

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

**Vorkommen und Charakterisierung von Extended-Spectrum-
Beta-Laktamase (ESBL)-produzierenden *Escherichia coli* bei
Lebensmittel liefernden Tieren**

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

vorgelegt von
Britta Büchter
Tierärztin aus Ibbenbüren

Berlin 2010

Journal-Nr.: 3416

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Lothar H. Wieler
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Reinhard Kroker
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):
escherichia coli, beta-lactamase, drug resistance, genes,
beta-lactam antibiotics, germany, cephalosporins, cattle, pigs, poultry*

Tag der Promotion: 29. November 2010

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-874-6

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2010

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2010

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Für meine Eltern

und in Gedenken an meine Freundin

Dr. Katja Laun

Inhalt

Inhalt	I
Verwendete Abkürzungen	V
Abbildungen	VIII
Tabellen	IX
1 Einleitung	- 1 -
2 Literaturübersicht	- 2 -
2.1 Beta-Laktamantibiotika.....	- 2 -
2.1.1 Penicilline.....	- 3 -
2.1.1.1 Benzylpenicilline	- 3 -
2.1.1.2 Aminopenicilline.....	- 3 -
2.1.2 Cephalosporine	- 4 -
2.2 Beta-Laktamasen	- 5 -
2.3 Extended-Spectrum-Beta-Laktamasen	- 8 -
2.3.1 TEM	- 9 -
2.3.2 SHV.....	- 10 -
2.3.3 CTX-M.....	- 11 -
2.3.4 OXA	- 12 -
2.3.5 Andere ESBL	- 13 -
2.4 Antibiotikaresistenz bei <i>E. coli</i>	- 13 -
2.5 Resistenz gegenüber Beta-Laktamantibiotika	- 16 -
2.6 Resistenzverbreitung bei <i>E. coli</i>	- 18 -
2.6.1 Konjugation	- 18 -
2.6.2 Plasmide	- 19 -
2.6.3 Transposons	- 19 -
2.6.4 Integrons und Genkassetten	- 20 -
2.7 Mikrobiologische Detektion sowie molekularbiologische Identifizierung von ESBL.....	- 22 -
2.7.1 Phänotypische Detektion	- 22 -
2.7.1.1 Bouillon-Mikrodilutionsverfahren.....	- 23 -
2.7.1.2 Agardiffusionstest	- 25 -
2.7.2 Genotypische Charakterisierung des <i>bla</i> -Gens.....	- 25 -

2.7.2.1	Polymerase-Kettenreaktion.....	- 26 -
2.7.2.2	Sequenzanalyse	- 26 -
2.8	Bedeutung, Wandel und geografische Verteilung von ESBL	- 27 -
3	Material und Methoden.....	- 32 -
3.1	Material	- 32 -
3.1.1	Studienumfang und Stichprobenplan	- 32 -
3.1.2	Tierarten und Indikationen	- 33 -
3.1.3	Teilnehmende Kooperationspartner	- 34 -
3.1.4	Begleitbogen für die Bakterienisolate.....	- 36 -
3.1.5	Bakterienstämme	- 36 -
3.1.5.1	Klinische Isolate für die genotypische Charakterisierung.	- 36 -
3.1.5.2	Referenzstämme des BVL.....	- 39 -
3.1.5.3	Referenzstämme des IMT.....	- 39 -
3.1.6	Geräte	- 40 -
3.1.7	Chemikalien, Nährmedien, Lösungen und Puffer.....	- 41 -
3.1.7.1	Chemikalien	- 41 -
3.1.7.2	Nährmedien	- 42 -
3.1.7.3	Lösungen und Puffer	- 43 -
3.1.8	Oligonukleotid-Primer.....	- 44 -
3.1.9	Antibiotika	- 45 -
3.2	Methoden	- 46 -
3.2.1	Kultivierung der eingesandten Bakterienisolate	- 46 -
3.2.2	Lagerung der reinkultivierten Bakterienisolate	- 46 -
3.2.3	Mikrobiologische Methoden	- 47 -
3.2.3.1	Bouillon-Mikrodilutionsverfahren.....	- 47 -
3.2.3.2	Phänotypische Bestätigung von ESBL-produzierenden <i>E. coli</i> -Stämmen	- 50 -
3.2.3.3	Agardiffusionstest	- 50 -
3.2.3.4	Qualitätskontrolle	- 50 -
3.2.4	Molekularbiologische Methoden.....	- 51 -
3.2.4.1	DNA-Isolierung	- 51 -
3.2.4.2	Polymerase-Kettenreaktion.....	- 51 -
3.2.4.3	Agarose-Gelelektrophorese	- 52 -

3.2.4.4	Pulsfeld-Gelelektrophorese.....	- 53 -
3.2.4.5	DNA-Sequenzanalyse	- 54 -
4	Ergebnisse	- 56 -
4.1	Phänotypische Detektion	- 56 -
4.1.1	Bouillon-Mikrodilutionsverfahren	- 56 -
4.1.2	Resistenzen gegenüber Nicht-Beta-Laktamantibiotika.....	- 59 -
4.1.3	Resistenzen gegenüber Beta-Laktamantibiotika	- 59 -
4.1.4	Agardiffusionstest.....	- 62 -
4.2	Genotypischer Nachweis sowie Charakterisierung des <i>bla</i> -Gens ..	- 63 -
4.2.1	Polymerase-Kettenreaktion	- 63 -
4.2.2	Sequenzanalyse der <i>bla</i> -Gene	- 63 -
4.2.3	Vorkommen von <i>bla</i> _{CTX-M} -Genen bei ESBL von einzelnen Tierarten und Infektionskrankheiten.....	- 63 -
4.3	Untersuchungen zur genomischen Ähnlichkeit der ESBL-bildenden <i>E. coli</i> -Stämme	- 65 -
4.3.1	Pulsfeld-Gelelektrophorese	- 65 -
4.4	Prävalenz ESBL-produzierender <i>E. coli</i> -Stämme in der getesteten deutschen Nutztierpopulation	- 67 -
5	Diskussion.....	- 69 -
5.1	Durchführung der Prävalenzstudie.....	- 69 -
5.2	Methoden der phänotypischen Bestätigung	- 70 -
5.2.1	Bouillon-Mikrodilutionsverfahren	- 70 -
5.2.2	Agardiffusionstest.....	- 72 -
5.3	Klonale Verwandtschaftsanalyse	- 72 -
5.4	Vorkommen von <i>bla</i> _{CTX-M} -Genen bei einzelnen Tierarten und Krankheiten	- 74 -
5.5	Prävalenz der gesamten getesteten deutschen Nutztierpopulation-	- 77 -
5.5.1	Vergleich veterinärmedizinischer Daten mit Daten aus anderen europäischen Ländern	- 77 -
5.5.2	Vergleich der Daten mit Daten aus human- medizinischen Prävalenzstudien	- 80 -
6	Zusammenfassung.....	- 83 -
7	Summary.....	- 85 -

8	Verwendete Literatur	- 87 -
9	Anhang.....	- 107 -
9.1	Publikation	- 107 -
9.2	Danksagung.....	- 108 -
9.3	Selbstständigkeitserklärung	- 109 -

Verwendete Abkürzungen

<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
A. bidest	Aqua bidest (destilliertes Wasser)
Abb.	Abbildung
AMP	Ampicillin
APR	Apramycin
ATCC	American Type Culture Collection
AUG	Amoxicillin/Clavulansäure
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CEP	Cephalothin
CHEF-PFGE	Contour-clamped homogenous electric field pulsed-Gelelektrophorese
CHL	Chloramphenicol
CLSI	Clinical Laboratory Standard Institute
COL	Colistin
CQN	Cefquinom
CTX-M	Cefotaximase
DHPS	Dihydropteroatsynthase
DOX	Doxycyclin
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. desoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ENR	Enrofloxacin
ESBL	Extended-Spectrum-Beta-Laktamasen
ESP	EDTA-Sarcosyl-Proteinase K
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
etc.	<i>et cetera</i>
EU	Europäische Union
e.V.	eingetragener Verein
evtl.	eventuell
FAZ	Cefazolin
FFN	Florfenicol

Verwendete Abkürzungen

FOP	Cefoperazon
FOT	Cefotaxim
g	Gramm
GEN	Gentamicin
GERMVet	German Resistance Monitoring Veterinär
h	Stunde (engl. hour)
i.d.R	in der Regel
I.E.	Internationale Einheiten
IMT	Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Fachbereich Veterinärmedizin, FU Berlin
IRT	Inhibitor-resistente TEM
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Kap.	Kapitel
kb	Kilo Basen
KBE	Kolonie-bildende Einheit
kbp	Kilo Basen-Paare
l	Liter
LB	Luria Bertani
Lsg.	Lösung
mg	Milligramm
MgCl₂	Magnesiumchlorid
MHK	Minimale Hemmstoffkonzentration
min	Minute(n)
ml	Milliliter
MLST	Multilocus Sequence Typing
mM	Millimolar
n	Gesamtzahl
Na	Natrium
NAL	Nalidixinsäure
NEO	Neomycin
Nr.	Nummer
o.g.	oben genannten
OXA	Oxacillinase
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PBP	Penicillin-bindendes Protein
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e. V.
PEN	Penicillin
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese

pI	isoelektrischer Punkt
POS	Positivkontrolle
RKI	Robert Koch-Institut
rpm	rounds per minute
s.	siehe
sec	Sekunde
SHV	Sulfhydryl variable
s.o.	siehe oben
SPE	Spectinomycin
spez.	Spezifisch
SPI	Spiramycin
spp.	Spezies
SXT	Trimethoprim/Sulfamethoxazol
t	Tonne
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEM	Temoniera
TET	Tetrazyklin
TIA	Tiamulin
TMP	Trimethoprim
TUL	Tulathromycin
U	unit
XNL	Ceftiofur
z. B.	zum Beispiel
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

Abbildungen

Abb. 1 Beta-Laktamantibiotika.....	- 2 -
Abb. 2 Enzymatische Deaktivierung von Beta-Laktamen:.....	- 5 -
Abb. 3 Klasse 1 Integron	- 21 -
Abb. 4 Geografische Verbreitung von CTX-M ESBL weltweit:	- 30 -
Abb. 5 <i>E. coli</i> -Stamm im Agardiffusionstest mit fehlendem Hemmhof (roter Pfeil)...	- 62 -
Abb. 6 Elektropherogramm der CHEF-PFGE.....	- 65 -
Abb. 7 Verwandtschaftsanalyse anhand der Restriktionsfragment-Längenprofile: ..	- 66 -
Abb. 8 Anzahl der <i>E. coli</i> -Stämme und der ESBL-produzierenden <i>E. coli</i> /Tierart.....	- 67 -

Tabellen

Tab. 1 Funktionale und molekulare Charakterisierung von Beta-Laktamasen	- 6 -
Tab. 2 Wiederkehrendes MHK-Muster bei vier getesteten Cephalosporinen:.....	- 24 -
Tab. 3 <i>E. coli</i> vom Kalb, Jungrind, Mastrind, Milchrind.....	- 33 -
Tab. 4 <i>E. coli</i> vom Ferkel, Läufer (Jungschwein), Mastschwein, Zuchtschwein.....	- 33 -
Tab. 5 <i>E. coli</i> von Pute, Masthahn, Legehennen, Ente, Gans.....	- 34 -
Tab. 6 An der BVL-Resistenzmonitoringstudie teilnehmende Kooperationspartner.-	34 -
Tab. 7 Zur genotypischen Charakterisierung verwendete <i>E. coli</i> -Stämme.....	- 37 -
Tab. 8 Referenzstämme für die MHK-Bestimmung und den Agardiffusionstest	- 39 -
Tab. 9 Eingesetzte Referenzstämme für PCR und PFGE.....	- 39 -
Tab. 10 Eingesetzte Geräte.....	- 40 -
Tab. 11 Eingesetzte Chemikalien	- 41 -
Tab. 12 Eingesetzte Nährmedien	- 42 -
Tab. 13 Eingesetzte Lösungen und Puffer	- 43 -
Tab. 14 Oligonukleotid-Primer zum genotypischen Nachweis von ESBL	- 44 -
Tab. 15 Auflistung der in den Mikrotiterplatten enthaltenen Antibiotika.....	- 45 -
Tab. 16 Verwendetes Plattenlayout mit Cefazolin in mg/l	- 49 -
Tab. 17 Verwendetes Plattenlayout mit Cefotaxim in mg/l (grau unterlegt).....	- 49 -
Tab. 18 Standard PCR-Ansatz	- 51 -
Tab. 19 Abweichungen vom Standard-Temperaturprofil bei der PCR	- 52 -
Tab. 20 Abweichungen vom Standard-Temperaturprofil bei der PCR	- 55 -
Tab. 21 CTX-M-produzierender <i>E. coli</i> -Stämme	- 56 -
Tab. 22 Ergebnisse der MHK der ESBL produzierenden <i>E. coli</i> (n = 40).....	- 61 -
Tab. 23 Vorkommen von blaCTX-M-Genen in <i>E. coli</i> -Stämmen	- 64 -
Tab. 24 Verteilung der <i>E. coli</i> -Stämme pro Indikation	- 68 -



1 Einleitung

Antimikrobielle Wirkstoffe aus der Gruppe der Beta-Laktame zählen zu den in der Human- und Veterinärmedizin weltweit sehr häufig eingesetzten Antibiotika. Der wichtigste Resistenzmechanismus von Gram-negativen Bakterien gegenüber Beta-Laktamantibiotika beruht auf der enzymatischen Inaktivierung des Antibiotikums durch die Hydrolyse des Beta-Laktamrings durch Beta-Laktamasen (Wiedemann *et al.*, 1989). Immer häufiger sind jedoch Beta-Laktam-spaltende Enzyme „Extended-Spectrum-Beta-Laktamases“ (ESBL) Ursache für Resistenzen bei Gram-negativen Bakterien (z. B. *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp.) gegenüber Oxyimino-Cephalosporinen der neueren Generationen. Der Eintrag ESBL-produzierender *E. coli* von Tieren in die Umwelt kann dabei als mögliche Übertragungsschnittstelle von ESBL-Resistenzgenen zwischen Mensch und Tier fungieren. Die Übertragung kann unter anderem durch direkten Kontakt und/oder durch die Aufnahme von Lebensmitteln stattfinden, die mit ESBL kontaminiert sind. Hierbei ist der leichte Austausch von *bla*-Genen über mobile genetische Elemente wie Plasmide oder Transposons zwischen den unterschiedlichen Bakterienpopulationen von besonderer Bedeutung. Zum Vorkommen von ESBL in *E. coli* von Tieren waren in Deutschland bislang kaum Daten verfügbar. Die Bedeutung dieser Enzyme bei Bakterien von Tieren und ein möglicher Einfluss auf die Resistenzen von *E. coli* in der Veterinärmedizin konnte bis dato nicht beurteilt werden und somit auch nicht die Auswirkungen auf die aktuell verfügbaren Therapiemöglichkeiten.

Ziel dieser Arbeit war deshalb die phänotypische und genotypische Identifizierung bzw. Charakterisierung von ESBL-produzierenden *E. coli*-Stämmen in einem repräsentativen Kollektiv aus Stämmen unterschiedlicher bakterieller Infektionskrankheiten (z. B. Enteritiden, Septikämien, Mastitiden etc.) von Nutztieren (Rind, Schwein und Geflügel), um valide Daten über die Häufigkeit und die Gruppen-Zugehörigkeit von ESBL in den deutschen Nutztierpopulationen zu gewinnen.

2 Literaturübersicht

2.1 Beta-Laktamantibiotika

Dem allgemeinen Sprachgebrauch folgend werden im Weiteren alle Antibiotika und die synthetisch hergestellten, antibiotisch wirksamen Chemotherapeutika bzw. Antiinfektiva als Antibiotika bezeichnet.

Die Gruppe der Beta-Laktamantibiotika setzt sich aus den Penicillinen, den Cephalosporinen, den Carbapenemen und den Monobactamen zusammen. Die beiden letztgenannten werden hier nicht beschrieben. Sie spielen eine wichtige Rolle als Reserveantibiotika in der Humanmedizin, sind daher nicht für die Veterinärmedizin zugelassen und von einer Umwidmung sollte ganz abgesehen werden. Die Grundstruktur der Beta-Laktame bildet ein so genannter Beta-Laktamring, dem im Falle der Penicilline ein Thiazolidinring, bei den Cephalosporinen ein Thiazinring, benachbart ist [Kroker aus Frey und Löscher, 2002].

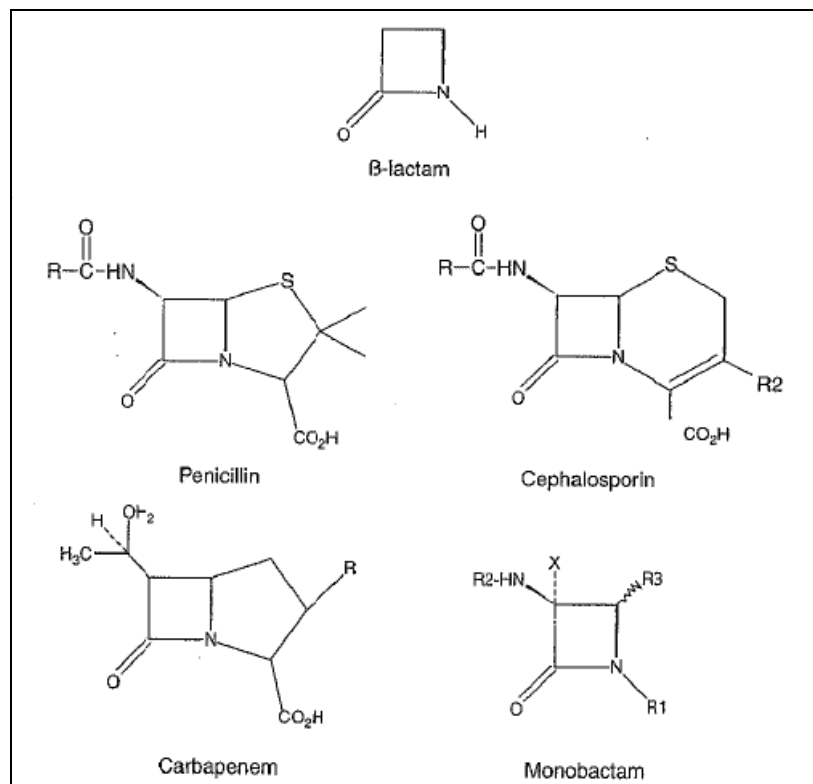


Abb. 1 Beta-Laktamantibiotika

(übernommen aus Giguere, Prescott, Baggot, Walker, Dowling, 2006).

Penicilline und Cephalosporine sind die wichtigsten Vertreter der Beta-Laktamantibiotika. Sie haben prinzipiell den gleichen Wirkungsmechanismus [Simon und Stille, 2004]. Die Beta-Laktamantibiotika gehen kovalente Bindungen mit Penicillin-bindenden-Proteinen (PBPs) ein. Dies hat eine Synthesestörung des Mureins zur Folge, welches für die physikalische Stabilität der Bakterienzelle verantwortlich ist [Löscher, Ungemach und Kroker, 2002]. Die verursachte Hemmung dieser Proteine führt zur Lysis der Zelle [Frey und Löscher, 2002]. Die Wirkungsunterschiede zwischen Penicillinen und Cephalosporinen sind bedingt durch eine unterschiedliche Affinität zu den PBPs der Bakterien, die Penetrationsfähigkeit durch die Zellmembran und die Beta-Laktamasefestigkeit [Simon und Stille, 2004].

2.1.1 Penicilline

Penicilline sind Abkömmlinge der 6-Aminopenicillansäure. Sie hemmen die Mureintranspeptidase bei der Mureinsynthese der Bakterienzellwand und verhindern somit den stabilen Aufbau der Bakterienzelle. Sie entfalten ihre bakterizide Wirkung primär gegenüber Gram-positiven Bakterien.

Innerhalb der Gruppe der Penicilline erfolgt eine Unterscheidung unter anderem in Benzylpenicilline, Phenoxypenicilline, Isoxazolylpenicilline, Aminopenicilline, Carboxypenicilline und Penethamathydrojodid [Schadewinkel-Scherkel, 1995; Kroker aus Frey und Löscher, 2002].

Im Weiteren wird lediglich auf die Benzylpenicilline sowie die Aminopenicilline eingegangen, da diese Antibiotika in der hier durchgeführten Resistenzbestimmung zum Einsatz kamen.

2.1.1.1 Benzylpenicilline

Benzylpenicillin wurde als erstes Antibiotikum bereits 1940 klinisch erprobt. Es wird aus dem Schimmelpilz *Penicillium notatum* gewonnen. Das Wirkungsspektrum umfasst hauptsächlich Gram-positive Erreger. Da Benzylpenicillin säurelabil ist und damit bei oraler Applikation von der Magensäure zerstört wird, werden parenterale Präparate eingesetzt. Durch die vorwiegend extrazelluläre Verteilung des Benzylpenicillins ist für die Wirksamkeit ein Plasmaspiegel von mindestens 0,1 – 1 I.E./ml zu gewährleisten.

2.1.1.2 Aminopenicilline

Aminopenicilline, auch Breitspektrumpenicilline genannt, stellen eine Klasse innerhalb der Penicilline dar, welche sich durch gute Verträglichkeit und Magensäurestabilität auszeichnen und die, anders als Benzylpenicilline, oral verabreicht werden können. Sie

2 Literaturübersicht

weisen ein erweitertes Wirkungsspektrum auf, welches zusätzlich zur Gram-positiven Keimflora auch Gram-negative Erreger wie beispielsweise *E. coli* einschließt [Schadewinkel-Scherkel, 1995; Kroker aus Frey und Löscher, 2002].

- **Ampicillin**

Ampicillin ist als Na-Salz oder Trihydrat im Handel erhältlich. Es besitzt eine kurze Halbwertszeit (von 30 min bis 93 min) und bei oraler Applikation eine Bioverfügbarkeit von 30 bis 50 %, wobei eine gleichzeitige Fütterung die Bioverfügbarkeit stark einschränkt. Eine Serumkonzentration von 5 µg/ml gilt als therapeutisch wirksam [Schadewinkel-Scherkel, 1995; Kroker aus Frey und Löscher, 2002].

- **Amoxicillin**

Das Wirkungsspektrum des Amoxicillins entspricht dem des Ampicillins, ist jedoch nach oraler Gabe besser bioverfügbar und auch bei gleichzeitiger Fütterung sind die Wechselwirkungen hinsichtlich der Resorptionsrate als geringer einzustufen. Die Halbwertszeit liegt etwas niedriger als die von Ampicillin [Schadewinkel-Scherkel, 1995; Kroker aus Frey und Löscher, 2002].

2.1.2 Cephalosporine

Cephalosporine sind Abkömmlinge der 7-Aminocephalosporansäure, wobei, anders als bei Penicillinen, nicht ein fünf-, sondern ein sechsgliedriger Heterozyklus ankondensiert ist. Der Wirkungsmechanismus ist mit dem der Penicilline weitestgehend identisch. Das Wirkungsspektrum variiert substanzabhängig. Cephalosporine werden häufig nach den Daten der Neueinführung der Stoffe in die Generationen 1 bis 4 klassifiziert [Kroker aus Frey und Löscher, 2002].

Zu den Cephalosporinen der **1. Generation** gehören beispielsweise Cephalotin, Cefazolin, Cefalexin und Cefradin. Sie sind wirksamer gegenüber Gram-positiven als gegenüber Gram-negativen Erregern.

Zu den Vertretern der **2. Generation** zählen Cefoxitin, Cefuroxim und Cefotiam. Diese Generation der Cephalosporine besitzt ein größeres Spektrum und weist stärkere Wirksamkeiten gegenüber Gram-negativen Bakterien auf.

Stoffe der **3. Generation** wie Ceftiofur, Cefoperazon und Cefotaxim (Humanmedizin) weisen ein breites Spektrum sowohl gegenüber Gram-positiven als auch Gram-negativen Erregern auf.

Zur **4. Generation** zählen Cefquinom wie auch Cefepim (Humanmedizin). Cephalosporine der 4. Generation weisen anders als die vorhergehenden Generationen eine höhere Beta-Laktamase-Stabilität auf [Frey und Löscher, 2002].

2.2 Beta-Laktamasen

Beta-Laktamasen sind natürlich vorkommende Enzyme in Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien, welche in der Lage sind, den Beta-Laktamring von Penicillinen, Cephalosporinen und Carbapenemen zu hydrolisieren und somit deren antibakterielle Wirkung zu deaktivieren.

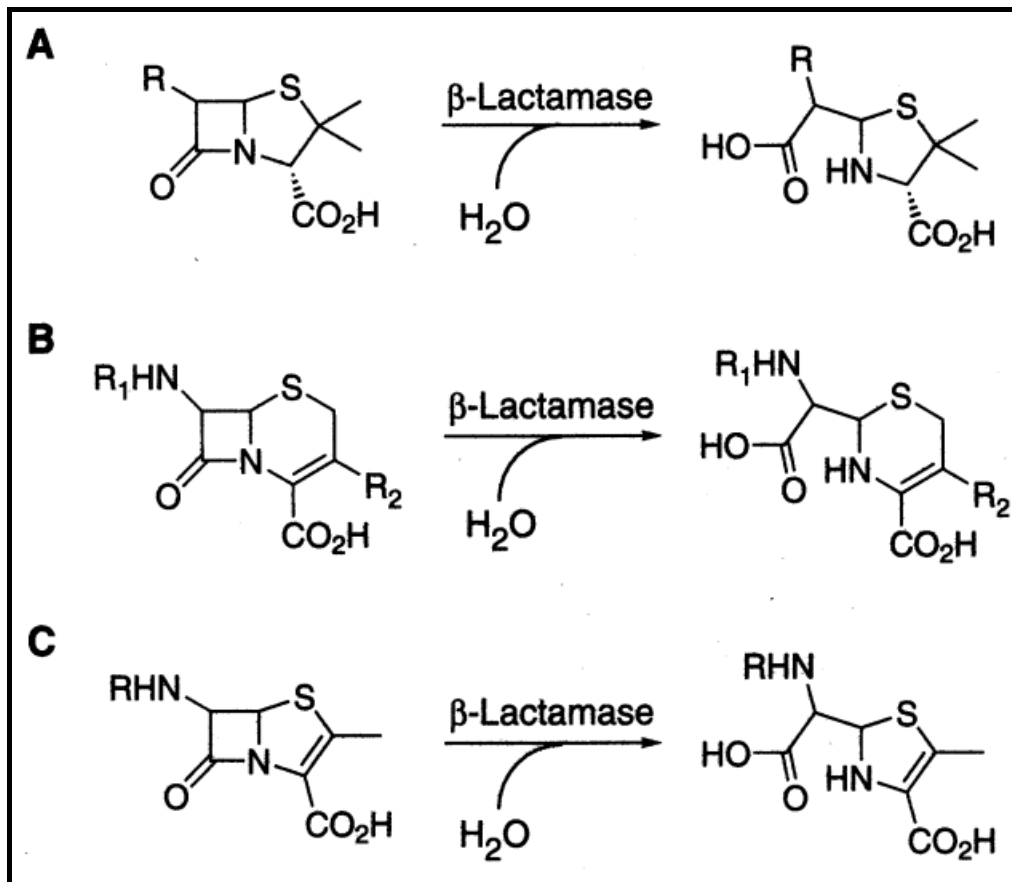


Abb. 2 Enzymatische Deaktivierung von Beta-Laktamen:
Spaltung des hydrolytischen Ringes und Inaktivierung von A) Penicillin,
B) Cephalosporin und C) Carbapenem durch Beta-Laktamasen (übernommen aus
Walsh, C., Antibiotics: Actions, Origins, Resistance, 2003).

Gram-negative Bakterien produzieren von Natur aus geringe Mengen speziesspezifischer Beta-Laktamasen, welche chromosomal kodiert vorliegen und im periplasmatischen Raum lokalisiert sind. Von der produzierten Menge und dem Typ hängt es ab, ob sie zur Resistenz führen oder nicht [Theuretzbacher, 1998]. Beta-Laktamasen-kodierende Gene können jedoch auch über Plasmide und Transposons

2 Literaturübersicht

weitergegeben werden. Die resultierenden Enzyme werden konstitutiv gebildet und sind Verursacher von Resistenzen gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen [Giguere, Prescott, Baggot, Walker, Dowling, 2006]. Beta-Laktamasen können anhand ihrer molekularen und/oder funktionalen Eigenschaften charakterisiert werden. Die Einteilung in die molekularen Klassen A bis D basiert auf dem Schema nach Ambler [Ambler, 1980]. Beta-Laktamasen der Klassen A, C und D sind Serinenzyme. Sie sind die klinisch häufigsten Enzyme. Daneben gibt es die Metalloenzyme, welche ein Zinkatom besitzen und der Klasse B angehören.

Die Einteilung nach Bush, Jacoby und Medeiros stützt sich auf die Einteilung in funktionale Gruppen. Beta-Laktamasen werden hierbei in vier Gruppen eingestuft. Zur Gruppe 1 gehören die Cephalosporinasen, welche kaum von dem Beta-Laktamase-Inhibitor Clavulansäure inhibiert werden. Gruppe 2 beinhaltet Beta-Laktamasen der Ambler-Klassen A und D. Diese sind allgemein durch Beta-Laktamase-Inhibitoren hemmbar. Der Gruppe 3 zugehörig sind die Metalloenzyme (Ambler Klasse B), welche kaum durch Beta-Laktamase-Inhibitoren gehemmt werden, jedoch durch Ethylendi-amintetraacetat (EDTA). Zur 4. Gruppe gehören die Penicillinasen, welche nicht durch Clavulansäure inhibiert werden [Bush *et al.*, 1995].

Tab. 1 Funktionale und molekulare Charakterisierung von Beta-Laktamasen
(nach Bush 2001)

Funktionale und molekulare Charakterisierung von Beta-Laktamasen			
Funktions- gruppe	Hauptunter- gruppe	Molekular- klasse	Eigenschaften von Beta-Laktamasen
1		C	Häufig vorkommende chromosomale Enzyme in Gram-negativen Bakterien, welche auch plasmid-kodiert vorliegen können. Vermittelt Resistenz für alle Beta-Laktamantibiotika außer Carbapenemen. Keine Inhibierung durch Clavulansäure.
2		A, D	Die meisten Enzyme können durch Clavulansäure inhibiert werden.
	2a	A	Häufige Resistenzen gegenüber Penicillinen. Penicillinasen von Staphylokokken und Enterokokken eingeschlossen.
	2b	A	Breitspektrum-Beta-Laktamasen (inklusive TEM-1 und SHV-1). Vornehmlich aus Gram-negativen Bakterien.
	2be	A	ESBL. Vermitteln Resistenz für Oxyimino-Cephalosporine und Monobaktame.

Funktionale und molekulare Charakterisierung von Beta-Laktamasen			
Funktions- gruppe	Hauptunter- gruppe	Molekular- klasse	Eigenschaften von Beta-Laktamasen
	2br	A	Inhibitor-resistente TEM (IRT). Zusätzlich ein Inhibitor-resistentes SHV-Derivat.
	2c	A	Carbenicillin-hydrolysierende Enzyme.
	2d	A	Cloxacillin-hydrolysierende Enzyme. Mäßig inhibierbar durch Clavulansäure.
	2e	A	Cephalosporinasen durch Clavulansäure inhibierbar.
	2f	A	Carbapenem-hydrolysierende Enzyme mit einer aktiven Serin-Seitenkette. Durch Clavulansäure inhibierbar.
3	3a, 3b, 3c	B	Metallo-Beta-Laktamasen. Vermittelt Resistenz für Carbapeneme und alle Beta-Laktame außer Monobaktamen. Keine Inhibition durch Clavulansäure möglich.
4		?*	Verschiedene nicht sequenzierte Enzyme, welche nicht durch die angegebenen Gruppen klassifizierbar sind.

Die Tabelle wurde von Bush, K. (2001) übernommen und ins Deutsche übersetzt.

* unbekannt

TEM-1 (Erläuterung siehe 2.3.1)

SHV-1 (Erläuterung siehe 2.3.2)

Die Einteilung in funktionale Gruppen hat für Klinik und mikrobiologische Labore eine größere Aussagekraft, da hier die Beta-Laktame nach ihrer Empfindlichkeit gegenüber Beta-Laktamase-Inhibitoren aufgegliedert werden [Paterson und Bonomo, 2005].

Derzeit sind über 500 verschiedene Beta-Laktamasen auf der Internetseite <http://www.lahey.org/Studies/> beschrieben (Stand 14.04.10). Die Mehrzahl der dort aufgeführten Beta-Laktamasen gehört zu den ESBL.

2.3 Extended-Spectrum-Beta-Laktamasen

Definitionsgemäß sind Extended-Spectrum-Beta-Laktamasen (ESBL) Beta-Laktamasen, die sekundär erworben wurden. Sie sind in der Lage Oxyimino-Cephalosporine, nicht jedoch Carbapeneme, zu hydrolysieren und ihre Gene können Resistenzen gegenüber Oxyimino-Cephalosporinen übertragen. Zu den ESBL gehören auch alle Beta-Laktamase-Mutanten, welche die oben genannten Fähigkeiten besitzen [Livermore und Cornaglia, 2008]. Die Hemmbarkeit von ESBL durch Beta-Laktamase-Inhibitoren wie Clavulansäure, Tazobactam oder Sulbactam ist ebenfalls eine Eigenschaft, welche in älteren Definitionen aufgeführt wird [Bush *et al.*, 1995; Paterson und Bonomo, 2005].

Ein Großteil der heute bekannten ESBL ist aus den klassischen Beta-Laktamasen entstanden. Durch Punktmutationen in den entsprechenden *bla*-Genen kommt es auf Proteinebene zu einer räumlichen Veränderung im aktiven Zentrum des Enzyms und somit zu einer Affinitätsänderung. Das Enzym ist dadurch in der Lage auch an die neueren Cephalosporine zu binden und sie hydrolytisch zu spalten [Stürenburg und Mack, 2003].

Die Verbreitung von Plasmid-vermittelten Beta-Laktamasen wie TEM-1, TEM-2 und SHV-1 und ihre Fähigkeit, Resistenzen gegenüber Breitbandpenicillinen zu übertragen, gab den Anstoß, Beta-Laktamase-stabile Beta-Laktamantibiotika zu entwickeln [Livermore, 2008]. In den 1980er Jahren kamen die Oxyimino-Cephalosporine auf den Markt und wurden bald weiträumig bei durch Gram-negative Bakterien ausgelösten schweren Infektionen eingesetzt [Bradford, 2001]. Der umfangreiche Einsatz der antimikrobiellen Wirkstoffe führte zu einem großen Selektionsdruck und damit zur vermehrten Ausbildung von Resistenzen [Livermore, 2008]. Aufgrund ihres erweiterten Aktivitätsspektrums, insbesondere gegenüber Oxyimino-Cephalosporinen, wurden diese Beta-Laktamasen als ESBL klassifiziert [Bradford, 2001].

Die Mehrheit der ESBL gehört zur Ambler Klasse A [Ambler, 1980] und zur funktionellen Klasse 2be, wobei das „e“ für Beta-Laktamasen steht, welche ein e-erweitertes Spektrum besitzen [Bush, 2001]. ESBL besitzen eine Vielzahl an unterschiedlichen Mutationen, die es ihnen erlauben, Breitband-Beta-Laktamantibiotika zu inaktivieren [Bush *et al.*, 1989]. ESBL unterscheiden sich von ihren „Eltern-Enzymen“ durch bis zu 7 Aminosäuresubstitutionen. Die wichtigsten Substitutionen an Position 164 bei TEM (286 Aminosäuren insgesamt), an Position 179 bei SHV (286 Aminosäuren insgesamt) und an Position 238 bei beiden haben eine Spektrumerweiterung zur Folge [Knox, 1995].

ESBL sind derzeit nicht resistent gegenüber Cephamycinen und Carbapenemen [Stürenburg, 2003], jedoch wurde auch schon berichtet, dass ESBL-produzierende Bakterienstämme Resistenzen gegenüber den oben genannten Wirkstoffen besitzen. Diese entwickelten sich aufgrund von Veränderungen der äußeren Bakterienmembran, z. B. durch den Verlust von Membranproteinen [Martinez-Martinez *et al.*, 1996; MacKenzie *et al.*, 1997]. Obgleich ESBL sich lediglich durch Punktmutationen im *bla*-Gen voneinander unterscheiden, zeigen sie doch große Unterschiede in ihrem Wirkungsspektrum.

