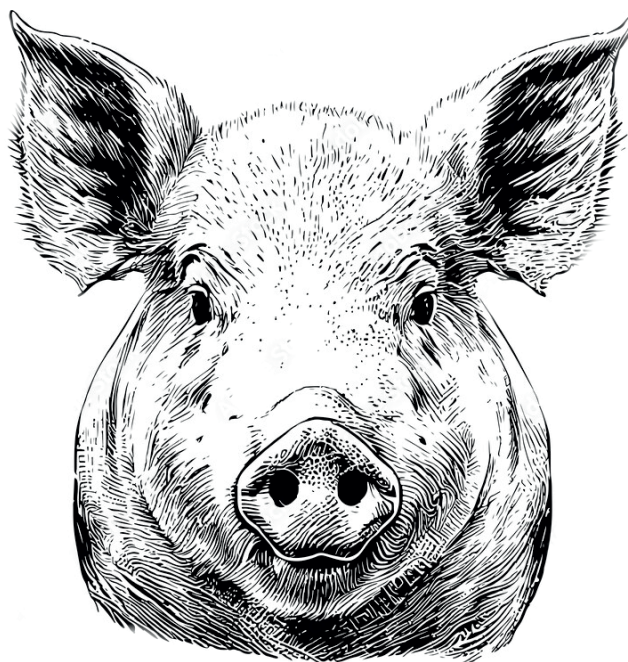


NICOLA MARIA PFEIFER

Untersuchungen zur Dynamik des Vorkommens
und zur Persistenz Cephalosporin- oder
Fluorchinolon-resistenter *Escherichia coli*-Stämme
in der Mastschweineproduktion



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2023

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2023

© 2023 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, 35396 GIESSEN, GERMANY
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
Justus-Liebig-Universität Gießen

und

dem Institut für molekulare Pathogenese
Friedrich-Loeffler-Institut in Jena

Betreuer: apl. Prof. Dr. Christian Menge

**Untersuchungen zur Dynamik des Vorkommens und zur Persistenz
Cephalosporin- oder Fluorchinolon-resistenter
Escherichia coli-Stämme in der Mastschweineproduktion**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Nicola Maria Pfeifer

Tierärztin aus Frankfurt am Main

Gießen 2022

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold

Gutachter: apl. Prof. Dr. Christian Menge
Prof. Dr. Dr. habil. Gerald Reiner
Prof. Dr. Rolf Bauerfeind

Tag der Disputation: 25.01.2023

Meiner Familie

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Pfeifer, N.; Barth, S. A.; Berens, C.; Menge, C. (2021): Dynamics of quinolone- and cephalosporin-resistant *Escherichia coli* carriage along the production chain in Thuringian pigsties. Poster, Nachwuchswissenschaftler-Symposium des Friedrich-Loeffler-Instituts, 20. – 21.10.2021, Online

Pfeifer, N.; Barth, S. A.; Berens, C.; Menge, C. (2021): Dynamics of quinolone- and cephalosporin-resistant *Escherichia coli* carriage along the production chain in Thuringian pigsties. Poster, Tagung der Fachgruppe „Bakteriologie und Mykologie“ der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, 14. – 16.06.2021, Online

Pfeifer, N.; Barth, S. A.; Higgins, O.; Chueiri, A.; O'Connor, L.; Smith, T.; Berens, C.; Menge, C. (2021): Dynamics of quinolone- and cephalosporin-resistant *Escherichia coli* carriage along the production chain in Thuringian pigsties. Poster, 3rd One Health European Joint Programme Annual Scientific Meeting, 09. – 11.06.2021, Kopenhagen / Hybrid

Pfeifer, N.; Barth, S. A.; Berens, C.; Menge, C. (2020): Dynamics of quinolone and cephalosporin resistant *Escherichia coli* carriage along the production chain on pig farms in Thuringia. Poster, Zoonoses 2020 – International Symposium on Zoonoses Research, 15. – 16.10.2020, Berlin / Hybrid

Pfeifer, N.; Barth, S. A.; Wiegand, E.; Berens, C.; Menge, C. (2020): Antimicrobial resistance (AMR) – development and persistence of resistomes and coding genetic elements in pig farming. Poster, 8. Leipziger Doktorandenforum der Veterinärmedizinischen Fakultät, 13.02.2020, Leipzig

Pfeifer, N.; Wiegand, E.; Berens, C.; Menge, C. (2019): Antimicrobial resistance (AMR) – development and persistence of resistomes and coding genetic elements in pig farming. Poster, Nachwuchswissenschaftler-Symposium des Friedrich-Loeffler-Instituts, 25. – 27.09.2019, Jena

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	2
2.1 Antibiotika	2
2.1.1 Klassifikation von Antibiotika.....	2
2.1.2 Fluorchinolone	4
2.1.3 Cephalosporine der dritten und vierten Generation	5
2.2 Antimikrobielle Resistenz	6
2.2.1 Grenzwerte zur Detektion antimikrobieller Resistenz	7
2.2.2 Erwerb und Transfer von Resistenzgenen.....	7
2.2.3 Entwicklung der Resistenzproblematik	11
2.3 Persistenz von antimikrobiellen Resistenzen.....	14
2.3.1 Persistenz von Resistenzdeterminanten auf zellulärer Ebene	14
2.3.2 Persistenz von antimikrobiellen Resistenzen in einer Tierhaltung.....	15
2.4 Escherichia coli.....	18
2.4.1 Vorkommen und Typisierung von <i>E. coli</i> -Stämmen.....	19
2.4.2 <i>E. coli</i> als Donor- und Akzeptorstamm von Resistenzdeterminanten.....	20
2.4.3 <i>E. coli</i> als Indikatorkeim für die Resistenzsituation in einer Population.....	20
2.5 Fluorchinolon-Resistenz.....	21
2.5.1 Resistenzmechanismen gegenüber Fluorchinolonen	21
2.5.2 Epidemiologie und Einflussfaktoren	23
2.6 Cephalosporin-Resistenz.....	25
2.6.1 Resistenzmechanismen gegenüber Cephalosporinen	25
2.6.2 Epidemiologie und Einflussfaktoren	26
2.7 Bedeutung und Ziel dieser Studie	28
3 Material und Methodik.....	30
3.1 Gewinnung der Sammelkotproben.....	30
3.1.1 Vorversuch	30
3.1.2 Hauptversuch	30
3.1.3 Kokzidientestung.....	31
3.2 Fragebogen	32
3.3 Kotprobenbearbeitung	32
3.3.1 Vorversuch	32
3.3.2 Hauptversuch	33
3.3.3 Schimmelbildung auf den Primärplatten	36
3.3.4 Ausplattieren der Rückstellproben	37
3.4 Kulturverarbeitung und Stammisolation	37
3.4.1 Inkubation.....	37
3.4.2 Anlegen von Dauerkulturen: Kryopräservation	37
3.4.3 Herstellung von Hitzelysaten	39

3.5	Stammidentifizierung mittels MALDI-TOF MS Analyse.....	39
3.6	PCR-Nachweise	40
3.6.1	Endpunkt-PCR-Analysen	41
3.6.2	<i>Real-Time</i> -PCR-Analyse	48
3.7	Agarose-Gelelektrophorese	49
3.7.1	Gelelektrophoretische Auftrennung von PCR-Amplifikaten	49
3.7.2	Gelelektrophoretische Auftrennung von Plasmid-DNA	50
3.7.3	Analyse von Gelelektrophoresen	51
3.8	Phänotypische Resistenz-Testung mittels Bouillon- Mikrodilutionsmethode.....	52
3.8.1	Suszeptibilitätstestung mit MICRONAUT-S Großtier Platte	52
3.8.2	Cefquinom-Suszeptibilitätstestung	53
3.8.3	Interpretation der Werte der minimalen Hemmkonzentrationen	55
3.9	DNA-Präparation	57
3.9.1	Präparation von Plasmid-DNA	57
3.9.2	Präparation von genomischer DNA.....	57
3.10	DNA-Sequenzierung.....	58
3.10.1	Sequenzierung von PCR-Amplifikaten.....	58
3.10.2	Vollgenomsequenzierung ausgewählter Stämme	58
4	Ergebnisse	61
4.1	Auswahl und Charakterisierung von Betrieben für die Studienteilnahme	61
4.2	Betriebsmanagement der für den Hauptversuch ausgewählten Betriebe	67
4.2.1	Beprobungsschema Betrieb B1.....	67
4.2.2	Beprobungsschema Betrieb B2.....	69
4.2.3	Beprobungsschema Betrieb K1.....	76
4.2.4	Beprobungsschema Betrieb K2.....	78
4.3	Kokzidienstatus.....	83
4.4	Shigatoxin-Detektion	83
4.5	Quantitative Analyse des Wachstums von Gammaproteobakterien auf Selektivplatten mit Enrofloxacin, Ceftiofur oder Cefquinom	83
4.5.1	Ausplattieren von Rückstellproben zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Methode	85
4.5.2	Vergleich der Quotientenwerte der GE4-, GF- und GQ-Platten pro Altersstufe und Betrieb	86
4.5.3	Vergleich der Quotientenwerte pro Selektivplattenart zwischen den Altersstufen und Betrieben.....	89
4.5.4	Betriebspezifischer Vergleich der Quotientenwerte pro Selektivplatte zwischen Mast- bzw. Absetzerdurchgängen	90
4.5.5	Betriebspezifischer Vergleich der Quotientenwerte zwischen den Selektivplatten pro Mast- bzw. Absetzerdurchgang	95

4.6	Qualitative Analyse der Cephalosporin- / Fluorchinolon-resistenten <i>E. coli</i>-Stämme	97
4.6.1	Anzahl isolierter Cephalosporin- / Fluorchinolon-resistenter <i>E. coli</i> -Stämme.....	100
4.6.2	MLVA-Profile der Cephalosporin- / Fluorchinolon-resistenten <i>E. coli</i> -Stämme.....	101
4.6.3	Gruppierung der Cephalosporin- / Fluorchinolon-resistenten <i>E. coli</i> -Stämme basierend auf ihren MLVA-Profilen.....	103
4.6.4	Antibiotikaresistenz-Profile der Cephalosporin- / Fluorchinolon-resistenten <i>E. coli</i> -Stämme	109
4.6.5	Genetischer Hintergrund der Resistenzen gegenüber Fluorchinolonen sowie Cephalosporinen der dritten und vierten Generation	129
4.6.6	Gel-basierte Plasmid-Profile der Cephalosporin- / Fluorchinolon-resistenten <i>E. coli</i> -Stämme	132
4.7	Analyse der Vollgenomsequenzen	133
4.7.1	Diversität der sequenzierten Stämme.....	134
4.7.2	Vorkommen von Antibiotikaresistenz-vermittelnden Determinanten.....	142
4.7.3	Plasmidsequenzen.....	149
4.7.4	Persistenz der Cephalosporin- und Fluorchinolon-Resistenz.....	154
5	Diskussion	169
5.1	Dynamik des Vorkommens der Enrofloxacin-, Ceftiofur- und Cefquinom-Resistenzprävalenz über den Beprobungszeitraum	169
5.1.1	Methodische Aspekte der quantitativen Ergebnisse	171
5.1.2	Quantitative Daten vor dem Hintergrund antibiotischer Interventionen auf den Betrieben	173
5.2	Diversität der Cephalosporin- bzw. Fluorchinolon-Resistenzkodierenden Elemente	180
5.3	Genetischer Hintergrund der Resistenzen gegenüber Fluorchinolonen sowie Cephalosporinen der dritten und vierten Generation	183
5.4	Persistenz der Cephalosporin- / Fluorchinolon-Resistenz	185
5.4.1	Ko-Selektion und Kreuz-Resistenz.....	188
5.4.2	Persistenz resistenzdeterminierender genetischer Elemente	190
5.4.3	Eigenschaften persistenter Stämme	193
5.5	Schlussfolgerung	199
6	Zusammenfassung	201
7	Summary	203
8	Literaturverzeichnis	205
9	Anhang	229
9.1	Übersicht über verwendete Verbrauchsmaterialien, Geräte, Softwareprogramme, Chemikalien, Oligonukleotide und Standards	229
9.1.1	Verwendete Puffer und Lösungen	234
9.1.2	Verwendete Oligonukleotid- <i>primer</i> sowie Standard- und Marker- <i>E. coli</i> -Stämme.....	236

9.2 Fragebögen	242
9.2.1 Absetzerferkel-Fragebogen	242
9.2.2 Läuferschwein / <i>flatdeck</i> -Fragebogen.....	246
9.2.3 Mastschwein-Fragebogen	249
9.3 RNA-Banden in Plasmidgelen	252
Abbildungsverzeichnis	254
Tabellenverzeichnis	258
Danksagung	260

Abkürzungsverzeichnis

AB	<u>A</u> ntibiotikum
Abb.	<u>A</u> bbildung
ADG	<u>A</u> bsetzer <u>d</u> urchgang
AMR	<u>a</u> ntimikrobielle <u>R</u> esistenz(en)
<i>Aqua dest.</i>	<i><u>A</u>qua <u>d</u>estillata</i>
ATCC	Amerikanische Kollektion zur Typisierung von Kulturen / <i><u>A</u>merican <u>T</u>ype <u>C</u>ulture <u>C</u>ollection</i>
bp	<u>B</u> asen <u>p</u> aar
BP	<u>B</u> akterien <u>p</u> ool
CC	klonaler Komplex / <i><u>c</u>lonal <u>c</u>omplex</i>
CQ	<u>C</u> ef <u>q</u> uinom
CS*	<u>C</u> ephalo <u>s</u> porin
CS3/4	<u>C</u> ephalo <u>s</u> porine der <u>d</u> ritten und <u>v</u> ierten Generation
CSR*	<u>C</u> ephalo <u>s</u> porin- <u>r</u> esistent bzw. - <u>R</u> esistenz
CSRE*	<u>C</u> ephalo <u>s</u> porin- <u>r</u> esistenter <u>E. coli</u> -Stamm
CSRG*	<u>C</u> ephalo <u>s</u> porin- <u>r</u> esistente <u>G</u> ammaproteobakterien
DNA	Desoxyribonukleinsäure / <i><u>d</u>eoxyribo<u>n</u>ucleic <u>a</u>cid</i>
<i>E. coli</i>	<i><u>E</u>scherichia <u>c</u>oli</i>
ECOFF	Epidemiologischer Grenzwert / <i><u>e</u>pidemiological <u>c</u>ut-<u>o</u>ff <u>v</u>alue</i>
ECOR-Kollektion	<i><u>E. coli</u> <u>r</u>eference <u>c</u>ollection</i>
EDTA	<u>E</u> thylendi <u>a</u> min- <u>T</u> etra <u>a</u> cet <u>a</u> t
ESBL	β -Laktamase mit erweitertem Spektrum / <i><u>e</u>xtended <u>s</u>pectrum β-<u>L</u>aktamase</i>
EUCAST	Europäisches Komitee für Antibiotika-Suszeptibilitätstestung / <i><u>E</u>uropean <u>C</u>ommittee on <u>A</u>ntimicrobial <u>S</u>usceptibility <u>T</u>esting</i>
FQ	Fluorchinolon / <i><u>f</u>luoro<u>q</u>uinolone</i>
FQR	Fluorchinolon-resistent bzw. -Resistenz / <i><u>f</u>luoro<u>q</u>uinolone-<u>r</u>esistant</i>
FQRE	<u>F</u> luorchinolon- <u>r</u> esistenter <u>E. coli</u> -Stamm
FQRG	<u>F</u> luorchinolon- <u>r</u> esistente <u>G</u> ammaproteobakterien
GA	Wasserblau-Metachromgelb-Agar nach <u>G</u> assner, modifiziert
GE	<u>G</u> assner-Agarplatte mit 0,125 μ g/ml <u>E</u> nrofloxacin
GE4	<u>G</u> assner-Agarplatte mit 4 μ g/ml <u>E</u> nrofloxacin
GF	<u>G</u> assner-Agarplatte mit 4 μ g/ml Ceftio <u>f</u> ur
GQ	<u>G</u> assner-Agarplatte mit 8 μ g/ml Cef <u>q</u> uinom
h	Stunde / <i><u>h</u>our</i>

Abkürzungsverzeichnis

HGT	<u>h</u> orizontaler <u>G</u> entransfer
Inc(-Gruppe)	Inkompatibilitätsgruppe von Plasmiden / <i><u>in</u>compatibility <u>g</u>roup</i>
kb	<u>K</u> ilob <u>a</u> se
KbE	<u>k</u> olonie <u>b</u> ildende <u>E</u> inheit
kSNP	<u>k</u> -mer-basierte <u>S</u> NP
LB	<u>L</u> uria- <u>B</u> ertani-Bouillon, modifiziert nach Miller
LEC-LAMP	<i><u>l</u>oop-<u>p</u>rim<u>e</u>r <u>e</u>ndonuclease <u>c</u>leavage <u>l</u>oop-mediated <u>i</u>sothermal <u>a</u>mplification</i>
M	<u>m</u> ol/l
MALDI-TOF MS	<i><u>m</u>atrix <u>a</u>ssisted <u>l</u>aser <u>d</u>esorption / <u>i</u>onisation - <u>t</u>ime <u>o</u>f <u>f</u>light <u>m</u>ass <u>s</u>pectrometry</i>
MDG	<u>M</u> ast <u>d</u> urchgang
MDR	multiresistent / <i><u>m</u>ultidrug <u>r</u>esistant</i>
MHB	<u>M</u> üller- <u>H</u> inton- <u>B</u> ouillon
MHK	<u>m</u> inimale <u>H</u> emm <u>k</u> onzentration
min	<u>M</u> inute
MLVA	<i><u>m</u>ultiple-<u>l</u>ocus <u>V</u>NTR <u>A</u>nalyse</i>
NaCl	<u>N</u> atrium- <u>C</u> hlorid
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung / <i><u>p</u>hosphate <u>b</u>uffered <u>s</u>aline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion / <i><u>p</u>olymerase <u>c</u>hain <u>r</u>eaction</i>
pMLST	<u>P</u> lasmid- <u>M</u> LST
PMQR	Plasmid-vermittelte Fluorchinolon-Resistenz / <i><u>p</u>lasmid-<u>m</u>ediated <u>q</u>inolone <u>r</u>esistance</i>
QRDR	Fluorchinolon-Resistenz bestimmende Region / <i><u>q</u>inolone <u>r</u>esistance-<u>d</u>etermining <u>r</u>egion</i>
RD	<u>R</u> esistenz <u>d</u> eterminante
SKP	<u>S</u> ammel <u>k</u> ot <u>p</u> robe
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus / <i><u>s</u>ingle-<u>n</u>ucleotide <u>p</u>olymorphism</i>
TÄHAV	<u>T</u> ierärztliche <u>H</u> aus <u>a</u> potheken <u>v</u> erordnung
TBE	<u>T</u> ris- <u>B</u> orat- <u>E</u> DTA
VNTR	Variable Anzahl an Tandemwiederholungen / <i><u>v</u>ariable-<u>n</u>umber <u>t</u>andem-<u>r</u>epeat</i>

*Entsprechend dem Fokus dieser Studie sind hier meist Cephalosporine der dritten und vierten Generation gemeint.

Weitere Abkürzungen werden im Text erläutert.

1 Einleitung

Der umsichtige und damit verminderte, zielgerichtete Einsatz von Antibiotika wird in der Human- und Veterinärmedizin seit langer Zeit als wichtigste Maßnahme zur nachhaltigen Reduktion des Auftretens sowie der Verbreitung antimikrobieller Resistenzen betrachtet. Auf dieser Annahme beruht auch das Prinzip der Änderung der Tierärztlichen Hausapothekenverordnung vom März 2018, die zu einer deutlichen Reduzierung der Abgabemengen von Cephalosporinen der dritten und vierten Generation sowie von Fluorchinolonen an Veterinärmediziner geführt hat. Resistenzdeterminanten können jedoch ungeachtet des Einsatzes der entsprechenden Antibiotika durch Ko-Selektion oder Kreuz-Resistenz in einer Tierpopulation erhalten bleiben. Dies führt zu folgender Hypothese:

Die Beschränkung des Einsatzes gewisser Antibiotika(klassen) wird als alleinstehende Maßnahme nicht ausreichen, um die Prävalenz der korrespondierenden Resistenzen langfristig zu senken.

Um dies zu überprüfen, wurde in einer Longitudinalstudie das Auftreten von Cephalosporin- und Fluorchinolon-resistenten *Escherichia coli*-Stämmen aus dem Darmmikrobiom von Mastschweinen untersucht. Die Stämme wurden aus Sammelkotproben von zwei ökologisch und zwei konventionell geführten schweinehaltenden Betrieben in Thüringen isoliert. Über einen Zeitraum von 16 Monaten wurden pro Betrieb drei bis vier Mastzyklen beprobt, um eine Persistenz der resistenten Stämme sowie der von ihnen kodierte Resistenzdeterminanten innerhalb eines Mastdurchgangs und über mehrere Mastdurchgänge hinweg identifizieren zu können. Die Betriebe wurden als geschlossene Systeme – also ohne den Zukauf von (Jung-)Tieren – geführt, sodass jede Mastzyklus-Tiergruppe, die von Geburt bis Schlachtzeitpunkt zusammen verblieb, als epidemiologische Einheit angesehen wurde. Zu jeder Kotprobe wurden Daten zum Einsatz von Antibiotika bei der entsprechenden Tiergruppe erhoben, um den Einfluss antibiotischer Anwendungen auf die Prävalenz resistenter *Escherichia coli* zu untersuchen. Mit der Studie sollen Muster in der Resistenzprävalenz gesucht werden, um die Eingangshypothese zu überprüfen und eventuell für die Persistenz verantwortliche Stämme sowie genetische Elemente zu identifizieren.

2 Literaturübersicht

2.1 Antibiotika

Antibiotika (AB) sind Wirkstoffe, die das Wachstum von Bakterien hemmen oder sie töten (WHO 2017b). Vor der Entdeckung antibiotischer Arzneimittel waren bakterielle Infektionen die häufigste Todesursache in Europa (DART 2020 2015). Heutzutage werden AB in der Medizin präventiv z. B. bei Chemotherapien und Organtransplantationen (DART 2020 2015) sowie zur Behandlung von zum Teil lebensbedrohlichen Bakteriämien, Urogenitalinfektionen, Pneumonien und anderen bakteriellen Infektionen eingesetzt (Erb *et al.* 2007). Ihre Verwendung in der Nutztierhaltung und in der Pflanzenproduktion dient darüber hinaus der Lebensmittelsicherheit sowie dem Verbraucherschutz (van Hoek *et al.* 2011; BVL 2020). Die Erhaltung ihrer Effektivität ist daher von äußerster Wichtigkeit für Human- und Veterinärmedizin. Allerdings wirken AB nicht spezifisch auf ein Zielpathogen, sondern auch auf andere Bakterien in und am Körper des behandelten Organismus und beeinflussen so die Ökologie des Mikrobioms am Applikationsort und vielfach im gesamten Wirt (Looft *et al.* 2012b; Stecher *et al.* 2013). Daher müssen beim Einsatz dieser Therapeutika Nebenwirkungen und Langzeiteffekte mitbedacht werden.

2.1.1 Klassifikation von Antibiotika

Antibiotische Wirkstoffe lassen sich anhand ihrer Wirkart, dem Wirkmechanismus und dem Wirkspektrum einteilen (DART 2020 2015). Primär grenzt man bakterio-statische AB, die Bakterien in ihrem Wachstum hemmen, von bakteriziden AB ab, die Bakterien töten (Tabelle 1). Der Wirkmechanismus wird durch die Zielstruktur der AB bestimmt. Während einige die DNA- oder RNA-Synthese stören bzw. verhindern (Chinolon-AB, Rifampicin) oder in die Proteinbiosynthese eingreifen (Aminoglykoside, Chloramphenicol, Makrolide, Tetracykline), blockieren andere Wirkstoffe die Zellwandsynthese (β -Laktam-AB, Glykopeptide) oder verändern den Energiestoffwechsel der Bakterienzelle (Sulfonamide, Trimethoprim; van Hoek *et al.* 2011). Das Spektrum betreffend unterscheidet man Breitband-AB, die gegenüber einer Vielzahl verschiedener Bakterien wirken, von Schmalspektrum-AB (Acar 1997). AB lassen sich aber auch nach ihrer therapeutischen Wichtigkeit einteilen (siehe 2.2.3.1).

Tabelle 1: Einteilung wichtiger Veterinär-Antibiotika sowie ihre Klassifizierung nach WHO, WOAH und EMA

Wirkstoffklasse	WHO ¹		WOAH ²	AMEG der EMA ³	Wirkart	Wirkstoff
	Bezeichnung	Kategorisierung	Kategorisierung	Kategorisierung		
β-Laktam-Antibiotika: – Penicilline	Penicillin + β-Laktamase-Inhibitor	HCPIA	VCIA	C	bakterizid	Amoxicillin- Clavulansäure
	Aminopenicillin	HCPIA	VCIA	D		Ampicillin
	Schmal-Spektrum Penicillin	HIA	VCIA	D		Benzylpenicillin
– Cephalosporine	1. Generation Cephalosporin	HIA	VHIA	C	bakterizid	Cefalotin
	3. Generation Cephalosporin	HTCPIA	VCIA	B		Ceftiofur
	4. Generation Cephalosporin	HTCPIA	VCIA	B		Cefquinom
Polypeptidantibiotika	Polymyxin	HTCPIA	VHIA	B	bakterizid	Colistin
Chinolone	Fluorchinolon	HTCPIA	VCIA	B	bakterizid	Enrofloxacin
Makrolide		HTCPIA	VCIA	C	bakteriostatisch	Erythromycin
		HTCPIA	VCIA	C	bakteriostatisch	Tilmicosin
		HTCPIA	VCIA	C	bis bakterizid	
Fenicole	Amphenicol	HIA	VCIA	C	bakterizid	Tulathromycin
		HIA	VCIA	C	bakteriostatisch	Florfenicol
Aminoglykoside	Aminoglykosid	HCPIA	VCIA	C	bakterizid	Gentamicin
	Aminocyclitol	IA	VCIA	D		Spectinomycin
Diaminopyrimidin (Dihydrofolatreduktase-Inhibitoren)		HIA	VCIA	D	bakteriostatisch	Trimethoprim-
Sulfonamide (Folatsynthese-Inhibitor)						Sulfamethoxazol
Tetrazykline		HIA	VCIA	D	bakteriostatisch	Tetrazyklin
Pleuromutiline		IA	VHIA	C	bakteriostatisch	Tiamulin

Anmerkungen bzw. Abkürzungen siehe Seite 4.

Literaturübersicht

¹WHO = Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organization*):

HTCPIA = höchste Priorisierung eines kritisch wichtigen ABs (*highest priority critically important AB*);

HCPIA = hohe Priorisierung eines kritisch wichtigen ABs (*high priority critically important AB*);

HIA = sehr wichtiges AB (*highly important AB*);

IA = wichtiges AB (*important AB*);

²WOAH = Weltorganisation für Tiergesundheit (*World Organisation for Animal Health*):

VCIA = Veterinärmedizinisch kritisch wichtiges AB (*veterinary critically important AB*);

VHIA = Veterinärmedizinisch sehr wichtiges AB (*veterinary highly important AB*);

³AMEG = Expertengruppe für AB (*Antimicrobial Advice ad hoc Expert group*) der Europäischen Arzneimittel-Agentur (*European Medicines Agency*):

B = Wirkstoff soll nur eingeschränkt genutzt werden (*restrict*);

C = Wirkstoff soll vorsichtig eingesetzt werden (*caution*);

D = Wirkstoff soll umsichtig eingesetzt werden (*prudent*).

Exemplarisch werden nachfolgend die zwei AB-Klassen detaillierter beschrieben, die im Verlauf der Arbeit von Bedeutung sind.

2.1.2 Fluorchinolone

Fluorchinolone (FQ) sind eine Untergruppe der Chinolon-AB, die sich durch ihr Fluoratom auszeichnet. Die synthetisch hergestellten, bakteriziden AB (Rodríguez-Martínez *et al.* 2011; Blair *et al.* 2015), die auch Gyrasehemmer genannt werden, stören die DNA-Replikation und werden in ältere und neuere Generationen eingeteilt. Ältere Generationen sind sehr effektiv gegenüber gramnegativen Bakterien, neuere zeigen zusätzlich gute Wirkung gegenüber grampositiven Bakterien und Anaerobiern (Sierra *et al.* 2005; Fabrega *et al.* 2009), weshalb sie zu den Breitband-AB zählen (Lim *et al.* 2010; Karczmarczyk *et al.* 2011). Fluorchinolone zeichnen sich durch ihre gute Bioverfügbarkeit und die effektive Durchdringung diverser Gewebe aus (Römer *et al.* 2017). In der Humanmedizin werden sie vor allem zur Behandlung von Infektionen mit *Salmonella* oder *Campylobacter* sowie bei nosokomialen Infektionen mit multiresistenten Erregern eingesetzt (Tadesse *et al.* 2012; WHO - AGISAR 2019).

FQ wirken genotoxisch, indem sie eine kovalente Bindung mit dem Komplex aus bakterieller DNA und den Enzymen Topoisomerase II (auch Gyrase genannt) oder IV eingehen. Diese Enzym-Tetramere bestehen jeweils aus zwei A- und zwei B-Untereinheiten und haben die Aufgabe, bei der DNA-Replikation sowie bei der Transkription die Superspiralisierung der DNA durch Doppelstrangbrüche zu regulieren (Reece *et al.* 1991). Chinolon-AB binden an die A-Untereinheit des Enzyms und verhindern damit die Superspiralisierung sowie die Wiederverbindung der getrennten DNA-Stränge (Marcusson *et al.* 2009).

In der Veterinärmedizin sind FQ beliebt, da sie nach der Anwendung schnell hohe Plasmalevel erreichen (Römer *et al.* 2017) und eine kurze Wartezeit haben (Vetidata). Im August 2021 waren 35 Fluorchinolone-haltige Medikamente bei der Informationsplattform Vetidata gemeldet. Ein Drittel davon beinhaltet den Wirkstoff Marbofloxacin, die anderen zwei Drittel Enrofloxacin (Vetidata). Fast alle Präparate sind Injektionspräparate, da Fluorchinolone meist intramuskulär angewendet werden (Römer *et al.* 2017). Bei Wiederkäuern wird der Wirkstoff zur Behandlung von Pneumonien, Mastitiden und Septikämien, bei neonataler Diarrhoe sowie bei *Escherichia Coli*-Enteritiden verwendet. Beim Schwein werden FQ zur Vorbeugung und Therapie von respiratorischen Infektionen mit den Erregern *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma* spp. und *Actinobacillus pleuropneumoniae* eingesetzt. Darüber hinaus werden *Escherichia Coli*-Enteritiden (Taylor *et al.* 2009), Septikämien oder Infektionen des Urogenitaltrakts und das postpartale Dysgalaktiesyndrom von Sauen mit FQ therapiert. Die meisten FQ werden bei Schweinen im Saugferkel- (Sarrazin *et al.* 2019) und Läuferalter angewendet.

2.1.3 Cephalosporine der dritten und vierten Generation

Cephalosporine (CS) gehören innerhalb der β -Laktam-AB zu den Cephemen und Cephamycinen. Wie alle β -Laktam-AB wirken sie bakterizid, indem sie die Synthese der Peptidoglykanschicht in der Zellwand verhindern (Ambler 1980; Pfeifer *et al.* 2010). Dazu binden diese AB mit ihrem β -Laktam-Ring an Penicillin-bindende-Proteine und blockieren so die Querverknüpfung von Peptidoglykanen, wodurch die Zellwand instabil wird (Barlow *et al.* 2008; Blair *et al.* 2015). Entsprechend ihres Wirtsspektrums und ihrer Pharmakodynamik teilt man CS in fünf Generationen ein, von denen nur Wirkstoffe der ersten vier in der Veterinärmedizin zugelassen sind. Während CS der ersten beiden Generationen hauptsächlich gegenüber grampositiven Bakterien wirken, nimmt bei den höheren Generationen die Wirkung gegenüber gramnegativen Erregern zu (Jordan *et al.* 2020). Daher zählen CS der dritten Generation zu den AB mit erweitertem Spektrum, die der vierten Generation zu den Breitband-AB (Horton *et al.* 2011; Zhang *et al.* 2021). Sie werden in der Humanmedizin zur Behandlung von respiratorischen, urogenitalen oder dermatologischen Infektionen eingesetzt und sind eine der wenigen noch verbleibenden Therapieoptionen für pädiatrische Infektionen mit *Escherichia coli* (*E. coli*) und *Salmonella*, die einen schweren Verlauf haben können (WHO - AGISAR 2019; Jordan *et al.* 2020).

Die Oxyimino-CS Ceftiofur und Cefquinom sind CS der dritten und vierten Generation (CS3/4) von veterinärmedizinischer Bedeutung (Hornish *et al.* 2002; Daniels *et al.* 2007). Sie sind vor allem wegen ihrer kurzen Wartezeit beliebt, die lediglich drei bis fünf Tage beträgt. Die meisten Präparate werden injiziert (Vetidata). In der Veterinärmedizin sind CS3/4 die Mittel der Wahl bei Infektionen des Respirationstrakts von Rind und Schwein (Jordan *et al.* 2020), die häufig durch *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* oder *Streptococcus suis* ausgelöst werden (Hornish *et al.* 2002; Vetidata). Beim Rind sind CS3/4 darüber hinaus gängige AB zur Behandlung von Ballenfäule, Mastitiden und Metritiden (Volkova *et al.* 2012; Jordan *et al.* 2020). Auch Septikämien und Arthritiden (Jahanbakhsh *et al.* 2016), die durch Streptokokken oder *E. coli* ausgelöst werden, sowie die durch *Staphylococcus hyicus* verursachte Dermatitis des Schweins werden mit CS3/4 behandelt (Cameron-Veas *et al.* 2015). Früher wurden die Wirkstoffe häufig meta- und prophylaktisch bei Saugferkeln eingesetzt, um respiratorischen oder umbilikalen Infektionen sowie Diarrhoe vorzubeugen (Jørgensen *et al.* 2007; Wittum 2012; Agersø *et al.* 2013). Weiterhin wird das Mastitis-Metritis-Agalaktie-Syndrom von Sauen unter Beteiligung von *E. coli*, Staphylokokken und Streptokokken mit CS3/4 therapiert (Cameron-Veas *et al.* 2015).

2.2 Antimikrobielle Resistenz

AB wurden bereits aus Permafrostböden isoliert und kommen auch heute natürlicherweise in ökologischen Systemen vor, da sie von diversen Mikroorganismen zur Verteidigung gegenüber anderen Bakterien produziert werden (D'Costa *et al.* 2011; Noll *et al.* 2018). Die Zielbakterien haben daraufhin AB-Resistenzmechanismen entwickelt, die den Effekt der AB vermindern oder aufheben (WHO 2015). Diese antimikrobiellen Resistenzen (AMR) können intrinsisch oder erworben sein. Im ersten Fall fehlt aufgrund genetischer, struktureller oder funktionaler Eigenschaften des Bakteriums die Zielstruktur des ABs. Bakterien können Resistenzdeterminanten (RD) aber auch durch chromosomale Mutation oder horizontalen Gentransfer (HGT) erwerben (Martínez *et al.* 2015). Durch die Expression der RD wird die Zielstruktur des entsprechenden ABs verändert, ersetzt oder sie vor seiner Wirkung geschützt, der Zugang zur Zielstruktur durch verminderten In- bzw. erhöhten Efflux erschwert, alternative Stoffwechselwege etabliert oder das AB selbst verändert bzw. zerstört (van Hoek *et al.* 2011; Blair *et al.* 2015).

2.2.1 Grenzwerte zur Detektion antimikrobieller Resistenz

Um AMR messbar zu machen und zu quantifizieren, wurden auf der minimalen Hemmkonzentration (MHK) basierende Grenzwerte etabliert (Zhang *et al.* 2021). Die MHK ist ein metrischer Wert, der die niedrigste Konzentration eines ABs beschreibt, die sichtbares Wachstum des Mikroorganismus auf einer Agarplatte oder in einer Flüssigkultur verhindert (CLSI-VET01 2018).

Klinische Grenzwerte von CLSI – Das *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) hat Grenzwerte entwickelt, die Bakterien in „suszeptibel“, „intermediär“ oder „resistent“ gegenüber einem AB einstufen, um die Wahrscheinlichkeit eines Therapieerfolgs nach standardmäßig erfolgter Dosierung zu bewerten (CLSI-VET05-R 2011; Zhang *et al.* 2021). CLSI-Grenzwerte beziehen sich daher immer auf eine definierte Kombination aus Pathogen, betroffener Tierart und spezifischer Erkrankung. Für die Veterinärmedizin sind aufgrund der lückenhaften Datenlage für viele Anwendungen keine CLSI-Werte festgelegt worden (BVL 2020).

ECOFF-Werte von EUCAST – *Epidemiological Cutoff* (ECOFF)-Werte wurden durch das *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST 2021) erarbeitet und werden vor allem in der EU verwendet (DART 2020 2015). Das System unterteilt Bakterienpopulationen gegenüber einem AB in Wildtyp- und Nicht-Wildtyp-Stämme. Letztere verfügen gegenüber dem AB über einen Resistenzmechanismus, der bakterielles Wachstum in AB-Konzentrationen oberhalb des ECOFF-Wertes erlaubt. So soll die Resistenzentwicklung von Bakterienstämmen in einem frühen Stadium detektiert werden (BVL 2020). Die Einteilung wird für jede Bakterienart auf Basis von Daten erstellt, die weltweit über einen großen Zeitraum hinweg ermittelt wurden. Der ECOFF-Wert liegt für die meisten AB unter dem CLSI-Grenzwert für „resistent“ (Martínez *et al.* 2015).

2.2.2 Erwerb und Transfer von Resistenzgenen

In Bakterien werden die Effekte von AB durch genetische Mechanismen ausgeglichen. Dazu zählen eine erhöhte Mutationsrate, verstärkte Rekombination und die Integration fremder DNA ins Genom (Baharoglu *et al.* 2010). Die veränderten Gene werden klonal an Tochterzellen weitergegeben oder über HGT auf andere Bakterien übertragen (Licht *et al.* 2005).

Resistenz-Mutation – Führen Mutationen, also Veränderungen in der Nukleotidsequenz, zu einem Aminosäureaustausch, so kann die Zielstruktur des ABs geändert oder direkt bzw. indirekt beeinflusst werden. Binden AB ihr Zielobjekt an einer spezifischen Stelle (Blair *et al.* 2015), kann bereits eine Mutation, die ein einzelnes Nukleotid betrifft, zur klinischen Resistenz führen (betrifft Chinolone, Sulfonamide, Trimethoprim; van Hoek *et al.* 2011).

