. R. Rodicio, M. C. Mendoza, M. Kirchner, I. Luzzi, D. Mevius, E. J. Threlfall, R. Helmuth, and B. Guerra on behalf of the WP21 Working Group. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium isolates collected within the European Project Med-Vet-Net (Work Package 21) carry Virulence-Resistance plasmids derived from pSLT90. International Symposium *Salmonella* and Salmonellosis, I3S, Saint Malo, Frankreich, 27-30 Juni 2010.

Kongressposter

Beutlich, J, M. R. Rodicio, M. C. Mendoza, M. Kirchner, D. Mevius, J. Threlfall, R. Helmuth, and B. Guerra on behalf of the WP21 Project Group. Virulence-Resistance plasmids found in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium isolates collected within the European Project Med-Vet-Net (WP21). 3rd ASM Conference on *Salmonella*: Biology, Pathogenesis & Prevention, Aix-en-Provence, Frankreich, Oktober 2009.

DISKUSSION

4.1 Multiresistenz in Deutschland

4.1.1 Multiresistente S. Saintpaul Isolate in deutschen Truthühnern und den daraus gewonnenen Lebensmitteln

4.1.1.1 Epidemiologische Bedeutung

Im Laufe der letzten Jahre hat S. Saintpaul immer mehr an epidemiologischer Bedeutung erlangt. Im Jahr 2006 gehörte dieses Serovar sogar zu den Top-5 Serovaren humaner Salmonellosen in Europa (http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/ 0611_SUR_Enter-net_Quarterly_Salmonella_Report_06_3.pdf). Diese Entwicklung konnte nicht nur in den europäischen Ländern, sondern weltweit beobachtet werden. In den Fokus der öffentlichen Aufmerksamkeit rückten in der Vergangenheit insbesondere zwei nationale S. Saintpaul Ausbrüche. Der erste Ausbruch fand 2006 in Australien assoziiert mit dem Konsum von Cantaloupe-Melonen statt (Munnoch et al., 2009). Der zweite betraf im Sommer 2008 mehr als 1500 Personen in verschiedenen Staaten der USA und wurde mit dem Verzehr von Jalapeño-Chilischoten und Tomaten in Verbindung gebracht (Centers for Disease Control and Prevention, 2008a). Der neuste Ausbruch mit S. Saintpaul wurde im Februar 2009 in den USA assoziiert mit Alfalfa-Sprossen erfasst (Centers for Disease Control and Prevention, 2009). In Deutschland wurde 1993 ein wichtiger bundesweiter Ausbruch aufgrund von kontaminierten Paprika verzeichnet (Lehmacher et al., 1995). Die Isolate dieses Ausbruchs zeigten eine hohe Ähnlichkeit mit zur gleichen Zeit aus Truthühnern isolierten Stämmen, die im Verdacht standen, Ursache sporadischer Humaninfektionen gewesen zu sein (Beyer et al., 1998). Die meisten bis dato gemeldeten Ausbrüche, in die S. Saintpaul Isolate impliziert waren, wurden entweder dem Konsum von Gemüsesorten (wie z.B. Paprika, Tomaten, Alfalfa) (Centers for Disease Control and Prevention, 2008a; Centers for Disease Control and Prevention, 2009; Lehmacher et al., 1995) oder dem Verzehr von Truthühner-Produkten (wie z.B. Fertig-Fleischprodukten) (Helmuth et al., 1984; Khaitsa et al., 2007) zugeschrieben. Dies weist darauf hin, dass beide Arten von Lebensmitteln eine wichtige Rolle als Infektionsvehikel spielen. Während bei Gemüse-assoziierten Ausbrüchen eher sensible Stämme involviert waren, wiesen die Isolate aus Truthühner-assoziierten Ausbrüchen eher Multiresistenzen auf. Die EFSA berichtet von der Grundlagenerhebung über die Prävalenz von Salmonella in Truthühnerherden zwischen 2006 und 2007, dass S. Saintpaul eines der am häufigsten auftretenden Serovare (in 10,4 % der untersuchten Isolate) in positiven Herden von Mast-Truthühnern in Europa war, und sogar das Serovar mit der höchsten Prävalenz in Polen, der Slowakei und den Niederlanden (European Food Safety Authority, 2008). In Deutschland wurden 98 Herden Zucht- und 295 Herden Mast-Truthühner untersucht und daraus insgesamt 111 *Salmonella* Stämme isoliert. Von diesen Isolaten handelte es sich bei 19 (17 %) Stämmen um *S*. Saintpaul. Dieses Serovar stand damit an Platz drei der Liste der häufigsten Serovare (Bundesinstitut für Risikobewertung, 2008). Alle im Rahmen der Prävalenzstudie gesammelten *S*. Saintpaul Isolate zeigten Resistenzen gegen mindestens fünf antimikrobielle Substanzen.

4.1.1.2 Das Problem der antimikrobiellen Multiresistenz

Von den insgesamt 52.318 im NRL-Salm zwischen 1998 bis September 2009 typisierten *Salmonella* Isolaten waren 799 *S.* Saintpaul Isolate. Davon stammten 533 (67 %) Isolate entweder direkt von Truthühnern oder von Truthühner-Produkten. Mehr als 90 % dieser Isolate waren resistent gegen 2 bis 12 antimikrobielle Substanzen. Ähnliche Ergebnisse wurden ebenfalls von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (Molla *et al.*, 2007; Nde und Logue, 2008). Eine mögliche Erklärung für dieses verstärkte Auftreten von multiresistenten *Salmonella* Isolaten in Truthühnern könnten die unterschiedlichen Produktionsverfahren in der Geflügelmast sein. Während nach Angaben des Kuratoriums für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft beispielsweise in der Hähnchenmast das Schlachtalter der Tiere zwischen 32 und 60 Tagen liegt, bleiben Truthühner oft zwischen 105 und 154 Tagen eingestallt (http://www.ktbl.de/index.php?id=94&no_cache=1).

In den 533 von Truthühnern stammenden *S.* Saintpaul Isolaten traten laut Datenbank des NRL-Salm Resistenzen gegen folgende Antibiotika am häufigsten auf: Ampicillin (85 % der Isolate), Sulfamethoxazol (82 %), Nalidixinsäure (79 %) und Streptomycin (75 %). Gegen Gentamicin und Kanamycin waren jeweils 34 % und 25 % der Isolate resistent, während jeweils weitere 44 % und 49 % einen intermediären Resistenzphänotyp zeigten. Die Stammauswahl für diese Studie wurde mit der Absicht getroffen, für einen definierten Zeitrahmen eine Sammlung repräsentativer Isolate aus aktivem und passivem Monitoring anzulegen und diese mit Humanstämmen und anderen europäischen Isolaten zu vergleichen.

Wie in dieser und auch in anderen Arbeiten gezeigt werden konnte (Miko *et al.*, 2005), stehen einige der bei *S*. Saintpaul beobachteten Resistenzarten in Beziehung zum Auftreten von Klasse 1 Integrons (siehe Tabelle 3.3 im Ergebnisteil). Die Präsenz von Integrons bewirkt

eine verstärkte Co-Selektion von verschiedenen Resistenztypen. Zudem werden die Verbreitung von Resistenzgenen und ihr Austausch zwischen Plasmiden und bakteriellem Chromosom durch die Integration in transponierbare Elemente unterstützt (Partridge *et al.*, 2001). Diese Verbindung von hoch effizienten Generfassungs- und Expressionssystemen zusammen mit der Eigenschaft der vertikalen und horizontalen Übertragung von Resistenzgenen führt dazu, dass die Bakterien den schädigenden Wirkungen von Antibiotika trotzen können (Carattoli, 2001).

Bei den in dieser Studie analysierten Organismen war der Prozentsatz Nalidixinsäureresistenter Isolate mit 82 % sowohl in Kot- als auch in Lebensmittelproben im Vergleich zu anderen Geflügelstudien (Antunes et al., 2003; Carramiñana et al., 2004; Logue et al., 2003; Malorny et al., 2003) sehr hoch. Von diesen Isolaten zeigten 29 % gegenüber Ciprofloxacin intermediäre Resistenz (MHK: 2 µg/ml). Verminderte Sensibilität wurde in 46 % der Isolate mit einer MHK von 1 µg/ml und in 7 % der Isolate mit MHK-Werten von 0,5 bis 0,25 µg/ml detektiert. Unter Anwendung der harmonisierten Cut-Off Werte des "European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing" (EUCAST) (www.eucast.org), wie in den EU-Vorschriften für Antibiotikaresistenz-Monitoring vorgeschrieben (Bronzwaer et al., 2008), werden diese Isolate nun sogar als resistent betrachtet (epidemiologischer Cut-Off bei 0,06 µg/ml). Diese Ergebnisse geben Anlass zur Besorgnis, da der Einsatz von Fluorochinolonen von entscheidender Bedeutung in Human- und Veterinärmedizin ist (Anonym, 2007). Wie bei Malorny et al. (2003) beschrieben, wurden Nalidixinsäure-resistente Stämme häufiger aus Truthühnern als aus anderem Geflügel isoliert. Obwohl in anderen Arbeiten qnr Gene in S. Saintpaul identifiziert wurden (Cavaco et al., 2009; García-Fernández et al., 2009; Veldman et al., 2011; B. Guerra, unveröffentlichte Daten), konnten in den 55 Isolaten analysierten dieser Studie keine qnrA, qnrB, qnrS, qnrC oder qnrD Gene nachgewiesen werden. Allerdings besaßen diese Isolate Mutationen in der QRDR des gyrA Gens. Außerdem wird vermutet, dass diese Stämme verstärkt aktive Effluxmechanismen exprimierten, die an der Resistenz gegenüber Cyclohexan und der verminderten Sensibilität gegenüber Triclosan und Fluorochinolonen maßgeblich beteiligt waren (Liebana et al., 2002; Webber et al., 2008; White et al., 1997).

Ein gemeinsames Kern-Resistenzprofil [AMP/AMC(i/r)-GEN(i/r)-KAN(i/r)-NAL-CIP(i/vs)-STR/SPE-SUL] wurde bevorzugt in Isolaten aus Kot-Proben gefunden. Dieses Muster trat in Assoziation mit intermediärer Resistenz oder verminderter Sensibilität gegenüber Ciprofloxacin, Resistenz gegenüber Cephalosporinen der ersten Generation, Resistenz oder intermediärer Resistenz gegenüber Cephalosporinen der zweiten Generation und intermediärer Resistenz oder verminderter Sensibilität gegenüber einiger Cephalosporine der dritten Generation auf. Auch dieser Befund ist aus Perspektive des öffentlichen Gesundheitswesens besorgniserregend, da diese antimikrobiellen Substanzen gemeinsam mit den Fluorochinolonen die Mittel der Wahl bei der klinischen Behandlung systemischer *Salmonella* Infektionen sind (Anonym, 2007; Helmuth und Hensel, 2004). Das Screening nach Resistenz-vermittelnden β-Laktam Genen, wie *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, und *bla*_{OXA-1}-like fiel negativ aus. Nur das sich auf dem Chromosom befindende *bla*_{TEM-1} Gen konnte nachgewiesen werden. Aus diesem Grund nehmen wir an, dass die negativen Isolate andere in dieser Arbeit nicht untersuchte molekulare Mechanismen (z. B. Verlust von Porinen, nicht-detektierte Gene oder Multiwirkstoff-Resistenz-Pumpen) (Schwarz und Chaslus-Dancla, 2001) besitzen, die für die Ausbildung der β-Lactam Resistenzen verantwortlich sind. Zur Beantwortung dieser Fragestellung besteht demnach weiterhin Forschungsbedarf.

4.1.1.3 Identifizierung und Charakterisierung einer klonalen Linie

Anhand der PFGE-Analyse konnte gezeigt werden, dass 15 der 16 Isolate der Grundlagenerhebung (Gruppe 1), die in fünf Betrieben aus insgesamt zwei Bundesländern isoliert wurden, derselben klonalen Linie angehörten. Die genetische Ähnlichkeit der XbaI-Profile dieser Isolate betrug 93 %. Außerdem besaßen alle das oben beschriebene phänotypische Kern-Resistenzmuster sowie dasselbe genotypische Kern-Resistenzprofil (*bla*_{TEM-1}, *aadB*, *aadA2*, *sul1*, und die Ser83 \rightarrow Glu83 Mutation im *gyrA* Gen), einschließlich eines Gentamicin-, Kanamycin-, Streptomycin/Spectinomycin- und Sulfamethoxazol-Resistenz übertragenden Klasse 1 Integrons.

Insgesamt war die Verteilung von Plasmiden in *S.* Saintpaul sehr unterschiedlich. Die Mehrzahl der zur klonalen Linie gehörigen Isolate besaßen entweder nur kleine oder gar keine Plasmide. Die Hybridisierungs-Experimente zeigten, dass das *aadB* Gen tragende Klasse 1 Integron auf dem Chromosom lokalisiert war. Dieses Integron wurde ebenfalls in neun weiteren in dieser Studie eingeschlossenen Isolaten gefunden, die jedoch keiner gemeinsamen klonalen Linie angehörten. Es wurde zwar bereits in früheren Studien beschrieben (Miko *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2005), in denen das *aadB* Gen aber bisher bei *Salmonella* ausschließlich auf Plasmiden identifiziert wurde, während eine chromosomale Position bis dato noch keine Erwähnung fand. In einigen der Geflügel- und Truthühner-Zuchtbetrieben, in denen die *S.* Saintpaul Stämme isoliert worden waren, kamen Antibiotika wie Penicillin und Enrofloxacin zum Einsatz (unveröffentlichte Daten). Infolgedessen könnte die Präsenz chromosomal

kodierter Resistenz-Determinanten, wie z. B. von Genen und Mutationen, diesen *S*. Saintpaul Isolaten einen selektiven Vorteil gegen den antimikrobiellen Selektionsdruck in diesen Betrieben verschaffen und die Resistenzen auf diese Weise langfristig persistent bleiben.

Derivate dieser multiresistenten *S*. Saintpaul Stämme wurden in ganz Deutschland gefunden. Und das nicht nur in den im Rahmen der Grundlagenerhebung zwischen 2006 und 2007 untersuchten Isolate, sondern auch in den Isolaten aus Truthühner-Kotproben aus Routineeinsendungen (2002/2003, 2005/2006). Außerdem wurden Stämme dieser klonalen Linie ebenfalls in Nachbarländern, wie den Niederlanden, aus Geflügel isoliert. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Linie weit verbreitet auftritt. Da die klonale Linie auch in deutschen Lebensmittelprodukten nachgewiesen wurde, ist eine Übertragung auf den Menschen nicht auszuschließen. Die Analyse von Humanisolaten, die vom RKI (Wernigerode, Deutschland) zur Verfügung gestellt wurden, bestätigte diese Hypothese.

4.1.1.4 Abschließende Betrachtungen und Ausblick

Diese Studie, in der eine multiresistente klonale Linie in *S*. Saintpaul Isolaten aviärer Herkunft in Deutschland und den Niederlanden identifiziert wurde, die ebenfalls in Humanproben nachgewiesen werden konnte, ist ein Beispiel von vertikaler Verbreitung der Resistenz. Das Prinzip der klonalen Verbreitung wird sowohl bei humanen als auch tierischen *Salmonella*-Infektionen als bedenklich eingestuft. Die Ausbreitungsmechanismen von multiresistenten *Salmonella*-Klonen sind bisher noch weitgehend unbekannt (Davis *et al.*, 2002). Die Ergebnisse dieser Studie geben insgesamt einen Überblick über die Eigenschaften von aus Truthühnern stammenden multiresistenten *S*. Saintpaul Isolaten, deren Verbreitung und molekulare Entwicklung zum Schutz der öffentlichen Gesundheit weitergehend untersucht werden sollten.

4.2 Multiresistenz in Europa: Studien an europäischen *Salmonella enterica* Isolaten im Rahmen des Exzellenznetzwerks MedVetNet

4.2.1 Antimikrobielle Resistenz und Virulenz-Determinanten in europäischen Salmonella Genomic Island 1 (SGI1) positiven Salmonella enterica Isolaten unterschiedlicher Herkunft

4.2.1.1 Serovarspezifität versus Variabilität

Die Akquisition von genomischen Inseln spielt als ein Mechanismus von Diversifikation und Adaption eine zentrale Rolle in der bakteriellen Evolution (Boyd *et al.*, 2009). Seit dem Aufkommen des pandemisch auftretenden multiresistenten *S.* Typhimurium DT104, richtete sich das Interesse der Forschung zunehmend auf dessen antibiotikaresistenz-übertragende genomische Insel SGI1. Insbesondere das horizontale Transferpotential von SGI1 ist intensiv untersucht worden (Boyd *et al.*, 2001; Doublet *et al.*, 2005). Diese Studie beschäftigte sich mit der Analyse der molekularen Eigenschaften von SGI1-tragenden epidemischen *Salmonella* Isolaten in einer europäischen Stammsammlung aus Human-, Tier- und Lebensmittelproben. Sie konzentrierte sich besonders auf Isolate, die zu anderen Serovaren als S. Typhimurium oder zu anderen Phagentypen als DT104 gehörten.

Die Typisierungsergebnisse zeigten eine breite Variabilität innerhalb der Serie, bestehend aus 38 Isolaten sieben verschiedener Serovare. Die PFGE-Analyse erfasste insgesamt 26 unterschiedliche XbaI-Profile und differenzierte dabei in gleichen Serovaren mehrere verschiedene Muster. Auch die MLVA-Untersuchung der *S*. Typhimurium Isolate fiel mit 21 verschiedenen Typen in insgesamt 23 Isolaten sehr heterogen aus. Diese Ergebnisse decken sich mit der Annahme, dass die Stämme unterschiedlichster geographischer Herkunft und Isolationsquelle in keinerlei epidemiologischer Beziehung zueinander stehen.

Die Charakterisierung der phäno- und genotypischen antimikrobiellen Resistenz dagegen zeigte im Allgemeinen bestimmte serovar-spezifische Charakteristika. Neben den in SGI1 organisierten Resistenzgenen, exprimierten viele Isolate zusätzliche entweder chromosomal oder plasmid-kodierte Resistenzgene. Insgesamt wurden aufgrund der jeweiligen Resistenzgenotypen und der Präsenz von Klasse 1 Integrons acht verschiedene mögliche SGI1 Varianten in dieser Stammsammlung identifiziert. Die Mehrzahl der Stämme (61 %, 23 Isolate), die zu den Serovaren Agona (1), Paratyphi B dT+ (1) und Typhimurium (21) gehörten, enthielten die klassischen SGI1 Resistenzgene (Abbildung 4.1) (Amar *et al.*, 2008; Mulvey *et al.*, 2006). Isolate mit einem Gen-Repertoire typisch für die Varianten SGI1-A und SGI1-C (Abbildung 4.1) wurden nur innerhalb von *S*. Derby gefunden (Akiba *et al.*, 2006). Das Resistenzgen-Repertoire der drei *S*. Albany Isolate ließ die Präsenz von SGI1-F vermuten (Abbildung 4.1) (Doublet *et al.*, 2003). In den vier *S*. Newport Stämmen wurde die Variante SGI1-L und in *S*. Kentucky die Variante SGI1-K detektiert (Cloeckaert *et al.*, 2006; Doublet *et al.*, 2008b).

Die Virulotyping-Ergebnisse der SGI1-positiven Isolate zeigten, dass nur wenig oder gar keine Variation bei den meisten in SPIs organisierten Genen sowie dem Fimbrien-Marker detektiert wurde. Demzufolge wurden die Gene ssaQ, mgtC, spi4_D, sopB und bcfC durchgehend durch alle Serovare in allen 38 Isolaten identifiziert. Es wurde beobachtet, dass einige Virulenz-Genotypen serovarspezifisch auftraten. Alle S. Newport und die meisten der S. Typhimurium Isolate hatten jeweils denselben Virulotyp gemeinsam, der sich in beiden Fällen aus acht verschiedenen Genen zusammensetzte. Dieser Zusammenhang zwischen einem bestimmten Serovar mit einem Virulenz-assoziierten Gen-Panel konnte bereits in einer von Hühn et al. (2010) innerhalb des Med-Vet-Net Projekts durchgeführten Microarray-Studie bestätigt werden, deren Gegenstand eine umfangreiche Sammlung europäischer Salmonella Isolate (77 Isolate; 10 davon SGI1-positiv) unterschiedlicher Serovare war. In zwei Arbeiten von Bamforth et al. (2009) und Giraud et al. (2009) konnte nachgewiesen werden, dass in SGI1 kodierte Gene Anteil an den Virulenzeigenschaften der Carrier-Isolate haben. Die Daten dieser Dissertation sowie von Hühn et al. (2010) zeigen, dass trotz geringfügiger Unterschiede SGI1-positive Isolate ein mehr oder weniger identisches Virulenzgen-Repertoire aufweisen.

4.2.1.2 Identifizierung von *aadB*-assoziierten SGI1-Varianten

Im S. Typhimurium Isolat 08-02886 wurde das Resistenzgen-Cluster bla_{PSE-1} -floR-sulltet(G)-aadB beobachtet. Das aadB Gen, das Resistenz gegenüber Gentamicin und intermediäre Resistenz gegenüber Kanamycin vermittelt, wurde in der 800 bp variablen Region eines Klasse 1 Integrons detektiert. Es ersetzte das Gen aadA2, welches normalerweise Teil des SGI1-typischen Integrons InD ist und Resistenzen für Streptomycin und Spectinomycin kodiert (Boyd *et al.*, 2001). Diese Anordnung lässt die Präsenz der Variante SGI1-M vermuten, die zuerst von Vo *et al.* (2007) in einem niederländischen *S.* Typhimurium DT104 Pferde-Isolat beschrieben wurde (Abbildung 4.1). Es scheint jedoch das erste Mal zu sein, dass die SGI1-M Variante in einem deutschen vom Nagetier stammenden *S.* Typhimurium DT120 Isolat identifiziert wurde. Die gleiche Variante wurde ebenfalls von Rodríguez *et al.* (2009) in deutschen *S.* Typhimurium Isolaten (Phagentypen DT104L und DT012) aus Pferd, Katze und Geflügel detektiert, die in Assoziation zum Auftreten des ESBL-kodierenden Gens $bla_{CTX-M-1}$ standen.

Ein weiteres Integron mit einer variablen Region von 800 bp, das ebenfalls eine *aadB* Genkassette trug, wurde in einem anderen *S*. Typhimurium Isolat 08-02885 gefunden. Dieses Isolat enthielt zusätzlich ein 3'-CS defektives Integron mit einer *aadA2* Genkassette. Es wird vermutet, dass dieses Isolat möglicherweise eine neue Variante, ähnlich SGI1-C (Mulvey *et al.*, 2006) mit einer zusätzlich erworbenen Gentamicin-Resistenz, enthalten könnte. Diese Annahme bedarf jedoch weiterer eingehender Untersuchungen.

SGI1 ist geschichtlich eng mit *S*. Typhimurium verbunden. In dieser Studie wurde gezeigt, dass trotz der klonalen Diversität der *S*. Typhimurium Isolate (bestätigt mittels PFGE- und MLVA-Analysen), in der genomischen Insel selbst nur eine geringe genetische Variation vorliegt. Dies wird deutlich, da von 23 Isolaten insgesamt 21 die klassische SGI1 enthalten und nur in zwei Isolaten jeweils eine SGI1-M Variante und eine mögliche neue Variante detektiert wurden.