2.3.1 TEM

TEM-1 stellt die erste Plasmid-vermittelte Beta-Laktamase in Gram-negativen Bakterien dar und wurde Anfang der 1960er Jahre entdeckt [Datta und Kontomichalou, 1965].

TEM-1 wurde ursprünglich in einem *E. coli*-Stamm einer Blutprobe einer griechischen Patientin namens Temoniera entdeckt und nach den ersten drei Buchstaben ihres Namens benannt [Medeiros, 1984]. TEM-1 ist die am weitesten verbreitete Beta-Laktamase bei Gram-negativen Bakterien. Bis zu 90 % der Ampicillin-Resistenz bei *E. coli* gehen auf TEM-1 zurück [Livermore, 1996]. TEM-1 ist in der Lage Penicillin und Cephalosporine der 1. Generation, wie z. B. Cephalothin, zu hydrolysieren.

TEM-2 ist ein Derivat aus TEM-1 und unterscheidet sich in einer einzelnen Aminosäuresequenz. Dies hat zwar eine Änderung des isoelektrischen Punktes (pI) zur Folge, jedoch keine Auswirkung auf die Substrateigenschaften [Jacoby und Medeiros, 1991]. Die Bestimmung des isoelektrischen Punktes dient als eine Möglichkeit, eine Beta-Laktamase zu identifizieren, da dieser bei jedem Enzym anders ist. Die der TEM Proteine liegen zwischen pI 5,2 und pI 6,5 [Bradford 2001].

TEM-1 und TEM-2 gehören nicht zu den Extended-Spectrum-Beta-Laktamasen [Paterson und Bonomo, 2005]. Sie stellen vielmehr die phylogenetische Grundlage für alle folgenden Aminosäuresubstitutionen der TEM ESBL dar.

Das erste TEM-Derivat, welches eine gesteigerte Aktivität gegenüber Breitspektrum-Cephalosporinen aufwies, war TEM-3. Es wurde 1987 erstmalig beschrieben [Sougakoff *et al.*, 1988]. Seitdem hat die Anzahl und Vielfältigkeit der TEM-Derivate stetig zugenommen. Mehr als 170 TEM Beta-Laktamasen sind derzeit beschrieben. Die Mehrheit gehört zu den ESBL. Eine aktuelle Übersicht über die Anzahl ist auf der Internetseite <http://www.lahey.org/Studies/temtable.asp> zu finden (Stand 14.04.10).

2 Literaturübersicht

Inhibitor-resistente TEM

Inhibitor-resistente TEM (IRT) zeichnen sich dadurch aus, dass sie im Gegensatz zu TEM nicht durch Clavulansäure oder Sulbactam gehemmt werden können. Obgleich IRTs nicht zu den ESBL gehören, werden sie häufig in diesem Zusammenhang diskutiert, da sie Derivate der klassischen TEM darstellen [Bradford, 2001]. IRT wurden Anfang der 1990er Jahre entdeckt. Sequenzanalysen zeigten im Vergleich zu TEM-1 Aminosäuresubstitutionen an den Positionen 69, 130, 244, 275 und 276, ausgehend von TEM-1 [Prinarakis et al., 1997].

Obgleich IRT Resistenzen gegenüber Clavulansäure und Sulbactam und somit auch gegen Beta-Laktam/Beta-Laktamase-Inhibitor Kombinationen wie zum Beispiel Amoxicillin/Clavulansäure zeigen, können sie durch Tazobactam sowie die Kombination Piperacillin/Tazobactam gehemmt werden [Bonomo et al., 1997; Chaibi et al., 1999]. Derzeit sind mindestens 23 Inhibitor-resistente TEM veröffentlicht [<http://www.lahey.org/Studies/temtable.asp>] (Stand 14.04.10).

2.3.2 SHV

SHV steht für „Sulfhydryl variable“ und beschreibt die strukturelle Eigenschaft der Enzyme. SHV Beta-Laktamasen stammen ursprünglich aus *Klebsiella* spp., wobei SHV-1 der Vorläufer aller SHV-Derivate ist und allgemein in *Klebsiella pneumoniae* detektiert wird. Es wird davon ausgegangen, dass SHV-1 ursprünglich in *Klebsiella* spp. chromosomal vorlag und Plasmid-vermittelt auf andere *Enterobacteriaceae* übertragen wurde [Stürenburg und Mack, 2003].

SHV-1 überträgt Resistenzen gegenüber Breitbandpenicillinen wie Ampicillin, Ticarcillin und Piperacillin jedoch nicht gegenüber Oxyimino-Cephalosporinen [Livermore, 1995].

1983 wurde erstmals ein Derivat von SHV-1 entdeckt, welches nunmehr Resistenzen gegenüber Cephalosporinen der neueren Generationen übertrug. Diese Plasmid-kodierte Beta-Laktamase wird als SHV-2 bezeichnet und gehört zu einer der ersten entdeckten ESBL [Knothe et al., 1983]. An Position 238 besitzt SHV-2 die Aminosäure Serin anstelle von Glycin. Diese Mutation bewirkt eine gesteigerte Affinität für Oxyimino-Cephalosporine mit einer signifikanten Erhöhung der minimalen Hemmstoffkonzentration (MHK) für Cefotaxim und einer geringeren Erhöhung der MHK für Ceftazidim [Kliebe et al., 1985].

Im Gegensatz zu den Inhibitor-resistenten TEM Beta-Laktamasen wurde von lediglich einem Inhibitor-resistenten SHV-Derivat berichtet [Prinarakis et al., 1997].

Mindestens 127 SHV Beta-Laktamasen sind zurzeit bekannt [<http://www.lahey.org/Studies/webt.asp#SHV>] (Stand 14.04.10). Die Mehrheit der SHV-Derivate gehört zu den ESBL.

2.3.3 CTX-M

CTX-M ist die weltweit am weitesten verbreitete ESBL [Livermore, 2007; Bonnet, 2004]. Mitte der 1980er Jahre wurde CTX-M erstmalig in Japan beschrieben [Matsumoto, 1988]. Kurz darauf berichteten Bauernfeind et al. (1992) von einem Cefotaxim-resistenten *E. coli*-Stamm, welcher eine Nicht-TEM und Nicht-SHV ESBL produzierte. Die Bezeichnung CTX-M wurde aufgrund der Fähigkeit zur hydrolytischen Aktivität gegenüber Cefotaxim abgeleitet. Zur gleichen Zeit begann eine rasante Verbreitung von Cefotaxim-resistenten *Salmonella*-Stämmen in verschiedenen Regionen Südamerikas. Die für die Cefotaximresistenz verantwortlichen Enzyme der Stämme zeichneten sich durch ihren im alkalischen statt im sauren Bereich liegenden pI aus. Zudem übertrugen sie in höherem Maße Resistenzen gegenüber Cefotaxim als gegenüber Ceftazidim und zeigten eine stärkere hydrolytische Aktivität gegenüber Cefotaxim, waren jedoch zugleich durch Beta-Laktamase-Inhibitoren hemmbar [Bauernfeind et al., 1992].

Sequenzanalysen zeigen, dass CTX-M ESBL lediglich zu 39 % identisch mit TEM und SHV sind [Barthélémy et al., 1992]. CTX-M ESBL stammen vermutlich von den natürlichen, chromosomal kodierten Beta-Laktamasen *bla*_{KLUC-1} von *Klyuvera cryocenses*, *bla*_{KLUA} von *Klyuvera ascorbata* und *bla*_{KLUG-1} von *Klyuvera geogiana* ab [Poirel, 2002; Bonnet, 2004]. DNA-Sequenzen, welche das CTX-M Gen flankieren, zeigen Ähnlichkeiten [Decousser et al., 2001]. Der offene Leserahmen Orf1 besitzt eine 96 %ige Identität mit *bla*_{KLUA} und *bla*_{KLUC-1} [Bonnet, 2004].

CTX-M Enzyme können anhand ihrer Aminosäuresequenzähnlichkeiten klassifiziert werden. Phylogenetische Studien deckten 5 Hauptgruppen auf, wobei die Mitglieder einer jeden Gruppe mehr als 94 % Identität und Mitglieder aus den phylogenetisch entferntesten Gruppen ≤ 90 % Identität aufwiesen [Bonnet, 2004].

Die Gruppe 1 enthält 18 Plasmid-vermittelte CTX-M ESBL: CTX-M-1, -3, -10, -11, -12, -15, -22, -23, -27, -28, -29, -30, -32, -33, -34, -36, -37 und -42. Zur Gruppe 2 gehören CTX-M-2, -4, -5, -6, -7, -20, -31, -35 und Toho-1. Auf die Gruppe 9 entfallen CTX-M-9, -13, -14, -16, -17, -18, -19, -21, -24, -38 und Toho-2. Gruppe 8 angehörig sind CTX-M-8, -40 und -41 und Gruppe 25/26 enthält CTX-M-25, -26 und -39 [Xu, 2005].

CTX-M Gene liegen üblicherweise auf Plasmiden mit Größen von 7 kb [Cao et al., 2002] bis zu 160 kb [Pai et al., 2001]. Das TEM-1 Gen liegt häufig auf dem gleichen

2 Literaturübersicht

Plasmid. Es sind jedoch auch Kombinationen mit TEM-2, OXA-1 und SHV nachgewiesen [Karim *et al.*, 2001; Sabaté *et al.*, 2000]. Diese Plasmide können nicht nur Resistenzen gegenüber Oxyimino-Cephalosporine vermitteln, sondern auch gegenüber anderen antimikrobiellen Wirkstoffen, wie beispielsweise Aminoglykoside, Tetrazykline, Chloramphenicol, Sulfonamide und Trimethoprim [Bonnet, 2004].

Plasmid-kodierte CTX-M sind häufig durch Konjugation übertragbar. Die Transferfrequenz variiert dabei von 10^{-7} bis 10^{-2} pro Spenderzelle. Dies erklärt die leichte Übertragbarkeit von *bla*_{CTX-M}-tragenden Plasmiden [Bonnet, 2004]. Derzeit sind mehr als 90 CTX-M bekannt [<http://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1>] (Stand 14.04.10). Alle CTX-M gehören zu den ESBL.

2.3.4 OXA

Die Bezeichnung OXA leitet sich von der Fähigkeit der Enzyme ab, Oxacillin zu hydrolisieren [Paterson und Bonomo, 2005]. OXA Beta-Laktamasen werden nach Ambler in die Klasse D und funktional in die Gruppe 2d (nach Bush, Jacoby und Medeiros) eingeteilt. Sie übertragen Resistenzen gegen Ampicillin und Cephalothin und besitzen typischerweise eine ausgeprägte hydrolytische Aktivität gegenüber Oxacillin und Cloxacillin und sind von Beta-Laktamase-Inhibitoren nur schwach hemmbar [Bush *et al.*, 1995]. Im Gegensatz zu den meisten ESBL, welche bei *E. coli*, *K. pneumoniae* und anderen *Enterobacteriaceae* gefunden wurden, kommen OXA Beta-Laktamasen vornehmlich in *Pseudomonas aeruginosa* vor [Bradford, 2001]. Die Gruppe der OXA Beta-Laktamasen wurde ursprünglich geschaffen, um wenige Beta-Laktamasen mit einem spezifischen Hydrolyseprofil einordnen zu können. Die Mitglieder dieser Gruppe zeigen eher phänotypische als genotypische Gemeinsamkeiten. Lediglich 20 % Sequenzhomologie besteht innerhalb der OXA Beta-Laktamasen [Bradford, 2001].

Viele OXA ESBL (OXA-11, -14, -16 und -17) leiten sich von OXA-10 ab [Danel *et al.*, 1995 und 1999; Hall *et al.*, 1993]. Oben genannte OXA-Subtypen unterscheiden sich von OXA-10 in einer von zwei Aminosäuresubstitutionen. An Position 73 sitzt Asparagin anstelle von Serin bzw. an Position 157 Aspartat anstelle von Glycin. Letztgenannte Aminosäuresubstitution verursacht eine ausgeprägte Resistenz gegenüber Ceftazidim [Danel *et al.*, 1999].

Zurzeit sind 11 OXA ESBL und 162 OXA Beta-Laktamasen bekannt [<http://www.lahey.org/Studies/webt.asp#OXA>] (Stand 14.04.10).

2.3.5 Andere ESBL

Die Mehrzahl der bekannten ESBL stammen von TEM und SHV ab bzw. können anderen ESBL-Gruppen wie OXA oder CTX-M zugeordnet werden. Es gibt jedoch einige ESBL, die nicht mit den etablierten Gruppen verwandt sind [Bradford, 2001].

Die PER-1 ESBL wurde erstmals in einem *P. aeruginosa*-Stamm in der Türkei entdeckt [Nordmann *et al.*, 1993] und später auch in *Salmonella enterica* spp. *enterica* Serovar Thyphimurium sowie in *Acinetobacter baumannii* [Vahaboglu *et al.*, 1996]. PER-1 ist weit verbreitet in der Türkei und wird in bis zu 60 % der Ceftazidim-resistenten *A. baumannii*-Stämme gefunden [Vahaboglu *et al.*, 1997]. PER-1 ist in der Lage Penicillin und Oxyimino-Cephalosporine, vornehmlich Ceftazidim und Aztreonam, zu hydrolisieren. Es ist von Beta-Laktamase-Inhibitoren hemmbar [Paterson und Bonomo, 2005].

VEB-1 weist eine 38 %ige Verwandtschaft mit PER-1 auf. Sie wurde erstmals in einem *E. coli*-Stamm eines Patienten in Vietnam entdeckt [Poirel *et al.*, 1999]. Sie vermittelt Resistenzen gegenüber Ceftazidim, Cefotaxim und Aztreonam und ist durch Einsatz von Beta-Laktamase-Inhibitoren hemmbar [Paterson und Bonomo, 2005]. Identische ESBL wurden auch in *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* und *P. aeruginosa* in Thailand entdeckt [Girlich *et al.*, 2002].

CME-1 zeigt ebenfalls eine Verwandtschaft mit PER-1 und wurde aus *Chryseobacterium meningosepticum* isoliert [Rossolini *et al.*, 1999]. Ebenso konnte TLA-1 in einem *E. coli*-Isolat eines Patienten in Mexiko detektiert werden [Silva *et al.*, 2000].

PER-1, VEB-1, CME-1 sowie TLA-1 zeigen 40 bis 50 % Sequenzähnlichkeit. Alle übertragen Resistenzen gegenüber Oxyimino-Cephalosporine, insbesondere gegen Ceftazidim und Aztreonam [Bradford, 2001].

2.4 Antibiotikaresistenz bei *E. coli*

Eine Antibiotikaresistenz liegt vor, wenn Bakterien in Anwesenheit therapeutisch relevanter Konzentrationen eines Antibiotikums ihre Vermehrung nicht einstellen. Sie sind gegenüber der Wirksubstanz unempfindlich [Hof, Müller, Dörries, 2000]. Bei der bakteriellen Resistenz wird zwischen der intrinsischen (natürliche) und der erworbenen (sekundäre) Resistenz unterschieden.

Die **intrinsische Resistenz** ist eine genus- oder speziesspezifische Eigenschaft von Bakterien. Sie beruht auf einer allgemeinen Unempfindlichkeit von Bakterien gegenüber einem spezifischen Wirkstoff oder einer Wirkstoffgruppe. Ursachen sind einerseits das Fehlen der Angriffsstelle für bestimmte Antibiotika im Bakterium, andererseits die

2 Literaturübersicht

Unzugänglichkeit des Wirkortes aufgrund der Undurchlässigkeit der Bakterienmembran. Die intrinsische Resistenz stellt eine physiologische Eigenschaft der Bakterien dar und ist nicht zwischen diesen übertragbar. Daher spielt sie bei der bakteriellen Resistenzentwicklung keine Rolle [Schwarz *et al.*, 2001].

Die **erworbene Resistenz** ist eine stammspezifische Eigenschaft, welche auf dem Erwerb fremder Resistenzgene oder auf resistenzvermittelnden Mutationen chromosomaler Gene beruht. Diese mutierten Gene sind natürlicherweise nicht zwischen Bakterien austauschbar, werden jedoch bei der Zellteilung vertikal weitergegeben. Resistenzvermittelnde Mutationen sind äußerst stabil, da sie meist nur den Austausch einiger Basenpaare umfassen und demzufolge nur geringfügige Änderungen in den Genprodukten bewirken, welche für die biologische Funktion nicht nachteilig sind. Im Gegensatz zur vertikalen Ausbreitung resistenzvermittelnder Mutationen sind Resistenzgene meist auf mobilen genetischen Elementen lokalisiert, so dass es neben der vertikalen auch zu einer horizontalen Verbreitung kommt [Schwarz *et al.*, 1999-2001].

Es lassen sich vier Hauptgruppen von Resistenzmechanismen unterscheiden:

1. **Enzymatische Inaktivierung der Wirkstoffe**

Der Resistenzmechanismus beruht auf einer enzymatischen Inaktivierung des Antibiotikums mittels hydrolytischer Spaltung oder mittels chemischer Veränderung der Wirkstoffe durch Acetylierung, Adenylierung oder Phosphorylierung [Werckenthin und Schwarz, 1997]. Zur hydrolytischen Spaltung der Wirkstoffe bilden Bakterien entsprechende Enzyme, die das Antibiotikum direkt angreifen und seine strukturelle Integrität zerstören [Schwarz *et al.*, 2000].

2. **Verminderte intrazelluläre Anhäufung der Wirkstoffe**

Einen weiteren Mechanismus der Antibiotikaresistenz stellt die Verringerung der Wirkstoffkonzentration in der Zelle dar. Dies kann auf verschiedenen Wegen geschehen. So stellt die äußere Membran bei Gram-negativen Bakterien eine Diffusionsbarriere für Antibiotika dar, welche von Porinen durchsetzt ist, die eine spezifische oder unspezifische Barrierefunktion innehaben. Spezifische Porine dienen dem Transport bestimmter Nährstoffe, unspezifische Porine wie OmpF oder OmpC (outer membrane protein) bei *E. coli*, sogenannte multiple drug resistance-Effluxpumpen (mdr Pumpen), transportieren mit unterschiedlicher

Spezifität Antibiotika und andere für das Bakterium toxische Substanzen aus der bakteriellen Zelle heraus. Eine erhöhte Expression dieser mdr Pumpen führt zu einer verringerten Empfindlichkeit z. B. auch gegenüber Beta-Laktamantibiotika. Besonders effizient für die Antibiotikaresistenz sind die Pumpen vom RND-Typ (resistance, nodulation, division), wie AcrABToIC. Diese Pumpe besteht aus drei Komponenten, welche die äußere Membran über den periplasmatischen Raum mit der Cytoplasmamembran verbinden und bei *E. coli* für die multiple Antibiotikaresistenz von größter Bedeutung ist [Heisig, 2006].

Eine verminderte intrazelluläre Anhäufung von antimikrobiellen Wirkstoffen kann zudem auch über eine verminderte Aufnahme dieser Wirkstoffe in die Bakterienzelle erfolgen. Ändert sich die Ladung der Lipopolysaccharide der äußeren Membran, wird das Anheften der Wirkstoffe an die äußere Membran wirksam blockiert. Dieser Mechanismus wurde beispielsweise bei *Pseudomonas spp.* identifiziert [Schwarz und Chaslus-Dancla, 2001].

3. Vorgänge an den zellulären Angriffsstellen

Bei diesem Mechanismus wird die Zielstruktur (der Antibiotika-Angriffsort) so verändert, dass sich das Antibiotikum nicht an sie binden kann. Dementsprechend kann die Zielstruktur durch das Antibiotikum auch nicht inaktiviert werden. Mutationen im Gen der Zielstruktur und enzymatische Modifikation der Zielstruktur (z. B. Addition von Schutzgruppen) können diese Veränderung bewirken. Die chemische Modifikation der Zielstruktur beispielsweise durch Methylierung macht die Angriffstelle unzugänglich für das Antibiotikum [Leclercq *et al.*, 1991; Schwarz und Chaslus-Dancla, 2001].

Sowohl die Überexpression der nativen Zielstruktur wie auch der Austausch der empfindlichen Angriffstelle durch unempfindliche Zielstrukturen sind mögliche Wege der Bakterien, einer antibiotischen Wirkung zu entgehen [Quintiliani *et al.*, 1999]. Letztgenannter Mechanismus spielt eine Rolle bei Resistenzen gegenüber Sulfonamiden oder Trimethoprim. Im Falle der Tetrazyklinresistenz sind zusätzliche Schutzproteine bekannt, die wahrscheinlich durch Maskierung der Angriffstelle die inhibitorische Wirkung der Tetrazykline verhindern, ohne jedoch die Funktionalität der betreffenden Ribosome nachteilig zu beeinflussen [Schwarz und Trollenier, 2000].

4. Alternative Stoffwechselwege

Eine weitere Möglichkeit von *E. coli* die Wirkung von Antibiotika zu umgehen, ist die Aufnahme alternativer Stoffwechselwege und damit die Umgehung der durch Antibiotika blockierten Wege. Hierbei werden Enzyme des Bakteriums, die durch das Antibiotikum gehemmt werden, durch funktionell analoge, jedoch unempfindliche Enzyme substituiert. Dieser Weg der Antibiotika-unempfindlichen Enzyme ist für Sulfonamide und Trimethoprim beschrieben [McDermott *et al.*, 2003]. Zielstruktur der Sulfonamide ist das Enzym Dihydropteroatsynthase (DHPS) des Folsäurestoffwechsels, das normalerweise eine höhere Affinität zu den Sulfonamiden als zu seinem physiologischen Partner p-Aminobenzoessäure hat. Eine Resistenz kann auf der Änderung der DHPS der Bakterien aufgrund von Mutationen, Insertionen oder Duplikationen beruhen, was zu erniedrigten Affinität für Sulfonamide führt [Werckenthin und Schwarz].

2.5 Resistenz gegenüber Beta-Laktamantibiotika

Resistenzen gegenüber Beta-Laktamantibiotika sind hauptsächlich auf die enzymatische Inaktivierung durch Beta-Laktamasen oder auf die reduzierte Bindungsfähigkeit an Penicillin-bindende-Proteine (PBP) zurückzuführen [Livermore, 1995; Georgeopapadakou, 1993]. Weitere Ursachen können die verminderte Aufnahme oder die gesteigerte Ausschleusung von Beta-Laktamantibiotika sein [Paulsen *et al.*, 1996; Quantiliani *et al.*, 1999]. Die Inaktivierung durch Beta-Laktamasen ist die am häufigsten vorkommende erworbene Resistenz [Schwarz *et al.*, 2001]. Im Folgenden werden die vier bekannten Resistenzmechanismen gegenüber Beta-Laktamantibiotika beschrieben.

Enzymatische Inaktivierung

Im Falle der Beta-Laktamantibiotika hydrolysieren Beta-Laktamasen den enzymatischen Beta-Laktamring und heben die Wirkung des Antibiotikums auf [Bush *et al.*, 1995]. Derzeit sind über 500 verschiedene Beta-Laktamasen bekannt. Auf der Internetseite <http://www.lahey.org/Studies/> werden alle bislang bekannten Beta-Laktamasen beschrieben (Stand 14.04.10). Die Mehrzahl der dort aufgeführten Beta-Laktamasen gehört zu den Extended-Spectrum-Beta-Laktamasen (siehe Kapitel 2.3).

Modifizierte Penicillin-bindende-Proteine

Veränderte Penicillin-bindende-Proteine (PBP) sind häufig Ursache für eine verminderte Bindungsfähigkeit von Beta-Laktamantibiotika. PBP sind Transpeptidasen, welche eine wichtige Rolle bei der Bakterienzellwandsynthese spielen [Georgeopapadakou, 1993]. Der Erwerb Beta-Laktam-resistenter PBP ist beispielsweise der Grund, weshalb Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA)-Stämme Resistenzen gegenüber Penicillinen, Cephalosporinen, Carbapenemen und Monobaktamen aufweisen. Das dafür verantwortliche Gen *mecA* ist dabei auf einer Genkassette (SSC*mec*) lokalisiert [Schwarz und Chaslus-Dancla, 2001].

PBP mit einer geringen Affinität für Beta-Laktamantibiotika wurden ebenfalls bei *Streptokokken* und *Enterokokken* entdeckt. In resistenten Stämmen von *Enterococcus faecium* und *Enterococcus faecalis* wurde eine Überproduktion von PBP3 festgestellt. PBP3 besitzt nur eine geringe Affinität für Beta-Laktame [Georgeopapadakou, 1993].

Verminderte Aufnahme von Beta-Laktamantibiotika

Ursprünglich empfindliche Bakterien können Resistenzeigenschaften erwerben, die mit einem Permeabilitätsrückgang der Bakterienzellmembran verbunden sind [Neu, 1989]. Dies kann zum einen an einem Mangel an bestimmten äußeren Membranproteinen liegen, welche ursprünglich als Eintrittspforte in die Bakterienzelle von Beta-Laktamantibiotika genutzt wurden [Charel *et al.*, 1996; Hopkins *et al.*, 1990]. Zum anderen kann es durch Änderung der elektrischen Ladungen in der äußeren Zellmembran vom Negativen zum elektrisch Neutralen stark positiv geladene Wirkstoffe am Eindringen hindern. Beta-Laktamresistenz bei *E. coli* und *K. pneumoniae* ist unter anderem auf die verminderte Expression bzw. die strukturelle Modifikation der Porine OmpF [Simonet *et al.*, 2000] sowie OmpK38 [Martinez-Martinez *et al.*, 1996] zurückzuführen.

Aktive Ausschleusung

Um der Einwirkung von Antibiotika zu entgehen, haben einige Bakterien Transportmechanismen entwickelt, mit deren Hilfe sie den Wirkstoff aktiv aus der Zelle schleusen können [Smith und Lewin, 1993]. Der verstärkte Export beruht dabei auf zwei unterschiedlichen Typen energieabhängiger Effluxsysteme. Zum einen liegen membranständige Transportproteine mit einem limitierten Substratspektrum vor. Spezifische Transporter vermitteln in der Regel ein höheres Resistenzniveau. Durch ihre

2 Literaturübersicht

Ausrichtung auf die Ausschleusung strukturell eng verwandter Substanzen sind sie in der Lage, die betreffenden Stoffe effizienter aus der Bakterienzelle auszuschleusen [Schwarz und Kehrenberg, 2000]. Zum anderen können unspezifische Transportsysteme, sogenannte „Multidrug-Transporter“ mit einem weiten Substratspektrum vorkommen [Schwarz und Chasus-Dancla, 2001]. Bei *Salmonella* spp. und *E. coli* wurde das bereits unter 2.4 genannte Effluxsystem AcrAB-TolC beschrieben, welches Beta-Laktamantibiotika effektiv aus der Zelle ausschleust [Poole, 2000 und Putman *et al.*, 2000].

2.6 Resistenzverbreitung bei *E. coli*

Die rasche Verbreitung von Resistenzeigenschaften liegt im horizontalen Gentransfer unter Mitwirkung von resistenztragenden mobilen genetischen Elementen begründet. Dazu zählen Plasmide, Transposons und Genkassetten/Integrone [Schwarz und Chasus-Dancla, 2001]. Beim horizontalen Gentransfer unterscheidet man zwischen Intraspeziestransfer, Interspeziestransfer und Intergenustransfer. Für die Bakterien besteht der Vorteil darin, dass sie die erforderlichen Resistenzgene nicht individuell entwickeln müssen, sondern auf die im jeweiligen Genpool der Bakteriengemeinschaft vorhandenen und austauschbaren Resistenzgene zurückgreifen können [Kehrenberg, 2000]. An dieser Stelle soll auf die Strukturen und Mechanismen eingegangen werden, die eine wichtige Funktion in der Verbreitung von Resistenzgenen bei *E. coli* einnehmen. Bei den Mechanismen der Resistenzverbreitung wird zwischen der Konjugation, der Transduktion und der Transformation unterschieden. Für *E. coli* ist insbesondere die Konjugation von Bedeutung. Auf diese wird im Folgenden näher eingegangen.

2.6.1 Konjugation

Die Konjugation beschreibt den Transfer eines selbstübertragbaren (konjugativen) Plasmides oder Transposons aus einer Spenderzelle in eine Empfängerzelle. Konjugative Plasmide und Transposons können kleinen nicht-konjugativen Plasmiden, die sich in der gleichen Bakterienzelle befinden, den Wechsel in die neue Wirtszelle ermöglichen, indem sie diesen Plasmiden ihren Transferapparat zur Verfügung stellen. Diesen Vorgang bezeichnet man als Mobilisierung [Schwarz *et al.*, 2001].

Konjugative Plasmide oder Transposons verfügen über einen *tra*-Genkomplex. Die Produkte dieses Genkomplexes stellen einzelne Komponenten des Transferapparates dar, mit dessen Hilfe sich die Plasmide oder Transposons von einer Bakterienzelle in die nächste bewegen. Der konjugative Transfer verläuft in der Regel so, dass eine

Kopie des betreffenden resistenzvermittelnden Elementes in der Spenderzelle verbleibt und eine weitere Kopie in die Empfängerzelle gelangt [Kehrenberg, 2000].

Plasmide klinisch relevanter *E. coli*-Stämme mit CTX-M-kodierenden Genen werden häufig durch Konjugation übertragen. Ihre Transferfrequenz variiert von 10^{-7} bis 10^{-2} pro Spenderbakterium. Dies erklärt die schnelle Verbreitung von *bla*_{CTX-M}-tragenden Plasmiden [Bonnet, 2004].

2.6.2 Plasmide

Plasmide sind extrachromosomale, doppelsträngige und meist ringförmige DNA-Moleküle in unterschiedlicher Größe (von < 2 kbp bis zu > 100 kbp). Sie sind in der Lage, sich unabhängig von der chromosomalen DNA zu replizieren. Abhängig von der Größe liegen sie in unterschiedlicher Kopienzahl in der Bakterienzelle vor. Sie tragen häufig Antibiotikaresistenzgene [Bennett, 1995].

Kleine Plasmide (< 10 kbp) tragen meist nur ein oder zwei Resistenzgene, wohingegen größere Plasmide (> 30 kbp) mehrere Resistenzgene besitzen können [Kehrenberg, 2000]. Plasmide tragen jedoch nicht nur Antibiotikaresistenzgene, sondern können auch Resistenzgene gegenüber Desinfektionsmitteln oder Schwermetallen bzw. Virulenzgene, Gene für ihre Übertragung in andere Bakterienzellen (sogenannter *tra*-Genkomplex) oder Gene für metabolische Eigenschaften besitzen [Stanisich, 1988].

2.6.3 Transposons

Transposons sind mobile genetische Elemente, die zum Ortswechsel (Transposition) befähigt sind. Im Gegensatz zu Plasmiden verfügen sie jedoch nicht über ein eigenes Replikationssystem. Daher sind sie immer auf vermehrungsfähige Vektormoleküle (chromosomale DNA oder Plasmide) angewiesen, in welche sie sich integrieren können [Bennett, 1995]. Transposons variieren in ihren Größen und in ihrem Aufbau und können ein oder mehrere Antibiotikaresistenzgene tragen. Größere Transposons können ebenfalls Gene besitzen, deren Genprodukte einen eigenständigen Transfer in andere Bakterienzellen ermöglichen [Kehrenberg, 2000].

Die Integration von Transposons in das Bakterienchromosom bzw. in Plasmide ist meistens unabhängig von einer spezifischen Bindungsstelle; bei einigen ist jedoch eine seitenspezifische Insertion beschrieben, wie beispielsweise bei Tn7, welches in *E. coli* in der Nähe des Genes *glmS* inseriert [Bartkus *et al.*, 2003; Cloeckert *et al.*, 2000; Waturangi *et al.*, 2003]. Antibiotikaresistenzen können horizontal durch Transposons vermittelt werden. Transposon Tn10 vermittelt beispielsweise Resistenzen gegenüber Tetrazyklinen. Es besteht aus zwei Insertionssequenzen IS10, welche das resistenz-

2 Literaturübersicht

vermittelnde Gen flankieren. Transposon Tn5 vermittelt Resistenzen gegenüber Kanamycin, Bleomycin und Streptomycin. Es ist in der Lage, sich in das Genom phylogenetisch völlig unterschiedlicher Bakterien zu integrieren [Ochman *et al.*, 2000].

2.6.4 Integrons und Genkassetten

Integrons stellen genetische Elemente dar, welche in der Lage sind, zusätzliche DNA in Form von Genkassetten aufzunehmen und zu integrieren. Ihre Struktur besteht aus zwei konservierten Regionen (*sul1* Region und *intI1* Region), welche eine variable Region (=Genkassette) flankieren sowie aus der Bindungsstelle *attI1* (attachment site), an der Genkassetten binden können. Die *intI1* Region beherbergt die Integrase zur Integration der Genkassetten und befindet sich auf dem 5`-konservierten Segment; die *sul1* Region vermittelt Resistenzen gegenüber Sulfonamiden und liegt auf dem 3`-konservierten Segment. Integrons besitzen einen Promoter (P_C), welcher die Transkription der Gene einleitet [Hall and Collis, 1995; Bush *et al.*, 1995].

Da Integrons, anders als Genkassetten, nicht eigenständig beweglich sind, sind sie häufig auf mobilen genetischen Elementen wie Transposons oder Plasmiden lokalisiert. Das Basis-Integron In0 besitzt die für Integrons charakteristischen Eigenschaften: das Integrase-Gen *intI*, die Bindungsstelle für Genkassetten *attI* sowie ein Promoter. Diese Strukturen befinden sich auf dem 5`-konservierten Segment. Das 3`-konservierte Segment hingegen beinhaltet das *sul1*-Gen sowie verkürzte Resistenzgene gegenüber quartären Ammoniumverbindungen *qacE* und *qacEΔ1*. Des Weiteren gehören zum 3`-konservierten Segment zwei offene Leserahmen *orf5* und *orf6*, welche für andere Proteine kodieren. Jede Aufnahme einer Genkassette in das Basis-Integron In0 schafft ein neues Integron. Dieses erhält eine neue Nummer wie zum Beispiel In1, welches Resistenzen gegenüber Aminoglykosiden und Beta-Laktamen über ihre Gene *aadA1b* bzw. *oxa2* vermittelt. Allgemein werden Integrons den Klasse 1 bzw. Klasse 2 Integrons zugeordnet. Klasse 1 Integrons kommen am häufigsten im Bakterienchromosom klinisch relevanter Bakterien auf Plasmiden oder Transposons vor. Klasse 2 Integrons werden normalerweise auf Transposon Tn7 gefunden. Diese besitzen 3 integrierte Genkassetten und es fehlt ihnen das 3`-konservierte Segment [Bennett, 1999].

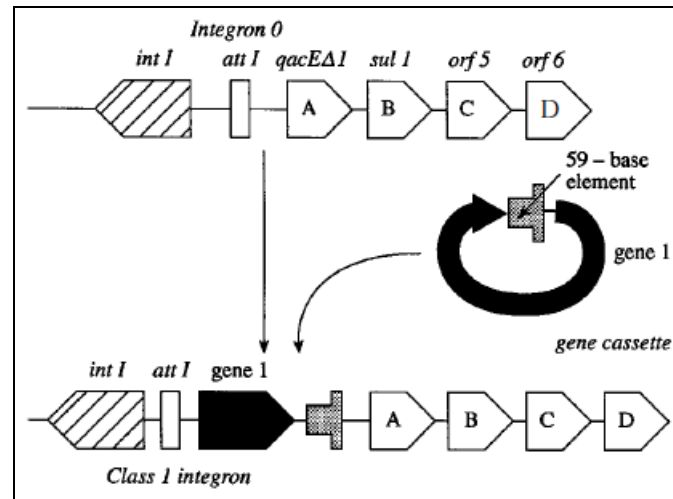


Abb. 3 Klasse 1 Integron
(übernommen aus Bennett; 1999)

Genkassetten sind kleine mobile genetische Elemente, die meist ein Gen (i.d.R. ein Antibiotikaresistenzgen) und eine spezifische Rekombinationsstelle (59-Basenelement) besitzen. Ihre Größe variiert von 62 bp bis zu 1549 bp, abhängig von der Größe ihres Gens [Recchia und Hall, 1995]. Genkassetten können als freie, zirkuläre, nicht-replizierende DNA vorliegen, meistens jedoch sind sie als lineare Sequenz in größeren DNA-Molekülen, wie in Plasmiden oder in Bakterienchromosomen eingebettet. Sie unterscheiden sich von Plasmiden durch das Fehlen von Replikationssystemen und von Transposons durch das Fehlen von Transpositionssystemen [Kehrenberg, 2000]. Genkassetten besitzen meist keinen Promoter. Die Transkription ihres Gens wird von einem Promoter im jeweiligen Integron aus eingeleitet [Collis *et al.*, 1995]. Der Promoter P_{ant} ist im 5'-konservierten Segment des Integrons lokalisiert und für die Einleitung der Transkription des Antibiotikaresistenzgens von Genkassetten verantwortlich. In Klasse 1 Integrons sind vier Varianten des Promoters P_{ant} mit unterschiedlicher Stärke bekannt. In wenigen Integrons wurde ein zweiter Promoter P_2 entdeckt. P_2 ist ein starker Promoter und in der Lage, den Grad der exprimierten Resistenz zu erhöhen [Hall und Collis, 1995].