Horizontaler Gentransfer – Bakterien können genetisches Material von anderen Bakterien akquirieren. Dieser HGT wird durch mobile genetische Elemente vermittelt. Im Mikrobiom des Gastrointestinaltrakts ist HGT aufgrund der dichten Besiedlung mit einer Vielzahl verschiedener Spezies ein effektiver und schneller Verbreitungsweg von RD (Barlow *et al.* 2008; Tenaillon *et al.* 2010; Volkova *et al.* 2012; Bakkeren *et al.* 2019). Dabei können die erworbenen RD über verschiedene Mechanismen transferiert werden. Bei der **Transformation** nimmt eine Bakterienzelle aktiv reine DNA aus der Umgebung auf (Licht *et al.* 2005; Riva *et al.* 2020). Ist die Zelle natürlich kompetent, wird die aufgenommene DNA anschließend in das Genom integriert oder als Plasmid in der Zelle erhalten und schließlich exprimiert (Fischer *et al.* 2001). Bei der **Transduktion** werden genomische DNA-Segmente oder mobile genetische Elemente durch Bakteriophagen vom Donor auf den Akzeptor übertragen (García-Aljaro *et al.* 2017). Phagen sind auch in der Umwelt sehr stabil, sodass sogar die Übertragung von DNA auf Bakterien in einem anderen Wirtsorganismus möglich ist (Stecher *et al.* 2013). Die **Konjugation** ist ein aktiver Prozess, bei dem die Kopie eines mobilen genetischen Elements nach seiner Verdoppelung durch direkten Kontakt zweier Bakterienzellen vom Donor auf den Akzeptor übertragen wird. Für den Transfer ist in gramnegativen Bakterien ein Konjugations-Pilus nötig (Carattoli 2011). Dieser wird von konjugativen Plasmiden oder Transposons kodiert, die auch nicht-konjugative Plasmide bzw. Transposons sowie chromosomale DNA aus der Donor-Zelle mobilisieren können (Salyers *et al.* 1997; Licht *et al.* 2005). Transformation und Transduktion spielen sich vor allem zwischen nah verwandten Bakterienspezies ab. Auch Konjugation ist zwar zwischen nah verwandten Spezies am erfolgreichsten, findet aber ebenso zwischen Bakterien verschiedener Spezies und Genera statt (Volkova *et al.* 2012; Volkova *et al.* 2013). Bei den *Enterobacteriaceae* im Darmmikrobiom trägt Konjugation am stärksten zum Gentransfer von RD bei (Barlow *et al.* 2008; Baharoglu *et al.* 2010). Transformation spielt aufgrund zahlreicher DNasen im

Mikrobiom hingegen eine untergeordnete Rolle (van den Eede *et al.* 2004; Stecher *et al.* 2013).

2.2.2.1 Gentransferelemente

Man unterscheidet konjugative von mobilisierbaren Elementen. Erstere kodieren die zum Transfer benötigten Proteine selbst, während letztere den Transferapparat von ko-residenten konjugativen Elementen verwenden (Wein *et al.* 2020).

Insertionssequenzen sind sehr kleine DNA-Elemente, die lediglich aus zwei identischen, gegenläufigen Sequenzmotiven (*inverted repeats*) und einem dazwischenliegenden Mobilisierungs-Gen (Transposase) bestehen (Poirel *et al.* 2003). **Nicht-konjugative Transposons** tragen zusätzlich akzessorische Gene wie z. B. RD (Partridge *et al.* 2018).

Sie sind meist sehr stabil und können sich durch DNA-Rearrangements an ihre Wirtszelle anpassen (Salyers *et al.* 1997). Transposons können ihren Integrationsort innerhalb eines DNA-Elements oder zwischen dem Chromosom und Plasmiden wechseln. Je nach Insertionsstelle und der Auswirkung auf die dort kodierten Gene bringen sie einen Fitnessvorteil oder -nachteil für die Wirtszelle (Enne *et al.* 2005). Durch HGT können sie passiv in eine andere Zelle transferiert werden (Licht *et al.* 2005; Barlow *et al.* 2008).

Konjugative Transposons hingegen transferieren eigenständig in eine neue Wirtszelle und können dabei auch andere mobile genetische Elemente in der Donor-Zelle mobilisieren (Partridge *et al.* 2018), da sie einen Transferursprung besitzen und Gene für Konjugations-Apparat sowie Integrase kodieren (García-Aljaro *et al.* 2017). Im Gegensatz zu Plasmiden besitzen sie aber keinen Replikationsursprung, sondern müssen zur Replikation im Chromosom oder in Plasmiden integriert sein. Da ihr Transferapparat nicht mit dem Replikationssystem der Zelle kompatibel sein muss, haben sie meist ein breiteres Wirtsspektrum als viele Plasmide (van Hoek *et al.* 2011).

Ein **Integron** besteht aus einer Integrase, einem Promotor und einer Integrationsstelle für Genkassetten. Dies sind nicht-replikative DNA-Elemente, auf denen meist mehrere Gene ähnlicher Funktion, wie z. B. RD, ko-lokalisiert sind (Baharoglu *et al.* 2010). Der gemeinsame Promotor kontrolliert die Expression der Genkassette(n), während die Integrase die Integration und Mobilisierung von Genen vermittelt (Licht *et al.* 2005). Integrons sind häufig auf Transposons oder Plasmiden kodiert, die sie in andere Zellen transferieren können (Deng *et al.* 2015). **Plasmide** sind meist zirkuläre DNA-Elemente, die im Gegensatz zu anderen mobilen genetischen Elementen frei in der Zelle vorliegen

und aufgrund ihres Replikationsursprungs autonom replizieren. Sie sind wenige Kilobasen (kB) bis, in Ausnahmefällen, mehrere Megabasen groß und kommen bei fast allen Bakterienspezies vor (Partridge *et al.* 2018; Rozwandowicz *et al.* 2018; Wein *et al.* 2020). Wie bei Transposons gibt es konjugative Plasmide, die Transfergene enthalten, und mobilisierbare Plasmide, die lediglich einen Transferursprung besitzen, mit dem sie den Transferapparat konjugativer Elemente nutzen können (Salysers *et al.* 1997). Neben den Genen für Konjugation und Mobilisierung enthalten Plasmide häufig RD, die einzeln oder assoziiert mit Insertionssequenzen, Transposons oder Integrons vorliegen (Partridge *et al.* 2018). Wegen der Ko-Lokalisation von RD gegen verschiedene AB-Klassen kann ein Stamm durch die Akquise eines einzigen Plasmids multiresistent, also resistent gegenüber mindestens einem Vertreter aus drei oder mehr verschiedenen AB-Klassen (Leverstein-van Hall *et al.* 2002; Magiorakos *et al.* 2012), werden (Barlow *et al.* 2008). Wie andere resistenzkodierende Elemente vermitteln auch Plasmide ihren Wirtszellen einen Fitnessnachteil, der aber häufig vernachlässigbar ist (Cottell *et al.* 2012) oder durch kompensatorische Mutationen im Plasmid bzw. Wirtsgenom sowie durch epistatische Veränderungen ausgeglichen werden kann (Loftie-Eaton *et al.* 2017). Zusätzlich haben Plasmide Mechanismen für die stabile Plasmidverbreitung entwickelt. So sorgen aktive Partitionssysteme bei der klonalen Weitergabe dafür, dass alle Tochterzellen eine Plasmidkopie enthalten (Rodriguez-Beltran *et al.* 2018; Daniel *et al.* 2020). Kodiert das Plasmid ein Toxin-Antitoxin-System, werden Plasmid-lose Tochterzellen durch ein Toxin abgetötet (Kamruzzaman *et al.* 2019). Darüber hinaus kommen die meisten Plasmide in mehrfacher Kopienzahl vor, um die Wahrscheinlichkeit des Transfers zu erhöhen. Damit dabei die metabolische Kompetenz der Wirtszelle nicht überlastet wird, kontrollieren Plasmide ihre Replikation (DeNap *et al.* 2005). Mehrere Plasmide mit derselben Replikationskontrolle können allerdings nicht stabil in einer Zelle koexistieren. Darauf basierend wurde eine Plasmid-Einteilung in Inkompatibilitätsgruppen (Inc) entwickelt. Sie gibt Aufschlüsse über die Verbreitung der Plasmide sowie der kodierten RD (Carattoli 2009; 2011). Auch Faktoren wie das Konjugationssystem, die Nutzung der Wirtsenzyme für die Replikation sowie Erhaltungsfunktionen haben Einfluss auf das Spektrum potenzieller Wirtszellen von Plasmiden (Licht *et al.* 2005; Partridge *et al.* 2018). Daher gibt es Plasmide mit breitem (IncN, IncP, IncL/M, IncA/C) und schmalem Wirtsspektrum (IncF, IncHI2, IncI1; Cantón *et al.* 2006).

2.2.3 Entwicklung der Resistenzproblematik

In den 1940er Jahren wurden die ersten AMR bei Bakterien gefunden. Dies wurde aufgrund der kontinuierlichen Entwicklung neuer antibiotischer Wirkstoffe allerdings nicht als bedeutsames Problem angesehen (Singer *et al.* 2003). Da seit 1987 jedoch keine neue AB-Klasse mehr entdeckt wurde (WHO 2015; Defraigne *et al.* 2018), während gleichzeitig weltweit eine steigende Prävalenz resistenter Bakterien beobachtet wird (Erb *et al.* 2007; Tadesse *et al.* 2012), reduziert sich das Spektrum wirksamer antibiotischer Therapeutika immer mehr (DART 2020 2015). Hinzu kommt, dass sich RD durch internationalen Handel, Migration und Reiseverkehr innerhalb kürzester Zeit weltweit verbreiten (Aarestrup 2005; Liebana *et al.* 2013; Pirolo *et al.* 2020; Bokhary *et al.* 2021). Darüber hinaus ist der Transfer von RD-tragenden Bakterienstämmen zwischen Tier und Mensch möglich, weil in Veterinär- und Humanmedizin häufig dieselben AB verwendet werden (WHO 2017b; ECDC & EFSA & EMA 2021). Mit Sorge wird daher die Übertragung resistenter zoonotischer Pathogene sowohl direkt vom Tier auf den Menschen als auch indirekt entlang der Lebensmittelkette betrachtet (van den Bogaard *et al.* 1999; Lazarus *et al.* 2015). Resistente Bakterien, die von Lebensmittel liefernden Tieren mit ihrem Kot ausgeschieden werden, können durch den Verzehr von Gemüse, das auf mit Gülle gedüngten Feldern wuchs, oder durch kontaminierte tierische Produkte auf den Endverbraucher übergehen (Witte 1998; Sengeløv *et al.* 2003; Poulin-Laprade *et al.* 2021). Die schnelle Anpassungsfähigkeit von Bakterien bietet dabei zusammen mit dem Selektionsdruck durch häufige AB-Anwendungen in unserer international verknüpften Welt eine explosive Mischung für die Entwicklung neuer sowie die Verbreitung bereits bestehender Resistenzmechanismen (Tenailon *et al.* 2010).

2.2.3.1 Maßnahmen zur Bekämpfung der Resistenzproblematik

Trotz der besorgniserregenden AMR-Situation steigt der Bedarf antibiotischer Therapien durch die Zunahme komplizierter medizinischer Interventionen und den demografischen Wandel sowie die wachsende Anzahl der zur Lebensmittelgewinnung gehaltenen Tiere (DART 2020 2015; Van Boeckel *et al.* 2015). Der Einsatz von AB ist allerdings der bedeutendste Einflussfaktor auf die Prävalenz und Verbreitung von AMR (Taylor *et al.* 2009; Chantziaras *et al.* 2014; Munk *et al.* 2018). Es droht eine globale Gesundheitskrise, in der bis zum Jahr 2050 eine jährliche Mortalitätsrate von 10 Millionen Menschen weltweit aufgrund resistenter Pathogene erwartet wird (O'Neill 2014),

weil einst einfach behandelbare Infektionen lebensbedrohliche Ausmaße erreichen können (Singer *et al.* 2003; Erb *et al.* 2007). Um dem entgegenzuwirken beauftragte die Weltgesundheitsorganisation ihre Mitgliedstaaten im Rahmen des „Global Action plan to tackle AMR“, nationale Strategien zur Prävention bakterieller Infektionen, zur Erforschung neuer Wirkstoffe und zur Optimierung des AB-Verbrauchs in Human- und Veterinärmedizin zu entwickeln (WHO 2015). Diese Optimierung zielt auf die Reduktion des AB-Einsatzes auf ein therapeutisch unerlässliches Maß ab (Lim *et al.* 2020). Deutschland folgt den Vorgaben der Weltgesundheitsorganisation mit der Deutschen Antibiotika-Resistenzstrategie (DART 2020 2015). In Abstimmung mit europäischen Programmen zur Überwachung des human- (ESAC-Net) und veterinärmedizinischen AB-Einsatzes (ESVAC 2021) wird deshalb auch hierzulande der AB-Verbrauch in der Human- (ARS 2021) und Tiermedizin (BVL 2021) kontrolliert.

Trotz der Bemühungen zur Reduktion des AB-Einsatzes muss die Möglichkeit einer antibiotischen Therapie erhalten bleiben (Apley *et al.* 1998; Wittum 2012). Für diese Fälle haben die Weltgesundheitsorganisation, die Europäische Arzneimittel-Agentur und die Weltorganisation für Tiergesundheit antibiotische Wirkstoffe für den nicht-menschlichen Gebrauch kategorisiert (siehe Tabelle 1). Die Weltgesundheitsorganisation hat AB hinsichtlich der Häufigkeit ihrer Anwendung in der Humanmedizin, alternativer Wirkstoffe und der Möglichkeit der zoonotischen AMR-Übertragung priorisiert. AB werden in wichtige (IA), sehr wichtige (HIA) und kritisch wichtige (CIA) Klassen eingeteilt, wobei bei letzterer die Unterscheidung in hohe (HPCIA) und höchste Priorisierung (HTPCIA) vorgenommen wurde. Die EMA hingegen unterscheidet AB nach ihrer Wichtigkeit für die Veterinärmedizin, der Resistenzentstehung und -verbreitung und den Konsequenzen, die die entsprechende AMR für die öffentliche Gesundheit haben könnte. Demnach sollen AB vermieden werden (A) und sind deshalb in der Veterinärmedizin nicht erlaubt, oder sie sollen nur eingeschränkt (B), vorsichtig (C) bzw. umsichtig genutzt werden (D; EMA – AMEG 2017). Kategorie D-Wirkstoffe stellen somit die therapeutischen AB der ersten Wahl dar. Die WOAH bewertet AB hinsichtlich ihrer Wichtigkeit für die Veterinärmedizin und der Möglichkeit veterinärmedizinischer Alternativtherapeutika als wichtig (VIA), sehr wichtig (VHIA) und kritisch wichtig (VCIA; OIE 2019). So soll der zunehmenden AMR-Prävalenz gegenüber Reserveantibiotika für die Humanmedizin bei Kommensalen und Pathogenen entgegengewirkt werden (DART 2020 2015).

Die Vorgaben der Deutschen Antibiotika-Resistenzstrategie (DART) 2020 für die Veterinärmedizin wurden 2014 in der 16. Arzneimittelgesetz-Novelle festgelegt und unter dem „AB-Minimierungskonzept“ zusammengefasst (BMJ 2014). Nach der Evaluierung des Konzepts wurden 2021 technische Änderungen in der 17. AMG-Novelle festgehalten (BMJ 2021). Zur Reduktion des AB-Einsatzes bei Masttieren wurde ein Bewertungssystem der antibiotischen Therapiehäufigkeit jedes Betriebs eingeführt. Liegt diese Therapiehäufigkeit im bundesweiten Vergleich über einer bestimmten Grenze, muss der Betrieb Maßnahmen zur Reduktion seiner antibiotischen Therapien ergreifen (DART 2020 2015; Noll *et al.* 2018). Darüber hinaus ermöglichte die 16. Arzneimittelgesetz-Novelle eine Änderung der Tierärztlichen Hausapothekenverordnung (TÄHAV). Das 2018 in Kraft getretene Gesetz sieht unter anderem die Limitierung des Einsatzes von CS3/4 und FQ in der Veterinärmedizin vor, indem diese Wirkstoffe nicht mehr umgewidmet und nur noch eingesetzt werden dürfen, wenn im Rahmen der Behandlung ein Antibiogramm durchgeführt wird (BMJ 2018).

2.2.3.2 Aktuelle Situation in Deutschland nach der 16. Arzneimittelgesetz-Änderung

In einem Bericht aus dem Jahr 2019 evaluierte das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft die bisherigen Auswirkungen der 16. Arzneimittelgesetz-Novelle (BMEL 2019). Der veterinärmedizinische AB-Verbrauch in Deutschland konnte seit 2011 um 59 % bzw. 1005 Tonnen gesenkt werden und lag im Jahr 2020 bei 701 Tonnen. Für CS3/4 wurde im gleichen Zeitraum eine Abnahme von 52 % bzw. 80 % verzeichnet, während die Verwendung von FQ um 22 % reduziert wurde. Vor allem in den Jahren 2017 bis 2019 verminderte sich der Einsatz dieser Wirkstoffe, was als Reaktion auf die TÄHAV-Änderung gedeutet wird (Gefeller *et al.* 2021). Auf Betrieben aller Größenordnungen hat sich zudem die Therapiehäufigkeit verringert, was bei schweinehaltenden Betrieben zusammen mit der Reduktion der antibiotischen Verbrauchsmengen besonders ausgeprägt war. Eine Aussage über die Auswirkungen dieser Reduktion auf die AMR-Situation in den Betrieben machte das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft wegen des kurzen Überwachungszeitraumes jedoch noch nicht (BMEL 2019). Dem nationalen Zoonosemonitoring und dem Resistenzmonitoring GERM-Vet ist lediglich eine Steigerung des Anteils vollständig suszeptibler *E. coli*-Isolate zu entnehmen (BVL 2018). Allerdings steht die Theorie, dass der verminderte Einsatz eines ABs automatisch zu einer niedrigeren Prävalenz der entsprechenden AMR führt,

unter Vorbehalt (Levin 2001; Singer *et al.* 2003; Enne *et al.* 2005). Auch das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit erkennt an, dass die alleinige Reduktion der antibiotischen Verbrauchsmengen die Komplexität der AMR-Problematik mit seinen vielen Einflussfaktoren nicht widerspiegelt (BVL 2016). So wurde die Persistenz von AMR nach Beendigung des Einsatzes spezifischer AB bereits in diversen Studien nachgewiesen (Nijssen *et al.* 2010; Sundqvist *et al.* 2010; Pakpour *et al.* 2012; Andersen *et al.* 2015; Verrette *et al.* 2019).

2.3 Persistenz von antimikrobiellen Resistenzen

2.3.1 Persistenz von Resistenzdeterminanten auf zellulärer Ebene

Die Persistenz einer AMR ergibt sich aus der Retention und Transmission der entsprechenden RD sowie Entstehung oder Erwerb neuer AMR-Mechanismen, die gegen das gleiche AB wirken (Erb *et al.* 2007; Call *et al.* 2013; Fjalstad *et al.* 2018; BVL 2020). Setzt man ein bestimmtes AB ein, so ist die Persistenz der dagegen gerichteten RD umso wahrscheinlicher, je größer der Selektionsdruck des ABs und je kleiner die Fitnesskosten der RD sind (Levin 2001; Sundqvist *et al.* 2010). Der Selektionsdruck wird durch die Wechselwirkung zwischen Bakterium und AB beeinflusst. Hinsichtlich des Bakteriums haben Mutations- sowie Wachstumsrate und die Fitness des Stammes einen Einfluss (Turnidge *et al.* 2005; Abraham *et al.* 2018), während hinsichtlich des ABs der Wirkmechanismus und der Anteil frei verfügbaren, bioaktiven Wirkstoffs entscheidend sind. Dieser wird von Pharmakokinetik- und -dynamik sowie Dosierung und Anwendungsart bestimmt (Apley *et al.* 1998; Pereira *et al.* 2014; Volkova *et al.* 2017). Je öfter Bakterien in Kontakt mit einem AB kommen, desto intensiver wird die entsprechende AMR selektiert (Call *et al.* 2013; Baker *et al.* 2018). Darüber hinaus wirken vor allem zu kurz angewandte AB und subletale AB-Konzentrationen stark selektiv (Salyers *et al.* 1997; Andremont 2003; Andersson *et al.* 2014; Amsler *et al.* 2021).

Die Fitnesskosten der RD können durch kompensatorische Mutationen aufgehoben werden, ohne den Grad der AMR zu beeinträchtigen (Andersson *et al.* 1999; Loftie-Eaton *et al.* 2017; Durao *et al.* 2018). Andere RD vermitteln von Natur aus nur sehr niedrige Fitnesskosten oder führen sogar zu einem Fitnessvorteil für das Bakterium (Levy 1997; Delsol *et al.* 2010; Volkova *et al.* 2013; Hansen *et al.* 2014), sodass AMR auch ohne antibiotischen Selektionsdruck vorkommen, erhalten bleiben und dadurch in Bakterienstämmen akkumulieren können (Singer *et al.* 2006; Sundqvist *et al.* 2010;

Pakpour *et al.* 2012; Fjalstad *et al.* 2018). Darüber hinaus können neben dem AB, gegen das eine RD wirkt, auch viele andere antibiotische Wirkstoffe Einfluss auf die Prävalenz und Weiterverbreitung dieser RD haben (Singer *et al.* 2006; Looft *et al.* 2012b), indem sie durch Kreuz-Resistenzen oder Ko-Selektion indirekt auf ihre Persistenz selektieren (Abraham *et al.* 2018; Burow *et al.* 2019; Van Gompel *et al.* 2019; Verrette *et al.* 2019).

Kreuz-Resistenz wird auch als „physiologische Kopplung“ bezeichnet und beschreibt RD, die AMR gegenüber mehreren verschiedenen AB-Klassen vermitteln (Bednorz *et al.* 2013). Dies trifft auf die meisten Effluxpumpen bzw. *multi-drug-transporter* zu. So vermittelt die Pumpe OqxAB z. B. verminderte Suszeptibilität gegenüber FQ, Fenicolen, β -Laktam-AB und Aminoglykosiden (Chang *et al.* 2021). Allerdings vermitteln auch spezifischere RD, wie *aac(6′)-Ib-cr*, Kreuz-Resistenz (siehe 2.5.1.2). Zudem gibt es Kreuz-Resistenzen innerhalb einer AB-Klasse. *Extended spectrum* β -Laktamasen (ESBL), zum Beispiel, vermitteln Resistenz gegenüber vielen verschiedenen β -Laktam-AB, da diese sich strukturell ähneln (Persoons *et al.* 2011; Agersø *et al.* 2014).

Ko-Selektion wird auch als „genetische Kopplung“ bezeichnet (Bednorz *et al.* 2013) und liegt vor, wenn RD gegen verschiedene AB(-Klassen) auf demselben mobilen genetischen Element kodiert sind (Aarestrup 2005). Oft sind sie dabei auch mit RD gegenüber (Schwer-)Metallen ko-lokalisiert (Baker-Austin *et al.* 2006; Gullberg *et al.* 2014). Wird ein AB eingesetzt, gegen das eine der RD eine Resistenz vermittelt, erhält sich das gesamte mobile genetische Element und damit auch die anderen damit assoziierten RD (Levin *et al.* 1997; Singer *et al.* 2003; Pakpour *et al.* 2012). Ko-Selektion trägt daher in erheblichem Maß zur Entstehung und Verbreitung von Multiresistenz bei, die wiederum zur Persistenz von AMR führt (Andersen *et al.* 2015; Dorado-Garcia *et al.* 2016).

2.3.2 Persistenz von antimikrobiellen Resistenzen in einer Tierhaltung

So wie sich RD bzw. die mobilen genetischen Elemente, auf denen sie kodiert sind, auch ohne den entsprechenden antibiotischen Selektionsdruck in der mikrobiellen Population erhalten können, können auch resistente Bakterienstämme ohne den Einsatz des entsprechenden ABs in einer Tierpopulation oder einem Stallgebäude persistieren (Wittum 2012; Fleury *et al.* 2015; Abraham *et al.* 2018; Kaspersen *et al.* 2020a; Poulin-Laprade *et al.* 2021). Unter Persistenz versteht man dabei den wiederholten Nachweis molekular sehr ähnlicher mobiler genetischer Elemente bzw. Stämme über

einen gewissen Zeitraum (Wang *et al.* 2020). Eine AMR kann durch das wiederholte Einbringen resistenter Stämme erhalten bleiben. Dies kann auf der Ebene der Tierpopulation stattfinden, indem mit resistenten Stämmen besiedelte Tiere zugekauft werden (Taylor *et al.* 2009). Auch Elterntiere, die noch mit dem entsprechenden AB behandelt werden, können resistente Stämme kontinuierlich an ihre Nachfahren weitergeben, wie für die Geflügelhaltung gezeigt wurde (Zurfluh *et al.* 2014; Dame-Korevaar *et al.* 2017). Auf der Ebene der Stallumgebung können Mitarbeiter, Transportfahrzeuge, Futtermittel, Gewässer, Nagetiere, Insekten oder Wildvögel als Überträger von AMR dienen (Marshall *et al.* 1990; Shere *et al.* 1998; Taylor *et al.* 2009; Lim *et al.* 2010; Pakpour *et al.* 2012; Walsh 2018). Allerdings können AMR auch in einzelnen Tieren der Tierpopulation persistieren, wenn resistente Stämme erfolgreich, z. B. gastrointestinale, Nischen besiedeln, aus denen sie nicht verdrängt werden. Diese Nischen entstehen aus einem Zusammenspiel von Wirtsfaktoren und der Fitness der Stämme (Giles *et al.* 2018; Wang *et al.* 2018; 2020). Alternativ erhält sich die RD nicht in einem spezifischen Stamm, sondern ist auf einem sehr stabilen mobilen genetischen Element mit breitem Wirtsspektrum kodiert, das seine Trägerstämme durch HGT wechselt und so zur Persistenz der RD beiträgt (Johnson *et al.* 2011; Cottell *et al.* 2012; Volkova *et al.* 2012; Hansen *et al.* 2014; Lambrecht *et al.* 2018). Ein resistenter Stamm oder ein resistenztragendes mobiles genetisches Element kann sich allerdings auch durch Zirkulation zwischen verschiedenen Tieren einer Population und der Stallumgebung erhalten (Usui *et al.* 2014; Fleury *et al.* 2015). Die hohe Populationsdichte auf engem Raum, die die moderne Tierhaltung in den meisten Haltungsformen vorsieht, schafft dafür optimale Bedingungen (Wittum 2012; Volkova *et al.* 2013; Ramesh *et al.* 2021). RD werden durch direkten Kontakt der Tiere oder über Kontaminationsquellen im Stall, an denen sich die Tiere reinfizieren, weitergegeben (Shere *et al.* 1998; Cameron-Veas *et al.* 2015; Wang *et al.* 2018). Auch die Aerosol-Übertragung resistenter Bakterien, die Stallstaub-Partikeln anhaften, wurde bereits nachgewiesen (Römer *et al.* 2017). Die fäkale Ausscheidung resistenter Bakterien und damit die Kontamination der Stallumgebung wird durch Stress gefördert, der die Darmmotilität erhöht (Mathew *et al.* 2003) und unter anderem durch sehr hohe oder niedrige Temperaturen (Moro *et al.* 1998; MacFadden *et al.* 2018), Transport (Langlois *et al.* 1999), Futterwechsel oder nicht-artgerechte Futterzusammensetzung ausgelöst wird (Lallès *et al.* 2004).

Die Aufnahme von resistenten Stämmen aus den Ausscheidungen anderer Tiere kommt bei koprophagen Tieren wie Schweinen, mit ihrem ausgeprägten Bedürfnis zu wühlen, besonders zum Tragen (Steenhard *et al.* 2000). Zusätzlich gibt es *super-shedder* Tiere, die bestimmte Stämme auch ohne äußere Einflüsse besonders stark ausscheiden und somit schnell und effektiv in der Umwelt verbreiten (Horton *et al.* 2011; Fleury *et al.* 2015). Neben AB gibt es zudem weitere, nicht-antibiotische Substanzen in der Stallumgebung, die zum Erhalt von RD beitragen können. Dazu gehören Metalle wie Kupfer und Zink, die dem Tierfutter als Mikronährstoffe zugesetzt werden und RD ko-selektieren (Pakpour *et al.* 2012; Bednorz *et al.* 2013). Aber auch Wirkstoffe aus Reinigungs- und Desinfektionsmitteln können RD indirekt selektieren (Nhung *et al.* 2015; Kampf 2018).

2.3.2.1 Dynamik des Auftretens resistenter Bakterien im Darm von Schweinen bis zur Schlachtreife

Trotz der Persistenz von AMR in einem Bestand weist das Mikrobiom älterer Schweine oft eine niedrigere AMR-Prävalenz als das jüngerer Schweine auf (Hansen *et al.* 2013; Dohmen *et al.* 2017; Burow *et al.* 2019; Amsler *et al.* 2021). Das gastrointestinale Mikrobiom junger Tiere wird maßgeblich vom Mikrobiom des Muttertiers sowie den Bakterien in der Umwelt geprägt (Callens *et al.* 2015; Chen *et al.* 2018). Zusätzlich wird es durch die Fütterung beeinflusst, weshalb man bei Saugferkeln von einem Milch-orientierten Mikrobiom spricht (Frese *et al.* 2015). Dies ist teils noch unbalanciert und damit anfälliger für stressbedingte Veränderungen physiochemischer Art (Mathew *et al.* 1996a; b; Bednorz *et al.* 2013), durch die resistente *Enterobacteriaceae* aufblühen und vermehrt ausgeschieden werden können (Stecher *et al.* 2013; Looft *et al.* 2012b). Auslöser von Stress können die Kastration (Reiner *et al.* 2012), das Absetzen (Xiong *et al.* 2019) oder Temperaturmaxima sein, für die Jungtiere sensibler sind (Moro *et al.* 1998; Mathew *et al.* 2003). Aufgrund dieser Anfälligkeit und der dadurch häufig ausgelösten Dysbiosen werden junge Schweine öfter pro- oder metaphylaktisch behandelt (Mathew *et al.* 2003; Sjölund *et al.* 2016; Fjalstad *et al.* 2018). Die Zusammenstellung von Läufer-schweinen verschiedener Muttertiere zu Mastgruppen nach dem Absetzen und der damit verbundene Kontakt zu einer Vielzahl neuer Bakterien löst zusätzlichen Stress bei jungen Schweinen aus (Coutellier *et al.* 2007). Einer dadurch ermöglichten Ausbreitung von Infektionserregern wird häufig mit vermehrtem AB-Einsatz begegnet (Sarrazin *et al.* 2019; Kyung-Hyo *et al.* 2020). Dabei nimmt die Diversität des Resistoms durch den

antibiotischen Selektionsdruck zu (Mencía-Ares *et al.* 2020), während die Diversität des Mikrobioms abnimmt (Looft *et al.* 2012b), was häufig mit der Reduktion der Anzahl protektiver kommensaler Anaerobier einhergeht. Dies kann die Reifung des Immunsystems beeinträchtigen (Becattini *et al.* 2016), was einen negativen Einfluss auf die Gesundheit des Tieres und damit wiederum auf die Behandlungshäufigkeit sowie die Frequenz der Ausscheidung resistenter Fäkalbakterien hat (Fjalstad *et al.* 2018). Trotzdem nimmt die AMR-Prävalenz mit steigendem Alter der Tiere meist ab (Cameron-Veas *et al.* 2015; Poulin-Laprade *et al.* 2021) und die Diversität resistenter Stämme sinkt (Hansen *et al.* 2014). Dies liegt unter anderem am niedrigeren Einsatz von AB bei Masttieren, die aufgrund der Wartezeit häufig nur am Einzeltier angewendet werden (Abraham *et al.* 2018). Zudem sind die Tiergruppen ab dem Läuferalter meist stabiler, und es kommt seltener zum Kontakt mit unbekanntem Tieren. Darüber hinaus können Stämme durch natürliche Umbauprozesse auch unabhängig von den von ihnen kodierten AMR aufkommen bzw. verschwinden (Lu *et al.* 2018; Wang *et al.* 2019). So ändert sich das Mikrobiom von Saugferkeln nach dem Absetzen in seiner Zusammensetzung (Frese *et al.* 2015), wodurch z. B. der Anteil an *Enterobacteriaceae*, die viele und sehr diverse RD aufweisen, abnimmt (Pärnänen *et al.* 2018; Chen *et al.* 2018; Poirel *et al.* 2018; Wang *et al.* 2019).

2.4 *Escherichia coli*

Die Dynamik sowie Persistenz von AMR lässt sich mit einem ubiquitär vorhandenen Modellorganismus wie *E. coli* (Riva *et al.* 2020), der als kommensales AMR-Reservoir dienen kann und intensivem Gentransfer unterliegt, ausgezeichnet abbilden (Mathers *et al.* 2015; Poirel *et al.* 2018). Das 1885 erstmals vom Mikrobiologen Theodor Escherich isolierte, gramnegative Bakterium *E. coli* gehört der Familie der *Enterobacteriaceae* (Riley 2020) aus der Klasse der Gammaproteobakterien an. Das *E. coli* K-12-Genom besteht aus circa 4721 Genen (Tenaillon *et al.* 2010) und setzt sich aus einem Kerngenom von etwa 1700 Genen zusammen, das allen bisher sequenzierten *E. coli* Isolaten gemein ist (Kaas *et al.* 2012). Das Pangenom von *E. coli*, also alle Gene, die bei dieser Spezies bisher sequenziert wurden, umfasst allerdings mindestens 43.415 Gene. Da sich diese Zahl bei jeder neuen Sequenzierung erhöht, spricht man von einem offenen Pangenom (Riley 2020). Zudem machen auf mobilen genetischen Elementen kodierte Gene mehr als 20 % des Genoms aus. Beides ist ein Hinweis auf die große Variabilität eines von ständiger Anpassung und Diversifikation geprägten Genoms (Stecher *et al.* 2013).

2.4.1 Vorkommen und Typisierung von *E. coli*-Stämmen

Das stäbchenförmige Bakterium ist Bestandteil der Darmflora von Reptilien sowie warmblütigen Tieren einschließlich des Menschen und wird mit ihrem Kot ausgeschieden (Tenailon *et al.* 2010). Im Darm ist es das häufigste fakultativ anaerobe Bakterium, wird aber in der Populationsstärke von Anaerobiern weit übertroffen (Stecher *et al.* 2013). *E. coli* hat eine klonale Populationsstruktur (Clermont *et al.* 2021), ein Wirtsorganismus ist aber meist polyklonal kolonisiert (Ludden *et al.* 2021). *E. coli* sind gut an die ökologische Nische des Gastrointestinaltrakts angepasst und leben im der Darmwand aufgelagerten Mukus (Nedialkova *et al.* 2014). Enterische *E. coli* sind meist kommensal, allerdings gibt es auch human- und tierspezifische Pathovare, welche in intestinale (InPEC) und extraintestinale Pathogene (ExPEC) unterteilt werden (Kaper *et al.* 2004). Aufgrund dieser Pathogenität und der Übertragbarkeit zwischen Mensch und Tier zählt *E. coli* zu den zoonotischen Erregern (Bernreiter-Hofer *et al.* 2021). *E. coli*-Stämme, die das Shigatoxin Stx2e kodieren, sind für den Menschen ungefährlich, verursachen aber die porcine Colibazillose sowie die Ödemkrankheit des Schweins (Casanova *et al.* 2018; Baldo *et al.* 2020). Diese und weitere Erkrankungen durch pathogene *E. coli*-Stämme können in der Schweinehaltung hohe Morbidität als auch Mortalität verursachen und gehen häufig mit großen wirtschaftlichen Schäden einher (Kaufmann *et al.* 2006; Luyckx *et al.* 2016).

Mittels diverser Methoden kann ein Bakterium als zugehörig zur Spezies *E. coli* typisiert werden (MALDI-TOF Analyse, Vollgenomsequenzierung, MLST). Auch für die Subtypisierung wurden verschiedene Methoden entwickelt. Kauffmann schlug 1947 ein serologisches Schema vor, demzufolge Organismen anhand ihrer Polysaccharid-Seitenketten (O-Antigen), ihres Kapselantigens (K) oder ihres Flagellen-Proteins (H-Antigen) differenziert werden (Fratamico *et al.* 2016). Anhand bestimmter Virulenzgene wurden *E. coli* außerdem in Pathovare eingeteilt (Riley 2020). Daran anschließend erstellten Ochman and Selander 1984 eine Referenzkollektion aus 72 kommensalen und pathogenen *E. coli*-Stämmen (*E. coli reference strain collection*; ECOR-Kollektion), die basierend auf der Diversität ihrer Allele an elf Enzym-Genloci ausgewählt wurden (Ochman *et al.* 1984). Diese Sammlung sollte die genotypische Varianz der bis dahin bekannten *E. coli*-Population darstellen und wird bis heute zu diesem Zweck verwendet. Basierend auf der ECOR-Kollektion wurde 2000 eine PCR entwickelt, die *E. coli*-Stämme

anhand der An- bzw. Abwesenheit bestimmter Gene kommensal- oder pathogen-assoziierten Phylogruppen zuordnet (Clermont *et al.* 2000). Im Jahr 2010 wurde die PCR ausgeweitet, sodass nun die Phylogruppen A, B1, B2, C, D, E, F und *clade* 1 unterschieden werden (Clermont *et al.* 2013). Im Darm von Omni- und Herbivoren ist die vorherrschende Phylogruppe B1, gefolgt von A und B2 sowie D (Tenaillon *et al.* 2010). Stämme aus den Phylogruppen A und B1 sind meist Kommensalen, während B2- und D-zugehörige Stämme vornehmlich den ExPEC zugeschrieben werden (Clermont *et al.* 2000; Meunier *et al.* 2010). Diese gelten als Erreger von Septikämien, Meningitiden und Urogenitalinfektionen (Kaper *et al.* 2004; Kaas *et al.* 2012). Phylogruppe E wird einer erfolgreichen humanen enterohämorrhagischen *E. coli*-Linie zugeordnet und enthält weitere InPEC-Stämme, wurde aber auch bereits aus Schweinen isoliert (Clermont *et al.* 2021; Poulin-Laprade *et al.* 2021). Allerdings ist zu bedenken, dass die phylogenetische Klassifizierung in pathogene und kommensale Stämme auch Ausnahmen kennt und daher vorsichtig verwendet werden sollte (Riley 2020). Stämme der Phylogruppen A und D tragen besonders häufig Resistenzgene, während Stämme der Gruppe B2 meist weniger RD tragen (Cantón *et al.* 2006; Tenaillon *et al.* 2010).

2.4.2 *E. coli* als Donor- und Akzeptorstamm von Resistenzdeterminanten

Unter antibiotischem Selektionsdruck nimmt der Anteil enteraler *E. coli*, die gegen das angewandte AB resistent sind, rasant zu (Looft *et al.* 2012b). Dies liegt unter anderem an der dann fehlenden Kolonisierungsresistenz anderer, suszeptibler Bakterien, deren Nischen *E. coli* kurzfristig einnimmt (Looft *et al.* 2012a). Während dieser Bakterien-Blüten kommt es zu intensivem HGT, da Plasmide effizienter von schnell wachsenden Donorzellen wie *E. coli* transferiert werden (Blake *et al.* 2003; Licht *et al.* 2005; Stecher *et al.* 2013). *E. coli* sind darüber hinaus zu einer Vielzahl an Gentransfermechanismen mit anderen Stämmen des enterischen Mikrobioms fähig, weshalb sie ein großes Reservoir für RD darstellen und häufig multiresistent sind (Mathers *et al.* 2015; Poirel *et al.* 2018). In den letzten Jahren haben sich daher immer mehr AMR-Überwachungsprogramme auf resistente kommensale Bakterien fokussiert (Aarestrup 2004).

2.4.3 *E. coli* als Indikatorkeim für die Resistenzsituation in einer Population

E. coli zählt zu den am besten erforschten Modellorganismen, weil Bakterien dieser Spezies im Kot zahlreicher Tierarten vorkommen und leicht zu isolieren sowie zu kultivieren sind (Tenaillon *et al.* 2010). So ist ein Vergleich der Daten mit vielen anderen

Forschungsprojekten möglich. Zusätzlich ist *E. coli* wegen der großen Diversität der RD, die man bereits bei dieser Spezies nachweisen konnte, auch der am häufigsten verwendete AMR-Modellorganismus (Poirel *et al.* 2018). Darüber hinaus vermutet Andremont, dass die Überwachung der AMR-Situation in pathogenen Populationen die Resistenzproblematik unterschätzt, da sich RD schneller in Kommensalen entwickeln und anschließend länger erhalten bleiben (Andremont 2003). Dies ist darin begründet, dass Kommensalen bei jeder antibiotischen Therapie einem Selektionsdruck unterliegen, während die meisten Pathogene nur zum Zeitpunkt der Infektion vorhanden sind. Im Falle prophylaktischer oder metaphylaktischer Behandlungen sowie bei falschen Diagnosen ist das Zielpathogen im behandelten Organismus unter Umständen gar nicht vorhanden. Zuletzt beziehen sich Dosierungsempfehlungen immer auf die zu erreichende AB-Konzentration im Zielorgan. Ob dabei allerdings subtherapeutische Dosen die kommensale Population im Darm erreichen, wird meist vernachlässigt (Volkova *et al.* 2017). Daher beproben sowohl das AMR-Monitoring von EFSA und ECDC (EFSA & ECDC 2019) als auch das deutsche Pendant des Bundesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL 2018) kommensale *E. coli*, um die Neuentstehung und Weiterverbreitung von RD sowie ihre Übertragung auf Pathogene frühzeitig zu erkennen (Sunde *et al.* 1998; van den Bogaard *et al.* 1999; Blake *et al.* 2003; Erb *et al.* 2007; Tadesse *et al.* 2012) und den Transfer von RD entlang der Lebensmittelkette darzustellen (WHO 2017a).