Abbildung 4.1: SGI1-Varianten in Korrespondenz zu dem in den Isolaten detektierten Gen-Repertoire. S. Agona, S. Paratyphi B dT+: SGI1; S. Typhimurium: SGI1, SGI1-M; S. Derby: SGI1-A, SGI1-C; S. Albany: SGI1-F; S. Newport: SGI1-L; S. Kentucky: SGI1-K1.

Adaptiert von Amar *et al.* (2008), Boyd *et al.* (2002), Cloeckaert *et al.* (2006), Doublet *et al.* (2008b), und Vo *et al.* (2007). Es werden ausschließlich die antimikrobiellen Resistenzgene gezeigt.

* Nicht in allen Isolaten vorhanden.

Die Abbildung wurde in Applied and Environmental Microbiology publiziert (Beutlich et al., 2011).

4.2.1.3 Kartierung "unkonventioneller" Isolate

Die PCR-basierte Kartierung der "unkonventionellen" Isolate zeigte weder in den SGI1-Integrations-Sites noch in den flankierenden Regionen Abberationen. Obwohl die Präsenz von SGI1 mittels Real-Time-PCR anhand des Markers S004 in der von Amar *et al.* (2008) durchgeführten Vorgängerstudie nachgewiesen wurde, konnten in fünf Isolaten die linke und rechte "Junction" (1 *S.* Agona und 3 *S.* Derby) bzw. nur die rechte "Junction" (1 *S.* Typhimurium) mittels klassischer PCR nicht detektiert werden. Dass bei dem *S.* Typhimurium Isolat ausschließlich die linke "Junction" identifizierbar war, lässt genetische Umstrukturierungen, wie z. B. Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP, engl. Single Nucleotide Polymorphism), an den Enden der SGI1-Sequenz vermuten. Bei S. Derby und S. Agona wurde die These der Integration von SGI1 in eine sekundäre chromosomale Attachment-Site zwischen den Genen *sodB* und *purR*, wie von Doublet *et al.* (2008a) vorgeschlagen, widerlegt. Die Aufklärung der genauen genetischen Organisation der SGI1-Region dieser Isolate erfordert weiterführende Kartierungs- und Sequenzierungs-Experimente.

4.2.1.4 Abschließende Betrachtungen und Ausblick

Insgesamt ermöglichte diese Studie die Zusammenstellung einer Stammsammlung mit Isolaten unterschiedlicher Herkunft, die weiteren molekularen Studien als Referenzmaterial dienen kann. Innerhalb der SGI1-positiven Isolate wurde eine erhebliche phänotypische und genetische Variabilität beobachtet. Neben den SGI1 charakteristischen Resistenzgenen (*bla*_{PSE-1}, *floR*, *sul1*, *tet*(G), *aadA2*) wurden auch andere chromosomal- oder plasmid-kodierte Resistenz-Determinanten detektiert. Wie andere Autoren gezeigt haben (Boyd *et al.*, 2002; Boyd *et al.*, 2009; Cloeckaert *et al.*, 2006; Doublet *et al.*, 2003; Doublet *et al.*, 2004; Doublet *et al.*, 2005; Doublet *et al.*, 2008a; Doublet *et al.*, 2008b; Mulvey *et al.*, 2006; Vo *et al.*, 2007) resultierte das Auftreten verschiedener genetischer Events in einer Vielzahl an SGI1-Varianten, die sowohl über vertikalen als auch horizontalen Transfer übertragen werden können (Mulvey *et al.*, 2006; Hall, 2010). Aufgrund ihres Virulenzgen-Repertoires und ihren Resistenzeigenschaften könnten einige dieser Varianten bzw. Isolate von klinischer Relevanz sein. Die Ergebnisse dieser Studie bieten eine solide Grundlage für zukünftige Kooperationen auf dem Gebiet der Resistenz- und Virulenz-Forschung und leisten einen Beitrag zu einer wissenschaftlich-basierten Risiko-Charakterisierung.

4.2.2 Identifizierung und Charakterisierung von multiresistenten europäischen S. Newport Isolaten (SGI1-positiv und –negativ) unterschiedlicher Herkunft

4.2.2.1 Epidemiologische Bedeutung

S. Newport wird beständig im nordamerikanischen, europäischen und lateinamerikanischen Raum unter den Top-6 Serovaren gemeldet. Der Gesamtanteil dieses Serovars stieg von 2001 von 3 % bis auf 5 % in 2005, aber verzeichnete in 2007 wieder eine Abnahme um 1,2 % (Hendriksen et al., 2011). In Deutschland standen nach Angaben des Robert Koch-Instituts (Berlin, Deutschland) zwischen 2005 und 2010 insgesamt 772 humane Salmonellose Fälle in Zusammenhang mit S. Newport (Gesamtprävalenz: 0,3 % von allen Fällen insgesamt; Maximale Prävalenz in 2006 mit 0,06 %; Minimale Prävalenz in 2010 mit 0,03 %) (www3.rki.de/SurvStat). Im NRL-Salm wurden zwischen 1998 und März 2011 insgesamt 501 S. Newport Isolate typisiert, von denen 229 Isolate (45,7 %) resistent gegen mindestens eine antimikrobielle Substanz getestet wurden. Die eingesendeten Proben wurden zwar aus den unterschiedlichsten Matrizes isoliert, aber der größte Teil stammte aus Geflügel (132 Isolate; 26,3 %), hauptsächlich aus Truthühnern bzw. Truthühnerfleisch (107 Isolate; 21,4 %). Von diesen Truthühner-Isolaten wiesen insgesamt 77,6 % (83 Isolate) Multiresistenzen gegen mindestens zwei Antibiotikaklassen auf. Die für diese Studie auf der Basis des Selektionskriteriums "Multiresistenz" zusammengestellte europäische S. Newport Sammlung spiegelt dieses Verhältnis recht gut wieder. Insgesamt 16 der 51 Isolate (31,4 %) stammten hier von Truthühnern, von denen 15 (93,8 %) multiresistent waren.

Durch *S.* Newport verursachte Krankheitsausbrüche sowohl bei Tieren als auch bei Menschen wurden in den vergangen 30 Jahren in der Literatur immer wieder beschrieben (Horwitz *et al.*, 1977; Anand *et al.*, 1980; Wegener *et al.*, 1997; Heinitz *et al.*, 2000). Auch das Problem von Multiresistenzen in *S.* Newport Stämmen ist bereits seit vielen Jahren bekannt (Rankin *et al.*, 2002; Poppe *et al.*, 2006; Cobbold *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2010). Eine hohe Prävalenz multiresistenter Isolate in Truthühnerherden wurde ebenfalls beobachtet (Papadopoulou *et al.*; 2009).

Basierend auf den Ergebnissen von <u>Multilocus-Enzym-Elektrophorese</u> (MLEE) (Beltran *et al.*, 1988) und verschiedenen MLST-Studien (Harbottle *et al.*, 2006; Sukhnanand *et al.*, 2005; Torpdahl *et al.*, 2005) wird *S.* Newport als polyphyletisch eingestuft. Sangal *et al.* (2010)

beschrieben auf Basis von MLST-Daten einer großen Sammlung europäischer und nordamerikanischer *S.* Newport Isolate die Aufteilung dieses Serovars in die drei Abstammungslinien Newport-I, Newport-II und Newport-III. Die Autoren vermuten, dass diese drei Gruppen von einer gemeinsamen Linie abstammen, die sich im Laufe der Zeit in verschiedene Linien unterteilt hat (Sangal *et al.*, 2010).

4.2.2.2 SGI-Varianten

Zielstellung dieser Studie war die Charakterisierung einer europäischen S. Newport Stammsammlung und die Untersuchung dieser Isolate auf die Präsenz der Multiresistenzvermittelnden genomischen Insel SGI1 bzw. ihrer Varianten. Basierend auf der PCR-Analyse von rechter und linker Junction wurden 17 der insgesamt 51 Isolate positiv getestet. Die Charakterisierung der phäno- und genotypischen antimikrobiellen Resistenz zeigte innerhalb dieser Stammsammlung sehr heterogene Charakteristika. Insgesamt wurden aufgrund der jeweiligen Resistenzgenotypen und der Präsenz von Klasse 1 Integrons verschiedene SGI1 Varianten in dieser Stammsammlung identifiziert. Isolate mit einem Gen-Repertoire, typisch für die Variante SGI1-L (bla_{PSE-1}-floR-sul1-tet(G)-dfrA15) wurden in fünf der Isolate detektiert (Cloeckaert et al., 2006). Die Integrons InC 1200 bp/bla_{PSE-1} und 750 bp/dfrA15 konnten in allen diesen Isolaten nachgewiesen werden, während das von Cloeckaert et al. (2006) beschriebene 1600 bp/aac(3)-Ie-aadA7 Integron in nur einem der SGI1-L-typischen Isolate vorkam. Es wurde beobachtet, dass in 8 der 17 SGI1-positiven Isolate anstatt bla_{PSE-1} das normalerweise plasmid-kodierte β-Laktamase-Gen bla_{TEM-1} amplifiziert wurde. Dieses Gen wurde bisher in Kombination mit SGI1 ausschließlich in S. Kentucky in den Varianten SGI1-K1 bis -K5 sowie SGI1-P1 und -P2 beschrieben (Doublet et al., 2008b).

Die Typisierungsergebnisse zeigten insgesamt eine breite Variabilität innerhalb des Serovars. Nach der PFGE-Analyse wurden 39 verschiedene Profile unterschieden. Anhand dieser Profile konnten weder Rückschlüsse auf die Präsenz von SGI1 getroffen werden noch war, mit Ausnahme der Muster XN18 und XN33/XN33a, eine Zuordnung zu geographischen Regionen oder bestimmten Isolationsquellen möglich. Repräsentativ für jedes PFGE-Profil wurden insgesamt 39 Isolate einer MLST-Typisierung unterzogen. Wie bereits von Sangal *et al.* (2010) vermutet, konnten hier alle SGI1-positiven Isolate dieser Studie der Gruppe Newport-I zugeordnet werden. Abweichend der Ergebnisse von Sangal *et al.* (2010) war diese Gruppe jedoch nicht vorrangig human-assoziiert, sondern wurde zu 54 % (13 von 24 Isolaten) in Geflügel detektiert. Obwohl hier nur eine kleine Sammlung von Isolaten untersucht wurde, wäre Geflügel als mögliches Newport-I Primärreservoir in Europa denkbar. Anders als bei Sangal *et al.* (2010) konnten die sensiblen Isolate, nicht vorrangig Newport-III zugeordnet werden, sondern verteilten sich über alle drei Gruppen.

4.2.2.3 Abschließende Betrachtungen und Ausblick

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal eine Sammlung europäischer S. Newport Isolate auf die Präsenz der chromosomalen Insel SGI1 untersucht. Die generierten Ergebnisse zeigen, dass das Serovar Newport eine hohe phänotypische und genetische Variablität besitzt, was die Präsenz eventuell neuer SGI1 Varianten vermuten lässt. Ähnlich wie bei S. Kentucky wäre es hier aufgrund unterschiedlicher Positionen der flankierenden IS-Elemente, Inversionen und partiellen Deletionen denkbar, dass neue MDR-Regionen entstanden sind. Die MDR-Region in diesem Serovar scheint demnach verschiedenen Rekombinations- und Insertionsevents bei Transposons oder Insertionssequenzen ausgesetzt zu sein, die in einer größeren Diversität von MDR-Genclustern und infolgedessen einer größeren Diversität von MDR-Phänotypen resultieren (Doublet et al., 2008b). Da bei einigen Isolaten nur eine der beiden "Junctions" detektiert wurde, besteht der Verdacht, dass hier genetische Neuordnungen, wie z. B. SNPs, an den Enden der SGI1-Sequenz stattgefunden haben. Insgesamt zeigte diese Studie, dass S. Newport anscheinend ein interessantes Reservoir neuer SGI1-Varianten zu sein scheint. Es wäre daher wünschenswert auf Basis dieser ersten Charakterisierung, insbesondere die Sequenzen dieser Isolate in weiteren Studien zu analysieren, um diesen Verdacht bestätigen zu können.

4.3 Multiresistenz-assoziierte Plasmide: Studien an europäischen *Salmonella enterica* Isolaten im Rahmen des Exzellenznetzwerks MedVetNet

4.3.1 Analyse eines PMQR übertragenden *qnrB*-Plasmids in einem SGI1 positiven *S*. Typhimurium Human-Isolat aus den Niederlanden

4.3.1.1 Identifizierung und Charakterisierung eines *qnrB19*-ColE-Plasmids

Seit der Entdeckung der PMQR in den späten 1990er Jahren durch Martinez-Martinez *et al.* (1998) wird in Enterobakterien, einschließlich *Salmonella enterica*, eine ständige Zunahme dieser Resistenzstrukturen beobachtet (Robicsek *et al.*, 2006). Fluorchinolon-Therapien werden in der Regel nur zur Behandlung von Salmonellose-Erkrankungen bei älteren oder immunsuppremierten Menschen eingesetzt. Sie sind jedoch auch gängige Medikamente bei Patienten mit Typhus abdominalis und invasiven Erkrankungen oder bei Salmonellen-Dauerausscheidern (García-Fernández *et al.*, 2009). Das Auftreten von *qnr* Gene wurde weltweit beschrieben und bildet den ersten entdeckten übertragbaren Mechanismus von Chinolon-Resistenz. Die Ausbreitung dieser Gene wird mit dem Anstieg der Resistenzraten gegen Fluorchinolone in klinischen *Enterobacteriaceae* Isolaten in Verbindung gebracht. (Robicsek *et al.*, 2006; Martínez-Martínez *et al.*, 2008). Bisher wurden fünf verschiedene Abstammungslinien von Qnr-Proteinen (QnrA, QnrB, QnrS, QnrC und QnrD) beschrieben (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011).

Neuere Studien zeigten, dass plasmid-lokalisierte qnr Gene verminderte Sensibilität gegenüber Fluorchinolonen (MHK: > 0,06 μ g/ml) und Nalidixinsäure (MHK: 8-16 μ g/ml) aufwiesen, ohne dabei in Verbindung zu Mutationen in den Topoisomerase-Genen zu stehen (Gay et al., 2006; Kehrenberg et al., 2007; Cattoir et al., 2007; Hopkins et al., 2007; Veldman et al., 2008; Veldman et al., 2011). Diese Eigenschaften wurden ebenfalls in dem in dieser Studie untersuchten Stamm STSGI-15 (CIP = MHK: $0.5 \mu g/ml$; NAL = MHK: $8\mu g/ml$) beobachtet. Die Sequenzierung seines qnr tragenden Plasmids pSGI15 ergab eine Gesamtgröße nur 2699 Da diese minimale Replikationseinheit von bp. das Mobilisierungssystem (mob Gene: mbeA-D) verloren zu haben scheint, könnte seine horizontale Verbreitung nur über andere Mechanismen wie Phagentransduktion, Fusion mit Transformation konjugativen Replikons oder der nackten erfolgen. DNA Die wahrscheinlichste Erklärung für die Entstehung von pSGI15 ist vermutlich die Rekombination ColE-produzierenden Sex-Faktors mit einem *qnr*-tragenden Plasmid und anschließender Deletion anderer Regionen wie z. B. von *tra* und Virulenz-kodierender oder kryptischer DNA. Auf diese Weise bildete sich ein Miniplasmid, das sich nur aus einem *qnr* Gen und den Replikationsfunktionen zusammensetzt.

Die Sequenz von pSGI15 enthält homologe Abschnitte zu putativer RNAII, RNAI und oriV-Elementen, die die Replikonbasis des ColE-like Plasmids bilden (Tomizawa und Som, 1984).

4.3.1.2 Epidemiologie von *qnrB19*-ColE-Plasmiden

Die erste Identifizierung der plasmid-vermittelten Resistenzdeterminante qnrB19 erfolgte durch Cattoir et al. (2008) in einem klinischen E. coli Isolat aus Kolumbien. In humanen S. Typhimurium Isolaten wurde das Gen von García-Fernández et al. (2009) auf Plasmiden der Inkompatibilitätsgruppen N und ColE detektiert. Das in dieser Studie untersuchte qnrB19-ColE Plasmid war das erste beschriebene qnrB19-Resistenz-Plasmid von einer so geringen Größe (2699 bp), das in Assoziation mit der Präsenz von SGI1 im Chromosom desselben Isolats auftrat. Nach Veröffentlichung dieser Ergebnisse (Hammerl et al., 2010) folgten weitere Arbeiten, die gnrB19 auf Plasmiden ähnlicher Größe nachweisen konnten. Pallecchi et al. (2010) identifizierten das gleiche Plasmid (pECY6-7; Accession Nr. GQ374156) in mehreren nicht-klonalen Chinolon-resistenten kommensalen E. coli Stämmen, die von gesunden Kindern aus verschiedenen urbanen Regionen in Peru und Bolivien isoliert worden waren. Wie auch pSGI15 besaßen diese Plasmide weder ISEcp1-like noch andere putative Insertionssequenzen (Pallecchi et al.; 2010). Die gleichen Autoren führten weitere Untersuchungen über das Vorkommen von qnrB-tragenden ColE-like Plasmiden in kommensalen Enterobacteriaceae bei einer weit abgelegenen Dorfgemeinschaft im peruanischen Amazonasgebiet durch. Obwohl die Bewohner nur einer minimalen Antiobiotika-Exposition ausgesetzt waren und Chinolone weder in Human- noch in Veterinärmedizin eingesetzt werden, wurde das zu pSGI15 homolge Plasmid pECY6-7 in mehreren Isolaten, darunter E. coli, Escherichia fergusonii, Enterobacter aerogenes und Kluyvera ascorbata, detektiert (Pallecchi et al., 2011). Im NRL-Salm und NRL-Antibiotikaresistenz wurden aus verschiedenen deutschen Bundesländern aus sieben von Reptilien stammenden Salmonella Stämmen unterschiedlicher Subspezies (I, II und IV) (Guerra et al.; 2010) sowie aus acht hauptsächlich von Putenfleisch stammenden S. Hadar Stämmen kleinere qnrB19-ColE Plasmide (2,7 – 4,5 kb) isoliert (Guerra et al., 2011). In den

USA wurde kürzlich ein pSGI15 ähnliches Plasmid mit einer Größe von 2,7 kb in einem humanen *Shigella sonnei* Isolat nachgewiesen (Folster *et al.*, 2011).

4.3.1.3 Abschließende Betrachtungen und Ausblick

pSGI15 und seine Varianten scheinen demnach eine große Rolle bei der weitverbreitetet geographischen und spezies-übergreifenden Ausbreitung des *qnrB19* Gens zu spielen und wurden sowohl in pathogenen als auch kommensalen Enterobacteriaceae beobachtet. Dabei wurde das Plasmid nicht nur in den urbanen Gebieten Europas und Lateinamerikas detektiert, sondern auch in einer abgelegenen Region ohne ersichtlichen Selektionsdruck (Pallecchi *et al.*, 2011). Die Gründe dieser ubiquitären Verbreitung dieses Plasmids bleiben bisher noch ungeklärt und bedürfen weiterer Untersuchungen hinsichtlich seiner Biologie und Ausbreitungsmechanismen.

4.3.2 Charakterisierung von Virulenz-Resistenz-Plasmiden in multiresistenten *S.* Typhimurium Isolaten

4.3.2.1 Identifizierung und Epidemiologie von pUO-StVR2

Virulente Bakterien haben ihren Phänotyp im Laufe eines langen Evolutionswegs in engem Kontakt mit ihren natürliche Wirten erlangt. Die meisten Virulenz-Determinanten sind dabei entweder in chromosomalen Genclustern, wie Pathogenitätsinseln, organisiert oder befinden sich in zusätzlichen genetischen Elementen wie z. B. Phagen oder Plasmiden. Dies legt nahe, dass die Evolution von einer avirulenten Lebensform zu einer pathogenen, häufig den Erwerb fremder DNA-Teile impliziert (Martínez und Baquero, 2002). Verschiedene Kombinationen dieser DNA-Teile resultieren in der Entstehung neuer Antibiotikaresistenz- und Virulenz-Phänotypen, die entsprechend wechselnder Umweltbedingungen einer natürlichen Selektion unterworfen sind (Baquero, 2004). Die ersten Hinweise auf eine Assoziation des Virulenzgens *spv* mit antimikrobiellen Resistenz-Determinanten gehen auf Studien aus den 1990er Jahren zurück (Threlfall *et al.*, 1994; Hampton *et al.*, 1995). Eine hohe Anzahl multiresistenter *S*. Typhimurium DT193 Isolate enthielt Plasmide von ca. 120 kb, deren Restriktionsmuster eine
große Ähnlichkeit mit pSLT zeigten (Threlfall *et al.*, 1994). Diese Resistenz-Derivate serovar-spezifischer Virulenz-Plasmide wurden nicht nur in *S*. Typhimurium, sondern auch in *S*. Enteritidis und hoch invasiven *S*. Choleraesuis detektiert (Rodicio *et al.*, 2011). Die Kopplung von Antibiotikaresistenz- und Virulenz-Determinanten auf einem Plasmid bewirkt eine Co-Selektion beider Eigenschaften, die zu möglicherweise immer virulenteren und resistenteren Isolaten führen könnte (Martínez und Baquero, 2002). Die *Salmonella* Virulenz-Resistenz-Plasmide sind ein interessantes Beispiel von Plasmidevolution und werden immer mehr zu einem öffentlichen Gesundheitsproblem (Guerra *et al.*, 2002).

Guerra *et al.* (2002) charakterisierten in Spanien multiresistente *S.* Typhimurium Isolate, die das von pSLT abstammende Virulenz-Resistenz-Plasmid pUO-StVR2 (\approx 140 kb) besaßen. Dieses Plasmid übertrug denselben Resistenzphänotyp wie die chromosomale Insel SGI1, zeigte jedoch einen anderen Resistenzgenotyp [*bla*_{OXA-1}-*catA1-aadA1-sul1-tet*(B)] (Guerra *et al.*, 2002). Unter den in dieser Studie untersuchten 15 multiresistenten *S.* Typhimurium Isolaten wurden pUO-StVR2-like Plasmide in zwei italienischen Humanisolaten vom Phagentyp DT120 identifiziert. Zunächst wurden hierfür alle Ampicillin-resistenten Isolate einem Screening nach dem auf einem InH-like Integron befindlichen *bla*_{OXA-1}-Gen unterzogen, gefolgt von der Detektierung eines Virulenz-Resistenz-Hybridplasmids. Diese Methode bewährte sich bereits bei der epidemiologischen Überwachung von *S.* Typhimurium pUO-StVR2-like Isolaten in Großbritannien (Herrero *et al.*, 2009). Die PFGE-Analyse, die identische bzw. sehr ähnliche Profile zeigte (XT12 und XT12a), belegte eine klonale Beziehung zu den spanischen pUO-StVR2-like enthaltenen Isolaten.

Herrero *et al.* (2008b) bewiesen, dass sich pUO-StVR2 aus pSLT durch den Erwerb eines komplexen DNA-Segments entwickelte, dessen Insertion zwischen den *ccdAB* Toxin/Antitoxin-Genen und dem *pefI* Gens des Virulenz-Plasmids erfolgte. Das dazwischen liegende Segment, einschließlich des InFIB/*repA2* Replikationsursprungs, des *rsk* Locus und eines großen Teils des *pef* Operons (*pefDCAB*), wurde vermutlich bei der Inkorporation der Fremd-DNA zerstört (Rodicio *et al.*, 2011).