2.7 Mikrobiologische Detektion sowie molekularbiologische Identifizierung von ESBL

2.7.1 Phänotypische Detektion

Um einen Therapieerfolg abschätzen zu können, benötigt man Informationen über die Empfindlichkeit bakterieller Erreger gegenüber den zur Verfügung stehenden antimikrobiellen Wirkstoffen. Die *in-vitro* Empfindlichkeitsprüfung der Erreger liefert diese Informationen. Hierfür stehen sowohl quantitative als auch qualitative Verfahren zur Verfügung.

Als Methode der Wahl gilt derzeit die Ermittlung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) mittels Bouillon-Mikrodilutionsverfahren. International anerkannte Institution für die Bereitstellung von standardisierten Verfahren und veterinärmedizinischen, klinischen Grenzwerten ist das Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) [Schwarz *et al.*, 2005; Luhofer *et al.*, 2004].

Zur Detektion von ESBL empfiehlt das CLSI den Einsatz von Cefpodoxim, Ceftazidim, Aztreonam, Cefotaxim oder Ceftriaxon zum Screening bzw. den Einsatz von Ceftazidim und Cefotaxim, jeweils isoliert und in Kombination mit Clavulansäure, zur phänotypischen Bestätigung [CLSI 2002].

Die Bandbreite der möglichen Methoden zur Detektion von ESBL ist groß. Sie reicht vom Double-disk diffusion Test, dem E-Test, dem Three-dimensional Test bis hin zu Dilutionstests. Das CLSI empfiehlt zur Detektion von ESBL sowohl die Bouillon-Mikrodilution als auch den Agardiffusionstest, wie es auch von zahlreichen Autoren empfohlen wird [Paterson und Bonomo, 2005; Bradfort, 2001; Stürenburg und Mack, 2003; Bush, 2001].

Die zuverlässige Detektion von ESBL hat maßgeblichen Einfluss auf die Therapie und den Therapieerfolg. Werden Patienten mit schweren durch ESBL-Produzenten verursachten Infektionen, bei denen der Erreger resistent gegenüber Cephalosporinen ist, mit Cephalosporinen behandelt, kommt es in 49 % bis 100 % der Fälle zu einem Therapieversagen [Meyer *et al.*, 1993; Schiappa *et al.*, 1996].

Zu ähnlichen Versagensraten kann es kommen, wenn oben beschriebene Patienten mit Cephalosporinen behandelt werden, gegenüber denen der Erreger MHK-Werte im intermediären Bereich aufweist oder sogar teilweise in der Testung sensibel reagiert. Dies macht deutlich, wie wichtig eine genaue Detektion von ESBL-produzierenden Erregern ist.

Der folgende Literaturteil beschränkt sich auf die Beschreibung des Bouillon-Mikrodilutionsverfahrens sowie des Agardiffusionstests, da diese beiden Methoden in dem CLSI Standard zur Detektion von ESBL angegeben sind und in dieser Arbeit Verwendung fanden.

2.7.1.1 Bouillon-Mikrodilutionsverfahren

Als MHK bezeichnet man die geringste Konzentration eines Antibiotikums, die gerade noch ausreicht, um ein mit bloßem Auge als Trübung der Nährbouillon erkennbares Wachstum zu verhindern (Deutsches Institut für Normung e.V., 1995). Zur Ermittlung der MHK kann das Bouillon-Mikrodilutionsverfahren eingesetzt werden. Das Bouillon-Mikrodilutionsverfahren zählt zu den quantitativen Verfahren, das Aufschluss über die Konzentration eines antimikrobiellen Wirkstoffes gibt, die notwendig ist, um den Infektionserreger in seiner Vermehrung zu hemmen oder abzutöten. Der MHK-Wert repräsentiert jedoch keinen absoluten Wert. Der sogenannte „wahre“ MHK-Wert befindet sich zwischen der niedrigsten Testkonzentration, die das Wachstum des Infektionserregers hemmt und der nächst niedrigeren Konzentration [CLSI 2002].

Bei dem Bouillon-Mikrodilutionsverfahren handelt es sich um einen Reihenverdünnungstest, bei dem flüssige Nährmedien zur Empfindlichkeitsprüfung eingesetzt werden. Zur Empfindlichkeitsprüfung erfolgt die Beimpfung mit einer standardisierten Suspension des Testorganismus. Das Inokulum hat einen großen Einfluss auf die Testergebnisse und muss entsprechend der jeweiligen Durchführungsvorschriften auf eine definierte Konzentration eingestellt und konsequent überprüft werden [CLSI 2002]. Der Inokulum-Effekt spielt in der mikrobiologischen Diagnostik eine wichtige Rolle. Erreger können bei einem Standard-Inokulum in einer Konzentration von beispielsweise 10^5 als „empfindlich“ erscheinen, wohingegen höhere Konzentrationen von 10^7 oder 10^8 zu deutlich höheren MHK-Werten führen können.

Die Produktion von ESBL gilt laut CLSI Richtlinien als bestätigt, wenn es zu einer Abnahme der MHK um drei oder mehr Titerstufen für die in Kombination mit Clavulansäure getesteten Cephalosporine gegenüber der alleinigen Testung kommt.

Das Bouillon-Mikrodilutionsverfahren kann gemäß CLSI auch als orientierendes Prüfverfahren eingesetzt werden. Wachstum bei einem der in den Richtlinien angegebenen Wirkstoffe kann auf eine ESBL-Produktion hindeuten [CLSI 2002].

Bereits in einer frühen Phase der ESBL-Detektion können Rückschlüsse auf das Vorhandensein von CTX-M ESBL gezogen werden. Schröder et al (2007) belegten, dass

2 Literaturübersicht

CTX-M-produzierende *E. coli*-Stämme ein für sie „typisches MHK-Muster“ bei vier getesteten Cephalosporinen aufweisen (Tab. 2).

Tab. 2 Wiederkehrendes MHK-Muster bei vier getesteten Cephalosporinen:
Zum phänotypischen Screening von CTX-M ESBL (übernommen und modifiziert von Schröder *et al.*, 2007)

BVL-Nr.	Beta-Laktamase	AMP*	AMC	CEP	CFZ	CPZ	CTX	CQN	XNL
433	OXA-1 like	> 64	16	32	4	4	0,25	8	1
434	OXA-1 like	> 64	16	16	4	1	0,25	2	1
461	OXA-1 like	> 64	> 32	16	8	2	0,25	4	2
463	CTX-M-2 like	> 64	16	> 32	> 32	> 16	>32	> 16	> 16
703	OXA phenotype	> 64	16	32	8	4	0,5	8	2
704	OXA-1 like	> 64	16	32	16	16	0,25	4	1
707	OXA-1 like	> 64	16	32	8	4	0,25	1	1
737	AmpC-type	> 64	> 32	> 32	> 32	16	2	4	4
1143	CTX-M-1 like	> 64	> 32	> 32	> 32	> 16	>32	> 16	> 16
1170	CTX-M-1 like	> 64	8	> 32	> 32	> 16	>32	> 16	> 16
1184	CTX-M 1 like	> 64	8	> 32	> 32	> 16	>32	> 16	> 16
1385	OXA-1 like	> 64	16	> 32	16	8	0,5	4	1
1747	OXA-1 like	> 64	16	32	4	0,5	0,25	1	0,5
2224	OXA-1 like	> 64	> 32	32	8	1	0,5	8	2
2850	OXA-1 like	> 64	> 32	> 32	> 32	> 16	1	> 16	8
3006	CTX-M-1 like	> 64	8	> 32	> 32	> 16	>32	> 16	> 16
3090	OXA-1 like	> 64	16	> 32	> 32	16	0,5	2	0,5
3608	CTX-M-1 like	> 64	8	> 32	> 32	> 16	>32	> 16	> 16
4275	OXA-1 like	> 64	> 32	> 32	> 32	4	1	> 16	2
4276	OXA-1 like	> 64	> 32	> 32	> 32	8	1	> 16	2
4425	OXA-1 like	> 64	16	16	4	1	0,125	1	0,5
4966	SHV 12	> 64	8	> 32	> 32	16	4	1	8
5044	OXA-1 like	> 64	> 32	> 32	> 32	8	1	16	2
5683	OXA-1 like	> 64	16	16	8	2	0,25	2	1
5856	CTX-M 2 like	> 64	16	> 32	> 32	> 16	>32	> 16	> 16
6207	AmpC-type	> 64	8	> 32	> 32	16	4	2	4
6237	CTX-M-1 like	> 64	8	> 32	> 32	> 16	>32	> 16	> 16
6420	CTX-M-1 like	> 64	16	> 32	> 32	> 16	>32	> 16	> 16
6450	OXA-1 like	> 64	> 32	16	8	4	0,5	8	2

*AMP: Ampicillin; AMC: Amoxicillin/Clavulansäure; CEP: Cephalothin; CFZ: Cefazolin; CPZ: Cefoperazon; CTX: Cefotaxim; CQN: Cefquinom; XNL: Ceftiofur

Bei 29 *E. coli*-Stämmen von Kälbern mit Diarrhoe wurden zunächst die MHK-Werte mittels Bouillon-Mikrodilution nach Vorgaben des CLSI ermittelt. Anschließend wurden die Stämme genotypisch charakterisiert. Auffällig hierbei war, dass alle identifizierten CTX-M ESBL ein wiederkehrendes MHK-Muster aufwiesen. Die MHK-Werte dieser Stämme lagen bei > 16 mg/l für Cefquinom, Ceftiofur und Cefoperazon und > 32 mg/l

für Cefotaxim. Bei den restlichen ermittelten ESBL wie OXA Gruppe 1, Amp C sowie SHV-12 war ein solches Muster nicht erkennbar.

2.7.1.2 Agardiffusionstest

Der Agardiffusionstest wird vom CLSI als ein phänotypischer Bestätigungstest für ESBL-produzierende Bakterien angegeben. Dafür kommen die Wirkstoffe Cefotaxim und Ceftazidim sowie die Wirkstoffkombinationen Cefotaxim/Clavulansäure und Ceftazidim/Clavulansäure zum Einsatz. Die vom CLSI festgelegten Konzentrationen liegen bei 30 µg beim Einzelwirkstoff und 30 µg/10 µg in der Wirkstoffkombination. Antibiotikahaltige Plättchen können von vielen unterschiedlichen Anbietern bezogen werden (z. B. Becton Dickinson, Oxoid, MAST). Das CLSI gibt in seinen Standards Müller-Hinton-Agar als Nährmedium mit einem gleichmäßigen Ausstrich des Inokulums vor. Die phänotypische Detektion mittels Agardiffusionstest wurde bereits in zahlreichen Studien angewandt und wird von vielen Forschern als Bestätigungsmethode empfohlen. Der Agardiffusionstest stellt ein klassisches Verfahren der phänotypischen ESBL-Bestätigung dar [Paterson und Bonomo, 2005; Bradford, 2001; Rayamajhi *et al.*, 2008; Perez *et al.*, 2007].

2.7.2 Genotypische Charakterisierung des *bla*-Gens

Phänotypische Bestätigungstests sind zwar in der Lage die Anwesenheit ESBL-produzierender Erreger zu detektieren, sie ermöglichen jedoch keine sichere Aussage darüber, welches spezifische *bla*-Gen vorliegt. Die genotypische Charakterisierung hat als Ergänzung zur konventionellen Resistenz-Bestimmung den Vorteil, dass aufgrund der Kenntnis des Vorhandenseins des entsprechenden *bla*-Gens eine anschließende antimikrobielle Medikation mit geeigneten Antibiotika exakter planbar ist. In der Humanmedizin kann durch die reduzierte Wartezeit, verglichen mit der benötigten Zeit für die Durchführung des Agardiffusionstest zur Bestätigung, die Kontaktzeit zwischen kranken und gesunden Individuen und damit das Ansteckungsrisiko verringert werden. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass die genotypische Identifizierung subjektive Interpretationen ausschließt.

Zur genotypischen Charakterisierung ESBL-produzierender *E. coli*-Stämme wurden die im folgenden genannten Methoden angewendet.

2.7.2.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase chain reaction (PCR) stellt das einfachste und schnellste Verfahren zur Identifikation entsprechender *bla*-Gene in ESBL-produzierenden Erregern dar.

Die Identifizierung erfolgt gewöhnlich in mehreren Schritten:

1. PCR zum Nachweis des *bla*-Gens

In diesem ersten Schritt zur genotypischen Identifizierung wird der für die Resistenz verantwortliche Mechanismus, also das entsprechende *bla*-Gen detektiert. Wie unter 2.3 aufgeführt, können unterschiedliche ESBL-Gruppen für die Beta-Laktam-Resistenz verantwortlich sein (TEM, SHV, CTX-M, OXA etc.).

2. PCR zum Nachweis von Gruppen

Nach Detektion des entsprechenden *bla*-Gens kann im zweiten Schritt das *bla*-Gen den unterschiedlichen Gruppen zugeordnet werden (z. B. Gruppe der *bla*_{CTX-M}). Üblicherweise werden dabei ESBL-spezifische Oligonukleotid-Primer eingesetzt, die sich an Regionen anlagern, die keine bekannten Punktmutationen besitzen [Bradford, 2001].

3. Sequenzanalyse zum Nachweis von Punktmutationen

Um genauere Aussagen zu den einzelnen ESBL innerhalb dieser Gruppen treffen zu können, benötigt man ein Verfahren, um die Punktmutationen im entsprechenden *bla*-Gen zu identifizieren. Dies ist mit der DNA-Sequenzanalyse möglich.

2.7.2.2 Sequenzanalyse

DNA-Sequenzanalyse ist die Bestimmung der DNA-Sequenz, d. h. der Nukleotid-Abfolge in einem DNA-Molekül oder kleineren Abschnitten daraus, wie z. B. einzelnen Genen. Die Didesoxymethode nach Sanger [Sanger *et al.*, 1977] wird auch Kettenabbruch-Synthese genannt und stellt eine enzymatische Methode dar. Hierbei wird der zu sequenzierende DNA-Abschnitt *in-vitro* durch eine PCR-Reaktion, das Cycle Sequencing, vervielfältigt. Neben dem DNA-Template, der DNA-Polymerase, dem entsprechenden Primer und den vier Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs), enthält der PCR-Ansatz als zusätzliche Komponente 2',3'-Didesoxyribonukleosid-Triphosphate (ddNTPs). Diese ddNTPs besitzen keine 3'-Hydroxygruppe: Beim Einbau in den neu synthetisierten Strang, ist eine Verlängerung der DNA durch die DNA-Polymerase nicht mehr möglich, da die OH-Gruppe am 3'-C-Atom für die Verknüpfung mit der Phosphatgruppe des nächsten Nukleotids fehlt. Anschließend werden die DNA-

Fragmente in einem automatischen Sequenzer aufgetrennt. Die ddNTPs oder die Primer sind mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und können mit Hilfe eines Lasers detektiert werden. Aus der Abfolge der auftretenden basenspezifischen Farbsignale ergibt sich die Basensequenz der untersuchten DNA-Probe.

2.8 Bedeutung, Wandel und geografische Verteilung von ESBL

Die Einführung der 3. Generation Cephalosporine in den frühen 1980ern wurde als großer Durchbruch im Kampf gegen die Beta-Laktamase-vermittelte Resistenz in Bakterien gefeiert. Diese Cephalosporine sollten die Antwort auf die stetig ansteigende Prävalenz Beta-Laktamase-produzierender Organismen sein. Vorteile der 3. Generation Cephalosporine waren einerseits ihre Wirksamkeit gegenüber Beta-Laktamase-produzierenden Bakterien, andererseits ihre geringere Nephrotoxizität verglichen mit Aminoglykosiden und Polymyxinen. Erstmals wurde 1983 über Plasmid-kodierte Beta-Laktamasen berichtet, die in der Lage waren, Breitspektrum-Cephalosporine zu hydrolisieren [Knothe *et al.*, 1983].

Diese für Beta-Laktamasen mit erweitertem Spektrum kodierenden Gene waren gekennzeichnet durch eine Punktmutation in der Nukleotidabfolge verglichen mit der von SHV-1 (2.3.2). Schnell wurden auch andere Beta-Laktamasen entdeckt, welche zwar eine enge Verwandtschaft mit TEM-1 und TEM-2 zeigten, jedoch in der Lage waren Resistenzen gegenüber Breitspektrum-Cephalosporine zu übertragen [Sirot *et al.*, 1987].

1989 erschien der erste fundierte Artikel über ESBL. Philippon, Labia und Jacoby (1989) berichteten von Beta-Laktamase-vermittelter Resistenz gegenüber Beta-Laktamantibiotika als einem Resultat grundlegender Änderungen des Substratspektrums der Enzyme im Sinne einer Erweiterung dieses Spektrums bei den so genannten ESBL [Philippon *et al.*, 1989].

Durch den vermehrten Einsatz von Beta-Laktamantibiotika der 3. und 4. Generation in der Therapie bei Menschen und Tieren wurde der Selektionsdruck auf Bakterien erhöht. Die Folge war eine steigende Resistenzrate in den entsprechenden Bakterienpopulationen. Die Verbreitung von Plasmiden, Transposons und anderen genetischen Elementen, welche ESBL-kodierende Gene tragen, ist der Hauptgrund für den Anstieg von ESBL weltweit. Die Ausbreitung wird durch nosokomiale Kreuzkontaminationen, durch Lebensmittel, weltweiten Handel und Reisen noch erhöht. Die in Europa am

2 Literaturübersicht

häufigsten vorkommenden ESBL gehören zu den Gruppen CTX-M, SHV und TEM [Coque *et al.*, 2008].

Eine große Bedeutung haben ESBL-produzierende Infektionserreger bereits in der Humanmedizin erlangt. ESBL-produzierende *E. coli* sind heute weltweit entscheidend an Ausbrüchen nosokomialer Infektionen in Gesundheitseinrichtungen beteiligt. Für Patienten mit einer durch ESBL-produzierende Bakterien ausgelösten Infektion besteht ein erhöhtes Risiko des Therapieversagens bei Behandlung mit Breitband-Beta-Laktamantibiotika. Klinische Daten zeigen, dass ESBL-produzierende Infektionserreger signifikant zu Komplikationen bei der Heilung und zu höheren Mortalitätsraten führen [Stürenburg und Mack, 2003].

Zahlreiche Fallstudien haben sich bereits mit den Risikofaktoren einer Kolonisation und Infektion mit ESBL-Produzenten in Krankenhäusern und Gemeinschaftseinrichtungen beschäftigt [Asensio *et al.*, 2000; Pena *et al.*, 1997; Lautenbach *et al.*, 2001].

Bei allen Studien konnte übereinstimmend festgestellt werden, dass vor allem schwer erkrankte Patienten mit einem längeren Krankenhausaufenthalt und intensivmedizinischer Betreuung einem hohem Risiko ausgesetzt waren, an einer durch ESBL-Produzenten verursachten Infektion zu erkranken.

Einen weiteren Risikofaktor stellt der verstärkte Einsatz von Antibiotika dar. Einige Studien konnten eine Verbindung zwischen dem Einsatz von Cephalosporinen der 3. Generation und dem Erwerb von ESBL-produzierenden Erregern nachweisen [Du *et al.*, 2002; Eveillard *et al.*, 2002; Ho *et al.*, 2002].

Doch nicht nur nosokomiale Ansteckungswege, sondern auch die Möglichkeit der Infektion mit ESBL-Produzenten im Alltag konnte mittels diverser Studien aufgezeigt werden [Brigante *et al.*, 2005; Colodner *et al.*, 2004; Mirelis *et al.*, 2003; Munday *et al.*, 2004]. Pitout *et al.* (2004) belegten in einer in den Jahren 2000 bis 2002 durchgeführten Überwachungsstudie, dass 5,5 Fälle von 100.000 Personen an einer durch ESBL-produzierenden *E. coli* verursachten Infektion erkrankten, davon 93 % an einer Urogenitalinfektion. Das Erkrankungsrisiko für Frauen war höher als für Männer (9,2 gegenüber 1,7 Fällen), ebenso stieg das Risiko zu erkranken mit zunehmenden Alter (≥ 65 Jahre = 22 Fälle, 20-64 Jahre = 4,8 Fälle) an. Von insgesamt 157 Proben aus durch ESBL-produzierende *E. coli*-Stämme erkrankten Personen, konnten 70 % der Stämme als *bla*_{CTX-M}-Gen-tragend identifiziert werden. Davon entfielen 15 % auf die Gruppe 1 und 55 % auf die Gruppe 9 der *bla*_{CTX-M} [Pitout *et al.*, 2004].

Dieser Wandel der Häufigkeit des Vorkommens von CTX-M ESBL hat sich in den letzten Jahren verstärkt vollzogen. In den 1990ern wurden vor allem TEM und SHV Beta-Laktamasen in *K. pneumoniae* für nosokomiale Ausbrüche verantwortlich gemacht. Heutzutage werden ESBL häufig in *E. coli* gefunden, wobei ein Großteil der CTX-M Gruppe zuzuordnen ist. Seit ca. zehn Jahren wird ein sehr starker Anstieg von *bla*_{CTX-M}-produzierenden Bakterien dokumentiert und die Gruppe der CTX-M sind heute die am weitesten verbreitete ESBL weltweit [Romero *et al.*, 2005].

CTX-M ESBL werden nicht nur in humanmedizinisch relevanten Erregern detektiert, sondern ebenso in Bakterien von Haustieren, Lebensmittel liefernden Tieren, Lebensmitteln und in Abwässern. Die Studien, die derzeit verfügbar sind, belegen, dass *bla*_{CTX-M}-Gen-tragende *E. coli* als Hauptproduzent identifiziert werden konnten: zum einen als nosokomialer Infektionserreger, zum anderen jedoch häufig auch ausserhalb von Krankenhäusern und Gemeinschaftseinrichtungen vorkommend [Romero *et al.*, 2005; Pitout *et al.*, 2005].

Die englische Health Protection Agency berichtete von einem jährlichen Anstieg Cefotaxim- und Ceftazidim-resistenter *E. coli* von 1,8 % im Jahr 2001 bis auf 5 % im ersten Viertel des Jahres 2004 [<http://www.hpa.org.uk/27.05.2009>] und Livermore und Hawkey (2005) veröffentlichten Daten aus denen hervorgeht, dass es in den Jahren 2001 und 2003 in England, insbesondere in der Region Shropshire, zu signifikanten Ausbrüchen von CTX-M-produzierenden *K. pneumoniae* respektive *E. coli* kam.

Epidemiologische Studien zeigten, dass CTX-M Enzyme in einer großen Bandbreite weltweit vorkommen und über Klone und *bla*_{CTX-M}-tragende genetische Elemente verbreitet werden [Cantón und Coque, 2006].

Abb. 4 zeigt die geografische Verbreitung von CTX-M ESBL aus humanmedizinisch relevanten Bakterien. Endemische Zustände beherrschen vor allem Europa, Asien und Südamerika, wohingegen die USA, jedoch nicht Kanada, nur sporadische Ausbrüche zu verzeichnen hat. Viele CTX-M Enzyme sind innerhalb eines Landes weit verbreitet wie beispielsweise CTX-M-9 und CTX-M-14 vorwiegend in Spanien, CTX-M-1 in Italien während CTX-M-2 in den meisten südamerikanischen Ländern, Japan und Israel angetroffen wird. Andere CTX-M Enzyme wie beispielsweise CTX-M-15 wurden weltweit detektiert [Paterson und Bonomo, 2005; Hernandez *et al.*, 2005; Brigante *et al.*, 2005; Ben-Ami *et al.*, 2006; Lavollay *et al.*, 2006; Boyd *et al.*, 2004].

2 Literaturübersicht

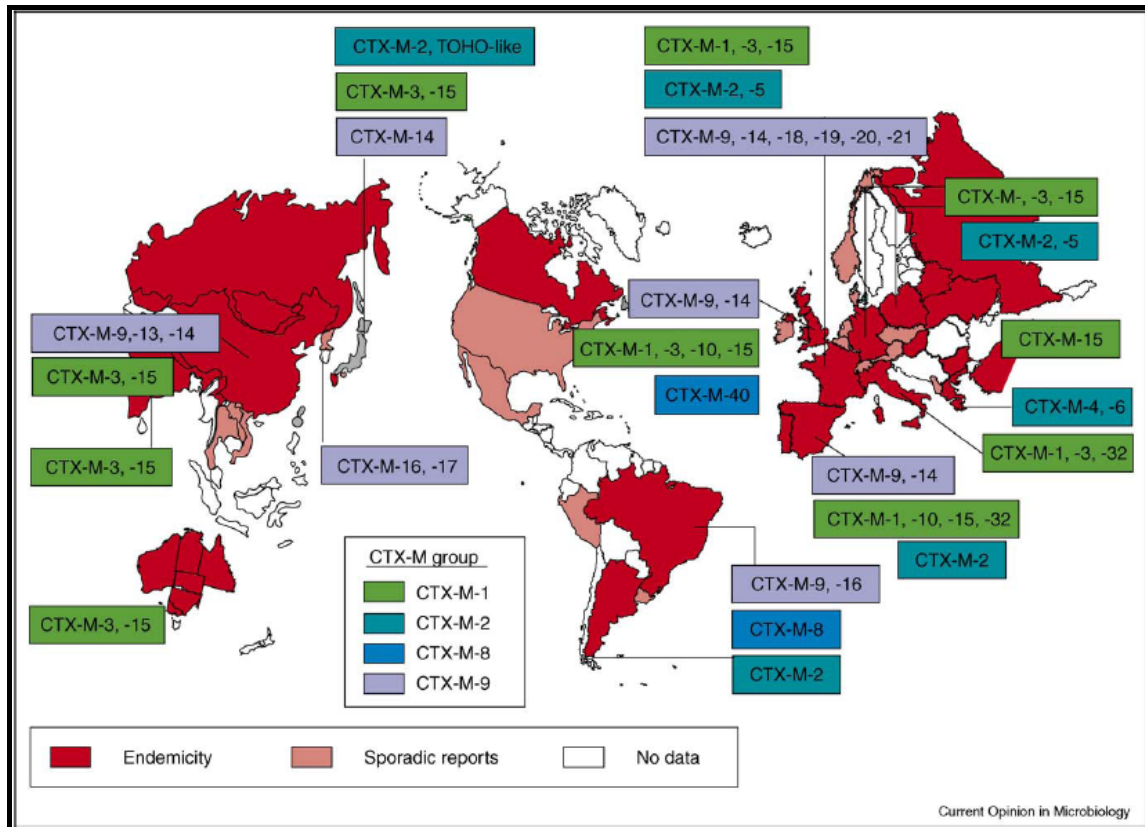


Abb. 4 Geografische Verbreitung von CTX-M ESBL weltweit: (übernommen aus Cantón und Coque, 2006; „*The CTX-M β -lactamase pandemic*“; Current Opinion in Microbiology 2006, 9:466–475), Analog zum humanmedizinischen Bereich können ESBL und insbesondere CTX-M ESBL aus veterinärmedizinisch relevanten Bakterien detektiert werden.

Verglichen mit humanmedizinischen Daten ist die Datenlage aus der Veterinärmedizin jedoch deutlich schmaler. Dennoch beschäftigen sich zunehmend mehr Wissenschaftler mit dem Vorkommen von ESBL von Tieren.

Beta-Laktamantibiotika gehören zu den bedeutendsten Antibiotika der Veterinärmedizin. In Dänemark stellten sie 2005 die am häufigsten verschriebene Wirkstoffgruppe bei Nutztieren dar [DANMAP 2005]. Durch den Einsatz von Beta-Laktamantibiotika bei Tieren ist es nicht verwunderlich, dass zunehmend von Tieren isolierte Bakterien, Resistenzgene gegenüber Beta-Laktamantibiotika tragen [Li *et al.*, 2007]. Monitoringstudien konnten diesen Trend belegen [CIPARS 2006; NARMS 2004]. In Kanada beispielsweise wurden *E. coli*-Stämme aus Geflügel von Schlachthöfen isoliert und auf ihre Antibiotikaempfindlichkeit (MHK $\geq 8 \mu\text{g/ml}$) getestet. Es konnte ein Anstieg von Resistenzen gegenüber Ceftiofur von 16 % 2002/2003 bis 25 % im Jahr 2004 beobachtet werden [CIPARS 2006].

Mit großer Besorgnis wird die Ausbreitung ESBL-produzierender Bakterien bei Tieren beobachtet und insbesondere der von CTX-M ESBL.

CTX-M ESBL werden aus veterinärmedizinisch relevanten Bakterien detektiert und stellen potentiell eine Gefahr für die öffentliche Gesundheit dar [Li *et al.*, 2007].

Der früheste Bericht über CTX-M ESBL von Tieren stammt aus einer japanischen Studie im Jahr 1988 [Matsumoto *et al.*, 1988]. In der Folgezeit wurde weltweit über das Vorkommen von CTX-M ESBL von Tieren berichtet [Li *et al.*, 2007].

So konnten Meunier *et al.* (2006) ESBL-produzierende *E. coli* aus Lebensmittel liefernden Tieren (Geflügel, Schwein und Rind) detektieren und genotypisch charakterisieren. Alle detektierten ESBL konnten zu der Gruppe der CTX-M ESBL zugeordnet werden. Dabei handelte es sich um *bla*_{CTX-M-1} und *bla*_{CTX-M-15}-Gene der Gruppe 1 [Meunier *et al.*, 2006].

Blanc *et al.* (2006) untersuchten klinisch relevante Proben sowie Fäkalproben von Schweinen, Broilern und Kaninchen aus Mastbetrieben in Spanien und detektierten bei allen drei Tierarten CTX-M ESBL. So besaßen 45 % der isolierten Proben vom Kaninchen Gene der Gruppe *bla*_{CTX-M-14}. Bei den Schweinen wiesen 69 % der isolierten Proben *bla*_{CTX-M-1} und beim Geflügel 50 % *bla*_{CTX-M-14}-Gene auf.

Doch nicht nur bei erkrankten Tieren konnten ESBL nachgewiesen werden, sondern ebenso bei gesunden Tieren bzw. Tierkörpern [Costa *et al.*, 2007; Meunier *et al.*, 2006; Brinas *et al.*, 2005]. Die Tatsache, dass ESBL in Tierkörpern nachgewiesen wurden, ist insofern problematisch, da diese ein Reservoir für CTX-M ESBL darstellen können und somit ein Übertrag auf Menschen möglich ist. Shiraki *et al.* (2004) detektierten beispielsweise CTX-M-2-produzierende *E. coli* aus Fäkalproben sowie aus Schlachtkörpern von Rindern in Japan. Sie vermuteten, dass diese Rinder ein Reservoir darstellen und die Übertrag auf den Menschen möglich ist [Shiraki *et al.*, 2004]. Diese These wurde von anderen Studien bestätigt [Aarestrup *et al.*, 2006; Girlich *et al.*, 2007].

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Studienumfang und Stichprobenplan

Das Referat 503 des Bundesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) erhebt seit dem Jahr 2001 Daten zur Antibiotikaempfindlichkeit tierpathogener Infektionserreger von Tieren, die der Lebensmittelgewinnung dienen. Seit dem Studienjahr 2006/2007 werden diese Daten auch von Infektionserregern anderer Tierarten, der so genannten Hobbytiere (Hund, Katze, Pferd), ermittelt. Die Proben werden von kooperierenden Laboren (Veterinäruntersuchungsämter, Tiergesundheitsdienste der Bundesländer, Universitätslabore, private veterinärmedizinische Labore) eingesandt und repräsentieren einen Querschnitt aus dem gesamten Bundesgebiet. Die externen Kooperationspartner sind in Tab. 6 aufgeführt. Im Rahmen der Studienplanung für die Studie 2005/2006 wurden die zu untersuchenden Bakterienspezies, die Tierarten sowie die Indikationen wie folgt festgelegt. Es wurden nur Proben in die Studie eingeschlossen, die von akut erkrankten Tieren stammten, welche vier Wochen vor Probennahme keine antibiotische Behandlung erfahren hatten. Pro Tierherde waren für jede Tierart und Indikation maximal zwei Bakterienstämme einer Spezies zugelassen, welche nicht vom gleichen Tier stammten und zeitlich unabhängig voneinander isoliert wurden. Dies wurde durch Abgleich der Betriebskennnummern sichergestellt. Die Sammlung von Bakterienisolaten für die Studie begann am 02. Mai 2005 und dauerte 52 Kalenderwochen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es eine Aussage bezüglich der Prävalenz ESBL-produzierender *E. coli* bei Lebensmittel liefernden Tieren treffen zu können. Daher wurden in dieser Arbeit nur Stämme der Bakterienspezies *E. coli* ausgewählt.

Insgesamt entsprachen 2.352 *E. coli*-Stämme den oben genannten Anforderungen und konnten somit in der Studie berücksichtigt werden.

3.1.2 Tierarten und Indikationen

E. coli aus folgenden Indikationen und Tierarten wurden einbezogen:

Tab. 3 *E. coli* vom Kalb, Jungrind, Mastrind, Milchrind

Infektionskrankheiten	Organe	Tierart	Anzahl
Respiratorische Erkrankungen	Bronchien, Lunge	Kalb, Jungrind, Mastrind, Milchrind	5
Mastitis	Milchdrüse	Milchrind	535
Enteritis	Darm	Kalb	288
Infektionen Geschlechtsapparat	Uterus	Rind	9
Septikämie		Kalb, Jungrind, Mastrind, Milchrind	2
Andere Erkrankungen		Kalb, Jungrind, Mastrind, Milchrind	14

Gesamt: n=853

Tab. 4 *E. coli* vom Ferkel, Läufer (Jungschwein), Mastschwein, Zuchtschwein

Infektionskrankheiten	Organe	Tierart	Anzahl
Respiratorische Erkrankungen	Bronchien, Lunge	Ferkel, Läufer, Mastschwein	19
Enteritis	Darm	Ferkel, Läufer, Mastschwein	552
Infektionen Geschlechtsapparat	Uterus	Schwein	37
Septikämie		Schwein	34
Andere Erkrankungen		Ferkel, Läufer, Mastschwein	10

Gesamt: n=652

3 Material und Methoden

Tab. 5 *E. coli* von Pute, Masthahn, Legehennen, Ente, Gans
(Tiere im Kükenalter wurden ebenfalls einbezogen)

Infektionskrankheiten	Organe	Tierart	Anzahl
Respiratorische Erkrankungen	Bronchien, Lunge	Masthahn, Pute, Legehennen, Ente, Gans	64
Infektionen Harnwege und Geschlechtsorgane		Masthahn, Pute, Legehennen, Ente, Gans	19
Nabel- und Dottersackentzündung		Pute, Huhn, Ente, Gans	97
Septikämie		Pute, Huhn, Ente, Gans	399
Gastritis/ Enteritis	Darm	Masthahn, Pute, Legehennen, Ente, Gans	2
Arthritis/(Poly-)Serositis		Masthahn, Pute, Legehennen, Ente, Gans	32
Andere Erkrankungen		Masthahn, Pute, Huhn, Ente, Gans	234

Gesamt: n=847

3.1.3 Teilnehmende Kooperationspartner

Tabelle 6 zeigt die Kooperationspartner aus insgesamt 12 Bundesländern auf, die an der Studie teilgenommen haben. Die Teilnahme erfolgte auf freiwilliger Basis und war für die Kooperationspartner nicht mit Kosten verbunden.