2.5 Fluorchinolon-Resistenz

2.5.1 Resistenzmechanismen gegenüber Fluorchinolonen

Verminderte Suszeptibilität gegenüber FQ entsteht zum einen durch chromosomale Mutationen in den Zielgenen der FQ, die eine klinische Resistenz vermitteln (Huseby *et al.* 2017), und zum anderen durch überwiegend Plasmid-kodierte Determinanten, die den FQ-MHK-Wert erhöhen, aber nicht zur Resistenz führen (Chang *et al.* 2021).

2.5.1.1 Chromosomal-kodierte Fluorchinolonresistenz

Mutationen in den Chinolonresistenz-bestimmenden Regionen

Die Chinolonresistenz-bestimmenden Regionen (Englisch: *quinolone resistance-determining region* (QRDR)) sind Sequenzabschnitte in den chromosomal-kodierten Genen der A- (*gyrA*) und B-Untereinheit (*gyrB*) der DNA-Gyrase sowie der Topoisomerase IV (*parC* und *parE*), in denen Mutationen, die eine FQ-Resistenz vermitteln, gefunden

wurden (Fabrega *et al.* 2009; Karczmarczyk *et al.* 2011). Da FQ diese Enzyme an einer spezifischen Stelle binden, reicht schon eine Punktmutation in der QRDR mit anschließender Änderung der Aminosäuresequenz aus, um eine intermediäre Suszeptibilität gegenüber FQ zu bewirken (Vila *et al.* 1994; Marcusson *et al.* 2009; Call *et al.* 2013). Häufig kommt es aber zur Akkumulation von Mutationen in der QRDR (Zurfluh *et al.* 2015). Dabei gibt es eine positive Korrelation zwischen der Anzahl an Mutationen und dem FQ-MHK-Wert. So sind Stämme mit zwei Mutationen meist, Stämme mit drei oder mehr Mutationen fast immer FQ-resistent (Marcusson *et al.* 2009; Chang *et al.* 2021).

Da bei gramnegativen Bakterien die DNA-Gyrase die Haupt-Zielstruktur von FQ ist, werden Mutationen zuerst und am häufigsten in *gyrA* (S83L / F / Y oder D87N / Y / G) gefunden (Tyson *et al.* 2015; Correia *et al.* 2017). Mutationen in *parC* (S80I / R oder E84V / G / K) und *parE* (z. B. L416F oder S458A) treten oft zusätzlich auf und sind am zweit- bzw. dritthäufigsten. Mutationen im *gyrB*-Gen sind selten (Lim *et al.* 2010; Qin *et al.* 2015). Nach Mutanten mit ausschließlich einer *gyrA*-Mutation werden am zweithäufigsten Stämme mit Doppelmutationen vorgefunden (*gyrA* + *parC* / *parE*; Kaspersen *et al.* 2020b). Es können auch mehrere Mutationen in demselben Gen auftreten (Fabrega *et al.* 2009; Marcusson *et al.* 2009).

Mutationen in AcrAB-TolC

AcrAB-TolC kodiert in *E. coli*-Stämmen eine Effluxpumpe mit breitem Substratspektrum. Ihre Expression wird normalerweise durch einen spezifischen (AcrR) oder globalen (MarR) Repressor verhindert (Karczmarczyk *et al.* 2011; Blair *et al.* 2015; Correia *et al.* 2017). Durch Mutationen in diesen Genen wird die AcrAB-TolC-Pumpe vermehrt exprimiert (Cheng *et al.* 2020), was die Suszeptibilität gegenüber FQ etwas vermindert und die Entstehung von QRDR-Mutanten fördert (Chang *et al.* 2021).

2.5.1.2 Plasmid-kodierte Fluorchinolon-Resistenzdeterminanten

Der Begriff PMQR (englisch: *plasmid-mediated quinolone resistance*) umfasst Gene, die durch HGT verbreitet werden und den FQ-MHK-Wert auf ein Niveau oberhalb des ECOFF-Wertes erhöhen, aber meist nicht zur klinischen FQ-Resistenz führen. Allerdings begünstigen sie durch die verminderte Suszeptibilität Mutationen in der QRDR, weshalb sie fortan als *enabler* bezeichnet werden (Fabrega *et al.* 2009; Rodríguez-Martínez *et al.* 2011; Poirel *et al.* 2012; Qin *et al.* 2015). Teilweise werden mehrere PMQR-Gene in

einem Stamm vorgefunden, deren synergistischer Effekt den Stamm auch ohne Mutationen in der QRDR klinisch FQ-resistent machen kann (Chang *et al.* 2021).

qnr (*quinolone-resistance*) – Diese Gene kodieren ein *pentapeptide repeat* Protein, das durch seine Bindung an den Komplex aus DNA-Gyrase bzw. Topoisomerase IV und FQ die Enzyme vor der Wirkung des ABs schützt (Blair *et al.* 2015). Es gibt sechs Varianten des Gens: *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS* und *qnrVc*; wobei letzteres bisher nur im Chromosom von *Vibrio cholera* detektiert wurde (Fonseca *et al.* 2008). Qnr-Träger haben einen Enrofloxacin-MHK-Wert von circa 0,25 µg/ml (Robicsek *et al.* 2006).

aac(6′)-Ib-cr – Die Aminoglykosid-Acetyltransferase vermittelt durch enzymatische Inaktivierung des ABs neben der Resistenz gegenüber Aminoglykosiden auch verminderte Suszeptibilität gegenüber Ciprofloxacin (Fabrega *et al.* 2009; Zurfluh *et al.* 2015).

qepA und oqxAB – FQ-Resistenz wird in geringem Maß auch durch die Plasmid-kodierten Effluxpumpen aus der *major facilitator* Superfamilie (QepA1 und QepA2) sowie *multidrug*-Transporter aus der RND Familie (OqxAB) vermittelt. OqxAB kommt allerdings selten vor (Rodríguez-Martínez *et al.* 2011; Qin *et al.* 2015).

2.5.2 Epidemiologie und Einflussfaktoren

Seit der Jahrtausendwende wird weltweit ein steter Anstieg der FQ-Resistenzprävalenz verzeichnet (Erb *et al.* 2007), zu der vor allem resistente *Enterobacteriaceae*-Stämme beitragen (EFSA & ECDC 2021). Den größten Einfluss auf die Prävalenz dieser Resistenz hat der Einsatz von FQ selbst (Taylor *et al.* 2009; Pereira *et al.* 2014; Römer *et al.* 2017; Amsler *et al.* 2021), die schon in niedrigen Konzentrationen stark selektiv wirken (Wiuuff *et al.* 2003; Huseby *et al.* 2017). Dennoch treten spontane Doppelmutationen selten auf (Zhao *et al.* 1997). Allerdings haben FQ einen mutagenen Effekt, der mit der Effektivität des Wirkstoffs steigt. Durch die Blockade der Gyrase bzw. Topoisomerase häufen sich einzelsträngige DNA-Bereiche an, in denen vermehrt Deletionen, Rekombinationen und Mutationen auftreten (Gocke 1991; Qin *et al.* 2015). Zusätzlich führt der erhöhte Gehalt einzelsträngiger DNA zur Aktivierung des SOS-Systems der Zelle (Correia *et al.* 2017), was Reparatur-DNA-Polymerasen aktiviert, die fehleranfällig sind und ebenfalls mit erhöhter Mutationsrate einhergehen. Das SOS-System fördert zudem HGT, was die Verbreitung von PMQR anregen könnte, die wiederum die Entstehung der FQ-Resistenz erleichtern (Qin *et al.* 2015).

FQ-Behandlungen von Einzeltieren haben Auswirkungen auf ihre Kontakttiere, da Urin und Fäzes hohe Mengen noch aktiven Wirkstoffs enthalten (Wiuff *et al.* 2003; Römer *et al.* 2017). Gleichzeitig wird die Stallumgebung, inklusive Tränken und Futtertrog, mit FQ-resistenten Stämmen aus den Ausscheidungen der behandelten Tiere kontaminiert, an denen sich unbehandelte Tiere infizieren (Usui *et al.* 2014; Amsler *et al.* 2021). Dass auch nach Beendigung der FQ-Behandlung lange Zeit eine hohe Resistenzprävalenz messbar ist, wird mit der Persistenz resistenter Stämme im Mikrobiom der Tiere oder im Stall erklärt (Römer *et al.* 2017; Kaspersen *et al.* 2020b). Dazu kann die lange Halbwertszeit von FQ beitragen (Amsler *et al.* 2021), deren Metabolite nachhaltig die Entwicklung bzw. Vermehrung von FQ-resistenten Mutanten und den Austausch von PMQR-Genen bei Bakterien in der Umwelt und im Mikrobiom der Kontakttiere selektieren (Burow *et al.* 2019).

Allerdings wurden FQ-Resistenzen auch auf Betrieben detektiert, die diese AB zuvor nicht eingesetzt haben (Taylor *et al.* 2009). Das kann daran liegen, dass die Fitness eines Stammes nicht mit der Anzahl der FQ-Resistenzmutationen abnimmt, sondern diese teils sogar einen Fitnessvorteil vermitteln (Huseby *et al.* 2017). Stämme mit zwei oder drei Mutationen können dabei eine bessere Fitness als Wildtyp-Stämme haben, weshalb ihre Präsenz auch in Abwesenheit weiterer FQ-Exposition selektiert wird (Marcusson *et al.* 2009). Gleichzeitig können PMQR-Gene ins Chromosom der Stämme integriert werden, was die Suszeptibilität gegenüber FQ weiter vermindert, die Fitness sowie Stabilität des Resistenz-Phänotyps aber erhöht (Chang *et al.* 2021). Diese kompensatorischen Mechanismen und die Selektion von Mutationen mit niedrigen Kosten können dazu führen, dass Stämme teilweise auch ohne antibiotischen Selektionsdruck FQ-resistent werden und bleiben (Marcusson *et al.* 2009). Außerdem führt die Ko-Selektion von PMQR-Genen, die häufig auf Multiresistenz-Plasmiden lokalisiert sind, dazu, dass die verminderte FQ-Suszeptibilität auch ohne den Einsatz von FQ erhalten bleibt und verbreitet wird (Paterson 2006; Rodríguez-Martínez *et al.* 2011; Pereira *et al.* 2014).

2.6 Cephalosporin-Resistenz

2.6.1 Resistenzmechanismen gegenüber Cephalosporinen

Die Resistenz gegenüber CS wird wie auch bei anderen β -Laktam-AB meist durch Enzyme vermittelt, die den β -Laktam Ring irreversibel zerstören (Zurfluh *et al.* 2015) und als β -Laktamasen bezeichnet werden (Schink *et al.* 2011). Diese sind vor allem bei *Enterobacteriaceae* weit verbreitet (Witte *et al.* 2003; Volkova *et al.* 2012) und lassen sich je nach Zusammensetzung des aktiven Zentrums in Serin- und Metallo- β -Laktamasen einteilen (Ambler 1980; Bush *et al.* 2010). Entsprechend des Ziel-ABs unterscheidet man Penicillinasen, Cephalosporinasen und Carbapenemasen.

2.6.1.1 ESBL

Extended spectrum β -Laktamasen sind in der Lage, sowohl (Amino-)Penicilline als auch Monobaktame und Oxyimino-CS zu spalten (Schink *et al.* 2011; Ewers *et al.* 2021), werden aber durch β -Laktamase-Inhibitoren wie Clavulansäure oder Tazobactam gehemmt (Lucas *et al.* 2018). In den meisten Fällen sind ESBL Varianten von β -Laktamasen der Ambler-Klasse A (bla_{TEM-1} und -2 , bla_{SHV-1} , bla_{CTX-M}) bzw. D (bla_{OXA} ; Pfeifer *et al.* 2010; BIOHAZ 2011; Geser *et al.* 2011). Im Folgenden werden die in Europa am häufigsten vorkommenden ESBL-Gene, die meist Plasmid-kodiert sind, vorgestellt (Cavaco *et al.* 2008; BIOHAZ 2011):

bla_{TEM} und bla_{SHV} – β -Laktamasen wie bla_{TEM-1} und bla_{TEM-2} sowie bla_{SHV-1} hydrolysieren Penicilline und frühe CS (z. B. Cefalotin). Ihre ESBL-Varianten (z. B. bla_{TEM-3} , bla_{SHV-5}) weisen aufgrund von Mutationen Aminosäure-Austausche in ihrem aktiven Zentrum auf, wodurch sich ihre β -Laktam-Bindungsstelle und damit ihr Substratspektrum zum ESBL-Phänotyp erweitert (Witte *et al.* 2003; Geser *et al.* 2011).

bla_{CTX-M} – Cefotaximase- β -Laktamasen spalten vornehmlich Cefotaxim, vermitteln aber Resistenz gegenüber Cephalosporinen aller Generationen (Saravanan *et al.* 2018), und gehören dem ESBL-Typ an. Sie wurden mehrfach und zu verschiedenen Zeitpunkten unabhängig voneinander aus dem Genom verschiedener *Kluyvera*-Arten, einer Bodenbakterienspezies, mobilisiert (Pfeifer *et al.* 2010; Blair *et al.* 2015). bla_{CTX-M} lassen sich in fünf phylogenetische Gruppen einteilen, von denen Vertreter der $bla_{CTX-M-1}$ - und $bla_{CTX-M-9}$ -Gruppen in Europa von Bedeutung sind (Bonnet 2004; Cantón *et al.* 2006).

***bla*_{OXA}** – Oxacillinasen gehören zu den Ambler-Klasse D- β -Laktamasen. Sie werden weniger effizient durch β -Laktamase-Inhibitoren gehemmt, haben dafür aber eine schwächere Wirkung gegenüber Penicillinen und frühen CS (Witte *et al.* 2003; Evans *et al.* 2014). Wie bei *bla*_{TEM} und *bla*_{SHV} gibt es auch hier mutierte Vertreter, die den ESBL zugeschrieben werden (*bla*_{OXA-2}, *bla*_{OXA-10}; Bergspica *et al.* 2020). Zur pandemischen Verbreitung ESBL-tragender Bakterienstämme tragen *bla*_{OXA} allerdings in geringerem Maße bei als *bla*_{CTX-M} (Evans *et al.* 2014).

2.6.1.2 AmpC

Mutationen in der Promotorregion des intrinsischen, chromosomal-kodierten *ampC*, einer β -Laktamase der Ambler-Klasse C, führen zu ihrer verstärkten Expression und damit ebenfalls zur Resistenz gegenüber CS der dritten, nicht aber gegenüber allen Vertretern der vierten Generation (Koga *et al.* 2019). Alternativ kann ein Promotor dieses Gens durch Integration der entsprechenden Insertionssequenz oder ein Plasmid-kodiertes *ampC* (z. B. Cephamycinasen) erworben werden, die weit verbreitet sind (Daniels *et al.* 2007; BIOHAZ 2011). AmpC wird nur in geringem Maß durch β -Laktamase-Inhibitoren gehemmt (Paterson 2006).

2.6.2 Epidemiologie und Einflussfaktoren

Während bis zur Jahrtausendwende bestimmte *bla*_{TEM}- und *bla*_{SHV}-Allele die dominierenden ESBL-Determinanten waren (Ewers *et al.* 2012), nimmt seitdem der Anteil *bla*_{CTX-M}-positiver Isolate stetig zu (Pitout *et al.* 2008; Bevan *et al.* 2017). So hat sich *bla*_{CTX-M-15} pandemisch in medizinischen Einrichtungen, aber auch in der Bevölkerung verbreitet. *bla*_{CTX-M-1} ist hingegen im europäischen Raum in der Veterinärmedizin vorherrschend (Cantón *et al.* 2008; Dahmen *et al.* 2012; Abraham *et al.* 2018). Allerdings ist die Verbreitung von ESBL-Determinanten nur selten an bestimmte Bakterienstämme geknüpft (Oteo *et al.* 2009; Hammerum *et al.* 2014), sondern findet hauptsächlich durch HGT statt (Schink *et al.* 2011; de Been *et al.* 2014; Jahanbakhsh *et al.* 2016; Ceccarelli *et al.* 2019; Ewers *et al.* 2021). *bla*_{CTX-M}-Allele sind häufig auf sehr stabilen, transmissiblen Plasmiden mit schmalen Wirtsspektrum kodiert, die ihren Trägerstämmen durch genetische Anpassungen sogar einen Fitnessvorteil vermitteln können (Cottell *et al.* 2012; Liebana *et al.* 2013; Schaufler *et al.* 2016). Das *bla*_{CTX-M-1}-Allel ist meist mit IncI1-Plasmiden assoziiert, wo es in einer genetisch konservierten Umgebung vorliegt (Dahmen *et al.* 2012; Rozwandowicz *et al.* 2018;

Ceccarelli *et al.* 2019; Poulin-Laprade *et al.* 2021), die sich auch über mehrere Jahre kaum verändert (Abraham *et al.* 2018). *bla*_{CTX-M-1}-kodierende IncI1-Plasmide wurden in Europa aus verschiedenen Stämmen und Tierarten isoliert (Dierikx *et al.* 2010; Pfeifer *et al.* 2010; Geser *et al.* 2011; de Been *et al.* 2014; Zurfluh *et al.* 2014; Abraham *et al.* 2018), haben ihr Reservoir aber vermutlich in der europäischen Geflügelhaltung (Dahmen *et al.* 2012). Auch *bla*_{CTX-M-15} kann mit IncI1-Plasmiden assoziiert sein (Smet *et al.* 2009), wird allerdings häufiger auf IncF-Plasmiden vorgefunden (Machado *et al.* 2006; Rozwandowicz *et al.* 2018). Zudem besteht für *bla*_{CTX-M-15} die Tendenz einer klonalen Weitergabe (Novais *et al.* 2007; Ludden *et al.* 2021).

Man geht davon aus, dass der Einsatz von CS3/4 den größten Einfluss auf das Vorkommen von ESBL hat (Paterson 2006; Jørgensen *et al.* 2007; Andersen *et al.* 2015; Fleury *et al.* 2015). Allerdings erhält sich eine erhöhte Prävalenz der CS-Resistenz auch nach Abschluss der CS-Behandlung (Cavaco *et al.* 2008; Andersen *et al.* 2015; Fleury *et al.* 2015), und es werden zunehmend CS-resistente Bakterien bzw. der HGT von ESBL-Genen bei gesunden, unbehandelten Tieren nachgewiesen (Geser *et al.* 2011; BIOHAZ 2011; Poulin-Laprade *et al.* 2021). Die indirekte AMR-Selektion durch ausgeschiedene AB-Rückstände ist bei CS3/4 im Gegensatz zu FQ allerdings unwahrscheinlich, da der Großteil der CS-Metabolite in den Ausscheidungen behandelter Tiere bereits inaktiviert vorliegt und aktives Cefotiofur in der Umwelt sehr instabil ist (Hornish *et al.* 2002; Volkova *et al.* 2012; Call *et al.* 2013). Die weltweite Verbreitung und Persistenz der CS-Resistenz lässt sich jedoch mit Ko-Selektionen erklären (Cantón *et al.* 2008; Dorado-Garcia *et al.* 2016; Jahanbakhsh *et al.* 2016; Lucas *et al.* 2018). Viele CS-resistente Stämme sind multiresistent, da die *bla*_{CTX-M}-kodierenden mobilen genetischen Elemente über zusätzliche RD gegenüber weiteren AB-Klassen verfügen (Jørgensen *et al.* 2007; Hammerum *et al.* 2014; Zurfluh *et al.* 2015): Aminoglykoside, Tetracycline und Trimethoprim-Sulfonamide (Paterson 2006; Geser *et al.* 2011; Poulin-Laprade *et al.* 2021). Zudem wurde bei französischen Rindern eine Selektion der CS-Resistenz durch den Einsatz von Florfenicol nachgewiesen (Meunier *et al.* 2010), während der Einsatz von FQ als Risikofaktor für das Vorkommen von CS-resistenten *E. coli* bekannt ist (Erb *et al.* 2007; Zurfluh *et al.* 2015). Darüber hinaus selektieren auch andere β -Laktam-AB wie Amoxicillin *bla*_{CTX-M} und erhalten diese durch Kreuz-Resistenz (Cavaco *et al.* 2008; Cameron-veas *et al.* 2015).

Haben sich ESBL-Plasmide also einmal im gastrointestinalen Mikrobiom etabliert, ist ihr spontaner Verlust unwahrscheinlich (Cottell *et al.* 2012; Mourand *et al.* 2016).

2.7 Bedeutung und Ziel dieser Studie

In den letzten Jahren hat sich die Anzahl der aus Menschen und Tieren isolierten *Enterobacteriaceae* mit Resistenz gegenüber FQ und/oder CS3/4 immer weiter erhöht (Hering *et al.* 2014; Zurfluh *et al.* 2015). Die schnelle und weltweite Verbreitung *bla*_{CTX-M}-kodierender Plasmide bei *Enterobacteriaceae* ist eines der größten Gesundheitsprobleme unserer Zeit (Cantón *et al.* 2006), zu dem Lebensmittel liefernde Tiere als Reservoir transferierbarer ESBL beitragen können (Schink *et al.* 2011; Ewers *et al.* 2012). So wurde sowohl die Übertragung ESBL-kodierender Plasmide (Inc11, IncN und IncF) von Schweinen auf Betriebs-Mitarbeitende (Moodley *et al.* 2009; de Been *et al.* 2014; Hammerum *et al.* 2014), als auch ihre Übertragung entlang der Geflügel-Lebensmittelkette bereits nachgewiesen (Zurfluh *et al.* 2014; Huijbers *et al.* 2016). Das Vorkommen von ESBL-Determinanten in Schweinegülle stellt darüber hinaus ein Risiko für die Transmission in die Umwelt und zu dort lebenden Tierarten dar (Rodrigues *et al.* 2013). Auch hinsichtlich FQ gibt es einen Zusammenhang zwischen ihrem Einsatz bei Lebensmittel liefernden Tieren und der FQ-Resistenz bei *E. coli* vom Menschen (ECDC & EFSA & EMA 2021). FQ-resistente *Salmonella*- und *Campylobacter*-Stämme veterinärmedizinischen Ursprungs wurden bereits bei menschlichen Patienten detektiert (Taylor *et al.* 2009). Aus rein veterinärmedizinischer Sicht sind FQ-resistente Erreger ebenfalls problematisch, da diese AB zu den effektivsten Therapieoptionen für die Behandlung respiratorischer Infektionen beim Schwein zählen (Wiuff *et al.* 2003). Dass RD gegen FQ und CS3/4 häufig zusammen auf Plasmiden kodiert sind (Pereira *et al.* 2014; Cameron-Veas *et al.* 2015), stellt darüber hinaus einen Risikofaktor für die Verbreitung von Multiresistenz dar (Qin *et al.* 2015).

Der veterinärmedizinische Einsatz von FQ sowie CS3/4 in Deutschland hat sich seit 2018 vermutlich aufgrund der Änderung der TÄHAV reduziert (Gefeller *et al.* 2021). Unter diesem Aspekt bieten sich die beiden AB-Klassen als Modelle an, um darzustellen, inwieweit die Minimierung des Einsatzes bestimmter antibiotischer Wirkstoffe zum Verschwinden der entsprechenden RD in Tierhaltungen beiträgt. Resistenzen gegenüber CS3/4 können dabei als Vertreter für Plasmid-kodierte RD, Resistenzen gegenüber FQ

als Vertreter vor allem klonal verbreiteter AMR angesehen werden. Als Modellorganismus für Lebensmittel liefernde Tiere wurde das Schwein gewählt, da der Verzehr von Schweinefleisch in Deutschland und in der EU den anderer Tierarten weit übertrifft (Bergspica *et al.* 2020; Deblitz C. *et al.* 2021). Gleichzeitig wurde die Schweinehaltung bereits als ein potenzielles Reservoir für resistente *Enterobacteriaceae* beschrieben (Delsol *et al.* 2010; Birkegard *et al.* 2017; Poulin-Laprade *et al.* 2021). Ziel dieser Studie war es deshalb, die Prävalenz fäkaler FQ- und CS-resistenter *E. coli*-Stämme exemplarisch in vier schweinehaltenden Betrieben in Thüringen zu ermitteln. Über einen Zeitraum von ein bis eineinhalb Jahren sollte die Dynamik des Auftretens dieser AMR über die verschiedenen Altersstufen der Schweine eines Mastdurchgangs und über mehrere Mastdurchgänge hinweg in denselben Stallgebäuden verfolgt werden. Zu den Sammelkotproben wurden die antibiotischen Behandlungen der beprobten Tiere in dem der Beprobung vorangegangenen Zeitraum erfasst. Angesichts der Vermutungen zur Persistenz von Bakterienstämmen (Kaspersen *et al.* 2020a), zu Kreuz-Resistenzen (van den Bogaard *et al.* 1999; Persoons *et al.* 2010) und Ko-Selektionen (Singer *et al.* 2006) sollte die Persistenz der für die entsprechenden AMR verantwortlichen genetischen Elemente überprüft werden. Daraus sollten Einblicke in Mechanismen gewonnen werden, die Einfluss auf die Persistenz von AMR haben. Im Hinblick auf eine zukünftige Risikobewertung sollten dominante Bakterienstämme oder mobile genetische Elemente identifiziert werden, die die Transmission und Persistenz von RD innerhalb eines Mastdurchgangs oder auf Betrieben vorantreiben.

3 Material und Methodik

Die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien, Geräte, Softwareprogramme, Chemikalien, Puffer und Lösungen sowie Oligonukleotide und Standard- bzw. Markerstämme sind im Anhang in den Tabellen unter Punkt 9.1 aufgelistet.

3.1 Gewinnung der Sammelkotproben

3.1.1 Vorversuch

Die Entnahme der Kotproben zur Auswahl der Betriebe für den Hauptversuch wurde von Mitarbeitern des Schweinegesundheitsdienstes durchgeführt. Sie nahmen dazu vom 01.07. bis 09.08.2019 auf den von ihnen besuchten schweinehaltenden Betrieben Sammelkotproben (SKP) von Schweinegruppen verschiedenen Alters. Dazu überführten sie circa 10 g Kot vom Buchtenboden in sterile 50 ml Zentrifugenröhrchen, die noch am Tag der Entnahme per Post verschickt wurden. Auf diese Weise wurde Probenmaterial von fünf konventionell und vier ökologisch bewirtschafteten Betrieben gesammelt.

3.1.2 Hauptversuch

Bei drei der vier für den Hauptversuch ausgewählten Betriebe (B1, B2, K2) wurden mehrere, aufeinanderfolgende Mastdurchgänge (MDG) an je fünf Alterszeitpunkten der Tiergruppe beprobt (Tabelle 2).

Tabelle 2: Alter der Tiergruppen an den Beprobungszeitpunkten im Hauptversuch

Bezeichnung	Altersgruppe	Beprobungszeitpunkt	Definition	Durchgeführte Beprobungen			
				B1	B2	K1	K2
I	Absetzer	am Ende der Saugferkelphase	kurz vor dem Absetzen bzw. am Tag des Absetzens	+	+	+	+
II	Läufer	am Ende der Läuferperiode	kurz vor dem Umställen vom <i>flatdeck</i> in den Maststall	+	+	–	+
III	Vormast (VM)	zu Beginn der Mastperiode	1 – 2 Wochen nach Einstallung in den Maststall	+	+	–	+
IV	Mittelmast (MM)	nach circa der Hälfte der Mastperiode	je nach Betriebsart nach 6 – 8 Wochen (K2) bzw. nach 9 – 12 Wochen im Maststall (B1, B2)	+	+	–	+
V	Endmast (EM)	zum Ende der Mastperiode	in den letzten Tagen, bevor die ersten Tiere aus der Mastgruppe zum Schlachthof transportiert wurden	+	+	–	+

Da die Tierbewegungen (Pünktlichkeit des Umstallens, Trennung von Altersgruppen und MDG) auf dem konventionellen Betrieb K2 strukturierter abliefen als auf den Bio-Betrieben (B1 und B2), wurden auf Betrieb K2 weniger MDG als auf den Bio-Betrieben beprobt (siehe Beprobungsschemata 4.2). Von Betrieb K1 wurden nur abgesetzte Ferkel beprobt (Tabelle 2, Beprobungszeitpunkt I), diese dafür aber häufiger als auf den anderen Betrieben.

Als Probenmaterial diente Sammelkot, der von mindestens sechs Stellen in einer Bucht bzw. in einem Abteil mit einem Holzspatel vom Buchtenboden aufgenommen und in sterile 50 ml Probenbehälter gegeben wurde. Bei den SKP der Absetzerferkel wurde darauf geachtet, dass möglichst wenig Sauenkot mit dem Ferkelkot vermischt wurde. Jede Probe hatte einen Umfang von circa 15 g Sammelkot. Die Proben wurden in einer Styroporbox mit Kühlakkus transportiert und noch am gleichen Tag im Labor bearbeitet.

Die Proben aus Betrieb K1 wurden durch Mitarbeitende des Betriebs am Tag des Umstallens der Ferkel aufs *flatdeck* genommen. Fand die Entnahme der SKP vor dem Umstall der Ferkel statt, wurde Kot aus den Absetzerabteilen gesammelt, fand sie danach statt, wurde Kot aus den *flatdecks* entnommen. Dazu wurde mit einer behandschuhten Hand Ferkelkot vom Buchtenboden mehrerer Buchten eines Abteils eingesammelt und in ein steriles 50 ml Zentrifugenröhrchen verbracht. Die SKP wurden noch am Tag der Entnahme per Post versandt und kamen meist am Folgetag, in seltenen Fällen aber erst nach 48 bis 72 Stunden am Institut an, wo sie sofort bearbeitet wurden. Da sich der größte Teil des Beprobungszeitraums über den Winter erstreckte, wurde auf eine Kühlung der Proben während des Versands verzichtet.

3.1.3 Kokzidentestung

Pro Betrieb wurde je eine SKP von zehn Würfen genommen, deren Ferkel zum Zeitpunkt der Beprobung ein bis zwei Wochen alt waren. Die Proben wurden auf 5 °C gekühlt und bis zum Folgetag an das Dezernat für Krankheits- und Zoonosendiagnostik des Thüringer Landesamtes für Verbraucherschutz übermittelt. Dort wurden die SKP mittels semi-quantitativem Flotationsverfahren hinsichtlich des Vorkommens von Oozysten von *Cystoisospora suis* überprüft.

3.2 Fragebogen

Zu jeder für den Hauptversuch genommenen SKP wurde mit dem jeweiligen Betriebsleiter gemeinsam ein Fragebogen ausgefüllt. Dabei handelte es sich je nach Alter der beprobten Tiere entweder um einen Fragebogen für Absetzer-Schweine, für *flatdeck*- / Läufer-Schweine oder für Mastschweine (siehe 9.2), da jeweils unterschiedliche Abläufe und Gegebenheiten angesprochen werden mussten. Die Fragebögen umfassten Fragen zur Größe und Zusammensetzung der beprobten Tiergruppe, zum gesundheitlichen Zustand der Tiere, zur Gabe von Antibiotika vor der Beprobung sowie einige Fragen zum Hygienemanagement der Tiere.

3.3 Kotprobenbearbeitung

3.3.1 Vorversuch

Von den Vorversuchs-SKP wurde bei ihrer Ankunft im Institut 1 g Sammelkot eingewogen und eine log₁₀-Verdünnungsreihe in steriler 0,9 %iger Natrium-Chlorid-Lösung (NaCl-Lösung) bis zur 10⁻²-Verdünnung erstellt (je Verdünnungsstufe 100 µl Kotsuspension plus 900 µl NaCl). Anschließend wurden 100 µl der 10⁻²-Verdünnung auf eine Gassner-Agarplatte (GA) pipettiert und mit einem Spatel verteilt. Zusätzlich wurden 500 µl derselben Verdünnungsstufe auf vier Gassner-Agarplatten mit Antibiotikum pipettiert (Tabelle 3) und ebenfalls ausplattiert.

Tabelle 3: Im Vor- und Hauptversuch verwendete Gassner-Agarplatten

	Antibiotikum	Konzentration [µg/ml Agarlösung]	Abkürzung
Gassner-Agar	–	–	GA
	Enrofloxacin	0,125	GE
		4	GE4
	Ceftiofur	4	GF
	Cefquinom	8	GQ

Die Auswahl der Antibiotikakonzentrationen in den Selektivplatten GE, GE4, GF und GQ wurde nach folgenden Kriterien getroffen:

GE = 0,125 µg/ml Enrofloxacin – Die Konzentration entspricht dem ECOFF-Wert von *E. coli* für Enrofloxacin (EUCAST 2021). Bakterien, die auf der Platte wachsen, werden der Nicht-Wildtyp-Population zugeordnet, verfügen also über mindestens einen Resistenzmechanismus gegenüber Enrofloxacin. Sie werden fortan als „resistenztragend“ bezeichnet.

GE4 = 4 µg/ml Enrofloxacin – Die Konzentration liegt über dem klinischen Grenzwert für respiratorische Infektionen mit Enrofloxacin-resistenten gramnegativen Bakterien beim Schwein (DVG-Arbeitskreis „Antibiotikaresistenz“ 2017). Bakterien, die auf der Platte wachsen, werden fortan als „resistent“ bezeichnet und schließen resistenztragende Stämme ein.

GF = 4 µg/ml Ceftiofur – Die Konzentration entspricht dem klinischen Grenzwert für respiratorische Infektionen mit Ceftiofur-resistenten gramnegativen Bakterien beim Schwein (DVG-Arbeitskreis „Antibiotikaresistenz“ 2017). Bakterien, die auf der Platte wachsen, werden fortan als „resistent“ bezeichnet.

GQ = 8 µg/ml Cefquinom – Die Konzentration liegt über dem klinischen Grenzwert für Infektionen mit Cefquinom-resistenten Bakterien bei Großtieren (DVG-Arbeitskreis „Antibiotikaresistenz“ 2004). Bakterien, die auf der Platte wachsen, werden fortan als „resistent“ bezeichnet.

Für die Auswahl der entsprechenden Grenzwerte siehe auch Tabelle 20 und die dazugehörigen Anmerkungen.

Nach der Inkubation wurden alle koloniebildenden Einheiten (KbE) pro Platte mittels Koloniezählstift gezählt. Dabei wurde die in Tabelle 4 dargestellte Einteilung vorgenommen.

Tabelle 4: Klassifizierung des Koloniewachstums auf Gassner-Agarplatten (Vorversuch)

Anzahl KbE		Kategorie
0 KbE ¹ / kein Wachstum	≅	–
1 – 10 KbE	≅	+
10 – 100 KbE	≅	++
≥ 100 KbE	≅	+++
Platte komplett bewachsen (Rasen)	≅	++++

¹KbE = Koloniebildende Einheit.

3.3.2 Hauptversuch

Von jeder Hauptversuchs-SKP wurden am Beprobungstag bzw. bei der Ankunft im Institut zuerst zwei Rückstellproben angefertigt. Dazu wurden jeweils 1,5 g frisch durchmischter Sammelkot in ein steriles 2 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C aufbewahrt. Anschließend wurde eine log₁₀-Verdünnungsreihe in 0,9 %iger NaCl-Lösung bis zur 10⁻⁶-Verdünnung erstellt.

3.3.2.1 Initiale KbE-Bestimmung

Aus der Verdünnungsreihe wurden je 100 µl einer pro Agarplatte gewählten Verdünnungsstufe auf die fünf verschiedenen Gassner-Agarplatten (Primärplatten: GA, GE, GE4, GF und GQ; Tabelle 3) pipettiert und mittels Spatel ausplattiert. Die Auswahl der Verdünnungsstufe pro Plattenart beruhte auf der Kenntnis der Betriebe sowie vorheriger antibiotischer Behandlungen und des Alters der beprobten Schweine. Um auch sehr niedrige Prävalenzen resistenter Bakterien detektieren zu können, wurden einzig im Falle der 10⁻¹-Verdünnung auch 500 µl ausplattiert. Die Verdünnungsstufen wurden bis zur abgeschlossenen Beurteilung der Agarplatten bei 5 °C aufbewahrt.

Nach der Inkubation der Primärplatten wurde die Auswertung jeder Platte dokumentiert (Abbildung 1 (Abb. 1)). Die gezählten KbE beziehen sich auf die Gesamtheit aller Gammaproteobakterien, also Lactose-positive sowie -negative Kolonien, die auf der Agarplatte wuchsen. Die Anzahl an KbE pro Gramm Sammelkotprobe wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Keimzahl [KbE / g SKP]} = \text{gezählte KbE} \times 10^{|\gamma + 1|}$$

Y entspricht dabei der Log10-Stufe der verwendeten Verdünnung. Wurden 500 µl ausplattiert, wurden die gezählten KbE mit dem Wert 2 multipliziert. Die Nachweisgrenze lag bei 20 KbE pro Gramm SKP.

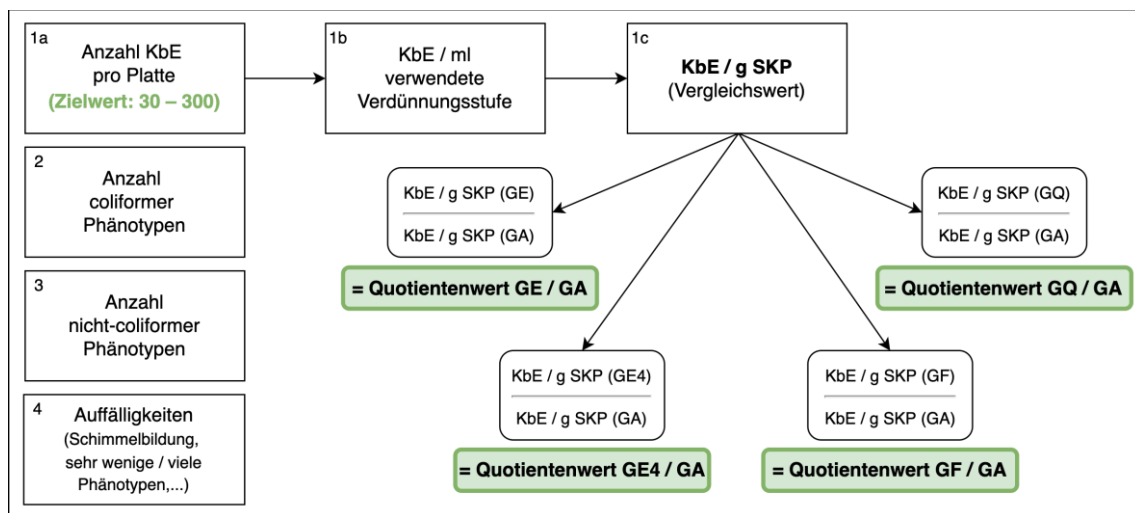


Abb. 1: Auswertungsschema der Primärplatten

Die KbE-Anzahl der antibiotikafreien Gassner-Agarplatte dient zur Einschätzung der Gesamtzahl vorhandener Gammaproteobakterien in einer SKP. Quotientenwert $\hat{=}$ Anteil an Bakterien, der bei der in der Selektivplatte enthaltenen Antibiotikumkonzentration wächst; KbE = Koloniebildende Einheit; SKP = Sammelkotprobe; Plattenbezeichnungen siehe Tabelle 3.