Das dänische Humanisolat 08-02884 zeigte dieselben Resistenzeigenschaften wie die Isolate der pUO-StVR2-Gruppe sowie ein korrespondierendes PFGE-Profil (XT12a). Es besaß ebenfalls ein IncFII-Plasmid von ca. 140 kb, mit dem von den getesteten Sonden allerdings nur *spvC* hybridisierte. Das *bla*_{OXA-1} Gen war dagegen auf dem Chromosom lokalisiert. Die PCR-Analyse zeigte, dass das gesamte *pef* Operon und auch das *rsk* Gen in diesem Isolat vollständig intakt waren. Aufgrund dieser Ergebnisse könnte vermutet werden, dass es sich bei diesem Stamm eventuell um eine chromosomale Vorläuferform des pUO-StVR2-Plasmids handelt. Eine solche Hypothese bedarf jedoch weiterer intensiver Untersuchungen.

4.3.2.2 Identifizierung von *bla*_{TEM-1}-*dfrA12*-Plasmiden

In 10 S. Typhimurium Isolaten wurden Multiresistenz-vermittelnde Plasmide der IncFII-Gruppe detektiert. Diese Stämme wurden hauptsächlich von Schweinen aus Großbritannien isoliert, konnten aber auch in einem italienischen Humanisolat nachgewiesen werden. Charakteristischerweise enthalten diese Plasmide ein atypisches Klasse 1 Integron, das an Stelle von sull mit sul3 downstream der variablen Region dfrA12-aadA2-cmlA1-aadA1 assoziiert ist. In Salmonella wurden diese atypischen sul3-Integrons zum erstem Mal in portugiesischen Isolaten nachgewiesen (Antunes et al., 2007). Bereits Antunes et al. (2007) zeigten, dass dieses Integron auf großen Plasmiden verschiedener Größen (≥ 100 kb) lokalisiert war. Diese Beobachtung konnte in der vorliegenden Studie bestätigt werden. Zusätzlich wurde hier gezeigt, dass diese Plasmide *bla*_{TEM-1} enthielten. Die Restriktionsanalyse am Beispiel von pUK-StVR42 ließ vermuten, dass es sich hierbei um eine neue Variante eines pSLT-Derivats handeln könnte. Da auch das PFGE-Profil dieses Stammes (XT12b) eine hochgradige Ähnlichkeit mit dem Muster von Isolaten der pUO-StVR2-Gruppe (XT12 und XT12a) aufwies, liegt die Annahme nahe, dass beide Virulenz-Resistenz-Plasmidgruppen denselben klonalen Ursprung haben.

In der Literatur sind bla_{TEM-1} -assoziierte Virulenz-Resistenz-Plasmide zurzeit noch recht wenig beschrieben. Guerra *et al.* (2001) detektierten in der monophasischen *S*. Typhimurium Variante 4,5,12:i:- Plasmide von ca. 140 kb, die sowohl das Virulenzgen *spv* als auch die Resistenzgene *bla*_{TEM-1}, *aacC4*, *cmlA1* und *tet*(A) enthielten. Diese Plasmide gehörten allerdings zu IncA/C und/oder IncN (García *et al.*, 2011). Zusätzlich besaßen sie ein Klasse 1 Integron mit den Genkassetten *dfrA12* und *aadA2* (Guerra *et al.*, 2001). Weitere *bla*_{TEM-1}assoziierte Virulenz-Resistenz-Plasmid wurden vor kurzem in japanischen *S*. Typhimurium Isolaten aus Rindern (Tamamura *et al.*, 2011) und in spanischen *S*. Enteritidis Humanisolaten (Rodríguez *et al.*, 2011) identifiziert.

4.3.2.3 Abschließende Betrachtungen und Ausblick

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse unterstützen die These der Ausbreitung des zuerst in Spanien detektierten endemisch auftretenden pUO-StVR2 in andere europäische Länder. Das Plasmid wurde mittlerweile auch in Großbritannien nachgewiesen und wird aufgrund der Präsenz seines charakteristischen Klasse 1 Integrons auch in Portugal und Norwegen vermutet. Eine Verbreitung dieses Plasmids wie z. B. durch Tourismus oder durch den Import kontaminierter Lebensmittel ist denkbar (Herrero *et al.*, 2009). pUO-StVR2 positive *S*. Typhimurium Isolate wurden bisher zwar hauptsächlich aus klinischen Proben isoliert, wurden aber ebenfalls in Lebensmitteln und Lebensmittel-produzierenden Tieren detektiert. Beim Menschen waren sie meist mit sporadischen Salmonellose-Fällen assoziiert. Ihr invasives Potential zeigte sich jedoch, indem sie auch im Blut nachgewiesen werden konnten und in Spanien Ursache verschiedener Ausbrüche waren (Rodicio *et al.*, 2011).

Insbesondere Schweine aus Großbritannien scheinen ein Reservoir für die in dieser Arbeit beschriebenen *bla*_{TEM-1}-IncFII-Plasmide darzustellen. Da ein Plasmid dieser Gruppe ebenfalls in einem Humanisolat nachgewiesen wurde, erscheint eine Übertragung über die Lebensmittelkette als wahrscheinlich. Die Assoziation von atypischen *sul3*-Integrons mit epidemischen Plasmiden und besonders multiresistenten *Salmonella*-Klonen könnte demnach zur Erhaltung und zur weiteren Ausbreitung von Antibiotikaresistenz-Elementen von Lebensmittel-produzierenden Tieren auf den Menschen beitragen (Antunes *et al.*, 2007).

In folgenden Studien wäre es wünschenswert diese Virulenz-Resistenz-Plasmide insbesondere in Sequenz-, RFLP und Transferanalysen näher zu charakterisieren und in epidemiologischen Untersuchungen mehr über ihre Verbreitung zu erfahren. Ein weiterer interessanter Aspekt wären Analysen zum Vorkommen der *bla*_{TEM-1}-IncFII-Plasmide in deutschen Schweinebeständen und den sich daraus ergebene möglichen Auswirkungen auf die Humanmedizin.

4.4 Fazit

Die Entwicklung von Antibiotikaresistenz-Mechanismen ist die evolutionäre Reaktion auf den starken Selektionsdruck, der aus der Exposition gegen antimikrobielle Substanzen hervorgeht (Wright, 2010). Als insbesondere problematisch in der klinischen Praxis werden durch multiresistente Bakterien, hauptsächlich gram-negative Organismen, verursachte Infektionen eingestuft (Cantón et al., 2003). Obwohl die Prävalenz von Salmonella in Europa allgemein als rückläufig verzeichnet wird (European Food Safety Authority und European Centre for Disease Prevention, 2011), wurde in den vergangenen Jahren ein vermehrter Anstieg multiresistenter Salmonella Isolate beobachtet (World Health Organization, 2005). Diese stellen ein zunehmendes Gesundheitsrisiko für den Menschen dar, da sie immer häufiger Ursache humaner Salmonellose Ausbrüche waren (Alcaine et al., 2007). Verschiedenste Tierarten, insbesondere Lebensmittel-produzierende Tiere, wurden dabei als Reservoire nontyphoidaler Salmonellen identifiziert (Cray et al., 2000; Uzzau et al., 2000; Pires et al., 2009). Die Übertragung der Pathogene erfolgte also entweder durch den Verzehr kontaminierter Lebensmittel oder dem direkten Kontakt mit infizierten Tieren. Nach aktuellen Schätzungen wird vermutet, dass Salmonella weltweit jährlich 93,8 Millionen Humaninfektionen verursacht, die in 155 000 Fällen tödlich enden (Majowicz et al., 2010). Obwohl bei S. enterica bisher mehr als 2500 Serovare bestimmt worden sind, werden Infektionen beim Menschen nur von einer begrenzten Serovaranzahl ausgelöst, wobei die Serovare Typhimurium und Enteritidis in den meisten Industrieländern die häufigste Ursache sind (Hendriksen et al., 2011).

Resistenzen gegen Antibiotika wurden bereits vor dem ersten klinischen Einsatz von Penicillin in den frühen 1940er Jahren als natürliches Phänomen erfasst. Mittlerweile haben sich jedoch gegen alle bekannten Antibiotikaklassen Resistenzen ausgebildet. Im Wesentlichen unterscheidet man zwei verschiedene Resistenzstrategien. Die erste Strategie beinhaltet Mechanismen, die Resistenzen vertikal von einem Bakterium auf seine Tochterzelle übertragen. Die zweite Strategie umfasst Genaktivitäten, die sowohl vertikal auf eine Tochterzelle als auch horizontal auf andere Bakterien derselben Spezies oder sogar anderer Gattungen übertragen werden können. Diese Gene befinden sich auf mobilen genetischen Elementen (Wright, 2010). In dieser Arbeit wurde als Beispiel für den ersten Transfermechanismus eine multiresistente klonale Linie in *S*. Saintpaul Isolaten aviärer Herkunft in Deutschland und den Niederlanden identifiziert. Sie steht im Verdacht über die Lebensmittelkette auch auf den Menschen übertragbar zu sein. Das Prinzip der klonalen

Verbreitung wird sowohl bei humanen als auch tierischen Salmonella-Infektionen als gezeigt, bedenklich eingestuft (Davis al., 2002). Es wurde die et dass Ausbreitungsmechanismen von multiresistenten Salmonella-Klonen bisher noch weitgehend unbekannt sind und nicht hauptsächlich antimikrobiellem Selektionsdruck zugeschrieben werden können (Davis et al., 2002). Eines der bekanntesten Beispiele klonaler Dissemination ist der pandemisch auftretende multiresistente S. Typhimurium DT104 (Alcaine et al., 2007), dessen charakteristische Pentaresistenz auf der chromosomalen Integration von SGI1 beruht (Boyd et al., 2001). Mittlerweile sind eine Vielzahl an SGII-Varianten bekannt, die sowohl über vertikalen als auch horizontalen Transfer übertragen werden können (Mulvey et al., 2006; Hall, 2010). Die Untersuchungen der molekularen Eigenschaften von europäischen SGI1-positiven Salmonella Isolaten in dieser Dissertation scheinen die zunehmende Diversifikation dieser Multiresistenz-vermittelnden genomischen Insel zu bestätigen. Insbesondere das epidemiologisch bedeutende Serovar Newport (Centers for Disease Control and Prevention, 2008; Cobbold et al., 2006; European Centre for Disease Prevention and Control, 2008) lässt aufgrund seines Gen-Repertoires die Existenz verschiedener neuer SGI1-Varianten vermuten (Amar et al., 2008; Beutlich et al., 2011). Die in dieser Arbeit durchgeführte Charakterisierung einer Sammlung europäischer S. Newport Isolate festigt diesen Verdacht, dass dieses Serovar ein interessantes Reservoir neuer SGI1-Varianten zu sein scheint.

In gram-negativen Bakterien beruht der Mechanismus des horizontalen Gentransfers vor allem auf Plasmidtransfer. Es wird angenommen, dass die Abstammungslinien von Resistenzplasmiden unabhängig von einander in unterschiedlichen bakteriellen Spezies evolvierten, obwohl ihre inkorporierten Gene vermutlich denselben Ursprung hatten (Cantón *et al.*, 2003). Diese Hypothese scheint ebenfalls eine mögliche Erklärung für das in dieser Arbeit untersuchte ubiquitär auftretende PMQR vermittelnde *qnrB19*-Plasmid zu sein. Das in dieser Studie untersuchte *qnrB19*-ColE Plasmid ist das kleinste bisher beschriebene *qnr*-Resistenz-Plasmid.

Ein weiteres interessantes Beispiel für die Evolution von Plasmiden ist die Kopplung von Antibiotikaresistenz- und Virulenz-Determinanten auf einem Plasmid, die eine Co-Selektion beider Eigenschaften bewirkt und somit vermutlich zur Entstehung von immer virulenteren und resistenteren Isolaten führt (Martínez und Baquero, 2002). Die in dieser Arbeit beschriebenen *bla*_{TEM-1}-*dfrA12*-Plasmide stehen in dem Verdacht, über die Lebensmittelkette auf den Menschen übertragbar zu sein und scheinen demnach ein potentielles Risiko für die öffentliche Gesundheit darzustellen. Die Präsenz von verschiedenen Resistenz-Determinanten

tragenden Plasmiden oder auch eines einzelnen Plasmids, das unterschiedliche Resistenz-Determinanten enthält, ermöglicht einerseits den Erhalt resistenter Bakterien unter antimikrobiellen Selektionsdrücken und erleichert andererseits die Verbreitung dieser Elemente (Cantón *et al.*, 2003).

Die medizinische Behandlung von Salmonellosen ist bei Mensch und Tier mit dem Auftreten multiresistenter *Salmonella* Stämme immer schwieriger geworden. Lebensmittelbedingte Infektionen und Ausbrüche mit multiresistenten Salmonellen werden in ansteigender Zahl gemeldet. Zur besseren Überwachung und Kontrolle der Verbreitung multiresistenter *Salmonella* ist es erforderlich, die für die Antibiotikaresistenz verantwortlichen Mechanismen und ihre Transmissionswege besser zu verstehen (Alcaine *et al.*, 2007). Diese Dissertation versucht mit der Charakterisierung verschiedener *S. enterica* Isolate hierzu einen Beitrag zu leisten.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Entwicklung von Antibiotikaresistenz-Mechanismen ist die evolutionäre Reaktion auf den starken Selektionsdruck, der aus der Exposition gegen antimikrobielle Substanzen hervorgeht. Als insbesondere problematisch werden durch multiresistente Bakterien verursachte Infektionen eingestuft. Salmonellen gehören weltweit zu den bedeutendsten zoonotischen Krankheitserregern. Obwohl ihre Prävalenz in Europa allgemein als rückläufig verzeichnet wird, wurde in den vergangenen Jahren ein vermehrter Anstieg multiresistenter *Salmonella* Isolate beobachtet. Diese Arbeit, die sich in die drei allgemeinen Themenbereiche 1) Multiresistenz in Deutschland, 2) Multiresistenz in Europa und 3) Multiresistenz-assoziierte Plasmide gliedert, versucht mit der Charakterisierung verschiedener *S. enterica* Isolate die für die Antibiotikaresistenz verantwortlichen Mechanismen und ihre Transmissionswege näher zu beleuchten und somit zur besseren Überwachung und Verbreitungskontrolle beizutragen.

1) In *S.* Saintpaul Isolaten aviärer Herkunft wurde eine multiresistente klonale Linie in Deutschland und den Niederlanden identifiziert, die im Verdacht steht, über die Lebensmittelkette auf den Menschen übertragbar zu sein. Ihre Verbreitung und molekulare Entwicklung sollten zum Schutz der öffentlichen Gesundheit weitergehend untersucht werden.

2) Die Untersuchungen der molekularen Eigenschaften von europäischen SGI1-positiven *Salmonella* Isolaten sprechen für eine zunehmende Diversifikation der Multiresistenzvermittelnden genomischen Insel SGI1. Aufgrund ihres Virulenzgen-Repertoires und ihren Resistenzeigenschaften könnten einige dieser Varianten/Isolate von klinischer Relevanz sein. Insbesondere das epidemiologisch bedeutende Serovar Newport lässt aufgrund seines Gen-Repertoires die Existenz verschiedener neuer SGI1-Varianten vermuten. Die in dieser Arbeit durchgeführte Charakterisierung einer Sammlung europäischer *S*. Newport Isolate festigt diesen Verdacht, dass dieses Serovar ein interessantes Reservoir neuer SGI1-Varianten zu sein scheint.

3) Das ColE-Plasmid pSGI15 ist das kleinste bisher beschriebene PMQR übertragende Resistenz-Plasmid. Dieses Plasmid und seine Varianten scheinen eine große Rolle bei der ubiquitären Ausbreitung des *qnrB19* Gens zu spielen und wurden sowohl in pathogenen als auch kommensalen *Enterobacteriaceae* beobachtet. Ein weiteres interessantes Beispiel für Plasmidevolution ist die Kopplung von Antibiotikaresistenz- und Virulenz-Determinanten auf einem Plasmid, die eine Co-Selektion beider Eigenschaften bewirkt und somit vermutlich zur Entstehung von immer virulenteren und resistenteren Isolaten führt. Die in dieser Arbeit in porcinen *S*. Typhimurium Isolaten beschriebenen *bla*_{TEM-1}-*dfrA12*-IncFII-Plasmide stehen in dem Verdacht, über die Lebensmittelkette auf den Menschen übertragbar zu sein.



The development of antimicrobial resistance mechanisms is the evolutionary response to the intense selection pressure resulting from the exposure to antimicrobial substances. Infections caused by multidrug resistant bacteria are considered as particularly problematic in clinical practice. *Salmonella* is one of the most important bacterial pathogens worldwide. Although its prevalence in Europe is encountered generally as regressive, in recent years an increase in multidrug resistant *Salmonella* isolates has been observed. This work, subdivided in three thematic areas 1) Multiple Drug Resistance in Germany, 2) Multiple Drug Resistance in Europe and 3) Multiple Drug Resistance associated plasmids, tempts by characterizing different *S. enterica* isolates to investigate the mechanisms responsible for antimicrobial resistance and therefore to contribute to better surveillance and dissemination control.

1) In *S*. Saintpaul isolates of avian origin a multidrug resistant clonal line was identified in Germany and The Netherlands and is suspected to be conferrable also to humans via the food chain. Its spread and molecular development should be examined further for protection of public health.

2) The studies on the molecular properties of European SGI1-positive *Salmonella* isolates indicate an increasing diversification of the multidrug resistance conferring *Salmonella* Genomic Island 1. Due to their virulence gene repertoire and their resistance properties, some of these variants/isolates may become clinical relevant. Based on its genetic properties, especially the epidemiological important serovar Newport is hypothesized to harbour various new SGI1 variants. The characterization on a European collection of *S*. Newport isolates performed in this work consolidates the suspicion this serovar being an interesting novel reservoir for SGI1 variants.

3) The ColE-plasmid pSGI15 is the smallest PMQR conferring resistance plasmid described so far. This plasmid and its variants seem to play a major role in the widespread dissemination of *qnrB19* both in pathogenic and commensal *Enterobacteriaceae*. On the other hand, the link of both antimicrobial resistance and virulence determinants on the same plasmid provides another interesting example for plasmid evolution and causes co-selection of both traits leading to more and more virulent and resistant isolates. The bla_{TEM-1} -dfrA12-IncFII-plasmids found in porcine *S*. Typhimurium isolates are suspected to be transferrable to humans via the food chain and seem to pose a potential riskfactor for public health.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Ahmed, A. M., A. I. Hussein, and T. Shimamoto. 2007. *Proteus mirabilis* clinical isolate harbouring a new variant of *Salmonella* genomic island 1 containing the multiple antibiotic resistance region. J. Antimicrob. Chemother. **59:**184-190.

Akiba, M., K. Nakamura, D. Shinoda, N. Yoshii, H. Ito, I. Uchida, and M. Nakazawa. 2006. Detection and characterization of variant *Salmonella* genomic island 1s from *Salmonella* Derby isolates. Jpn. J. Infect. Dis. **59:**341-345.

Alcaine, S. D., L. D. Warnick, and M. Wiedmann. 2007 Antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella*. J. Food Prot. **70**:780-790.

Alekshun, M. N., and S. B. Levy. 2007. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. Cell. **128**:1037-1050.

Amar, C. F., C. Arnold, A. Bankier, P. H. Dear, B. Guerra, K. L. Hopkins, E. Liebana, D. J. Mevius, and E. J. Threlfall. 2008. Real-time PCRs and fingerprinting assays for the detection and characterization of *Salmonella* Genomic Island-1 encoding multidrug resistance: application to 445 European isolates of *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Shigella*, and *Proteus*. Microb. Drug Resist. 14:79-92.

Ambler, R. P., A. F. Coulson, J. M. Frère, J. M. Ghuysen, B. Joris, M. Forsman, R. C. Levesque, G. Tiraby, and S. G. Waley. 1991. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. Biochem. J. 276:269-70.

Anand, C. M., M. C. Finlayson, J. Z. Garson, and M. L. Larson. 1980. An institutional outbreak of Salmonellosis due to lactose-fermenting *Salmonella* Newport. Am. J. Clin. Pathol. **74**:657-660.

Anderson, E. S., L. R. Ward, M. J. de Saxe, and J. D. H. de Sa. 1977. Bacteriophage-typing designations of *Salmonella* Typhimurium. J. Hyg. **78**:297-300.

Anonym. 2003a. Directive 2003/99/EC of the European Parliament and the Council on the Monitoring of Zoonoses and Zoonotic Agents. Official Journal of the European Union, L325/31: 12.12.2003. Unter: http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:325:0031:0040:EN:PDF.

Anonym. 2003b. Verordnung (EG) Nr. 2160/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 17. November 2003 zur Bekämpfung von Salmonellen und bestimmten anderen durch Lebensmittel übertragbaren Zoonoseerregern. Amtsblatt der Europäischen Union, L325/1: 12.12.2003. Unter: http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:325:0001:0015:DE:PDF.

Anonym. 2006. Commission Decision 2006/662/EC of 29 September 2006 concerning a financial contribution from the Community towards a baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in turkeys to be carried out in the Member States. Official Journal of the European Union, L272/22: 03.10.2006. Unter: http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do? uri=OJ:L:2006:272:0022: 0026:EN:PDF.

Anonym. 2007. Joint FAO/WHO/OIE Expert Meeting on Critically Important Antimicrobials. Report of a meeting held in Rome, Italy, 26 to 30 November 2007. Food and Agriculture Organization of the United Nations Headquarters, Rome, Italy.

Anonym. 2008a. GERMAP 2008: Antibiotika-Resistenz und –Verbrauch. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V., und Infektiologie Freiburg (Hrsg.). Unter: http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/ 08_PresseInfothek/ Germap_2008.pdf?__blob=publicationFile&v=2.

Anonym. 2008b. DART: Deutsche Antibiotika-Resistenzstrategie. Bundesministerium für Gesundheit, Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, und Bundesministerium für Bildung und Forschung (Hrsg.). Unter: http://www.bmg.bund.de/fileadmin /dateien/Publikationen/Gesundheit/Broschueren/Deutsche_Antibiotika_Resistenzstrategie_DART-_110331.pdf.

Anonym. 2010. Verordnung (EU) Nr. 37/2010 der Kommission vom 22. Dezember 2009 über pharmakologisch wirksame Stoffe und ihre Einstufung hinsichtlich der Rückstandshöchstmengen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs. Amtsblatt der Europäischen Union, L15/1: 20.01.2010. Unter: http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:015:0001:0072:DE:PDF.

Antunes, P., C. Reu, J. C. Sousa, L. Peixe, and N. Pestana. 2003. Incidence of *Salmonella* from poultry products and their susceptibility to antimicrobial agents. Int. J. Food Microbiol. **82**:97-103.

Antunes, P., J. Machado, J. C. Sousa, and L. Peixe. 2005. Dissemination of sulfonamide resistance genes (*sul1*, *sul2*, and *sul3*) in Portuguese *Salmonella enterica* strains and relation with integrons. Antimicrob. Agents Chemother. **49**:836-839.

Antunes, P., J. Machado, and L. Peixe. 2006. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 and 2 integrons in *Salmonella enterica* isolates from different sources in Portugal. J. Antimicrob. Chemother. **58**:297-304.

Antunes, P., J. Machado, and L. Peixe. 2007. Dissemination of *sul3*-containing elements linked to class 1 integrons with an unusual 3' conserved sequence region among *Salmonella* isolates. Antimicrob. Agents Chemother. **51:**1545-1548.

Arlet, G., and A. Philippon. 1991. Construction by polymerase chain reaction and use of intragenic DNA probes for three main types of transferable beta-lactamases (TEM, SHV, CARB). FEMS Microbiol. Lett. **66**:19-25.