Tab. 6 An der BVL-Resistenzmonitoringstudie teilnehmende Kooperationspartner

Bundesland	Kooperationspartner
Baden-Württemberg	<ul style="list-style-type: none"> • Chemische- u. Veterinäruntersuchungsämter, Heidelberg und Stuttgart • Geflügelgesundheitsdienste Fellbach und Freiburg
Bayern	<ul style="list-style-type: none"> • Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Erlangen • Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Südbayern (LGL), Oberschleißheim • Tiergesundheitsdienst Bayern e.V., Poing • Institut f. Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin, Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität, München

Bundesland	Kooperationspartner
	<ul style="list-style-type: none"> • Staatl. Tierärztliches Untersuchungsamt, Diagnostikzentren Milchlabor und Geflügel, Aulendorf
Brandenburg	<ul style="list-style-type: none"> • Landeslabore Brandenburg, Frankfurt/Oder-Markendorf und Potsdam
Hessen	<ul style="list-style-type: none"> • Landesbetrieb Hessisches Landeslabor (LHL), Giessen • Staatliches Untersuchungsamt Hessen, Standort Kassel
Mecklenburg-Vorpommern	<ul style="list-style-type: none"> • Landesveterinär- und Lebensmitteluntersuchungsämter Mecklenburg-Vorpommern, Neubrandenburg und Rostock
Niedersachsen	<ul style="list-style-type: none"> • Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Veterinärinstitut Oldenburg • Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Hannover • LUFA Nordwest, Institute für Tiergesundheit, Hannover und Oldenburg • Tierärztliche Hochschule Hannover, Außenstelle Bakum • Tierärztliche Hochschule Hannover, Klinik für Geflügel • Veterinärlabor Lohmann Tierzucht (LTZ), Cuxhaven • Veterinärlabor Ankum, Ankum • LVL, Lebensmittel- und Veterinäruntersuchungslabor GmbH, Emstek
Nordrhein-Westfalen	<ul style="list-style-type: none"> • Landwirtschaftskammer Westfalen-Lippe • Untersuchungszentrum NRW LUFA, Münster • Staatliche Veterinäruntersuchungsämter, Arnsberg, Detmold und Krefeld • Chemisches Landes- und Staatliches Veterinäruntersuchungsamt, Münster • Geflügelpraxis Dr. Pöppel, Mikrobiologisches Labor, Delbrück-Anreppen
Rheinland-Pfalz	<ul style="list-style-type: none"> • Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz, Koblenz
Sachsen	<ul style="list-style-type: none"> • Landesuntersuchungsanstalt für das Gesundheits- und Veterinärwesen Sachsen (LUA), Standorte Dresden, Leipzig • Sächsische Tierseuchenkasse, Tiergesundheitsdienst, Dresden
Sachsen-Anhalt	<ul style="list-style-type: none"> • Landesveterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamt Sachsen-Anhalt, Halle/Saale • Landesamt für Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt, Fachbereich 4, Veterinäruntersuchungen und -epidemiologie, Stendal • Heidemarkmästerei, Haldensleben
Schleswig-Holstein	<ul style="list-style-type: none"> • Landeslabor Schleswig-Holstein, Lebensmittel-, Veterinär- und Umweltuntersuchungen, Neumünster • Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt ITL, Kiel
Thüringen	<ul style="list-style-type: none"> • Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz (TLLV), Standorte Jena und Bad Langensalza • Tiergesundheitsdienst Thüringen e.V., Bad Langensalza

3.1.4 Begleitbogen für die Bakterienisolate

Wie im Studienplan 2005/2006 gefordert, mussten vom teilnehmenden Kooperationslabor weitere epidemiologische Angaben im Begleitbogen eingetragen werden. Der Begleitbogen entsprach einer Datenbank zu der alle teilnehmenden Labore via Internet Zugang hatten.

Folgende Angaben waren zwingend notwendig:

(1) Laborreferenznummer, (2) Externe Probenidentifizierungsnummer, (3) Bakterienart, (4) Isolierungsdatum, (5) Postleitzahl und Ort des Herkunftsbetriebes, (6) Tierart, (7) Erkrankung, (8) Probenmaterial.

Ein Fehlen dieser Informationen führte im BVL automatisch zum Ausschluss der Bakterienkultur aus der Studie. Angaben zum Tieralter und –gewicht, zur Herdengröße, zur Haltungform, zu postmortalen Befunden sowie zur vorherigen Anwendung von Antibiotika bei den beprobten Tieren oder der Einsatz von antimikrobiell wirksamen Substanzen im Bestand waren optional, da sie aufgrund fehlender Informationen von den externen Laboren nicht regelmäßig erhoben werden konnten.

3.1.5 Bakterienstämme

3.1.5.1 Klinische Isolate für die genotypische Charakterisierung

Die genotypische Charakterisierung wurde bei jenen *E. coli*-Stämmen durchgeführt, welche im Agardiffusionstest nach CLSI Vorgaben phänotypisch als ESBL-produzierend bewertet wurden. Nach CLSI (2002) ist dieser Test positiv, wenn zwischen den Hemmhofdurchmessern von Cefotaxim bzw. Ceftazidim und dem entsprechenden Wirkstoff in Kombination mit Clavulansäure eine Differenz von mindestens 5 mm liegt.

Tab. 7 listet die *E. coli*-Stämme auf, welche sich im nach CLSI Angaben phänotypischen Bestätigungstest (Agardiffusionstest) als ESBL positiv darstellten und in die genotypische Charakterisierung eingingen.

Tab. 7 Zur genotypischen Charakterisierung verwendete *E. coli*-Stämme

Stamm-Nr.	BVL Nr.	Infektionskrankheit	Tierart	Probe	PLZ	Ort
IMT 14388	271	Enteritis	Läufer (bis 40kg)	Gewebe	16348	Ruhlsdorf
IMT 14391	588	Sepsis	Junghenne < 1/2 Jahr	Dottersack	49577	Kettenkamp
IMT 14392	802	Enteritis	Kalb (> 6 Wo)	Kot	07957	Langenweizendorf
IMT 14393	805	Enteritis	Kalb (> 6 Wo)	Gewebe	07389	Knau
IMT 14396	1532	Enteritis	Ferkel (bis 15 kg)	Gewebe	09623	Burkersdorf
IMT 14397	1709	akute Mastitis	Milchrind	Milch	16835	Seebeck
IMT 14398	1838	Sepsis	Legehennen > 1/2 Jahr	Gewebe	49393	Lohne-Kroge
IMT 14399	1900	Enteritis	Kalb (> 6 Wo)	Kot	63584	Gründau-Hain
IMT 14400	2034	Enteritis	Kalb (> 6 Wo)	Kot	54673	Nasingen
IMT 14401	2081	akute Mastitis	Milchrind	Gewebe	91486	Uehlfeld
IMT 14402	2157	Colitis	Schwein	Gewebe	17168	Todendorf
IMT 14403	2176	Pneumonie	Kalb (> 6 Wo)	Kot	19217	Carlow
IMT 14404	2308	akute Mastitis	Milchrind	Milch	14947	Nuthe-Urstromtal
IMT 14405	2520	Enteritis	Ferkel (bis 15 kg)	Kot	19294	Grebs
IMT 14406	2534	Arthritis	Kalb (> 6 Wo)	Gewebe	18279	Raden
IMT 14407	3150	Sepsis	Ferkel (bis 15 kg)	Gewebe	31535	Neustadt a.R.
IMT 14408	3374	Enteritis	Kalb (> 6 Wo)	Kot	49565	Bramsche
IMT 14409	3375	Enteritis	Kalb (> 6 Wo)	Kot	29352	Adelheidsdorf
IMT 14410	3423	Enteritis	Kalb (> 6 Wo)	Gewebe	04626	Altkirchen
IMT 14413	3947	Enteritis	Ferkel (bis 15 kg)	Gewebe	35799	Merenberg
IMT 14414	3955	Enteritis	Ferkel (bis 15 kg)	Kot	64853	Otzberg
IMT 14415	3986	akute Mastitis	Milchrind	Milch	09228	Wittgensdorf

3 Material und Methoden

Stamm-Nr.	BVL Nr.	Infektionskrankheit	Tierart	Probe	PLZ	Ort
IMT 14416	4016	Enteritis	Ferkel (bis 15 kg)	Gewebe	04886	Köllitsch
IMT 14418	4346	Enteritis	Kalb (> 6 Wo)	Kot	34388	Trendelburg
IMT 14419	4458	Enteritis	Kalb (> 6 Wo)	Kot	54675	Geichlingen
IMT 14425	4682	Enteritis	Kalb (> 6 Wo)	Gewebe	17098	Friedland
IMT 14426	4684	Enteritis	Kalb (> 6 Wo)	Gewebe	18239	Radegast
IMT 14427	4687	Enteritis	Kalb (> 6 Wo)	Gewebe	23968	Beckerwitz
IMT 14428	4715	Enteritis	Kalb (> 6 Wo)	Gewebe	25725	Schafstedt
IMT 14430	4981	akute Mastitis	Milchrind	Milch	96524	Gefell
IMT 14431	5064	Enteritis	Kalb (> 6 Wo)	Kot	17509	Wusterhusen
IMT 14435	5393	Enteritis	Kalb (> 6 Wo)	Gewebe	23992	Rüggkamp
IMT 14436	5400	(Poly)serositis	Ferkel (bis 15 kg)	Gewebe	19417	Klein Labenz
IMT 14437	5472	akute Mastitis	Milchrind	Milch	49762	Renkenberge
IMT 14438	5570	Sepsis	Kalb (> 6 Wo)	Gewebe	38829	Harsleben
IMT 14441	5708	Enteritis	Zuchtschwein	Gewebe	07819	Geroda
IMT 14443	5751	Sepsis	Küken (Masthahn)	Tupfer	49681	Garrel
IMT 14444	5864	Enteritis	Schwein	Kot	64853	Otzberg
IMT 14445	5910	Enteritis	Kalb (> 6 Wo)	Kot	09573	Leubsdorf
IMT 14446	6094	Sepsis	Milchrind	Gewebe	39615	Leppin

3.1.5.2 Referenzstämme des BVL

Die in Tab. 8 aufgeführten Referenzstämme wurden beim BVL zur Qualitätskontrolle der MHK-Bestimmung und des Agardiffusionstests eingesetzt.

Tab. 8 Referenzstämme für die MHK-Bestimmung und den Agardiffusionstest

Bakterienspezies	Bezeichnung	Bezugsquelle
<i>E. coli</i>	DSM 1103	DSMZ
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603	ATCC

3.1.5.3 Referenzstämme des IMT

Die Referenzstämme für den genotypischen Nachweis der genannten ESBL-Gene mittels PCR und für die PFGE werden in Tab. 9 zusammengefasst.

Tab. 9 Eingesetzte Referenzstämme für PCR und PFGE

Stamm-Nr.	Gen	Bezugsquelle	Literaturzitat
IMT 12014	<i>bla</i> _{CTX-M-1} / <i>bla</i> _{TEM-3}	Pfeifer, RKI	Sirot <i>et al.</i> , 1987
IMT 12015	<i>bla</i> _{SHV-3}	Pfeifer, RKI	----- *
IMT 12016	<i>bla</i> _{CTX-M-9}	Pfeifer, RKI	Pfeifer <i>et al.</i> , 2007
IMT 12017	<i>bla</i> _{CTX-M-10}	Pfeifer, RKI	Pfeifer <i>et al.</i> , 2007
IMT 12074	<i>bla</i> _{CTX-M-9} / <i>bla</i> _{OXA-1}	Karch, Uniklinikum Münster	Olowe <i>et al.</i> , 2009
IMT 12075	<i>bla</i> _{SHV-1}	Karch, Uniklinikum Münster	Olowe <i>et al.</i> , 2009
IMT 12076	<i>bla</i> _{SHV-2}	Karch, Uniklinikum Münster	Olowe <i>et al.</i> , 2009
IMT 12079	<i>bla</i> _{TEM-1} / <i>bla</i> _{TEM-2}	Karch, Uniklinikum Münster	Olowe <i>et al.</i> , 2009
IMT 12080	<i>bla</i> _{TEM-9}	Karch, Uniklinikum Münster	Olowe <i>et al.</i> , 2009
IMT 14265	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	Xu, Birmingham UK	Xu <i>et al.</i> , 2005
IMT 14266	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	Xu, Birmingham UK	Xu <i>et al.</i> , 2005
IMT 14269	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	Xu, Birmingham UK	Xu <i>et al.</i> , 2005
IMT 14270	<i>bla</i> _{CTX-M-26}	Xu, Birmingham UK	Xu <i>et al.</i> , 2005
IMT 14355	<i>bla</i> _{CTX-M-3}	Coque, Frankreich	Coque <i>et al.</i> , 2002

3 Material und Methoden

Stamm-Nr.	Gen	Bezugsquelle	Literaturzitat
IMT 14358	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	Coque, Frankreich	Coque <i>et al.</i> , 2002
IMT 14359	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	Coque, Frankreich	Coque <i>et al.</i> , 2002
IMT 14693	<i>bla</i> _{OXA}	Wallmann, BVL	Schröer <i>et al.</i> , 2007
IMT 14695	<i>bla</i> _{OXA}	Wallmann, BVL	Schröer <i>et al.</i> , 2007
IMT 14696	<i>bla</i> _{OXA}	Wallmann, BVL	Schröer <i>et al.</i> , 2007
IMT 14697	<i>bla</i> _{OXA}	Wallmann, BVL	Schröer <i>et al.</i> , 2007
IMT 2147	EDL993 O157:H7, <i>stx2+</i> , <i>lee+</i> , <i>hlyEHEC+</i> , <i>pssA/EspP+</i> , <i>stx1+</i>	Universität Gießen	Johnson <i>et al.</i> , 1995

* durch Sequenzierung bestätigt

3.1.6 Geräte

Die in diesem Projekt eingesetzten Geräte werden in Tab. 10 aufgeführt.

Tab. 10 Eingesetzte Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Agarosekammern	Agarosekammer	Neolab, Deutschland
Brutschrank	IPP 400	Memmert GmbH + Co KG, Deutschland
Brutschränke	Heraeus Typ B6060	Thermo Fisher Scientific Inc, Deutschland
Cycler	Gene Amp PCR System 2400	Applied Biosystems Inc, USA
Densimat	Densimat	bioMérieux, Deutschland
Elektrophoresekammern	Elektrophoresekammer	AGS; Hybaid; MWG
Inoculator Pipettierautomat	Sensititre	Trek Diagnostic Systems LTD, England
Kühlzentrifuge	3K30	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Deutschland
Objektträger	76 x 26 mm	Carl Roth GmbH + Co KG, Deutschland
Pipetten	Pipetten	Eppendorf AH, Deutschland

Gerät	Typ	Hersteller
Pulsfeld-Gelelektrophoresekammer	Rad Chef-DR III System; Electrophoresis Cell;	BioRad-Cooling Module, USA
Schüttler	KS 250 bas	IKA Labortechnik, Deutschland
Schüttelinkubator	C 24 Incubator Shaker	New Brunswick Scientific Co, USA
Dispenser	Sensi-Disc Dispenser	Becton Dickinson Caribe LTD, USA
Sensititre	Sensi Touch	MCS Diagnostik, Holland
Sterilwerkbank	Sterilwerkbank	Heraeus
Sterilwerkbank	Sterilwerkbank	Steag Laminarflow-Prozeßtechnik GmbH, Deutschland
Thermocycler	Thermocycler	Biometra bio-medizinische Analytik GmbH, Deutschland
Tischzentrifuge	5415D	Eppendorf AH, Deutschland
Transilluminator	E.A.S.Y. 429K; ICU-1; Video-Graphik; Printer UP 890 CE	Herolab GmbH, Deutschland
UV-Tisch	TI 1	Biometra, Deutschland
Vortexer	Genie 2	Carl Roth GmbH + Co KG, Deutschland
Vortexer	MS2 Minishaker	IKA Labortechnik, Deutschland
Waagen	LA 230S und BP 2100	Sartorius AG, Deutschland
Wärmeschrank	Wärmeschrank	Binder GmbH, Deutschland

3.1.7 Chemikalien, Nährmedien, Lösungen und Puffer

3.1.7.1 Chemikalien

Tab. 11 Eingesetzte Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Agarose	Biodeal, Deutschland
API ID 32 E	bioMérieux, Deutschland
Cefotaxim Antibiotikaplättchen	Becton Dickinson Caribe LTD, USA
Cefotaxim/Clavulansäure	Becton Dickinson Caribe LTD, USA
Ceftazidim	Becton Dickinson Caribe LTD, USA

3 Material und Methoden

Chemikalien	Hersteller
Ceftazidim/ Clavulansäure	Becton Dickinson Caribe LTD, USA
DNA polymerase 5 µl 250 U	Rapidozym GmbH, Deutschland
Ethanol	Merck KGaA, Deutschland
Gram Kristallviolett	Merck KGaA, Deutschland
Indol Reagenz	Merck KGaA, Deutschland
Lambda Ladder	New England Biolabs, USA
Lugols Lösung	Merck KGaA, Deutschland
Natriumchlorid	Merck KGaA, Deutschland
Paraffin flüssig	Carl Roth GmbH + Co KG, Deutschland
Proteinase K	Carl Roth GmbH + Co KG, Deutschland
Pulsed Field Agarose	peqlab Biotechnologie GmbH, Deutschland
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Deutschland
Salzsäure	Carl Roth GmbH + Co KG, Deutschland
Sensititre Antibiotikamikrotiterplatten: NLV 34, 53, 54, 59, 66, 67	Trek Diagnostic Systems LTD, England
Xbal	Promega Corporation, USA

3.1.7.2 Nährmedien

Tab. 12 Eingesetzte Nährmedien

Medium	Bezugsquelle bzw. Herstellungsvorschrift
BHI-Bouillon	Heipha Diagnostika Dr. Müller GmbH, Deutschland
Columbia-Agar mit Schafblut	Oxoid GmbH, Deutschland
Gassner Agar	Oxoid GmbH, Deutschland
LB-Agar	NaCl 5,00 g/l, Pankreatisches Pepton (Casein) 10,00 g/l, Hefeextrakt 5,00 g/l, 1 N NaOH 1,00 ml, Agar 15,00 g/l pH 7,0+0,2 autoklaviert bei 121 °C, 15 min
LB-Medium	NaCl 5,00 g/l, Pankreatisches Pepton (Casein) 10,00 g/l, Hefeextrakt 5,00 g/l, pH 7,0+0,2 autoklaviert bei 121 °C, 15 min
Mueller Hinton Agar	Oxoid GmbH, Deutschland
Mueller Hinton II Bouillon	Trek Diagnostik System, England

3.1.7.3 Lösungen und Puffer

Tab. 13 Eingesetzte Lösungen und Puffer

Lösungen bzw. Puffer	Zusammensetzung/Hersteller
Beschwererlösung/Stopplösung (für DNA-Gelelektrophorese)	Formamid 9,50 ml, EDTA-Lsg. pH 8,0/500 mM/0,40 ml, Bromphenolblau 5,00 mg, Xylencyanol FF 5,00 mg, A. bidest 0,100 ml
BioTherm Buffer without MgCl ₂	Rapidozym GmbH, Deutschland
BSA Puffer	New England Biolabs, USA
50mM MgCl ₂	Rapidozym GmbH, Deutschland
EDTA pH 8	18,615 g EDTA, mit NaOH pH 8 einstellen, ad 100ml A. bidest
Enzympuffer für Xbal	0,121 g Tris, 0,058 g NaCl, 0,203 g MgCl ₂ , mit NaOH auf pH 8 einstellen, 0,78 ml Mercaptoethanol, in 80 ml A. bidest lösen
ESP-Puffer	18,62 g EDTA, 1,00 g Sarcosyl, pH 9,5 eingestellt mit NaOH, auf 100 ml A. bidest, 1,80 mg/ml ProteinaseK
Ethidiumbromidlösung 1 %	Carl Roth GmbH + Co KG, Deutschland
NaCl-Lösung 0,9 %-ig	9 g NaCl in 1000 ml A. bidest lösen
PBS-Puffer	NaCl 80g, KCl 2g, Na ₂ HPO ₄ 14,4 g, KH ₂ PO ₄ 2,4 g, pH mit HCl einstellen, ad 1000 ml A. bidest
PB-Puffer, Bindungspuffer	Qiagen GmbH, Deutschland
QG-Puffer, Lösungspuffer	Qiagen GmbH, Deutschland
TBE-Puffer Stammlösung (10 x konz.)	107,82 g Tris, 55,03 g Borsäure, 18,62 g EDTA-Lsg. pH 8,0, eingestellt mit NaOH auf 100 ml, ad 1000 ml mit A. bidest
TE Puffer	1,21 g Tris, 3,72 g EDTA, pH 7,5 auf 1000 ml A. bidest
Lösungen für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR): 10 x PCR buffer Taq DNA Polymerase Magnesium Chlorid Solution dNTP	Tris-HCl, pH 8,4 200 mM, KCl 500 mM 5 U/μl 50 mM PCR Nucleotide Mix: dATP, dCTP, dGTP, dTTP, each dNTP 10 mM
Ziehl-Neelsen-Karbofuchsin Lösung	Merck KGaA, Deutschland

3 Material und Methoden

3.1.8 Oligonukleotid-Primer

Die in dieser Arbeit als Amplifikationsprimer für die ESBL-Gene eingesetzten Oligonukleotide sind in Tab. 14 aufgeführt.

Tab. 14 Oligonukleotid-Primer zum genotypischen Nachweis von ESBL und zur Sequenzanalyse der entsprechenden Gene

Bezeichnung	Funktion	Sequenz 5' → 3'	PCR-Produkt (bp)	Referenz
CTX-M 7	<i>bla</i> _{CTX-M} Gruppe 1 Nachweis	GCGTGATACCACTTCACCTC	260	Xu <i>et al.</i> , 2005
CTX-M 8	<i>bla</i> _{CTX-M} Gruppe 1 Nachweis	TGAAGTAAGTGACCAGAATC	260	Xu <i>et al.</i> , 2005
CTX-M 17	<i>bla</i> _{CTX-M} Gruppe 2 Nachweis	TGATACCACCACGCCGCTC	341	Xu <i>et al.</i> , 2005
CTX-M 18	<i>bla</i> _{CTX-M} Gruppe 2 Nachweis	TATTGCATCAGAAACCGTGGG	341	Xu <i>et al.</i> , 2005
CTX-M 19	<i>bla</i> _{CTX-M} Gruppe 8/25/26 Nachweis	CGATACCACCACGCCGTTAG	207	Xu <i>et al.</i> , 2005
CTX-M 20	<i>bla</i> _{CTX-M} Gruppe 8/25/26 Nachweis	GCGATATCATTTCGTCTACCAT	207	Xu <i>et al.</i> , 2005
CTX-M 11	<i>bla</i> _{CTX-M} Gruppe 9 Nachweis	ATCAAGCCTGCCGATCTGGTTA	293	Xu <i>et al.</i> , 2005
CTX-M 12	<i>bla</i> _{CTX-M} Gruppe 9 Nachweis	GTAAGCTGACGCAACGTCTGC	293	Xu <i>et al.</i> , 2005
M13U CTX-M 1 F	<i>bla</i> _{CTX-M} Gruppe 1 Sequenzanalyse	GGTAAAAAATCACTGCG	863	keine
M13L CTX-M 1 R	<i>bla</i> _{CTX-M} Gruppe 1 Sequenzanalyse	GGTGACGATTTTAGCCGC	863	keine
CTX-M F Endsequenz	<i>bla</i> _{CTX-M} Gruppe 1 Sequenzanalyse	ACTCTGCGTAATCTGACG	427	keine
CTX-M R Endsequenz	<i>bla</i> _{CTX-M} Gruppe 1 Sequenzanalyse	GAGCTTATGGCCTGGTAT	427	keine
OXA Group 1 F	<i>bla</i> _{OXA} Gruppe 10 Nachweis	TTTTCTGTTGTTGGGTTTC	427	Bert <i>et al.</i> , 2002
OXA Group 1 R	<i>bla</i> _{OXA} Gruppe 10 Nachweis	TTTCTTGGCTTTTATGCTTG	427	Bert <i>et al.</i> , 2002
OXA Group 2 F	<i>bla</i> _{OXA} Gruppe 2 Nachweis	AAGAAACGCTACTCGCCTGC	478	Bert <i>et al.</i> , 2002
OXA Group 2 R	<i>bla</i> _{OXA} Gruppe 2 Nachweis	CCACTCAACCCATCCTACCC	478	Bert <i>et al.</i> , 2002
OXA Group 3 F	<i>bla</i> _{OXA} Gruppe 1 Nachweis	TCAACAAATCGCCAGAGAAG	276	Bert <i>et al.</i> , 2002
OXA Group 3 R	<i>bla</i> _{OXA} Gruppe 1 Nachweis	TCCCACACCAGAAAAACCAG	276	Bert <i>et al.</i> , 2002
TEM Grimm F	<i>bla</i> _{TEM} Nachweis	ATGAGTATTCAACATTTCCG	861	Grimm <i>et al.</i> , 2004
TEM Grimm R	<i>bla</i> _{TEM} Nachweis	TTAATCAGTGAGGCACCTAT	861	Grimm <i>et al.</i> , 2004
SHV F	<i>bla</i> _{SHV} Nachweis	GGGTTATTCTTATTTGTCCG	930	Coque <i>et al.</i> , 2002

Bezeichnung	Funktion	Sequenz 5' → 3'	PCR-Produkt (bp)	Referenz
SHV R	<i>bla</i> _{SHV} Nachweis	TTAGCGTTGCCAGTGCTC	930	Coque <i>et al.</i> , 2002

3.1.9 Antibiotika

Zur Bestimmung der MHK-Werte nach dem Bouillon-Mikrodilutionsverfahren (CLSI, 2002) wurden pro Bakterienisolat drei verschiedene Mikrotitrationsplatten der Firma Trek Diagnostic Systems LTD, England verwendet. Jede Platte verfügte über ein eigenes Plattenlayout. Pro Platte wurden acht Antibiotika getestet, insgesamt 22 Wirkstoffe und 2 Wirkstoffkombinationen. Dabei handelt es sich um die in Tab. 15 angegebenen Substanzen. Die unterschiedlichen Antibiotika lagen in dehydratisierter Form und in aufsteigender Konzentration in Zweifach- Verdünnungsschritten in den Vertiefungen der Platten vor.

Tab. 15 Auflistung der in den Mikrotiterplatten enthaltenen Antibiotika

Antibiotikaklasse	Antibiotikum	Konzentrationen [mg/l]	von/bis
Penicilline	Ampicillin	0,03 - 64	
	Amoxicillin/Clavulansäure 2:1	0.03/0.015 - 64/32	
	Penicillin	0.015 - 32	
Cephalosporine	Cephalothin	0.06 - 128	
	Cefoperazon	0.06 - 32	
	Cefquinom	0.015 - 32	
	Ceftiofur	0.03 - 64	
	Cefotaxim	0.015 - 32	
	Cefazolin	0.03 - 64	
Aminoglykoside	Apramycin	0.03 - 64	
	Gentamicin	0.12 - 256	
	Neomycin	0.06 - 128	
	Spectinomycin	0.25 - 512	
Tetrazykline	Tetrazyklin	0.12 - 256	
	Doxycyclin	0.06 - 128	
Antifolate	Trimethoprim	0.06 - 128	
	Trimethoprim/Sulfamethoxazol	0.015/0.3 - 32/608	
Fenicole	Chloramphenicol	0.5 - 256	
	Florfenicol	0.12 - 256	

3 Material und Methoden

Makrolide	Tulathromycin	0.03 - 64
	Spiramycin	0.06 - 128
Sonstige	Enrofloxacin	0.008 - 16
	Colistin	0.03 - 16
	Nalidixinsäure	0.06 - 128
	Tiamulin	0.03 - 64

3.2 Methoden

3.2.1 Kultivierung der eingesandten Bakterienisolate

Die auf unterschiedlichen Nährmedien eingesandten Bakterienisolate wurden auf Columbiaagar mit Schafblut (Oxoid GmbH, Wesel) im Verdünnungsausstrich aufgebracht und über Nacht bei 36°± 2° C kultiviert. Beim Vorliegen von Mischkulturen wurden morphologisch in Frage kommende Bakterienkolonien subkultiviert bis eine Reinkultur erreicht werden konnte. Im Anschluss wurden diese Stämme biochemisch differenziert, um die von den einsendenden Laboren angegebene Speziesbezeichnung zu verifizieren. Die reinkultivierten Stämme wurden konserviert und dienten für die spätere MHK-Bestimmung als Stammkulturen.

3.2.2 Lagerung der reinkultivierten Bakterienisolate

Von einem reinkultivierten Bakterienisolat wurden zwei bis drei Kolonien mit einer sterilen Öse von der Agar-Platte abgenommen und in einen mit Keramik-Kügelchen und Medium gefüllten Cryobankbehälter (Cryobank-System, Mast Diagnostica) überführt. Durch mehrmaliges Rühren wurden die Kolonien aus der Öse gelöst und es entstand eine trübe Bakteriensuspension. Vorsichtiges Schütteln führte zu einer verbesserten Verteilung und dem Anhaften der Bakterien an der Oberfläche der Kügelchen. Nach fünf Minuten wurde das Medium mit einer sterilen Pipette entfernt. Anschließend wurden die Cryobankbehälter bei -80° C eingefroren.

3.2.3 Mikrobiologische Methoden

3.2.3.1 Bouillon-Mikrodilutionsverfahren

Als Maß für die Antibiotika-Empfindlichkeit wurde die Minimale Hemmkonzentration mit dem Bouillon-Mikrodilutionsverfahren ermittelt.

Die zu prüfenden *E. coli*-Stämme wurden aus der Cryobank entnommen und auf Columbiaagar mit Schafblut rekultiviert. Nach ca. 18-stündiger Bebrütung bei 36 +/- 2° C wurde eine zweite Subkultur im Verdünnungsausstrich angelegt und erneut über Nacht bebrütet. Dies diente der Verbesserung der Vitalität und zur Überprüfung der Bakterienkultur auf Reinheit.

Zur Herstellung des Inokulums für die anschließende MHK-Bestimmung wurden von der zweiten Subkultur ein bis drei einzeln wachsende Kolonien mit einem sterilen Wattetupfer abgetragen und in 3 ml physiologischer Kochsalzlösung gleichmäßig suspendiert bis eine Trübung von 0,5 McFarland Standard erreicht wurde. Die Kontrolle der Dichte erfolgte mittels eines Densimaten (bioMérieux). Von der entstandenen Keimsuspension wurden 50 µl in 10 ml Mueller-Hinton-II-Bouillon pipettiert und homogenisiert, wodurch ein Inokulum mit einer Bakterienkonzentration von 5×10^5 KBE/ml erreicht wurde. Um eine Verdichtung des Inokulums durch weiteres Wachstum zu vermeiden, erfolgte die Beschickung der mit Antibiotika beschichteten Mikrotiterplatten innerhalb von 15 Minuten nach Herstellung der Suspension. Dazu wurden 50 µl mit einer elektronischen Pipette in jede Vertiefung der Mikrotiterplatten pipettiert.

Durch Zugabe der Bakteriensuspension wurden die dehydratisierten Antibiotika rehydratisiert. Anschließend wurden die Platten mit einer speziellen Klebefolie verschlossen und bei 36 +/- 2° C für ca. 18 Stunden inkubiert.

Die Auswertung erfolgte visuell. Bakterienwachstum zeigte sich als Ansammlung von Zellen auf dem Boden der Vertiefungen der Mikrotiterplatten. Die Mikrotiterplatten wurden zum Ablesen in ein Ablesegerät der Marke Sensititre, Typ Sensi Touch (Trek Diagnostics, UK) eingelegt. Eine Lampe beleuchtete dabei die Mikrotiterplatte von oben und ein Spiegel übertrug das Bild. Eine der Mikrotiterplatte (96 Felder) identische Tastatur ermöglichte es dem Ableser, genau jenes Feld zu markieren, auf dem kein Bakteriensediment mehr sichtbar war.

3 Material und Methoden

Die Daten wurden automatisch in eine Excel-Tabelle übertragen und als minimaler Hemmkonzentrationswert angezeigt.

Die Durchführung des Bouillon-Mikrodilutionsverfahrens diente zum einen als Messverfahren zur Antibiotikaempfindlichkeit im Rahmen der Routinearbeit des BVL; für diese Studie wurde sie als orientierendes Prüfverfahren zur Detektion zum Vorkommen von ESBL sowie als phänotypisches Screening zum Vorkommen von CTX-M ESBL genutzt.

Eine Änderung im Ablauf der mikrobiologischen Detektion ergab sich nach ca. einem Drittel der 2.352 insgesamt getesteten *E. coli*. Um eine verbesserte Aussage über die Resistenzlage der Stämme gegenüber dem 3. Generations Cephalosporin Cefotaxim zu bekommen, wurde das Plattenlayout geändert. Von insgesamt 2.352 getesteten *E. coli*-Stämmen wurde ca. ein Drittel der Stämme auf dem in Tab. 16 dargestellten Plattenlayouts getestet. Das Plattenlayout wurde anschließend modifiziert und Cefotaxim anstelle von Cefazolin eingesetzt (Tab. 17).

Tab. 16 Verwendetes Plattenlayout mit Cefazolin in mg/l

Plattenlayout SENSITITRE NLV 53												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AMP 0.03	AMP 0.06	AMP 0.12	AMP 0.25	AMP 0.5	AMP 1	AMP 2	AMP 4	AMP 8	AMP 16	AMP 32	AMP 64
B	AUG2 0.03	AUG2 0.06	AUG2 0.12	AUG2 0.25	AUG2 0.5	AUG2 1	AUG2 2	AUG2 4	AUG2 8	AUG2 16	AUG2 32	AUG2 64
C	PEN 0.015	PEN 0.03	PEN 0.06	PEN 0.12	PEN 0.25	PEN 0.5	PEN 1	PEN 2	PEN 4	PEN 8	PEN 16	PEN 32
D	XNL 0.03	XNL 0.06	XNL 0.12	XNL 0.25	XNL 0.5	XNL 1	XNL 2	XNL 4	XNL 8	XNL 16	XNL 32	XNL 64
E	CEQ 0.015	CEQ 0.03	CEQ 0.06	CEQ 0.12	CEQ 0.25	CEQ 0.5	CEQ 1	CEQ 2	CEQ 4	CEQ 8	CEQ 16	CEQ 32
F	CEP 0.06	CEP 0.12	CEP 0.25	CEP 0.5	CEP 1	CEP 2	CEP 4	CEP 8	CEP 16	CEP 32	CEP 64	CEP 128
G	FAZ 0.03	FAZ 0.06	FAZ 0.12	FAZ 0.25	FAZ 0.5	FAZ 1	FAZ 2	FAZ 4	FAZ 8	FAZ 16	FAZ 32	FAZ 64
H	FOP 0.06	FOP 0.12	FOP 0.25	FOP 0.5	FOP 1	FOP 2	FOP 4	FOP 8	FOP 16	FOP 32	POS	POS

AMP: Ampicillin; AUG2: Amoxicillin/Clavulansäure im Verhältnis 2:1; PEN: Penicillin; XNL: Ceftiofur; CEQ: Cefquinom; CEP: Cephalothin; FAZ: Cefazolin; FOP: Cefoperazon; POS: Positivkontrolle

Tab. 17 Verwendetes Plattenlayout mit Cefotaxim in mg/l (grau unterlegt)

Plattenlayout SENSITITRE NLV 67												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AMP 0.03	AMP 0.06	AMP 0.12	AMP 0.25	AMP 0.5	AMP 1	AMP 2	AMP 4	AMP 8	AMP 16	AMP 32	AMP 64
B	AUG2 0.03	AUG2 0.06	AUG2 0.12	AUG2 0.25	AUG2 0.5	AUG2 1	AUG2 2	AUG2 4	AUG2 8	AUG2 16	AUG2 32	AUG2 64
C	PEN 0.015	PEN 0.03	PEN 0.06	PEN 0.12	PEN 0.25	PEN 0.5	PEN 1	PEN 2	PEN 4	PEN 8	PEN 16	PEN 32
D	XNL 0.03	XNL 0.06	XNL 0.12	XNL 0.25	XNL 0.5	XNL 1	XNL 2	XNL 4	XNL 8	XNL 16	XNL 32	XNL 64
E	CEQ 0.015	CEQ 0.03	CEQ 0.06	CEQ 0.12	CEQ 0.25	CEQ 0.5	CEQ 1	CEQ 2	CEQ 4	CEQ 8	CEQ 16	CEQ 32
F	CEP 0.06	CEP 0.12	CEP 0.25	CEP 0.5	CEP 1	CEP 2	CEP 4	CEP 8	CEP 16	CEP 32	CEP 64	CEP 128
G	FOT 0.015	FOT 0.03	FOT 0.06	FOT 0.12	FOT 0.25	FOT 0.5	FOT 1	FOT 2	FOT 4	FOT 8	FOT 16	FOT 32
H	FOP 0.06	FOP 0.12	FOP 0.25	FOP 0.5	FOP 1	FOP 2	FOP 4	FOP 8	FOP 16	FOP 32	POS	POS

FOT: Cefotaxim

3 Material und Methoden

3.2.3.2 Phänotypische Bestätigung von ESBL-produzierenden *E. coli*-Stämmen

Die Produktion einer ESBL durch ein Bakterium gilt laut CLSI (2002) als bestätigt, wenn der Hemmhof für Cefotaxim oder Ceftazidim mindestens 5 mm kleiner ist als der für den jeweiligen Wirkstoff in Kombination mit dem Beta-Laktam-Inhibitor Clavulansäure.