Wurde nach Inkubation der Platten auf einer Primärplatte kein Koloniewachstum vorgefunden, so wurde eine niedrigere Verdünnungsstufe auf einer neuen Platte derselben Art ausplattiert und wie zuvor verfahren. Wachsen nach dem Ausplattieren der niedrigsten Verdünnungsstufe auf einer Primärplatte keine KbE, so wurde für die jeweilige Probe bei der entsprechenden Plattenart „kein Wachstum“ vermerkt. War die Primärplatte nach der Inkubation hingegen so dicht bewachsen, dass einzelne Kolonien nicht mehr voneinander differenzierbar waren, so wurde eine höhere Verdünnungsstufe ausplattiert.

3.3.2.2 Erweiterte KbE-Bestimmung

Da das Ausplattieren bei der initialen KbE-Bestimmung häufig wiederholt werden musste, was zu Zeitverlusten führte, wurde ab circa der Hälfte der Beprobungen die erweiterte KbE-Bestimmung durchgeführt. Je 100 µl von zwei aufeinanderfolgenden Verdünnungsstufen wurden auf zwei der fünf verschiedenen Gassner-Agarplatten pipettiert und mittels Spatel ausplattiert (Abb. 2), um auf mindestens einer der beiden Platten eine zählbare und gleichzeitig repräsentative Anzahl von Einzelkolonien zu erhalten – in der Regel 30 bis 300 KbE pro Platte. Die niedrigsten aufeinanderfolgenden Verdünnungsstufen, die ausplattiert werden konnten, waren demnach 500 µl und 100 µl der 10⁻¹-Verdünnung.

Die Inkubation und die Auswertung der Platten wurden beibehalten. Der finale Quotientenwert für eine antibiotikumhaltige Primärplatte (Abb. 1) wurde aus dem Mittelwert der beiden Quotientenwerte der entsprechenden Primärplattenart berechnet, solange beide auf einer repräsentativen Anzahl an KbE beruhten.

Lag die Anzahl der KbE auf beiden Platten einer Plattenart deutlich außerhalb des zählbaren Bereichs, wurden am Tag nach der Beprobung zwei geeignetere aufeinanderfolgende Verdünnungsstufen der SKP auf neue Platten derselben Art ausplattiert und wie zuvor verfahren (Abb. 2). Zeigten sich nach Ausplattieren der niedrigsten Verdünnungsstufen und Inkubation auf beiden beimpften Platten keine KbE, so wurde für die jeweilige Probe bei der entsprechenden Plattenart „kein Wachstum“ vermerkt.

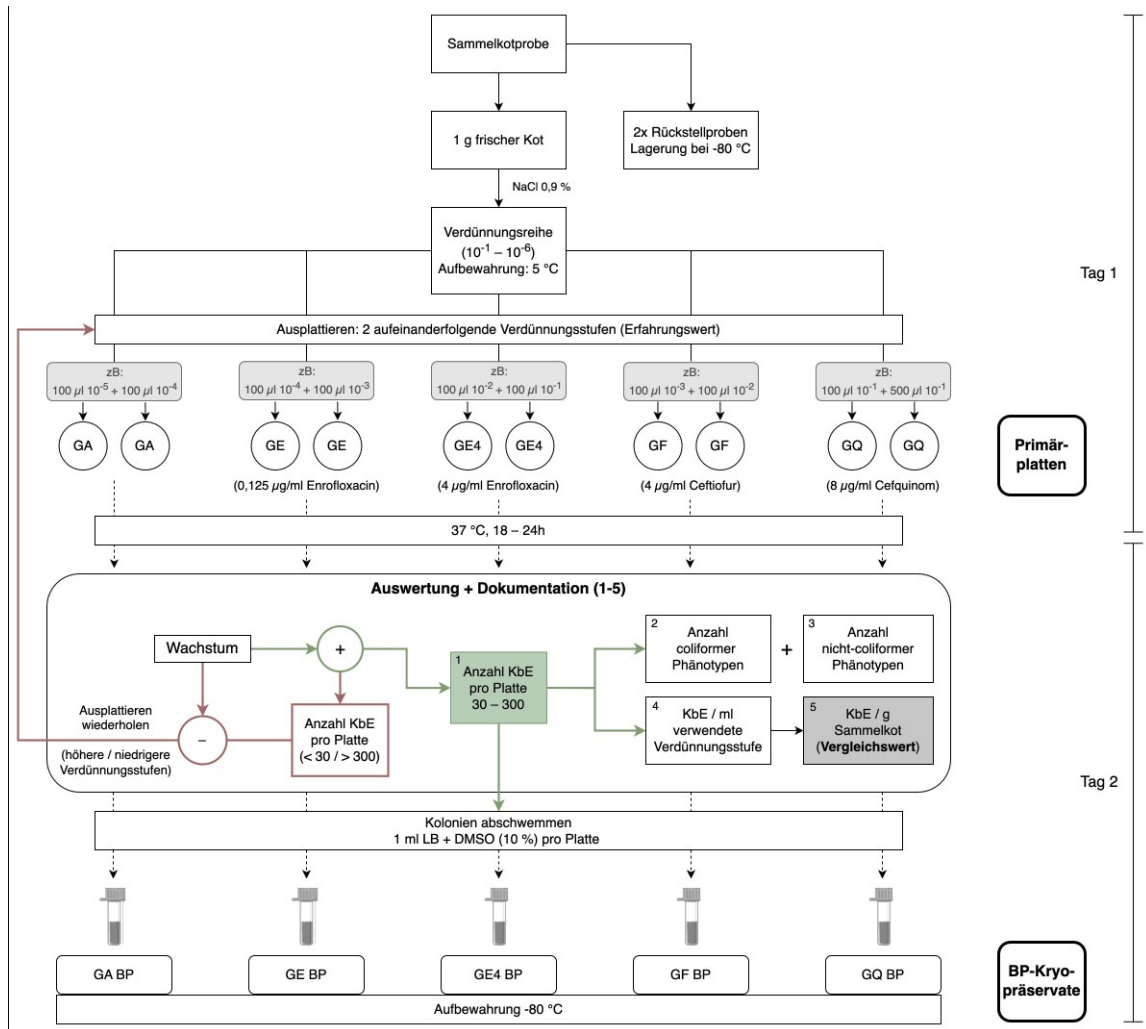


Abb. 2: Bearbeitungsschema der Sammelkotproben bis zur Bakterienpool-Kryopräservation

KbE = Koloniebildende Einheit; LB = Luria-Bertani-Bouillon; BP = Bakterienpool; DMSO = Dimethylsulfoxid; Plattenbezeichnungen siehe Tabelle 3.

3.3.3 Schimmelbildung auf den Primärplatten

Vornehmlich nach dem Ausplattieren niedriger Verdünnungsstufen bildete sich nach der Inkubation auf einigen Agarplatten Schimmel. Um dies zu unterdrücken, erfolgte beim Wiederholen des Ausplattierens derselben Verdünnungsstufe eine Zugabe des Antimykotikums Amphotericin B. Dazu wurde zuerst überprüft, ob diese Behandlung Auswirkungen auf das Wachstum von *E. coli*-Stämmen hat. Luria-Bertani/Miller-Flüssigmedium (LB) wurde mit dem *E. coli*-Stamm ATCC 25922 beimpft, woraufhin eine Kultur mit Amphotericin B auf eine Wirkkonzentration von 250 ng/ml eingestellt wurde. Nach Inkubation zeigten die Kulturen mit und ohne Amphotericin B visuell keinen Unterschied im Wachstum des *E. coli*-Stammes. Auch bei der Wiederholung des Experiments mit einer höheren Wirkkonzentration von 1,25 µg Amphotericin B/µl LB-Medium wurde

keine Beeinträchtigung des Wachstums beobachtet. Darauf aufbauend wurden bei der Wiederholung des Ausplattierens der SKP-Verdünnungsstufe 50 µl einer Amphotericin B Stammlösung (250 µg/ml) auf die neuen Platten der entsprechenden Plattenart pipettiert und mittels Spatel verteilt, bis die Lösung vollständig eingezogen war. Auf diese Weise wurde eine Wirkkonzentration von 625 ng/ml Agar erreicht (circa 20 ml Agar pro Agarplatte). Anschließend wurden die Verdünnungsstufen der SKP wie zuvor beschrieben ausplattiert, inkubiert und ausgewertet.

3.3.4 Ausplattieren der Rückstellproben

Die Rückstellproben der SKP, deren quantitative Ergebnisse überprüft werden sollten, wurden aufgetaut, aliquotiert und eine log₁₀-Verdünnungsreihe in 0,9%iger NaCl-Lösung erstellt. Das Ausplattieren, die Inkubation sowie die Auswertung entsprachen dem ursprünglichen Schema der erweiterten KbE-Bestimmung (Abb. 1 sowie Abb. 2).

3.4 Kulturverarbeitung und Stammisolation

3.4.1 Inkubation

Alle Primär- und Sekundärplatten sowie Blutagarplatten, beimpfte Micronautplatten für die Suszeptibilitätstestung, Flüssigkulturen sowie Ausstriche von Kryopräservaten wurden 18 bis 24 Stunden (h) bei 37 °C aerob im Brutschrank inkubiert.

Die Flüssigkulturen für die Plasmidpräparation wurden 16 h bei 37 °C und 180 Umdrehungen pro Minute aerob im Kühlinkubator mit integriertem Schüttler inkubiert.

3.4.2 Anlegen von Dauerkulturen: Kryopräservation

Herstellung des Bakterienpool-Kryopräservats

Die Bakterienkolonien von ausreichend bewachsenen Primärplatten wurden nach abgeschlossener Auswertung mit 1 ml LB-Medium + Dimethylsulfoxid (DMSO; 10 %) abgeschwemmt und in ein steriles 2 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Dieses wurde bei -80 °C aufbewahrt und diente zur Kryopräservation des Bakterienpools (BP) einer SKP auf dem jeweiligen Plattentyp (Abb. 2). Waren durch das Ausplattieren zweier Verdünnungsstufen zwei Platten derselben Art vorhanden, die Wachstum aufwiesen, so wurden die abgeschwemmten Bakterien in einem gemeinsamen Reaktionsgefäß gesammelt. Waren beide Platten eines Plattentyps nur spärlich bewachsen, so wurden die vorhandenen Einzelkolonien mit einer Öse auf der Platte verstrichen. Nach erneuter Inkubation wurde das Kryopräservat am Folgetag hergestellt.

Isolation der *E. coli*-Stämme und Herstellung ihrer Kryopräservate

Die GE4-, GF- und GQ-BPs wurden zu einem späteren Zeitpunkt mittels Öse auf dem jeweiligen Plattentyp, von dem der BP abgeschwemmt worden war, ausgestrichen (Sekundärplatten, Abb. 3) und inkubiert. Anschließend wurde jeder pro Platte identifizierte, coliforme Phänotyp auf einer neuen Platte derselben Art zur Reinkultur vereinzelt. Dabei wurde für jedes coliforme Isolat der Phänotyp notiert (Abb. 3). Wurde diese Reinkultur mittels MALDI-TOF MS Analyse als *E. coli* identifiziert, wurde ihr eine fortlaufende, Stamm-spezifische Nummer zugeteilt. Anschließend wurden alle KbE, die nicht für ein Hitzelysate (siehe 3.4.3) entnommen worden waren, von der Agarplatte mit 1 ml LB + DMSO (10 %) abgeschwemmt und in ein steriles 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Dieses wurde bei -80 °C aufbewahrt und diente als Kryopräservat des *E. coli*-Stammes.

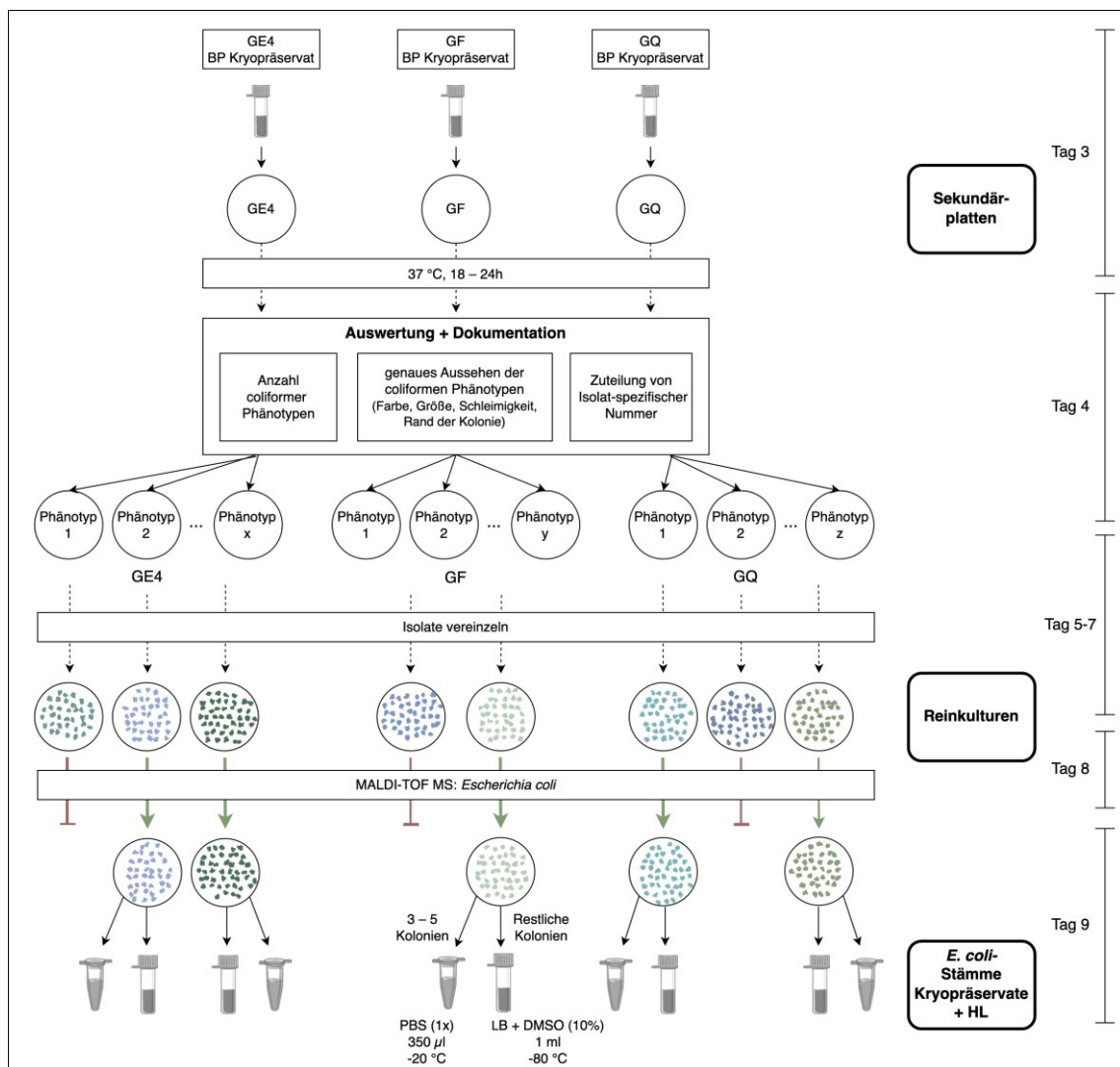


Abb. 3: Schema zur Isolierung der *E. coli*-Stämme aus den BP-Kryopräservaten
 MALDI-TOF MS = matrix assisted laser desorption / ionisation – time of flight mass spectrometry; PBS = phosphate buffered saline; HL = Hitzelysate; Plattenbezeichnungen siehe Tabelle 3; weitere Abkürzungen siehe Abb. 2.

3.4.3 Herstellung von Hitzelysaten

Von der mit einem als *E. coli* identifizierten Stamm bewachsenen Gassner-Agarplatte wurden vor der Herstellung des Kryopräservats drei bis fünf Kolonien mit einer sterilen Öse abgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß in 350 µl PBS-Puffer (1x) gegeben. Nach kurzem Vortexen wurde die Suspension für 15 min auf 99 °C erhitzt. Die so gewonnenen Hitzelysate der *E. coli*-Stämme wurden bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Sie dienten als Matrize für Analysen mittels *polymerase chain reaction* (PCR).

3.5 Stammidentifizierung mittels MALDI-TOF MS Analyse

Sobald ein Isolat als Reinkultur vorlag, erfolgte wie zuvor beschrieben (Ahmed *et al.* 2021) seine Spezies-Bestimmung mittels MALDI-TOF MS (*matrix assisted laser desorption / ionisation – time of flight mass spectrometry*). Dazu wurden drei Kolonien des Isolats in 300 µl Reinstwasser gelöst und mit 900 µl 99,9 %igem Ethanol vermischt. Für die MALDI-TOF MS Aufarbeitung wurde die Probe 5 Minuten (min) bei 16.200 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet je nach Größe in 10 – 30 µl 70 %iger Formalinsäure gelöst. Nach Zugabe von 50 µl Acetonitril und erneuter Zentrifugation wurden 1 µl des Überstands auf eine *polished steel target* MTP 384 MALDI-Probenplatte pipettiert. Eingebettet in 1 µl gesättigter Matrix-Lösung wurde die Probe luftgetrocknet. Durch den Beschuss der Probe mit dem gepulsten 200 Hz Laser smartbeam 2 unter 25 kV Beschleunigungsspannung wurden die Proteine im elektrischen Feld aufgetrennt. Bei jeder Messung wurde zur Kalibrierung der IVD Bacterial Test Standard der Firma Bruker mitgeführt. Die Massenspektren (Messrahmen: 4000 – 10.000 Dalton) wurden mittels MALDI Biotyper UltrafleXtreme im linearen Messmodus mit der Software Bruker Compass sowie Flex Control ermittelt. Die Identifizierungssoftware Biotyper compass generiert für jede Messung die Bakterienart sowie einen Zahlenwert zur Validierung des Ergebnisses. Es wurden stets Doppelbestimmungen durchgeführt, deren Ergebnis nur im Falle einer „sehr wahrscheinlichen“ (Werte ≥ 2.3) oder einer „wahrscheinlichen“ Spezies-Identifikation (Werte ≥ 2) akzeptiert wurden.

Alle Isolate, die nicht als *E. coli* identifiziert worden waren, wurden nach der MALDI-TOF MS Analyse nicht weiterbearbeitet.

3.6 PCR-Nachweise

Mittels unterschiedlicher Mono- oder Multiplex-PCR-Analysen wurden Virulenz- oder Resistenzgene in BPs oder den daraus isolierten *E. coli*-Stämmen nachgewiesen.

Die in den PCR-Reaktionen verwendeten Oligonukleotide (Englisch: *primer*) wurden von der Firma Eurofins Scientific SE, Luxemburg, hergestellt. Lediglich die beiden in der *Real-Time*-PCR verwendeten HPLC gereinigten *primer* LB1 und LB15 wurden von der Firma metabion international AG, Planegg, D, produziert. Die lyophilisierten *primer* wurden den Herstellerangaben entsprechend in *Aqua destillata* (*Aqua dest.*) auf eine Konzentration von 100 µM eingestellt (Stammlösung). Die *primer* der Endpunkt-PCR-Reaktionen wurden anschließend erneut in *Aqua dest.* auf eine Konzentration von 5 – 10 µM verdünnt (Arbeitskonzentration). Alle *primer*-Lösungen wurden bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C gelagert. Die fluoreszenzmarkierten *primer* LB1 und LB15 wurden in licht-geschützten Reaktionsgefäßen aufbewahrt.

Ein PCR-Reaktionsansatz belief sich stets auf 25 µl. Je nach verwendeter Polymerase wurden verschiedene Reagenzien eingesetzt (Tabelle 5). Als Negativkontrolle wurde *Aqua. dest.* anstatt DNA zum Reaktionsansatz hinzugefügt.

Tabelle 5: Verwendete Polymerasen sowie Zusätze zum Reaktionsansatz (25 µl)

Polymerase	Zusatz	Menge für einen Reaktionsansatz [µl]
Bst 2.0 WarmStart DNA Polymerase		1 (8 units / µl)
	Endonuclease IV (1 / 10 verdünnt)	1 (10 units / µl)
	Desoxy-Nukleosidtriphosphate (10 mM)	3,5
	Isothermaler Amplifikationspuffer (10x)	2,5
	Magnesiumsulfat (100 mM)	1,5
HotStarTaq DNA Polymerase im Qiagen Mastermix	Qiagen Master Mix (2x)	12,5 (5 units / µl)
	Q-Solution (5x)	5
HotStarTaq DNA Polymerase im HotStarTaq Master Mix (Qiagen)		21,5 (5 units / µl)
OneTaq DNA Polymerase		0,125 (5 units / µl)
	Desoxy-Nukleosidtriphosphate (10 mM)	0,5
	OneTaq Buffer x5	5
	GC enhance buffer	5

Tabelle 5: (Fortsetzung)

Polymerase	Zusatz	Menge für einen Reaktionsansatz [µl]
Phusion High Fidelity DNA Polymerase		0,25 (2 units / µl)
	Desoxy-Nukleosidtriphosphate (10 mM)	0,5
	Phusion HF Buffer (5x)	5
puReTaq DNA Polymerase		(1 bead = Perle aus lyophilisierten Komponenten)
	Desoxy-Nukleosidtriphosphate (je 200 µM)	
	Tris-Hydrochlorid (pH 9,0; 10 mM)	
	Kaliumchlorid (50 mM)	
	Magnesiumchlorid (1,5 mM)	
	Bovines Serumalbumin	
	Stabilisatoren (undefiniert)	

3.6.1 Endpunkt-PCR-Analysen

3.6.1.1 Shigatoxin-PCR

Die aus den ersten 49 SKP gewonnenen 226 BPs wurden mittels *stx1-stx2*-Duplex-PCR (Tabelle 6) hinsichtlich des Vorhandenseins von Shigatoxingenen überprüft. Als Positivkontrolle wurde der *E. coli*-Stamm EDL933 verwendet, der sowohl *stx1*- als auch *stx2*-positiv ist.

Tabelle 6: Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen der *stx1-stx2*-Duplex-PCR

Reaktionsansatz		
Polymerase	OneTaq DNA Polymerase	
<i>primer</i>	MP4- <i>stx1A</i> -F	CGA TGT TAC GGT TTG TTA CTG TGA CAG C
	MP4- <i>stx1A</i> -R	AAT GCC ACG CTT CCC AGA ATT G
	MP3- <i>stx2A</i> -F	GTT TTG ACC ATC TTC GTC TGA TTA TTG AC
	MP3- <i>stx2A</i> -R	AGC GTA AGG CTT CTG CTG TGA C
Matrize	2 µl Hitzelysat	
PCR-Bedingungen		
Initiale Denaturierung	94 °C	30 Sek. ¹
30 Zyklen	94 °C	30 Sek.
	56 °C	40 Sek.
	68 °C	40 Sek.
	68 °C	300 Sek.
Finale Elongation	68 °C	300 Sek.

¹Sek. = Sekunden

Für *stx2*-positive BPs wurde anschließend eine *stx2*-Subtypisierung als Monoplex-PCR für die Subtypen 2a – 2g durchgeführt. Zur Identifizierung des *stx2d*-Subtyps wurden statt einem, wie bei den anderen Subtypen, drei *reverse-primer* eingesetzt (Tabelle 7).

Tabelle 7: Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen der *stx2*-Subtypisierungs-PCRs

Reaktionsansatz		
Polymerase	HotStarTaq DNA Polymerase im HotStarTaq Master Mix	
<i>primer</i>	stx2a-F2	GCG ATA CTG RGB ACT GTG GCC
	stx2a-R2	GCC ACC TTC ACT GTG AAT GTG
	stx2b-F1	AAA TAT GAA GAA GAT ATT TGT AGC GGC
	stx2b-R1	CAG CAA ATC CTG AAC CTG ACG
	stx2c-F1	GAA AGT CAC AGT TTT TAT ATA CAA CGG GTA
	stx2c-R2	CCG GCC ACY TTT ACT GTG AAT GTA
	stx2d-F1	AAA RTC ACA GTC TTT ATA TAC AAC GGG TG
	stx2d-R1	TTY CCG GCC ACT TTT ACT GTG
	stx2d-O55-R	TCA ACC GAG CAC TTT GCA GTA G
	stx2d-R2	GCC TGA TGC ACA GGT ACT GGA C
	stx2e-F1	CGG AGT ATC GGG GAG AGG C
	stx2e-R2	CTT CCT GAC ACC TTC ACA GTA AAG GT
	stx2f-F1	TGG GCG TCA TTC ACT GGT TG
	stx2f-R1	TAA TGG CCG CCC TGT CTC C
stx2g-F1	CAC CGG GTA GTT ATA TTT CTG TGG ATA TC	
stx2g-R1	GAT GGC AAT TCA GAA TAA CCG CT	
Matrize	1 µl Hitzelysat	
PCR-Bedingungen		
Initiale Denaturierung	95 °C	900 Sek. ¹
35 Zyklen	94 °C	50 Sek.
	64 °C	40 Sek.
	72 °C	60 Sek.
	72 °C	180 Sek.
Finale Elongation	72 °C	180 Sek.

¹Sek. = Sekunden;

Die gestrichelten Linien trennen die *primer*-Kombinationen der einzelnen Monoplex-PCR Ansätze.

3.6.1.2 MLVA-PCR

Zur Typisierung der *E. coli*-Stämme wurde die *multiple-locus variable-number tandem-repeat* (VNTR) Analyse (MLVA) angewandt. Die publizierte Methode der Multiplex-PCR (Camelena *et al.* 2019) wurde abgewandelt, sodass zwei (ms21 und CNV014) der sieben detektierten VNTRs (Tabelle 8, nach Camelena *et al.*) in einer Duplex-PCR (Tabelle 9) und die restlichen fünf (RDB1, ms11, CNV001, CNV004 und O157-33) in einer Multiplex-PCR (Tabelle 10) amplifiziert wurden. Als Positivkontrolle diente der *E. coli*-Stamm MG1655, dessen MLVA-Banden bei 766 Basenpaaren (bp), 529 bp, 438 bp, 401 bp, 300 bp, 199 bp und 105 bp liegen.

Tabelle 8: Durch MLVA-PCR detektierte Gene sowie dazugehörige primer

<i>E. coli</i> MLVA primer (ECMLV)	VNTR ¹ Name	Gen	Größe VNTR ¹ [bp]	Größenspanne PCR Fragment [bp]
ECMLV1	RDB1	<i>rhaD</i>	92	162 – 1597
ECMLV2	ms11	<i>rsxC</i>	96	575 – 869
ECMLV3	ms21	<i>tRNA-Arg</i>	139	616 – 1157
ECMLV4	CNV001	<i>ftsK</i>	39	413 – 539
ECMLV5	CNV004	<i>tolA</i>	48	375 – 438
ECMLV6	CNV014	<i>hemY</i>	6	102 – 149
ECMLV7	O157-33	<i>ytfl</i>	17	176 – 211

¹VNTR = *variable-number tandem-repeat*

Tabelle 9: Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen der MLVA-Duplex PCR

Reaktionsansatz		
Polymerase	HotStarTaq DNA Polymerase im Qiagen Mastermix	
primer	ECMLV3-F	TTC AGG AAA TGG ATA AAG TAG T
	ECMLV3-R	GGG AGT ATG CGG TCA AAA GC
	ECMLV6-F	CAA AGA GCA ATA ACA CTT TTA GCA
	ECMLV6-R	GCA GCA GGG ACA ACG GAA GCT AA
Matrize	2 µl Hitzelysat (1:10 verdünnt)	
PCR-Bedingungen		
Initiale Denaturierung	95 °C	900 Sek. ¹
30 Zyklen	94 °C	30 Sek.
	55 °C	90 Sek.
	72 °C	90 Sek.
	72 °C	600 Sek.
Finale Elongation	72 °C	600 Sek.

¹Sek. = Sekunden

Für die Multiplex-PCR (Tabelle 10) wurde aus den elf *primern* ein Mix für jeweils 100 PCR-Reaktionsansätze hergestellt, der bis zur Verwendung bei -20 °C aufbewahrt wurde.

Tabelle 10: Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen der MLVA-Multiplex-PCR

Reaktionsansatz			
Polymerase	OneTaq DNA Polymerase		
<i>primer</i>	ECMLV1-F	TCC CTG GAC AAA CCA GGA CTG	
	ECMLV1-R1	CGT GCG GAC TTA TGA GAA AG	
	ECMLV1-R2	CGT GCG GGC TTA TGA AAA AG	
	ECMLV2-F	GAA ACA GGC CCA GGC TAC AC	
	ECMLV2-R	CTG GCG CTG GTT ATG GGT AT	
	ECMLV4-F	ACA ACC GGC TGG GGC GAA TCC	
	ECMLV4-R	GTC AGC AAA TCC AGA GAA GGC A	
	ECMLV5-F	GCG GCG CTG AAG AAG AAA GC	
	ECMLV5-R	CTC CCG GCA GGC GAA GCA TTG T	
	ECMLV7-F	GTG AAG GAT AAG CTG CAT TTG TCA	
	ECMLV7-R	GCC TGA CGC TAA AGA TAA AGA AGA	
Matrize	2 µl Hitzelysat		
PCR-Bedingungen			
Initiale Denaturierung		94 °C	900 Sek. ¹
30 Zyklen		94 °C	30 Sek.
		58 °C	90 Sek.
		68 °C	90 Sek.
		68 °C	600 Sek.
Finale Elongation		68 °C	600 Sek.

¹Sek. = Sekunden

3.6.1.3 *bla*_{TEM}-PCR

Die *E. coli*-Stämme wurden hinsichtlich des Vorkommens des β-Laktamase-Gens *bla*_{TEM} untersucht (Tabelle 11). Dabei detektiert die gewählte PCR verschiedene *bla*_{TEM}-Varianten.

Tabelle 11: Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen der *bla*_{TEM}-PCR

Reaktionsansatz			
Polymerase	OneTaq DNA Polymerase		
<i>primer</i>	tem1-RK1445/08-for	ATG AGT ATT CAA CAT TTT CGT GTC G	
	MultiTSO-T_rev	CGT TCA TCC ATA GTT GCC TGA C	
Matrize	1 µl Hitzelysat		
PCR-Bedingungen			
Initiale Denaturierung		94 °C	60 Sek. ¹
25 Zyklen		94 °C	30 Sek.
		56 °C	30 Sek.
		68 °C	60 Sek.
		68 °C	300 Sek.
Finale Elongation		68 °C	300 Sek.

¹Sek. = Sekunden

3.6.1.4 *gyrA-gyrB-parC*-Triplex-PCR

Mutationen in den Genen *gyrA*, *gyrB* oder *parC*, die eine Resistenz gegenüber Fluorchinolonen vermitteln, wurden mittels Triplex-PCR (Tabelle 12) und anschließender Sequenzierung identifiziert. Aus diesem Grund wurde die PCR mit einer *proofreading* Polymerase durchgeführt.

Tabelle 12: Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen der *gyrA-gyrB-parC*-Triplex-PCR

Reaktionsansatz		
Polymerase	Phusion High Fidelity DNA Polymerase	
<i>primer</i>	<i>gyrA</i> -EcFQR_F	GGT ACA CCG TCG CGT ACT TT
	<i>gyrA</i> -EcFQR_R ¹	CAA CGA AAT CGA CCG TCT CT
	<i>gyrB</i> -F	TGA AAT GAC CCG CCG TAA
	<i>gyrB</i> -R ¹	GCT TGC CTT TCT TCA CTT TGT A
	<i>parC</i> -FQRVila_F	AAA CCT GTT CAG CGC CGC ATT
	<i>parC</i> -FQRVila_R ¹	GTG GTG CCG TTA AGC AAA
Matrize	2 µl Hitzelysat (1:10 verdünnt)	
PCR-Bedingungen		
Initiale Denaturierung	98 °C	120 Sek. ²
27 Zyklen	98 °C	10 Sek.
	58 °C	20 Sek.
	72 °C	20 Sek.
	72 °C	600 Sek.
Finale Elongation	72 °C	600 Sek.

¹Diese *primer* wurden auch bei der Sequenzierung der PCR-Amplifikate eingesetzt;

²Sek. = Sekunden.

3.6.1.5 *parE-acrR-marR*-Triplex-PCR

Mutationen in den Genen *parE*, *acrR* oder *marR*, die ebenfalls die Suszeptibilität gegenüber Fluorchinolonen verringern, wurden mittels Triplex-PCR unter Verwendung einer *proofreading* Polymerase (Tabelle 13) und anschließender Sequenzierung in den Stämmen identifiziert.

Tabelle 13: Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen der *parE-acrR-marR*-Triplex-PCR

Reaktionsansatz		
Polymerase	PuReTaq Ready-To-Go PCR beads	
<i>primer</i>	<i>parE</i> F853 ¹	GAC CGA AAG CTA CGT CAA CC
	<i>parE</i> R1810	GTT CGG ATC AAG CGT GGT TT
	<i>Mar</i> ORF1139 ¹	GCC AGG CCA AGA AAT AAC GC
	<i>Mar</i> ORR2011	GAG TAA CCC GAA CGC TCT GA
	<i>Acr</i> R8900F	ACT GTT ACT ACG CCA ACG
	<i>Acr</i> R9934R	CTG AAC CTG AAG AAC GAC CTG
	<i>Acr</i> RQ9887R ²	GAC GCA GTG AAC CAG AA
Matrize	1 µl Hitzelysat	

¹Diese *primer* wurden auch bei der Sequenzierung der PCR-Amplifikate eingesetzt.

²Dieser *primer* wurde ausschließlich zur Sequenzierung des PCR-Amplifikats verwendet.

Tabelle 13: (Fortsetzung)

PCR-Bedingungen		
Initiale Denaturierung	95 °C	300 Sek. ²
27 Zyklen	94 °C	15 Sek.
	58 °C	20 Sek.
	72 °C	60 Sek.
	72 °C	600 Sek.
Finale Elongation	72 °C	600 Sek.

²Sek. = Sekunden

3.6.1.6 *qnr*-Multiplex-PCR

Die *E. coli*-Stämme wurden hinsichtlich des Vorkommens vornehmlich Plasmid-kodierter *qnr* untersucht (Tabelle 14), die eine Resistenz gegenüber niedrigen Enrofloxacin-Konzentrationen vermitteln.

Tabelle 14: Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen der *qnr*-Multiplex-PCR

Reaktionsansatz		
Polymerase	OneTaq DNA Polymerase	
<i>primer</i>	Qnr-Sm-F	GCA AGT TCA TTG AAC AGG GT
	Qnr-Sm-R	TCT AAA CCG TCG AGT TCG GCG
	Qnr-Bm-F	GGM ATH GAA ATT CGC CAC TG
	Qnr-Bm-R	TTT GCY GYY CGC CAG TCG AA
	Qnr-Am-F	AGA GGA TTT CTC ACG CCA GG
	Qnr-Am-R	TGC CAG GCA CAG ATC TTG AC
	Qnr-Dm-F	AGG TGT AGC ATG TAT GGA AAA GC
	Qnr-Dm-R	ACA TTG GGG CAT TAG GCG TT
Matrize	1 µl Hitzelysat	
PCR-Bedingungen		
Initiale Denaturierung	95 °C	300 Sek. ¹
30 Zyklen	95 °C	45 Sek.
	58 °C	45 Sek.
	72 °C	45 Sek.
	72 °C	300 Sek.
Finale Elongation	72 °C	300 Sek.

¹Sek. = Sekunden

3.6.1.7 *qnrB*-PCR

Stämme, die in der *qnr*-Multiplex-PCR eine schwache Bande auf Höhe des *qnrB*-Amplifikats zeigten (264 bp), wurden in einer *qnrB*-Monoplex-PCR erneut hinsichtlich des Vorhandenseins dieses Gens getestet (Tabelle 15).

Tabelle 15: Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen der *qnrB*-PCR

Reaktionsansatz			
Polymerase	OneTaq DNA Polymerase		
<i>primer</i>	QnrBm-F	GGM ATH GAA ATT CGC CAC TG	
	QnrBm-R	TTT GCY GYY CGC CAG TCG AA	
Matrize	1 µl Hitzelysat		
PCR-Bedingungen			
Initiale Denaturierung		95 °C	300 Sek. ¹
30 Zyklen		95 °C	45 Sek.
		53 °C	30 Sek.
		72 °C	45 Sek.
		72 °C	300 Sek.
Finale Elongation		72 °C	300 Sek.

¹Sek. = Sekunden

3.6.1.8 PMQR2-Triplex-PCR

Die *E. coli*-Stämme wurden auf die Anwesenheit des vornehmlich Plasmid-kodierten *aac(6′)-Ib-cr*-Gens untersucht, das unter anderem eine Resistenz gegenüber niedrigen Enrofloxacin-Konzentrationen vermittelt. Auch das Vorkommen der ebenfalls Plasmid-kodierten Gene für die Effluxpumpen *qepA* und *oqxAB* wurde überprüft (Tabelle 16).

Tabelle 16: Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen der PMQR2-Triplex-PCR

Reaktionsansatz			
Polymerase	HotStarTaq DNA Polymerase im Qiagen Mastermix		
<i>primer</i>	aac(6′)-Ib-cr-F	TTG GAA GCG GGG ACG GAM	
	aac(6′)-Ib-cr-R	ACA CGG CTG GAC CAT A	
	qepA-F	GCA GGT CCA GCA GCG GGT AG	
	qepA-R	CTT CCT GCC CGA GTA TCG TG	
	oqxAB-F	CCG CAC CGA TAA ATT AGT CC	
	oqxAB-R	GGC GAG GTT TTG ATA GTG GA	
Matrize	2 µl Hitzelysat		
PCR-Bedingungen			
Initiale Denaturierung		95 °C	900 Sek. ¹
30 Zyklen		94 °C	30 Sek.
		63 °C	90 Sek.
		72 °C	90 Sek.
		72 °C	600 Sek.
Finale Elongation		72 °C	600 Sek.

¹Sek. = Sekunden

3.6.1.9 *floR*-PCR

E. coli-Stämme, deren Florfenicol-MHK-Wert > 8 µg/ml betrug, wurden in einer Monoplex-PCR auf Präsenz des *floR*-Gens untersucht (Tabelle 17).

Tabelle 17: Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen der *floR*-PCR

Reaktionsansatz			
Polymerase	OneTaq DNA Polymerase		
<i>primer</i>	floR-F	ATG GCA GGC GAT ATT CAT TA	
	floR-R	AAA CGG GTT GTC ACG ATC AT	
Matrize	1 µl Hitzelysate		
PCR-Bedingungen			
Initiale Denaturierung		94 °C	300 Sek. ¹
30 Zyklen		94 °C	30 Sek.
		55 °C	35 Sek.
		70 °C	60 Sek.
Finale Elongation		72 °C	300 Sek.

¹Sek. = Sekunden

3.6.2 *Real-Time*-PCR-Analyse

3.6.2.1 LEC-LAMP-Multiplex-PCR zur Identifizierung des *bla*_{CTX-M}-Allels

Die phänotypisch Ceftiofur-resistenten Stämme wurden mittels der *loop-primer endonuclease cleavage loop-mediated isothermal amplification* (LEC-LAMP) Methode (Higgins *et al.* 2020) hinsichtlich des Vorkommens von Allelen aus der *bla*_{CTX-M-1}-Genfamilie analysiert. Mit einer Multiplex-LEC-LAMP-PCR wurden die Stämme als *bla*_{CTX-M}-negativ, als *bla*_{CTX-M-1}- oder als *bla*_{CTX-M-15}-positiv charakterisiert. Die Bindungsstelle der *primer* erlaubt es allerdings nicht, zwischen den Allelen *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-61} und *bla*_{CTX-M-138} bzw. zwischen *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-55} und *bla*_{CTX-M-102} zu differenzieren, da die in diesen Allelen vorkommenden Einzelnukleotid-Polymorphismen am 3'-Ende des kodierenden Leserahmens der Ausgangsgene *bla*_{CTX-M-1} bzw. *bla*_{CTX-M-15} liegen. Zur besseren Übersichtlichkeit werden positive Signale in der LEC-LAMP-PCR von hier an lediglich als *bla*_{CTX-M-1}- oder *bla*_{CTX-M-15}-positiv bzw. -negativ bezeichnet. Für die Multiplex-PCR wurde eine Mischung der *primer* erstellt, die wie alle anderen *primer*-Lösungen bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C gelagert wurde.