Asako, H., H. Nakajima, K. Kobayashi, M. Kobayashi, and R. Aono. 1997. Organic solvent tolerance and antibiotic resistance increased by overexpression of *marA* in *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. **63**:1428-1433.

Babic, M., A. M. Hujer, and R. A. Bonomo. 2006. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. Drug Resist. 9:142-56.

Bamforth, J., E. Giraud, B. Doublet, A. Cloeckaert, F. Kabanangi, S. T. Cardona, M. Graham, G. R. Golding, and M. R. Mulvey. 2009. *Salmonella* Genomic Island 1 influences expression of virulence-associated genes in early stationary phase and enhances killing of *Caenorhabditis elegans* for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. ASM Conference "*Salmonella*: Biology, Pathogenesis and Prevention", October 2009, Aix-en-Provence, France. Conference proceedings p 104.

Baquero, F. 2004. From pieces to patterns: evolutionary engineering in bacterial pathogens. Nat. Rev. Microbiol. **2**:510-518.

Barton, B. M., G. P. Harding, and A. J. Zuccarelli. 1995. A general method for detecting and sizing large plasmids. Anal. Biochem. 226:235-240.

Bassetti, M., E. Righi, and C. Viscoli. 2008. Novel beta-lactam antibiotics and inhibitor combinations. Expert Opin. Investig. Drugs. 17:285-296.

Bäumler, A., R. Tsolis, and F. Heffron. 2000. Virulence mechanisms of *Salmonella* and their genetic basis. In: Wray, C. and Wray, A. (Eds.), *Salmonella* in Domestic Animals. CABI Publishing, Oxon, New York, pp. 57-72.

Beltran, P., J. M. Musser, R. Helmuth, J. J. Farmer III, W. M. Frerichs, I. K. Wachsmuth, K. Ferris, A. C. McWhorter, J. G. Wells, A. Cravioto, and R. K. Selander. 1988. Toward a population genetic analysis of *Salmonella*: genetic diversity and relationships among strains of serotypes *S*. Choleraesuis, *S*. Derby, *S*. Dublin, *S*. Enteritidis, *S*. Heidelberg, *S*. Infantis, *S*. Newport, and *S*. Typhimurium. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85:7753–7757.

Bennett, P. M. 2000. Transposable elements. In: Lederberg *et al.* (Eds.) Encyclopedia of Microbiology, Vol. 4, 2nd Edition. Academic Press, San Diego, California, USA. pp. 704–724.

Beutlich, J., I. Rodríguez, A. Schroeter, A. Käsbohrer, R. Helmuth, and B. Guerra. 2010. A predominant multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Saintpaul clonal line in German turkey and related food products. Appl. Environ. Microbiol. **76**:3657-67.

Beutlich, J., S. Jahn, B. Malorny, E. Hauser, S. Hühn, A. Schroeter, M. R. Rodicio, B. Appel, J. Threlfall, D. Mevius, R. Helmuth, and B. Guerra, on behalf of the Med-Vet-Net WP21 Project Group. 2011. Antimicrobial resistance and virulence determinants in European *Salmonella* Genomic Island 1 positive *Salmonella enterica* isolates from different origins. Appl. Environ. Microbiol. Epub ahead of print, doi:10.1128/AEM.00425-11.

Beyer, W., F. M. Mukendi, P. Kimmig, and R. Bohm. 1998. Suitability of repetitive-DNA-sequence-based PCR fingerprinting for characterizing epidemic isolates of *Salmonella enterica* serovar Saintpaul. J. Clin. Microbiol. **36**:1549-1554.

Birnboim, H. C., and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. **7**:1513-1523.

Birren, B., L. Hood, and E. Lai. 1989. Pulsed field gel electrophoresis: Studies of DNA migration made with the programmable, autonomously-controlled electrode electrophoresis system. Electrophoresis. **10**:302-309.

Blaha, T. 1993. The diffusion dynamics of salmonellae in animal herds. Dtsch. Tierarztl. Wochenschr. 100:278-280.

Bockemühl, J. 1992. *Enterobacteriaceae*. In: Burkhardt, F. (Hrsg.), Mikrobiologische Diagnostik. Georg Thieme-Verlag Stuttgart-New York, 138-141.

Boyd, D. A., G. A. Peters, L. Ng, and M. R. Mulvey. 2000. Partial characterization of a genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* Typhymurium DT104. FEMS Microbiol. Lett. **189:**285-291.

Boyd, D., G. A. Peters, A. Cloeckaert, K. S. Boumedine, E. Chaslus-Dancla, H. Imberechts, and M. R. Mulvey. 2001. Complete nucleotide sequence of a 43-kilobase genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 and its identification in phage type DT120 and serovar Agona. J. Bacteriol. **183**:5725-5732.

Boyd D., A. Cloeckaert, E. Chaslus-Dancla, and M. R. Mulvey. 2002. Characterization of variant *Salmonella* genomic island 1 multidrug resistance regions from serovars Typhimurium DT104 and Agona. Antimicrob. Agents Chemother. **46**:1714-22.

Boyd, E. F., S. Almagro-Moreno, and M. A. Parent. 2009. Genomic islands are dynamic, ancient integrative elements in bacterial evolution. Trends Microbiol. 17:47-53.

Brenner, F. W., R. G. Villar, F. J. Angulo, R. Tauxe, and B. Swaminathan. 2000. *Salmonella* nomenclature. J. Clin. Microbiol. **38**:2465-2467.

Bronzwaer, S., A. Lonnroth, and R. Haigh. 2004. The European Community strategy against antimicrobial resistance. Euro. Surveill. 9:30-34. Bronzwaer, S., F. Aarestrup, A. Battisti, B. Bengtsson, S. Piriz Duran, H. D. Emborg, G. Kahlmeter, D. Mevius, G. Regula, P. Sanders, C. Teale, D. Wasyl, K. De Smet, J. Torren Edo, P. Tüll, H. Deluyker, and P. Mäkelä. 2008. Harmonised monitoring of antimicrobial resistance in *Salmonella* and *Campylobacter* isolates from food animals in the European Union. Clin. Microbiol. Infect. 14:522–533.

Brown, N. L., and L. R. Evans. 1991. Transposition in prokaryotes: transposon Tn501. Res. Microbiol. 142:689-700.

Bundesinstitut für Risikobewertung. 2008. Grundlagenstudie zur Erhebung der Prävalenz von Salmonellen in Truthühnerbeständen. Bericht des BfR vom 04. März 2008. Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin, Deutschland. Unter: http://www.bfr.bund.de/cm/208/grundlagenstudie_zur_erhebung_der_praevalenz_von_salmonellen_in_truthuehnerbestaenden.pdf.

Bundesinstitut für Risikobewertung. 2010. Antibiotikaresistenzen in der Lebensmittelkette. Presseinformation 18/2010, 13.12.2010. Unter: http://www.bfr.bund.de/de/presseinformation/2010/18/ antibiotikaresistenzen_in_der_lebensmittelkette-53288.html.

Bush, K., and S. Mobashery. 1998. How beta-lactamases have driven pharmaceutical drug discovery. From mechanistic knowledge to clinical circumvention. Adv. Exp. Med. Biol. **456**:71-98.

Bush, K., and G. A. Jacoby. 2010. Updated functional classification of beta-lactamases. Antimicrob. Agents Chemother. **54**:969-976.

Callow, B. R. 1959. A new phage-typing scheme for *Salmonella* Typhimurium. J. Hyg. 57:346-359.

Cantón, R., T. M. Coque, and F. Baquero. 2003. Multi-resistant gram-negative bacilli: from epidemics to endemics. Curr. Opin. Infect. Dis. 16:315-325.

Carattoli, A. 2001. Importance of integrons in the diffusion of resistance. Vet. Res. 32:243-259.

Carattoli, A. 2003. Plasmid-mediated antimicrobial resistance in *Salmonella enterica*. Curr. Issues Mol. Biol. 5:113-122.

Carattoli, A., A. Bertini, L. Villa, V. Falbo, K. L. Hopkins, and E. J. Threlfall. 2005. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. J. Microbiol. Methods. 63:219-228.

Carramiñana, J. J., C. Rota, I. Agustin, and A. Herrera. 2004. High prevalence of multiple resistance to antibiotics in *Salmonella* serovars isolated from a poultry slaughterhouse in Spain. Vet. Microbiol. **104**:133-139.

Casin, I., J. Breuil, J. P. Darchis, C. Guelpa, and E. Collatz. 2003. Fluoroquinolone resistance linked to GyrA, GyrB, and ParC mutations in *Salmonella enterica* Typhimurium isolates in humans. Emerg. Infect. Dis. 9:1455-1457.

Cattoir, V., F. X. Weill, L. Poirel, L. Fabre, C. J. Soussy, and P. Nordmann. 2007. Prevalence of *qnr* genes in *Salmonella* in France. J. Antimicrob. Chemother. **59**:751–754.

Cattoir, V., P. Nordmann, J. Silva-Sanchez, P. Espinal, and L. Poirel. 2008. ISEcp1-mediated transposition of *qnrB*-like gene in *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. **52**:2929-2932.

Cavaco, L. M., H. Hasman, S. Xia, and F. M. Aarestrup. 2009. *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin. Antimicrob. Agents Chemother. **53**:603–608.

Centers for Disease Control and Prevention. 2008a. Outbreak of *Salmonella* serotype Saintpaul infections associated with multiple raw produce items—United States, 2008. Centers for Diseases Control (CDC). MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep. **57:**929–934.

Centers for Disease Control and Prevention. 2008b. *Salmonella* surveillance: annual summary, 2006. U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA. Unter: http://www.cdc.gov/nci-dod/dbmd/phlisdata/salmtab/2006/SalmonellaAnnualSummary2006.pdf.

Centers for Disease Control and Prevention. 2009. Outbreak of *Salmonella* serotype Saintpaul infections associated with eating alfalfa sprouts - United States, 2009. Centers for Diseases Control (CDC). Morb. Mortal. Wkly. Rep. **58**:500-503.

Chen, C. Y., T. P. Strobaugh Jr, and J. G. Frye. 2010. Characterization of small ColE1-like plasmids conferring kanamycin resistance in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Typhimurium and Newport. Plasmid. **63**:150-154.

Chopra, I., and M. Roberts. 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **65**:232-260.

Chu, G., D. Vollrath, and R. W. Davis. 1986. Separation of large DNA molecules by contourclamped homogeneous electric fields. Science. 234:1582-1585.

Chu, C., S. F. Hong, C. Tsai, W. S. Lin, T. P. Liu, and J. T. Ou. 1999. Comparative physical and genetic maps of the virulence plasmids of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium, Enteritidis, Choleraesuis, and Dublin. Infect. Immun. **67**:2611-2614.

Chu, C., C. H. Chiu, W. Y. Wu, C. H. Chu, T. P. Liu, and J. T. Ou. 2001. Large resistance virulence plasmids in clinical isolates of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis. Antimicrob. Agents Chemother. **45**:2299–2303.

Chu, C., and C. H. Chiu. 2006. Evolution of the virulence plasmids of non-typhoid *Salmonella* and its association with antimicrobial resistance. Microbes Infect. **8**:1931-1936.

Clark, S. M., E. Lai, B. W. Birren, and L. Hood. 1988. A novel instrument for separating large DNA molecules with pulsed homogenous electric fields. Science. 241:1203-1205.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006a. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard 7th ed. (M7-A7), Vol. 26, No. 2. CLSI, Wayne, PA.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006b. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard - 9th Edition (M2-A9), Vol. 26, No. 1. CLSI, Wayne, PA.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006c. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 16th international supplement (M100-S16), Vol. 26, No.. 3. CLSI, Wayne, PA.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008a. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animal; approved standard -3^{rd} Edition (M31-A3), Vol. 28, No. 8. CLSI, Wayne, PA.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008b. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 18th informational supplement (M100-S18), Vol. 28, No. 1. CLSI, Wayne, PA.

Cloeckaert, A., and E. Chaslus-Dancla. 2001. Mechanisms of quinolone resistance in *Salmonella*. Vet. Res. **32**:291-300.

Cloeckaert, A, K. Praud, B. Doublet, M. Demartin, and F. W. Weill. 2006. Variant *Salmonella* genomic island 1-L antibiotic resistance gene cluster in *Salmonella enterica* serovar Newport. Antimicrob. Agents Chemother. **50**:3944-3946.

Cobbold, R. N., D. H. Rice, M. A. Davis, T. E. Besser, and D. D. Hancock. 2006. Long-term persistence of multi-drug-resistant *Salmonella* enterica serovar Newport in two dairy herds. J. Am. Vet. Med. Assoc. **228:**585–591.

Cray, P. J. F., J. T. Gray, and C. Wray. *Salmonella* infections in pigs. 2000. In: Wray, C. and Wray, A. (Eds.), *Salmonella* in Domestic Animals. CABI Publishing, Oxon, New York, pp. 191–208.

D'Aoust, J.-Y. 1989. "*Salmonella*". In: Doyle, M.P. (Ed.), Foodborne Bacterial Pathogens. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 327-445.

Davies, J., and D. Davies. 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **74**:417-433.

Davis, M. A., D. D. Hancock, and T. E. Besser. 2002. Multiresistant clones of *Salmonella enterica*: The importance of dissemination. J. Lab. Clin. Med. **140**:135-141.

Doi, Y., and Y. Arakawa. 2007. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. Clin. Infect. Dis. 45:88-94.

Doublet, B., R. Lailler, D. Meunier, A. Brisabois, D. Boyd, M. R. Mulvey, E. Chaslus-Dancla, and A. Cloeckaert. 2003. Variant *Salmonella* genomic island 1 antibiotic resistance gene cluster in *Salmonella enterica* serovar Albany. Emerg. Infect. Dis. 9:585-591.

Doublet, B., P. Butaye, H. Imberechts, D. Boyd, M. R. Mulvey, E. Chaslus-Dancla, and A. Cloeckaert. 2004. *Salmonella* genomic island 1 multidrug resistance gene clusters in *Salmonella enterica* serovar Agona isolated in Belgium in 1992 to 2002. Antimicrob. Agents Chemother. **48:**2510-2517.

Doublet, B., D. Boyd, M. R. Mulvey, and A. Cloeckaert. 2005. The *Salmonella* genomic island 1 is an integrative mobilizable element. Mol. Microbiol. **55**:1911-1924.

Doublet, B., G. R. Golding, M. R. Mulvey, and A. Cloeckaert. 2008a. Secondary chromosomal attachment site and tandem integration of the mobilizable *Salmonella* genomic island 1. PLoS One **3:**e2060.

Doublet, B., K. Praud, S. Bertrand, J.-M. Collard, F. W. Weill, and A. Cloeckaert. 2008b. Novel insertion sequence- and transposon-mediated genetic rearrangements in genomic island SGI1 of *Salmonella enterica* serovar Kentucky. Antimicrob. Agents Chemother. **52**:3745-3754.

Emborg, H.-D., and A. M. Hammerum (Eds.). 2007. DANMAP 2006. Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark. National Food Institute, Technical University of Denmark, Søborg, Denmark. Unter: http://www.danmap.org/pdfFiles/Danmap_2006.pdf.

European Centre for Disease Prevention and Control. 2008. ECDC surveillance report: quarterly *Salmonella* report Q1 2008, January – March 2008. Unter: http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0912_SUR_Salmonella_Q1_2008.pdf.

European Food Safety Authority. 2008. Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in turkey flocks, Part A. The EFSA Journal. **134**:1-91. Unter: http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/134r.pdf.

European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. 2011. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009. EFSA Journal 2011, **9**:2090. www.efsa.europa.eu/efsajournal.

Fahy, O. L., S. L. Townley, N. J. Coates, I. Clark-Lewis, and S. R. McColl. 2004. Control of *Salmonella* dissemination in vivo by macrophage inflammatory protein (MIP)-3alpha/CCL20. Lab. Invest. **84**:1501-1511.

Fierer, J., and D. G. Guiney. 2001. Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of *Salmonella* infection. J. Clin. Invest. **107**:775-780.

Figurski, D. H., and D. R. Helinski. 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **76**:1648-1652.

Fluit, A. C., and F. J. Schmitz. 2004. Resistance integrons and super-integrons. Clin. Microbiol. Infect. 10:272-288.

Folster, J. P., G. Pecic, A. Bowen, R. Rickert, A. Carattoli, and J. M. Whichard. 2011. Decreased susceptibility to ciprofloxacin among *Shigella* isolates in the United States, 2006 to 2009. Antimicrob. Agents Chemother. **55**:1758-1760.

Frana, T. S., S. A. Carlson, and R. W. Griffith. 2001. Relative distribution and conservation of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium phage type DT104. Appl. Environ. Microbiol. **67:**445–448.

Frech, G., and S. Schwarz. 2000. Molecular analysis of tetracycline resistance in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Typhimurium, Enteritidis, Dublin, Choleraesuis, Hadar and Saintpaul: construction and application of specific gene probes. J. Appl. Microbiol. **89**:633-641.

Frech, G., C. Kehrenberg, and S. Schwarz. 2003. Resistance phenotypes and genotypes of multiresistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium var. Copenhagen isolates from animal sources. J. Antimicrob. Chemother. **51:**180–182.

Galimand, M., P. Courvalin, and T. Lambert. 2003. Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* due to 16S rRNA methylation. Antimicrob. Agents Chemother. **47**:2565-2571.

García-Fernández, A., D. Fortini, K. Veldman, D. Mevius, and A. Carattoli. 2009. Characterization of plasmids harbouring *qnrS1*, *qnrB2* and *qnrB19* genes in *Salmonella*. J. Antimicrob. Chemother. **63**:274-281.

García, P., B. Guerra, M. Bances, M. C. Mendoza, and M. R. Rodicio. 2011. IncA/C plasmids mediate antimicrobial resistance linked to virulence genes in the Spanish clone of the emerging *Salmonella enterica* serotype 4,[5],12:i:-. J. Antimicrob. Chemother. **66**:543-549.

Garrity, G. M., J. A. Bell, and T. G. Lilburn. 2004. Taxonomic outline of Prokariotes. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd Edition. Release 5.0, Springer Verlag, New York, 79-122.

Gay, K., A. Robicsek, J. Strahilevitz, C. H. Park, G. Jacoby, T. J. Barrett, F. Medalla, T. M. Chiller, and D. C. Hooper. 2006. Plasmid-mediated quinolone resistance in non-Typhi serotypes of *Salmonella enterica*. Clin. Infect. Dis. **43**:297–304.

Giraud, E., J. M. Bamforth, G. R. Golding, B. Doublet, A. Cloeckaert, and M. R. Mulvey. 2009. *Salmonella* Genomic Island 1 modulates the expression of virulence-related loci in acidic conditions in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. ASM Conference "*Salmonella*: Biology, Pathogenesis and Prevention", October 2009, Aix-en-Provence, France. Conference proceedings p. 116.

Glynn, M. K., C. Bopp, W. Dewitt, P. Dabney, M. Mokhtar, and F. J. Angulo. 1998. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 infections in the United States. N. Engl. J. Med. **338**:1333-1338.

Gonzalez-Zorn, B., T. Teshager, M. Casas, M. C. Porrero, M. A. Moreno, P. Courvalin, and L. Dominguez. 2005. *armA* and aminoglycoside resistance in *Escherichia coli*. Emerging Infect. Dis. 11:954-956.

Grimont, P. A. D., F. Grimont, and P. Bouvet. 2000. Taxonomy of the Genus *Salmonella*. In: Wray C. and Wray A. (Eds.). *Salmonella* in Domestic Animals. CABI Publishing, Oxon, New York, pp. 1-17.

Grimont, P. A. D., and F.-X. Weill. 2007. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur, Paris, France.

Grundmann, H., S. Hori, and G. Tanner. 2001. Determining confidence intervals when measuring genetic diversity and the discriminatory abilities of typing methods for microorganisms. J. Clin. Microbiol. **39**:4190–4192.

Guardabassi, L., and P. Courvalin. 2006. Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance. In: Aarestrup, F. M. (Ed.), Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. ASM Press, Washington, DC, pp. 1-18.

Guerra, B., S. Soto, S. Cal, and M. C. Mendoza. 2000. Antimicrobial resistance and spread of class 1 integrons among *Salmonella* serotypes. Antimicrob. Agents Chemother. 44:2166-2169.

Guerra, B., S. M. Soto, J. M. Argüelles, and M. C. Mendoza. 2001. Multidrug resistance is mediated by large plasmids carrying a class 1 integron in the emergent *Salmonella enterica* serotype [4,5,12:i:-]. Antimicrob. Agents Chemother. **45**:1305-1308.

Guerra, B., S. Soto, R. Helmuth, and M. C. Mendoza. 2002. Characterization of a self-transferable plasmid from *Salmonella enterica* serotype Typhimurium clinical isolates carrying two integron-borne gene cassettes together with virulence and drug resistance genes. Antimicrob. Agents Chemother. **46**:2977-2981.

Guerra, B., B. Malorny, A. Schroeter, and R. Helmuth. 2003. Multiple resistance mechanisms in fluoroquinolone-resistant *Salmonella* isolates from Germany. Antimicrob. Agents Chemother. **47**:2059.

Guerra, B., E. Junker, and R. Helmuth. 2004a. Incidence of the recently described sulfonamide resistance gene *sul3* among German *Salmonella enterica* strains isolated from livestock and food. Antimicrob. Agents Chemother. **48**:2712-2715.

Guerra, B., E. Junker, A. Miko, R. Helmuth, and M. C. Mendoza. 2004b. Characterization and localization of drug resistance determinants in multidrug-resistant, integron-carrying *Salmonella enterica* serotype Typhimurium strains. Microb. Drug Resist. **10**:83-91.

Guerra, B., R. Helmuth, K. Thomas, J. Beutlich, S. Jahn, and A. Schroeter. 2010. Plasmidmediated quinolone resistance determinants in *Salmonella* spp. isolates from reptiles in Germany. J. Antimicrob. Chemother. **65**:2043-2045.

Guerra, B., K. Thomas, J. Beutlich, L. Cavaco, K. Veldman, R. Helmuth, and A. Schroeter. 2011. Turkey meat as source of plasmid mediated quinolone resistance (PMQR) in *Salmonella*. 21st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, ECCMID, May 2011, Milan, Italy

Guibourdenche, M., P. Roggentin, M. Mikoleit, P. I. Fields, J. Bockemühl, P. A. Grimont, and F.-X. Weill. 2010. Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. Res. Microbiol. 161:26-29.

Hall, R. M. 1997. Mobile gene cassettes and integrons: moving antibiotic resistance genes in gramnegative bacteria. Ciba. Found. Symp. 207:192-202; discussion 202-205.

Hall, R. M. 2010. *Salmonella* genomic islands and antibiotic resistance in *Salmonella enterica*. Future Microbiol. **5**:1525-1538.

Hammerl, J. A., J. Beutlich, S. Hertwig, D. Mevius, E. J. Threlfall, R. Helmuth, and B. Guerra. 2010. pSGI15, a small ColE-like *qnrB19* plasmid of a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strain carrying *Salmonella* genomic island 1 (SGI1). J. Antimicrob. Chemother. **65**:173-175.

Hampton, M. D., E. J. Threlfall, J. A. Frost, L. R. Ward, and B. Rowe. 1995. *Salmonella* Typhimurium DT193: differentiation of an epidemic phage type by antibiogram, plasmid profile, plasmid fingerprint and *Salmonella* plasmid virulence (*spv*) gene probe. J. Appl. Bacteriol. **78**:402-408.

Hansson, K., L. Sundström, A. Pelletier, and P. H. Roy. 2002. *Int12* integron integrase in Tn7. J. Bacteriol. **184**:1712-1721.