Um aus den 2.352 *E. coli*-Stämmen jene zu identifizieren, welche ESBL produzieren, wurde der im Folgenden beschriebene Agardiffusionstest als phänotypischer Bestätigungstest ausgewählt.

3.2.3.3 Agardiffusionstest

Die Herstellung des Inokulums für den Agardiffusionstest (Double disc diffusion test) erfolgte identisch mit dem für die MHK-Bestimmung. Zur Aufnahme der Bakterienkultur wurde ein Wattetupfer verwendet. Dieser wurde danach auf Mueller-Hinton-Agar in einem entsprechend des CLSI (2002) vorgegebenen Muster ausgestrichen. Dazu wurde die Platte 3-mal jeweils im Winkel von 60° gedreht und der Wattetupfer gleichmäßig über die Platte geführt. Anschließend wurden die Antibiotikaplättchen unter Zuhilfenahme eines Dispensers einheitlich auf die Platte gestempelt. Die Plättchen enthielten die Wirkstoffe Cefotaxim, Ceftazidim sowie Cefotaxim/Clavulansäure und Ceftazidim/Clavulansäure. Die Konzentrationen lagen bei den Einzelwirkstoffen bei 30 µg, in der Kombination bei 30 µg Wirkstoff und 10 µg Clavulansäure. Die Bebrütung der Platten erfolgte bei 36 +/- 2° C für ca. 18 Stunden. Nach der Bebrütung wurden die Hemmhöfe millimetergenau ausgemessen und die Ergebnisse ausgewertet und dokumentiert.

3.2.3.4 Qualitätskontrolle

Eine Qualitätskontrolle wurde regelmäßig durchgeführt. Sowohl bei der MHK-Bestimmung als auch im Agardiffusionstest wurden an jedem Versuchstag die Referenzstämme *E. coli* DSM 1103 sowie *K. pneumoniae* ATCC 700603 mitgeführt, um die Richtigkeit und Standardisierung der Testung zu gewährleisten (Tab. 8).

3.2.4 Molekularbiologische Methoden

3.2.4.1 DNA-Isolierung

Die Hitzelyse stellt ein einfaches und schnelles Verfahren dar, um genomische DNA aus Bakterien zu gewinnen und in der PCR als Matrize einzusetzen. Eine Kolonie einer über Nacht auf Columbiaagar bei 36 +/- 2° C bebrüteten *E. coli*-Kultur wurde mit einer Öse in 300 µl A. bidest in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß (Typ „safe-lock“, Eppendorf, Hamburg) überführt und homogenisiert. Im Anschluss wurde die Suspension bei 100° C für 10 min gekocht, danach bei -82° C für 10 min gefroren und nach erneutem Auftauen bei 13.000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig aufgenommen und in ein neues 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die darin enthaltene genomische DNA wurde bei -82° C eingefroren und war für mehrere Wochen haltbar. Für den PCR-Ansatz wurden jeweils 3 µl des gelagerten Überstandes für einen 30 µl-PCR-Ansatz als DNA-Template (Matrizen-DNA) eingesetzt.

3.2.4.2 Polymerase-Kettenreaktion


Als Template-DNA wurde chromosomale DNA verwendet, die mittels Hitzelyse (3.2.3.1) isoliert wurde. Der auf Eis pipettierte Reaktionsansatz (30 µl Gesamtvolumen) setzte sich wie folgt zusammen:

Tab. 18 Standard PCR-Ansatz

Reagenz	Volumen	Hersteller
Template-DNA	3 µl	
10 x Polymerase-Puffer, MgCl ₂ -frei	3 µl	Rapidozym, Deutschland
MgCl ₂ [50 mM]	1.2 µl	Rapidozym, Deutschland
Primer 1 [10 pmol/µl]	1 µl	Sigma, Deutschland
Primer 2 [10 pmol/µl]	1 µl	Sigma, Deutschland
dNTPs [0,2 mM]	0.6 µl	Rapidozym, Deutschland
Taq DNA-Polymerase [0,5 U/µl]	0.1 µl	Rapidozym, Deutschland
A. bidest	20.1 µl	

3 Material und Methoden

Folgendes Temperaturprofil wurde, soweit nicht anders erwähnt, benutzt:

1) Initialdenaturierung	95°C	5 min		25 x
2) Denaturierung	95°C	1 min		
3) Annealing	55°C	1 min		
4) Synthese	72°C	1 min		
5) verlängerte Synthesephase	72°C	10 min		
6) Endphase	10°C	∞		

Abweichungen zum Standard-Temperaturprofil werden in Tab. 19 aufgeführt.

Tab. 19 Abweichungen vom Standard-Temperaturprofil bei der PCR

PCR	Primer	Annealingtemperatur (°C)	Annealingdauer (min)
CTX-M Gruppe 9	CTX-M 11 und 12	62	1
CTX-M Gruppe 2	CTX-M 17 und 18	67	1
CTX-M Gruppen 8, 25/26	CTX-M 19 und 20	58	1
SHV	SHV F und R	61	1
OXA Gruppe 1	OXA 1 F und R	51	1
OXA Gruppe 2	OXA 2 F und R	61	1
OXA Gruppe 10	OXA 10 F und R	58	1

3.2.4.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Elektrophorese ist ein physikalisches Trennverfahren, welches auf der Wanderung geladener Moleküle im elektrischen Feld beruht [Maniatis *et al*, 1989]. Bei dieser Methode können DNA-Fragmente mit unterschiedlicher Größe aufgetrennt und anhand ihrer Größe und durch Vergleich mit Strängen bekannter Größen identifiziert werden. Dabei wandert die DNA durch ein elektrisches Feld. Aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen wandert die DNA in Richtung Anode. Das Agarosegel bildet hierbei eine Art Molekularsieb, wobei die kleineren Moleküle sich schneller durch das Gel bewegen können und somit eine Auftrennung der Stränge nach ihrer Größe ermöglicht wird. 7,5 g Agarose wurden in 500 ml TBE-Puffer solange aufgeköcht, bis eine klare Lösung vorlag. Zur späteren Visualisierung der DNA-Banden auf dem UV-Tisch wurden, nach Abkühlung der Lösung auf 55° C, 8,5 µl Ethidiumbromid zugegeben. Die flüssige Agarose wurde in eine Gelkammer gegossen, in der sich ein Probenfach mit 10 bis 24 Taschen befand. Nach dem Aushärten wurde das Gel in die entsprechende, mit 1 x TBE-Puffer gefüllte horizontale Elektrophoresekammer gelegt. Das

PCR-Produkt wurde nach Zugabe von Beschwererlösung („Stop-Lösung“) in die Taschen des Gels pipettiert und danach ein elektrisches Feld von 100 V für 45 bis 60 min angelegt. Im Anschluss wurden die DNA-Banden mittels eines Transilluminators (3.1.6) visualisiert und fotografiert.

3.2.4.4 Pulsfeld-Gelelektrophorese

Die Contour-Clamped Homogeneous Electric Field – Pulsfeld-Gelelektrophorese (CHEF-PFGE) wurde eingesetzt, um die *E. coli*-Stämme auf eine mögliche Ähnlichkeit zu untersuchen. Bei diesem Verfahren wird das Genom mit einer selten schneidenden Restriktionsendonuklease (z. B. mit *Xba*I) verdaut und anschließend wurden die DNA-Fragmente mittels eines elektrischen Feldes aufgetrennt. Dabei können unterschiedliche Klone durch die Anzahl und Größe der Restriktionsfragmente separiert werden.

Von einer Übernacht-Kultur der *E. coli*-Stämme auf Columbiaagar mit Schafblutzusatz wurde eine Kolonie entnommen, in 300 µl LB-Bouillon überführt und bei 36° +/- 2° C im Schüttelinkubator für ca. 18 Stunden inkubiert.

Darauf folgend wurde 1 ml 1 x PBS-Puffer jedem Tube zugegeben und 5 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, anschließend 250 µl 1 x PBS-Puffer, zum Lösen des Pellets, in jedes Tube überführt und nach 1 Stunde Inkubation bei Raumtemperatur die Suspension mittels eines Vortexers homogenisiert. Dieser Vorgang wurde wiederholt.

Pro Tube wurden folgend 375 µl 1,2 %iges Pulsfeld-Agarosegel zugegeben, anschließend diese Menge in eine Blöckchenform überführt und für 30 min gekühlt. Die erstarrten Blöckchen wurden in 1,5 ml Tubes überführt und inkubierten unter Zugabe von 0,9 mg Proteinase K sowie 500 µl ESP-Lösung (Mengenangabe pro Blöckchen) für ca. 48 Stunden bei 56° C im Wasserbad. Nach Abpipettieren des Proteinase K-Gemisches wurde jedes Blöckchen in ein 15 ml Röhrchen (Greiner) überführt und anschließend mit 10 ml 1 x TE-Puffer befüllt. Die Röhrchen ruhten für 1,5 Stunden gekühlt. Dieser Vorgang wurde ein zweites Mal wiederholt. Im Anschluss konnten die Blöckchen für mehrere Wochen kühl aufbewahrt werden.

Vor dem Einsatz der Blöckchen in der PFGE wurde die darin enthaltene DNA mit *Xba*I verdaut. Dazu wurde der 1 x TE-Puffer durch 500 µl *Xba*-Puffer pro Tube ersetzt und das Blöckchen wurde für 1,5 Stunden bei 37° C inkubiert. Nach Entfernung des *Xba*-Puffers wurden pro Tube 150 µl *Xba*-Puffer, 1,5 µl BSA und 0,83 µl *Xba*I (Konzentration: 12 U/µl) hinzugefügt und dieses für 16 Stunden bei 37° C inkubiert. Nach Beendigung der Restriktion wurden die Blöckchen vorsichtig mit einem Spatel in die Taschen eines 1 %-igen Pulsfeld-Agarosegels überführt. Die Taschen wurden mit

3 Material und Methoden

der entsprechenden Agarose versiegelt. Die elektrophoretische Auftrennung der restringierten DNA-Fragmente wurde in einer Contour-Clamped Homogeneous Electric Field - PFGE-Kammer (CHEF DR III; BioRad, München) in 0,5 x TBE unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Laufzeit: 22 h; Temperatur: 14 °C; Winkel: 120 °; Spannung: 6 V; Pulszeit: 5–50 sec.


Die Auswertung erfolgte nach 20-minütiger Färbung in einer Ethidiumbromidlösung mit anschließender Entfärbung in A. bidest und Fotografieren der Gele unter UV-Licht (Transilluminator TI, Biometra, Wiesbaden; Foto-Kamera Polaroid MP4+ Instant Camera System). Die klonale Verwandtschaftsanalyse anhand der generierten Bandenmuster wurde mit dem Computerprogramm BioNumerics (Version 4.6, Applied Maths) mit 1,5 % Positionstoleranz und Dice-Einstellung für den Koeffizienz-Vergleich durchgeführt. Auswertungsgrundlage war hierbei das auf dem "Unweighted pair group method with arithmetic mean" (UPGMA) basierende Clusterverfahren. Stämme wurden als verwandt bezeichnet, wenn ihre Übereinstimmung bei $\geq 85\%$ lag [Tenover *et al.*, 1995; Carrico *et al.*, 2005].

3.2.4.5 DNA-Sequenzanalyse

Insgesamt wurden *bla*-Gene von 40 ESBL positiven *E. coli*-Stämmen sequenziert. Zuvor erfolgte die genotypische Charakterisierung mittels PCR. Um genauere Aussagen bezüglich der Punktmutationen im Bereich des *bla*-Genes zu erhalten, mussten die entsprechenden Bereiche im Genom der *E. coli*-Stämme sequenziert werden.

Die Sequenzanalyse wurde durch die Firma AGOWA GmbH, Berlin durchgeführt. Die Auswertung der übermittelten Sequenzen erfolgte mit der Software BioNumerics (Version 4.6, Applied Maths) sowie Kodon (Version 3.6, Applied Maths).

Folgendes Temperaturprofil wurde als Standard genutzt:

1) Initialdenaturierung	94°C	5 min		33 x
2) Denaturierung	94°C	0,5 min		
3) Annealing	55°C	1 min		
4) Synthese	72°C	1 min		
5) verlängerte Synthesephase	72°C	10 min		
6) Endphase	10°C	∞		

Abweichungen zum Standard-Temperaturprofil werden in Tabelle 20 aufgeführt.

Tab. 20 Abweichungen vom Standard-Temperaturprofil bei der PCR

PCR	Primer	Annealingtemperatur (°C)	Annealingdauer (min)
CTX-M Gruppe 1 Endsequenz	CTX F und R	54	1
TEM Sequenzanalyse	TEM F und R	57	1
OXA Sequenzanalyse	OXA F und R	47	0,5
CTX-M Gruppe 1 Sequenzanalyse	CTX-M F und R	56	0,5

4 Ergebnisse

4.1 Phänotypische Detektion

4.1.1 Bouillon-Mikrodilutionsverfahren

Die Ergebnisse der Minimalen Hemmkonzentration wurden als orientierende Prüfung auf das Vorkommen von ESBL genutzt. Diese MHK-Ergebnisse von 40 Stämmen wiesen ein spezifisches Muster auf, welches auf das Vorkommen von CTX-M ESBL schließen ließ.

Die MHK-Werte dieser Stämme lagen bei > 32 mg/l für Cefotaxim und Cefquinom und bei > 64 mg/l für Ceftiofur (Tab. 21, IMT 14404 – IMT 14446).

Die ersten 12 in Tab. 21 aufgeführten *E. coli*-Stämme (IMT 14388 – IMT 14403) wurden initial mit einem anderen Plattenlayout (halbkonzentrierte Verdünnungsreihen und Cefazolin anstelle von Cefotaxim) getestet (Tab. 16). Es wird jedoch auch hier ein wiederkehrendes MHK-Muster erkennbar. Tab. 21 zeigt zusätzlich für alle 40 *E. coli*-Stämme weitere Resistenzen auf.

Tab. 21 CTX-M-produzierende *E. coli*-Stämme: Zusammenfassende Ergebnisse der phänotypischen und genotypischen Charakterisierung CTX-M-produzierender *E. coli*-Stämme gegenüber Ceftiofur, Cefquinom und Cefotaxim

Stamm-Nr.	Probenherkunft	CTX-M ident.	TEM ident.	OXA ident.	MHK (mg/l)			Zusätzlich nachgewiesene Resistenzen
					XNL	CQN	CTX	
IMT 14388	Läufer, Enteritis	P		P	> 32	> 16	n.b.	TET, CEP, AMP, FAZ
IMT 14391	Huhn, Sepsis	P	P		> 32	> 16	n.b.	CHL, TET, SXT, CEP, GEN, AMP
IMT 14392	Kalb, Enteritis	P	P		> 32	> 16	n.b.	CHL, TET, SXT, CEP, GEN, AMP, FAZ
IMT 14393	Kalb, Enteritis	P	P		> 32	> 16	n.b.	TET, SXT, CEP, AMP, FAZ
IMT 14396	Ferkel, Enteritis	P	P		> 32	> 16	n.b.	CHL, SXT, CEP, AMP, FAZ
IMT 14397	Kuh, Mastitis	P		P	> 32	> 16	n.b.	CHL, TET, CEP, GEN, AMP, FAZ

4 Ergebnisse

Stamm-Nr.	Probenherkunft	CTX-M ident.	TEM ident.	OXA ident.	MHK (mg/l)			Zusätzlich nachgewiesene Resistenzen
					XNL	CQN	CTX	
IMT 14398	Huhn, Sepsis	P			> 32	> 16	n.b.	CEP, AMP, FAZ
IMT 14399	Kalb, Enteritis	P		P	> 32	> 16	n.b.	CHL, TET, SXT, CEP, GEN, AMP, FAZ
IMT 14400	Kalb, Enteritis	P	P		> 32	> 16	n.b.	CHL, TET, SXT, CEP, GEN, AMP, FAZ
IMT 14401	Ferkel, Enteritis	P			> 32	> 16	n.b.	CEP, GEN, AMP, FAZ
IMT 14402	Schwein, Colitis	P	P		> 32	> 16	n.b.	CHL, TET, SXT, CEP, AMP, FAZ
IMT 14403	Kalb, Pneumonie	P	P		> 32	> 16	n.b.	TET, SXT, CEP, AMP, FAZ
IMT 14404	Kuh, Mastitis	P	P		> 64	> 32	> 32	TET, CEP, AMP
IMT 14405	Ferkel, Enteritis	P			> 64	> 32	> 32	CHL, TET, CEP, GEN, AMP
IMT 14406	Kalb, Arthritis	P			> 64	> 32	> 32	TET, CEP, AMP
IMT 14407	Ferkel, Sepsis	P			> 64	> 32	> 32	CEP, AMP
IMT 14408	Kalb, Enteritis	P			> 64	> 32	> 32	CHL, TET, SXT, CEP, GEN, AMP
IMT 14409	Kalb, Enteritis	P	P		> 64	> 32	> 32	TET, SXT, CEP, GEN, AMP
IMT 14410	Kalb, Enteritis	P	P		> 64	> 32	> 32	TET, CEP, GEN, AMP
IMT 14413	Ferkel, Enteritis	P			> 64	> 32	> 32	TET, SXT, CEP, AMP
IMT 14414	Ferkel, Enteritis	P	P		> 64	> 32	> 32	TET, SXT, CEP, AMP
IMT 14415	Ferkel, Enteritis	P	P		> 64	> 32	> 32	SXT, CEP, AMP
IMT 14416	Ferkel, Enteritis	P	P		> 64	> 32	> 32	TET, CEP, GEN, AMP
IMT 14418	Kalb, Enteritis	P	P		> 64	> 32	> 32	TET, SXT, CEP, GEN, AMP

4 Ergebnisse

Stamm-Nr.	Probenherkunft	CTX-M ident.	TEM ident.	OXA ident.	MHK (mg/l)			Zusätzlich nachgewiesene Resistenzen
					XNL	CQN	CTX	
IMT 14419	Kalb, Enteritis	P	P		> 64	> 32	> 32	CHL, TET, SXT, CEP, AMP, AUG
IMT 14425	Kalb, Enteritis	P			> 64	> 32	> 32	CHL, TET, SXT, CEP, GEN, AMP
IMT 14426	Kalb, Enteritis	P		P	> 64	> 32	> 32	CHL, CEP, GEN, AMP, AUG
IMT 14427	Kalb, Enteritis	P	P		> 64	> 32	> 32	CHL, TET, SXT, CEP, GEN, AMP
IMT 14428	Kalb, Enteritis	P			> 64	> 32	> 32	CHL, TET, SXT, CEP, GEN, AMP
IMT 14430	Kuh, Mastitis	P	P		> 64	> 32	> 32	CHL, TET, SXT, CEP, AMP
IMT 14431	Kalb, Enteritis	P	P		> 64	> 32	> 32	CHL, TET, SXT, CEP, AMP
IMT 14435	Kalb, Enteritis	P	P		> 64	> 32	> 32	TET, SXT, CEP, AMP
IMT 14436	Ferkel, Serositis	P			> 64	> 32	> 32	TET, CEP, AMP
IMT 14437	Kuh, Mastitis	P	P		> 64	> 32	> 32	TET, SXT, CEP, AMP
IMT 14438	Kalb, Sepsis	P	P		> 64	> 32	> 32	CHL, TET, SXT, CEP, AMP
IMT 14441	Schwein, Enteritis	P	P		> 64	> 32	> 32	CHL, TET, CEP, AMP
IMT 14443	Broiler, Sepsis	P			> 64	> 32	> 32	TET, SXT, CEP, AMP
IMT 14444	Schwein, Enteritis	P	P		> 64	> 32	> 32	TET, SXT, CEP, AMP
IMT 14445	Kalb, Enteritis	P			> 64	> 32	> 32	TET, CEP, AMP
IMT 14446	Kuh, Sepsis	P			> 64	> 32	> 32	TET, CEP, AMP

P = positiv; n. b. = nicht bestimmt; CTX, Cefotaxim; CQN, Cefquinom; XNL, Ceftiofur; CHL, Chloramphenicol; TET, Tetrazyklin; SXT, Trimethoprim/Sulfamethoxazol; CEP, Cephalothin; GEN, Gentamicin; AMP, Ampicillin; AUG, Amoxicillin/Clavulansäure; FAZ, Cefazolin

4.1.2 Resistenzen gegenüber Nicht-Beta-Laktamantibiotika

Von den 40 genotypisch detektierten ESBL-produzierenden *E. coli*-Stämmen zeigten 85 % Resistenz gegenüber Tetrazyklin sowie 62,5 % gegenüber der Wirkstoffkombination Trimethoprim/Sulfamethoxazol. Knapp die Hälfte (47,5 %) der getesteten *E. coli* zeigten sich resistent gegenüber Chloramphenicol und 40 % gegenüber Gentamicin (Tabelle 22). Bei den oben genannten Antibiotika liegen veterinärspezifische klinische Grenzwerte gemäß CLSI vor. Für Enrofloxacin gibt das CLSI lediglich für Hühner und Puten einen klinischen Grenzwert vor. Von den insgesamt 40 ESBL-produzierenden *E. coli*-Stämmen wurden drei aus Hühnern isoliert. Von diesen drei Stämmen zeigte ein Stamm Resistenz gegenüber Enrofloxacin.

Bei den folgenden Antibiotika sind vom CLSI keine veterinärmedizinisch klinischen Grenzwerte festgelegt. Eine prozentuale Angabe der Resistenzrate ist somit nicht möglich. Aus diesem Grund wird zur Einschätzung der Resistenzsituation für diese Wirkstoffe die MHK_{90} angegeben. Die MHK_{90} gibt die Konzentration der Wirkstoffmenge in mg/l an, bei der 90 % der Stämme eines Untersuchungskollektivs kein Wachstum mehr zeigen.

Die MHK_{90} lag gegenüber Tiamulin bei 128 mg/l, gegenüber Spiramycin bei 256 mg/l, gegenüber Trimethoprim bei 256 mg/l, gegenüber Nalidixinsäure bei 256 mg/l, gegenüber Apramycin bei 128 mg/l, gegenüber Spectinomycin bei 1024 mg/l, gegenüber Florfenicol bei 256 mg/l sowie gegenüber Neomycin bei 128 mg/l (Tab. 22). Aufgrund der sehr hohen MHK_{90} -Werte kann davon ausgegangen werden, dass die hier aufgeführten Antibiotika in ihrer Wirksamkeit vermindert sind, da so hohe Konzentrationen im Zielgewebe in aller Regel nicht erreicht werden können.

4.1.3 Resistenzen gegenüber Beta-Laktamantibiotika

Bei Testung der Beta-Laktamantibiotika waren die 40 Stämme zu 100 % resistent gegenüber Ampicillin und Cephalothin. Lediglich 5 % der Stämme zeigten Resistenzen gegenüber der Wirkstoffkombination Amoxicillin/Clavulansäure (Tab. 22). Für die oben genannten Antibiotika liegen veterinärmedizinisch klinische Grenzwerte gemäß CLSI vor.

Bezüglich der folgenden Antibiotika sind vom CLSI keine veterinärspezifischen klinischen Grenzwerte festgelegt. Auch hier erfolgt die Einschätzung der Resistenzsituation anhand der MHK_{90} -Werte. Die MHK_{90} lag gegenüber Penicillin, Cefotaxim sowie Cefoperazon bei 64 mg/l, gegenüber Ceftiofur lag die MHK_{90} bei 128 mg/l. Cefotaxim hat keine Zulassung für die veterinärmedizinische Anwendung, wurde

4 Ergebnisse

jedoch hier in die Testung einbezogen, da es einer der Wirkstoffe ist, die vom CLSI zur Detektion von ESBL vorgegeben werden.

Wie in Kapitel 3.2.3.1 beschrieben, wurden 12 von 40 *E. coli*-Stämmen gegenüber Cefazolin anstelle von Cefotaxim getestet. Im Folgenden bezieht sich die Prozentangabe für Cefazolin daher auf jeweils die Summe der auf dem jeweiligen Plattenlayout getesteten Stämme. Vor diesem Hintergrund zeigten sich 91,7 % der getesteten *E. coli*-Stämme resistent gegenüber Cefazolin. Alle MHK_{90} -Werte der getesteten Beta-Laktamantibiotika sind deutlich erhöht. Daher kann auch hier von einer verminderten Wirksamkeit ausgegangen werden.

Tab. 22 Ergebnisse der MHK der ESBL produzierenden *E. coli* (n = 40)
 Weiße Felder: Spannweite der getesteten Antibiotika / Schwarze Bänder: Klinische Grenzwerte gemäß CLSI (2002). Rote Schrift: Wachstumshemmung gegenüber der höchsten getesteten Konzentration des Antibiotikums. In dieser Tabelle sind ausschließlich veterinär-spezifische Grenzwerte angegeben. Die nach CLSI intermediären Grenzwerte werden hier bei resistant erfasst.
 * Klinischer MHK-Grenzwert bei Hühner und Puten

Wirkstoff	0,008	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	MHK ₉₀	Prozent resistant
AMP															40					100,0
AUG								1		1	21	16	2							5,0
APR								3	20	8	1				8				128	
FAZ											1				11					91,7
FOP														40					64	
FOT														28					64	
CQN				1									11	29					64	
XNL							1							11	28			128		
CEP								1	4	4	14	2	1	1	11	28				100,0
CHL											1				1	10	7			47,5
COL						18	21				1								0,5	
DOX							1	4	2	6	14	10		3					32	
ENR *	4	9	3				1	2		8	22	2	14							33,3
FFN															1	3	4		256	
GEN				1	1	1	15	5	2			5	6	4		1				40,0
NAL							1	1	9	5				7	1	16			256	
NEO					1	3	3	12	5	4	1		3	5	4	2			128	
PEN														40					64	
SPE											9	4	8	5	3	3	2	6	1024	
SPI														1	11	28			256	
TET						1	1	3	1				1	13	15	4	1			85,0
TIA													1	3	36				128	
TMP					5	8	2									25			256	
SXT				3	3	4	3	2						25						62,5
TUL								3	7	11	14	5						32		

4 Ergebnisse

4.1.4 Agardiffusionstest

Zusätzlich zur orientierenden Prüfung zum Vorkommen von ESBL mittels MHK-Bestimmung (Kapitel 4.1.1) erfolgte der phänotypische Bestätigungstest aller 2.352 *E. coli*-Stämme mittels Agardiffusionstest [CLSI 2002] gegenüber Cefotaxim und Cefotaxim sowie deren Kombination mit Clavulansäure.

Die in der MHK gefundenen Stämme entsprachen den vom CLSI angegebenen Kriterien für einen positiven ESBL Bestätigungstest und wurden daraufhin genotypisch charakterisiert. Die folgende Abbildung zeigt exemplarisch die typische Vergrößerung des Hemmhofes um die Wirkstoffkombination Cefotaxim/Clavulansäure.

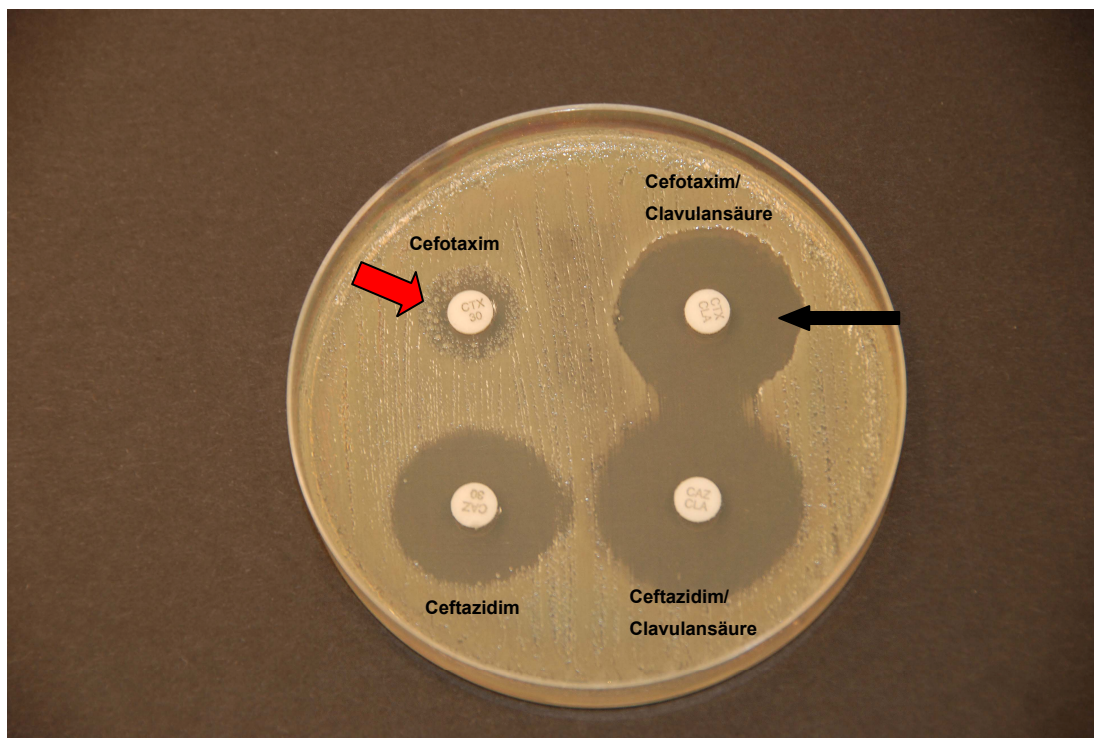


Abb. 5 *E. coli*-Stamm im Agardiffusionstest mit fehlendem Hemmhof (roter Pfeil) im Bereich des mit Cefotaxim beladenen Plättchens. Dahingegen ist der Hemmhof um das Plättchen mit der Wirkstoffkombination Cefotaxim/Clavulansäure deutlich ausgebildet (schwarzer Pfeil).

4.2 Genotypischer Nachweis sowie Charakterisierung des *bla*-Gens

4.2.1 Polymerase-Kettenreaktion

Alle 40 phänotypisch bestätigten ESBL-positiven *E. coli*-Stämme wurden in zwei Schritten (Kapitel 2.7.2.1) genotypisch charakterisiert. Im ersten Schritt erfolgte der Nachweis des *bla*-Gens. Im zweiten Schritt die Zuordnung der *bla*_{CTX-M}-Gene in Gruppen.

Als Ergebnis des ersten Identifikationsschrittes wiesen alle 40 Stämme *bla*_{CTX-M}-Gene auf. Zusätzlich wurden bei einigen Stämmen auch weitere ESBL detektiert. Bei 13 Stämmen konnte ausschließlich das *bla*_{CTX-M}-Gen nachgewiesen werden, 23 Stämme besaßen *bla*_{CTX-M} und zusätzlich *bla*_{TEM} und vier Stämme *bla*_{CTX-M} gemeinsam mit *bla*_{OXA}. Es konnten keine *bla*_{SHV}-Gene detektiert werden.

Im zweiten Schritt konnten die *bla*-Gene den einzelnen Gruppen zugeordnet werden. Die genotypischen Charakterisierungen ergaben, dass alle *bla*_{CTX-M}-Gene den CTX-M ESBL der Gruppe 1 zugeordnet werden konnten und die *bla*_{OXA}-Gene den OXA ESBL der Gruppe 1. Die TEM ESBL wurden nicht weitergehend charakterisiert. In diesem Fall war eine Einteilung in Gruppen nicht möglich. Die weitere genotypische Charakterisierung wäre lediglich über Sequenzanalyse der *bla*_{TEM}-Gene möglich gewesen und wurde in dieser Arbeit nicht weiter berücksichtigt.

4.2.2 Sequenzanalyse der *bla*-Gene

Mittels Sequenzanalyse war es möglich, die Punktmutationen der 40 CTX-M-produzierenden *E. coli* der Gruppe 1 zu identifizieren und damit eine Charakterisierung des CTX-M-Typs innerhalb der CTX-M-Gruppe 1 zu treffen. In dieser Gruppe besaßen 36 *E. coli*-Stämme das *bla*_{CTX-M-1}-Gen und 4 das *bla*_{CTX-M-15}-Gen.

4.2.3 Vorkommen von *bla*_{CTX-M}-Genen bei ESBL von einzelnen Tierarten und Infektionskrankheiten

Tab. 23 gibt eine Übersicht über die Herkunft der *bla*_{CTX-M}-Gene der jeweiligen ESBL-bildenden Stämme bezüglich der Tierarten sowie der Infektionskrankheiten, an denen die Tiere zum Zeitpunkt der Probennahme erkrankt waren.

Alle *bla*_{CTX-M-15}-Gene wurden bei ESBL-bildenden *E. coli* von Kälbern mit Enteritiden isoliert. *E. coli*-Isolate mit *bla*_{CTX-M-1}-Genen wurden sowohl beim Rind, beim Schwein als auch beim Geflügel detektiert. Insgesamt 22 von 36 *bla*_{CTX-M-1}-produzierenden *E. coli*-

4 Ergebnisse

Stämmen wurden von Rindern isoliert. Dabei handelt es sich in 15 Fällen um Kälber, davon 12 mit Enteritiden und bei 7 Fällen um Milchrinder, davon 6 mit akuter Mastitis. Weitere 11 Stämme mit *bla*_{CTX-M-1}-Genen wurden von Schweinen isoliert, davon 9 Stämme aus Enteritiden. Auch bei Geflügel-Stämmen (Junghenne, Legehenne einschließlich Küken) wurden *bla*_{CTX-M-1}-Gene gefunden; alle Tiere waren laut Vorbericht an einer Sepsis verstorben.