Die für diese *Real-Time*-Reaktion verwendeten *primer* LB1 und LB15 waren jeweils mit einem Fluorophor versehen (LB1 mit FAM, LB15 mit HEX), das durch einen ebenfalls in das Oligonukleotid eingebauten Signalauslöser (Englisch: *quencher*) unterdrückt wurde. Erst wenn der jeweilige *primer* an die entsprechende Zielsequenz im Genom des

zu testenden Bakterienstamms gebunden hat, verlängert wurde und eine Schleife ausbilden konnte, wurden *quencher* (BHQ1, Tabelle 18) und Fluorophor durch einen endonukleolytischen Schnitt voneinander getrennt, sodass ein Fluoreszenzsignal entstand. Der Echtzeit-Nachweis der *bla*_{CTX-M-1}- oder *bla*_{CTX-M-15}-Allele erfolgte über die Messung dieses Signals. Dabei wurde das *primer*-gebundene Fluorophor FAM (495 – 520 nm) bei *bla*_{CTX-M-1}- und das *primer*-gebundene Fluorophor HEX (535 – 565 nm) bei *bla*_{CTX-M-15}-positiven Stämmen freigesetzt.

Tabelle 18: Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen der LEC-LAMP-Multiplex-PCR

Reaktionsansatz		
Polymerase	Bst 2.0 WarmStart DNA Polymerase	
<i>primer</i>	FIP	GCT TTC ACT TTT CTT CAG CAC CGC ¹ CGC TTT GCG ATG TGC AG
	BIP	CCG AAT CTG TTA AAT CAG CGA GTT GAG A–GAC GTG CTT TTC CGC
	LF	CGG CCA TCA CTT TAC TGG TGC
	LB1	BHQ1 ² -TCTGA(dSpacer ³)T(FAM ⁴ -dT)GGT TAA CTA TAA TCC GAT TGC G
	LB15	BHQ1-TCTGA(dSpacer)C(HEX ⁵ -dT)TGT TAA CTA TAA TCC GAT TGC G
	F3	GTG GCA TTG ATT AAC ACA GCA G
	B3	GCG CTA AGC TCA GCC AG
Matrize	1 µl Hitzelysat	
PCR-Bedingungen		
90 Zyklen	63 °C	60 Sek. ⁶

¹– = Trennung zwischen *sense*- und *antisense*-Sequenzen

²BHQ1 = *black hole quencher 1* = Signalauslöcher, an Thymin gekoppelt;

³dSpacer = 1',2'-dideoxyribose = abasisches Nukleotidanalogen;

⁴FAM = Fluorophor 6-Carboxyfluoreszein, an Thymin gekoppelt;

⁵HEX = Fluorophor 6-Hexachlorfluoreszein, an Thymin gekoppelt;

⁶Sek. = Sekunden.

3.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von PCR-Amplifikaten oder Plasmid-DNA wurde in horizontalen Agarose-Gelen durchgeführt. Als Laufpuffer sowie für die Agarose-Gele wurde 1x Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer) verwendet. Die Sichtbarmachung und Dokumentation der aufgetrennten DNA-Fragmente erfolgte unter UV-Licht im Geldokumentationssystem. Digitale Abbilder der Gele wurden mittels BioNumerics Software ausgewertet.

3.7.1 Gelelektrophoretische Auftrennung von PCR-Amplifikaten

Die Agarose-Gele wurden vor dem Gießen mit 70 ng/ml GelRed-Farbstoff versetzt. Ihre Agarosekonzentration, die an die Größe des zu detektierenden PCR-Amplifikats angepasst wurde, ist Tabelle 19 zu entnehmen. Nachdem die jeweilige Menge an PCR-Amplifikat mit 3 – 5 µl Ladepuffer vermischt worden war, erfolgte das Auftragen

der Proben. Die PCR-Produkte wurden unter einer Spannung von circa 6 V/cm Elektrodenabstand aufgetrennt. Zur Bestimmung der Größe der aufgetrennten PCR-Fragmente wurde randständig ein 100 bp DNA Marker mitgeführt.

Tabelle 19: Agarose-Konzentrationen und Menge des eingesetzten Amplifikats zur Darstellung der PCR-Ergebnisse

PCR	Agarosekonzentration im Gel [%]	Eingesetzte Menge Amplifikat [μ l]
<i>stx1-stx2</i> -Duplex-PCR	1,5	10
<i>stx2</i> -Subtypisierungs-PCR	1,5	10
MLVA-Multiplex-PCR	2,5	10
MLVA-Duplex-PCR	2,5	10
<i>bla</i> _{TEM} -PCR	1,5	7
<i>gyrA-gyrB-parC</i> -Triplex-PCR	1,5	7
<i>parE-acrR-marR</i> -Triplex-PCR	1,0	6
<i>qnr</i> -Multiplex-PCR	2,0	8
<i>qnrB</i> -PCR	2,0	7
PMQR2-Triplex-PCR	2,0	12
<i>floR</i> -PCR	1,5	8

3.7.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von Plasmid-DNA

Zur Darstellung der Plasmide wurde ein Aliquot des Plasmid-Präparats eines Stammes (18 μ l; siehe 3.9.1) im Verhältnis von 4:1 mit Ladepuffer versetzt und 20 μ l dieses Gemisches in einem TBE-Agarose-Gel aufgetragen. Dabei wurden große Plasmide (circa 48,5 kb bis 240 kb bzw. Plasmide oberhalb der chromosomalen DNA-Bande) und kleine Plasmide (circa 1 kb bis 48,5 kb bzw. Plasmide unterhalb der chromosomalen DNA-Bande) in separaten Gelläufen visualisiert. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die TBE-Agarose-Gele bei Raumtemperatur 15 min in einem Ethidiumbromidhaltigen Färbegrad (4 μ g/ml) gefärbt und anschließend 45 min in *Aqua dest.* entfärbt.

3.7.2.1 Darstellung kleiner Plasmide

Nachdem das Gemisch aus Plasmid-DNA und Ladepuffer auf einem 0,8 %igen TBE-Agarose-Gel aufgetragen worden war, wurde für 3 h eine Spannung von 4,7 V/cm Elektrodenabstand angelegt. Zur Größenbestimmung wurden jeweils randständig 6,5 μ l eines Quick-Load 1 kb Extend DNA Markers mitgeführt. Bei jedem Gellauf wurde zudem die Plasmid-DNA des *E. coli*-Stammes V517 aufgetragen, um auch einen Größenvergleich unter den Bedingungen des Laufverhaltens von zirkulärer Plasmid-DNA im Agarose-Gel zu gewährleisten. Da in vielen Gelen ungefähr auf gleicher Höhe unspezifische Banden

zu sehen waren, wurde zum Ausschluss von Verunreinigungen überprüft, ob es sich hierbei um RNA handelt (siehe 9.3).

3.7.2.2 Darstellung großer Plasmide

Nachdem das Gemisch aus Plasmid-DNA und Ladepuffer auf einem 0,5 %igen TBE-Agarose-Gel aufgetragen worden war, wurde das Gel 18 h unter einer Spannung von 4,2 V/cm Elektrodenabstand in der Maxi-Plus SUB25C Gelelektrophorese aufgetrennt. Während des gesamten Laufs wurde der Laufpuffer über ein System der Pufferumwälzung mit angeschlossenem Kühlgerät auf 14 °C gekühlt. Zur Größenbestimmung wurden jeweils randständig und in der Gelmitte in zwei Bahnen die Plasmid-DNA folgender *E. coli*-Stämme aufgetragen: In einer Spur Stamm R478 und Stamm R27, in der zweiten Spur Stamm 18E0127 und Stamm V517. Dazu wurden für jede Markerspur 10 µl der beiden Stämme vermischt, mit 4 µl loading dye versetzt und von dem Gemisch wiederum 20 µl in die entsprechenden Bahnen im Gel übertragen.

3.7.3 Analyse von Gelelektrophoresen

Die Agarose-Gele der MLVA-PCR-Analyse sowie der Plasmid-DNA wurden Computerbasiert analysiert (BioNumerics Software). Dazu wurden jeweils verschiedene Experiment-Kategorien des Typs „Fingerabdruck“ erstellt, die mittels zusammengesetzter Datensätze gemeinsam interpretiert wurden. Das Gel-Bild der MLVA-Duplex- und der MLVA-Multiplex-PCR wurden unter gleicher Gewichtung zu einem „MLVA-Profil“ vereint, während die Bilder der kleinen und großen Plasmide eines Stammes unter der Kategorie „Plasmid-Profil“ zusammengeführt wurden. Das Bandenmuster der großen Plasmide (> 48,5 kB) wurde dabei im Vergleich zum Bandenmuster der kleinen Plasmide dreifach gewichtet, um die teils eingeschränkte Reproduzierbarkeit der Darstellung der kleinen Plasmide auszugleichen, und weil Antibiotika-Resistenzdeterminanten eher auf größeren Plasmiden kodiert sind. Die Profile basierten auf dem *Dice*-Koeffizienten der Bandenmuster. Sie wurden mittels der *unweighted pair group* Methode mit arithmetischem Mittel (UPGMA) und einer Bandentoleranz von 1,5 %, einer Optimierung von 2 % sowie einer Toleranzänderung von 0,5 % verglichen. Um Variation zwischen den Gelläufen zu kompensieren, wurde bei zwei Stämmen vom gleichen MLVA-Profil ausgegangen, wenn eine Ähnlichkeit des Bandenmusters von mindestens 98 % bestand. Die Stämme gehörten in diesem Fall einem gemeinsamen MLVA-*cluster* an (siehe 4.6.3).

3.8 Phänotypische Resistenz-Testung mittels Bouillon-Mikrodilutionsmethode

3.8.1 Suszeptibilitätstestung mit MICRONAUT-S Großtier Platte

Mit jedem als *E. coli* identifizierten Stamm wurde eine Empfindlichkeitsprüfung gegenüber 16 Antibiotika (AB) durchgeführt (Tabelle 20). Die dafür genutzte MICRONAUT-S Großtier Platte (Abb. 4) wurde von der Arbeitsgruppe „Antibiotikaresistenzen“ der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft entwickelt (DVG-Arbeitskreis „Antibiotikaresistenz“ 2017). Der auf der Testplatte abgedeckte Konzentrationsbereich dieser AB, der jeweils mindestens drei, höchstens aber acht Konzentrationen umfasst, deckt für jedes AB die klinischen Grenzwerte „resistent“, „intermediär“ und „suszeptibel“ ab (Tabelle 20). So wurde mittels Bouillon-Mikrodilutionsmethode für jeden Stamm die jeweilige MHK des ABs bestimmt. Für suszeptible Stämme, die in keiner auf der Platte vorhandenen Konzentration eines ABs wuchsen, oder resistente Stämme, die in allen auf der Platte vorhandenen Konzentration eines ABs wuchsen, wurde als MHK-Wert allerdings nur ein Höchst- bzw. Mindestwert bestimmt (größer oder kleiner gleich einem bestimmten Zahlenwert).

Die Micronautplatten wurden entsprechend den Angaben des Herstellers unter Verwendung von Müller-Hinton-Bouillon (MHB) beimpft und inkubiert. In Kürze wurde wie folgt vorgegangen: Die Kryokultur eines jeden Stammes wurde auf einer Blutagar-Platte ausgestrichen und inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden einige Kolonien in steriler, 0,9 %iger NaCl-Lösung homogenisiert, sodass die Trübung der Suspension bei 600 nm einer im Vergleich mit einem Standard ermittelten optischen Dichte von 0,5 McFarland-Einheiten entsprach. 50 µl der Bakteriensuspension wurden daraufhin in 11,5 ml MHB überführt und nach ausreichendem Vortexen 100 µl der beimpften MHB in jede Kavität der Micronautplatte pipettiert. Zur Inkubation (siehe 3.4.1) wurden maximal fünf Micronautplatten aufeinandergestapelt, wobei die oberste Platte mit einem Deckel abgedeckt wurde. Als Referenzstamm wurde der *E. coli*-Stamm ATCC 25922 verwendet. Die photometrische Messung der Testplatten erfolgte nach Inkubation und anschließendem Aufschütteln mittels ELISA Reader, die Auswertung mittels MICRONAUT6 Software. Dabei wurde beim Wachstum eines Stammes in der höchsten Konzentration, die von einem AB auf der Platte vorhanden war (z.B. 16 µg/ml bei Ampicillin), als MHK-Ergebnis die entsprechend eine Log₂-Stufe höhere Konzentration des ABs im System eingetragen (entsprechend des Beispiels Ampicillin: MHK ≥ 32 µg/ml).

Katalog-Nr.	Kategorie		Bezeichnung										MERLIN
E1-150-100	V		MICRONAUT-S Großtiere 4										Diagnostika
Layout	K												
1 Test													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	GC	PEN 8	PEN 4	PEN 2	PEN 1	PEN 0,5	PEN 0,25	PEN 0,125	PEN 0,0625	COL 2	COL 1	COL 0,5	
B	GC	AMP 16	AMP 8	AMP 4	AMP 2	AMP 1	AMP 0,5	AMP 0,25	FLL 8	FLL 4	FLL 2	FLL 1	
C	AMC 16/8	AMC 8/4	AMC 4/2	AMC 2/1	TIA 32	TIA 16	TIA 8	TIA 4	TIA 2	TIA 1	TIA 0,5	TIA 0,25	
D	CET 4	CET 2	CET 1	CET 0,5	CET 0,25	CET 0,125	TILM 16	TILM 8	TILM 4	TILM 2	TILM 1	TILM 0,5	
E	CTN 16	CTN 8	CTN 4	CTN 2	CTN 1	TUL 64	TUL 32	TUL 16	TUL 8	TUL 4	TUL 2	TUL 1	
F	ERY 4	ERY 2	ERY 1	ERY 0,5	ERY 0,25	ERY 0,125	TET 8	TET 4	TET 2	TET 1	TET 0,5	TET 0,25	
G	GEN 8	GEN 4	GEN 2	GEN 1	GEN 0,5	GEN 0,25	GEN 0,125	T/S 2/38	T/S 1/19	T/S 0,5/9,5	T/S 0,25/4,75	TET 0,125	
H	SPT 64	SPT 32	SPT 16	SPT 8	SPT 4	ENR 1	ENR 0,5	ENR 0,25	ENR 0,125	ENR 0,0625	ENR 0,03125	ENR 0,015625	

Abb. 4: Belegung der MICRONAUT-S Großtier Platte zur Antibiotika-Suszeptibilitätstestung mittels Bouillon-Mikrodilution

Zahlen unterhalb der Antibiotika-Bezeichnungen: Konzentration in µg/ml; GC (*growth control*) = Wachstumskontrolle; PEN = Penicillin; COL = Colistin; AMP = Ampicillin; FLL = Florfenicol; AMC = Amoxicillin-Clavulansäure; TIA = Tiamulin; CET = Ceftiofur; TILM = Tilmicosin; CTN = Cefalotin; TUL = Tulathromycin; ERY = Erythromycin; TET = Tetrazyklin; GEN = Gentamicin, T/S = Trimethoprim/Sulfamethoxazol; SPT = Spectinomycin; ENR = Enrofloxacin.

3.8.2 Cefquinom-Suszeptibilitätstestung

Da die MICRONAUT-S Großtier Platte keine Empfindlichkeitstestung gegenüber Cefquinom (CQ) einschließt, wurde diese separat auf einer leeren 96-Loch Mikrotiterplatte für alle von GQ-Platten isolierten Stämme durchgeführt, um deren Resistenz gegen das in der Platte enthaltene AB zu bestätigen. Es wurden jeweils acht Stämme im Doppelansatz gegen die CQ-Konzentrationen 8, 4, 2 und 1 µg/ml getestet (Abb. 5). Dieser Konzentrationsbereich deckt die klinischen Grenzwerte „suszeptibel“ (≤ 2 µg/ml), „intermediär“ (4 µg/ml) und „resistent“ (≥ 8 µg/ml) für bakterielle Infektionen beim Großtier ab (DVG-Arbeitskreis „Antibiotikaresistenz“ 2004). Vorbereitend wurde jeder CQ-Stamm auf einer GQ-Platte ausgestrichen und inkubiert. Nach Überprüfung der Reinheit wurde eine Einzelkolonie des Stammes auf Blutagar ausgestrichen und erneut inkubiert.

Für die Beschickung der Mikrotiterplatte wurde eine CQ-Stammlösung (2 mg/ml DMSO) in Reinstwasser auf eine Konzentration von 16 µg/ml verdünnt und daraus eine Log2-Verdünnungsreihe in Reinstwasser bis zur Konzentration von 0,03125 µg/ml erstellt. In alle Kavitäten mit der Endkonzentration 8 µg/ml wurden 50 µl der 16 µg/ml CQ-Verdünnung pipettiert, und in alle Kavitäten mit der Endkonzentration 4 µg/ml wurde das gleiche Volumen der 8 µg/ml CQ-Verdünnung pipettiert. Dies wurde entsprechend für alle anderen Konzentrationen fortgeführt (A1 – F12 + G11 – 12; Abb. 5). In die Kavitäten der Wachstumskontrollen (G1 – 10 + H1 – 8) wurden je 50 µl Reinstwasser vorgelegt. Als Sterilkontrollen wurden 100 µl MHB, respektive Reinstwasser, in die entsprechenden Kavitäten (H9 – 12) pipettiert, während in den Sterilkontrollen der CQ-Verdünnungen 50 µl MHB vorgelegt wurden (E9 – 12). Nun wurden 5 ml 0,9 %ige NaCl-Lösung mit Einzelkolonien des CQ-Stammes von der Blutagarplatte versetzt, sodass die Trübung der Suspension bei 600 nm einer im Vergleich mit einem Standard ermittelten optischen Dichte von 0,5 McFarland-Einheiten entsprach. Nach ausreichendem Durchmischen wurden 10 µl der Suspension in 1,15 ml MHB übertragen, das beimpfte Medium gevortext und 50 µl davon in die CQ-haltigen Kavitäten sowie in die Kavitäten zur Wachstumskontrolle des entsprechenden Stammes pipettiert. Dies wurde für alle acht Stämme pro Platte in gleicher Weise durchgeführt. Als Qualitätskontrolle wurde auf jeder Platte der *E. coli*-Stamm ATCC 25922 mitgeführt. Abschließend wurde die Platte mit einem Deckel abgedeckt und inkubiert (siehe 3.4.1).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Stamm 1				Stamm 4				Stamm 7			
B	8 µg	4 µg	2 µg	1 µg	8 µg	4 µg	2 µg	1 µg	8 µg	4 µg	2 µg	1 µg
C	Stamm 2				Stamm 5				Stamm 8			
D	8 µg	4 µg	2 µg	1 µg	8 µg	4 µg	2 µg	1 µg	8 µg	4 µg	2 µg	1 µg
E	Stamm 3				Stamm 6				8 µg	4 µg	2 µg	1 µg
F	8 µg	4 µg	2 µg	1 µg	8 µg	4 µg	2 µg	1 µg	0,5 µg	0,25 µg	0,125 µg	0,063 µg
G	GC Stamm 1		GC Stamm 2		GC Stamm 3		GC Stamm 4		GC ATCC		0,031 µg	0,016 µg
H	GC Stamm 5		GC Stamm 6		GC Stamm 7		GC Stamm 8		Sterilk. MHB		Sterilk. Reinstw.	

Abb. 5: Layout der 96-Loch Mikrotiterplatte zur Empfindlichkeitstestung gegenüber Cefquinom mittels Bouillon-Mikrodilution

Angaben in µg = Cefquinom-Menge in 1 ml; GC = Wachstumskontrolle; ATCC = ATCC 25922 *E. coli* Qualitätskontrollstamm; Sterilk. = Sterilkontrolle; MHB = Müller-Hinton-Bouillon; Reinstw. = Reinstwasser.

Am Folgetag wurden die Platten visuell ausgewertet sowie nach dem Aufschütteln photometrisch bei 620 nm gemessen. Die Testung auf einer Platte wurde nur als gültig gewertet, wenn die Sterilkontrollen dieser Platte im Gegensatz zu den Wachstumskontrollen kein Wachstum zeigten und der MHK-Wert der Qualitätskontrolle zwischen 0,0625 und 0,03125 µg Cefquinom/ml lag (CLSI-VET06 2017). Der Inhalt einer Kavität wurde als Wachstum gewertet, wenn bei der visuellen Überprüfung Knöpfchenbildung zu sehen war und photometrisch $\geq 50\%$ der gemittelten Trübungen der Wachstumskontrollen gemessen wurden. In diesem Fall wurde als MHK-Wert die Konzentration eingetragen, die eine Log₂-Stufe über der Cefquinom Konzentration der entsprechenden Kavität lag. Belief sich die gemessene Trübung auf weniger als 50 % der gemittelten Trübungen der Wachstumskontrollen, so wurde die Konzentration der gemessenen Kavität als MHK-Wert für den Stamm eingetragen. Abschließend wurden die Sterilkontrollen mittels Öse auf GA ausgestrichen, um den jeweiligen Stamm nach erfolgter Inkubation erneut auf Reinheit zu überprüfen. Falls sich eine Mischkultur zeigte, wurde die CQ-MHK-Testung für diesen Stamm wiederholt.

3.8.3 Interpretation der Werte der minimalen Hemmkonzentrationen

Die MHK-Werte aus der Suszeptibilitätstestung wurden anschließend nach zwei verschiedenen Bewertungskriterien eingeteilt (siehe 2.2.1):

ECOFF-Werte von EUCAST – Für die AB Tilmicosin, Tiamulin und Tulathromycin liegt kein ECOFF-Wert vor (EUCAST 2021).

Klinische Grenzwerte des Arbeitskreises „Antibiotikaresistenz“ der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft – Die Grenzwerte basieren größtenteils auf der dritten Version des CLSI-Dokuments VET01S (CLSI-VET01 2018). Lediglich der Grenzwert für Colistin wurde aus der Vorschrift DIN 58940-4 des Deutschen Instituts für Normung entnommen (DIN 2000), die der „Arbeitskreis Veterinärmedizinische Infektionsdiagnostik“ veröffentlicht hat (AVID-Methodensammlung 2000).

Die Ergebnisse für Benzylpenicillin und Erythromycin wurden aus der Auswertung ausgeschlossen, da *E. coli* intrinsisch resistent gegenüber diesen AB ist (CLSI-VET08 2018; EUCAST 2021). Von der Micronautplatte wurden demnach 14 AB in die Auswertung einbezogen.

Tabelle 20: Getestete Antibiotika inklusive Konzentrationsbereich der MICRONAUT-S Großtier Platte

Antibiotikum			Konzentrationsbereich		Auswertung			ECOFF ³
Abk. ¹	vollständiger Name	Stoffklasse	in µg/ml	Log-Stufen	Klinischer Grenzwert ²			
					S	I	R	
AMC	Amoxicillin-Clavulansäure	Aminopenicillin mit β-Laktamase Inhibitor	2/1 – 16/8	4	≤ 8/4	16/8	≥ 32/16	8
AMP	Ampicillin	Aminopenicillin	0,25 – 16	8	≤ 8	16	≥ 32	8
CTN	Cefalotin	Cephalosporin, 1. Generation	1 – 16	5	≤ 8	16	≥ 32	32
CET	Ceftiofur	Cephalosporin, 3. Generation	0,125 – 4	6	≤ 2	4	≥ 8	1
COL	Colistin	Polymyxin	0,5 – 2	3	≤ 0,5	1 – 2	≥ 4	2
ENR	Enrofloxacin	Fluorchinolon	0,015625 – 1	7	≤ 0,25	0,5	≥ 1	0,125
ERY	Erythromycin	Makrolid-Antibiotikum (14-gliedrig)	0,125 – 4	6	Intrinsische Resistenz			–
FLL	Florfenicol	(Am)Phenicol	1 – 8	4	≤ 4	8	≥ 16	16
GEN	Gentamicin	Aminoglykosid	0,125 – 8	7	≤ 4	8	≥ 16	2
PEN	Benzylpenicillin	Schmal-Spektrum Penicillin	0,0625 – 8	8	Intrinsische Resistenz			–
SPT	Spectinomycin	Aminocyclitol	4 – 64	5	≤ 32	64	≥ 128	64
TET	Tetrazyklin	Tetrazyklin	0,125 – 8	7	≤ 4	8	≥ 16	8
TIA	Tiamulin	Pleuromutilin	0,25 – 32	8	≤ 16	–	≥ 32	–
TILM	Tilmicosin	Makrolid-Antibiotikum (16-gliedrig)	0,5 – 16	6	≤ 16	–	≥ 32	–
T/S	Trimethoprim/Sulfamethoxazol	Dihydrofolatreduktase-Inhibitor + Sulfonamid	0,25/4,75 – 2/38	4	≤ 2/38	–	≥ 4/76	0,25
TUL	Tulathromycin	Makrolid-Antibiotikum (15-gliedrig)	1 – 64	6	≤ 16	32	≥ 64	–

¹Abk. = Abkürzung;²Kriterien für die Auswertung übernommen aus dem Deutschen Tierärzteblatt (DVG-Arbeitskreis „Antibiotikaresistenz“ 2017): S = suszeptibel; I = intermediär; R = resistent; es wurde jeweils der Grenzwert für *Enterobacteriaceae* gewählt. Falls dieser nicht vorhanden war, wurde der Grenzwert für Schweine bzw. deren gramnegative Erreger gewählt. Falls nur eine einzige Kombination aus Tierart, Indikation und Erreger angegeben war, wurde dieser Grenzwert verwendet.³nach (EUCAST 2021).

3.9 DNA-Präparation

3.9.1 Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation der Plasmid-DNA von *E. coli*-Stämmen in möglichst zirkulärer Form erfolgte gemäß der Methode von Barth / Schwarz (Barth 2003), die auf dem modifizierten Verfahren von Kado / Liu (Kado *et al.* 1981) beruht. Nach Ausstreichen und Inkubation eines Stammes auf dem Plattentyp, von dem er ursprünglich isoliert worden war (GE4, GF oder GQ), wurden 5 ml LB-Medium, die das entsprechende Antibiotikum in gleicher Konzentration enthielten, mit einer Kolonie von der Platte beimpft. Nach erneuter Inkubation (siehe 3.4.1) wurden 1,5 ml der Übernachtskultur in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und 10 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurde die Suspension 4 min bei 16.000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde durch Vortexen in 20 µl Tris-EDTA-Puffer homogenisiert, woraufhin 100 µl Lyse-Puffer zugegeben wurden. Dieser wurde bei jeder Plasmid-Präparation frisch aus 10 % SDS, Tris, NaOH und *Aqua dest.* angesetzt. Die Suspension wurde daraufhin durch händisches Stürzen des Reaktionsgefäßes gemischt und 25 min bei 58 °C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (49,5:49,5:1) zugegeben und das Lysat durch 100 Mal kräftiges Stürzen durchmischt. Nach erneuter Zentrifugation bei 15.700 x g für 15 min wurde die obere Phase (circa 90 – 100 µl), in der die Plasmid-DNA enthalten ist, in ein neues steriles 1,5 ml *safelock* Reaktionsgefäß überführt und bis zur gelelektrophoretischen Auftrennung bei -20 °C verwahrt.

3.9.2 Präparation von genomischer DNA

Die in den jeweiligen PCR-Reaktionen amplifizierte, genomische DNA für die Sequenzierung von PCR-Fragmenten wurde mit dem NucleoSpin PCR & Gel Cleanup Kit den Herstellerangaben entsprechend extrahiert und aufgereinigt.

Die genomische DNA der für die Vollgenomsequenzierung ausgewählten Stämme wurde mit dem UltraClean Microbial Kit den Herstellerangaben entsprechend aus Reinkulturen extrahiert und aufgereinigt.

Nach der Extraktion wurde die aufgereinigte DNA in einem *safelock* Reaktionsgefäß im Elutionspuffer des Kits (UltraClean Microbial Kit: *Solution* Elutionspuffer, 10 mM Tris-HCl, pH 8; NucleoSpin PCR & Gel Cleanup Kit: Elutionspuffer, 5 mM Tris-HCl, pH 8,5) aufgenommen. Nachdem die DNA-Konzentration jeder Probe mittels NanoDrop One Spektrophotometer ermittelt wurde, wurde die DNA bis zum Versand bei 5 °C verwahrt.

3.10 DNA-Sequenzierung

3.10.1 Sequenzierung von PCR-Amplifikaten

Sequenzierungen von PCR-Fragmenten wurden für alle Amplifikate aus der *gyrA-gyrB-parC*-Triplex-PCR und der *parE-acrR-marR*-Triplex-PCR durchgeführt, um Mutationen in den entsprechenden Genen nachzuweisen. 13 µl des zu sequenzierenden PCR-Amplifikats wurden mit 2 µl des zur Sequenzierung verwendeten *primers* (10 µM) vermischt und in einem *safelock* Reaktionsgefäß an die Firma Eurofins Genomics SE, versandt. Dort wurde die Sequenzierung der PCR-Amplifikate, basierend auf der Sanger-Methode, durchgeführt.

3.10.2 Vollgenomsequenzierung ausgewählter Stämme

Die genomische DNA der zur Vollgenomsequenzierung ausgewählten Stämme wurde entweder in *safelock* Reaktionsgefäßen an die Firma Eurofins Genomics SE versandt oder in 96-Loch-Platten überführt, die anschließend mit Gummistreifen verschlossen und an die Firma LGC Genomics GmbH versandt wurden. Bei beiden Firmen wurde die Vollgenomsequenzierung unter Verwendung der Illumina NovaSeq Plattform durchgeführt. Die Stämme wurden entweder bei Eurofins als 2x150 bp *paired-end reads* (n = 54) oder bei LGC als 2x250 bp *paired-end reads* (n = 162) sequenziert.

Für die Auswertung der Sequenzen wurde eine Software *pipeline* entwickelt, die größtenteils auf bereits publizierten, in Python oder Perl geschriebenen Programmen beruht. Mit dem Programm *FastQC* (version 0.11; Babraham Bioinformatics Group – <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) wurde eine Qualitätskontrolle der Sequenzdaten durchgeführt. Anschließend wurde mittels der *Shovill pipeline* (Version 1.1; Seemann T. 2019c), welche die Programme *Seqtk*, *KMC 2*, *Trimmomatic*, *Lighter*, *FLASH*, *SPAdes*, *SAMtools*, *BWA MEM* und *Pilon* umfasst, die *de novo* Assemblierung der Illumina *paired-end reads* zu *contigs* durchgeführt. Dazu zählt die Zusammenführung der einzelnen *paired-end reads*, eine Schätzung der Genomgröße, das Abschneiden der Adaptersequenzen, die Korrektur von Sequenzierfehlern in den *reads* und zuletzt eine Nachbearbeitung der assemblierten Sequenzen. Sie beinhaltet die Verbesserung der *contig*-Sequenzen, indem kleinere Fehler durch zugeordnete *reads* behoben werden, sowie die Entfernung von *contigs*, welche zu kurz sind oder eine zu geringe Sequenzabdeckung zeigen. Mit dem Programm *Quast* (Version 5.0; Gurevich *et al.* 2013) wurde anschließend die Qualität der

Assemblierung überprüft. Hierbei wurden verschiedene Daten der Qualitätsanalyse generiert (maximale und minimale *contig* Länge, N50, Gesamtgenomgröße). Unter Verwendung des Programms ABRicate (Version 1.0; Seemann T. 2019a) wurden die Sequenzen der Stämme nach der Anwesenheit spezifischer Gene durchsucht: Replikationsursprünge von Plasmiden sowie Virulenz- und Antibiotika-Resistenzgene. Für diese Annotationen wurden verschiedene Datenbanken wie PlasmidFinder (460 Sequenzen, letzte Aktualisierung am 12.07.2021), VFDB (2597 Sequenzen, letzte Aktualisierung im März 2018), ResFinder (3077 Sequenzen, letzte Aktualisierung im September 2021) sowie Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD; 2631 Sequenzen, letzte Aktualisierung im März 2020) eingesetzt. Zudem wurde der Serotyp eines jeden Stamms mittels SeroTypeFinder (560 Sequenzen, letzte Aktualisierung am 24.09.2020) identifiziert. Für die Analyse der Ergebnisse wurden Filterkriterien bezüglich des *BLAST*-Alignments von Such- und Zielsequenz verwendet. Die prozentuale Anzahl identischer Nukleotide (*percentage identity*) sollte mindestens 70 % und die Länge der Suchsequenz mindestens 90% der Zielsequenz betragen. Ebenfalls zur funktionellen Annotation wurde das von NCBI entwickelte AMRfinderPlus Programm (Version 3.10; 6841 Sequenzen, zuletzt aktualisiert am 11.08.2021; Feldgarden *et al.* 2021) verwendet. Dieses identifiziert Antibiotika-Resistenzgene, aber auch Gene, welche an einer Reaktion gegenüber z. B. Schwermetallen beteiligt sind. Anschließend wurden die sequenzierten Stämme mit dem Programm MLST (Version 2.19; Seemann T. 2019b) typisiert. Dabei wurden die *contigs* nach den Genen des MLST Schemas nach Achtman *et al.* durchsucht und entsprechend des Allelmusters einem Sequenztyp zugewiesen (Achtman *et al.* 2012). Zudem wurde das Programm EZClermont (Version 0.6; <https://github.com/nickp60/EzClermont>) verwendet, um anhand der An- bzw. Abwesenheit der entsprechenden Markerfragmente eine Phylotypisierung nach Clermont *et al.* vorzunehmen (Clermont *et al.* 2013; Clermont *et al.* 2019). Zuletzt wurden die Analyse-Ergebnisse aller beschriebenen Programme mit Hilfe von *multiqc* (Version 1.10; Ewels *et al.* 2016) in einem Bericht zusammengefasst.

Um zu entscheiden, ob *contigs* Plasmid-DNA oder chromosomale DNA enthielten, wurden die Sequenzdaten mit PLATON analysiert, das unter anderem Replikations-, Konjugations- und Mobilisierungsgene sowie Transferursprung-Gene auf *contigs* identifiziert und sie mit Plasmiden aus einer Datenbank abgleicht (Version 1.6;

Schwengers *et al.* 2020). Für Stämme mit Plasmidtypen, für die derzeit Plasmid-MLST (pMLST)-Schemata in der PubMLST Datenbank (Jolley *et al.* 2018) hinterlegt sind (IncA/C, IncF, IncHI1, IncHI2, IncI1 und IncN), wurde eine *in silico* pMLST-Bestimmung unter Verwendung des Programms PLSDB (Carattoli *et al.* 2014) durchgeführt (Galata *et al.* 2019). Mit dem Programm kSNP (Version 3.0; Gardner *et al.* 2015) wurden *k*-mere bestimmt und *k*-mer-basierte Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) identifiziert, die bei der Phylogenieberechnung als Ausgangsbasis für FastTree2 (Version 2.0; Poon *et al.* 2010) dienen. Sollte nur das Kerngenom der 216 sequenzierten Stämme dargestellt werden, wurden unter der Verwendung des Parameters „core“ im Programm kSNP lediglich *k*-mer-basierte SNPs (kSNPs) verglichen, wenn das entsprechende *k*-mer in den Assemblierungen aller Stämme des Datensatzes vorkam. Der Vergleich des akzessorischen Genoms wurde mit dem Programm Roary (<https://sanger-pathogens.github.io/Roary/>) durchgeführt. Dieses überprüft auf Basis des Pangenoms die An- bzw. Abwesenheit der Gene in allen Stämmen eines Datensatzes und definiert akzessorische Gene als solche, die nicht in allen Stämmen vorkommen. Zur Phylogenieberechnung verwendet das Programm ebenfalls FastTree2. Die Darstellung phylogenetischer Bäume wurde mit dem internetbasierten Programm ITOL durchgeführt (Letunic *et al.* 2016). Um zwei phylogenetische Dendrogramme zu vergleichen, wurde mit dem Programm Dendroscope eine *tanglegram*-Grafik erstellt (Version 3.0; Huson *et al.* 2012). Zur weiterführenden Analyse der Ähnlichkeit von Stammpaarungen wurden kSNP-basierte *heatmaps* erstellt. Es flossen aber nur kSNPs in die Analyse ein, wenn das entsprechende *k*-mer in beiden zu vergleichenden Stämmen vorkam. Die in R (Version 4.04; R Core Team 2021) berechneten Netzwerkgrafiken wurden mit dem Programm Cytoscape dargestellt (Version 3.9.0; Shannon *et al.* 2003).

4 Ergebnisse

4.1 Auswahl und Charakterisierung von Betrieben für die Studienteilnahme

Im Rahmen eines Vorversuchs erfolgte ein *Screening* von schweinehaltenden Betrieben in Thüringen, deren Betriebsleiter ihre grundsätzliche Bereitschaft erklärt hatten, an dieser Studie teilzunehmen. Der Schweinegesundheitsdienst Thüringen sammelte dazu im Juli und August 2019 von fünf konventionell und vier ökologisch bewirtschafteten Betrieben Sammelkotproben (SKP). Zusätzlich wurden Daten über die Betriebsgröße und die Lokalisation der Betriebe übermittelt. Verglichen wurden die Betriebe anhand der Anzahl an koloniebildenden Einheiten (KbE) nach Ausstrich der SKP auf antibiotikahaltigen Gassner-Agarplatten (Tabelle 21). Die Auswahl von Betrieben mit starkem Koloniewachstum auf diesen Platten sollte ermöglichen, im Beprobungszeitraum des Hauptversuchs eine potentielle Abnahme an Bakterien, die eine Resistenzdeterminante gegen die in den Gassner-Agarplatten enthaltenen Antibiotika aufwiesen, zu detektieren. In den Hauptversuch sollten zwei konventionelle und zwei biologisch geführte Betriebe aufgenommen werden. Darüber hinaus sollten die Betriebe als geschlossenes System geführt werden, in dem Schweine von der Geburt bis zur Schlachtreife gehalten werden, da der Betrieb seine eigene Nachzucht für die Mast produziert. Damit sollten externe Einflüsse auf die Resistenzsituation in den Betrieben minimiert werden.

Von den vier Bio-Betrieben zeigte nur die Probe von Betrieb B2 Koloniewachstum auf der Gassner (GA)-Agarplatte mit 8 µg/ml Cefquinom (GQ). Die Proben eines weiteren Bio-Betriebs, Betrieb B1, brachten auf allen GA-Platten mit 4 µg/ml Ceftiofur (GF), mit 0,125 µg/ml Enrofloxacin (GE) und mit 4 µg/ml Enrofloxacin (GE4) starkes Wachstum hervor. In den Proben der Betriebe B3 und B4 konnten hingegen keine Cefquinom-resistenten und nur eine geringe Anzahl an Enrofloxacin-resistenten Bakterien nachgewiesen werden.

Von fünf konventionellen Betrieben zeigten nur die Proben der Betriebe K1 und K2 Koloniewachstum auf den GE4-Platten. Eine Probe von Betrieb K2 wuchs auf allen Selektivplatten stark an. Beide Proben von Betrieb K3 und K5 brachten auf den GF- und GQ-Platten kaum oder gar kein Wachstum hervor. Von Betrieb K4 enthielt eine Probe viele Ceftiofur-resistente Bakterien, die andere Probe zeigte allerdings kein Wachstum auf den GF- und GQ-Platten.

Tabelle 21: Koloniewachstum auf selektiven Gassner-Agarplatten nach Ausstrich von Sammelkotproben aus Thüringer schweinehaltenden Betrieben

Bio-Betriebe					Konventionelle Betriebe						
Betrieb	Probe	Selektivnährmedien ¹				Betrieb	Probe	Selektivnährmedien			
		GF	GQ	GE	GE4			GF	GQ	GE	GE4
B1	1	++	-	+++	++	K1	1	++	-	++	++
	2	++++	-	++++	+++		2	+	-	++	-
	3	++	-	++++	+++						
B2	1	++	++	++++	++	K2	1	++++	+++	+++	++
	2	+++	-	++++	++		2	+	+	++	-
B3	1	+++	-	++++	-	K3	1	+	+	+	-
	2	+++	-	+++	+		2	-	-	++	-
B4	1	+++	-	++	+	K4	1	-	-	++	-
	2	+++	-	++++	+		2	+++	+	++++	-
						K5	1	-	-	++++	-
							2	-	-	++	-

¹Plattenbezeichnungen siehe Tabelle 3; Intensität Koloniewachstum siehe Tabelle 4; die vier für den Hauptversuch ausgewählten Betriebe sind fett gedruckt.