Harbottle, H., D. G. White, P. F. McDermott, R. D. Walker, and S. Zhao. 2006. Comparison of multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and antimicrobial susceptibility typing for characterization of *Salmonella enterica* serotype Newport isolates. J. Clin. Microbiol. **44**:2449–2457.

Heinitz, M. L., R. D. Ruble, D. E. Wagner, and S. R. Tatini. 2000. Incidence of *Salmonella* in fish and seafood. J. Food Prot. **63**:579-592.

Helmuth, R., O. Pietzsch, R. Stephan, T. Chakraborty, and E. Bulling. 1984. Gentamicin-resistant *Salmonellae* in turkey rearing, p. 237-242. In: M. Woodbine (Ed.), Antimicrobials and Agriculture. Proceedings of the 4th International Symposium. Butterworths, London, UK.

Helmuth, R., R. Stephan, C. Bunge, B. Hoog, A. Steinbeck, and E. Bulling. 1985. Epidemiology of virulence-associated plasmids and outer membrane protein patterns within seven common *Salmonella* serotypes. Infect. Immun. **48**: 175–182.

Helmuth, R. 2000. Antibiotic resistance in *Salmonella*. In: Wray C. and Wray A.(Eds.), *Salmonella* in Domestic Animals. CABI Publishing, Oxon, New York, pp. 89-106.

Helmuth, R., B. Guerra, B. Malorny, A. Miko, und A. Schroeter. 2004. Erfassung phänotypischer und genotypischer Resistenzeigenschaften bei *Salmonella*- und *E.coli*-Isolaten vom Tier, Lebensmitteln, Futtermitteln und der Umwelt. Unter: http://www.bfr.bund.de/cm/343/erfassung_phaenotypischer_und_genotypischer_resistenzeigenschaften_bei_salmonella_und_e._coli_isolaten_v om_tier_abschlussbericht.pdf.

Helmuth, R., and A. Hensel. 2004. Towards the rational use of antibiotics: results of the first International Symposium on the Risk Analysis of Antibiotic Resistance. J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health. **51**:357-360.

Helmuth. R., A. Schroeter, B. Malorny, A. Miko, and B. Guerra. 2009. Tracing antibiotic resistance along the food chain: why and how. In: Barbosa-Cánovas *et. al.* (Eds.), Global issues in food science and technology. Elsevier Academic Press, 247-262.

Hendriksen, R. S., A. R. Vieira, S. Karlsmose, D. M. Lo Fo Wong, A. B. Jensen, H. C. Wegener, and F. M. Aarestrup. 2011. Global monitoring of *Salmonella* serovar distribution from the World Health Organization Global Foodborne Infections Network country data bank: results of quality assured laboratories from 2001 to 2007. Foodborne Pathog. Dis. Epub ahead of print.

Herrero, A., M. R. Rodicio, M. A. González-Hevia, and M. C. Mendoza. 2006. Molecular epidemiology of emergent multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium strains carrying the virulence resistance plasmid pUO-StVR2. J. Antimicrob. Chemother. **57**:39-45.

Herrero, A., M. R. Rodicio, M. A. Echeita, and M. C. Mendoza. 2008a. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium carrying hybrid virulence-resistance plasmids (pUO-StVR): a new multidrugresistant group endemic in Spain. Int. J. Med. Microbiol. **298**:253-261.

Herrero, A., M. C. Mendoza, R. Rodicio, and M. R. Rodicio. 2008b. Characterization of pUO-StVR2, a virulence-resistance plasmid evolved from the pSLT virulence plasmid of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Antimicrob. Agents Chemother. **52**:4514-4517.

Herrero, A., M. C. Mendoza, E. J. Threlfall, and M. R. Rodicio. 2009. Detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with pUO-StVR2-like virulence-resistance hybrid plasmids in the United Kingdom. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **28**:1087-1093.

Herschleb, J., G. Ananiev, and D. C. Schwartz. 2007. Pulsed-field gel electrophoresis. Nat. Protoc. 2:677-684.

Hopkins, K. L., L. Wootton, M. R. Day, and E. J. Threlfall. 2007. Plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrS1* found in *Salmonella enterica* strains isolated in the UK. J. Antimicrob. Chemother. **59**: 1071–1075.

Horwitz, M. A., R. A. Pollard, M. H. Merson, and S. M. Martin. 1977. A large outbreak of foodborne salmonellosis on the Navajo Nation Indian Reservation, epidemiology and secondary transmission. Am. J. Public Health. 67:1071-1076.

Hühn, S., R. M. La Ragione, M. Anjum, M. Saunders, M. J. Woodward, C. Bunge, R. Helmuth, E. Hauser, B. Guerra, J. Beutlich, A. Brisabois, T. Peters, L. Svensson, G. Madajczak, E. Litrup, A. Imre, S. Herrera-Leon, D. Mevius, D. G. Newell, and B. Malorny. 2010. Virulotyping and antimicrobial resistance typing of *Salmonella enterica* serovars relevant to human health in Europe. Foodborne Pathog. Dis. 7:523-535.

Hunter, P. R., and M. A. Gaston. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson_s index of diversity. J. Clin. Microbiol. **26**:2464–2466.

Huovinen, P. 2001. Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole. Clin. Infect. Dis. 32:1608-1614.

Ibarra, J. A., and O. Steele-Mortimer. 2009. *Salmonella--*the ultimate insider. *Salmonella* virulence factors that modulate intracellular survival. Cell Microbiol. **11**:1579-1586.

Jacoby, G. A. 2005. Mechanisms of resistance to quinolones. Clin. Infect. Dis. 41:S120-126.

Jacoby, G. A., K. E. Walsh, D. M. Mills, V. J. Walker, H. Oh, A. Robicsek, and D. C. Hooper. 2006. *qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. Antimicrob. Agents Chemother. **50**:1178-1182.

Jana, S., and J. K. Deb. 2006. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. Appl. Microbiol. Biotechnol. **70**: 140–150.

Jepson, M. A., M. A. and Clark. 2001. The role of M cells in *Salmonella* infection. Microbes Infect. 3:1183–1190.

Jones, B. D., S. and Falkow. 1996. Salmonellosis: host immune responses and bacterial virulence determinants. Annu. Rev. Immunol. 14:533-561.

Kado, C. I., and S. T. Liu. 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. J. Bacteriol. **145**:1365-1373.

Kehrenberg, C., K. L. Hopkins, E. J. Threlfall, and S. Schwarz. 2007. Complete nucleotide sequence of a small *qnrS1*-carrying plasmid from *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Typhimurium DT193. J. Antimicrob. Chemother. **60**: 903–905.

Kelly, B. G., A. Vespermann, and D. J. Bolton. 2009. The role of horizontal gene transfer in the evolution of selected foodborne bacterial pathogens. Food Chem. Toxicol. 47:951-968.

Khaitsa, M. L., R. B. Kegode, and D. K. Doetkott. 2007. Occurrence of antimicrobial-resistant *Salmonella* species in raw and ready to eat turkey meat products from retail outlets in the midwestern United States. Foodborne Pathog Dis. **4**:517-525.

Kidgell, C., U. Reichard, J. Wain, B. Linz, M. Torpdahl, G. Dougan, and M. Achtman. 2002. *Salmonella typhi*, the causative agent of typhoid fever, is approximately 50,000 years old. Infect. Genet. Evol. **2**:39-45.

Köhler, W., und H. Mochmann. 1980. Grundriß der Medizinischen Mikrobiologie. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart.

Koehn, A. 1970. Technical modification of the swarming plate method according to Sven Gard in Salmonella diagnosis. Zentralbl. Bakteriol. Orig. **215**:449-455.

Kümmerer, K. 2003. Significance of antibiotics in the environment. J. Antimicrob. Chemother. 52:5-7.

Larsson, J. T., M. Torpdahl, R. F. Petersen, G. Sorensen, B. A. Lindstedt, and E. M. Nielsen. 2009. Development of a new nomenclature for *Salmonella* Typhimurium multilocus variable number of tandem repeats analysis (MLVA). Euro Surveill. **14**:19174.

Lehmacher, A., J. Bockemühl, and S. Aleksic. 1995. Nationwide outbreak of human salmonellosis in Germany due to contaminated paprika and paprikapowdered potato chips. Epidemiol. Infect. 115:501–511.

Le Minor, L. 1984. Facultative anaerobic gram-negative rods. In: Holt J. G. and Krieg N. R. (Eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 9th Edition. Williams and Wilkins, Baltimore. 1:427-458.

Le Minor, L., and M. Y. Popoff. 1987. Request for an Opinion. Designation of *Salmonella enterica*. sp. nov., nom. rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*. Int. J. Syst. Bacteriol. **37:**465–468.

Le Minor, L., and M. Y. Popoff. 1992. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars. Institute Pasteur, Paris, France.

Levesque, C., L. Piche, C. Larose, and P. H. Roy. 1995. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. Antimicrob. Agents Chemother. **39**:185-191.

Levings, R. S., D. Lightfoot, S. R. Partridge, R. M. Hall, and S. P. Djordjevic. 2005. The genomic island SGI1, containing the multiple antibiotic resistance region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 or variants of it, is widely distributed in other *S. enterica* serovars. J. Bacteriol. **187**:4401-4409.

Levy, S. B. 2001. Antibacterial household products: cause for concern. Emerg. Infect. Dis. 7:512-515.

Levy, S. B., and B. Marshall. 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. Nat. Med. 10:S122-S129.

Liebana, E., C. Clouting, C. A. Cassar, L. P. Randall, R. A. Walker, E. J. Threlfall, F. A. Clifton-Hadley, A. M. Ridley, and R. H. Davies. 2002. Comparison of *gyrA* mutations, cyclohexane resistance, and the presence of class I integrons in *Salmonella enterica* from farm animals in England and Wales. J. Clin. Microbiol. **40**:1481-1486.

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

Lindstedt, B. A., T. Vardund, L. Aas, and G. Kapperud. 2004. Multiple-locus variablenumber tandem-repeats analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium using PCR multiplexing and multicolor capillary electrophoresis. J. Microbiol. Methods. **59**:163-172.

Lindstedt, B. A. 2005. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. Electrophoresis 26:2567-2582.

Livermore, D. M. 2003. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. Clin. Infect. Dis. 36:S11-23.

Logue, C. M., J. S. Sherwood, P. A. Olah, L. M. Elijah, and M. R. Dockter. 2003. The incidence of antimicrobial-resistant *Salmonella* spp. on freshly processed poultry from US Midwestern processing plants. J. Appl. Microbiol. **94**:16-24.

Madsen, L., F. M. Aarestrup, and J. E. Olsen. 2000. Characterisation of streptomycin resistance determinants in Danish isolates of *Salmonella* Typhimurium. Vet. Microbiol. **75**:73-82.

Maiden, M. C., J. A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J. E. Russell, R. Urwin, Q. Zhang, J. Zhou, K. Zurth, D. A. Caugant, I. M. Feavers, M. Achtman, and B. G. Spratt. 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95:3140-3145.

Majowicz, S. E., J. Musto, E. Scallan, F. J. Angulo, M. Kirk, S. J. O'Brien, T. F. Jones, A. Fazil, and R. M. Hoekstra; International Collaboration on Enteric Disease 'Burden of Illness' Studies. 2010. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. Clin. Infect. Dis. **50**:882–889.

Malorny, B., A. Schroeter, B. Guerra, and R. Helmuth. 2003. Incidence of quinolone resistance in strains of *Salmonella* isolated from poultry, cattle and pigs in Germany between 1998 and 2001. Vet. Rec. **153**:643-648.

Marcus, S. L., J. H. Brumell, C. G. Pfeifer, and B. B. Finlay. 2000. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. Microbes. Infect. **2**:145-156.

Martínez, J. L., and F. Baquero. 2002. Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. Clin. Microbiol. Rev. 15:647-679.

Martínez-Martínez, L., A. Pascual, and G. A. Jacoby. 1998. Quinolone resistance from a transferable plasmid. Lancet. **351**:797-799.

Martínez-Martínez, L., M. E. Cano, J. M. Rodríguez-Martínez, J. Calvo, and A. Pascual. 2008. Plasmid-mediated quinolone resistance. Expert Rev. Anti. Infect. Ther. **6:**685–711.

Mascaretti, O. A. 2003. Bacteria versus antimicrobial agents: an integrated approach. ASM Press, Washington, D.C.

Mazel, D. 2006. Integrons: agents of bacterial evolution. Nat. Rev. Microbiol. 4:608-620.

McClelland, M., K. E. Sanderson, J. Spieth, S. W. Clifton, P. Latreille, L. Courtney, S. Porwollik, J. Ali, M. Dante, F. Du, S. Hou, D. Layman, S. Leonard, C. Nguyen, K. Scott, A. Holmes, N. Grewal, E. Mulvaney, E. Ryan, H. Sun, L. Florea, W. Miller, T. Stoneking, M. Nhan, R. Waterston, and R. K. Wilson. 2001. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. Nature **413**:852-856.

McDermott, P. F., S. Zhao, D. D. Wagner, S. Simjee, R. D. Walker, and D. G. White. 2002. The food safety perspective of antibiotic resistance. Anim. Biotechnol. 13:71-84.

McGhie, E. J., L. C. Brawn, P. J. Hume, D. Humphreys, and V. Koronakis. 2009. *Salmonella* takes control: effector-driven manipulation of the host. Curr. Opin. Microbiol. **12**:117-124.

Methner, U. 2005. Situation of bovine salmonellosis in Germany from 1995-2003 according to the data from the National Animal Disease Reporting System. Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 118:449-455.

Michael, G. B., P. Butaye, A. Cloeckaert, and S. Schwarz. 2006. Genes and mutations conferring antimicrobial resistance in *Salmonella*: an update. Microbes. Infect. 8:1898-1914.

Michael, G. B., M. Cardoso, and S. Schwarz. 2008. Molecular analysis of multiresistant porcine *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Bredeney isolates from Southern Brazil: identification of resistance genes, integrons and a group II intron. Int. J. Antimicrob. Agents. **32**:120-129.

Miko, A., K. Pries, A. Schroeter, and R. Helmuth. 2003. Multiple-drug resistance in D-tartratepositive *Salmonella enterica* serovar Paratyphi B isolates from poultry is mediated by class 2 integrons inserted into the bacterial chromosome. Antimicrob. Agents Chemother. **47**:3640-3643.

Miko, A., K. Pries, A. Schroeter, and R. Helmuth. 2005. Molecular mechanisms of resistance in multidrug-resistant serovars of *Salmonella enterica* isolated from foods in Germany. J. Antimicrob. Chemother. **56**:1025-1033.

Molla, B., A. Miko, K. Pries, G. Hildebrandt, J. Kleer, A. Schroeter, and R. Helmuth. 2007. Class 1 integrons and resistance gene cassettes among multidrug resistant *Salmonella* serovars isolated from slaughter animals and foods of animal origin in Ethiopia. Acta Trop. **103**:142–149.

Mulvey, M. R., D. A. Boyd, A. B. Olson, B. Doublet, and A. Cloeckaert. 2006. The genetics of *Salmonella* genomic island 1. Microbes. Infect. 8:1915-1922.

Munnoch, S. A., K. Ward, S. Sheridan, G. J. Fitzsimmons, C. T. Shadbolt, J. P. Piispanen, Q. Wang, T. J. Ward, T. L. Worgan, C. Oxenford, J. A. Musto, J. McAnulty, and D. N. Durrheim. 2009. A multi-state outbreak of *Salmonella* Saintpaul in Australia associated with cantaloupe consumption. Epidemiol. Infect. **137**:367-374.

Nde, C. W., and C. M. Logue. 2008. Characterization of antimicrobial susceptibility and virulence genes of *Salmonella* serovars collected at a commercial turkey processing plant. J. Appl. Microbiol. **104**:215–223.

Ng, L.-K., M. R. Mulvey, I. Martin, G. A. Peters, and W. Johnson. 1999. Genetic characterization of antimicrobial resistance in Canadian isolates of *Salmonella* serovar Typhimurium DT104. Antimicrob. Agents Chemother. **43**: 3018–3021.

Ohl, M. E., and S. I. Miller. 2001. *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. Annu. Rev. Med. **52**:259-274.

Olive, D. M., and P. Bean. 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. J. Clin. Microbiol. **37**:1661-1669.

Olsen, J. E., D. J. Brown, M. N. Skov, and J. P. Christensen. 1993. Bacterial typing methods suitable for epidemiological analysis. Applications in investigations of Salmonellosis among livestock. Vet. Q. **15**:125-135.

Orman, B. E., S. A. Piñeiro, S. Arduino, M. Galas, R. Melano, M. I. Caffer, D. O. Sordelli, and D. Centrón. 2002. Evolution of multiresistance in nontyphoid Salmonella serovars from 1984 to 1998 in Argentina. Antimicrob. Agents Chemother. **46**:3963-3970.

Pallecchi, L., E. Riccobono, S. Sennati, A. Mantella, F. Bartalesi, C. Trigoso, E. Gotuzzo, A. Bartoloni, and G. M. Rossolini. 2010. Characterization of small ColE-like plasmids mediating widespread dissemination of the *qnrB19* gene in commensal enterobacteria. Antimicrob. Agents Chemother. 54:678-682.

Pallecchi, L., E. Riccobono, A. Mantella, C. Fernandez, F. Bartalesi, H. Rodriguez, E. Gotuzzo, A. Bartoloni, and G. M. Rossolini. 2011. Small *qnrB*-harbouring ColE-like plasmids widespread in commensal enterobacteria from a remote Amazonas population not exposed to antibiotics. J. Antimicrob. Chemother. **66**:1176-1178.

Papadopoulou, C., R. H. Davies, J. J. Carrique-Mas, and S. J. Evans. 2009. *Salmonella* serovars and their antimicrobial resistance in British turkey flocks in 1995 to 2006. Avian Pathol. **38**:349-357.

Park, C. H., A. Robicsek, G. A. Jacoby, D. Sahm, and D. C. Hooper. 2006. Prevalence in the United States of aac(6')-Ib-cr encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. Antimicrob. Agents Chemother. **50**:3953-5.

Partridge, S. R., H. J. Brown, H. W. Stokes, and R. M. Hall. 2001. Transposons Tn*1696* and Tn*21* and their integrons In4 and In2 have independent origins. Antimicrob. Agents Chemother. **45**:1263-1270.

Perreten V., and P. Boerlin. 2003. A new sulfonamide resistance gene (*sul3*) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland. Antimicrob. Agents Chemother. **47:**1169-1172.

Piddock, L. J. 2002. Fluoroquinolone resistance in *Salmonella* serovars isolated from humans and food animals. FEMS Microbiol. Rev. **26**:3-16.

Pires, S. M., E. G. Evers, W. van Pelt, T. Ayers, E. Scallan, F. J. Angulo, A. Havelaar, T. Hald, and the Med-Vet-Net Workpackage 28 Working Group. 2009. Attributing the human disease burden of foodborne infections to specific sources. Foodborne Pathog. Dis. 6:417–424.

Popoff, M. Y., J. Bockemühl, and A. McWhorter-Murlin. 1994. Supplement 1993 (no. 37) to the Kauffmann-White scheme. Res. Microbiol. **145:**711-716.

Popoff, M. Y., and L. Le Minor. 2001. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars, 8th Revision. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella, Institut Pasteur, Paris, France.

Popoff, M. Y., J. Bockemühl, and L. L. Gheesling. 2004. Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann–White scheme. Res. Microbiol. **155**:568-570.

Poppe, C., L. Martin, A. Muckle, M. Archambault, S. McEwen, and E. Weir. 2006. Characterization of antimicrobial resistance of *Salmonella* Newport isolated from animals, the environment, and animal food products in Canada. Can. J. Vet. Res. **70**:105-114.

Porwollik, S., E. F. Boyd, C. Choy, P. Cheng, L. Florea, E. Proctor, and M. McClelland. 2004. Characterization of *Salmonella enterica* subspecies I genovars by use of microarrays. J. Bacteriol. **186**:5883-5898.

Rankin, S. C., H. Aceto, J. Cassidy, J. Holt, S. Young, B. Love, D. Tewari, D. S. Munro, and C. E. Benson. 2002. Molecular characterization of cephalosporin-resistant *Salmonella enterica* serotype Newport isolates from animals in Pennsylvania. J. Clin. Microbiol. **40**:4679-4684.

Recchia, G. D., and R. M. Hall. 1995. Gene cassettes: a new class of mobile element. Microbiology. 141:3015-3027.

Reeves, M. W., G. M. Evins, A. A. Heiba, B. D. Plikaytis, and J. J. Farmer III. 1989. Clonal nature of *Salmonella* Typhi and its genetic relatedness to other *salmonellae* as shown by multilocus enzyme electrophoresis and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. J. Clin. Microbiol. **27:**313–320.

Reeves, P. R., M. Hobbs, M. A. Valvano, M. Skurnik, C. Whitfield, D. Coplin, N. Kido, J. Klena, D. Maskell, C. R. Raetz, and P. D. Rick. 1996. Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature. Trends Microbiol. 4:495-503.

Reissbrodt, R. 1995. 9. Alternative Methoden der Isolierung und Identifizierung von Salmonellen. In: Kühn, H., Tschäpe, H. (Hrsg.): Salmonellosen des Menschen. Epidemiologische und ätiologische Aspekte. RKI-Schriften, Medizin Verlag München. **3**:105-117.

Riley, L. W. 2004. Molecular epidemiology of infectious diseases: principles and practices. ASM Press, Washington, p.337.

Robert Koch-Institut. 2006. Epidemiologisches Bulletin Nr.41 vom 13. Oktober 2006.

Robert Koch-Institut. 2009. Epidemiologisches Bulletin Nr.13 vom 30. März 2009.

Robicsek, A., G. A. Jacoby, and D. C. Hooper. 2006. The worldwide emergence of plasmidmediated quinolone resistance. Lancet Infect. Dis. 6:629-640.

Roche Molecular Biochemicals. 1995. The DIG System User's Guide for Filter Hybridization. Boehringer Mannheim.

Rodicio, M. R.; A. Herrero, I. Rodríguez, P. García, I. Montero, J. Beutlich, R. Rodicio, B. Guerra, and M. C. Mendoza. 2011. Acquisition of antimicrobial resistance determinants by virulence plasmids specific for nontyphoid serovars of *Salmonella enterica*. Rev. Med. Microbiol. 22:55-65.

Rodríguez, I., W. Barownick, R. Helmuth, M. C. Mendoza, M. R. Rodicio, A. Schroeter, and B. Guerra. 2009. Extended-spectrum ß-lactamases and AmpC ß-lactamases in ceftiofur-resistant *Salmo-nella enterica* isolates from food and livestock obtained in Germany during 2003-07. J. Antimicrob. Chemother. **64**:301-309.

Rodríguez, I., B. Guerra, M. C. Mendoza, and M. R. Rodicio. 2011. pUO-SeVR1 is an emergent virulence-resistance complex plasmid of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. J. Antimicrob. Chemother. **66**:218-220.

Rodríguez-Martínez, J. M., M. E. Cano, C. Velasco, L. Martínez-Martínez, and A. Pascual. 2011. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. J. Infect. Chemother. 17:149-182.

Rotger, R., and J. Casadesús. 1999. The virulence plasmids of *Salmonella*. Int. Microbiol. 2:177-184.

Rowe-Magnus, D. A., and D. Mazel. 2002. The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. Int. J. Med. Microbiol. **292**:115-125.

Ruiz, J. 2003 Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. J. Antimicrob. Chemother. **51**:1109-1117.

Rychlik, I., D. Gregorova, and H. Hradecka. 2006. Distribution and function of plasmids in *Salmo-nella enterica*. Vet. Microbiol. **112**:1-10.

Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sandvang, D., F. M. Aarestrup, and L. B. Jensen. 1997. Characterization of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella typhimurium* DT104. FEMS Microbiol. Lett. 160:37–41.

Sangal, V., H. Harbottle, C. J. Mazzoni, R. Helmuth, B. Guerra, X. Didelot, B. Paglietti, W. Rabsch, S. Brisse, F. X. Weill, P. Roumagnac, and M. Achtman. 2010. Evolution and population structure of *Salmonella enterica* serovar Newport. J. Bacteriol. **192**:6465-6476.

Schneidereit, M. 2006. Antibiotikaeinsatz in der Veterinärmedizin – Situation in Deutschland und anderen europäischen Veredelungsregionen. Präsentation für den Bundesverband für Tiergesundheit auf der 20. Jahrestagung der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie im September 2006, Bonn. Unter: http://www.bft-online.de/schwerpunktthemen/vortrag-antibiotikaeinsatz-in-der-veterinaermedi-zin/.

Schmidt, H., and M. Hensel. 2004. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. Clin. Microbiol. Rev. 17:14-56.

Schroeter, A., B. Hoog, and R. Helmuth. 2004. Resistance of *Salmonella* isolates in Germany. J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health. **51**:389-392.

Schwarz, S., and E. Chaslus-Dancla. 2001. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. Vet. Res. **32**:201-225.

Schwarz, S., C. Kehrenberg, B. Doublet, and A. Cloeckaert. 2004. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. FEMS Microbiol. Rev. 28:519-542.

Schwarz, S., A. Cloeckaert, and M. C. Roberts. 2006. Mechanisms and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents. In: Aarestrup, F. M. (Ed.), Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. ASM Press, Washington, D. C., pp. 73-98.

Selbitz, H.-J., H.-J. Sinell, A. Sziegoleit, and J. Kleer. 1995. Das Salmonellen-Problem. Salmonellen als Erreger von Tierseuchen und Zoonosen. VET special, Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart.

Selbitz, H.-J. 2002. Bakterielle Krankheiten der Tiere In: Mayr A. (Ed.). Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, Enke Verlag, Stuttgart, 417-588.

Shaw, K. J., P. N. Rather, R. S. Hare, and G. H. Miller. 1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. Microbiol. Rev. 57: 138–163.

Sköld, O. 2001. Resistance to trimethoprim and sulfonamides. Vet. Res. 32:261-273.

Sørum, H., and T. M. L'Abee-Lund. 2002 Antibiotic resistance in food-related bacteria--a result of interfering with the global web of bacterial genetics. Int. J. Food Microbiol. **78**:43-56.

Srinivasan, A., and S. J. McSorley. 2006. Activation of *Salmonella*-specific immune responses in the intestinal mucosa. Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.). **54**:25-31.

Su, L. H, and C. H. Chiu. 2007. *Salmonella*: clinical importance and evolution of nomenclature. Chang Gung Med. J. **30**:210-219.

Suggs, S. V., R. B. Wallace, T. Hirose, E. H. Kawashima, and K. Itakura. 1981. Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: isolation of cloned cDNA sequences for human beta 2-microglobulin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **78**:6613-6617.

Sukhnanand, S., S. Alcaine, L. D. Warnick, W.-L. Su, J. Hof, M. P. J. Craver, P. McDonough, K. J. Boor, and M. Wiedmann. 2005. DNA sequence-based subtyping and evolutionary analysis of selected *Salmonella enterica* serotypes. J. Clin. Microbiol. **43**:3688–3698.

Switt, A. I., Y. Soyer, L. D. Warnick, and M. Wiedmann. 2009. Emergence, distribution, and molecular and phenotypic characteristics of *Salmonella enterica* serotype 4,5,12:i:-. Foodborne Pathog. Dis. 6:407-415.

Tamamura, Y., I. Uchida, K. Tanaka, H. Okazaki, S. Tezuka, H. Hanyu, N. Kataoka, S. Makino, M. Kishima, T. Kubota, T. Kanno, S. Hatama, R. Ishihara, E. Hata, H. Yamada, Y. Nakaoka, and M. Akiba. 2011. Molecular epidemiology of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates from cattle in Hokkaido, Japan: evidence of clonal replacement and characterization of the disseminated clone. Appl. Environ. Microbiol. **77**:1739-1750.

Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, and B. Swaminathan. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J. Clin. Microbiol. 33:2233-2239.

Threlfall, E. J., and J. A. Frost. 1990. The identification, typing and fingerprinting of *Salmonella*: laboratory aspects and epidemiological applications. J₂ Appl. Bacteriol. **68**:5-16.

Threlfall, E. J., M. D. Hampton, H. Chart, and B. Rowe. 1994. Identification of a conjugative plasmid carrying antibiotic resistance and *Salmonella* plasmid virulence (*spv*) genes in epidemic strains of *Salmonella* Typhimurium phage type 193. Lett. Appl. Microbiol. **18**:82-85.

Threlfall, E. J. 2002. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in foodand water-borne infections. FEMS Microbiol. Rev. **26**:141-148.

Threlfall, E. J., I. S. Fisher, C. Berghold, P. Gerner-Smidt, H. Tschäpe, M. Cormican, I. Luzzi, F. Schnieder, W. Wannet, J. Machado, and G. Edwards. 2003. Antimicrobial drug resistance in isolates of *Salmonella enterica* from cases of salmonellosis in humans in Europe in 2000: results of international multi-centre surveillance. Euro Surveill. 8:41-45.

Tindall, B. J., P. A. Grimont, G. M. Garrity, and J. P. Euzeby. 2005. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **55**:521-524.

Tomizawa, J., and T. Som. Control of ColE1 plasmid replication: enhancement of binding of RNAI to the primer transcript by the Rom protein. Cell. **38**: 871–878.

Torpdahl, M., M. N. Skov, D. Sandvang, and D. L. Baggesen. 2005. Genotypic characterization of *Salmonella* by multilocus sequence typing, pulsedfield gel electrophoresis and amplified fragment length polymorphism. J. Microbiol. Methods **63:**173–184.

Tran, J. H., and G. A. Jacoby. 2002. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99:5638-5642.

Uzzau, S., D. J. Brown, T. Wallis, S. Rubino, G. Leori, S. Bernard, J. Casadesús, D. J. Platt, and J. E. Olsen. 2000. Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. Epidemiol. Infect. **125**:229–255.

van Asten, A. J., and J. E. van Dijk. 2005. Distribution of "classic" virulence factors among *Salmonella* spp. FEMS Immunol. Med. Microbiol. **44**:251-259.

Vandenbosch, J. L., D. K. Rabert, D. R. Kurlandsky, and G. W. Jones. 1989. Sequence analysis of *rsk*, a portion of the 95-kilobase plasmid of *Salmonella* Typhimurium associated with resistance to the bactericidal activity of serum. Infect. Immun. **57**:850-857.

van Essen-Zandbergen, A., H. Smith, K. Veldman, and D. Mevius. 2007. Occurrence and characteristics of class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Campylobacter* spp. in the Netherlands. J. Antimicrob. Chemother. **59**:746-750.

Veldman, K., W. van Pelt, and D. Mevius. 2008. First report of *qnr* in *Salmonella* in The Netherlands. J. Antimicrob. Chemother. **61**:452–453.

Veldman, K., L. M. Cavaco, D. Mevius, A. Battisti, A. Franco, N. Botteldoorn, M. Bruneau, A. Perrin-Guyomard, T. Cerny, C. De Frutos Escobar, B. Guerra, A. Schroeter, M. Gutierrez, K. Hopkins, A. L. Myllyniemi, M. Sunde, D. Wasyl, and F. M. Aarestrup. 2011. International collaborative study on the occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolated from animals, humans, food and the environment in 13 European countries. J. Antimicrob. Chemother. **66**:1278-1286.

Vo, A. T., E. van Duijkeren, A. C. Fluit, and W. Gaastra. 2007. A novel *Salmonella* genomic island 1 and rare integron types in *Salmonella* Typhimurium isolates from horses in The Netherlands. Antimicrob. Agents Chemother. **59:**594-599.

Walker, R. A., E. Lindsay, M. J. Woodward, L. R. Ward, and E. J. Threlfall. 2001. Variation in clonality and antibiotic-resistance genes among multiresistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium phage type U302 (MR U302) from humans, animals and foods. Microb. Drug Resist. **7:**13–21.

Walsh, C. 2003. Antibiotics: Actions, origins, resistance. ASM Press, Washington, DC.

Wang, M., J. H. Tran, G. A. Jacoby, Y. Zhang, F. Wang, and D. C. Hooper. 2003. Plasmidmediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. Antimicrob. Agents Chemother. **47**:2242-2248.

Wang, M., Q. Guo, X. Xu, X. Wang, X. Ye, S. Wu, D. C. Hooper, and M. Wang. 2009. New plasmid-mediated quinolone resistance gene, *qnrC*, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. Antimicrob. Agents Chemother. **53**:1892-1897. Webber, M. A., L. P. Randall, S. Cooles, M. J. Woodward, and L. J. Piddock. 2008. Triclosan resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. J. Antimicrob. Chemother. **62**:83-91.

Wegener, H. C., L. Baggesen, J. Neimann, and S. V. Nielsen. 1997. An outbreak of human salmonellosis in Denmark caused by alfalfa sprouts, p. 587-589. In: Proceedings and abstracts of the International Symposium on Salmonella and Salmonellosis, Ploufragan, France.

Weill, F. X., L. Fabre, B. Grandry, P. A. Grimont, and I. Casin. 2005. Multiple-antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serotype Paratyphi B isolates collected in France between 2000 and 2003 is due mainly to strains harboring *Salmonella* genomic islands 1, 1-B, and 1-C. Antimicrob. Agents Chemother. **49:**2793-2801.

White, D. G., J. D. Goldman, B. Demple, and S. B. Levy. 1997. Role of the *acrAB* locus in organic solvent tolerance mediated by expression of *marA*, *soxS*, or *robA* in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **179**:6122-6126.

White, P. A., C. J. McIver, and W. D. Rawlinson. 2001. Integrons and gene cassettes in the enterobacteriaceae. Antimicrob. Agents Chemother. 45:2658–2661.

White, D. G., S. Zhao, R. Singh, P. F. McDermott. 2004. Antimicrobial resistance among gramnegative foodborne bacterial pathogens associated with foods of animal origin. Foodborne Pathog. Dis. 1:137-152.

Wichelhaus, T. A., V. Schäfer, und V. Brade. 2000. Typisierungsverfahren in der Infektionsepidemiologie. Chemother. J. 2:93-98.

World Health Organization. 2001. WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance. WHO/CDS/CSR/DRS/2001.2. Unter: http://www.who.int/csr/resources/publications/drug-resist/en/EGlobal_Strat.pdf.

World Health Organization. 2005. Drug-resistant Salmonella. Fact Sheet No. 139. Unter: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/.

Wright, G. D. 2005. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. Adv. Drug Deliv. Rev. 57:1451-1470.

Wright, G. D. 2010. Q&A: Antibiotic resistance: where does it come from and what can we do about it? BMC Biol. 8:123.

Yan, S. S., M. L. Pendrak, B. Abela-Ridder, J. W. Punderson, D. P. Fedorko, and S. L. Foley. **2003.** An overview of *Salmonella* typing: Public health perspectives. Clin. Applied Immunol. Rev. **4**:189–204.

Zhao, S., P. J. Fedorka-Cray, S. Friedman, P. F. McDermott, R. D. Walker, S. Qaiyumi, S. L. Foley, S. K. Hubert, S. Ayers, L. English, D. A. Dargatz, B. Salamone, and D. G. White. 2005. Characterization of *Salmonella* Typhimurium of animal origin obtained from the National Antimicrobial Resistance Monitoring System. Foodborne Pathog. Dis. **2:**169–181.

Internet-Referenzen

http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0611_SUR_Enternet_Quarterly_Salmonella_Report_06_3.pdf www.eucast.org

http://www.ktbl.de/index.php?id=94&no_cache=1

http://www.lahey.org/Studies/

http://www.medvetnet.org/pdf/Reports/Appendix_2_Workpackage_9.doc

http://www.mlst.net/

http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica/

http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica/documents/primersEnterica_html

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/

http://www3.rki.de/SurvStat

8 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die diesen Weg mit mir gemeinsam gegangen sind und zum Gelingen meiner Dissertation maßgeblich beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Bernd Appel danke ich ganz herzlich für die Möglichkeit meine Dissertation in der Abteilung Biologische Sicherheit am Bundesinstitut für Risikobewertung anfertigen zu dürfen und für die Begutachtung dieser Arbeit. Ebenso herzlichsten Dank auch an Herrn Prof. Dr. Rupert Mutzel für die Begutachtung meiner Dissertation.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Beatriz Guerra für die Bereitstellung des spannenden Themas und die großartige Betreuung. Bea, ich danke Dir, dass ich soviel bei Dir lernen durfte und Du mich all die Jahre immer mit uneingeschränkter Hilfsbereitschaft, konstruktiven Ratschlägen, unermüdlichem Engagement und Deiner Freundschaft, begleitet und unterstützt hast. Muchas gracias!

Bei Herrn Dr. Reiner Helmuth bedanke ich mich für die Aufnahme nach unserem "Umzug" in die Fachgruppe 46 und für die Durchsicht dieser Arbeit. Auch vielen Dank an meinen früheren Fachgruppenleiter Herrn Dr. Karsten Nöckler für seine Unterstützung und die Möglichkeit in seiner Fachgruppe arbeiten zu können.

Besonders bedanken möchte ich mich außerdem bei den zahlreichen Einsendern der Isolate. Vielen Dank an Herrn Dr. Wolfgang Rabsch für die *S*. Saintpaul Humanisolate und an Herrn Prof. Dr. Dik Mevius für die niederländischen *S*. Saintpaul Geflügelisolate. Frau Dr. Annemarie Käsbohrer danke ich für ihr Engagement und für die Bereitstellung sämtlicher Informationen bezüglich des Puten-Monitoring-Programms.

Many thanks to all the MedVetNet partners, especially all the members of the WP21 working group. Thank you very much for the great cooperation, the supply with isolates, interesting meetings and funny evenings. My warmest thanks to Prof. Dr. Dik Mevius and Prof. Dr. John Threlfall for their believe in me and the opportunity to be part of this group. (Dik, for further information please ask the work package leader ;-)).

I also thank the MedVetNet team for allowing me to improve my practical skills at the University of Oviedo in Spain. I am especially thankful to Dr. Maria Rosario Rodicio and Dr. Maria Carmen Mendoza for their warm welcome and their support during my stay. Thank you Charo for all your ideas and that you are still there for me.

Besonderer Dank gilt ebenfalls der gesamten Fachgruppe 46 ohne deren Hilfe diese Arbeit gar nicht möglich gewesen wäre. Danke für Eure stets "offenen Ohren", Euer Wissen, die tolle Arbeitsatmosphäre und die überlebenswichtige Gummibärchen-Versorgung. Reiner, Dankeschön für Dein Vertrauen in mich, Dein Fachwissen, die motivierenden Worte und Gespräche. Andreas vielen Dank für die Resistenztestungen und die Phagentypie. Burkhard, Cornelia, Ernst und Istvan, danke auch an Euch für Eure Hilfe und Unterstützung. Ernst, danke außerdem für die "schriftlichen Tests" und dafür dass ich keine Benzolringe aus dem Lager holen musste. Gabi, Franzi, Johanna, Manu und Martha vielen Dank für Eure Hilfsbereitschaft und die Serotypisierung meiner Isolate. Katharina, Dir ein besonderes Dankeschön für die ganzen Resistenztestungen und für Deinen sportlichen Beistand innerhalb und außerhalb des Labors.

Ein ganz großes Dankeschön an meine Labormädels/jungs Bea, Jana B., Jana S., Jennie, Robert, Silke und Silvia für Eure Hilfsbereitschaft, all die lustigen Momente und aufmunternden Worte. Irene, thanks a lot for your help and support here and in Spain. Many thanks also to my labmades in Berlin during this time Belen, Maria, Marian and Dilek.

Muchas gracias as well to all my Spanish labmades in Oviedo, especially to Patri, Mateo and Nacho for making my first stay in Asturias really unforgetable. Thank you for all the jokes, Covadonga and the introduction in the secrets of how to serve cider!

Danke auch an meine "alte" Fachgruppe 45 – insbesondere den Kollegen von "hinter der Glastür" Alessandro, Alex, Angelika, Annika, Conny, das Enno, Gabi, Peter und Sabine; aber natürlich auch Anita, Antje, Barbara und Dorothea. Dr. Stefan Hertwig und Jens Hammerl danke ich insbesondere für die tolle Zusammenarbeit bei der Sequenzierung des *qnrB19*-Plasmids. Danke Barni für Deine Unterstützung und Ideen sowohl in unserem alten als auch neuen Labor.

Ich denke sehr gerne an die Zeit mich Euch zurück und danke Euch dafür, dass ihr nach wie vor für mich da seid.

Ein riesengroßes Dankeschön an meine Formatierungsexpertin Frau Dr. Britta Kraushaar. Danke Britta für Deine Geduld und Deine Unterstützung bei der optischen Gestaltung dieser Arbeit!

Ein besonderes Dankeschön ebenfalls an meine Doppelhelixspezialistin und künstlerische Beraterin Frau Beatrice Baumann. Bea, vielen Dank für die Hilfe bei der Titelbildgestaltung und Deiner dafür geopferten Freizeit!

Danke ebenfalls an den gesamten Doktorandenstammtisch für viele lustige, schöne und unvergessliche Abende.

Das größte Dankeschön gilt meiner Familie und meinen Freunden für ihr Verständnis, ihre Rücksichtsnahme und die moralische Unterstützung in der Zeit der Umsetzung dieses Dissertationsvorhabens. Vielen Dank besonders an meine Eltern Petra und Jürgen, die mir immer den Rücken gestärkt und mich in allen Lebenslagen bedingungslos unterstützt haben! Danke auch an meine Schwester Yvonne, ohne die alles nur halb so lustig wäre ("Ein Indianer kennt keinen Schmerz, uns fehlen die Enzyme!").

Andrej, danke, dass Du mich durch alle Höhen und Tiefen geduldig begleitet hast, fürs Zuhören, Dein Verständnis und dass Du immer für mich da bist!

9 LEBENSLAUF

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Due to protection of data privacy the curriculum vitae is not included.


Tabelle A1a: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide.

			Primer			Amplikon-	PCR-Be	edingungen	
	Gen/Region	Funktion	Bezeichnung	Sequenz 5 '- 3'	Accession Nr.	Referenz	Größe (bp)	T _a (° C)	t _e (min)
	Klasse 1 Integron	variable Region	[5'CS/3'CS]	[GGCATCCAAGCAGCAAG / AAGCAGACTTGACCTGA]	U12338	Lévesque et al., 1995	variabel	58	02:00
	Klasse 2 Integron	variable Region	[Hep-74/51]	[CGGGATCCCGGACGGCATGCACGATTTGTA / GATGCCATCGCAAGTACGAG]	AJ002782	White et al., 2001	variabel	65	03:00
	int1	Integrase1	[Int1-F/B]	[GCCTTGCTGTTCTTCTAC / GATGCCTGCTTGTTCTAC]	X12870	Ng et al. ,1999	558	55	00:30
	rcr1 (orf513)	Mobilisierungsprotein für CR1	[rcr1-F/B]	[AATCGCCCACTCAAACAAAC / CAGACGCTCGTGATGACAAT]	AY123253	Beutlich et al ., 2011	223	60	00:30
	qacE∆1	R-quaternäre Ammoniumverbindung	[qacE∆1-F/B]	[ATCGCAATAGTTGGCGAAGT / CAAGCTTTTGCCCATGAAGC]	X15370	Sandvang et al., 1997	226	60	00:20
SUL	sul1	Folsäure- Inhibitor (DHPS-I-Synthase)	[sul1-F/B]	[CTTCGATGAGAGCCGGCGGC / GCAAGGCGGAAACCCGCGCC]	X12869	Sandvang et. al., 1997	436	65	00:30
	sul2	Folsäure- Inhibitor (DHPS-II-Synthase)	[sul2-F/B]	[TCAACATAACCTCGGACAGT / GATGAAGTCAGCTCCACCT]	M36657	Chu et al. , 2001	707	58	00:40
	sul3	Folsäure- Inhibitor (DHPS-III-Synthase)	[sul3-F/B]	[GAGCAAGATTTTTGGAATCG / CATCTGCAGCTAACCTAGGGCTTTGGA]	AJ459418	Perreten & Boerlin, 2003	789	51	00:40
AMP	bla _{TEM-1}	ß-Laktamase	[OT-1/2]	[TTGGGTGCACGAGTGGGT / TAATTGTTGCCGGGAAGC]	AF126482	Arlet & Phillippon, 1991	503	55	00:30
	bla _{PSE-1}	Carbenicillinase	[pse1-F/B]	[CGCTTCCCGTTAACAAGTAC / CTGGTTCATTTCAGATAGCG]	M69058	Sandvang et al., 1997	419	65	00:30
	<i>bla</i> _{OXA-1} -like	Oxacillinase	[oxa1-F/B]	[AGCAGCGCCAGTGCATCA / ATTCGACCCCAAGTTTCC]	AJ009819	Guerra et al ., 2000	708	59	00:30
GEN	aacC2	N-Acetyltransferase	[aac(3)-II-F/B]	[ATTCGAAAACTCGGAGTC / CGGAGTGGCTCCGAAGTG]	X51534	B. Guerra unpublished	800	55	00:40
	aacC4	N-Acetyltransferase	[aac(3)-IV F/B]	[GTTACACCGGACCTTGGA / AACGGCATTGAGCGTCAG]	X01385	Guerra et al., 2001	674	60	00:40
	aadB	O-Adenyltransferase	[aadB-F/B]	[GAGCGAAATCTGCCGCTCTGG / CTGTTACAACGGACTGGCCGC]	AF078527	Frana et al ., 2001	350	70	00:30
	aac(3)-le	N-Acetyltransferase	[aac(3)-le-F/B]	[GCAACAAGCCGTCATCAA / CTCTGCTCAACCGCAATGTC]	AY463797	B. Aranda unpublished	358	55	00:30
	armA	16S rRNA Methylase	[armA-F/B]	[GGTGCGAAAACAGTCGTAGT / TCCTCAAAATATCCTCTATGT	AY522431.4	González et al., 2005	776	54	01:00
STR	aadA1 -like	O-Adenyltransferase	[aadA1-F/B]	[GTGGATGGCGGCCTGAAGCC / ATTGCCCAGTCGGCAGCG]	M10241	Sandvang et al ., 1997	526	70	00:30
	aadA2	O-Adenyltransferase	[aadA2-F/B]	[TGT TGG TTA CTG TGG CCG TA / GAT CTC GCC TTT CAC AAA GC]	AF071555	Walker et al., 2001	622	60	00:40
	aadA7	O-Adenyltransferase	{aadA7-F/B]	[TCGTCGATCTCTTGGAGGTTT / CTGCGGTGTACCAGATACGAG	AF224733	B. Aranda unpublished	798	66	00:40
	strA	O-Phosphotransferase	[strA-F/B]	[CCTGGTGATAACGGCAATTC / CCAATCGCAGATAGAAGG]	M28829	Madsen et al., 2000	548	60	00:40
	strB	O-Phosphotransferase	[strB-F/B]	[ATCGTCAAGGGATTGAAACC / GGATCGTAGAACATATTGGC]	M28829	Madsen et al., 2000	509	60	00:40
KAN	aphA1	O-Phosphotransferase	[aphA1-IAB-F/B]	[AAACGTCTTGCTCGAGGC / CAAACCGTTATTCATTCGTGA]	AF024666	Frana et al. , 2001	461	60	00:40
	aphA2 (Kn)	O-Phosphotransferase	[Kn-F/B]	[ACTGGCTGCTATTGGGCGA / CGTCAAGAAGGCGATAGAAGG]	U66885	Frana et al. , 2001	516	60	00:40
	aac(6')-1b	N-Acetyltransferase	[aac(6')-1b-F/B]	[TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA / CTCGAATGCCTGGCGTGTTT]	AY884051	Park et. al., 2006	482	55	00:45
TMP	dfrA1-like	DHFR-la Reduktase	[dfrA1-like-F/B]	[GTGAAACTATCACTAATGG / CCCTTTTGCCAGATTTGG]	Z83311	Guerra et al., 2000	473	55	00:30
	dfrA10	DHFR Reduktase	[dfrA10-F/B]	[TGTCATTGGTGGTGTTGGTT / CAGCGAAGCTGGTCTAACAA]	AY123253	Beutlich et al ., 2011	231	60	00:30
	dfrA12	DHFR-XII Reduktase	[dfrA12-F/B]	[ACTCGGAATCAGTACGCA / GTGTACGGAATTACAGCT]	AF175203	Guerra et al., 2001	462	55	00:30
	dfrA17	DHFR Reduktase	[dfrA17-F/B]	[GATTTCTGCAGTGTCAGA / CTCAGGCATTATAGGGAA]	AF220757	Guerra et al., 2004b	384	55	00:30
	dfrA5-14	DHFR Reduktase	[dfrA5/A14-F/B]	[GATTGGTTGCGGTCCA / CTCAAAAACAACTTCGAAGG]		Frech et. al. , 2003	379	55	00:30
	dfrA7-17	DHFR Reduktase	[dfrA7/A17-F/B]	[CAGAAAATGGCGTAATCG / TCACCTTCAACCTCAACG]		Frech et. al. , 2003	345	55	00:30