Tab. 23 Vorkommen von *bla*_{CTX-M}-Genen in *E. coli*-Stämmen in Abhängigkeit zur Herkunft der Stämme

Tierart	Infektionskrankheit	CTX-M Typ	IMT Nr.
Kalb	Enteritis	CTX-M 1	IMT 14392
Kalb	Enteritis	CTX-M 1	IMT 14393
Kalb	Enteritis	CTX-M 1	IMT 14408
Kalb	Enteritis	CTX-M 1	IMT 14410
Kalb	Enteritis	CTX-M 1	IMT 14418
Kalb	Enteritis	CTX-M 1	IMT 14425
Kalb	Enteritis	CTX-M 1	IMT 14426
Kalb	Enteritis	CTX-M 1	IMT 14427
Kalb	Enteritis	CTX-M 1	IMT 14428
Kalb	Enteritis	CTX-M 1	IMT 14431
Kalb	Enteritis	CTX-M 1	IMT 14435
Kalb	Enteritis	CTX-M 1	IMT 14445
Kalb	Enteritis	CTX-M 15	IMT 14399
Kalb	Enteritis	CTX-M 15	IMT 14400
Kalb	Enteritis	CTX-M 15	IMT 14409
Kalb	Enteritis	CTX-M 15	IMT 14419
Kalb	Pneumonie	CTX-M 1	IMT 14403
Kalb	Arthritis	CTX-M 1	IMT 14406
Kalb	Sepsis	CTX-M 1	IMT 14438
Milchrind	akute Mastitis	CTX-M 1	IMT 14397
Milchrind	akute Mastitis	CTX-M 1	IMT 14401
Milchrind	akute Mastitis	CTX-M 1	IMT 14404
Milchrind	akute Mastitis	CTX-M 1	IMT 14415
Milchrind	akute Mastitis	CTX-M 1	IMT 14430
Milchrind	akute Mastitis	CTX-M 1	IMT 14437
Milchrind	Sepsis	CTX-M 1	IMT 14446
Ferkel	Enteritis	CTX-M 1	IMT 14396
Ferkel	Enteritis	CTX-M 1	IMT 14405
Ferkel	Enteritis	CTX-M 1	IMT 14413
Ferkel	Enteritis	CTX-M 1	IMT 14414
Ferkel	Enteritis	CTX-M 1	IMT 14416
Ferkel	Sepsis	CTX-M 1	IMT 14407
Ferkel	(Poly)serositis	CTX-M 1	IMT 14436
Läufer	Enteritis	CTX-M 1	IMT 14388
Schwein	Enteritis	CTX-M 1	IMT 14402
Schwein	Enteritis	CTX-M 1	IMT 14441

Tierart	Infektionskrankheit	CTX-M Typ	IMT Nr.
Schwein	Enteritis	CTX-M 1	IMT 14444
Küken	Sepsis	CTX-M 1	IMT 14443
Junghenne	Sepsis	CTX-M 1	IMT 14391
Legehennen	Sepsis	CTX-M 1	IMT 14398

4.3 Untersuchungen zur genomischen Ähnlichkeit der ESBL-bildenden *E. coli*-Stämme

4.3.1 Pulsfeld-Gelelektrophorese

Die genomische DNA aller 40 *bla*_{CTX-M}-tragenden *E. coli*-Stämmen wurde mit der Restriktionsendonuklease *Xba*I verdaut und anschließend in der Contour-Clamped Homogeneous Electric Field – Pulsfeld-Gelelektrophorese untersucht. Abb. 6 zeigt exemplarisch ein Elektropherogramm von zwölf CTX-M-produzierenden *E. coli*.



Abb. 6 Elektropherogramm der CHEF-PFGE

Die Abbildung zeigt 12 der insgesamt 40 *Xba*I-verdauten *E. coli*-Stämme:
 Reihe 1, 8 und 15: Lambda Ladder PFGE Marker;
 Reihe 2: IMT 14388; Reihe 3: IMT 14391; Reihe 4: IMT 14392;
 Reihe 5: IMT 14393; Reihe 6: IMT 14394; Reihe 7: IMT 14395;
 Reihe 9: IMT 14396; Reihe 10: IMT 14397; Reihe 11: IMT 14398;
 Reihe 12: IMT 14399; Reihe 13: IMT 14402; Reihe 14: IMT 14403

4 Ergebnisse

Die Analyse der Verwandtschaft aller 40 *E. coli*-Stämme, basierend auf der Ähnlichkeit ihrer Restriktionsfragment-Längenprofile, wurde mit dem Computerprogramm BioNumerics (Version 4.6, Applied Maths) analysiert und in Form eines Dendrogramm dargestellt (Abb. 7).

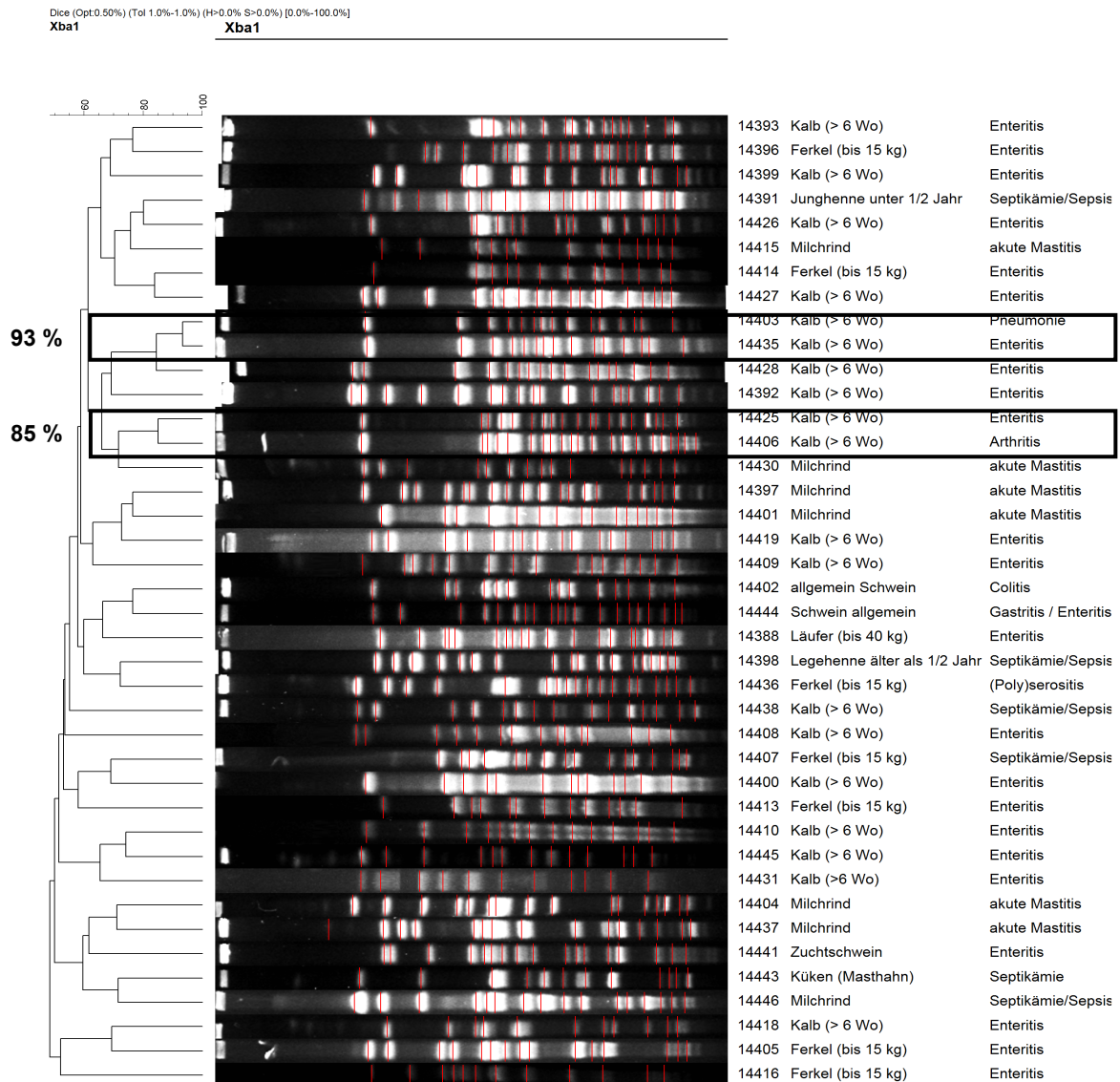


Abb. 7 Verwandtschaftsanalyse anhand der Restriktionsfragment-Längenprofile: Ähnlichkeiten des Genoms bei 40 ESBL-produzierenden *E. coli*-Stämmen nach Restriktion mit *Xba1*.

Nach der Restriktion mit *Xba1* zeigte sich mit 38 verschiedenen Pulsfeldmustern eine große genomische Diversität innerhalb der getesteten 40 *E. coli*-Stämme.

Vier *bla*_{CTX-M-1}-Stämme zeigten eine genomische Ähnlichkeit. IMT 14403 und IMT 14435 wiesen eine Ähnlichkeit von 93 %, IMT 14425 und IMT 14406 eine Ähnlichkeit

von 85 % auf. Alle vier *E. coli*-Stämme stammten von Kälbern, jedoch aus unterschiedlichen Krankheitsgeschehen. IMT 14403 stammte von einem Kalb mit Pneumonie, IMT 14435 von einem Kalb mit Enteritis. Die Krankheiten aus denen IMT 14425 sowie IMT 14406 isoliert wurden, waren Enteritis bzw. Arthritis.

Die vier *E. coli*-Stämme mit *bla*_{CTX-M-15}-Genen zeigten keine klonale Ähnlichkeit.

4.4 Prävalenz ESBL-produzierender *E. coli*-Stämme in der getesteten deutschen Nutztierpopulation

Aus insgesamt 2.352 untersuchten *E. coli*-Stämmen von drei verschiedenen Tierarten (Rinder, Schweine und Geflügel) konnten phänotypisch 40 ESBL-produzierende *E. coli* identifiziert werden. Insgesamt wurden *E. coli*-Stämme von 853 Rindern, 652 Schweinen und 847 Geflügel isoliert und untersucht.

Damit liegt die Prävalenz ESBL-produzierender *E. coli*-Stämme in der getesteten Population erkrankter Nutztiere im Studienjahr 2005/2006 bei 1,7 %.

Die Prävalenz der ESBL-produzierenden *E. coli* innerhalb der Tierarten lag beim Rind bei 3 %, beim Geflügel bei 0,3 % und beim Schwein bei 1,2 % (Abb. 8).

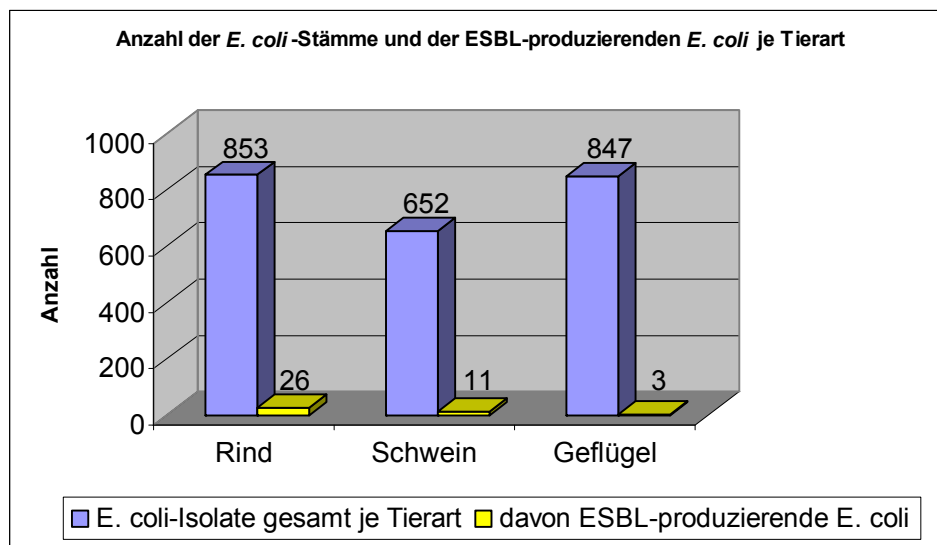


Abb. 8 Anzahl der *E. coli*-Stämme und der ESBL-produzierenden *E. coli*, aufgliedert nach Tierart

Wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben, konnten vier von insgesamt 40 *bla*_{CTX-M}-Gruppe-1 tragenden *E. coli*-Stämmen dem *bla*_{CTX-M-15}-Gen zugeordnet werden. Die 36 *bla*_{CTX-M-1}-Gen-tragenden Stämme verteilten sich auf alle Tierarten. Hierbei waren Rinder mit Enteritiden die größte Gruppe (n = 16), darauf folgten die Schweine mit Enteritiden (n = 9). An dritter Stelle folgten Rinder mit Mastitiden (n = 6), im Anschluss daran Ge-

4 Ergebnisse

flügel mit Sepsis (n = 3) sowie Rinder mit Sepsis (n = 2). Jeweils ein *bla*_{CTX-M-1}-Gen-tragender Stamm konnte von einem Schwein mit Sepsis, einem Rind mit Pneumonie sowie von einem Rind mit Arthritis und einem Schwein mit Polyserositis isoliert werden. Die folgende Tabelle zeigt sowohl die Anzahl der gefundenen *E. coli*-Stämme je Infektionskrankheit und Tierart als auch die Anzahl der ESBL-produzierenden *E. coli* bei den einzelnen Krankheiten und deren prozentualen Anteil auf. Das Alter der Tiere bleibt hierbei unberücksichtigt.

Tab. 24 Verteilung der *E. coli*-Stämme pro Indikation sowie Anteil ESBL-positiver *E. coli*

Tierart	Indikation	<i>E. coli</i> -Stämme je Krankheit	ESBL produzierende <i>E. coli</i> je Krankheit	
			Absolut	Relativ
Rind	Enteritis	288	16	5,5
	Mastitis	535	6	1,1
	andere	14	1	7,1
	Sepsis	2	2	100
	Pneumonie	5	1	20
	Erkrankungen des Urogenitaltraktes	9	0	0
Schwein	Enteritis	552	9	1,6
	Sepsis	34	1	2,9
	Erkrankungen des Geschlechtsapparates	37	0	0
	Pneumonie	19	0	0
	andere	10	1	10
Geflügel	Sepsis	399	3	0,75
	andere	236	0	0
	Dottersackentzündung	97	0	0
	Pneumonie	64	0	0
	Serositis	32	0	0
	Eileiterentzündung	19	0	0

Der Anteil ESBL-produzierender *E. coli*-Stämme aus Enteritiden beim Rind (5,5 %) lag deutlich höher als aus Mastitiden (1,1 %). Beim Geflügel konnten bei der Indikation „Sepsis“ 0,75 % ESBL-produzierende *E. coli* identifiziert werden. Septikämien beim Schwein (2,9 %), verursacht durch ESBL-produzierende *E. coli*, kamen häufiger vor als durch ESBL verursachte Enteritiden (1,6 %).

5 Diskussion

5.1 Durchführung der Prävalenzstudie

Das Ziel dieser Prävalenzstudie war es, erstmalig Daten zum Vorkommen Extended-Spektrum-Beta-Laktamase (ESBL)-produzierender *E. coli* akut erkrankter deutscher Nutztiere zu erheben.

Böttner et al (2000) empfehlen die Schaffung einer repräsentativen Datenlage, die es ermöglichen soll, den Ist-Zustand zu charakterisieren und mit der bereits geringe Verschiebungen in der Empfindlichkeits- bzw. Resistenzsituation sicher erfasst werden können. Um das Ergebnis unabhängig von Schwankungen durch endemische und epidemiologische Gegebenheiten sowie von individuellen Therapiegewohnheiten sicherzustellen, muss eine Studie überregional konzipiert sein [Böttner *et al.*, 2000]. Die Planung der hier vorliegenden Studie erfolgte daher nach den gleichen epidemiologischen Gesichtspunkten welche bereits als Grundlage der GERM-Vet Studie von Wallmann et al beschrieben wurden [Wallmann *et al.*, 2003].

Durch Einhaltung festgelegter Vorgaben wurden mögliche Fehlerquellen, welche die Qualität der Daten der Studie beeinträchtigen würden, weitestgehend ausgeschlossen. Wichtigster Parameter hierbei war die repräsentative Stichprobe aus der Grundgesamtheit von *E. coli*-Stämmen bei Tieren. Die Auswahl einer repräsentativen Stichprobe ist für die Studienplanung besonders bedeutsam, da die Festlegung der Probenauswahl die Basis der Studie darstellt. Da eine Vollerhebung oft nicht praktikabel ist, muss die Teilerhebung ein „verkleinertes Abbild“ (= repräsentative Stichprobe) der Gesamtsituation darstellen [Kreienbrock, 1989]. Berekoven et al (1999) empfehlen die Auswahl einer Teilgesamtheit so vorzunehmen, dass „aus dem Ergebnis der Teilerhebung möglichst exakt und sicher auf die Verhältnisse der Gesamtmasse geschlossen werden kann.“ Dies ist dann möglich „wenn die Teilerhebung in der Verteilung aller interessierenden Merkmale der Gesamtmasse entspricht, d. h. ein zwar verkleinertes, aber sonst wirklichkeitsgetreues Abbild der Gesamtheit darstellt“ [Berekoven *et al.*, 1999].

Die Probennahme in dieser Studie erfolgte ausschließlich passiv durch externe Kooperationspartner. Einsender waren private wie öffentliche Diagnostiklabore aus 13 Bundesländern. Die hohe Anzahl der eingesandten Stämme (n=2.352) sowie die räumliche Verteilung der isolierten Proben waren Voraussetzung für den repräsentativen

Charakter dieser Studie. Der Vorteil einer passiven Probenahme liegt zum einem in einem wenig zeitintensiven Arbeitsaufkommen, zum anderen in einer großen Kostenreduktion, verglichen mit einer aktiven Probennahme. Beide Faktoren sollten zur effizienten Planung von Überwachungsprogrammen berücksichtigt werden [Bywater, 2000]. Der Nachteil einer passiven Probennahme liegt in der mangelnden Selektionsmöglichkeit und Kontrollierbarkeit der Probennahme begründet. Probleme in der Repräsentativität können sich ergeben, wenn das Probenmaterial vorselektiert ist, aus Problembetrieben oder von vorbehandelten Tieren stammt [Altreuther *et al.*, 1997]. Um die Qualität der Proben zu sichern, veranstaltet das BVL jährlich ein Treffen mit den einsendenden Laboren. Auf diesen Treffen wird auf die Problematik der Repräsentativität regelmässig hingewiesen, um somit das Personal in den Laboren zu sensibilisieren. Zusätzlich wird im jährlichen Stichprobenplan darauf verwiesen, Vorselektionen zu vermeiden. Dies kann z. B. dadurch verhindert werden, indem unabhängig vom Betrieb, jede erste Probe des Tages weitergeleitet wird. Damit wäre eine Vorselektion ausgeschlossen. Ein festgelegtes Qualitätsmanagement, bei dem die Labore regelmässig vom BVL besucht werden, gibt es aus Kostengründen nicht.

Um eine Testung von Stämmen vorbehandelter Tiere und vorselektierten Probenmaterials zu vermeiden, wurden in dieser Studie ausschließlich Proben von akut erkrankten, nicht antibiotisch vorbehandelten Tieren angefordert. Das Risiko einer Testung von „Copy“-Stämmen wurde dahingehend reduziert, indem pro Tierherde maximal zwei Bakterienstämme einer Spezies zugelassen wurden, welche nicht vom gleichen Tier stammen durften und zeitlich unabhängig voneinander isoliert sein mußten. Dies wurde durch den Abgleich der Betriebskennnummern sichergestellt.

5.2 Methoden der phänotypischen Bestätigung

5.2.1 Bouillon-Mikrodilutionsverfahren

Zur phänotypischen Bestätigung von ESBL-produzierenden *E. coli* stehen zahlreiche Methoden zur Verfügung (Double-disk diffusion Test, E-Test, Three-dimensional Test, Dilutionstests etc.) [Bradford, 2001; Paterson und Bonomo, 2005]. Das Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) empfiehlt zur Detektion von ESBL sowohl die Bouillon-Mikrodilution als auch den Agardiffusionstest.

In dieser Arbeit wurde die Bouillon-Mikrodilution zur Empfindlichkeitsbestimmung der Bakterien sowie als orientierende Prüfung auf das Vorhandensein von ESBL ein-

gesetzt. Der Vorteil dieses standardisierten Verfahrens liegt in der hohen Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse [Bywater, 2000; Caprioli *et al.*, 2000]. Dies konnte durch die im Rahmen der Qualitätssicherung regelmäßig durchgeführten Ringversuche bestätigt werden. Die Ergebnisse zeigen, dass bei der Einhaltung der Durchführungsvorschriften des CLSI nicht nur innerhalb eines Laboratoriums, sondern auch zwischen unterschiedlichen Laboren eine gute Übereinstimmung der ermittelten Werte möglich ist.

Wie viele der ESBL-produzierenden *E. coli*-Stämme in der Diagnostik detektiert werden, hängt stark von den gewählten Grenzwerten ab. Konventionelle Grenzwerte können Bakterien sensibel gegenüber Cephalosporinen erscheinen lassen, obgleich sie ESBL-Produzenten sind [Paterson und Bonomo, 2005]. Problematisch ist hierbei der Gebrauch unterschiedlicher Grenzwerte in den einzelnen Ländern. Es kommt damit in Abhängigkeit vom jeweils verwendeten Standard zu einer Variation der Grenzwerte in den MHKs [Livermore und Hawkey, 2005]. In Europa werden unterschiedliche Systeme mit teilweise unterschiedlichen Grenzwerten zur Bestimmung der Antibiotikaempfindlichkeit von Bakterien verwendet. Problematisch wird insbesondere der direkte Vergleich der Daten [Baquero, 1990]. Ein weiteres Problem liegt in den fehlenden veterinärspezifischen Grenzwerten fast aller Überwachungssysteme. Das CLSI gibt derzeit weltweit als einziges Institut für standardisierte Laborverfahren tiermedizinische klinische Grenzwerte vor. Dies ist ein weiterer wesentlicher Vorteil in der Anwendung der CLSI-Kriterien in dieser Studie.

Die Bouillon-Mikrodilution diente in dieser Studie nicht ausschließlich zur Empfindlichkeitsüberprüfung, sondern auch als phänotypische Screeningmethode zur Detektion von ESBL. Anhand eines spezifischen MHK-Musters wurden Ergebnisse zum Vorkommen von CTX-M ESBL in den unterschiedlichen Populationen gewonnen. Schröder *et al.* (2007) belegten, dass CTX-M-produzierende *E. coli*-Stämme ein für sie „typisches MHK-Muster“ gegenüber vier getesteten Cephalosporinen aufweisen [Schröder *et al.*, 2007]. Die MHK-Werte der in dieser Studie untersuchten *E. coli*-Stämme lagen bei > 32 mg/l für Cefotaxim und Cefquinom und bei > 64 mg/l für Ceftiofur (Tab. 21, IMT 14404 – IMT 14446). Anhand des MHK-Musters konnten bereits in einer frühen Phase der ESBL-Detektion Rückschlüsse auf das Vorhandensein von CTX-M ESBL gezogen werden (Kapitel 2.7.1.1). Die Ergebnisse dieser Studie unterstützen die Aussage von Schröder *et al.* (2007).

5.2.2 Agardiffusionstest

Als phänotypischer Bestätigungstest wurde in dieser Studie der Agardiffusionstest gemäß den CLSI-Standards angewendet. Der Vergleich des CTX-M-typischen MHK-Musters aus der Bouillon-Mikrodilution mit den Ergebnissen aus dem Agardiffusionstest wies bei unseren Untersuchungen eine sehr gute Übereinstimmung (100 %) auf.

Im weiteren Verlauf der Studie konnten von den 40 im Agardiffusionstest als ESBL-positiv identifizierten *E. coli*-Stämmen alle genotypisch als *bla*-Gen-tragend charakterisiert werden. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass nicht alle 2.352 mit dem Agardiffusionstest getesteten *E. coli*-Stämme einer genotypischen Identifizierung unterzogen wurden und somit durchaus die Möglichkeit besteht, dass ESBL-Stämme im Agardiffusionstest als falsch negativ dargestellt wurden. Auch Resistenzausprägungen wie Inhibitor-resistente TEM (Punkt 2.3.1) sowie AmpC Beta-Laktamasen würden in diesem Test nicht positiv bewertet [Paterson und Bonomo, 2005].

Bei der Auswahl geeigneter Cephalosporine zur Detektion von ESBL muss berücksichtigt werden, dass die Bandbreite der Resistenzen bei den unterschiedlichen ESBL erheblich variieren kann. Sollen ESBL in ihrer gesamten Bandbreite detektiert werden, so wird der Einsatz von Ceftazidim und Cefotaxim vorgeschlagen [Livermore *et al.*, 2001]. In dieser Studie kamen im Agardiffusionstest gemäß den Vorgaben des CLSI die Wirkstoffe Ceftazidim und Cefotaxim isoliert sowie in Kombination mit Clavulansäure zur ESBL-Detektion zum Einsatz, um potentielle ESBL in ihrer gesamten Bandbreite detektieren zu können.

5.3 Klonale Verwandtschaftsanalyse

Von den 40 untersuchten *E. coli*-Stämmen zeigten 36 eine große genomische Diversität. Durch Einsatz der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) konnten 38 unterschiedliche Pulsfeldmuster ermittelt werden. Eine klonale Ähnlichkeit lag hier nicht vor (< 85 %). Die große genomische Diversität könnte als Hinweis auf eine unabhängige Entstehung der Stämme gesehen werden. Zwei Pulsfeldmustern konnten jeweils zwei der untersuchten Stämme zugewiesen werden (Ähnlichkeit 85 % bzw. 93 %). Um den epidemiologischen Hintergrund der Isolate genauer definieren zu können, wurden die geografischen Ursprungsorte und die Tierart, von der die *E. coli*-Stämme isoliert wurden, ermittelt. Die Stämme IMT 14425 und IMT 14406 wiesen eine Ähnlichkeit von 85 % auf. Beide Stämme stammten von Kälbern mit den Indikationen Enteritis bzw.

Arthritis. Die geografische Entfernung zwischen den Betrieben betrug 85 km. Die Stämme IMT 14403 und IMT 14435 wiesen eine Ähnlichkeit von 93 % auf. Auch hier stammten beide Stämme von Kälbern mit unterschiedlichen Krankheiten (Pneumonie bzw. Enteritis). Die räumliche Distanz lag in diesem Fall bei 60 km.

Da viele Landtierärzte, aber auch Viehhändler bzw. Viehtransporteure, große Distanzen zwischen den von ihnen betreuten Betrieben zurücklegen, ist nicht auszuschließen, dass es zu einem Übertrag ESBL-produzierender *E. coli*-Stämme zwischen den Betrieben gekommen sein kann. Weiterhin muss die Herkunft der Tiere beachtet werden. Es besteht die Möglichkeit, dass die Tiere aus gemeinsamen Ursprungsbetrieben stammen. Um diese Aussage zu festigen, wäre es notwendig zu analysieren, ob es zwischen den Betrieben mit den oben genannten verwandten *E. coli*-Stämmen eine solche Verbindung gibt. Oppegaard et al (2001) konnten einen horizontalen Transfer eines mehrfach resistenten *E. coli*-Stammes zwischen Tier und Tierarzt nachweisen. In der vorliegenden Studie gaben die Begleitbögen der eingesandten Bakterienisolate jedoch weder Auskunft über die betreuenden Tierärzte noch über die Ursprungsbetriebe der Tiere, insofern kann hier über einen möglichen Übertrag lediglich spekuliert werden.

Aber es muss generell bedacht werden, dass klonale Untersuchungen von *E. coli*-Stämmen aus verschiedenen Regionen mittels PFGE nur eine eingeschränkte Aussagekraft haben. Lediglich Elektropherogramme mit einer sehr hohen Ähnlichkeit (mindestens 90 %) dürfen als verwandt angesehen werden. Hingegen besteht aufgrund der enormen Diversität von *E. coli* die Möglichkeit, dass ähnliche PFGE-Muster unterschiedlichen Phylotypen angehören. Deshalb sollten in zukünftigen Untersuchungen zumindest Multilocus Sequenz Typisierung-Analysen (MLST) der Stämme vorgenommen werden.

Die vier *bla*_{CTX-M-15}-Gen-tragenden *E. coli*-Stämme wurden von Kälbern mit Enteritiden isoliert. Bemerkenswert ist, dass die räumliche Entfernung zwischen IMT 14400 und IMT 14419 lediglich 3,6 km betrug. In der PFGE lag die Ähnlichkeit der Bandenmuster jedoch unter 85 %, was auf die Verbreitung verschiedener CTX-M-15-produzierender Klone in diesem Gebiet hinweist. Lu et al (2009) konnten hingegen in nah benachbarten Farmen die Verbreitung eines bestimmten Klones nachweisen [Lu et al., 2009]. Die in der vorliegenden Studie nachgewiesene große genomische Diversität zwischen ESBL-produzierenden *E. coli*-Stämmen ist jedoch nicht ungewöhnlich und wurde bereits von zahlreichen anderen Forschergruppen beobachtet [Meunier et al., 2006; Brinas et al., 2005; Bonnedahl et al., 2009].

5 Diskussion

Dass *bla*_{CTX-M-15}-Gen-tragende *E. coli* in Tieren vorkommen, wurde auch in anderen Studien belegt. Grobbel et al (2009) konnten *bla*_{CTX-M-15}-Gen-tragende sowie *bla*_{CTX-M-1}-Gen-tragende *E. coli* in Hunden, Katzen sowie Pferden identifizieren [Grobbel et al., 2009]. Ewers et al (2010) detektierten mittels MLST den human pandemischen Klon B2-O25:H4-ST131 in insgesamt neun der *bla*_{CTX-M-15}-Gen-tragenden *E. coli*-Stämmen aus Hunden bzw. aus einem Pferd. Der Hauptteil der Stämme (5/9) stammte aus Deutschland. Ewers et al konnten belegen, dass ein Austausch multiresistenter *E. coli*-Stämme von Mensch zu Tier und umgekehrt möglich ist [Ewers et al., 2010]. In der Humanmedizin wurde dieser Klon bereits in verschiedensten Ländern nachgewiesen, weshalb man hier von einer pandemischen Verbreitung des *bla*_{CTX-M-15}-tragenden B2-O25:H4-ST131 spricht [Blanco et al., 2009; Nicolas-Chanoine et al., 2008; Clermont et al., 2008]. In der Veterinärmedizin wurde dieser Klon meines Wissens nur von Ewers et al und ein weiteres Mal bei einem Hund aus Portugal beschrieben [Pomba et al, 2009]. Hierbei muss aber bedacht werden, dass die Stämme, die in dieser Promotion charakterisiert wurden, bereits im Jahre 2005 bzw. 2006 isoliert worden waren, die Daten also älter sind als in den beiden oben zitierten Arbeiten. In der vorliegenden Studie wurde die MLST nicht eingesetzt. Es wäre jedoch aufschlußreich, ob die in dieser Studie detektierten *bla*_{CTX-M-15}-tragenden *E. coli*-Stämme dem beschriebenen Klon ST131 entsprechen, um so auch dessen Verbreitung in Nutztieren diskutieren zu können.

5.4 Vorkommen von *bla*_{CTX-M}-Genen bei einzelnen Tierarten und Krankheiten

Die Prävalenz der in dieser Studie untersuchten ESBL-produzierenden *E. coli* lag beim Rind mit 3 % deutlich höher als beim Geflügel mit 0,3 % und beim Schwein mit 1,2 %. ESBL-produzierende *E. coli*-Stämme wurden am häufigsten aus Rindern mit Enteritiden (16/288, 5,6 %) gefolgt von Mastitiden (6/535, 1,1 %) isoliert (Tab. 24).

Eine deutlich höhere Prävalenz (9 %) innerhalb der Tierart Rind konnten Locatelli et al (2009) nachweisen. Sie isolierten 2 *bla*_{CTX-M-1}-tragende *E. coli*-Stämme aus insgesamt 22 Proben von Rindern mit Mastitis. Im Vergleich zu unserer Studie ist die Prävalenz der oben genannten Studie jedoch kritisch zu betrachten, da alle Proben aus derselben Herde isoliert wurden und die Stichprobe damit keinen repräsentativen, sondern einen rein selektiven Charakter besitzt.

Es sollte berücksichtigt werden, dass bei der Isolierung von *E. coli*-Stämmen aus Enteritiden sowohl pathogene als auch nicht pathogene Stämme, also Kommensalen,

in die Untersuchung eingeflossen sein können, da bei der Probennahme beim kranken Tier nicht auszuschließen ist, dass Bakterien der autochthonen Microbiota isoliert wurden. Es kann daher keine sichere Aussage getroffen werden, ob die untersuchten Stämme klinisch relevante Bakterien waren oder Kommensalen. Dass neben pathogenen auch kommensale *E. coli bla*-Gene tragen können, ist aus europäischen und internationalen Studien [Brinas *et al*, 2003; Machado *et al*, 2008; Blanc *et al*, 2006; Shiraki *et al*, 2004] bekannt, in welchen *E. coli*-Stämme von gesunden Nutztieren untersucht wurden. Brinas *et al* (2003) konnten in 13 von 160 Stämmen *bla*-Gene nachweisen (8 %). Fünf der 13 *bla*-Gene konnten der Gruppe der CTX-M ESBL zugeordnet werden. Eine Unterscheidung zwischen pathogenen und kommensalen *E. coli* hätte durch Nachweis verschiedener Virulenzfaktoren getroffen werden können. Diese Analysen wurden jedoch aufgrund der geringen Anzahl von 40 ESBL-produzierenden Stämmen nicht durchgeführt.

Anders als bei den Rindern konnte beim Geflügel lediglich ein Anteil von 0,3 % ESBL-produzierender *E. coli* identifiziert werden, obgleich die Anzahl der untersuchten Stämme bei Rind (n=853) und Geflügel (n=847) vergleichbar waren. Die Erklärung liegt eventuell in der Tatsache begründet, dass es in Deutschland kein Cephalosporin auf dem Markt gibt, welches für die therapeutische Anwendung beim Geflügel zugelassen ist. Aufgrund dessen ist der Selektionsdruck auf *bla*-Gen-tragende *E. coli* kaum vorhanden. Obgleich Resistenzgene bereits vor dem klinischen Einsatz von Antibiotika in bestimmten Bakterienpopulationen nachgewiesen werden können, hat dieser durch den Selektionsdruck einen entscheidenden Einfluss auf die Resistenzentstehung und vor allem -anreicherung [Levy, 2002].

Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass die eingesandten Geflügelstämme dieser Studie ausschliesslich aus Niedersachsen von Privatlaboren stammten. Aufgrund der regionalen Begrenzung und der möglichen Vorselektion durch die Privatlabore ist die Stichprobe nicht aussagekräftig genug, um einen repräsentativen Überblick für Gesamtdeutschland zu geben. Ist beispielsweise das Vorkommen von ESBL-produzierenden *E. coli* in diesem Bundesland (Niedersachsen) nicht so präsent wie in anderen Bundesländern, dann spiegelt dies nicht die tatsächliche bundesweite Situation wieder.

Interessant sind hier die Ergebnisse einer Studie aus Belgien [Smet *et al.*, 2008], die einen deutlich höheren Anteil ESBL-produzierender *E. coli* von Geflügel beschreibt. In dieser Studie wurden insgesamt 489 kloakale Proben entnommen und anschließend phänotypisch und genotypisch untersucht. Im Ergebnis konnten in 133 von 489 Proben

5 Diskussion

(27 %) als ESBL-produzierende *E. coli* identifiziert werden. Smet et al (2008) vermuten, dass Koselektion aufgrund des Einsatzes Nicht-Beta-Laktamantibiotika für die hohe Prävalenz verantwortlich ist, da Resistenzgene gegen andere antibiotisch wirksame Substanzen auf dem gleichen genetischen Element wie das *bla*-Gen lokalisiert sein könnten. Zugelassene Cephalosporine für den therapeutischen Einsatz bei Geflügel, sind in Belgien, wie in Deutschland, nicht auf dem Markt. Zusätzlich ist zu bedenken, dass in der belgischen Studie die Proben ausschließlich aus einem Bestand isoliert wurden und damit die Stichprobe als nicht repräsentativ angesehen werden kann.