Basierend auf den oben genannten Kriterien und den Ergebnissen des Vorversuchs sowie den Betriebsdaten bzw. dem Betriebsmanagement wurden die Betriebe B1, B2, K1 und K2 (Tabelle 21) für die Beprobung im Hauptversuch ausgewählt. Zur Vorbereitung wurde jeder Betrieb einmal besucht, wobei den Betriebsleitern eine Datenschutzerklärung sowie eine Forschungsinformation ausgehändigt wurde. Bei diesen Besuchen wurde sich ein Überblick über den Aufbau des Hofes verschafft, die Stallungen gesichtet und die routinemäßigen Abläufe mit den Betriebsleitern besprochen (Geburtszyklus, Impfungen und regelmäßige Medikamentengaben, Umstallung der Tiere). Die wesentlichen Punkte dieser Besprechung, kombiniert mit der Auswertung der Fragebögen, sind in Tabelle 22 dargestellt.

Tabelle 22: Daten zum Betriebsmanagement der Betriebe B1, B2, K1 und K2

Kriterium	Spezifikation	Betrieb B1	Betrieb B2	Betrieb K1	Betrieb K2
Standorte		1	2 (Abferkelung bis Mittelmast; Endmast)	2 (Abferkelung bis <i>flatdeck</i> ; Mast)	2 (Abferkelung bis <i>flatdeck</i> ; Mast)
Stallgebäude		1	3 (Standort 1) 1 (Standort 2)	2 (Standort 1) 1 (Standort 2)	2 (Standort 1) 1 (Standort 2)
Stallbau	Außenbereich	Nur bei Abferkelbuchten nicht vorhanden	Überall vorhanden	Nicht vorhanden	Nicht vorhanden
	Bodenart	Stroh	Stroh	Spaltenboden	Spaltenboden
Tierzahl	Zuchtsauen	32	110	600	800
	Ferkel bis 30kg	180	460	3100	4400
	Zucht- + Mastschweine	167	855	1000	3660
Rhythmus Abferkelung		3-wöchentlich (nicht strikt eingehalten)	3-wöchentlich	1-wöchentlich	1-wöchentlich
Trennung von Tiergruppen		Nicht strikt	Mäßig strikt	Nur in Säugeperiode Austausch von Tieren (Ammensauen, Ausgleichen von Würfen)	Nur in Säugeperiode Austausch von Tieren (Ammensauen, Ausgleichen von Würfen) und beim dritten MDG ¹ auf dem <i>flatdeck</i>
Abferkelung		Frei	Frei	Ferkelschutzkorb	Ferkelschutzkorb
Saugferkelphase [Wochen]		4 – 6 (3 – 4 davon in Sauengruppenhaltung)	6 – 8 (3,5 davon in Sauengruppenhaltung)	3,5 – 4	4
	Festes Futter ab Tag	Circa 15	Circa 21	7	7 – 10

¹MDG = Mastdurchgang.

Tabelle 22: (Fortsetzung)

Kriterium	Spezifikation	Betrieb B1	Betrieb B2	Betrieb K1	Betrieb K2
Läuferperiode [Wochen]		4 – 6	3 – 4	3 – 4	7 – 9
Mastphase [Wochen]		20 – 31	17 – 18	(Nicht abgefragt)	13 – 15
Schlachtalter [Monate]		7 – 11	7 – 7,5	(Nicht abgefragt)	6 – 7
Andere Tierarten auf dem Betriebsgelände		Mäuse; Hunde; Katzen; Tauben; Puten; Pferde; Rinder	(Nicht beobachtet /) Endmast: Rinder	Mäuse; Katzen	Katzen; Ziegen
Reinigung	Abferkelstall	Nur Entmisten + Reinigung (1x / Woche) – Hochdruckreinigung teils wegen Wassermangel ausgelassen	Entmisten + Hochdruckreinigung vor Einstellen neuer Tiergruppe	Hochdruckreinigung vor Einstellen neuer Tiergruppe	Hochdruckreinigung vor Einstellen neuer Tiergruppe (bei hälftig belegten Abteilen zumindest andere Abteilhälfte)
	Läuferstall	Nur Entmisten + Reinigung (1x / Woche) – Hochdruckreinigung teils wegen Wassermangel ausgelassen	Entmisten + Hochdruckreinigung vor Einstellen neuer Tiergruppe	Hochdruckreinigung vor Einstellen neuer Tiergruppe	Hochdruckreinigung vor Einstellen neuer Tiergruppe
	Maststall	Nur Entmisten, 1x / Jahr Grundreinigung	Entmisten + Hochdruckreinigung vor Einstellen neuer Tiergruppe	(Nicht abgefragt)	Hochdruckreinigung vor Einstellen neuer Tiergruppe

Tabelle 22: (Fortsetzung)

Kriterium	Spezifikation	Betrieb B1	Betrieb B2	Betrieb K1	Betrieb K2
Desinfektion	Zeitpunkt	Keine Desinfektion (Läuferbuchten nach Infektionsgeschehen in vielen Tiergruppen einmalig vor Einstallung der Läufergruppe 4+5 desinfiziert)	Nur Abferkelstall vor Einstallen neuer Tiergruppe	Vor jeder neuen Einstallung – 24h Einwirkzeit	Vor jeder neuen Einstallung – 24h Einwirkzeit
	Desinfektionsmittel	Branntkalk	Wofasteril SC super (mit alcapur Komponente)	MS Megades	MS Megades Oxy
Entwurmung		Alle Schweine circa alle 6 Monate	Altsauen vor der Geburt, Läufer kurz vor dem Umstallen, im Maststall alle 6 Wochen	Sauen kurz vor dem Absetzen	Nur Sauen
Anzahl positiver Kokzidienproben		1 / 10	5 / 10	1 / 10	2 / 10
Während des Beprobungszeitraums eingesetzte Antibiotika	Zur Einzeltierbehandlung	Enrofloxacin Cefquinom	–	Amoxicillin Streptomycin Trimethoprim/ Sulfamethoxazol Penicillin	Amoxicillin Apramycin Cefquinom Marbofloxacin Tetrazyklin Trimethoprim/ Sulfamethoxazol Tulathromycin Tylosin

65

Ergebnisse

Tabelle 22: (Fortsetzung)

Kriterium	Spezifikation	Betrieb B1	Betrieb B2	Betrieb K1	Betrieb K2
Während des Beprobungszeitraums eingesetzte Antibiotika	Zur Behandlung ganzer Tiergruppen	–	–	Streptomycin Penicillin	Spectinomycin Ceftiofur Lincomycin Doxycyclin

4.2 Betriebsmanagement der für den Hauptversuch ausgewählten Betriebe

4.2.1 Beprobungsschema Betrieb B1

4.2.1.1 Standardabläufe auf dem biologisch geführten Betrieb

Die Tiere befanden sich von Geburt bis Schlachtreife in demselben Stall, der lediglich in verschiedene Stallbereiche gegliedert war. Auf dem Betrieb wurden auch Rinder, Puten, Hühner und Tauben gehalten, wobei sich der Taubenschlag im Dachgeschoss des Schweinestalls befand. Auch Hunde und Katzen hatten Zugang zu den Stallungen. Zudem waren viele Schwalbennester im Stall zu sehen. Die Abferkelung fand ungefähr im drei-Wochen Rhythmus statt. Trächtige Sauen warfen ihre Ferkel in einer eigenen Bucht im Abferkelstall (Abb. 6). Nach zwei Wochen wurden drei bis vier Sauen, deren Geburtstermine im gleichen Zeitraum lagen, gemeinsam mit ihren Ferkeln zu einer Sauen-Saugferkelgruppe zusammengefasst und in die Gruppenbuchten umgestallt. Diese verfügten im Gegensatz zu den Abferkelbuchten über einen Außenbereich. Nach weiteren zwei Wochen wurden die Ferkel abgesetzt, die ab jetzt als Läufer Schweine bezeichnet wurden, und die Muttersauen aus den Gruppenbuchten ausgestallt. Die Läufer Schweine blieben weitere vier Wochen in dem fortan als Läuferbucht deklarierten Stallbereich, bevor sie in den Maststall gebracht wurden, der ebenfalls über Außenbereiche verfügte. Dort kamen die Schweine zu Beginn der Mast in Bucht 1 und wurden während der fünfmonatigen Mastphase immer weiter in Richtung Bucht 6 umgestallt, bis sie als Endmastgruppe aus dieser Bucht zur Schlachtung transportiert wurden. Allerdings wurden nie ganze Mastgruppen, sondern immer nur einzelne Tiere aus einer Gruppe als schlachtreif eingestuft.

4.2.1.2 Reinigung und Desinfektion

Der Abferkelstall wurde alle zwei Tage entmistet. Nachdem eine Muttersau mit ihren Ferkeln ausgestallt worden war, wurde die Abferkelbucht per Hochdruckreiniger gesäubert. Die Läuferbuchten und der Maststall wurden einmal pro Woche mit dem Hoflader entmistet. Beim Maststall wurden dabei Stroh und Einstreu von Bucht 1 Richtung Bucht 6 geschoben und von dort entsorgt, sodass frische Einstreu stets nur in Bucht 1 ausgeteilt wurde. Einmal pro Jahr wurde der Maststall komplett entleert und mit dem Hochdruckreiniger gesäubert. Auf dem Betriebsgelände werden keine Desinfektionsmittel eingesetzt.

4.2.1.3 Spezifische Darstellung der Probennahme

Auf diesem Betrieb wurden von September 2019 bis Mai 2020 21 SKP von fünf aufeinanderfolgenden MDG genommen (Tabelle 23). Da einige Tiergruppen allerdings im Läuferalter oder während der Mast zusammengelegt worden waren (Abb. 6), wurden insgesamt nur drei aufeinanderfolgende MDG beprobt.

Tabelle 23: Übersicht über die Beprobung auf Betrieb B1

Beprobungszeitpunkt	Mastdurchgang	Anzahl Proben
Absetzer ¹	1, 2, 3 (a + b + c), 4, 5	7
Läufer	1, 2+3, 4, 5	4
Vormast	1, 2+3, 4	3
Mittelmast / Vormast	4+5	1
Mittelmast	1, 2+3, 4+5	3
Endmast	1, 2+3, 4+5	3
Gesamt		21

¹Bei Mastdurchgang 3 setzt sich die Absetzerferkel-Beprobung aus drei einzelnen Proben zusammen (a + b + c), die in je einer Abferkelbucht genommen wurden.

Die oben beschriebenen zeitlichen Abläufe wurden nur ansatzweise eingehalten. Meistens orientierten sich die Zeitpunkte der Umstallung daran, ob eine Bucht im entsprechend nächsten Stall frei geworden war, beziehungsweise an der Größe und dem Wachstum der Schweine. Beides variierte aber je nach Gesundheitszustand der Tiergruppe stark. So kamen einige Abferkelgruppen erst nach dem Absetzen vom Muttertier als Gruppe in einer Läuferbucht zusammen und wurden bis dahin alleine mit der jeweiligen Muttersau in der Abferkelbucht gehalten (MDG 3 und 5, Abb. 6). Außerdem wurden Läufer Schweine auch länger als vier Wochen in den Läuferbuchten gehalten. Bei der Umstallung in den Maststall kamen die Vormast-Schweine nicht immer in Bucht 1, sondern in eine der Buchten, die kürzlich frei geworden war (meist Bucht 1, 2 oder 3 – MDG 4, Abb. 6). Auch die Ausstallung zur Schlachtung erfolgte nicht immer aus Bucht 6 (MDG 1, Abb. 6). Zudem wurden Schweine aufeinanderfolgender Würfe teilweise in den Läuferbuchten oder auch im Maststall zusammengeführt, falls einer der Gruppen durch niedrige Abferkel- oder hohe Verlustraten nur noch wenige Tiere angehörten. Aus diesen Gründen wurden die Absetzer von MDG 3 mit den Läufer Schweinen von MDG 2, bei denen es durch eine längere Krankheitsphase viele Verluste gegeben hatte, in Bucht 1 des Läuferstalls zusammengeführt. Genauso wurden zu einem späteren Zeitpunkt die Läufer Schweine von MDG 5 zu den Vormast-Schweinen

von MDG 4 dazugestellt (Abb. 6). Da zu diesem Zeitpunkt bereits eine Vormast-Probe von MDG 4 genommen worden war, wurde die darauffolgende Beprobung als Mittelmast/Vormast von MDG 4 respektive MDG 5 beschrieben (Tabelle 23).

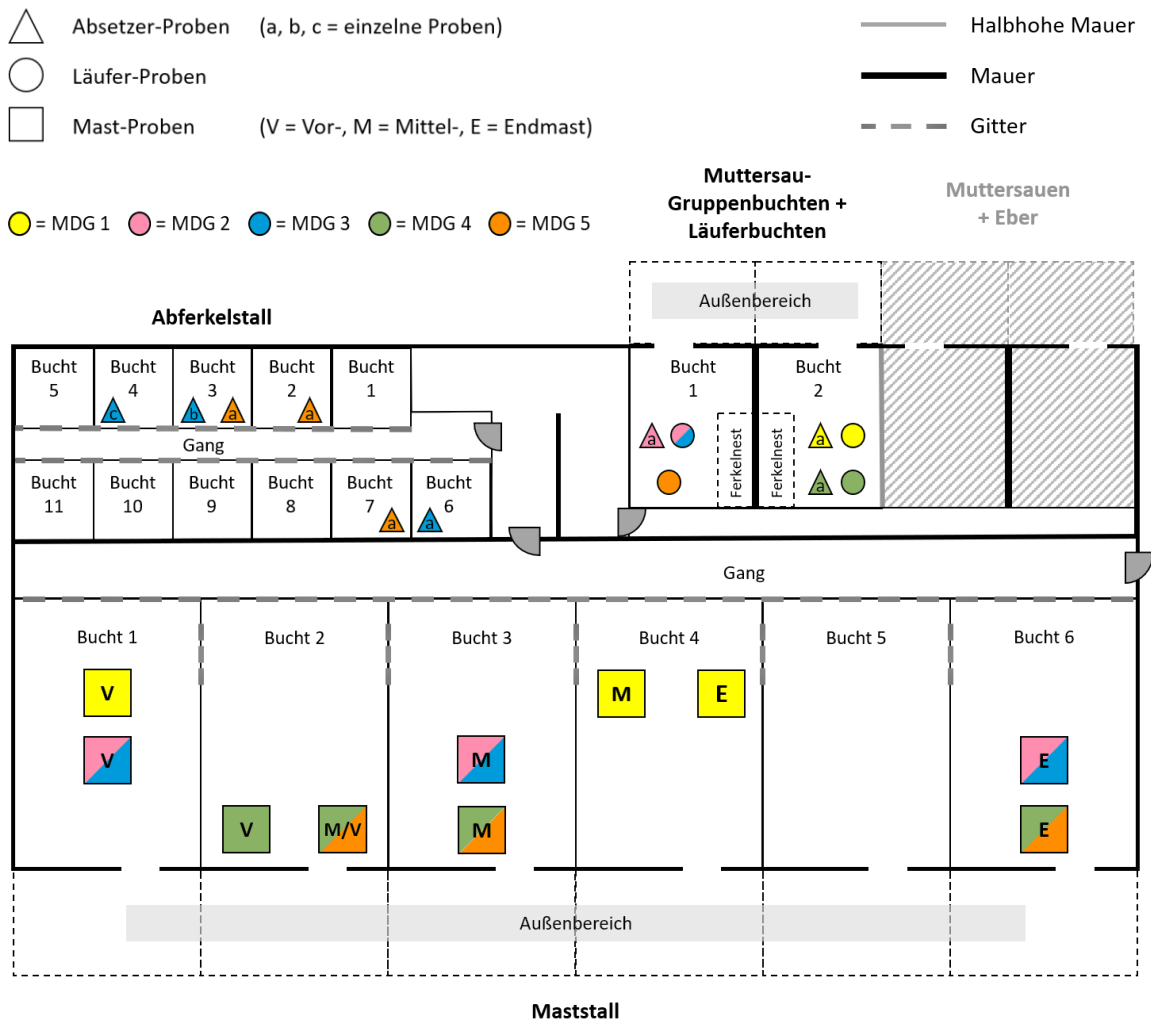


Abb. 6: Übersicht über die Beprobung im Stallgebäude von Betrieb B1
 MDG = Mastdurchgang; wurde Kot von verschiedenen Absetzergruppen bzw. aus verschiedenen Buchten in einer Sammelkotprobe vermengt, so sind alle diese Proben-Symbole mit einem „a“ versehen. Ist ein Symbol mit zwei Farben gefüllt, setzt sich die beprobte Tiergruppe aus den Tieren von zwei MDG zusammen, die im Läuferalter oder während der Mast zusammengelegt wurden.

4.2.2 Beprobungsschema Betrieb B2

4.2.2.1 Standardabläufe auf dem biologisch geführten Betrieb

Die Schweine befanden sich von Geburt an bis zur Mitte der Mastphase auf einem Betrieb mit reiner Schweinehaltung (Standort 1; Abb. 7A-C), der zu einem Hauptbetrieb im Nachbarort gehörte (Standort 2; Abb. 7D). Auf dem Gelände dieses Hauptbetriebs, auf dem auch Rinder gehalten wurden, fand lediglich die Endmast statt. In allen Stallungen verfügten die Buchten auch über einen Außenbereich.

Die Abferkelung fand in dreiwöchigem Rhythmus statt. Eine trächtige Sau ferkelte in einer Abferkelbucht ab und verblieb dort drei Wochen mit ihren Ferkeln. Es ferkelten ungefähr zehn bis zwölf Sauen im gleichen Zeitraum ab. Je drei oder vier dieser Sauen wurden anschließend mit ihren Nachkommen in eine gemeinsame Gruppenbucht im gleichen Stallgebäude umgestallt, in der sie weitere dreieinhalb Wochen bei ihren Ferkeln blieben (Abb. 7A). Bei dieser Gruppenzusammenstellung wurden die schwächsten Ferkel von allen Würfen aussortiert und ohne Muttertier zusammen in eine Bucht eingestallt („Bucht Aussortierte Ferkel“, Abb. 7A), wo sie mit Milchersatz ernährt wurden. In den Gruppenbuchten wurden die Saugferkel nach mindestens 42 Tagen Säugezeit von ihren Muttersauen abgesetzt und mit einem Transporter zum Läuferstall auf dem gleichen Betriebsgelände gefahren. Die Absetzer eines Wurfzeitraums wurden immer abwechselnd in die vorderen oder hinteren vier Buchten des Läuferstalls eingestallt (Bucht 1 bis 4 bzw. Bucht 5 bis 8). Dabei wurde versucht, die Zusammensetzung der Ferkelgruppe aus einer Bucht im Abferkelstall im Läuferstall beizubehalten. Gruppenbucht 1 aus dem Abferkelstall wurde also möglichst geschlossen in eine Bucht im Läuferstall umgestallt. Die aussortierten Ferkel, die schwächer und damit meist auch kleiner als ihre Wurfgeschwister waren, wurden gemeinsam mit den Ferkeln des nächsten Wurfzeitraums in den Läuferstall eingestallt und zählten ab diesem Zeitpunkt zur selben Altersgruppe (Aussortierte MDG 2 wurden gemeinsam mit den abgesetzten Ferkeln von MDG 3 in den Läuferstall eingestallt, Abb. 7B). Die Läuferphase betrug vier bis fünf Wochen. Anschließend wurden alle Tiere einer Altersgruppe in den Maststall umgestallt, der sich ebenfalls auf demselben Betriebsgelände befand. Dabei wurden die 45 größten Läufer Schweine herausgesucht und gemeinsam in eine Bucht eingestallt. Die restlichen 60 bis 80 Läufer wurden auf zwei weitere Buchten im Maststall aufgeteilt. Da die beiden zuletzt genannten Tiergruppen während der Mastphase alle drei Wochen ihrer Größe entsprechend aufgeteilt und mit Tieren anderer Wurf-Zeiträume vermischt wurden, wurde in der Mastphase jeweils nur die Mastgruppe mit den 45 größten Schweinen beprobt. Nach circa dreieinhalb Monaten Mast, in der die Tiergruppen teilweise ihre Buchten innerhalb des Maststalls wechselten (Abb. 7C), wurden die größten Tiere einer Altersgruppe in den Endmaststall im Nachbarort umgestallt. Die zuvor bereits als größten Läufer Schweine deklarierten Tiere wurden dabei immer geschlossen zur Endmast umgestallt (Abb. 7D). Nach weiteren fünf bis sechs Wochen im Endmaststall wurden die

Schweine zur Schlachtung abgegeben. Auch bei B2 wurden nie ganze Gruppen als schlachtreif eingestuft, sondern immer nur Einzeltiere aus den Gruppen abtransportiert.

4.2.2.2 Reinigung und Desinfektion

Der Abferkelstall wurde vor jeder Einstellung neuer Muttertiere mittels Hochdruckreiniger gesäubert. Zur Desinfektion wurde anschließend Wofasteril SC super in 10 %iger Konzentration angewandt (Wirkstoff Acetylhydroperoxid mit Wasserstoffperoxid in komplexer organischer Lösung). Der Läuferstall wurde nach dem Ausstallen der Tiere entmistet und ebenfalls mittels Hochdruckreiniger gesäubert. Im Maststall wurde der Außenbereich während der Mastphase zwei Mal pro Woche entmistet, der Innenbereich der Buchten alle drei Wochen. Nach dem Ausstallen der Tiere wurde die Bucht ebenfalls entmistet und mit Wasser gereinigt. Falls es nicht zu kalt war, wurde die Bucht mit Reinigungsmittel geschauert. Bei niedrigen Temperaturen wurde auf diesen Schritt verzichtet, weil der Stall sonst zu stark auskühlt. Im Endmaststall wurde der Innenbereich während der kompletten Endmastphase einmal entmistet, der Außenbereich wurde alle drei Tage mit dem Hoflader entmistet. Nach dem Abtransport der Tiere zum Schlachthof wurde die komplette Bucht entmistet und mit Wasser gereinigt. Im Läuferstall und in beiden Mastställen wurde kein Desinfektionsmittel eingesetzt.

4.2.2.3 Spezifische Darstellung der Probennahme

Auf diesem Betrieb wurden von September 2019 bis April 2020 28 SKP von vier aufeinanderfolgenden MDG genommen (Tabelle 24). Bei MDG 4 hätte eine Beprobung während der Weihnachtsfeiertage 2019 stattfinden müssen, weshalb dieser MDG nicht mit in die Studie eingeflossen ist.

Tabelle 24: Übersicht über die Beprobung auf Betrieb B2

Beprobungszeitpunkt	Mastdurchgang	Anzahl Proben
Absetzer ¹	1 (a + b), 2 (a + b + Aussortierte), 3 (a + b + Aussortierte), 4 (Aussortierte), 5 (a + b)	11
Läufer	1, 2, 3, 5	4
Vormast	1, 2, 3, 5	4
Mittelmast	1, 2, 3, 5	4
Endmast	1, 2, 3, 5	4
Gesamt		27

¹Die Absetzerferkel-Beprobung setzt sich aus drei einzelnen Proben zusammen, die in unterschiedlichen Sauen-Gruppenbuchten genommen wurden. „Aussortiert“ stellt dabei die Probe derjenigen Ferkel dar, die wegen vermindertem Wachstum oder Krankheit aus den Abferkelbuchten aussortiert wurden und mit den Ferkeln des darauffolgenden Wurfzeitraums auf das *flatdeck* eingestallt werden.

Bei den Absetzerproben wurde bei jedem MDG eine SKP aus den Gruppenbuchten 1 und 2 sowie eine zweite SKP aus den Gruppenbuchten 3 und 4 genommen, die im Außenbereich jeweils nur durch Gitter getrennt waren. Dadurch war ein direkter Kontakt zwischen den Tieren möglich, weshalb sie als epidemiologische Einheit gewertet wurden. Zwischen Gruppenbucht 2 und 3 hingegen befand sich eine freie Fläche. Falls aussortierte Ferkel im Abferkelstall vorhanden waren, wurden auch diese beprobt (Probe „c“ – MDG 2, 3 und 4; Abb. 7A). Die Probe der aussortierten Ferkel von MDG 3 wurde lediglich qualitativ analysiert und ist nur bei Altersvergleichen mit in den Datensatz eingeflossen, nicht aber beim Vergleich von MDG. Die aussortierten Ferkel von MDG 4 wurden ausnahmsweise nicht in eine Gruppenbucht auf der linken Stallseite umgestellt, sondern zu einer Ammensau in Abferkelbucht 14, wo sie kurz vor dem Absetzen beprobt wurden. Bei der Einstellung in den Läuferstall wurden die aussortierten Ferkel von MDG 2 zu den Absetzern von MDG 3 und später die aussortierten Ferkel von MDG 4 zu den Absetzern von MDG 5 dazugestellt (Abb. 7B).

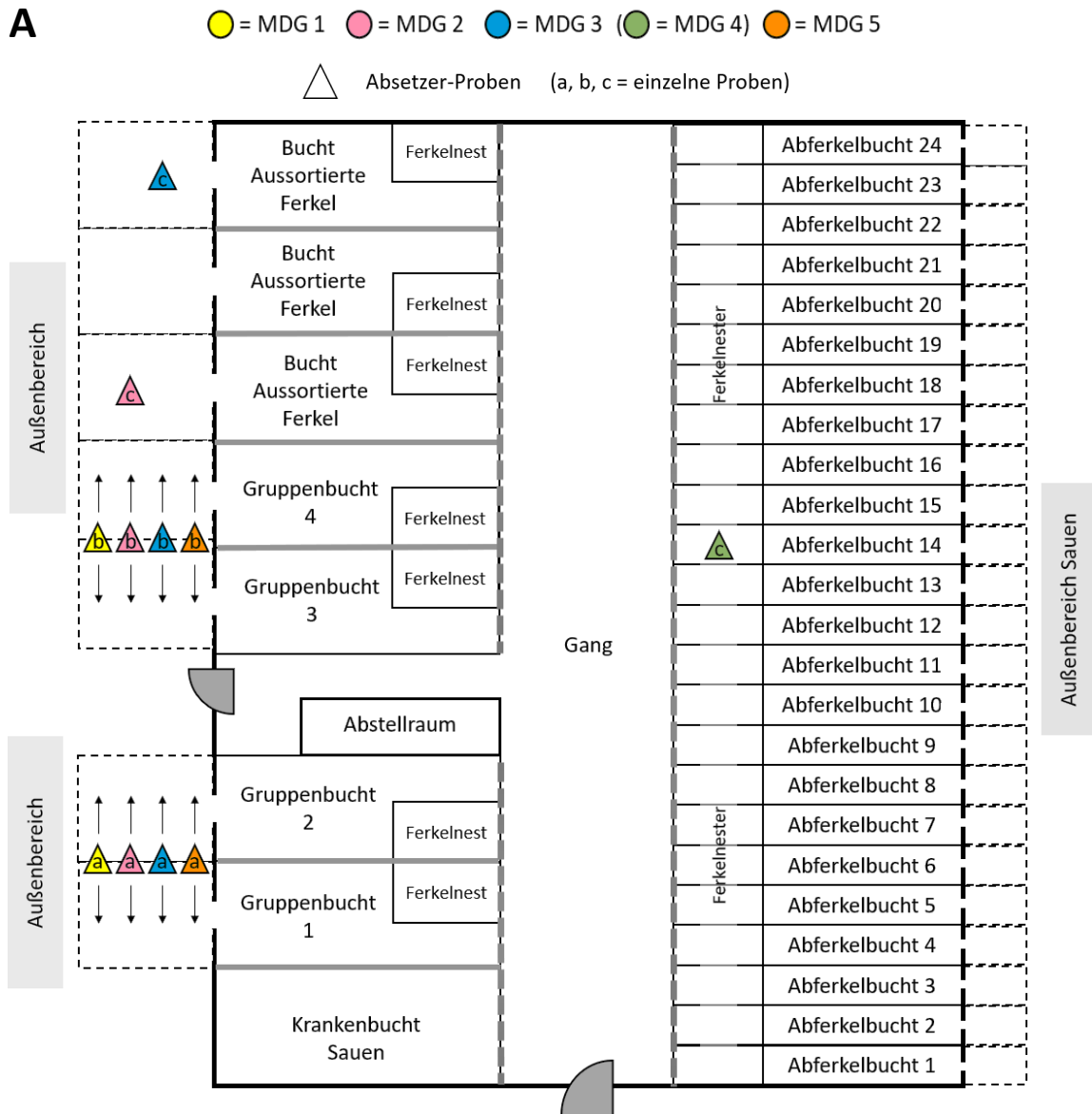


Abb. 7: Übersicht über die Beprobung in den Stallgebäuden von Betrieb B2
 Räumlichkeiten bei der Beprobung in den Stallgebäuden von Standort 1 mit Abferkelstall (A), Läuferstall (B), und Maststall (C) sowie von Standort 2 mit dem Endmaststall (D); MDG = Mastdurchgang; Pfeil = Kot aus allen Buchten entnommen, über die sich Pfeil erstreckt.

B

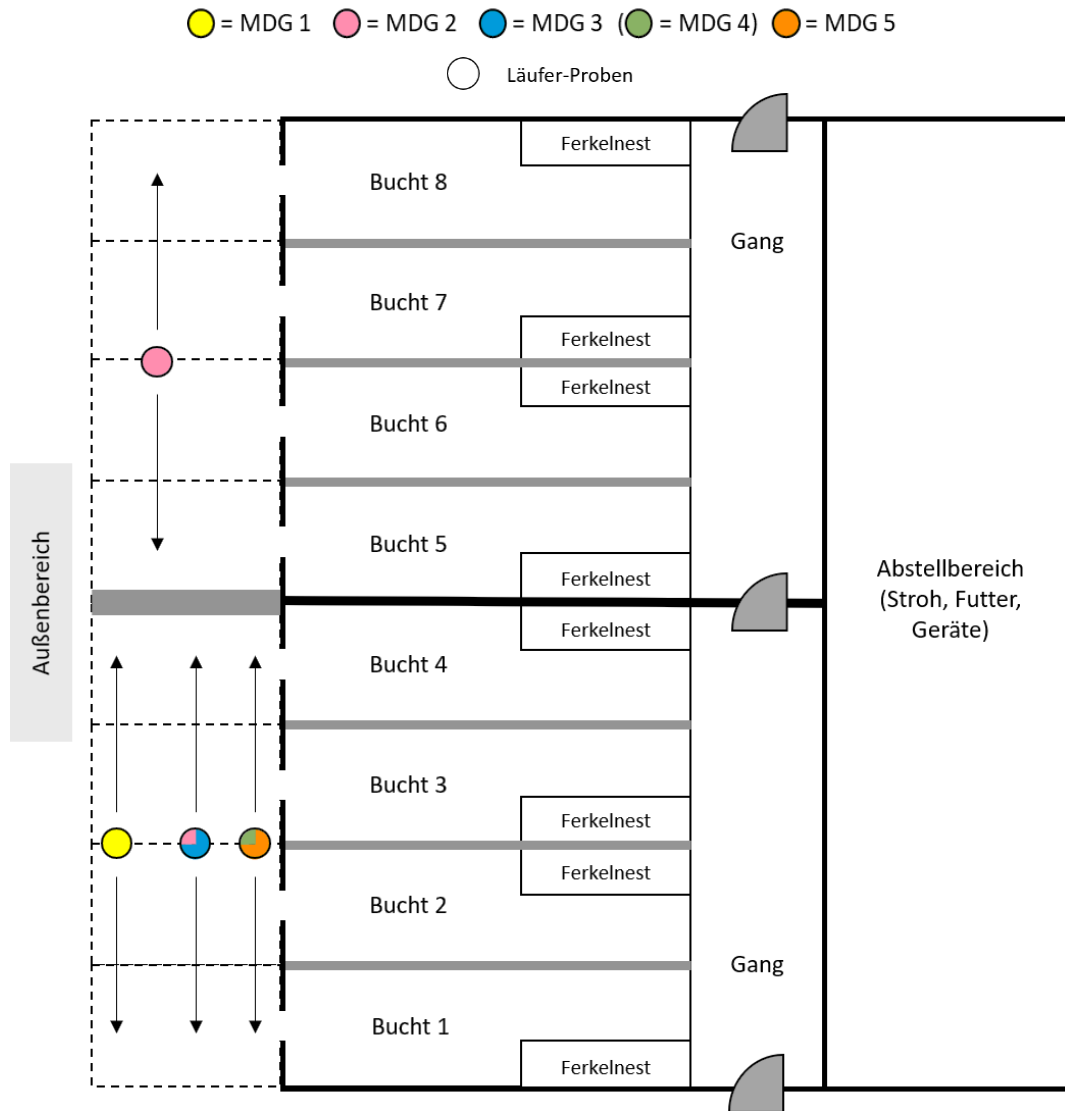


Abb. 7: (Fortsetzung)

MDG = Mastdurchgang; Pfeile siehe Abb. 7A; ist ein Symbol mit zwei Farben gefüllt, so setzt sich die beprobte Tiergruppe aus den Tieren von zwei MDG zusammen: Der MDG mit dem kleineren Farbanteil steht für die aussortierten Tiere dieses MDGs, die beim darauffolgenden MDG (zweite Farbe) dazugestellt wurden.

C

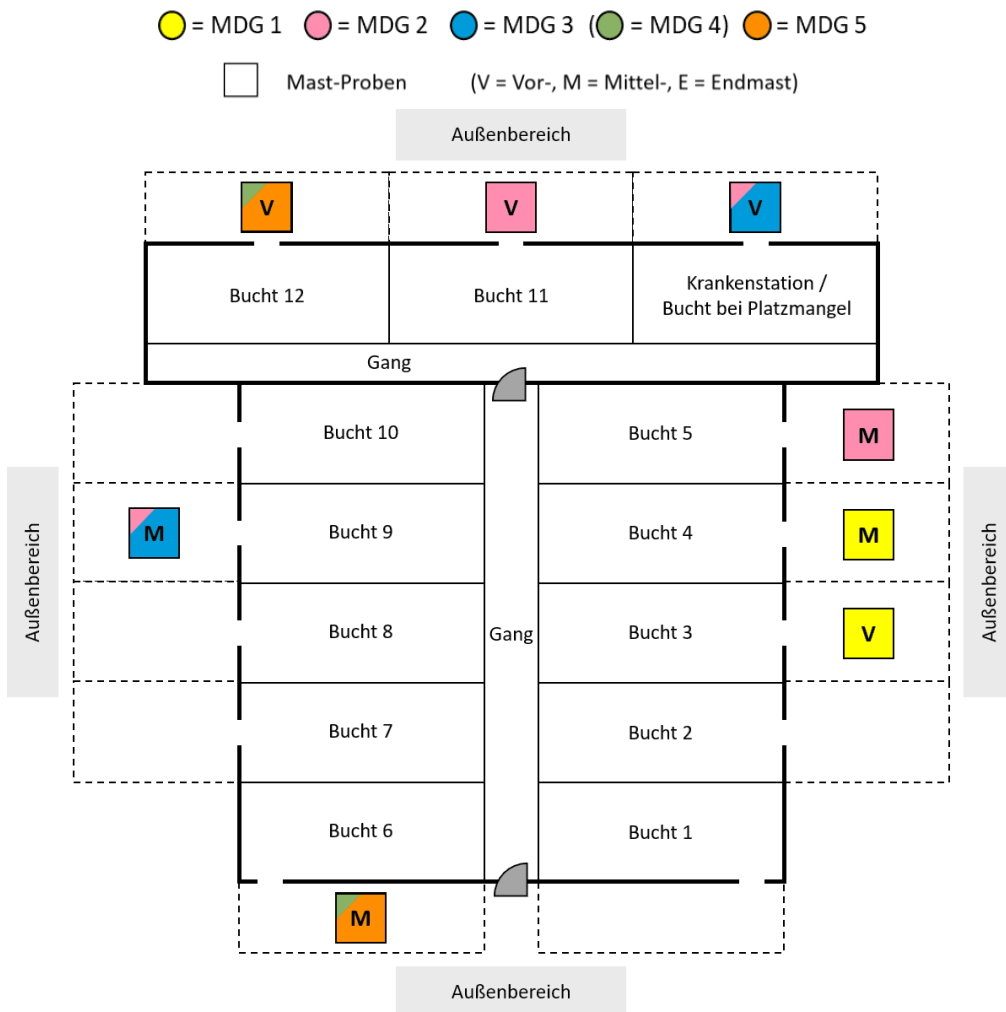


Abb. 7: (Fortsetzung)

MDG = Mastdurchgang; Pfeile und zweifarbige Symbole siehe Abb. 7B.

D

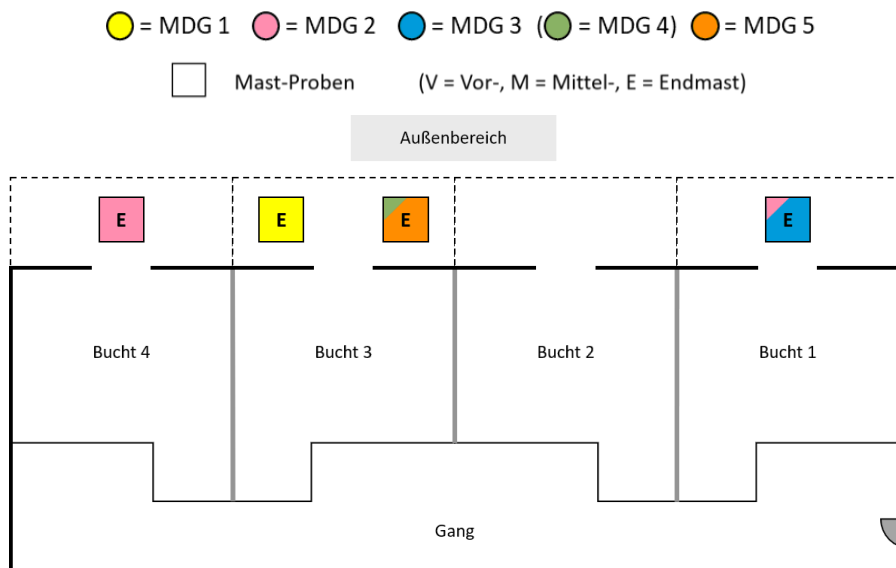


Abb. 7: (Fortsetzung)

MDG = Mastdurchgang; Pfeile und zweifarbige Symbole siehe Abb. 7B.

4.2.3 Beprobungsschema Betrieb K1

4.2.3.1 Standardabläufe auf dem konventionell geführten Betrieb

Die Abferkelung fand wöchentlich statt. Eine trächtige Sau gebar ihre Ferkel in einer Abferkelbucht im Abferkelstall. Dort bestand ein Abteil aus 28 Buchten. Wenige Stunden nach der Geburt wurden die Würfe ausgeglichen. Das heißt, dass der Muttersau bei einem Wurf mit mehr als 14 Ferkeln einige Ferkel weggenommen und zu einer anderen Sau mit weniger Ferkeln dazugesetzt wurden. Alternativ wurden die überzähligen Ferkel zu einer Ammensau gesetzt, deren Ferkel kurz vorher abgesetzt worden waren. Das Ausgleichen der Würfe wurde meist innerhalb eines Abteils, aber auch über Abteile hinweg ausgeübt. Nach dreieinhalb Wochen wurden alle Saugferkel von ihren Muttertieren abgesetzt und in ein *flatdeck* auf demselben Betriebsgelände umgestallt. Dabei wurden alle Ferkel eines Abferkelabteils geschlossen in ein *flatdeck* umgestallt. Lediglich bei einer Überzahl an abgesetzten Ferkeln oder bei vielen Kleinwüchsigen wurden einige dieser Tiere aussortiert und in einer Bucht in einem anderen Abferkelabteil untergebracht, das entsprechend dem Abferkelrhythmus eine Woche später belegt wurde. Waren die aussortierten Ferkel noch sehr klein, wurden sie im neuen Abferkelabteil nochmal zu einer Ammensau gesetzt. Zu einem späteren Zeitpunkt wurden sie dann mit den restlichen Ferkeln des neuen Abferkelabteils aufs *flatdeck* umgestallt. Ein *flatdeck* bestand aus zwölf Buchten und wurde für sieben Wochen von den Läufer Schweinen bewohnt, bevor sie zu einem der Mastställe, die der Betrieb belieferte, transportiert wurden.