CHL	catA1	CHL-Acetyltransferase	[catA1-like-F/B]	[CCACCGTTGATATATCCC / CCTGCCACTCATCGCAGT]	U46780	Guerra et al., 2001	623	60	00:30
	cmIA1	Efflux-Protein CML	[cmIA-F/B]	[TGTCATTTACGGCATACTCG / ATCAGGCATCCCATTCCCAT]	M64556	Guerra et al., 2001	435	55	00:30
	floR	Efflux-Protein FLO	[paspp-flo-F/B]	[CACGTTGAGCCTCTATAT / ATGCAGAAGTAGAACGCG]	AF071555	Ng et al. ,1999	868	55	00:40
TET	tet (A)	Efflux-Protein TET-A	[tetA-F/B]	[GCTACATCCTGCTTGCCT / CATAGATCGCCGTGAAGA]	X61367	Ng et al. ,1999	210	55	00:20
	tet (B)	Efflux-Protein TET-B	[tetB-F/B]	[TTGGTTAGGGGCAAGTTTTG / GTAATGGGCCAATAACACCG]	J01830	Ng et al. ,1999	600	55	00:30
	tet (G)	Efflux-Protein TET-G	[tetG-F/B]	[GCTCGGTGGTATCTCTGC / AGCAACAGAATCGGGAAC]	S52437	Ng et al. ,1999	500	55	00:30
QUINOLONES	qnrA	Protein QnrA	[qnr-F/B]	[TCAGCAAGAGGATTTCTCA / GGCAGCACTATTACTCCCA]	AY070235	Wang et al., 2003	627	60	00:30
	qnrB	Protein QnrB	[qnrB-F/B]	[ATGACGCCATTACTGTATAA / GATCGCAATGTGTGAAGTTT]	DQ351241	Jacoby et al ., 2006	560	55	00:40
	qnrS	Protein QnrS	[qnrS-F/B]	[ACGACATTCGTCAACTGCAA / TAAATTGGCACCCTGTAGGC]	DQ485529	Gay et al ., 2006	417	60	00:30
	qnrC	Protein QnrC	[qnrC-F/B]	[GGGTTGTACATTTATTGAATC / TCCACTTTACGAGGTTCT]	EU917444	Wang et al., 2009	447	50	00:30
	qnrD	Protein QnrD	[qnrD-F/B]	[CGAGATCAATTTACGGGGAATA / AACAAGCTGAAGCGCCTG]	FJ228229	Cavaco et al ., 2009	582	55	00:30
	gyrA	Untereinheit A der DNA-Gyrase	[gyrA-F/B]	[TGTCCGAGATGGCCTGAAGC / TACCGTCATAGTTATCCACG]	U28377	Guerra et al., 2003	346	60	00:30
VIRULENZGENE	avrA	SP1 encoded protein	[avrA-F/B]	[CCTGTATTGTTGAGCGTCTGG / AGAAGAGCTTCGTTGAATGTCC]	AE006468	Hühn <i>et al</i> ., 2010	422	58	00:30
	ssaQ	SPI 2 encoded secretion system apparatus protein	[ssaQ-F/B]	[GAATAGCGAATGAAGAGCGTCC / CATCGTGTTATCCTCTGTCAGC]	AE008761	Hühn <i>et al</i> ., 2010	677	58	00:30
	mgtC	SPI 3 encoded putative transcriptional regulator	[mgtC-F/B]	[TGACTATCAATGCTCCAGTGAAT / ATTTACTGGCCGCTATGCTGTTG]	AF106566	Hühn <i>et al</i> ., 2010	655	58	00:30
	siiD (spi4_D)	SPI 4 HlyD family secretion protein	[siiD-F/B]	[GAATAGAAGACAAAGCGATCATC / GCTTTGTCCACGCCTTTCATC]	AF060869	Hühn <i>et al</i> ., 2010	1231	58	00:30
	sopB	SPI 5 invasion gene D protein	[sopB-F/B]	[TCAGAAGRCGTCTAACCACTC / TACCGTCCTCATGCACACTC]	AE008747	Hühn <i>et al</i> ., 2010	518	58	00:30
	gipA	Gifsy-1 Peyer's patch-specific virulence factor GipA	[gipA-F/B]	[ACGACTGAGCAGGCTGAG / TTGGAAATGGTGACGGTAGAC]	AF246666	Hühn <i>et al</i> ., 2010	422	58	00:30
	sodC1	Gifsy-2 encoded, copper/zinc superoxide dismutase	[sodC1-F/B]	[CCAGTGGAGCAGGTTTATCG / GGTGCGCTCATCAGTTGTTC]	AF007380	Hühn <i>et al</i> ., 2010	467	58	00:30
	sopE1	Translocated effector protein	[sopE1-F/B]	[CGGGCAGTGTTGACAAATAAAG / TGTTGGAATTGCTGTGGAGTC]	L78932	Hühn <i>et al</i> ., 2010	455	58	00:30
	spvC	Salmonella plasmid virulence	[spvC-F/B]	[ACTCCTTGCACAACCAAATGCGGA / TGTCTTCTGCATTTCGCCACC]	AE006471	Hühn <i>et al</i> ., 2010	571	58	00:30
	bcfC	Fimbrial usher, bovine colonization factor	[bcfC-F/B]	[ACCAGAGACATTGCCTTCC / TTCTGATCGCCGCTATTCG]	AE008694	Hühn <i>et al</i> ., 2010	467	53	00:30
	rck	Resistance to complement killing protein	[rck-F/B]	[TCGTTCTGTCCTCACTGC / TCATAGCCCAGATCGATG]	AE006471	Guerra et al., 2002	424	56	00:30
	pefA	Virulence plasmid encoded fimbrial protein	[pefA-F/B]	[GCACACGCTGCCAATGAA / CACAGACTTGAAGTCACC]	AE006471	Guerra et al., 2002	442	55	00:30
	traT	conjugal transfer surface exclusion protein	[traT-F/B]	[GATGGTTACACTGGTCAG / TCTGAGATCTGTACGTCG]	AE006471	Guerra et al., 2002	288	54	00:30
	repA2	replication regulatory protein	[rsK-F/B]	[CCCTACCCAGGTCTTGAAGTCAT / CCTTCTCCCTCTCAGCAGCTTCAT]	AE006471	Vandenbosch et al., 1989	920	66	00:56
	traX-finO	conjugal transfer pilus acetylation protein	[traX-F/B]	[AACCGTGGCGCTGCTGCTGAT / CTTCCACTTCGGGGGGCGTGGT]	AE006471	Chu et al., 1999	801	64	00:50
	oriT	origin of transfer	[oriT-F/B]	[GGTTACGGGATTCCTTCCATGAAAT / ATATCTTTATCTCTCGCCCCTTCCT]	AE006471	Chu et al., 1999	653	68	00:41
	samA	mutagenesis by UV and mutagens	[samA-F/B]	[GAGGAACTGGATCTGAATGCCT / GATTTCCTCCACCGGTTGCAGT]	AE006471	Chu et al., 1999	847	60	00:53
	pefB	Virulence plasmid encoded fimbrial protein	[pefB-F/B]	[GGCACTCAGGGACTACCTTG / TGATGCGTGACAGGCGGTTC]	AE006471	Herrero et al., 2006	110	55	00:30
	pefD	Virulence plasmid encoded fimbrial protein	[pefD-F/B]	[CTTTAAGGTCAGGCCCAAGG / TCCGTTCAGCGACAGTTTCC]	AE006471	Herrero et al., 2006	402	55	00:25
	parA	plasmid partition protein A	[parA-F/B]	[GAAGTACGCGATGACGATTC / GGTGCTTCCATCATAGGTTG]	AE006471	Herrero et al., 2006	873	56	00:55
	parB	plasmid partition protein B	[parB-F/B]	[GAGATGACTGACACCCAAAG / GAGCTATCAATGCCTGAGAG]	AE006471	Herrero et al., 2006	732	56	00:45
	ccdAB	plasmid maintenance protein	[ccdAB-1/2]	[CAGCGAATTACAGTGACAG / TCTCAGCCTCCGGGAGAAC]	AE006471	A. Herrero unpublished	478	50	00:30
	pefl/ORF7	putative regulatory protein	[peflorf7-F/R]	[TCGTCCAGGAACGTCAG / ATTCCAGGCCGGCTTCTTC]	AE006471	A. Herrero unpublished	493	50	00:30
	srgA	putative thiol-disulfide isomerase or thioredoxin	[srgA-F/R]	[ACGCATAACCGGAATATTCCGGCTG / CTGGTCAGCAGCAGGAGAATCAGTG]	AE006471	A. Herrero unpublished	852	70	00:53

SGI1-	dnaN	DNA polymerase III subunit beta	[dnaN-F/B]	[CTTCCGCTTCTTCCTGTTCC/CGCCGATTTCCCGAATCTTG]	AE008879	Beutlich et al ., 2011	572	56	00:40
Flanking Region	dnaA	chromosomal replication initiation protein	[dnaA-F/B]	[ATTGACGTTGGAGCGGTAGG/GCTTTGGCAGCAGTGTCTTG]	AE008879	Beutlich et al ., 2011	385	55	00:40
	rpmH	50S ribosomal protein L34	[rpmH-F/B]	[GTGGCGTAAGTCGTTCAAAG/GTTGCTGGAAGACGAATGTG]	AE008879	Beutlich et al ., 2011	307	52	00:30
	mpA	ribonuclease P	[rnpA-F/B]	[GTGGTTAAGCTCGCATTTCC/TTCGCCACCACCACGAAATC]	AE008879	Beutlich et al ., 2011	269	54	00:40
	yidC	inner membrane protein translocase component	[yidC-F/B]	[GCTGTACAACGTCGAGAAAG/TACAACGCCAGGAAGATAGG]	AE008879	Beutlich et al ., 2011	924	54	00:40
	thdF (trmE)	tRNA modification GTPase	[thdF-F/B]	[GCGTATTTCCGGTCTGAAGG/CCGGCGGTATCGATGATATG]	AE008879	Beutlich et al ., 2011	753	57	00:40
	int2 (STM3844)	integrase/recombinase	[STM3844-F/B]	[GCCGCTCACTGGTTGCCCAT/CGCCGGGGATACGCCATTCC]	AE008879	Beutlich et al ., 2011	573	65	00:40
	urt (STM3845)	inner membrane protein	[STM3845-F/B]	[GGTGGCAAAGTCGATGTACG/CAGGATCCGGCCAAGGATAG]	AE008879	Beutlich et al., 2011	394	50	00:40
	rt (STM 3846)	reverse transcriptase	[STM3846-F/B]	[GACCAACGCTCAAGTTCATC/TGAGCTTGGTGCTCCAATAC]	AE008879	Beutlich et al., 2011	214	46	00:30
	yidY	multidrug efflux system protein	[yidY-F/B]	[CTGTTTGCCGGGAAGATAGC/AGAATCCGGCGCAGATAAGC]	AE008879	Beutlich et al., 2011	757	57	00:40
	yidZ	DNA-binding transcriptional regulator	[yidZ-F/B]	[CGCAACTGGGATTATGACTC/GTGTTGATAGCCTGTCGTAG]	AE008879	Beutlich et al., 2011	548	53	00:40
	yieE	cytoplasmic protein	[yieE-F/B]	[GGATACTTACGGAGGGACAG/GACGACCGGTTGGCTCATTG]	AE008879	Beutlich et al., 2011	678	53	00:40
	yieF	oxidoreductase	[yieF-F/B]	[CGCTGAATGTGGTTACACTG/TCGCCAAATGCGGTCAACTG]	AE008879	Beutlich et al., 2011	532	54	00:40
	yieG	membrane transport protein	[yieG-F/B]	[CCAAATCGACATGCCCTACC/TGCGGCCTTTGGCAGTATTC]	AE008879	Beutlich et al., 2011	527	57	00:40
	yieH	6-phosphogluconate phosphatase	[yieH-F/B]	[CGCCTATGTCACTATGTTCC/TAAACGTCGTCACGTTAGGG]	AE008879	Beutlich et al., 2011	536	53	00:40
	sodB /purR	Secondary chromosomal attachment site of SGI1	[sodB-F/purR-B]	[GAAAAATCTCGCCGCATAAG/GCCCGTTTCGCTACATCTTT]		Doublet et al., 2008a	508	59	00:40
MLVA	STTR3	Putative surface-exposed virulence protein	[STTR3-F/R]	[HEX-CCCCCTAAGCCCGATAATGG / TGA-CGCCGTTGCTGAAGGTAATAA]	AE006468	Lindstedt et al ., 2004	490	60	01:30
	STTR5	Putative inner membrane protein	[STTR5-F/R]	[HEX-ATGGCGAGGCGAGCAGCAGT / GGT-CAGGCCGAATAGCAGGAT]	AE006468	Lindstedt et al ., 2004	260	60	01:30
	STTR6	Prophage related	[STTR6-F/R]	[FAM-TCGGGCATGCGTTGAAA / CTGGTGGGGAGAATGACTGG]	AE006468	Lindstedt et al ., 2004	340	60	01:30
	STTR9	intergenic VNTR locus	[STTR9-F/R]	[FAM-AGAGGCGCTGCGATTGACGATA / CATTTTCCACAGCGGCAGTTTTTC]	AE006468	Lindstedt et al ., 2004	180	60	01:30
	STTR10p	intergenic VNTR locus	[STTR10p-F/R]	[TET-CGGGCGCGGCTGGAGTATTTG / GAAGGGGCCGGGCAGAGACAGC]	AE006468	Lindstedt et al ., 2004	400	60	01:30
MLST	thrA	aspartokinase / homoserine dehydrogenase	[thrA-F/R]	[GTCACGGTGATCGATCCGGT / CACGATATTGATATTAGCCCG]	AE006468	http://www.mlst.net/	852	55	00:50
			[thrA-sF]	[ATCCCGGCCGATCACATGAT]	AE006468	http://www.mlst.net/			
	purE	phosphoribosylaminoimidazole carboxylas	[purE-F/R]	[ATGTCTTCCCGCAATAATCC / TCATAGCGTCCCCCGCGGATC]	AE006468	http://www.mlst.net/	510	55	00:40
			[purE-sF/]	[CGCATTATTCCGGCGCGTGT]	AE006468	http://www.mlst.net/			
	sucA	alpha ketoglutarate dehydrogenase	[sucA-F/R]	[AGCACCGAAGAGAAACGCTG / GGTTGTTGATAACGATACGTAC]	AE006468	http://www.mlst.net/	643	55	00:40
			[sucA-sF]	[AGCACCGAAGAGAAACGCTG]	AE006468	http://www.mlst.net/			
	hisD	histidinol dehydrogenase	[hisD-F/R]	[GAAACGTTCCATTCCGCGCAGAC / CTGAACGGTCATCCGTTTCTG]	AE006468	http://www.mlst.net/	894	55	01:00
			[hisD-sF]	[GTCGGTCTGTATATTCCCGG]	AE006468	http://www.mlst.net/			
	aroC	chorismate synthase	[aroC-F/R]	[CCTGGCACCTCGCGCTATAC / CCACACACGGATCGTGGCG]	AE006468	http://www.mlst.net/	826	55	00:50
			[aroC-sF]	[GGCACCAGTATTGGCCTGCT]	AE006468	http://www.mlst.net/			
	hemD	uroporphyrinogen III cosynthase	[hemD-F/R]	[ATGAGTATTCTGATCACCCG / ATCAGCGACCTTAATATCTTGCCA]	AE006468	http://www.mlst.net/	666	55	00:40
			[hemD-sF]	[GTGGCCTGGAGTTTTCCACT]	AE006468	http://www.mlst.net/			
	dnaN	DNA polymerase III beta subunit	[dnaN-F/R]	[ATGAAATTTACCGTTGAACGTGA / AATTTCTCATTCGAGAGGATTGC]	AE006468	http://www.mlst.net/	833	55	00:50
			[dnaN-sF]	[CCGATTCTCGGTAACCTGCT]	AE006468	http://www.mlst.net/			

Tabelle A1b: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide zur Inkompatibilitätsgruppenbestimmung.

	Inkompatibilitäts-			Primer			_	PCR-E	edingungen
	gruppe	Target site	Bezeichnung	Sequenz 5 '- 3'	Accession Nr.	Referenz	Amplikon (bp) T _a (° () t _e (min)
Replikontyping	HI1	parA-parB	[HI1-F/B]	[GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC / TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA]	AF250878	Carattoli et al., 2005	471	60	00:40
	HI2	iterons	[HI2-F/B]	[TTTCTCCTGAGTCACCTGTTAACAC / GGCTCACTACCGTTGTCATCCT]	BX664015	Carattoli et al., 2005	644	60	00:40
	11	RNAI	[I1-F/B]	[CGAAAGCCGGACGGCAGAA / TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT]	M20413	Carattoli et al., 2005	139	60	00:40
	Х	ori y	[X-F/B]	[AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT / TGAGAGTCAATTTTTATCTCATGTTTTAGC]	Y00768	Carattoli et al., 2005	376	60	00:40
	L/M	repA,B,C	[L/M-F/B]	[GGATGAAAACTATCAGCATCTGAAG / CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG]	U27345	Carattoli et al., 2005	785	60	00:40
	Ν	repA	[N-F/B]	[GTCTAACGAGCTTACCGAAG / GTTTCAACTCTGCCAAGTTC]	NC_003292	Carattoli et al., 2005	559	60	00:40
	FIA	iterons	[FIA-F/B]	[CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG / GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG]	J01724	Carattoli et al., 2005	462	60	00:40
	FIB	repA	[FIB-F/B]	[GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG / GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG]	M26308	Carattoli et al., 2005	702	60	00:40
	W	repA	[W-F/B]	[CCTAAGAACAACAAAGCCCCCG / GGTGCGCGCGCATAGAACCGT]	U12441	Carattoli et al., 2005	242	60	00:40
	Y	repA	[Y-F/B]	[AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG / GCGAGAATGGACGATTACAAAACTTT]	K02380	Carattoli et al., 2005	765	60	00:40
	Р	iterons	[P-F/B]	[CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA / TCACGCGCCAGGGCGCAGCC]	M20134	Carattoli et al., 2005	534	60	00:40
	FIC	repA2	[FIC-F/B]	[GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG / TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT]	AH003523	Carattoli et al., 2005	262	60	00:40
	A/C	repA	[A/C-F/B]	[GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA / ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT]	X73674	Carattoli et al., 2005	465	60	00:40
	Т	repA	[T-F/B]	[TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT / CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC]	K00053	Carattoli et al., 2005	750	60	00:40
	FIIS	repA	[FIIS-F/B]	[CTGTCGTAAGCTGATGGC / CTCTGCCACAAACTTCAGC]	AE006471	Carattoli et al., 2005	270	60	00:40
	FrepB	RNAI/repA	[FrepB-F/B]	[TGATCGTTTAAGGAATTTTG / GAAGATCAGTCACACCATCC]	AY234375	Carattoli et al., 2005	270	52	00:30
	К	RNAI	[K/B-F/K-R]	[GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC / TCTTTCACGAGCCCGCCAAA]	M93063	Carattoli et al., 2005	160	60	00:40
	B/O	RNAI	[K/B-F/B/O-R]	[GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC / TCTGCGTTCCGCCAAGTTCGA]	M28718	Carattoli et al., 2005	159	60	00:40
	oricolE	ColE plasmids [Generic]	[oricolE-F-R]	[GTTCGTGCATACAGTCCA / GGCGAAACCCGACAGGACT]	AM746977	García-Fernández et al ., 2009	187	60	00:30
	oricolE _{Tp}	ColE _{Tp} -like pTPqnrS-1a	[oricolE-F/oricolE _{Tp} -R]	[GTTCGTGCATACAGTCCA / GGTTTACCGGTGTCATTCC]	AM746977	García-Fernández et al ., 2009	106	60	00:30

T_a, Annealing Temperatur; t_e, Elongationszeit

Tabelle A2a: Die in dieser Arbeit untersuchten 55 S. Saintpaul Stämme und 24 S. Saintpaul Vergleichsstämme.