Generell muss berücksichtigt werden, dass nicht nur der Einsatz von Antibiotika zu Resistenzen bei Bakterien führt, sondern auch der Einsatz von Bioziden [Chapman, 1998]. Der am häufigsten beschriebene intrinsische Resistenzmechanismus von Bakterien in Anwesenheit von Bioziden ist die Permeabilitätsänderung in der Zellmembran, auch als Permeabilitäts-Barriere beschrieben [Cloete, 2003]. Diese Permeabilitäts-Barriere reduziert die Menge an Bioziden, die nun in der Lage sind in die Bakterienzelle einzudringen [Champlin et al., 2005]. Das Vorhandensein von Efflux-Pumpen ist ein weiterer Mechanismus, der häufig beobachtet wird. Efflux-Pumpen reduzieren die Konzentration von Bioziden in der Zelle [Levy, 2002]. Durch den steigenden Einsatz von Bioziden in der Tierhaltung ist davon auszugehen, dass die Anzahl von Resistenzen bei Bakterien gegenüber Bioziden steigt. Studien von Oethinger et al (1998) konnten beispielsweise eine Toleranz gegenüber Cyclohexan und Resistenzen gegenüber Fluorchinolonen in klinischen Isolaten von *E. coli* nachweisen [Oethinger et al., 1998]. Biozide kommen in der Tierhaltung nicht nur in Form von Desinfektionsmitteln zum Einsatz, sondern werden auch in der Fütterung von Nutztieren eingesetzt, mit dem Ziel, Leistungsminderungen durch Mikroorganismen entgegenzuwirken [SCENIHR, 2009]. In der Diskussion um Prävalenzzahlen bezüglich Resistenzen bei Bakterien sollten generell die Biozide unbedingt mit berücksichtigt werden.

5.5 Prävalenz der gesamten getesteten deutschen Nutztierpopulation

5.5.1 Vergleich veterinärmedizinischer Daten mit Daten aus anderen europäischen Ländern

Die Prävalenz ESBL-produzierender *E. coli*-Stämme in der getesteten deutschen Nutztierpopulation lag für das Studienjahr 2005/2006 bei 1,7 % (40/2352). Vergleichbare Daten aus Deutschland liegen derzeit nicht vor, in einigen anderen europäischen Ländern ist dies jedoch der Fall.

Um die Resistenzepidemiologie genauer zu untersuchen, haben mehrere europäische Mitgliedstaaten seit einigen Jahren Antibiotikaresistenzstudien implementiert. Einige konzentrieren sich ausschließlich auf humanmedizinische Daten, andere hingegen veröffentlichen auch Daten aus der Veterinärmedizin. Es muss insgesamt darauf hingewiesen werden, dass sich der Vergleich von Daten aus anderen europäischen Prävalenzstudien als schwierig gestaltet, da die Studienbedingungen in den meisten Fällen nicht übereinstimmen. Daher sollte ein direkter Vergleich der Daten untereinander, jedoch auch mit den Ergebnissen dieser Studie, unter Vorbehalt erfolgen.

In den nördlichen europäischen Ländern (Dänemark, Schweden, Norwegen) gibt es Resistenzstudien, die sich mit dem Einsatz von Antibiotika und dem Auftreten von Resistenzen in Erregern von Lebensmittel liefernden Tieren, Lebensmitteln und Menschen beschäftigen. Das "Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme" (DANMAP) wurde 1995 mit dem Ziel gestartet, den Verbrauch antimikrobieller Wirkstoffe bei Mensch und Tier, das Auftreten von Resistenzen in Bakterien von Lebensmittel liefernden Tieren und Menschen, die Assoziation zwischen dem antimikrobiellen Einsatz und auftretenden Resistenzen sowie Transmissionswege von Resistenzgenen darzulegen [<http://www.danmap.org/>]. Bakterienstämme aus Schlachthöfen sowie aus mikrobiologischen Diagnostiklaboren wurden für das dänische Resistenzmonitoring berücksichtigt. Untersucht wurden unter anderem *E. coli*-Stämme aus Enteritiden von Schweinen und Rindern sowie von Geflügel mit Septikämien. Andere Länder wie Schweden und Norwegen folgten mit ähnlichen Programmen [<http://www.sva.se/en/Startpage/Engelskmalgruppsnavigering/animalhealth/Antibiotic-Resistance/Monitoring-/SVARM-reports/>] und [<http://www.vetinst.no/nor/Forskning/Publikasjoner/Norm-Norm-Vet-rapporten>].

5 Diskussion

Schaut man sich die Daten des dänischen Programms aus dem Studienjahr 2005 an, kann festgestellt werden, dass die Anzahl ESBL-produzierender *E. coli* von Nutztieren und tierischen Lebensmitteln in Dänemark gering war. Im Studienjahr 2005 wurden insgesamt 369 *E. coli*-Stämme von Schweinen, Rindern und Geflügel untersucht. Von diesen konnten zwei ESBL-produzierende porcine *E. coli*-Stämme identifiziert werden. Beide besaßen das *bla*_{CTX-M-1}-Gen [Aarestrup *et al.*, 2006], welches auch in der vorliegenden Studie nachgewiesen werden konnte. Die Prävalenzrate der untersuchten ESBL-produzierenden *E. coli* in der DANMAP-Studie lag somit im Jahr 2005 bei 0,5 %.

Im Jahr 2006 wurden bereits 10 ESBL-produzierende *E. coli*-Stämme von erkrankten Schweinen und Rindern aus insgesamt 364 untersuchten *E. coli*-Stämmen detektiert. Dies entspricht einer Prävalenzrate von 2,7 %. Alle Stämme besaßen *bla*_{CTX-M}-Gene. Angaben zur Anzahl der isolierten Stämme innerhalb der beiden Tierarten wurden nicht gemacht. Hansen *et al.* (2006) beurteilten die Prävalenzrate für ESBL-produzierende *E. coli* 2006 als nach wie vor niedrig. Sie wiesen jedoch darauf hin, dass Studien in den Folgejahren notwendig seien, um das Vorkommen abschätzen zu können [DANMAP 2006, S. 69].

Auch Norwegen untersucht regelmäßig die Entwicklung von Antibiotikaresistenzen in Menschen und Tieren im NORM/NORM-VET Programm (Teil des Norwegian Government's Action Plan against Antimicrobial Resistance). Anders als in Dänemark werden hier *E. coli*-Stämme lediglich aus Fäkalproben von gesunden Tieren (Rind und Schaf) sowie aus Fleisch (Rind) auf ihre Antibiotikaresistenz beprobt. Diese Stämme dienen als Indikatorbakterien, welche ein Reservoir an Resistenzgenen besitzen können, die zwischen verschiedenen Bakterienspezies und auch zwischen Mensch und Tier transferiert werden können. Sie werden genutzt, um Auskunft über den Selektionsdruck diverser Antibiotika in verschiedenen Bakterienpopulationen zu bekommen.

Im Studienjahr 2005 konnten ESBL-produzierende *E. coli* ausschließlich aus humanmedizinischen Proben isoliert werden [NORM/NORM-VET 2005]. Anders im Studienjahr 2006. Hier wurde aus insgesamt 309 untersuchten *E. coli*-Stämmen ein ESBL-produzierender *E. coli*-Stamm (*bla*_{TEM-20}-Gen) von einem gesunden Broiler detektiert [NORM/NORM-VET 2006]. Dies entspricht einer Prävalenzrate von 0,3 %.

Das schwedische Antibiotikaresistenzmonitoring SVARM (Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring) konnte in den Studienjahren 2005 und 2006 keine ESBL-produzierenden *E. coli*-Stämme detektieren [SVARM 2005 und 2006].

Vergleicht man die Ergebnisse der Studienjahre aus Dänemark (Studienjahr 2005) und Norwegen (Studienjahr 2006) mit dem Ergebnis aus dieser Studie, so kann festgestellt werden, dass die Prävalenzraten ESBL-produzierender *E. coli* insgesamt in den oben genannten Ländern deutlich unterhalb derer von Deutschland liegt. Im Studienjahr 2006 liegt die Prävalenzrate innerhalb der dänischen Isolate (gesamt 2,7 %) jedoch oberhalb derer der deutschen (gesamt 1,7 %). Ein Vergleich innerhalb der Tierarten ist aufgrund fehlender Angaben nicht möglich.

In Frankreich wird seit 2001 im Rahmen der RESAPATH-Studie die Entwicklung der Antibiotikaresistenz von pathogenen Erregern aus Rindern, Schweinen und Geflügel untersucht.

Im Rahmen des RESAPATH-Netzwerkes wurden von März bis Oktober 2006 insgesamt 1264 Fäkalproben von Rindern gezogen und mit der Fragestellung der Prävalenzrate von ESBL untersucht. Davon stammten 657 Proben von kranken Rindern von Farmen und 607 Proben von gesunden Rindern aus dem Schlachthof. Die Prävalenzrate ESBL-produzierender *E. coli* bei kranken Rindern lag bei 2,6 %, die der gesunden Rinder sogar bei 4,1 % [Madec *et al*, 2008]. Vergleicht man die RESAPATH-Daten mit denen dieser Studie, so kann man feststellen, dass sich die Prävalenzraten innerhalb der Tierarten ähneln (diese Studie: Prävalenz bei erkrankten Rindern lag bei 3 %). In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu untersuchen, wie hoch die Prävalenzrate bei gesunden deutschen Rindern liegt.

In den Studienjahren 2000, 2003 und 2004 wurden ebenfalls im Rahmen des RESAPATH-Netzwerkes 9602 *E. coli*-Stämme von Geflügel, Rind und Schwein gesammelt und auf ESBL untersucht. Insgesamt konnte bei 8 Stämmen ESBL (8 Stämme mit *bla*_{CTX-M} sowie 5 mit zusätzlich *bla*_{TEM}) nachgewiesen werden. Zwei *E. coli*-Stämme wurden bei Hühnern mit Septikämien, drei von Schweinen, davon zwei Ferkel mit Septikämien und eine Sau mit Urogenitalerkrankung sowie drei von Rindern, davon zwei mit Urogenitalerkrankungen und eine Probe aus Faeces isoliert. Alle detektierten Stämme zeigten sich insbesondere gegenüber Ceftiofur resistent. Eine phylogenetische Ähnlichkeit lag bei keinem Stamm vor. Die Gesamtprävalenz von 0,08 % liegt deutlich unter den Ergebnissen der vorliegenden Studie (1,7 %) [Meunier *et al*, 2006].

5.5.2 Vergleich der Daten mit Daten aus humanmedizinischen Prävalenzstudien

Anders als in der Veterinärmedizin beschäftigt sich die Humanmedizin schon seit Jahren unter anderem mit der Überwachung ESBL-produzierender Bakterien.

In Deutschland führt die Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. (PEG) seit 1998 Resistenzstudien durch und stellt die Resistenzsituation bei humanen klinisch wichtigen Infektionserregern gegenüber ausgewählten Antibiotika in Deutschland und im mitteleuropäischen Raum dar. An den regelmäßigen Datenerhebungen sind jeweils 20 bis 30 ausgewählte über Deutschland, Österreich und der Schweiz verteilte Laboratorien beteiligt. Die Mehrheit der Zentren befindet sich an Krankenhäusern der Maximalversorgung. In den Laboratorien werden die Bakterienisolate aus Infektionsmaterial konsekutiv gesammelt und unter Verwendung einer einheitlichen und standardisierten Methodik identifiziert und auf ihre Empfindlichkeit gegenüber ausgewählten Antibiotika geprüft. Die PEG legt in ihren Berichten regelmäßig das Vorkommen von Bakterienstämmen mit dem ESBL-Phänotyp unter anderem bei *E. coli* dar. So konnte aufgezeigt werden, dass die Prävalenz von ESBL-produzierenden *E. coli* im Jahr 1998 bei 0,3 % lag und im Jahr 2007 bis auf 10,3 % angestiegen ist. Im Studienjahr 2004 lag die Prävalenz ESBL-produzierender *E. coli* bei 5,1 % [http://www.p-e-g.org/ag_resistenz/main.htm].

Verglichen mit den Daten der PEG-Studie liegt die Prävalenzrate aus der getesteten Nutztierpopulation in Deutschland (1,7 % in 2005/2006) deutlich unter derjenigen der Humanmedizin. Dies ist insofern interessant, da der Verbrauch an Beta-Laktamantibiotika in der Tiermedizin deutlich über dem in der Humanmedizin liegt. Auf Basis einer „defined daily doses“ (DDD) = 1 g betrug der Verbrauch von Beta-Laktamen in der Humanmedizin nach Schätzung von GERMAP 2008 ca. 140 t pro Jahr. Diese Menge ist geringer als der Verbrauch in der Tiermedizin, welcher bei knapp 200 t im Jahr 2005 lag.

Vergleicht man den oben aufgeführten Antibiotikaverbrauch von Beta-Laktamen in der Veterinärmedizin mit dem in der Humanmedizin, stellt man fest, dass trotz des geringeren Gesamteinsatzes von Beta-Laktamantibiotika eine deutlich höhere Prävalenz ESBL-produzierender *E. coli* in der Humanmedizin vorliegt. Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass ein direkter Vergleich der Verbrauchsmenge an Beta-Laktamantibiotika zwischen Veterinär- und Humanmedizin sich insgesamt als schwierig gestaltet.

Ein Grund ist, dass die Daten über den Antibiotikaverbrauch im ambulanten Bereich in der Humanmedizin für den GERMAP-Bericht 2008 im Wesentlichen auf den Untersuchungen des Wissenschaftlichen Instituts der Krankenkasse AOK (WIdO) beruhen [GERMAP 2008]. Das WIdO sammelt Daten zum Antibiotikaverbrauch aus den Erhebungen des Arzneimittelindex der gesetzlichen Krankenversicherungen [de With *et al.*, 2004]. Anders als in der Humanmedizin gab es in der Veterinärmedizin für die GERMAP-Studie weniger verlässliche Angaben zum Verbrauch von Beta-Laktamantibiotika. Schätzungen der Verbrauchsmengen der Veterinärantibiotika übernahm für GERMAP 2008 das Veterinärpanel der Gesellschaft für Konsumforschung (GfK) in Nürnberg. Die Angaben des Veterinärpanels basieren auf einer Stichprobenuntersuchung des Einkaufsverhaltens der niedergelassenen Tierärzte. Die Stichprobe versuchte, möglichst repräsentativ die bezogenen Tierarzneimittelmengen zu erfassen und rechnete diese dann auf die Grundgesamtheit der niedergelassenen Tierärzte hoch. In der Verbrauchsmengenschätzung von 2005 wurde von einem Fehler von 10–20 % ausgegangen [GERMAP 2008]. Gleichzeitig kann keinerlei Aussage über die Anzahl, die Art der behandelten Tiere, die behandelten Erkrankungen oder die eingesetzte Dosierung getroffen werden.

Es ist demnach derzeit nicht möglich, eine umfassende Kenntnis über die exakte Menge an eingesetzten Antibiotika in der Veterinärmedizin zu erlangen. Es können auch keine Aussagen darüber getroffen werden, welches Antibiotikum für welche Indikation eingesetzt wird. Alle Angaben beruhen im Wesentlichen auf Schätzungen des Veterinärpanels. Anders in der Humanmedizin, wo sich anhand des Arzneimittelindex der Krankenkassen ein genauere Verbrauch an bestimmten Antibiotika bei bestimmten Indikationen ermitteln lässt. Auf dieser Grundlage sollte ein Vergleich der Prävalenz ESBL-produzierender *E. coli* in Human- und Veterinärmedizin kritisch gesehen werden. Beim Vergleich dieser Daten muss jedoch immer bedacht werden, dass aus den reinen Mengenangaben keine Rückschlüsse auf den Verbrauch pro Einzeltier geschlossen werden kann. Daraus ergibt sich eine Vielzahl ungeklärter Fragen, die eine seriöse Bewertung des Antibiotikaeinsatzes in der Tiermedizin derzeit nicht erlaubt. Hier sind dringend weitergehende epidemiologische Studien auf Ebene einzelner repräsentativer landwirtschaftlicher Betriebe bzw. Tierarztpraxen von Nöten.

Weitere Prävalenzdaten ESBL-produzierender *E. coli* in deutschen Krankenhäusern werden vom Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System (KISS) zur Verfügung gestellt. Das Nationale Referenzzentrum für die Surveillance von nosokomialen

5 Diskussion

Infektionen sammelt, bewertet und vergleicht Daten nosokomialer Infektionen aus teilnehmenden Krankenhäusern und stellt diese Daten zur Verfügung. In den Modulen ITS-KISS (Intensivstation) und DEVICE-KISS (Nicht-Intensivstationen) werden Daten nosokomialer Infektionen aus den Indikationen primäre Sepsis, Harnwegsinfektionen sowie Pneumonie und Bronchitis gesammelt. In den oben genannten Modulen werden auch ESBL-produzierende *E. coli* berücksichtigt.

Im Studienjahr 2005 nahmen 169 Stationen am ITS-KISS-Modul teil. Es wurden insgesamt 77.305 Patienten erfasst. Davon konnten 70 Patienten mit einer durch ESBL-produzierende *E. coli* verursachten Infektion ermittelt werden. Dies entspricht einer Prävalenzrate von 0,09 %.

Im Studienjahr 2006 wurden 205 Stationen, 171.377 Personen und 213 Infektionen, verursacht durch ESBL-produzierende *E. coli*, erfasst. Dies entspricht einer Prävalenz von 0,1 %.

Im Rahmen des DEVICE-KISS-Moduls nahmen im Studienjahr 2005 29 Stationen mit insgesamt 14.442 Patienten teil. Es konnten 4 durch ESBL-produzierende *E. coli* verursachte Infektionen ermittelt werden. Die Prävalenzrate beträgt für dieses Studienjahr 0,02 %. Im Studienjahr 2006 lag sie bei 0,06 % (18 Infektionen auf 26.270 Patienten in 29 Stationen) [<http://www.nrz-hygiene.de/>].

Leider stehen auch solche Daten in der Tiermedizin nicht zur Verfügung, obwohl nosokomiale Infektionen an Häufigkeit zunehmen [Ruscher *et al.*, 2009]. Hier ist ein Umdenken zukünftig zwingend erforderlich.

Insgesamt kann aufgezeigt werden, dass die Prävalenzraten beider Studienmodule einem Aufwärtstrend unterliegen. Dies wurde auch im Rahmen der oben aufgeführten PEG-Studie belegt. Ein direkter Vergleich der Ergebnisse dieser Studie mit denen der KISS-Studie ist jedoch nur unter Vorbehalt sinnvoll, da keine Beschreibungen zur mikrobiologischen und molekularbiologischen Erfassung, inklusive verwendeter Grenzwerte, ESBL-produzierender *E. coli* vorliegen. Paterson und Bonomo (2005) konnten jedoch aufzeigen, dass zur Bewertung der Prävalenz ESBL-produzierender *E. coli* gleiche Grenzwerte notwendig sind [Paterson und Bonomo, 2005].

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass ein direkter Vergleich von Prävalenzen ESBL-produzierender *E. coli* in Human- und Veterinärmedizin insgesamt nicht sinnvoll erscheint, man aber einen gemeinsamen Trend ausmachen kann. In beiden medizinischen Gebieten ist aufgrund der steigenden Zahlen detekierter *E. coli*, welche ESBL produzieren, eine fortlaufende Überwachung sinnvoll und zwingend notwendig.

6 Zusammenfassung

Extended-Spectrum-Beta-Laktamase (ESBL)-produzierende *E. coli* stellen ein ernstzunehmendes weltweites Problem in der Human- wie Tiermedizin dar. ESBL limitieren die Wirksamkeit und Einsatzmöglichkeiten vorhandener Beta-Laktamantibiotika; eine wirkungsvolle Therapie kann deshalb unter Umständen nicht gewährleistet werden. Die rasche weltweite Verbreitung ESBL-produzierender *E. coli* erfordert ein kontinuierliches Monitoring.

Ziel dieser Arbeit war die phänotypische Detektion und genotypische Charakterisierung von ESBL-produzierenden *E. coli*-Stämmen in einem Kollektiv aus Stämmen unterschiedlicher bakterieller Infektionskrankheiten von Nutztieren (Rind, Schwein und Geflügel), um repräsentative Daten über die Häufigkeit und die Gruppenzugehörigkeit von ESBL in der deutschen Nutztierpopulation zu gewinnen. Aus diesem Grund wurden insgesamt 2.352 *E. coli*-Stämme untersucht.

Mittels Agardiffusionstest wurden ESBL-produzierende *E. coli* nach Vorgaben des CLSI phänotypisch bestätigt. Die Bouillon-Mikrodilution wurde sowohl zur allgemeinen Resistenzbestimmung sowie als Screening zur Detektion von CTX-M-Produzenten eingesetzt.

ESBL-produzierende *E. coli* wurden anschliessend mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Sequenzanalyse genotypisch charakterisiert und durch Einsatz der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) auf eine mögliche genomische Ähnlichkeit hin untersucht.

Unsere Studie konnte erstmals belegen, dass ESBL-produzierende *E. coli*-Stämme auch in deutschen Nutztierpopulationen vertreten sind. Die Prävalenz in der getesteten Nutztierpopulation lag im Studienjahr 2005/2006 bei 1,7 %. Sie war damit deutlich niedriger als die in der Humanmedizin (5,1 % im Jahr 2004 gemäß PEG).

Die Prävalenz ESBL-produzierender *E. coli* innerhalb der untersuchten Tierarten betrug 3 % für Rinder, 1,2 % für Schweine und 0,3 % für Geflügel.

Innerhalb der Tierarten wurden alle Altersstufen berücksichtigt.

ESBL-Produzenten (n=40) wurden bei Rindern größtenteils in den Indikationen Enteritis (16/26) und Mastitis (6/26), bei Schweinen in der Indikation Enteritis (9/11) und beim Geflügel mit Septikämien (3/3) gefunden.

6 Zusammenfassung

Alle 40 detektierten ESBL-produzierenden *E. coli* trugen bla_{CTX-M}-Gene. Davon konnten 36 bla_{CTX-M-1} Gene und 4 bla_{CTX-M-15} Gene identifiziert werden. bla_{CTX-M-15} Gene waren ausschliesslich bei Kälbern mit Enteritiden vertreten. bla_{CTX-M-1} Gene wurden hingegen bei allen drei Tierarten detektiert. Die PFGE wies mit 38 verschiedenen Pulsfeldmustern eine große genomische Diversität zwischen den getesteten 40 *E. coli*-Stämmen auf.

Eine große genomische Ähnlichkeit lag bei vier bla_{CTX-M-1}-tragenden Stämmen vor. Zwei Stämme wiesen eine Ähnlichkeit von 93 % und zwei weitere Stämme wiesen eine Ähnlichkeit von 85 % auf.

Im Vergleich zu humanmedizinischen Daten war die für einen Vergleich zur Verfügung stehende Datenlage in der Veterinärmedizin insgesamt als nicht ausreichend einzuordnen. Daten aus Deutschland lagen zu Beginn der Studie nicht vor. Daher konnte zu diesem Zeitpunkt auch keine Aussage getroffen werden, ob und wenn ja, in welcher Häufigkeit ESBL-produzierende *E. coli* in der deutschen Nutztierpopulation vorkommen. Aufgrund des erweiterten Resistenzspektrums gegenüber Beta-Laktamantibiotika, der damit einhergehenden Wahl einer geeigneten antimikrobiellen Therapie und dem zoonotischen Potenzial dieser Bakterien werden repräsentative Daten zur Einschätzung der Situation in Deutschland dringend benötigt.

Humanmedizinische Studien konnten in den letzten Jahren einen kontinuierlichen Anstieg ESBL-produzierender *E. coli* aufzeigen. Aufgrund dessen wird eine regelmäßige Beobachtung der Entwicklung der Daten aus der Veterinärmedizin dringend angeraten, um zukünftig valide Aussagen bezüglich der veterinärmedizinischen Prävalenzrate und ihres möglichen Anstiegs treffen zu können.

Die Daten dieser Arbeit geben eine erste Auskunft über die Prävalenz sowie den genotypischen Charakter ESBL-produzierender *E. coli* in den getesteten deutschen Nutztierpopulationen und bieten eine Grundlage für zwingend erforderliche weitere Monitoringstudien – sowohl in der Nutztierhaltung als auch im Bereich der Hobbytiere. Insbesondere im letztgenannten Bereich sollte eine Surveillance nosokomialer Infektionen in Erwägung gezogen werden.

7 Summary

Appearance and molecular characterization of „Extended-Spectrum-Beta-Lactamase“ (ESBL)-producing *Escherichia coli* in food-producing animals

Extended-Spectrum-Beta-Lactamase (ESBL)-producing *E. coli* are becoming a serious problem worldwide not only in human but also in veterinary medicine. This is due to the fact that ESBLs limit the effect of existing Beta-Lactam antibiotics, and, as a consequence, their possible application. Hence, effective therapy cannot necessarily be guaranteed.

It is of imminent importance that worldwide spreading of ESBL-producing *E. coli* continuously be monitored.

The provided research was aimed at phenotypical detection and genotypical characterization of ESBL-producing *E. coli* strains in a collective of various bacterial infectious diseases of food-delivering animals (cattle, pigs and poultry) in order to find representative data regarding frequency and group affiliation of ESBLs in the German food-delivering animal population. For this purpose, a total of 2352 *E. coli* strains were examined.

By applying a disc diffusion test, the existence of ESBL-producing *E. coli* was confirmed according to CLSI standards. Broth microdilution was applied in order to determine general resistance and was also applied as a measure of screening in order to detect CTX-M-producers. Subsequently, ESBL-producing *E. coli* were genotypically characterized by use of polymerase chain reaction (PCR) and sequence analysis. They were also examined by employing pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in order to determine possible genomic similarity.

The results of this study provided proof for the first time that ESBL-producing *E. coli* strains are in existence in the German food-delivering animal population. A prevalence of 1,7 % in the tested population was determined in the years 2005/2006, which was clearly much lower than in human medicine (5,1 % in the year 2004 according to PEG).

Among the tested species ESBL-producing *E. coli* were prevalent with 3 % in cattle, 1,2 % in pork and 0,3 % in poultry. Within each animal species all ages were ex-

7 Summary

amined. ESBL-producing *E. coli* (n=40) were mostly found with the indications enteritis (16/26) and mastitis (6/26) in cattle, with the indication enteritis in pigs and with septicaemia in poultry.

All 40 detected ESBL-producing *E. coli* were carriers of *bla*_{CTX-M}-genes. Among these, 36 *bla*_{CTX-M-1} and 4 *bla*_{CTX-M-15}-genes were identified. *bla*_{CTX-M-15}-genes were only present in calves with enteritis, however, *bla*_{CTX-M-1}-genes were found in all three animal species.

PFGE showed 38 different pulsed-field patterns which proves a large genomic diversity among the 40 investigated strains.

A high genomic similarity was found in four *bla*_{CTX-M-1} carrying strains. Two strains had a similarity of 93 % and two further strains a similarity of 85 %.

The existing data for veterinary medicine is not sufficient for a comparison between veterinary and human medicine. At the beginning of this study no data was available from Germany. Therefore, no statement could be made concerning the existence and frequency of ESBL-producing *E. coli* in the German food-producing animal population. Due to the enlarged spectrum of resistance against beta-lactamantibiotics and, as a result, the choice of a suitable antimicrobial therapy as well as the zoonotic potential of this type of bacteria, it is urgently recommended to collect representative data in order to evaluate the situation in Germany.

A continuous rise of ESBL-producing *E. coli* in human medicine was documented within the last years. Therefore, it is imperative to closely observe the development of this phenomenon in veterinary medicine in order to make valid statements regarding prevalence in veterinary medicine and its possible rise.

The data provided in this study can be viewed as initial information regarding prevalence as well as genotypical character of ESBL-producing *E. coli* in the tested food-delivering animal population in Germany. It also offers a basis for urgently necessary monitoring studies - within food-producing animal populations as well as for domestic animals. Especially with regard to domestic animals a surveillance of nosocomial infections should be taken into consideration.

8 Verwendete Literatur

Aarestrup, F. M., Hasman, H., Agerso, Y., Jensen, L. B., Harksen, S., Svensmark, B. (2006)

First description of blaCTX-M-1-carrying *Escherichia coli* isolates in Danish primary food production

JAC Advance access published online on April 5, 2006

Altreuther, P., Böttner, A., Scheer, M., Schmid, P., Traeder, W., Weiskopf, S. (1997)

Anmerkungen zum Resistenzmonitoring in der Tiergesundheit

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 110: 418-421

Ambler, R. P. (1980)

The structure of beta-lactamases

Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 289 (1036): 321-31

Amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant β -lactamases

Lahey Clinic; [<http://www.lahey.org/Studies/>]

Asensio, A., Oliver, A., Gonzalez-Diego, P., Baquero, F., Perez-Diaz, P., Ros, J., Cobo, J., Palacios, M., Lasheras, D., Canton, R. (2000)

Outbreak of a multiresistant *Klebsiella pneumoniae* strain in an intensive care unit: antibiotic use as risk factor for colonization and infection

Clin. Infect. Dis., 30: 55-60

Authier, S., Paquette, D., Labrecque, O., Messier, S. (2006)

Comparison of susceptibility to antimicrobials of bacteria isolates from companion animals in a veterinary diagnostic laboratory in Canada between 2 time points 10 years apart

Can. Vet. J., 47: 774-778

Baquero, F. (1990)

European standards for antibiotic susceptibility testing: towards a theoretical consensus

Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 9 (7): 492-495

Barthelemy, M., Peduzzi, J., Bernard, H., Tancrede, C., Labia, R. (1992)

Close amino acid sequence relationship between the new plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase MEN-1 and chromosomally encoded enzymes of *Klebsiella oxytoca*

Biochem. Biophys. Acta., 1122 (1): 15-22

Bartkus, J. M., Juni, B. A., Ehresmann, K., Miller, C. A., Sanden, G. N., Cassidy, P. K., Saubolle, M., Lee, B., Long, J., Harrison, A. R. Jr., Besser, J. M. (2003)

Identification of a mutation associated with erythromycin resistance in *Bordetella pertussis*: implications for surveillance of antimicrobial resistance

J. Clin. Microbio., 41: 1167-72.

8 Verwendete Literatur

Bauernfeind, A., Grimm, H., Schweighart, S. (1990)

A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*
Infection, 18 (5): 294-8

Bauernfeind, A., Casellas, J. M., Goldberg, M., Holley, M., Jungwirth, R., Mangold, P., Rohnisch, T., Schweighart, S., Wilhelm, R. (1992)

A new plasmidic cefotaximase from patients infected with *Salmonella typhimurium*
Infection, 20 (3): 158-63

Ben-Ami, R., Schwaber, M. J., Navon-Venezia, S., Schwartz, D., Giladi, M., Chmel-nitsky, I., Leavitt, A., Carmeli, Y. (2006)

Influx of extended-spectrum β -lactamase-producing enterobacteriaceae into the hospital
Clin. Infect. Dis., 42: 925-934

Bennett, P. M. (1995)

The spread of drug resistance

In: Baumberg, S., Young, J. P. W., Wellington, E. M. H., Saunders, J. R. (Hrsg.)
Population genetics of bacteria; Symposium 52 of the Society for General Microbiology,
Cambridge University Press, Cambridge, UK

Bennett, P. M. (1999)

Integrans and gene cassetts: a genetic construction kit for bacteria
J. Antimicrob. Chemother., 43: 1-4

Berekoven, L., Eckert, W., Ellenrieder, P. (1999)

Marktforschung: Methodische Grundlagen und praktische Anwendung
8. Auflage, Wiesbaden

Bert, F., Branger, C., Lambert-Zechovsky, N. (2002)

Identification of PSE and OXA β -lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using
PCR-restriction fragment length polymorphism
J. Antimicrob. Chemother., 50: 11-18

Bertrand, S., Weill, F.-X., Cloeckart, A., Vrints, M., Mairiaux, E., Praud, K., Dierick, K., Wildemaue, C., Godard, C., Butaye, P., Imberechts, H., Grimont, P. A. D., Collard, J.-M. (2006)

Clonal Emergence of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase (CTX-M-2)-producing *Salmonella enterica* Serovar Virchow Isolates with Reduced Susceptibilities to Ciprofloxacin among Poultry and Humans in Belgium and France (2000 to 2003)
J. Clin. Microbiol., 44 (8): 2897-2903

Blanc, V., Mesa, R., Saco, M., Lavilla, S., Prats, G., Miró, E., Navarro, F., Cortés, P., Llagostera, M. (2006)

ESBL- and plasmidic class C β -lactamase-producing *E. coli* strains isolated from poultry, pig and rabbit farms
Vet. Microbiol., 118: 299-304

Blanco, M., Alonso, M. P., Nicolas-Chanoine, M. H., Dahbi, G., Mora, A., Blanco, J. E., López, C., Cortés, P., Llagostera, M., Leflon-Guibout, V., Puentes, B., Mamani, R., Herrera, A., Coira, M. A., García-Garrote, F., Pita, J. M., Blanco, J. (2009)

Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing extended-spectrum {beta}-lactamases in Lugo (Spain): dissemination of clone O25b:H4-ST131 producing CTX-M-15

J. Antimicro. Chemother., 63: 1135-1141

Böttner, A., Pirro, F., Schmid, P., Traeder, W., Weiskopf, S., Weiß, H., Zschiesche, E. (2000)

Leitfaden zur Planung von Studien zur Erfassung der Resistenzsituation bei veterinärmedizinisch relevanten Infektionserregern

Berliner und Münchner Tierärztliche Wochenschau, 113: 299-305

Bonnedahl, J., Drobni, M., Gauthier-Clerc, M., Hernandez, J., Granholm, S., Kayser, Y., Melhus, A., Kahlmeter, G., Waldenström, J., Johansson, A., Olsen, B. (2009)

Dissemination of *Escherichia coli* with CTX-M type ESBL between humans and yellow-legged gulls in the south of France

PLoS ONE 4 (6) e:5958

Bonnet, R. (2004)

Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes

Antimicrob. Agents Chemother., 48 (1): 1-14

Bonomo, R. A., Rudin, S. A., Shlaes, D. M. (1997)

Tazobactam is a potent inactivator of selected inhibitor-resistant class A beta-lactamases

FEMS Microbiol. Lett., 148 (1): 59-62

Boyd, D. A., Tyler, S., Christianson, S., McGeer, A., Muller, M. P., Willey, B. M., Bryce, E., Gardam, M., Nordmann, P., Mulvey, M. R. (2004)

Complete nucleotide sequence of a 92-kilobase plasmid harboring the CTX-M-15 extended-spectrum β -lactamase involved in an outbreak in long-term-care facilities in Toronto, Canada

Antimicrob. Agents Chemother., 48: 3758-3764

Bradford, P. A. (2001)

Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat

Clin. Microbiol. Rev., 14 (4): 933-51

Brigante, G., Luzzaro, F., Perilli, M., Lombardi, G., Coli, A., Rossolini, G. M., Amicosante, G., Toniolo, A. (2005)

Evolution of CTX-M-type beta-lactamases in isolates of *Escherichia coli* infecting hospital and community patients

Int. J. Antimicrob. Agents, 25: 157-162

8 Verwendete Literatur

- Brinas, L., Zarazaga, M., Sáenz, Y., Ruiz-Larrera, F., Torres, C. (2002)**
β-lactamases in Ampicillin-resistant *Escherichia coli* isolates from food, humans and healthy animals
Antimicrob. Agents Chemother., 46 (10): 3156-3163
- Brinas, L., Moreno, M. A., Zarazaga, M., Porrero, M. C., Sáenz, Y., Garcia, M., Dominguez, L., Torres, C. (2003)**
Detection of CMY-2, CTX-M-14, and SHV-12 β-lactamases in *Escherichia coli* fecal-sample isolates from healthy chickens
Antimicrob. Agents Chemother., 47: 2056-2058
- Brinas, L., Moreno, M. A., Teshager, T., Sáenz, Y., Porrero, M. C., Dominguez, L., Torres, C. (2005)**
Monitoring and characterization of extended-spectrum β-lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy and sick animals in Spain in 2003
Antimicrob. Agents Chemother., 49 (3): 1262-1264
- Bush, K., Singer, S. B. (1989)**
Biochemical characteristics of extended broad spectrum beta-lactamases
Infection, 17 (6): 429-33
- Bush, K., Jacoby, G. A., Medeiros, A. A. (1995)**
A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure
Antimicrob. Agents Chemother., 39 (6): 1211-33
- Bush, K. (2001)**
New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy
Clin. Infect. Dis., 32 (7): 1085-9
- Bywater, R. J. (2000)**
Sense and nonsense in surveillance programs
Acta vet. Scand., Suppl. 93: 119-127
- Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance (CIPARS) 2006**
[<http://www.phac-aspc.gc.ca/cipars-picra/2006-eng.php>]
- Cantón, R., Coque, T. M. (2006)**
The CTX-M β-lactamase pandemic
Current Opinion in Microbiology, 9: 466-475
- Cao, V., Lambert, T., Nhu, D. Q., Loan, H. K., Hoang, N. K., Arlet, G., Courvalin, P. (2002)**
Distribution of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of Enterobacteriaceae in Vietnam
Antimicrob. Agents Chemother., 46 (12): 3739-43