4.2.3.2 Reinigung und Desinfektion

Nach dem Ausstallen der Ferkel aufs *flatdeck* wurde das Abferkelabteil mittels Hochdruckreiniger gesäubert. Anschließend wurde mit dem Desinfektionsmittel MS Megades (Wirkstoffe Glutaraldehyd und Benzalkoniumchlorid) desinfiziert. Es wirkte 20 bis 24 Stunden ein, bis die nächsten trächtigen Sauen eingestallt wurden. Auch der Gang innerhalb eines Abteils wurde mitgewaschen und -desinfiziert. Die *flatdecks* wurden auf die gleiche Weise gereinigt und desinfiziert.

4.2.3.3 Spezifische Darstellung der Probennahme

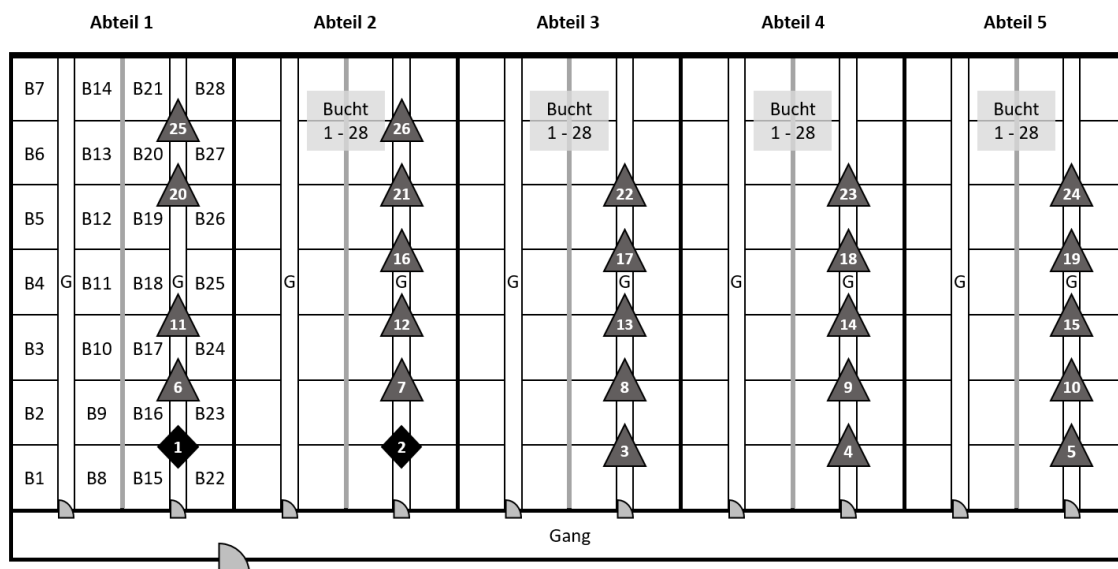
Auf diesem Betrieb wurden von September 2019 bis März 2020 26 SKP von 26 Abferkelgruppen genommen (Tabelle 25).

Tabelle 25: Übersicht über die Beprobung auf Betrieb K1

Beprobung		Nummer des Abteils	Anzahl Proben
Zeitpunkt	Ort		
Absetzer	Abferkelabteil	1 (1x), 2 (1x)	2
	<i>flatdeck</i> ¹	1 (4x), 2 (5x), 3 (5x), 4 (5x), 5 (5x)	24
	Gesamt		26

¹Die Beprobung auf dem *flatdeck* fand am Tag des Umstellens auf das *flatdeck* statt. Die Nummer des Stallabteils entsprach bei beiden Beprobungsorten dem Abferkelabteil, in dem die Tiergruppe während der Saugferkelphase eingestallt war.

Die ersten beiden SKP wurden aus mehreren Buchten der entsprechenden Abferkelabteile der beprobten Ferkelgruppen gesammelt. Durch die Nutzung eines Kotschiebers in den Abferkelabteilen war dort allerdings immer nur wenig Ferkelkot zu finden. Deshalb wurde der Beprobungsort für die nachfolgenden SKP dahingehend geändert, dass diese direkt nach dem Umstellen der entsprechenden Ferkelgruppen auf dem jeweiligen *flatdeck* genommen wurden. Es wurde wiederum Kot aus mehreren Buchten eines *flatdecks* für eine SKP vermischt. Die erste SKP enthielt Sammelkot von Absetzerferkeln aus Abteil 1 im Abferkelstall. Eine Woche später wurde die darauffolgende Wurfgruppe in Abteil 2 des Abferkelstalls abgesetzt und beprobt. Im 1-Wochen-Rhythmus wurde dies entsprechend fortgeführt (Abb. 8). Lediglich eine Probe in Abteil 1 im Winter 2019 wurde feiertagsbedingt nicht genommen.

**Abb. 8: Übersicht über die Beprobung der Abferkelabteile von Betrieb K1**

Schwarze Raute = Probe wurde im Abferkelabteil genommen; graues Dreieck = Probe wurde auf *flatdeck* genommen – markiert ist aber Abferkelabteil, aus dem die beprobten Ferkel am Tag der Beprobung auf das *flatdeck* umgestallt wurden; Zahl im Symbol \triangleq Reihenfolge der Beprobung; zwischen zwei Ziffern liegt immer eine Woche außer zwischen Ziffer 15 und 16: zwei Wochen; B = Bucht; G = Gang.

4.2.4 Beprobungsschema Betrieb K2

4.2.4.1 Standardabläufe auf dem konventionell geführten Betrieb

Abferkel- und *flatdeck*-Stall befanden sich am Hauptstandort des Betriebs (Standort 1), der zwei Mastställe beliefert, die jeweils circa eine halbe Stunde Autofahrt entfernt liegen. Die beprobten Tiergruppen wurden bis auf wenige Tiere nur in einen der beiden Mastställe umgestallt (Standort 2), weshalb der andere Maststall nicht mit in die Beprobung eingeschlossen wurde. An beiden beprobten Standorten liefen Katzen in den Gemeinschaftsräumen der Stallgebäude herum.

Die Abferkelung fand wöchentlich statt. Eine trächtige Sau gebar ihre Ferkel in einer Abferkelbucht im Abferkelstall. In diesem Stall bestand ein Abteil aus zwei Abteilhälften (Abteil 1.1 und 1.2, Abb. 9A), die jeweils in zwölf Buchten gegliedert waren. Die Abteilhälften waren durch eine halbhohle Betonwand getrennt. Meist wurden die Abteilhälften mit Muttersauen unterschiedlicher Wurf-Zyklen belegt, da bei einem kompletten Ausstallen des Abteils nach dem Absetzen der Saugferkel die Temperatur zu tief sinken würde. In einem Abteil befanden sich also meist Ferkel verschiedener Altersgruppen. Die Saugferkel verblieben vier Wochen bei der Muttersau, wurden dann abgesetzt und meist geschlossen mit den anderen Ferkeln des Abteils, die zur gleichen Zeit geboren worden waren, auf ein *flatdeck* umgestallt. Teilweise wurden allerdings einige abgesetzte Ferkel zurückgehalten, falls der Wurf-Zyklus sehr viele Ferkel umfasste, die nicht alle gleichzeitig auf ein *flatdeck* passen würden. Die aussortierten Ferkel wurden dann ohne Muttersau in eine Bucht eines bereits belegten Abferkelabteils umgestallt und kamen zu einem späteren Zeitpunkt mit den Ferkeln dieses Abteils auf ein *flatdeck*. Beim Umstallen kamen circa 18 Ferkel unterschiedlicher Muttertiere zusammen in je eine der 20 Buchten eines *flatdecks* (Abb. 9B). Die Läufer Schweine blieben hier acht Wochen, bevor sie fast geschlossen in den Maststall umgestallt wurden. Lediglich einige kleinwüchsige Tiere wurden aussortiert und in den zweiten Maststall umgestallt, der nicht in die Beprobung eingeschlossen wurde. Im beprobten Maststall bestand ein Abteil aus 18 Buchten (Abb. 9C), in die jeweils circa 16 Schweine eingestallt wurden. Nach etwa dreieinhalb Monaten Mast wurden die ersten Tiere aus einer Altersgruppe zur Schlachtung abtransportiert.

4.2.4.2 Reinigung und Desinfektion

Die Abferkelabteile wurden nach dem Ausstallen der Ferkel mittels Hochdruckreiniger gesäubert und mit dem Desinfektionsmittel MS Megades Oxy (Wirkstoffe Wasserstoffperoxid und Peressigsäure) behandelt. Falls nur eine Abteilhälfte ausgestallt worden war, wurde nur diese gereinigt und desinfiziert. Die *flatdecks* wurden geschlossen ausgestallt und danach auf gleiche Weise gereinigt und desinfiziert. Im Maststall war ein Güllesystem mit Stöpsel installiert. Der Stöpsel wurde nach dem Ausstallen des Mastabteils gezogen, sodass die Gülle abfließen konnte. Daraufhin wurde das Abteil gescheuert, damit das Reinigungswasser durch den geöffneten Stöpsel abfließen konnte und so auch die Güllekanäle gereinigt wurden. Anschließend wurde der Stöpsel wieder geschlossen und das Abteil mit dem gleichen Desinfektionsmittel wie der Abferkelstall desinfiziert. Das Mastabteil stand daraufhin sieben Tage leer, bevor die nächste Mastgruppe eingestallt wurde.

4.2.4.3 Spezifische Darstellung der Probennahme

Auf diesem Betrieb wurden von September 2019 bis Oktober 2020 19 SKP von drei aufeinanderfolgenden MDG genommen (Tabelle 26).

Tabelle 26: Übersicht über die Beprobung auf Betrieb K2

Beprobungszeitpunkt	Mastdurchgang	Anzahl Proben
Absetzer ¹	1 (a + b + c), 2 (a + b), 3 (a + b)	7
Läufer	1, 2, 3	3
Vormast	1, 2, 3	3
Mittelmast	1, 2, 3	3
Endmast	1, 2, 3	3
Gesamt		19

¹Die Absetzerferkel-Beprobung setzt sich aus jeweils zwei bis drei einzelnen Proben zusammen, die in je einem Abferkelabteil genommen wurden.

Um einen Einfluss derselben Stallumgebung auf die Dynamik der resistenten Bakterienstämme der Schweine überprüfen zu können, wurden MDG für diesen Betrieb als aufeinanderfolgend definiert, wenn sie möglichst lange dieselben Stallabteile bewohnten. Da die längsten Phasen in derselben Umgebung im Läuferalter und während der Mast stattfanden, wurden diejenigen MDG beprobt, die nacheinander das gleiche *flatdeck* und im Optimalfall auch das gleiche Abteil im Maststall bewohnten.

Für die SKP der Absetzerferkel wurde möglichst aus jeder zweiten Bucht pro entsprechender Abteilhälfte etwas Ferkelkot eingesammelt. Bei MDG 1 waren die Saugferkel im kompletten Abteil 3 sowie in einer Hälfte des Abteils 2 untergebracht, da dieser Durchgang mehr Tiere als die beiden folgenden umfasste. Grund dafür war, dass einige aussortierte Ferkel eines vorangegangenen Wurfes, der zu umfangreich für ein *flatdeck* gewesen wäre, in das Abferkelabteil von MDG 1 dazugestellt wurden. Bei MDG 2 und 3 waren die Ferkel auf jeweils eine Hälfte von zwei Abteilen aufgeteilt (Abb. 9A). Auf dem *flatdeck* wurde Kot aus jeder vierten Bucht im Abteil als SKP vermengt (Abb. 9B). Gleiches gilt für die Beprobung im Maststall. Bei der Vormast-Beprobung von MDG 2 waren in der letzten Bucht des Abteils (Bucht 18, Abb. 9C) für zwei Wochen übergebliebene Mastschweine aus einem anderen Abteil eingestallt, die erst später als die anderen Schweine ihrer Abferkelgruppe als schlachtreif eingestuft wurden. Diese Bucht wurde nicht in die Mast-Beprobung mit einbezogen. Bei MDG 3 wurden bei der Einstellung in den Maststall 50 Läufer Schweine aus einem anderen Läuferstall des Betriebs zu der Tiergruppe hinzugefügt, die ab diesem Zeitpunkt zu MDG 3 dazugezählt und während der Mast mitbeprobt wurden. Sie wurden im gleichen Abferkelstall wie alle anderen Schweine geboren. Allerdings fand für die zugesetzten Tiere keine Beprobung im Absetzeralter oder auf dem *flatdeck* statt.

A

● = MDG 1 ● = MDG 2 ● = MDG 3

△ Absetzer-Proben (a, b, c = einzelne Proben)

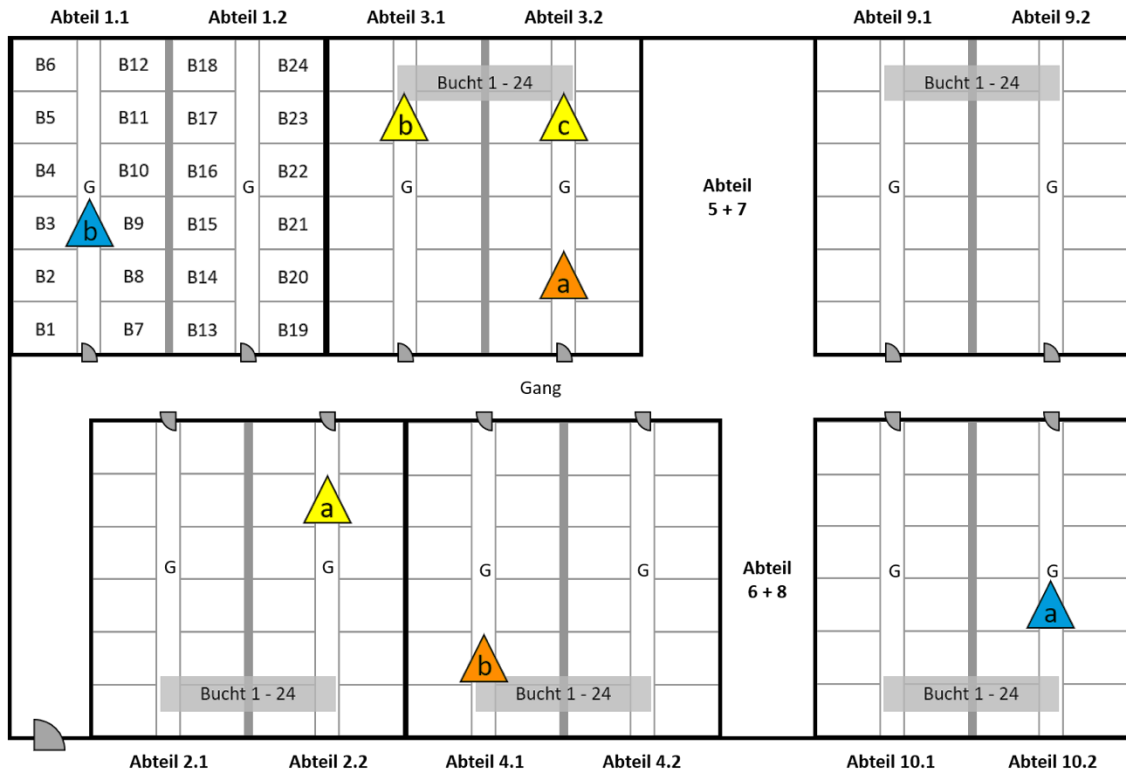


Abb. 9: Übersicht über die Beprobung in den Stallgebäuden von Betrieb K2
 Räumlichkeiten bei der Beprobung in den Stallgebäuden von Standort 1 mit Abferkelstall (A) und Läuferstall (B) sowie von Standort 2 mit dem Maststall (C); in den durch ein Dreieck markierten Abteilen wurde Kot aus jeder zweiten Bucht zu einer Sammelkotprobe vermengt; MDG = Mastdurchgang.

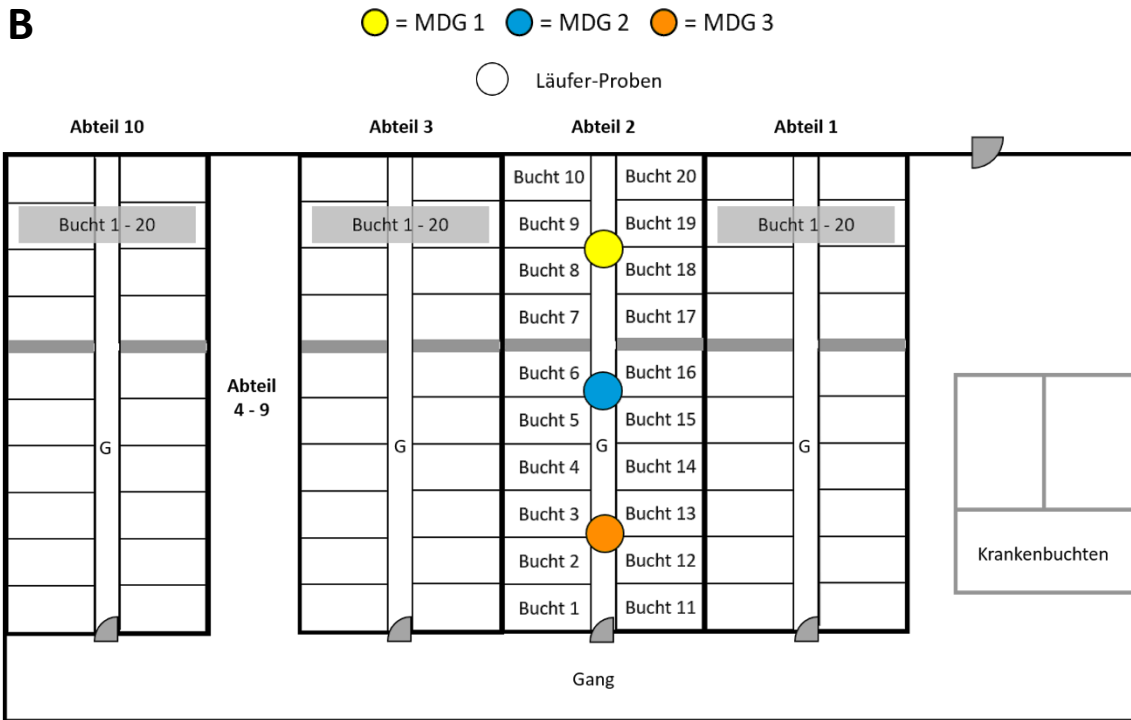


Abb. 9: (Fortsetzung)
MDG = Mastdurchgang; G = Gang; in den durch einen Kreis markierten Abteilen wurde Kot aus jeder vierten Bucht zu einer Sammelkotprobe vermengt.

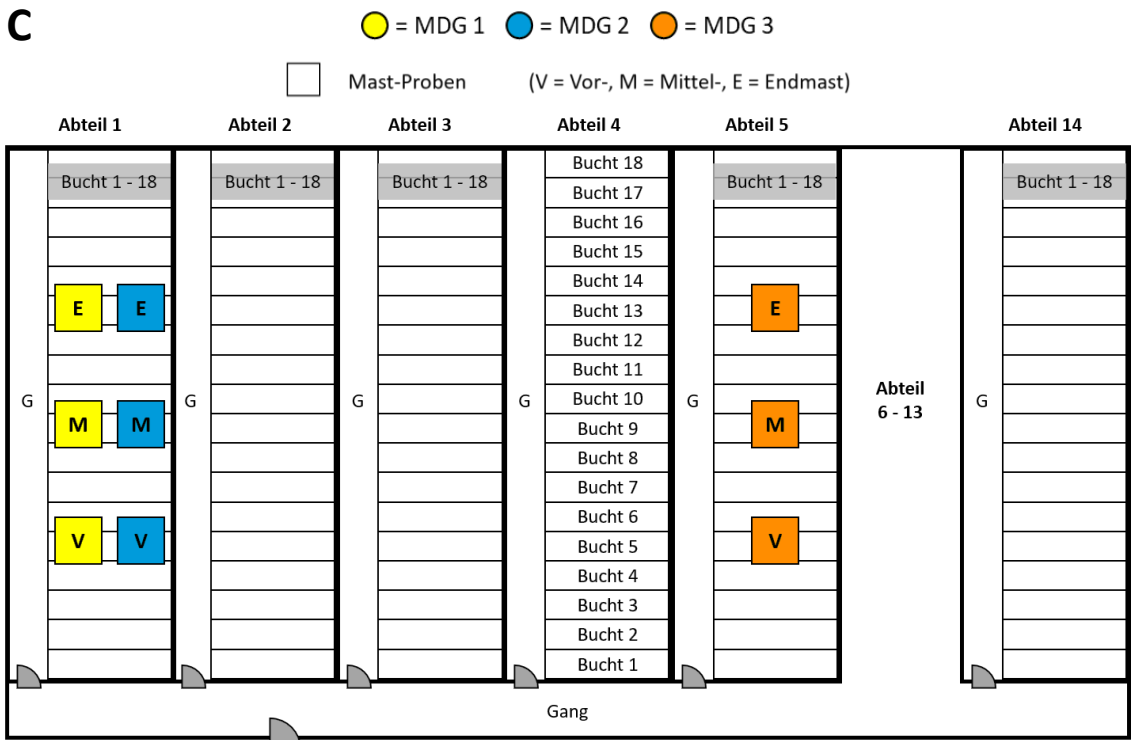


Abb. 9: (Fortsetzung)
MDG = Mastdurchgang; G = Gang; in den durch ein Quadrat markierten Abteilen wurde Kot aus jeder dritten Bucht zu einer Sammelkotprobe vermengt.

4.3 Kokzidienstatus

Aus den Betrieben K1 und B1 war jeweils nur eine der zehn Sammelkotproben von zwei Wochen alten Ferkelgruppen mit Oozysten von *Cystoisospora suis* belastet. Aus Betrieb K2 betraf dies zwei von zehn Proben. Aus Betrieb B2 hingegen wurden 50 % der Proben positiv auf *Cystoisospora suis* getestet.

4.4 Shigatoxin-Detektion

Pro Betrieb wurden mindestens sieben (36 %, Betrieb K2) und höchstens 21 (77 %, Betrieb B2) der SKP mittels *stx1-stx2*-Duplex-PCR untersucht. Bei 19 BPs wurde *stx2* nachgewiesen. Die *stx*-Subtypisierung für acht der *stx2*-positiven BPs (mindestens ein BP pro Betrieb) ergab für alle acht Proben den Subtyp *stx2e*. Da *stx2e*-positive Shigatoxin produzierende *E. coli* (STEC) ein vernachlässigbares human-pathogenes Potential besitzen, wurde ab diesem Zeitpunkt von einer Ungefährlichkeit der Proben für das Laborpersonal ausgegangen und auf eine weitere *stx*-Detektion verzichtet.

4.5 Quantitative Analyse des Wachstums von Gammaproteobakterien auf Selektivplatten mit Enrofloxacin, Ceftiofur oder Cefquinom

Der quantitative Datensatz wurde aus der Auszählung der KbE auf den Primärplatten generiert. Wachstum auf der GE-Platte entsprach einem resistenztragenden, Wachstum auf den restlichen Selektivplatten einem resistenten Phänotyp (siehe 3.3.1). Dabei diente Enrofloxacin als Vertreter für FQ, während Ceftiofur und Cefquinom als Vertreter für CS der dritten bzw. vierten Generation (CS3/4) gewählt wurden.

Insgesamt wurden 92 SKP bearbeitet, die auf 368 Selektivplatten ausplattiert wurden (Betrieb B1: n = 84, B2: n = 104, K1: n = 104, K2: n = 76). Etwa die Hälfte dieser SKP (n = 45) wurden entsprechend der initialen KbE-Bestimmung bearbeitet, die restlichen 47 entsprechend der erweiterten (siehe 3.3.2).

Auf 329 der 368 Selektivplatten (89 %) wurde Koloniewachstum von Gammaproteobakterien detektiert. Während sich auf allen GE-Platten der vier Betriebe Koloniewachstum zeigte, wuchsen auf 96 % der GF-Primärplatten Kolonien (Abb. 10). Von den GE4- und GQ-Primärplatten waren 83 % beziehungsweise 89 % bewachsen.

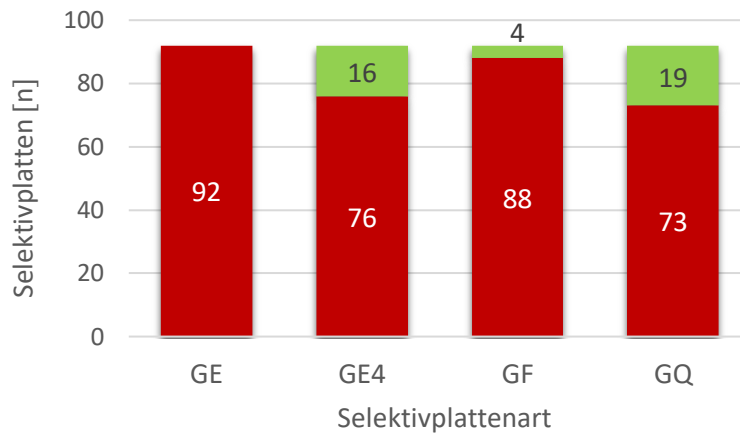


Abb. 10: Anzahl der Selektivplatten mit Wachstum pro Selektivplattenart
 Rot = Koloniewachstum; grün = kein Koloniewachstum;
 Plattenbezeichnungen siehe Tabelle 3.

Vergleicht man das Wachstum auf den Selektivplatten zwischen den Betrieben, so zeigte jede Selektivplatte von Betrieb K2 Koloniewachstum (Abb. 11). Von den Betrieben K1 und B1 wurde auf 98 % beziehungsweise 95 % der Selektivplatten Wachstum vorgefunden. Bei Betrieb B2 hingegen waren nur 70 % der Selektivplatten bewachsen.

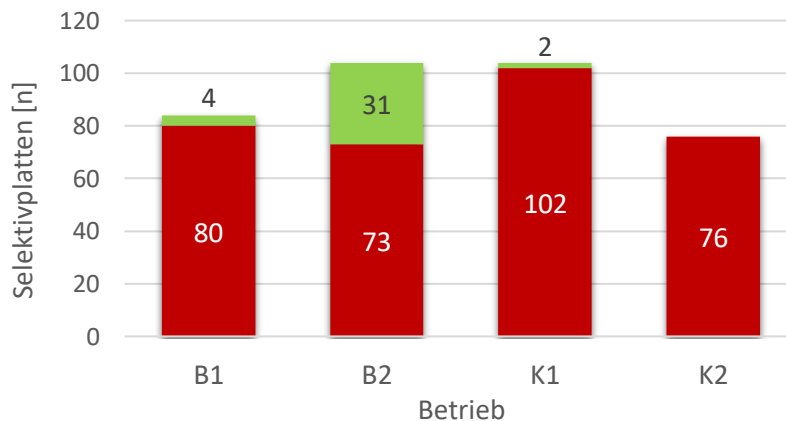


Abb. 11: Anzahl der Selektivplatten mit Wachstum pro Betrieb
 Rot = Koloniewachstum; grün = kein Koloniewachstum.

Mit zunehmendem Alter der Tiere waren weniger Selektivplatten bewachsen (Abb. 12). So zeigte sich bei den Absetzerproben auf 191 der 200 Selektivplatten Wachstum, während bei den Endmastproben nur 31 von 40 Selektivplatten bewachsen waren. An dieser Feststellung ändert sich auch nichts, wenn man im Absetzeralter nur die Auswertung der SKP von den Betrieben B1, B2 und K2 betrachtet, bei denen im Gegensatz zu Betrieb K1 alle Altersstufen beprobt worden waren. Der Anteil an Selektivplatten von Absetzer-SKP mit Koloniewachstum war unter diesen Umständen zwar etwas geringer als unter Einbeziehung der SKP von K1, dennoch nahm der Anteil an Platten mit Koloniewachstum bis zur Endmast immer noch um 16 Prozentpunkte ab.

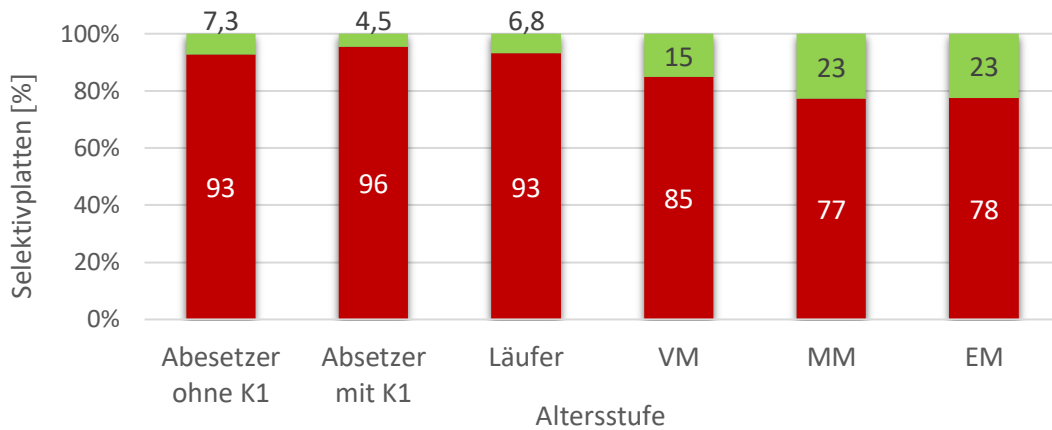


Abb. 12: Anteil der Selektivplatten mit Wachstum pro Altersstufe

Rot = Koloniewachstum; grün = kein Koloniewachstum; VM = Vormast; MM = Mittelmast; EM = Endmast.

4.5.1 Ausplattieren von Rückstellproben zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Methode

Beim Vergleich der KbE-Werte auf den Selektivplatten von SKP verschiedener MDG und Altersstufen desselben Betriebs waren immer wieder Ausreißer zu sehen – also einzelne SKP, die extrem viel oder wenig Wachstum aufwiesen oder deren Anteil nicht-suszeptibler Bakterien nicht mit den restlichen Werten eines MDGs harmonisierte. Um die Plausibilität dieser Werte zu überprüfen, wurde für die entsprechenden SKP die Kotprobenbearbeitung mit den Rückstellproben wiederholt. Zusätzlich wurden einige weitere, willkürlich ausgewählte SKP einbezogen. Es wurde stets das Koloniewachstum für alle fünf Plattenarten neu ausgewertet. Die absoluten Werte des Koloniewachstums auf allen Primärplattenarten vom Ausplattieren der Rückstellproben sowie die daraus gebildeten Prozentwerte nicht-suszeptibler KbE wurden auf ihre Korrelation mit den jeweiligen Werten der Auswertung der ursprünglichen, frisch bearbeiteten SKP untersucht (Tabelle 27).

Tabelle 27: Korrelation der Ergebnisse der Sammelkotproben-Auswertung von den Original- und Rückstellproben

	Absolute KbE ¹ -Anzahl pro Primärplatte	Quotientenwerte pro Selektivplatte
Pearson-Korrelation²	0,81	0,71
Spearman-Korrelation²	0,89	0,75

¹KbE = Koloniebildende Einheit;

²die Effektstärke wird von 0,1 – 0,3 als schwach positiv, von 0,3 – 0,5 als mittel positiv und > 0,5 als stark positiv eingestuft (Cohen 1988).

Die Korrelationsberechnungen nach Pearson und nach Spearman zeigten eine stark positive Korrelation der Werte der Original- und der Rückstellproben. Dabei war die Korrelation der absoluten Anzahlen an KbE pro Primärplatte etwas stärker als die der jeweiligen Quotientenwerte der Selektivplatten. Im Korrelationsdiagramm zeigten die beiden auf den gezählten KbE-basierenden Wertemengen eine lineare Korrelation (Abb. 13). Das Koloniewachstum war auf den Primärplatten der Originalproben insgesamt stärker ausgeprägt als auf denen der Rückstellproben. Die Verhältnisse zwischen den CS-resistenten (CSR) bzw. FQ-resistenten (FQR) / -resistenztragenden und -sensiblen Gammaproteobakterien blieben davon jedoch unberührt. Deshalb wurde die quantitative Analyse mit den Werten der Originalproben durchgeführt.

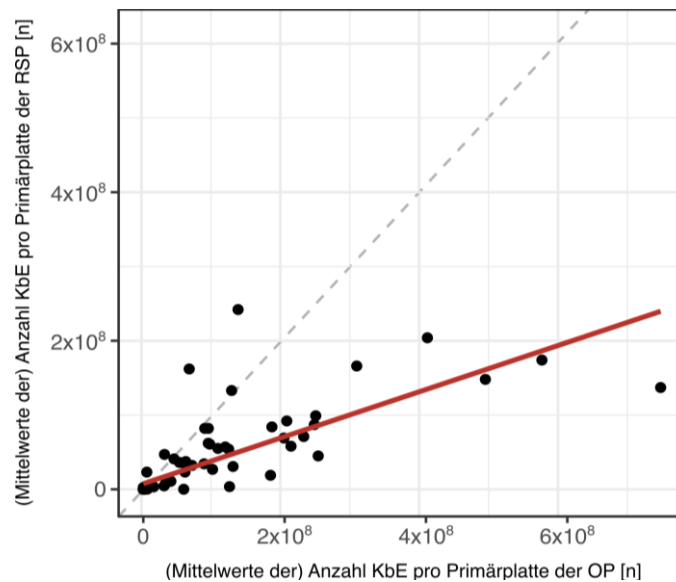


Abb. 13: Korrelationsdiagramm der (Mittelwerte der) Anzahl koloniebildender Einheiten pro Primärplatte von den Original- bzw. Rückstellproben

KbE = koloniebildende Einheiten; OP = Originalproben; RSP = Rückstellproben; grau gestrichelte Linie = Referenzlinie (Anstieg: $m = 1$); rote Linie = Regressionsgerade; es wurden 107 Werte korreliert. Mittelwerte wurden nur verwendet, wenn zwei verschiedene Verdünnungsstufen 30 – 300 KbE pro Platte erbrachten und damit zwei Zahlenwerte für die KbE pro Primärplatte vorlagen (siehe 3.3.2.2).

4.5.2 Vergleich der Quotientenwerte der GE4-, GF- und GQ-Platten pro Altersstufe und Betrieb

Um einen Überblick über den quantitativen Datensatz zu gewinnen, wurden alle ermittelten Quotientenwerte zuerst als einzelne Wertepunkte dargestellt. Bei allen beprobten Altersstufen wurden CSR- / FQR-Gammaproteobakterien (CSRG / FQRG) gefunden (Abb. 14). Dabei blieb das obere Quartil immer unter 10 %, außer man bezieht im Absetzeralter die Beprobung von K1 nicht mit in die Auswertung ein. Ab der Mast lag

das obere Quartil sogar immer unter 1 %. Allerdings waren die Wertebereiche sehr groß, da in jeder Altersstufe Werte zwischen 0 % (kein Wachstum) und über 10 % (sehr viel Wachstum) ermittelt wurden. So gab es von den Absetzer- bis zu den Vormastproben SKP, bei denen die Koloniezahlen der FQ- oder CS-resistenten Population mindestens 70 % der Population auf der GA-Platte betrug ($n = 11$ SKP). Der Median änderte sich über die verschiedenen Altersstufen aber nur mäßig und lag, außer bei den Mittelmastproben, immer zwischen 0,1 % und 1 %.

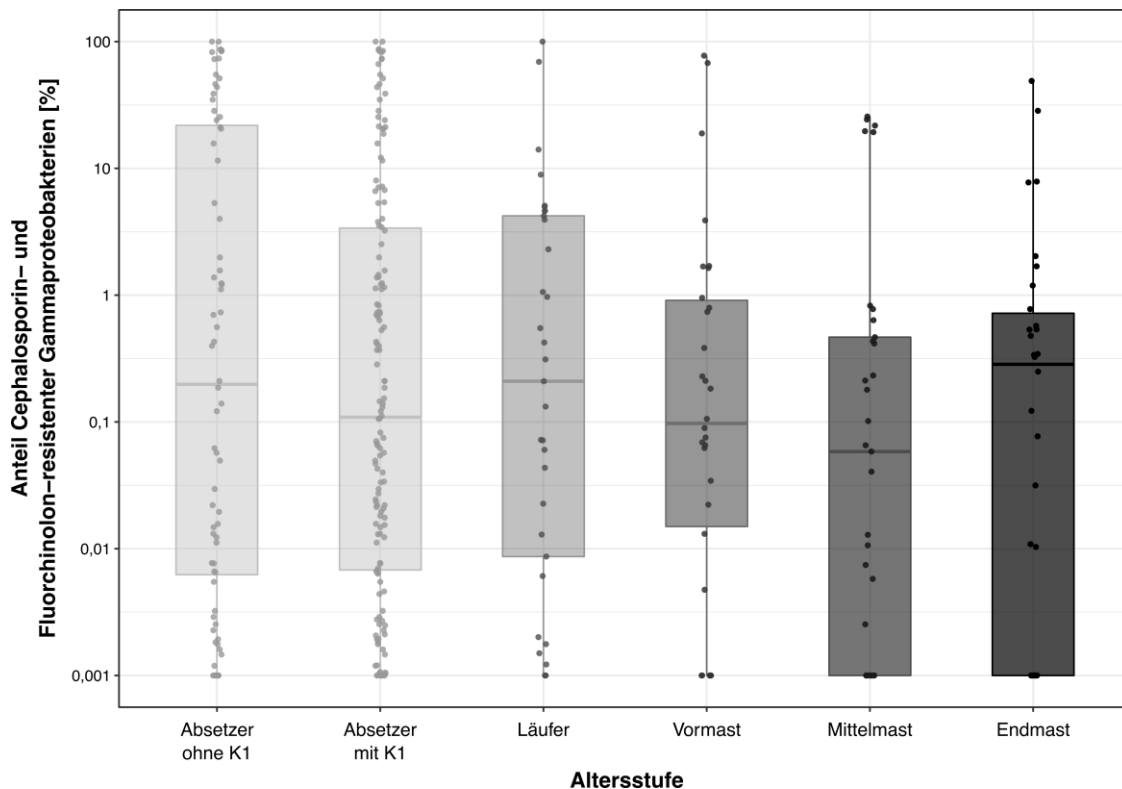


Abb. 14: Anteil Cephalosporin- / Fluorchinolon-resistenter Gammaproteobakterien an allen Gammaproteobakterien je Altersstufe

Darstellung der Gesamtheit aller ermittelten Quotientenwerte der GE4-, GF- und GQ-Platten als *box-and-whisker-plots*; durch die ausschließliche Absetzerferkel-Beprobung auf Betrieb K1 lagen zu dieser Altersstufe mehr Werte vor. Wertepunkte zur besseren Sichtbarkeit leicht horizontal gestreut; Antennen umschließen alle Werte innerhalb des 1,5-fachen Interquartilsabstands. Um auch Werte von SKP ohne Wachstum (Messwert 0) logarithmisch darstellen zu können, wurde zu allen Prozentwerten resistenter KbE der Wert 0,001 addiert. Werte, die über 100 % lagen, wurden bei 100 % abgeschnitten ($n = 3$).

Auch auf allen Betrieben wurden CSRG / FQRG vorgefunden (Abb. 15), wobei ihr Anteil stark zwischen den Betrieben aber auch innerhalb eines Betriebs variierte. Sogar innerhalb der Proben einer Altersstufe von einem Betrieb schwankten die Werte zwischen zwei (Endmast K2) und fast fünf (Absetzer K1) Zehnerpotenzen.