Stamm Nr.	Serovar	Isolationsdatum	Bundesland / Einsender	Herkunft
06-04820	S. Saintpaul	05.12.2006	Niedersachsen	Pute, Kot; EU-Prävalenzstudie 2006/2007
06-04821	S. Saintpaul	05.12.2006	Niedersachsen	Pute, Kot; EU-Prävalenzstudie 2006/2007
06-04822	S. Saintpaul	05.12.2006	Niedersachsen	Pute, Kot; EU-Prävalenzstudie 2006/2007
07-00296	S.Subspec. I Rauform	31.01.2007	Niedersachsen	Pute, Kot; EU-Prävalenzstudie 2006/2007
07-00297	S. Saintpaul	31.01.2007	Niedersachsen	Pute, Kot; EU-Prävalenzstudie 2006/2007
07-00298	S.Subspec. I Rauform	31.01.2007	Niedersachsen	Pute, Kot; EU-Prävalenzstudie 2006/2007
07-00299	S.Subspec. I Rauform	31.01.2007	Niedersachsen	Pute, Kot; EU-Prävalenzstudie 2006/2007
07-00301	S. Saintpaul	31.01.2007	Niedersachsen	Pute, Kot; EU-Prävalenzstudie 2006/2007
07-00637	S. Saintpaul	26.02.2007	Niedersachsen	Pute, Kot; EU-Prävalenzstudie 2006/2007
07-00638	S. Saintpaul	26.02.2007	Niedersachsen	Pute, Kot; EU-Prävalenzstudie 2006/2007
07-00639	S. Saintpaul	26.02.2007	Niedersachsen	Pute, Kot; EU-Prävalenzstudie 2006/2007
07-00641	S.Subspec. I Rauform	26.02.2007	Niedersachsen	Pute, Kot; EU-Prävalenzstudie 2006/2007
07-00647	S. Saintpaul	20.02.2007	Niedersachsen	Pute, Kot; EU-Prävalenzstudie 2006/2007
07-00648	S. Saintpaul	20.02.2007	Niedersachsen	Pute, Kot; EU-Prävalenzstudie 2006/2007
07-00303	S.Subspec. I Rauform	31.01.2007	Niedersachsen	Pute, Kot; EU-Prävalenzstudie 2006/2007
07-03778	S. Saintpaul	21.08.2007	Mecklenburg-Vorpommern	Pute, Kot; EU-Prävalenzstudie 2006/2007
03-00314	S. Saintpaul	20.01.2003	Berlin	Pute, Kot; Routineeinsendungen NRL-Salm
03-00315	S. Saintpaul	20.01.2003	Berlin	Pute, Kot; Routineeinsendungen NRL-Salm
03-00374	S. Saintpaul	29.01.2003	Berlin	Pute, Kot; Routineeinsendungen NRL-Salm
03-00835	S. Saintpaul	14.03.2003	Berlin	Pute, Kot; Routineeinsendungen NRL-Salm
03-01331	S. Saintpaul	26.05.2003	Berlin	Pute, Kot; Routineeinsendungen NRL-Salm
03-01587	S. Saintpaul	26.06.2003	Berlin	Pute, Kot; Routineeinsendungen NRL-Salm
03-01845	S. Saintpaul	09.07.2003	Berlin	Pute, Kot; Routineeinsendungen NRL-Salm
03-02540	S. Saintpaul	01.09.2003	Berlin	Pute, Kot; Routineeinsendungen NRL-Salm
03-02645	S. Saintpaul	11.09.2003	Berlin	Pute, Kot; Routineeinsendungen NRL-Salm
03-02646	S. Saintpaul	11.09.2003	Berlin	Pute, Kot; Routineeinsendungen NRL-Salm
05-01572	S. Saintpaul	14.04.2005	Berlin	Pute, Kot; Routineeinsendungen NRL-Salm
06-01822	S. Saintpaul	10.04.2006	Berlin	Pute, Kot; Routineeinsendungen NRL-Salm
06-01828	S. Saintpaul	05.04.2006	Berlin	Pute, Kot; Routineeinsendungen NRL-Salm
06-02800	S. Saintpaul	17.07.2006	Niedersachsen	Pute, Kot; Routineeinsendungen NRL-Salm
05-01959	S. Saintpaul	12.05.2005	Berlin	Pute, Kot; Routineeinsendungen NRL-Salm
05-03413	S. Saintpaul	17.08.2005	Berlin	Pute, Kot; Routineeinsendungen NRL-Salm
02-01006	S. Saintpaul	02.04.2002	Berlin	Pute, Kot; Routineeinsendungen NRL-Salm

00-02151	S. Saintpaul	17.07.2000	Berlin
00-03122	S. Saintpaul	28.09.2000	Schleswig-Holstein
06-04383	S. Saintpaul	07.11.2006	Bayern
07-00039	S. Saintpaul	02.01.2007	Bayern
07-00078	S. Saintpaul	20.12.2006	Sachsen-Anhalt
07-00334	S. Saintpaul	02.02.2007	Berlin
07-00365	S. Saintpaul	05.02.2007	Berlin
07-00366	S. Saintpaul	05.02.2007	Berlin
07-01360	S. Saintpaul	03.05.2007	Nordrhein-Westfalen
07-01714	S. Saintpaul	17.05.2007	Nordrhein-Westfalen
07-02157	S. Saintpaul	30.05.2007	Nordrhein-Westfalen
07-02208	S. Saintpaul	23.05.2007	Thüringen
07-02593	S. Saintpaul	12.07.2007	Niedersachsen
03-02701	S. Saintpaul	08.09.2003	Niedersachsen
04-02381	S. Saintpaul	16.06.2004	Rheinland-Pfalz
06-01775	S. Saintpaul	14.02.2006	Nordrhein-Westfalen
06-01242	S. Saintpaul	10.03.2006	Nordrhein-Westfalen
06-02638	S. Saintpaul	27.06.2006	Rheinland-Pfalz
07-02022	S. Saintpaul	14.06.2007	Sachsen
03-03008	S. Saintpaul	06.10.2003	Berlin
06-04009	S. Saintpaul	29.09.2006	Berlin
07-04336	S. Saintpaul	09.10.2007	Mecklenburg-Vorpommern
06-02682	S. Saintpaul	05.07.2006	Niedersachsen
06-02684	S. Saintpaul	05.07.2006	Niedersachsen
160.17	S. Saintpaul	27.01.2006	Central Veterinary Institute, Lelystad, Niederlande
162.04	S. Saintpaul	21.02.2006	Central Veterinary Institute, Lelystad, Niederlande
164.55	S. Saintpaul	27.03.2006	Central Veterinary Institute, Lelystad, Niederlande
165.59	S. Saintpaul	10.04.2006	Central Veterinary Institute, Lelystad, Niederlande
168.26	S. Saintpaul	19.05.2006	Central Veterinary Institute, Lelystad, Niederlande
170.44	S. Saintpaul	19.06.2006	Central Veterinary Institute, Lelystad, Niederlande
503.36	S. Saintpaul	14.07.2006	Central Veterinary Institute, Lelystad, Niederlande
178.41	S. Saintpaul	11.09.2006	Central Veterinary Institute, Lelystad, Niederlande
179.35	S. Saintpaul	18.09.2006	Central Veterinary Institute, Lelystad, Niederlande
182.30	S. Saintpaul	19.10.2006	Central Veterinary Institute, Lelystad, Niederlande
184.72	S. Saintpaul	14.11.2006	Central Veterinary Institute, Lelystad, Niederlande
208,19	S. Saintpaul	21.09.2007	Central Veterinary Institute, Lelystad, Niederlande
212,64	S. Saintpaul	22.11.2007	Central Veterinary Institute, Lelystad, Niederlande
216,13	S. Saintpaul	29.01.2008	Central Veterinary Institute, Lelystad, Niederlande

Pute. Lebensmittel: Routineeinsendungen NRL-Salm Pute, Lebensmittel; Routineeinsendungen NRL-Salm Pute. Lebensmittel: Routineeinsendungen NRL-Salm Pute, Lebensmittel; Routineeinsendungen NRL-Salm Pute, Lebensmittel; Routineeinsendungen NRL-Salm Pute, Lebensmittel; Routineeinsendungen NRL-Salm Pute. Lebensmittel: Routineeinsendungen NRL-Salm Pute, Lebensmittel; Routineeinsendungen NRL-Salm Pute. Lebensmittel: Routineeinsendungen NRL-Salm Pute, Lebensmittel; Routineeinsendungen NRL-Salm Pute, Lebensmittel; Routineeinsendungen NRL-Salm

Huhn, Kot; Außengruppe Huhn, Kot; Außengruppe

Broiler; Außengruppe Broiler; Außengruppe Broiler; Außengruppe Geflügel, Lebensmittel; Außengruppe Broiler; Außengruppe Broiler; Außengruppe Geflügel, Lebensmittel; Außengruppe Broiler; Außengruppe Geflügel, Lebensmittel; Außengruppe Pute; Außengruppe Geflügel, Lebensmittel; Außengruppe Geflügel, Lebensmittel; Außengruppe Geflügel, Lebensmittel; Außengruppe Geflügel, Lebensmittel; Außengruppe

06-07097	S. Saintpaul	2006	Robert Koch Institut, Wernigerode, Deutschland	Mensch; Außengruppe
06-06267	S. Saintpaul	2006	Robert Koch Institut, Wernigerode, Deutschland	Mensch; Außengruppe
06-05450	S. Saintpaul	2006	Robert Koch Institut, Wernigerode, Deutschland	Mensch; Außengruppe
06-05255	S. Saintpaul	2006	Robert Koch Institut, Wernigerode, Deutschland	Mensch; Außengruppe
06-03607	S. Saintpaul	2006	Robert Koch Institut, Wernigerode, Deutschland	Mensch; Außengruppe
07-00052	S. Saintpaul	2007	Robert Koch Institut, Wernigerode, Deutschland	Mensch; Außengruppe
07-03262	S. Saintpaul	2007	Robert Koch Institut, Wernigerode, Deutschland	Mensch; Außengruppe
07-08401	S. Saintpaul	2007	Robert Koch Institut, Wernigerode, Deutschland	Mensch; Außengruppe

Stamm Nr.	Serovar	Phagentyp ^a	Isolationsjahr	Einsender	Herkunft
08-00263	S. Derby	nd	2004	CVI, Lelystad, Niederlande	Mensch
08-00311	S. Derby	nd	2004	CVI, Lelystad, Niederlande	Mensch
08-00315	S. Typhimurium	DT104L	2005	CVI, Lelystad, Niederlande	Raps
08-00264	S. Typhimurium	DT104L	2005	CVI, Lelystad, Niederlande	Huhn
08-00312	S. Typhimurium	DT104L	2005	CVI, Lelystad, Niederlande	Mensch
08-00265	S. Albany	nd	2006	ANSES, Maisons-Alfort, Frankreich	Lebensmittel
08-00309	S. Albany	nd	2006	ANSES, Maisons-Alfort, Frankreich	Lebensmittel
08-00266	S. Kentucky	nd	2003	PZH, Warschau, Polen	Mensch
08-00267	S. Paratyphi B dT+	nd	2004	VLA, Weybridge, UK	Rind
08-00268	S. Newport	nd	2005	SSI, Kopenhagen, Dänemark	Mensch
08-00269	S. Newport	nd	2005	SSI, Kopenhagen, Dänemark	Mensch
08-00313	S. Newport	nd	2005	SSI, Kopenhagen, Dänemark	Mensch
08-00314	S. Newport	nd	2005	SSI, Kopenhagen, Dänemark	Mensch
08-00310	S. Albany	nd	2002	BfR, Berlin, Deutschland	Lebensmittel
08-00316	S. Typhimurium	NT	2004	CVI, Lelystad, Niederlande	Mensch
08-00270	S. Typhimurium	U309	2004	CVI, Lelystad, Niederlande	Schwein
08-00317	S. Typhimurium	U309	2005	CVI, Lelystad, Niederlande	Schwein
08-00318	S. Typhimurium	206	2005	CVI, Lelystad, Niederlande	Mensch
08-00319	S. Typhimurium	RDNC	2005	CVI, Lelystad, Niederlande	Schwein
08-00320	S. Typhimurium	DT193	2004	VLA, Weybridge, UK	Schaf
08-00321	S. Typhimurium	DT151	2005	VLA, Weybridge, UK	Rind
08-00271	S. Typhimurium	U309	2004	ISS, Rom, Italien	Mensch
08-00322	S. Typhimurium	NT	2004	ISS, Rom, Italien	Mensch
08-00323	S. Typhimurium	NT	2005	SSI, Kopenhagen, Dänemark	Mensch
08-00324	S. Typhimurium	DT92	2005	SSI, Kopenhagen, Dänemark	Mensch
08-00325	S. Typhimurium	DT193	2004	BfR, Berlin, Deutschland	Wurstware
08-00326	S. Typhimurium	RDNC	2005	BfR, Berlin, Deutschland	Schwein
08-00272	S. Typhimurium	206	2005	BfR, Berlin, Deutschland	Schwein
08-00327	S. Typhimurium	RDNC	2006	VMRI, Budapest, Ungarn	Gans
08-00328	S. Typhimurium	RDNC	2006	VMRI, Budapest, Ungarn	Gans
08-00329	S. Typhimurium	RDNC	2006	VMRI, Budapest, Ungarn	Fleischwurst
08-02864	S. Agona	nd	2004	CVI, Lelystad, Niederlande	Mensch
08-02865	S. Typhimurium	DT104B low	2005	CVI, Lelystad, Niederlande	Mensch
08-02866	S. Derby	nd	2005	CVI, Lelystad, Niederlande	Mensch
08-02867	S. Derby	nd	2005	CVI, Lelystad, Niederlande	Mensch
08-02868	S. Derby	nd	2005	CVI, Lelystad, Niederlande	Mensch
08-02885	S. Typhimurium	DT104L	2005	BfR, Berlin, Deutschland	Kaninchen
08-02886	S. Typhimurium	DT120	2005	BfR, Berlin, Deutschland	Nagetier

Tabelle A2b: Die in dieser Arbeit untersuchten 38 Europäischen Salmonella Genomic Island 1 (SGI1) positiven Salmonella enterica Isolate.

^a nd, nicht durchgeführt

ANHANG

09-01969S. Newport2007CVI, Lelystad, NiederlandeMensch09-01971S. Newport2008CVI, Lelystad, NiederlandeMensch	
09-01971S. Newport2008CVI, Lelystad, NiederlandeMensch	
09-01973 S. Newport 2008 CVI, Lelystad, Niederlande Mensch	
09-01974 S. Newport 2008 CVI, Lelystad, Niederlande Geflügelfleisc	ı
09-01975 S. Newport 2007 HPA, Colindale, UK Mensch	
09-01976 S. Newport 2008 HPA, Colindale, UK Mensch	
09-02072 S. Newport 2007 SSI, Kopenhagen, Dänemark Mensch	
09-02073 S. Newport 2007 SSI, Kopenhagen, Dänemark Mensch	
09-02074 S. Newport 2007 SSI, Kopenhagen, Dänemark Mensch	
09-02075 S. Newport 2007 SSI, Kopenhagen, Dänemark Mensch	
09-01977 S. Newport 2008 HPA, Colindale, UK Mensch	
09-02076 S. Newport 2007 ANSES, Maisons-Alfort, Frankreich Käse	
09-02077 S. Newport 2007 ANSES, Maisons-Alfort, Frankreich Rind	
09-02081 S. Newport 2007 VLA, Weybridge, UK Truthahn	
09-02082 S. Newport 2007 VLA, Weybridge, UK Truthahn	
09-02084 S. Newport 2007 VLA, Weybridge, UK Rind	
09-02086 S. Newport 2008 VLA, Weybridge, UK Truthahn	
07-01171 S. Newport 2007 BfR, Berlin, Deutschland Umwelt	
07-02304 S. Newport 2007 BfR, Berlin, Deutschland Hühnerfleisch	
07-04307-2 S. Newport 2007 BfR, Berlin, Deutschland Truthahnfleis	:h
08-00672 S. Newport 2008 BfR, Berlin, Deutschland Truthahnfleis	h
08-01563 S. Newport 2008 BfR, Berlin, Deutschland Truthahnfleis	:h
09-01972 S. Newport 2008 CVI, Lelystad, Niederlande Mensch	
09-01978 S. Newport 2008 HPA, Colindale, UK Mensch	
09-01979 S. Newport 2008 HPA, Colindale, UK Mensch	
09-02078 S. Newport 2008 ANSES, Maisons-Alfort, Frankreich Truthahnfleis	:h
09-02079 S. Newport 2008 ANSES, Maisons-Alfort, Frankreich Geflügelfleisc	ı
09-02080 S. Newport 2008 ANSES, Maisons-Alfort, Frankreich Hühnerfleisch	
09-02083 S. Newport 2007 VLA, Weybridge, UK Truthahn	
09-02110 S. Newport 2005 PZH, Warschau, Polen Mensch	
09-02111 S. Newport 2007 PZH, Warschau, Polen Mensch	
09-02485 S. Newport 2005 ISS, Rom, Italien Mensch	
09-02543 S. Newport 2008 ISCIII, Madrid, Spanien Mensch	
09-02545 S. Newport 2008 VMRI, Budapest, Ungarn Truthahn	

 Tabelle A2c: Die in dieser Arbeit untersuchten 51 Europäischen S. Newport Isolate.

09-02546	S. Newport	2009	VMRI, Budapest, Ungarn	Truthahn
09-02547	S. Newport	2009	VMRI, Budapest, Ungarn	Truthahn
09-02548	S. Newport	2009	VMRI, Budapest, Ungarn	Truthahn
09-02549	S. Newport	2009	VMRI, Budapest, Ungarn	Truthahn
09-02550	S. Newport	2009	VMRI, Budapest, Ungarn	Truthahn
09-02551	S. Newport	2009	VMRI, Budapest, Ungarn	Truthahn
07-00538	S. Newport	2006	BfR, Berlin, Deutschland	Truthahn
09-01970	S. Newport	2007	CVI, Lelystad, Niederlande	Mensch
09-01980	S. Newport	2008	HPA, Colindale, UK	Mensch
09-02071	S. Newport	2007	SSI, Kopenhagen, Dänemark	Mensch
09-02085	S. Newport	2008	VLA, Weybridge, UK	Huhn
09-02486	S. Newport	2008	ISS, Rom, Italien	Mensch
09-02540	S. Newport	2008	ISCIII, Madrid, Spanien	Mensch
09-02541	S. Newport	2008	ISCIII, Madrid, Spanien	Mensch
09-02542	S. Newport	2008	ISCIII, Madrid, Spanien	Mensch
09-02544	S. Newport	2008	ISCIII, Madrid, Spanien	Mensch
09-02650	S. Newport	2008	ANSES, Maisons-Alfort, Frankreich	Umwelt

Stamm Nr.	Serovar	Phagentyp	Isolationsjahr	Einsender	Herkunft
08-02878	S. Typhimurium	DT120	2005	ISS, Rom, Italien	Mensch
08-02879	S. Typhimurium	DT120	2005	ISS, Rom, Italien	Mensch
08-02884	S. Typhimurium	DT12	2005	SSI, Kopenhagen, Dänemark	Mensch
08-02869	S. Typhimurium	U288	2004	VLA, Weybridge, UK	Schwein
08-02870	S. Typhimurium	DT193	2004	VLA, Weybridge, UK	Schwein
08-02871	S. Typhimurium	DT193	2004	VLA, Weybridge, UK	Schwein
08-02872	S. Typhimurium	DT193	2005	VLA, Weybridge, UK	Schwein
08-02873	S. Typhimurium	U288	2005	VLA, Weybridge, UK	Schwein
08-02874	S. Typhimurium	NT	2005	VLA, Weybridge, UK	Schwein
08-02881	S. Typhimurium	RDNC	2005	ISS, Rom, Italien	Mensch
08-02875	S. Typhimurium	U288	2006	VLA, Weybridge, UK	Schwein
08-02876	S. Typhimurium	U311	2006	VLA, Weybridge, UK	Schwein
08-02877	S. Typhimurium	NT	2006	VLA, Weybridge, UK	Schwein
08-02880	S. Typhimurium	U302	2005	ISS, Rom, Italien	Mensch
08-02883	S. Typhimurium	NT	2005	ISS, Rom, Italien	Mensch

Tabelle A2d: Die in dieser Arbeit untersuchten 15 S. Typhimurium Stämme zur Charakterisierung von Virulenz-Resistenz-Plasmiden.

Tabelle A3a: Die im NRL-Salm des BfR eingesetzten antimikrobiellen Substanzen und MHK-Breakpoints. Dieser Plattensatz wurde bis zum 31.12.2007 verwendet.

Antimikrobielle	Konzentrationen	MI	HK-Breakpoin	its	Referenz
Substanzen	(μg/mL)	R	I	S	
Ampicillin (AMP)	1-32	≥ 32	16	≤ 8	Clinical and Laboratory Standards Institute (2006c)
Chloramphenicol (CHL)	2-64	≥ 32	16	≤ 8	Clinical and Laboratory Standards Institute (2006c)
Florfenicol (FLO)	2-64	≥ 32	-	≤ 16	Emborg und Hammerum (2007); DANMAP 2006
Gentamicin (GEN)	1-32	≥16	8	≤ 4	Clinical and Laboratory Standards Institute (2006c)
Kanamycin (KAN)	4-64	≥16	32	≤ 64	Clinical and Laboratory Standards Institute (2006c)
Neomycin (NEO)	2-32	≥16	8	≤ 4	Schroeter <i>et al.</i> (2004)
Ciprofloxacin (CIP)	0,03-4	≥ 4	2	≤ 1 ^a	Clinical and Laboratory Standards Institute (2006c)
Nalidixinsäure (NAL)	4-128	≥ 32	16	≤ 8	Emborg und Hammerum (2007); DANMAP 2006
Amoxicillin-Clavulansäure (AMC)	2/1-32/16	≥ 32/16	16/8	≤ 8/4	Clinical and Laboratory Standards Institute (2006c)
Tetracyclin (TET)	2-32	≥16	8	≤ 4	Clinical and Laboratory Standards Institute (2006c)
Streptomycin (STR)	4-64	≥ 32	16	≤ 8	Schroeter <i>et al.</i> (2004)
Spectinomycin (SPE)	2-128	≥ 128	-	≤ 64	Emborg und Hammerum (2007); DANMAP 2006
Sulfamethoxazol (SUL)	35-512	≥ 512	-	≤ 256	Clinical and Laboratory Standards Institute (2006c)
Trimethoprim (TMP)	4-32	≥16	-	≤ 8	Emborg und Hammerum (2007); DANMAP 2006
Trimethoprim-Sulfamethoxazol (SXT)	1/19-8/52	≥ 4/76	-	≤ 2/38	Schroeter <i>et al.</i> (2004)
Ceftiofur (XNL)	0,5-8	≥8	4	≤ 2	Clinical and Laboratory Standards Institute (2006c)
Colistin	4-64	≥16	-	≤ 8	Emborg und Hammerum (2007); DANMAP 2006

^a In dieser Arbeit wurden Isolate mit einer MHK von 1 bis 0,12 μ g/mL als vermindert sensibel und mit einer MHK \leq 0,06 μ g/mL als voll sensibel gegenüber Ciprofloxacin betrachtet.

Antimikrobielle	Getestete	MHK-Breakpoints			Referenz
Substanzen	Konzentrationen (µg/mL)	R	I	S	
Cephalothin	1-32	≥ 32	16	≤8 ^a	Clinical and Laboratory Standards Institute (2008b)
Cefuroxim	1-32	≥ 32	16	≤ 8 ^a	Clinical and Laboratory Standards Institute (2008b)
Cefotaxim	1-64	≥ 64	32-16	$\leq 8^{b}$	Clinical and Laboratory Standards Institute (2008b)
Ceftazidim	1-32	≥ 32	16	≤ 8 ^a	Clinical and Laboratory Standards Institute (2008b)
Cefoxitin	1-32	≥ 32	16	≤ 8 ^a	Clinical and Laboratory Standards Institute (2008b)
Ceftiofur	0,5-8	≥8	4	< 4 ^c	Clinical and Laboratory Standards Institute (2008b)

Tabelle A3b: Die bei der Antibiotika-Empfindlichkeitsprüfung mittels Agar-Dilutionsmethode eingesetzten Cephalosporine und MHK-Breakpoints.

^a In dieser Arbeit wurden Isolate mit einer MHK von 8 bis 2 μ g/mL als vermindert sensibel und mit einer MHK < 2 μ g/mL als voll sensibel gegenüber Cephalothin, Cefuroxim, Ceftazidim und Cefoxitin betrachtet.

^b In dieser Arbeit wurden Isolate mit einer MHK von 8 bis 2 µg/mL als vermindert sensibel und mit einer MHK < 2 µg/mL als voll sensibel gegenüber Cefotaxim betrachtet.

^c In dieser Arbeit wurden Isolate mit einer MHK von 2 bis 1 µg/mL als vermindert sensibel und mit einer MHK < 1 µg/mL als voll sensibel gegenüber Ceftiofur betrachtet.