Caprioli, A., Busani, L., Martel, J. L., Helmuth, R. (2000)

Monitoring of antibiotic resistance in bacteria of animal origin: epidemiological and microbiological methodologies
Int. J. Antimicrob. Agents, 14 (4): 295-301

Carattoli, A., Lovari, S., Franco, A., Cordaro, G., Di Matteo, P., Battisti, A. (2005)

Extenden-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Rome, Italy from 2001 to 2003
Antimicrob. Agents Chemother., 49 (2): 833-835

Carattoli, A., (2008)

Animal reservoirs for extended spectrum β -lactamase producers
Clin. Microbiol. Infect., 14 (1): 3-10

Carrico, J. A., Pinto, F. R., Simas, C., Nunes, S., Sousa, N. G., Frazao, N., de Lencastre, H. Almeida, J. S. (2005)

Assessment of Band-Based Similarity Coefficients for Automatic Type and Subtype Classification of Microbial Isolates Analyzed by Pulsed-Field Gel Electrophoresis
J. Clin. Microbiol., 43 (11): 5483–5490

Chaibi, E. B., Sirot, D., Paul, G., Labia, R. (1999)

Inhibitor-resistant TEM beta-lactamases: phenotypic, genetic and biochemical characteristics
J. Antimicrob. Chemother., 43 (4): 447-58

Champlin, F. R., Ellison, M. L., Bullard, J. W., Conrad, R. S. (2005)

Effect of outer membrane permeabilisation on intrinsic resistance to low triclosan levels in *Pseudomonas aeruginosa*
Int J Antimicrob Agents, 2005; (26):159-64

Chapman, J. S. (1998)

Characterizing bacterial resistance to preservatives and disinfectants
Int Biodet Biodeg, 1998; (41): 241-5

Charrel, R. N., Pages, J.-M., Micco de, P., Mallea, M. (1996)

Prevalence of outer membrane porin alterations in β -lactam-antibiotic-resistant *Enterobacter aerogenes*
Antimicrob. Agents Chemother., 40: 2854-2858

Cloete, T. E. (2003)

Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds
Int Biodet Biodegrad, 2003; (51):277-82

Clermont, O., Lavollay, M., Vimont, S., Deschamps, C., Forestier, C., Branger, C., Denamur, E., Arlet, G. (2008)

The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* diffusing clone belongs to a highly virulent B2 phylogenetic subgroup
J. Antimicrob. Chemother., 61: 1024-1028

8 Verwendete Literatur

CloECKaert A, Baucheron S, Flaujac G, Schwarz S, Kehrenberg C, Martel JL, Chaslus-Dancla E. (2000)

Plasmid mediated florfenicol resistance encoded by the *floR* gene in *Escherichia coli* isolated from cattle

Antimicrob. Agents Chemother., 44: 2858-60

Collis, C. M., Hall, R. M. (1995)

Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons

Antimicrob. Agents Chemother., 39: 155-62

Colodner, R., Rock, W., Chazan, B., Keller, N., Guy, N., Sakran, W., Raz, R. (2004)

Risk factors for the development of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in nonhospitalized patients

Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 23: 163-167

Coque, T. M., Oliver, A., Pérez-Díaz, J. C., Baquero, F., Cantón, R. (2002)

Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum β -lactamases are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000)

Antimicrob. Agents Chemother., 46 (2): 500-510

Coque, T. M., Baquero, F., Canton, R. (2008)

Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe

Eurosurveillance 13 (47): 1-11

Cornaglia, G., Garau, J., Livermore, D. M. (2008)

Living with ESBLs. Introduction

Clin. Microbiol. Infect., 14 Suppl 1: 1-2

Danel, F., Hall, L. M., Gur, D., Livermore, D. M. (1995)

OXA-14, another extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*

Antimicrob. Agents Chemother., 39 (8): 1881-4

Danel, F., Hall, L. M., Duke, B., Gur, D., Livermore, D. M. (1999)

OXA-17, a further extended-spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase, isolated from *Pseudomonas aeruginosa*

Antimicrob. Agents Chemother., 43 (6): 1362-6

Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme (DANMAP)

[<http://www.danmap.org>]

Datta, N., Kontomichalou, P. (1965)

Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae

Nature, 208 (5007): 239-41

Decousser, J. W., Poirel, L., Nordmann, P. (2001)

Characterization of a chromosomally encoded extended-spectrum class A beta-lactamase from *Kluyvera cryocrescens*
Antimicrob. Agents Chemother., 45 (12): 3595-8

de With, K., Schröder, H., Meyer, E., Nink, K., Hoffmann, S., Steib-Bauert, M., Kämmerer, R., Rueß, S., Daschner, F. D., Kern, W. V. (2004)

Antibiotikaaanwendung in Deutschland im europäischen Vergleich
Dtsch. Med. Wochenschr., 129: 1987-1992

Du, B., Yong, Y., Liu, H., Chen, D., Liu, D., Xu, Y., Xie, X. (2002)

Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection : risk factors, and clinical outcome
Intensive Care Med., 28: 1718-1723

Emery, C. L., Weymouth, L. A. (1997)

Detection and clinical significance of extended-spectrum β -lactamases in a tertiary-care medical centre
J. Clin. Microbiol., 35: 2061-2067

Eveillard, M., Schmit, J. L., Eb, F. (2002)

Antimicrobial use prior to the acquisition of multiresistent bacteria
Infect. Control Hosp. Epidemiol., 23: 155-158

Ewers, C., Grobbel, M., Stamm, Y., Kopp, P. A., Diehl, I., Semmler, T., Fruth, A., Beutlich, J., Guerra, B., Wieler, L. H., Guenther, S. (2010)

Emergence of human pandemic O25:H4-ST131 CTX-M-15 ESBL producing *Escherichia coli* among companion animals
J. Antimicrob. Chemother., 12, 2010, Epub ahead of print

Frey, H.-H., Löscher, W. (2001)

Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin
2., völlig neu bearbeitete Auflage
Enke Verlag

Georgeopapadakou, N. H. (1993)

Penicillin-binding proteins and bacterial resistance to β -lactams
Antimicrob. Agents Chemother., 37: 2045-2053

GERMAP 2008

Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland
1. Auflage, Oktober 2008

Giguère, S., Prescott, J. F., Baggot, J. D., Walker, R. D., Dowling, P. M. (2006)

Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine
Fourth Edition
Blackwell Publishing Ltd, UK

8 Verwendete Literatur

Girlich, D., Naas, T., Leelaporn, A., Poirel, L., Fennewald, M., Nordmann, P. (2002)
Nosocomial spread of the integron-located *veb-1*-like cassette encoding an extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* in Thailand
Clin. Infect. Dis., 34 (5): 603-11

Girlich, D., Poirel, L., Carattoli, A., Kempf, I., Lartigue, M.-F., Bertini, A., Nordmann, P. (2007)
Extended spectrum β -lactamase CTX-M-1 in *Escherichia coli* isolates from healthy poultry in France
Applied and Environmental Microbiology, 73 (14): 4681-4685

Grimm, V., Ezaki, S., Susa, M., Knabbe, C., Schmid, R. D., Bachmann, T. T. (2004)
Use of DNA microarrays for rapid genotyping of TEM beta-lactamases that confer resistance
Journal of Clinical Microbiology, 42 (8): 3766-3774

Grobbe, M., Guenther, S., Stamm, I., Kopp, P., Fruth, A., Beutlich, J., Guerra, B., Wieler, L. H. und Ewers, C. (2009)
Extended spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* in animals: Do we have to face new emerging multiresistant clones?
Poster, 61. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) e.V.
International Journal of Medical Microbiology

Hall, L. M., Livermore, D. M., Gur, D., Akova, M., Akalin, H. E. (1993)
OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*
Antimicrob. Agents Chemother., 37 (8): 1637-44

Hall, R. M., Collis, C. M. (1995)
Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination
Mol. Microbiol., 15:593-600

Health Protection Agency
[<http://www.hpa.org.uk/27.05.2009>]

Heisig, P. (2006)
Wirkungs- und Resistenzmechanismen der β -Lactam-Antibiotika
Pharm. Unserer Zeit, (35): 400-408

Hernandez, J. R., Martinez-Martinez, L., Canón, R., Coque, T. M. (2005)
Spanish group for nosocomial infections (GEIH): Nationwide study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases in Spain
Antimicrob. Agents Chemother., 49: 2122-2125

Ho, P. L., Chan, W. M., Tsang, K. W., Wong, S. S., Young, K. (2002)
Bacteremia caused by *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamase: a case-control study of risk factors and outcomes
Scand. J. Infect. Dis., 34: 567-573

Hof, H., Dörries, R., Müller, R. L. (2000)

Medizinische Mikrobiologie
Duale Reihe, Thieme Verlag

Hope, R., Potz, N. A. C., Warner, M., Fagan, E. J., Arnold, E., Livermore, D. M. (2007)

Efficacy of practised screening methods for detection of cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae
J. Antimicrob. Chemother., 59: 110-113

Hopkins, J. M., Towner, K. J. (1990)

Enhanced resistance to cefotaxime and imipenem associated with outer membrane protein alterations in *Enterobacter aerogenes*
J. Antimicrob. Chemother., 25: 49-55

Jacoby, G. A., Medeiros, A. A. (1991)

More extended-spectrum beta-lactamases
Antimicrob. Agents Chemother., 35 (9): 1697-704

Johnson, J. M., Weagant, S. D., Jinneman, K. C., Bryant, J. L. (1995)

Use of pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological study of *Escherichia coli* O157:H7 during a food-borne outbreak
Appl. Environ. Microbiol., 61 (7): 2806-2808

Kehrenberg, C. (2000)

Molekulare Grundlagen der Tetracyclinresistenz von Isolaten der Genera Pasteurella und Mannheimia: Identifizierung neuartiger Plasmide und Transposons
Ph.D.-These, Tierärztliche Hochschule Hannover

Kliebe, C., Nies, B. A., Meyer, J. F., Tolxdorff-Neutzling, R. M., Wiedemann, B. (1985)

Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins
Antimicrob. Agents Chemother., 28 (2): 302-7

Knothe, H., Shah, P., Krcmery, V., Antal, M., Mitsuhashi, S. (1983)

Transferable resistance to cefotaxime, ceftiofur, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*
Infection, 11 (6): 315-7

Knox, J. R. (1995)

Extended-spectrum and inhibitor-resistant TEM-type beta-lactamases: mutations, specificity, and three-dimensional structure
Antimicrob. Agents Chemother., 39 (12): 2593-601

Kreienbrock, L. (1989)

Einführung in die Stichprobenverfahren
Oldenbourg-Verlag, München

8 Verwendete Literatur

Lautenbach, E., Patel, J. B., Bilker, W. B., Edelstein, P. H., Fishman, N. O. (2001)
Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes
Clin. Infect. Dis., 32: 1162-1171

Lavollay, M., Mamlouk, K., Frank, T., Akpabie, A., Burghoffer, B., Ben Redjeb, S., Bercion, R., Gautier, V., Arlet, G. (2006)
Clonal dissemination of a CTX-M-15 β -lactamase-producing *Escherichia coli* strain in the Paris area, Tunis, and Bangui
Antimicrob. Agents Chemother., 50: 2433-2438

Leclercq, R., Courvalin, P. (1991)
Bacterial resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramin antibiotics by target modification
Antimicrob. Agents Chemother., 35: 1267-1272

Levy, S. B. (2002)
Factors impacting on the problem of antibiotic resistance
J. Antimicrob. Chemother., 49 (1): 25-30

Levy, S. B. (2002)
Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance
J Appl Microbiol, 2002; 92 (Suppl):65-71

Li, X.-Z., Mehrotra, M., Ghimire, S., Adewoye, L. (2007)
 β -lactam resistance and β -lactamases in bacteria of animal origin
Vet. Microbiol., 121: 197-214

Livermore, D. M. (1995)
Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance
Clin. Microbiol. Rev., 8 (4): 557-84

Livermore, D. M., Yuan, M. (1996)
Antibiotic resistance and production of extended-spectrum beta-lactamases amongst *Klebsiella* spp. from intensive care units in Europe
J. Antimicrob. Chemother., 38 (3): 409-24

Livermore, D. M., Brown, D. F. (2001)
Detection of beta-lactamase-mediated resistance.
J. Antimicrob. Chemother., 48 (1): 59-64.

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

Livermore, D. M., Canton, R., Gniadkowski, M., Nordmann, P., Rossolini, G. M., Arlet, G., Ayala, J., Coque, T. M., Kern-Zdanowicz, I., Luzzaro, F., Poirel, L., Woodford, N. (2007)

CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe
J. Antimicrob. Chemother., 59 (2): 165-74

Livermore, D. M. (2008)

Defining an extended-spectrum beta-lactamase
Clin. Microbiol. Infect., 14 Suppl 1: 3-10

Locatelli, C., Caronte, I., Scaccabarozzi, L., Migliavacca, R., Pagani, L., Moroni, P. (2009)

Extended-spectrum β -lactamase in *E. coli* strains isolated from clinical bovine mastitis
Ves. Res. Commun., 33 (1): 141-144

Löscher, W., Ungemach, F. R., Kroker, R. (2002)

Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren
5., neubearbeitete Auflage
Parey Buchverlag

Lu, L., Dai, L., Wang, Y., Wu, C., Chen, X., Li, L., Qi, Y., Xia, L., Shen, J. (2009)

Characterization of antimicrobial resistance and integrons among *Escherichia coli* isolated from animal farms in Eastern China
Acta Tropica, 113: 20-25

Luhof, G., Böttner, A., Hafez, H. M., Kaske, M., Kehrenberg, C., Kietzmann, M., Klarmann, D., Klein, G., Krabisch, P., Kühn, T., Richter, A., Traeder, W., Waldmann, K.-H., Wallmann, J., Werckenthin, C., Schwarz, S. (2004)

Layoutvorschläge der Arbeitsgruppe "Antibiotikaresistenz" für die Belegung von Mikrotiterplatten zur Empfindlichkeitsprüfung von Bakterien gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen in der Routinediagnostik: Mastitis und Großtierlayouts
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., 117: 245-251

Machado, E., Coque, T. M., Cantón, R., Sousa, J. C., Peixe, L. (2008)

Antibiotic resistance integrons and extended-spectrum β -lactamases among *Enterobacteriaceae* isolates recovered from chickens and swine in Portugal
J. Antimicrob. Chemother., pp: 1-7

MacKenzie, F. M., Forbes, K. J., Dorai-John, T., Amyes, S. G., Gould, I. M., (1997)

Emergence of a carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*
Lancet, 350 (9080): 783

Madec, J.-Y., Matin, S., Lepage, G., Rambaud, P. L. T. (2008)

Prevalence of fecal carriage of acquired extended-spectrum cephalosporin resistance in *Enterobacteriaceae* strains from cattle in France
J. Clin. Microbiol., 46 (4): 1566-1567

8 Verwendete Literatur

Martinez-Martinez, L., Hernandez-Alles, S., Alberti, S., Tomas, J. M., Benedi, V. J., Jacoby, G. A. (1996)

In vivo selection of porin-deficient mutants of *Klebsiella pneumoniae* with increased resistance to cefoxitin and expanded-spectrum-cephalosporins
Antimicrob. Agents Chemother., 40 (2): 342-8

Maniatis, T., Sambrook, J., Fritsch, E. F. (1989)

Molecular cloning: a laboratory manual
2nd ed., Cold Spring Harbor (N.Y.) Laboratory Press

Matsumoto, Y., Ikeda, F., Kamimura, T., Yokota, Y., Mine, Y. (1988)

Novel plasmid-mediated beta-lactamase from *Escherichia coli* that inactivates oxyimino-cephalosporins
Antimicrob. Agents Chemother., 32 (8): 1243-6

Mc Dermott, P. F., Walker, R. D., White, D. G. (2003)

Antimicrobials: Modes of Action and Mechanisms of Resistance
International Journal of Toxicology, 22 (2): 135-143

Medeiros, A. A. (1984)

Beta-lactamases
Br. Med. Bull., 40 (1): 18-27

Meunier, D., Jouy, E., Lazizzera, C., Kobisch, M., Madec, J.-Y. (2006)

CTX-M-1 and CTX-M-15-type β -lactamases in clinical *Escherichia coli* isolates recovered from food-producing animals in France
J. Antimicrob. Agents 28: 402-407

Meyer, K. S., Urban, C., Eagan, J. A., Berger, B. J., Rahal, J. J. (1993)

Nosocomial outbreak of *Klebsiella* infection resistant to late-generation cephalosporins
Ann. Intern. Med., 119: 353-58

Mirelis, B., Navarro, F., Miro, E., Mesa, R. J., Coll, P., Prats, G. (2003)

Community transmission of extended-spectrum beta-lactamase
Emerg. Infect. Dis., 9: 1024-1025

Moland, E. S., Sanders, C. C., Thomson, K. S. (1998)

Can results obtained with commercially available MicroScan microdilution panels serve as an indicator of β -lactamase producing among *Escherichia coli* and *Klebsiella* isolates with hidden resistance to extended-spectrum cephalosporins and aztreonam?
J. Clin. Microbiol., 36: 2575-2579

Munday, C. J., Whitehead, G. M., Todd, N. J., Campbell, M., Hawkey, P. M. (2004)

Predominance and genetic diversity of community- and hospital-acquired CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in York, UK
J. Antimicrob. Chemother., 54: 628-633

Naas, T., Oxacelay, C., Nordmann, P. (2007)

Identification of CTX-M-type extended-spectrum- β -lactamase genes using real-time PCR and pyrosequencing
Antimicrob. Agents Chemother., 51 (1): 223-230

National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS) 2004

[<http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/NewsEvents/CVMUpdates/ucm047922.htm>]

National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS)

[<http://www.cdc.gov/NARMS/>]

National Committee for Clinical Laboratory Standards (2002)

Durchführungsvorschriften für antimikrobielle Empfindlichkeitsprüfungen mittels Agardiffusions- und Dilutionstests von Bakterien tierischer Herkunft; Empfohlener Standard – zweite Ausgabe
NCCLS Dokument M31-A2, Vol. 22, No. 6

National Committee for Clinical Laboratory Standards (2002)

Durchführungsvorschriften für antimikrobielle Empfindlichkeitsprüfungen mittels Agardiffusions- und Dilutionstests von Bakterien tierischer Herkunft; Nachrichtliche Ergänzung
NCCLS Dokument M31-S1, Vol. 24, No. 17

Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen

Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System (KISS)
[<http://www.nrz-hygiene.de/index1.htm>]

Neu, H. C. (1989)

Overview of mechanisms of bacterial resistance
Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 12: 109-116

Nicolas-Chanoine, M. H., Blanco, J., Leflon-Guibout, V., Demarty, R., Alonso, M. P., Canica, M. M., Park, Y. J., Lavigne, J. P., Pitout, J., Johnson, J. R. (2008)

Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15
J. Antimicrob. Chemother., 61: 273-281

Norwegian Government's Action Plan against Antimicrobial Resistance (NORM/NORM-VET)

[<http://www.vetinst.no/eng/Research/Publications/Norm-Norm-Vet-Report>]

Ochman, H., Lawrence, J. G., Groisman, E. A. (2000)

Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation
Nature, 405 (6784): 299-304

Oethinger, M, Kern, W. V., Goldman, J. D., Levy, S. B. (1998)

Association of organic solvent tolerance and fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli*
Mol Microbiol, 1998; (16):45-55

8 Verwendete Literatur

Olowe, A. O., Grobbel, M., Büchter, B., Lübke-Becker, A., Fruth, A., Wieler, L. H. (2009)

Detection of *bla*_{CTX-M-15} extended-spectrum β -lactamase genes in *Escherichia coli* from hospital patients in Nigeria

Int. J. Antimicrob. Agents, 35 (2010): 206-207

Oppegaard, H., Steinum, T. M., Wasteson, Y. (2001)

Horizontal transfer of a multi-drug resistance plasmid between coliform bacteria of human and bovine origin in a farm environment

Applied and Environmental Microbiology, 67 (8): 3732-3734

Pai, H., Choi, E. H., Lee, H. J., Hong, J. Y., Jacoby, G. A. (2001)

Identification of CTX-M-14 extended-spectrum beta-lactamase in clinical isolates of *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, and *Klebsiella pneumoniae* in Korea

J. Clin. Microbiol., 39(10): 3747-3749

Paterson, D. L., Bonomo, R. A. (2005)

Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update

Clin. Microbiol. Rev., 18 (4): 657-86

Paulsen, I. T., Brown, M. H., Skurray, R. A. (1996)

Proton-dependent multidrug efflux systems

Microbiol. Rev. 60: 575-608

Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e. V.

[http://www.p-e-g.org/ag_resistenz/main.htm]

Pena, C., Pujol, M., Ricart, A., Ardanuy, C., Ayats, J., Linares, J., Garrigosa, J., Ariza, J., Gudiol, F. (1997)

Risk factors for faecal carriage of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamase (ESBL-KP) in the intensive care unit

J. Hosp. Infect., 35: 9-16

Perez, F., Endimiani, A., Hujer, K., Bonomo, R. A. (2007)

The continuing challenge of ESBLs

Current Opinion in Pharmacology, 7: 459-469

Pfeifer, Y. und Witte, W. (2007)

ESBL und AmpC: Beta-Laktamasen als eine Hauptursache der Cephalosporin-Resistenz bei Enterobakterien

Epidemiol. Bull., 2007, 28: 247-250

Philippon, A., Labia, R., Jacoby, G. (1989)

Extended-spectrum beta-lactamases

Antimicrob. Agents Chemother., 33: 1131-1136

- Pitout, J. D., Hanson, N. D., Church, D. L., Laupland, K. B. (2004)**
Population-based laboratory surveillance for *Escherichia coli*-producing extended-spectrum beta-lactamases: importance of community isolates with blaCTX-M genes
Clin. Infect. Dis., 38: 1736-1741
- Poirel, L., Naas, T., Guibert, M., Chaibi, E. B., Labia, R., Nordmann, P. (1999)**
Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene
Antimicrob. Agents Chemother., 43 (3): 573-81
- Poirel, L., Kampfner, P., Nordmann, P. (2002)**
Chromosome-encoded Ambler class A beta-lactamase of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended-spectrum beta-lactamases
Antimicrob. Agents Chemother., 46 (12): 4038-40
- Pomba, C., da Fonseca, J. D., Baptista, B. C., Correia, J. D., Martinez-Martinez, L. (2009)**
Detection of the pandemic O25-ST131 human virulent *Escherichia coli* CTX-M-15-producing clone harboring the qnrB2 and aac(6')-Ib-cr genes in a dog
Antimicrob. Agents Chemother., 53: 327-328
- Poole, K. (2000)**
Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-negative bacteria
Antimicrob. Agents Chemother., 44: 2233-2241
- Prinarakis, E. E., Miriagou, V., Tzelepi, E., Gazouli, M., Tzouvelekis, L. S. (1997)**
Emergence of an inhibitor-resistant beta-lactamase (SHV-10) derived from an SHV-5 variant
Antimicrob. Agents Chemother., 41 (4): 838-40
- Putman, M., van Veen, H. W., Konings, W. N. (2000)**
Molecular properties of bacterial multidrug transporters
Microbiol. Mol. Biol. Rev., 64: 672-693
- Quintiliani, R., Jr., Sahm, D. F., Courvalin, P. (1999)**
Mechanisms of resistance to antimicrobial agents
In P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Tenover und R. H. Tenover (ed.)
Manual of Clinical Microbiology, 7. Auflage, ASM Press Washington, D. C. pp. 1505-1525
- Rayamajhi, N., Kang, S. G., Lee, D. Y., Kang, M. L., Lee, S. I., Park, K. Y. (2008)**
Characterization of TEM-, SHV- and AmpC-type β -lactamases from cephalosporin-resistant *Enterobacteriaceae* isolated from swine
Int. J. Food Microbiol., 124: 183-187
- Recchia, G. D., Hall, R. M. (1995)**
Gene cassettes: a new class of mobile element
Microbiology, 141: 3015-3027

8 Verwendete Literatur

Reseau de surveillance de la resistance aux antibiotiques chez les principales bacteries pathogenes des bovins, des porcs et des volailles (RESAPATH)

Marie, J., Martel, J. L., Kobisch, M., Sanders, P. (2001)

Reseau de surveillance de la resistance aux antibiotiques chez les principales bacteries pathogenes des bovins, des porcs et des volailles
Epidémiol. et santé anim., 40 : 51-55

Rolle, M., Mayr, A. (2002)

Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre
7. Auflage, Enke Verlag, Stuttgart

Romero, L., López, L., Rodríguez-Bano, J., Hernández, R. J., Martínez-Martinez, L., Pascual, A. (2005)

Long-term study of the frequency of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing extended-spectrum β -lactamases
Clin. Microbiol. Infect., 11: 625-631

Rossolini, G. M., Franceschini, N., Lauretti, L., Caravelli, B., Riccio, M. L., Galleni, M., Frere, J. M., Amicosante, G. (1999)

Cloning of a *Chryseobacterium* (Flavobacterium) meningosepticum chromosomal gene (*blaA*(CME)) encoding an extended-spectrum class A beta-lactamase related to the *Bacteroides cephalosporinases* and the VEB-1 and PER beta-lactamases
Antimicrob. Agents Chemother., 43 (9): 2193-9

Ruscher, C., Lübke-Becker, A., Wleklinski, C. G., Soba, A., Wieler, L. H., Walther, B. (2009)

Prevalence of Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from clinical samples of companion animals and equidae
Vet. Microbiol., 136 (1-2): 197-201

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977)

DNA sequencing with chain-terminating inhibitors
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (12): 5463-7

Schadewinkel-Scherkel, A.-M., Scherkel, R. (1995)

Antibiotika und Chemotherapeutika in der tierärztlichen Praxis
Jena – Stuttgart, Gustav Fischer Verlag

SCENIHR (2009)

Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks),
Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides, 19 January 2009

Schiappa, D. A., Hayden, M. K., Matushek, M. G., Hashemi, F. N., Sullivan, J., Smith, K. Y., Miyashiro, D., Quinn, J. P., Weinstein, R. A., Trenholme, G. M. (1996)

Ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* bloodstream infection: a case-control and molecular epidemiologic investigation
J. Infect. Dis., 174: 529-536

Schröer, U., Böttner, A., Nordmann, P., Wallmann, J. (2007)

Determination of the susceptibility of four cephalosporins as a screening method to identify CTX-M (ESBL) producing *E. coli* in veterinary medicine
Abstracts of the 47th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Chicago, U.S.A., 17.-20.09.2007, C2-1527, 134

Schwarz, S., Noble, W. C. (1999)

Aspects of bacterial resistance to antimicrobial agents used in veterinary dermatological practice
Vet. Dermatol, 10: 163-176

Schwarz, S., Kehrenberg, C. (2000)

Antimikrobielle Resistenz: Resistenzmechanismen, Resistenzgene & Übertragungswege
Amtstierärztl. Dienst Lebensmittelkontr., (2000) 7: 55-60.

Schwarz, S., Trolldenier, H. (2000)

Resistenzen gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen.
Handlexikon der tierärztlichen Praxis
Seiten 712bg-712bz-2. ed: E. Wiesner
Enke Verlag Stuttgart

Schwarz, S., Chaslus-Dancla, E. (2001)

Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance.
Vet. Res., 32: 201-226.

Schwarz, S., Kehrenberg, C., Walsh, T.R. (2001)

Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production
Int. J. Antimicrob. Agents, 17 (6): 431-7

Schwarz, S.; Böttner, A., Hafez, H. M., Kaske, M., Kehrenberg, C., Kietzmann, M., Klarmann, D., Klein, G., Krabisch, P., Kühn, T., Luhofer, G., Richter, A., Sigge, C., Traeder, W., Waldmann, K. H., Wallmann, J., Werckenthin, C. (2005)

Standardisierung der Empfindlichkeitsprüfung bei Bakterien von Tieren
3. Leipziger Tierärztekongress Leipzig, 20.-22.1.2005
Abstr. in: *Tierärztliche Praxis* 2004; 32 (K): Suppl.: 98

Shiraki, Y., Shibata, N., Doi, Y., Arakawa, Y. (2004)

Escherichia coli producing CTX-M-2 β -lactamase in cattle, Japan
Emerging Infectious Diseases, 10 (1): 69-75

Silva, J., Aguilar, C., Ayala, G., Estrada, M. A., Garza-Ramos, U., Lara-Lemus, R., Ledezma, L. (2000)

TLA-1: a new plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase from *Escherichia coli*
Antimicrob. Agents Chemother., 44 (4): 997-1003

Simon, C., Stille, W. (2004)

Antibiotika-Therapie in Klinik und Praxis
10. Auflage, Schattauer Verlag

8 Verwendete Literatur

Simonet, V., Mallea, M., Pages, J.-M. (2000)

Substitutions in the eyelet region disrupt cefepime diffusion through the *Escherichia coli* OmpF channel
Antimicrob. Agents Chemother., 44: 311-315

Sirot, D., Sirot, J., Labia, R., Morand, A., Courvalin, P., Darfeuille-Michaud, A., Perroux, R., Cluzel, R. (1987)

Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-M-1, a novel β -lactamase
J. Antimicrob. Chemother., 20: 323-334

Smet, A., Martel, A., Persoons, D., Dewulf, J., Heyndrickx, M., Catry, B., Herman, L., Haesebrouck, F., Butaye, P. (2008)

Diversity of extended-spectrum β -lactamases and class c β -lactamases among cloacal *Escherichia coli* isolates in Belgian broiler farms
Antimicrob. Agents Chemother., 52 (4): 1238-1243

Smith, J. T., Lewin, C. S. (1993)

Mechanisms of antimicrobial resistance and implications for epidemiology
Vet. Microbiol., 35: 233-242

Sougakoff, W., Goussard, S., Gerbaud, G., Courvalin, P. (1988)

Plasmid-mediated resistance to third-generation cephalosporins caused by point mutations in TEM-type penicillinase genes
Rev. Infect. Dis., 10: 879-884

Stanisich, V. A. (1988)

Identification and analysis of plasmids at the genetic level
p. 11-48 In Grinstead, J., Bennett, P. M. (ed.) Plasmid Technology
Academic Press, London, United Kingdom

Steward, C. D., Rasheed, J. K., Hubert, S.K., Biddle, J. W., Raney, P. M., Anderson, G. J., Williams, P. P., Brittain, K. L., Oliver, A., McGowan, J. E. Jr, Tenover, F. C. (2001)

Characterization of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from 19 laboratories using the National Committee for Clinical Laboratory Standards extended-spectrum beta-lactamase detection methods
J Clin Microbiol.;39 (8): 2864-72

Stürenburg, E., Mack, D. (2003)

Extended-spectrum β -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control
Journal of Infection, 47, 273-295

Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring (SVARM)

[<http://www.sva.se/en/Target-navigation/Animal-health/Antibiotic-Resistance/Monitoring-of-antimicrobial-resistance/SVARM-reports/>]

Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., Swaminathan, B. (1995)

Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing
J. Clin. Microbiol., 33 (9): 2233–2239

Tenover, F. C., Mohammed, M. J., Stelling, J., O'Brien, T., Williams, R. (2001)

Ability of laboratories to detect emerging antimicrobial resistance: proficiency testing and quality control results from the World Health Organisation's external quality assurance system for antimicrobial susceptibility testing
J. Clin. Microbiol., 39: 241-250

Theuretzbacher, U. (1998)

Beta-Lactamasen und Beta-Lactamase-Inhibitoren
Chemotherapie Journal, 7. Jahrgang, Heft 4: 136-142

Vahaboglu, H., Dodanli, S., Eroglu, C., Ozturk, R., Soyletir, G., Yildirim, I., Avkan, V. (1996)

Characterization of multiple-antibiotic-resistant *Salmonella typhimurium* strains: molecular epidemiology of PER-1-producing isolates and evidence for nosocomial plasmid exchange by a clone
J. Clin. Microbiol., 34 (12): 2942-6

Vahaboglu, H., Ozturk, R., Aygun, G., Coskun, F., Yaman, A., Kaygusuz, A., Leblebicioglu, H., Balik, I., Aydin, K., Otkun, M. (1997)

Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study
Antimicrob. Agents Chemother., 41 (10): 2265-9

Wallmann, J., Schröter, K., Wieler, L. H., Kroker, R. (2003)

Antibiotikaempfindlichkeit ausgewählter pathogener Bakterien von erkrankten Lebensmittel liefernden Tieren in Deutschland
Tieraerztl Prax, 31: 122-31

Walsh, C. (2003)

Antibiotics: Actions, Origins, Resistance
ASM Press, USA

Waturangi, D. E., Schwarz, S., Suwanto, A., Kehrenberg, C., Erdelen, W. (2003)

Identification of a truncated Tn1721-like transposon located on a small plasmid of *Escherichia coli* isolated from *Varanus indicus*
J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health, 50: 86-9

Werckenthin, C., Schwarz, S. (1997)

Resistenzen gegenüber Proteinbiosyntheseinhibitoren bei Staphylokokken: Resistenzgene und ihre Ausbreitung – Übersichtsreferat
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., 110: 324-332

8 Verwendete Literatur

Wiedemann, B., Kliebe, C., Kresken, M. (1989)

The epidemiology of beta-lactamases

J. Antimicrob Chemother., 24 Suppl B: 1-22

Xu, L., Ensor, V., Gossain, S., Nye, K., Hawkey, P. (2005)

Rapid and simple detection of blaCTX-M genes by multiplex PCR assay

J. Med. Microbiol., 12 (Pt 12): 1183-7

9 Anhang

9.1 Publikation

Büchter, B., Grobbel, M., Kaspar, H., Lübke-Becker, A., Steinacker, U., Wallmann, J., Wieler, L. H. (2008)

Vorkommen und molekulare Charakterisierung Extended-Spectrum Beta-Lactamase-produzierender E. coli in Lebensmittel liefernden Tieren

Poster, Tagung der Fachgruppe Mikrobiologie

Braunschweig 25.06. bis 27.06.2010

Poster 44

9.2 Danksagung

Viele Menschen haben mich bei dieser Doktorarbeit unterstützt. Ihnen möchte ich danken.

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Lothar H. Wieler für die hervorragende Betreuung, die stets konstruktiven Hinweise sowie seine Geduld und sein Verständnis danken.

Des Weiteren gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. Wallmann. Einerseits für die Überlassung des Themas zum anderen für die gute fachliche Betreuung und sein stets offenes Ohr bei Fragen und Problemen.

Allen Mitarbeitern des Referats 503 des Bundesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit sei gedankt für ihre unermüdliche Hilfe. Ganz besonders jedoch geht mein Dank an meine Kolleginnen Dr. Heike Kaspar und Dr. Antje Römer. Ihr wart mir eine gute Stütze, in guten wie in schweren Zeiten, und habt es immer verstanden mich aufzubauen und zu motivieren.

Auch den Mitarbeitern und Kollegen des Instituts für Mikrobiologie und Tierseuchen der FU Berlin danke ich für ihre Unterstützung und die Bereitschaft mich in ein neues Themengebiet einzuarbeiten.

In diesem Zusammenhand möchte ich mich ganz herzlich bei Dr. Antina Lübke-Becker und Dr. Mirjam Grobbel bedanken. Auf euch konnte ich mich jederzeit verlassen. Ihr habt mir mit euren konstruktiven Vorschlägen stets weitergeholfen. Dir Mirjam, möchte ich für dein Verständnis danken. Du wirst immer einen ganz besonderen Platz in meinem Leben einnehmen.

Für das Korrekturlesen der Arbeit bedanke ich mich bei Antje, Heike, Matthias, Ingeborg und Heidi. Jessi und Heidi danke ich für die Hilfe beim Summary.

Gunther, dir danke ich für deine kritische wissenschaftliche Durchsicht und Hilfe.

Zu guter Letzt bedanke ich mich ganz besonders bei meinen Eltern für ihre unermüdliche Unterstützung, ihr Vertrauen in mich und die Motivation und Liebe in schweren Zeiten. Ich bin stolz und froh eine so tolle Familie zu haben.

9.3 Selbstständigkeitserklärung

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

Berlin, den 15. Juli 2010

Britta Büchter