Insgesamt machten die CSRG / FQRG dabei meist (86 % der Quotientenwerte) weniger als 10 % der Gesamtpopulation auf der GA-Platte aus. Nur bei Absetzerferkeln aus Betrieb K2 war der Anteil bei fast allen Proben größer. Diese Werteverteilung spiegelt sich auch im Median wider, wobei sich die stark differierenden Werte der einzelnen Betriebe im Laufe der Mast immer weiter angleichen. Während der Mast lagen die Mediane der Betriebe K1, B1 und B2 im Absetzeralter unter 0,1 % lag (bei B2 sogar unter 0,01 %), lag der Median des Betriebs K2 bei den Beprobungen der gleichen Altersstufe über 50 %. Von den Absetzer- zu den Läuferproben änderte sich der Wertebereich der Bio-Betriebe kaum, die Häufigkeit des Auftretens resistenter Bakterien von Betrieb K2 nahm hingegen um eine Zehnerpotenz ab. Während der Mast lagen die Mediane aller Betriebe dann stets unter 1 %, der Median von Betrieb B2 wieder unter 0,01 %. Für K1 konnte nur ein Vergleich der Werte der Absetzerferkel mit den anderen Betrieben gezogen werden. Dieser Wertebereich ähnelte dem von Betrieb B1 zum gleichen Alterszeitpunkt, wobei durch die vermehrte Anzahl an Absetzer-SKP von K1 die Spanne des Wertebereichs größer war.

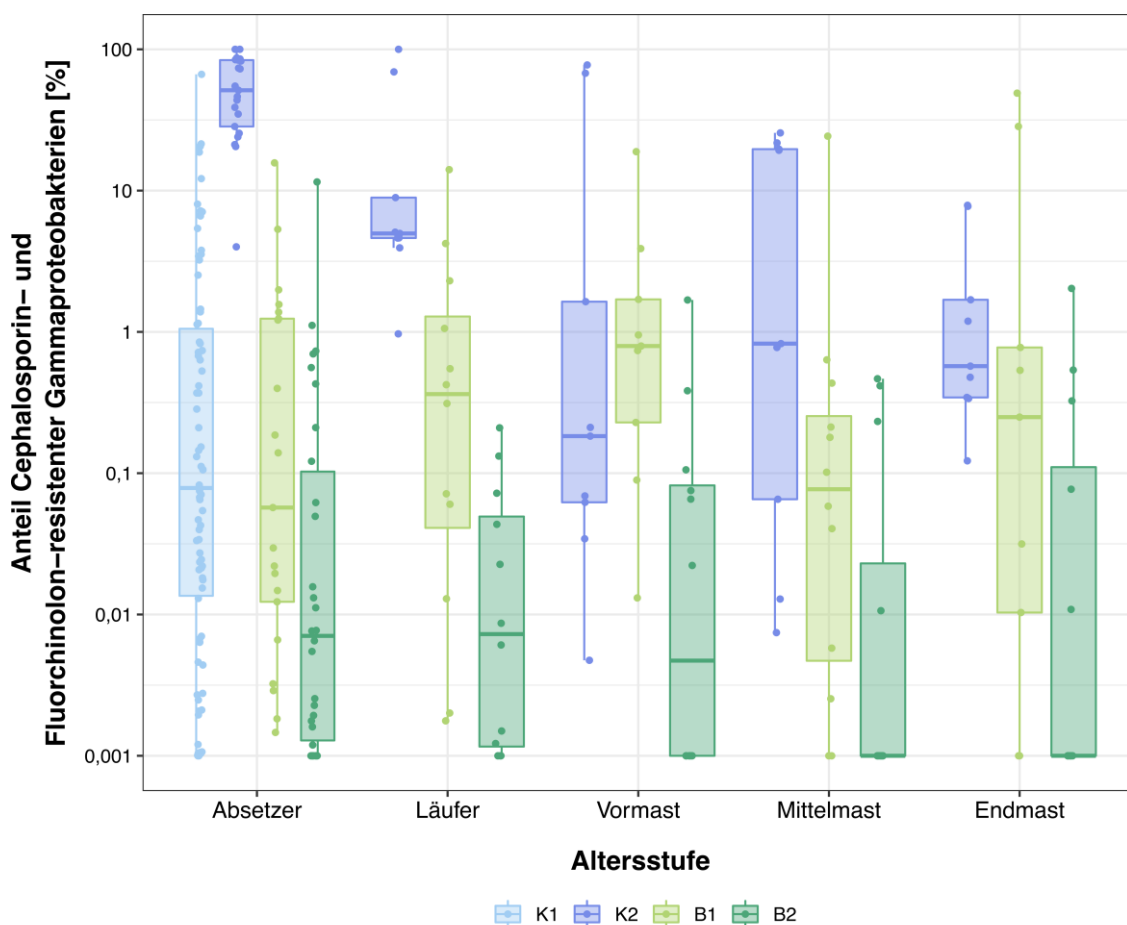


Abb. 15: Anteil Cephalosporin- / Fluorchinolon-resistenter Gammaproteobakterien an allen Gammaproteobakterien je Altersstufe und Betrieb
Berechnung und Darstellung der Quotientenwerte siehe Abb. 14.

4.5.3 Vergleich der Quotientenwerte pro Selektivplattenart zwischen den Altersstufen und Betrieben

Im Aufzuchtalter (Absetzer- und Läufer Schweine) ist eine starke Abnahme der Quotientenwerte zu beobachten, während sich die Werte im Lauf der Mast weniger ausgeprägt veränderten (Abb. 16). Der höchste Quotientenwert wurde bei den GE-Platten der Absetzerproben ohne K1-Proben erzielt (41 %), der niedrigste Wert bei den GE4-Platten der Endmastproben (0,38 %). Innerhalb einer Altersstufe war lediglich bei den Vormastproben der durchschnittliche Quotientenwert der GQ-Platten am höchsten, bei allen anderen Altersstufen traf dies auf die GE-Platten zu. Bezieht man die GE-Platten, die nur die Enrofloxacin-Konzentration des ECOFF-Wertes, nicht aber die des klinischen Grenzwertes enthalten (siehe Tabelle 3), nicht in die Analyse mit ein, so wurde der höchste durchschnittliche Quotientenwert außer bei der Vormast auf den GF-Platten gemessen. Schließt man die Auswertung der Selektivplatten von Betrieb K1 von der Analyse aus, so liegen die Werte der Absetzerproben um 4,0 (GE-Platten) bis 14 Prozentpunkte (GF-Platten) höher als unter Einbeziehung aller Absetzerproben.

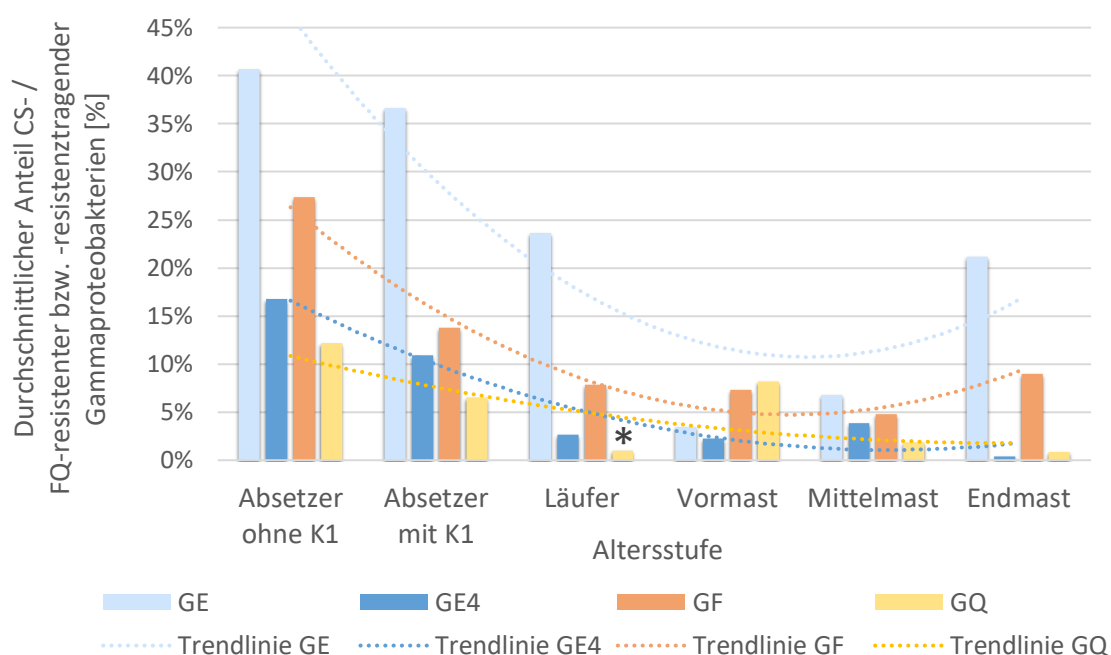


Abb. 16: Mittelwerte der Quotientenwerte pro Selektivplatte und Altersstufe

Gepunktete Trendlinien = Polynome zweiten Grades; * = Ausreißerwert von 800 % (Betrieb K2 – Läufer 1) ausgeschlossen; CS = Cephalosporine; FQ = Fluorchinolone; Plattenbezeichnungen siehe Tabelle 3.

Vergleicht man die vier Betriebe bezüglich der Quotientenwerte der Selektivplattenarten GE4, GF und GQ, so übertraf Betrieb K2 die Werte der anderen Betriebe bei weitem (Abb. 17). Die KbE-Werte dieses Betriebs auf den GE4- und GQ-Platten betragen

durchschnittlich fast ein Viertel der KbE auf der GA-Platte, bei den GF-Platten sogar fast die Hälfte. Bei Betrieb B2 betrug das Koloniewachstum auf den Selektivplatten hingegen nie mehr als ein Hundertstel des Wachstums auf der GA-Platte.

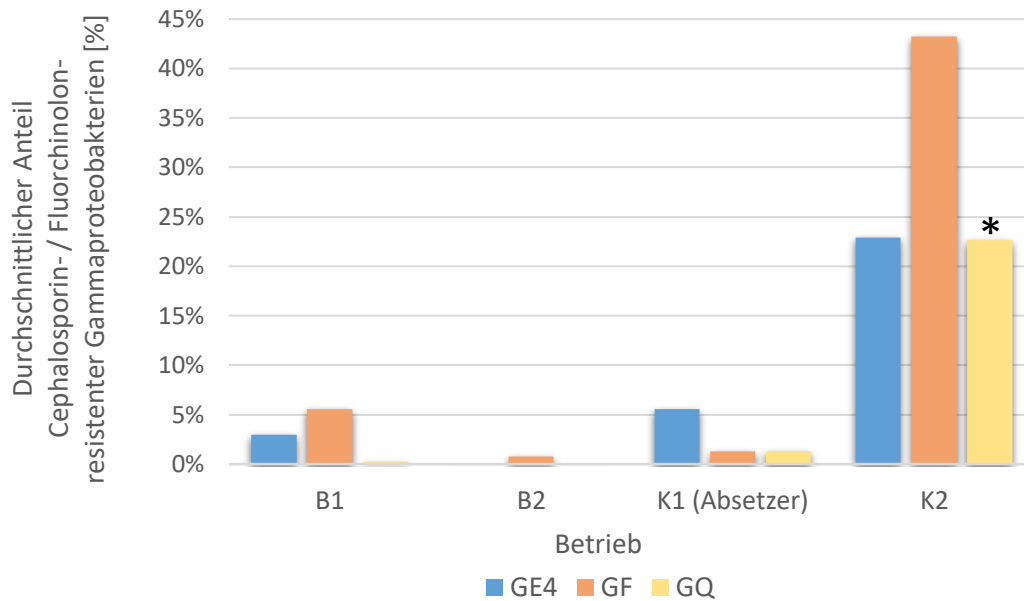


Abb. 17: Mittelwerte der Quotientenwerte pro Selektivplatte und Betrieb
 * = Ausreißerwert von 800 % (Betrieb K2 – Läufer 1) ausgeschlossen; Plattenbezeichnungen siehe Tabelle 3.

4.5.4 Betriebsspezifischer Vergleich der Quotientenwerte pro Selektivplatte zwischen Mast- bzw. Absetzerdurchgängen

Alle *heatmaps* wurden auf Basis der KbE-Werte der Gammaproteobakterien auf den drei Selektivplattenarten GE4, GF und GQ im Vergleich zu den KbE-Werten auf der GA-Platte erstellt. Dabei wurden für die Prozentwerte in Excel folgende Einstellungen gewählt:

- Minimum = Zahl: 0,01
- Mittelpunkt = Quantil: 40
- Maximum = Zahl: 1

Ein Quantil trennt den Bereich zwischen zwei festgelegten Grenzwerten (hier: 0,01 und 1) in eine bestimmte Anzahl von Abschnitten (hier: 40) ein, die alle prozentual gleich viele Datenpunkte des Datensatzes enthalten.

4.5.4.1 Betrieb B1

Beim Vergleich der MDG ergab sich bei Betrieb B1 (Abb. 18) ein sehr heterogenes Bild, da der Anteil CS- / FQ-resistenter KbE innerhalb eines MDGs, aber auch zwischen den MDG stark schwankte (Abb. 19). Am höchsten waren die Quotientenwerte auf den GF-Platten der Endmast von MDG 1 sowie MDG 2+3. Höhere Werte zeigten sich zudem

von den Absetzerproben bis zur Vormast auf den GE4-Platten. Auf den GQ-Platten wurden nur wenige Kolonien detektiert.

Absetzer			Läufer	Vormast	Mittelmast	Endmast	
Absetzer 1			Läufer 1	Vormast 1	Mittelmast 1	Endmast 1	MDG 1
Absetzer 2			Läufer 2+3	Vormast 2+3	Mittelmast 2+3	Endmast 2+3	MDG 2+3
Abs. 3a	Abs. 3b	Abs.3c					
Absetzer 4			Läufer 4	Vormast 4 Mittelmast 4 / Vormast 5	Mittelmast 4+5	Endmast 4+5	MDG 4+5
Absetzer 5			Läufer 5				

Abb. 18: Aufbau der heatmaps von Betrieb B1 über alle Beprobungen

MDG = Mastdurchgang; Abs. = Absetzer; Absetzer 1 = Absetzer von MDG 1; Läufer 2+3 = Läufer Schweine von MDG 2 und 3 wurden vor der Beprobung zusammengelegt; Mittelmast 4 / Vormast 5 = Vormast-Schweine von MDG 5 wurden zu Mast Schweinen von MDG 4 dazugestellt; a / b / c = Absetzerferkel-Beprobung eines MDGs setzt sich aus mehreren Proben zusammen, die aus unterschiedlichen Buchten entnommen wurden (siehe 4.2.1.3).

	Absetzer			Läufer	Vormast	Mittelmast	Endmast	
GE4	1,4%			0,31%	19%	0,04%	0,25%	MDG 1
	16%			14%	0,95%	0,10%	0,78%	MDG 2+3
	1,6%	1,2%	0,19%					
	0,01%			0,42%	0,74%	0,06%	0,53%	MDG 4+5
5,3%			0,07%	0,21%				
GF	0,40%			2,3%	1,7%	24%	49%	MDG 1
	1,2%			0,55%	0,23%	0,18%	28%	MDG 2+3
	0,14%	2,0%	0,02%					
	0,06%			4,2%	0,79%	0,63%	0,03%	MDG 4+5
0,03%			0%	0,43%				
GQ	0%			1,1%	3,9%	0%	0%	MDG 1
	0,02%			0,06%	0,01%	0%	0%	MDG 2+3
	0%	0%	0%					
	0,01%			0,01%	0,09%	0%	0,01%	MDG 4+5
0,01%			0%	0%				

Abb. 19: Quotientenwerte der GE4-, GF- und GQ-Platten aller Kotproben von Betrieb B1 vergleichend zwischen den Plattenarten

Plattenbezeichnungen siehe Tabelle 3; MDG = Mastdurchgang.

Die höchsten Werte der GE4-Platten fanden sich im Absetzerbereich in MDG 2. Bei der Zusammenlegung mit Tieren aus MDG 3 blieb dieser hohe Wert erhalten (Läuferprobe). Erst danach nahmen die Quotientenwerte deutlich ab, sodass sie in allen Endmastproben unter 1% lagen. Der Anteil resistenter Bakterien kann bei aufeinanderfolgenden Beprobungen allerdings auch stark schwanken

(siehe Läufer, Vormast und Mittelmast bei MDG 1). Der Anteil Ceftiofur-resistenter Gammaproteobakterien ver Hundertfachte sich in MDG 1 von der Absetzer- bis zur Endmastprobe (0,40 % zu 49 %). Dieser fast kontinuierliche Anstieg fand sich in MDG 2 allerdings nicht wieder. Dort war lediglich der Wert der Endmastprobe erhöht, während die Werte in MDG 3 immer unter 5 % lagen. Der Anteil Cefquinom-resistenter Bakterien war im gesamten Beprobungszeitraum sehr niedrig. Lediglich die Werte der Läufer- und Vormastprobe von MDG 1 waren leicht erhöht. Der Wert der Vormastprobe war dabei sogar auf der GQ- höher als auf der GF-Selektivplatte.

4.5.4.2 Betrieb B2

Während auf Betrieb B2 (Abb. 20) fast keine Cefquinom-resistenten Gammaproteobakterien detektiert wurden, wurden durchgängig niedrige Anteile an Ceftiofur-resistenten Bakterien ermittelt. Eine Absetzerprobe wies hier einen erhöhten Quotientenwert auf. Der Anteil Enrofloxacin-resistenter Bakterien lag nur bei wenigen SKP über 0,1 % (Abb. 21).

Absetzer		Läufer	Vormast	Mittelmast	Endmast	
Abs. 1a	Abs. 1b	Läufer 1	Vormast 1	Mittelmast 1	Endmast 1	MDG 1
Abs. 2a	Abs. 2b	Läufer 2	Vormast 2	Mittelmast 2	Endmast 2	MDG 2
Aussortierte 2		Läufer 2+3	Vormast 2+3	Mittelmast 2+3	Endmast 2+3	MDG 3
Abs. 3a	Abs. 3b					
Aussortierte 4		Läufer 4+5	Vormast 4+5	Mittelmast 4+5	Endmast 4+5	MDG 5
Abs. 5a	Abs. 5b					

Abb. 20: Aufbau der *heatmaps* von Betrieb B2 über alle Beprobungen

Abkürzungen siehe Abb. 18; „Aussortiert“ steht für die Probe derjenigen Ferkel, die aus den Abferkelbuchten aussortiert wurden und mit den Ferkeln des darauffolgenden Wurfzeitraums auf das *flatdeck* eingestellt wurden. Ab dem Läuferalter sind also Schweine von MDG 2 und MDG 3 (Läufer 2+3) zusammen eingestellt (siehe 4.2.2.3).

	Absetzer		Läufer	Vormast	Mittelmast	Endmast	
GE4	1,1%	0,21%	0%	0,07%	0,41%	0%	MDG 1
	0%	0,43%	0,01%	0%	0%	0,08%	MDG 2
	0,01%		0%	0%	0%	0%	MDG 3
	0,01%	0,01%					
	0%		0,01%	0%	0%	0%	MDG 5
0%	0%						
GF	12%	0,56%	0,13%	1,7%	0,23%	0,32%	MDG 1
	0,70%	0,12%	0,21%	0,06%	0,47%	2,0%	MDG 2
	0,06%		0,0%	0,38%	0,0%	0,54%	MDG 3
	0,05%	0,01%					
	0,0%		0,04%	0,10%	0,01%	0,01%	MDG 5
0,73%	0,0%						
GQ	0,01%	0%	0%	0,02%	0%	0%	MDG 1
	0%	0%	0,07%	0%	0%	0%	MDG 2
	0%		0%	0%	0%	0%	MDG 3
	0%	0,01%					
	0%		0,02%	0%	0%	0%	MDG 5
0%	0%						

Abb. 21: Quotientenwerte der GE4-, GF- und GQ-Platten aller Kotproben von Betrieb B2 vergleichend zwischen den Plattenarten
Plattenbezeichnungen siehe Tabelle 3; MDG = Mastdurchgang.

4.5.4.3 Betrieb K1

Aus Betrieb K1 wurden 26 SKP quantitativ ausgewertet. Bei 40 % der SKP betragen die KbE-Zahlen auf den GE4-Platten mindestens 1 % der KbE-Zahlen der GA-Platte (Abb. 22). Vor allem in den ersten beiden Absetzerdurchgängen (ADG) war dieser Anteil in allen Abteilen teils auch deutlich größer. In den nachfolgenden ADG wurden hingegen nur in den Abteilen 3 bis 5 noch vermehrt höhere Werte ermittelt, wobei der Wert des 3. ADGs in Abteil 4 besonders herausstach. Der Anteil Ceftiofur- oder Cefquinom-resistenter Gammaproteobakterien war in allen Abteilen nur bei den ersten beiden ADG erhöht.

	Abteil 1	Abteil 2	Abteil 3	Abteil 4	Abteil 5	
GE4	7,2%	12%	0,74%	8,0%	5,4%	1. ADG
	0,14%	21%	3,23%	3,4%	1,4%	2. ADG
	0,01%	0,41%	0,28%	67%	0,63%	3. ADG
	\	0,53%	0,13%	2,5%	6,7%	4. ADG
	0,05%	0,03%	3,5%	0,01%	0,06%	5. ADG
	0,01%	0%				6. ADG
GF	3,8%	7,1%	0,37%	0,01%	0,68%	1. ADG
	0,02%	19%	0,83%	1,2%	0,11%	2. ADG
	0,03%	0,02%	0,05%	0,10%	0%	3. ADG
	\	0,04%	0,02%	0,07%	0,15%	4. ADG
	0%	0%	0,11%	0%	0%	5. ADG
	0%	0%				6. ADG
GQ	1,4%	6,6%	0,37%	0,01%	0,72%	1. ADG
	0%	21%	0,85%	1,1%	0,02%	2. ADG
	0,02%	0,02%	0,04%	0,08%	0%	3. ADG
	\	0,03%	0,02%	0,07%	0,21%	4. ADG
	0%	0%	0,07%	0%	0%	5. ADG
	0%	0%				6. ADG

Abb. 22: Quotientenwerte der GE4-, GF- und GQ-Platten aller Kotproben von Betrieb K1 vergleichend zwischen den Plattenarten

\ = Probe wurde nicht genommen; Plattenbezeichnungen siehe Tabelle 3;
ADG = Absetzerdurchgang.

4.5.4.4 Betrieb K2

Bei Betrieb K2 (Abb. 23) waren in allen MDG die Quotientenwerte der Absetzerproben sehr hoch (Abb. 24). In zwei dieser Proben wurden sogar mehr KbE auf den Selektivplatten als auf der GA-Platte gezählt (GE4: Absetzer 2b; GF: Absetzer 1b). Der Anteil von CSRG / FQRG an der Gesamtpopulation auf der GA-Platte variierte in den Läufer- bis Mittelmastproben stark. Der höchste Wert aller Betriebe wurde in der Läuferprobe von MDG 1 auf der GQ-Platte gemessen, bei der darauffolgenden Vormastprobe wurden jedoch kaum CSRG vorgefunden. In MDG 1 wurden zwar die höchsten einzelnen Quotientenwerte detektiert, MDG 2 ergab dafür aber kontinuierlich hohe Werte, während in MDG 3 nur die Werte der Absetzerproben erhöht waren. Dennoch war in allen MDG eine Abnahme der Quotientenwerte bis zum Zeitpunkt der Schlachtung zu beobachten.

Absetzer			Läufer	Vormast	Mittelmast	Endmast	
Abs. 1a	Abs. 1b	Abs. 1c	Läufer 1	Vormast 1	Mittelmast 1	Endmast 1	MDG 1
Abs. 2a		Abs. 2b	Läufer 2	Vormast 2	Mittelmast 2	Endmast 2	MDG 2
Abs. 3a	Abs. 3b		Läufer 3	Vormast 3	Mittelmast 3	Endmast 3	MDG 3

Abb. 23: Aufbau der heatmaps von Betrieb K2 über alle Beprobungen

Für die Erläuterung der Abkürzungen siehe Abb. 18.

	Absetzer			Läufer	Vormast	Mittelmast	Endmast	
GE4	24%	44%	39%	4,6%	0%	20%	0,34%	MDG 1
	51%		142%	8,9%	1,6%	22%	0,12%	MDG 2
	55%	21%		0,97%	0,03%	0,06%	1,7%	MDG 3
GF	74%	202%	84%	69%	0,07%	26%	7,9%	MDG 1
	84%		83%	5,1%	68%	0,78%	0,48%	MDG 2
	87%	25%		4,6%	0,21%	0,01%	1,2%	MDG 3
GQ	4,0%	46%	21%	800%	0,06%	19%	7,7%	MDG 1
	73%		86%	5,0%	78%	0,83%	0,34%	MDG 2
	35%	28%		3,9%	0,18%	0,01%	0,57%	MDG 3

Abb. 24: Quotientenwerte der GE4-, GF- und GQ-Platten aller Kotprobe von Betrieb K2 vergleichend zwischen den Plattenarten
Plattenbezeichnungen siehe Tabelle 3; MDG = Mastdurchgang.

4.5.5 Betriebsspezifischer Vergleich der Quotientenwerte zwischen den Selektivplatten pro Mast- bzw. Absetzerdurchgang

Um das Auftreten resistenter Gammaproteobakterien auf den drei Plattenarten vergleichen zu können, werden die Daten aus 4.5.4 in veränderter Anordnung dargestellt.

4.5.5.1 Betrieb B1

Der Anteil an CSRG und FQRG variierte teils stark (Abb. 25). Während die GQ-Quotientenwerte fast durchgängig niedrig waren, wiesen die GF-Platten vereinzelt erhöhte Werte auf. Diese Dynamik wurde nur selten von den Werten der GE4-Platte gespiegelt.

	Absetzer			Läufer	Vormast	Mittelmast	Endmast	
MDG 1	1,4%			0,31%	19%	0,04%	0,25%	GE4
	0,40%			2,3%	1,7%	24%	49%	GF
	0%			1,1%	3,9%	0%	0%	GQ
MDG 2	16%			14%	0,95%	0,10%	0,78%	GE4
	1,6%	1,2%	0,19%					
	1,2%			0,55%	0,23%	0,18%	28%	GF
	0,14%	2,0%	0,02%					
0,02%			0,06%	0,01%	0%	0%	GQ	
0%	0%	0%						
MDG 3	0,01%			0,42%	0,74%	0,06%	0,53%	GE4
	5,3%			0,07%				
	0,06%			4,2%	0,79%	0,63%	0,03%	GF
	0,03%			0%				
	0,01%			0,01%	0,09%	0%	0,01%	GQ
0,01%			0%					

Abb. 25: Quotientenwerte der GE4-, GF- und GQ-Platten aller Kotproben von Betrieb B1 vergleichend zwischen den Mastdurchgängen
MDG = Mastdurchgang; Plattenbezeichnungen siehe Tabelle 3.

4.5.5.2 Betrieb B2

Der Betrieb B2 zeigte im Vergleich mit den anderen Betrieben die niedrigsten Quotientenwerte, die nur einmal über 2,0 % hinausgingen. Dabei ähnelte sich lediglich die Dynamik der Quotientenwerte der GE4- und GF-Platten am Anfang des ersten MDGs.

4.5.5.3 Betrieb K1

In allen Abteilen, insbesondere in Abteil 2, ergab der erste oder zweite ADG die höchsten Quotientenwerte (Abb. 26). Der Anteil der FQRG überwog fast immer den Anteil der CSRG. Die Quotientenwerte der GF- und GQ-Platten ähnelten sich dabei meist.

	GE4	GF	GQ	
Abteil 1	7,2%	3,8%	1,4%	1. ADG
	0,14%	0,02%	0%	2. ADG
	0,01%	0,03%	0,02%	3. ADG
	\	\	\	4. ADG
	0,05%	0%	0%	5. ADG
	0,01%	0%	0%	6. ADG
Abteil 2	12%	7,1%	6,6%	1. ADG
	21%	19%	21%	2. ADG
	0,41%	0,02%	0,02%	3. ADG
	0,53%	0,04%	0,03%	4. ADG
	0,03%	0%	0%	5. ADG
	0%	0%	0%	6. ADG
Abteil 3	0,74%	0,37%	0,37%	1. ADG
	3,2%	0,83%	0,85%	2. ADG
	0,28%	0,05%	0,04%	3. ADG
	0,13%	0,02%	0,02%	4. ADG
	3,5%	0,11%	0,07%	5. ADG
Abteil 4	8,0%	0,01%	0,01%	1. ADG
	3,4%	1,2%	1,1%	2. ADG
	67%	0,10%	0,08%	3. ADG
	2,5%	0,07%	0,07%	4. ADG
	0,01%	0%	0%	5. ADG
Abteil 5	5,4%	0,68%	0,72%	1. ADG
	1,4%	0,11%	0,02%	2. ADG
	0,63%	0%	0%	3. ADG
	6,7%	0,15%	0,21%	4. ADG
	0,06%	0%	0%	5. ADG

Abb. 26: Quotientenwerte der GE4-, GF- und GQ-Platten aller Kotproben von Betrieb K1 vergleichend zwischen den Abteilen

\ = Probe wurde nicht genommen; Plattenbezeichnungen siehe Tabelle 3;
ADG = Absetzerdurchgang.

4.5.5.4 Betrieb K2

Auf Betrieb K2 wurde der größte Anteil CS- / FQ-resistenter KbE in den Absetzer- und bei MDG 1 auch in den Läuferproben detektiert (Abb. 27). In den meisten Proben korrelierte die Höhe der Quotientenwerte der GF- und GQ-Platten. Vor allem bei den Absetzerproben, teils aber auch bei den Läufer- und in MDG 1 auch bei den Mittelmastproben ähnelte die Dynamik des Auftretens der CSRG auch der der FQRG. Die Unterschiede zwischen den MDG waren dabei allerdings stärker ausgeprägt als zwischen den Plattenarten.

	Absetzer			Läufer	Vormast	Mittelmast	Endmast	
MDG 1	24%	44%	39%	4,6%	0%	20%	0,34%	GE4
	74%	202%	84%	69%	0,07%	26%	7,9%	GF
	4,0%	46%	21%	800%	0,06%	19%	7,7%	GQ
MDG 2	51%	142%	8,9%	1,6%	22%	0,12%	GE4	
	84%	83%	5,1%	68%	0,78%	0,48%	GF	
	73%	86%	5,0%	78%	0,83%	0,34%	GQ	
MDG 3	55%	21%	0,97%	0,03%	0,06%	1,7%	GE4	
	87%	25%	4,6%	0,21%	0,01%	1,2%	GF	
	35%	28%	3,9%	0,18%	0,01%	0,57%	GQ	

Abb. 27: Quotientenwerte der GE4-, GF- und GQ-Platten aller Kotproben von Betrieb K2 vergleichend zwischen den Mastdurchgängen
MDG = Mastdurchgang; Plattenbezeichnungen siehe Tabelle 3.

4.6 Qualitative Analyse der Cephalosporin- / Fluorchinolon-resistenten *E. coli*-Stämme

CSR und/oder FQR *E. coli*-Stämme (CSRE / FQRE) ausgewählter SKP und Bakterienpools (BP) wurden qualitativ untersucht. Isolate, die mittels MALDI-TOF MS nicht als *E. coli* bestätigt wurden, gehörten den Gattungen *Acinetobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Pseudomonas* und *Rahnella* an und wurden nicht weiter analysiert. Die Analyse umfasste die Typisierung mittels MLVA-PCR, die Empfindlichkeitsprüfung gegenüber 14 Antibiotika und die Identifikation von Resistenzgenen durch PCR-Analysen (Abb. 28). Zusätzlich wurde für alle CSRE sowie einige FQRE eine Plasmid-Präparation mit anschließender Darstellung der Plasmide durchgeführt. Auf Basis dieser Untersuchungen erfolgte die Auswahl von 216 CSRE / FQRE für die Vollgenomsequenzierung.

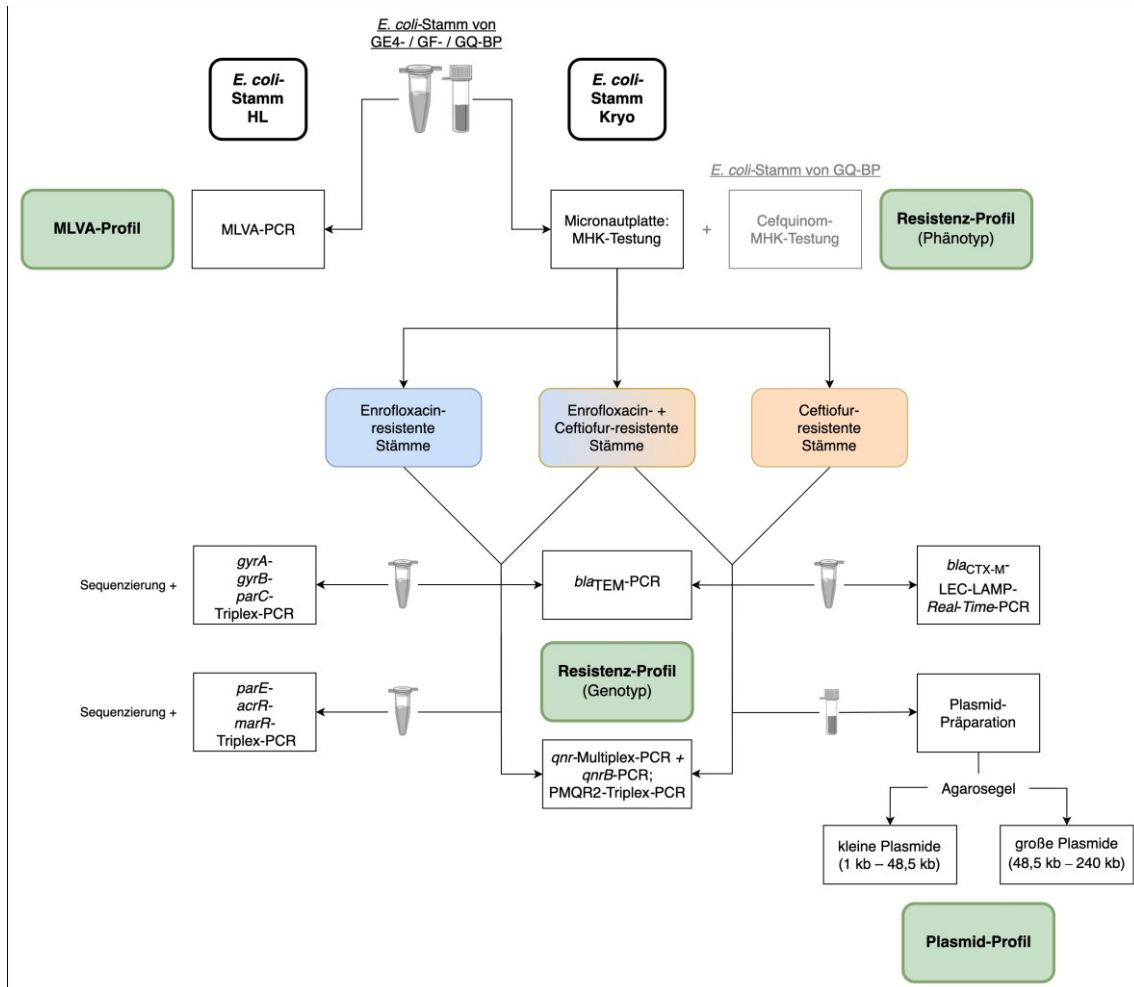


Abb. 28: Flussdiagramm der qualitativen Analyse der CSR / FQR *E. coli*-Stämme
 HL = Hitzelysate; Kryo = Kryopräservat; MHK = minimale Hemmkonzentration;
 BP = Bakterienpool; Plattenbezeichnungen siehe Tabelle 3.

Auswahl von Bakterienpools für die qualitative Bearbeitung und Auswertung

Von den insgesamt 329 Selektivplatten mit Koloniewachstum wurden nur die Kryopräservate der GE4-, GF- und GQ-Platten der qualitativen Bearbeitung und Auswertung unterzogen. Während alle SKP und BPs von **Betrieb B1** analysiert wurden, wurden von **Betrieb K1** wegen der großen Anzahl an SKP nur ausgewählte BPs bearbeitet (Abb. 29). Die GQ-BPs wurden nicht bearbeitet (Abb. 30), da die aus diesen BPs isolierten Stämme generell auch resistent gegenüber Cefotiofur waren (siehe 4.6.4.1), weshalb sie mit großer Wahrscheinlichkeit auch in den GF-BPs enthalten sind. Es wurden darüber hinaus nur die GE4- und GF-BPs von denjenigen SKP aus K1 bearbeitet, die laut der quantitativen Auswertung einen hohen Anteil an Enrofloxacin-, respektive Cefotiofur-resistenten Bakterien aufwiesen. Nach diesen Kriterien wurden die GE4- (n = 16) und / oder GF-BPs (n = 14) von 16 SKP aus Betrieb K1 zur weiteren qualitativen Beurteilung ausgewählt.

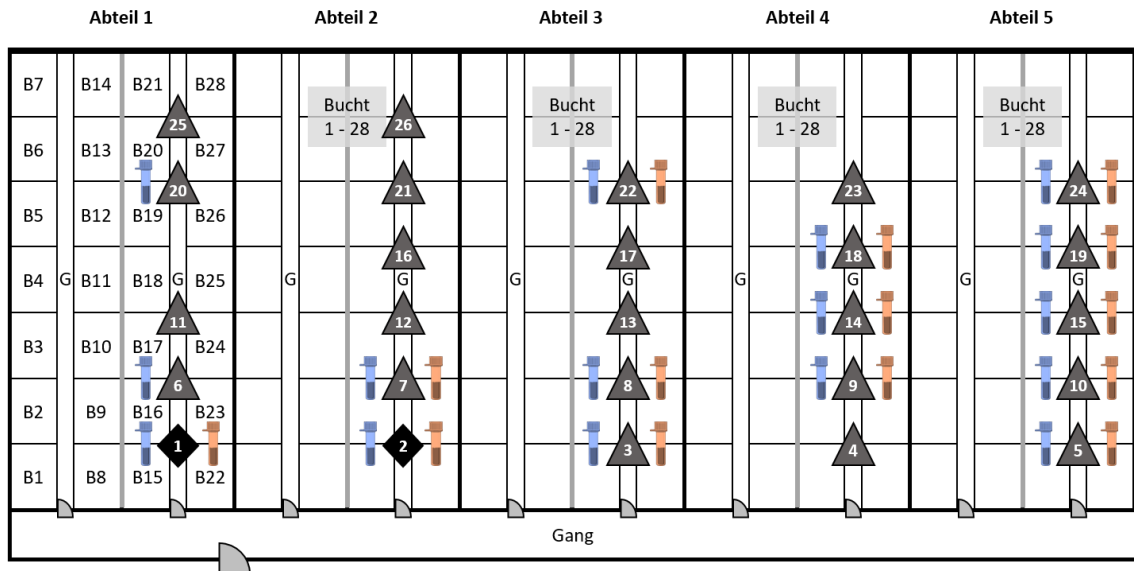


Abb. 29: Auswahl der Sammelkotproben für die Isolierung von Cephalosporin- / Fluorchinolon-resistenten *E. coli*-Stämmen aus Betrieb K1

Symbole und Ziffern siehe Abb. 8; Kryokultur-Symbol: blau = GE4-Bakterienpool, orange = GF-Bakterienpool.

Von **Betrieb K2** wurden die BPs von MDG 1 und 2 bearbeitet, während von MDG 3 nur quantitative Daten erhoben und ausgewertet wurden (Abb. 30). Bei **Betrieb B2** wurde eine zusätzliche SKP (Absetzer 3 Aussortiert) qualitativ analysiert. Die beprobten Tiere waren bei den Tieren von MDG 4 dazugestellt worden, der nicht bis zur Endmast weiterbepröbt (siehe 4.2.2.3) und deshalb nicht in die Auswertung mit einbezogen wurde. Daher wurden die aus dieser Probe isolierten *E. coli*-Stämme lediglich bei Fragen zur Absetzer-Altersstufe aus Betrieb B2 mit analysiert.

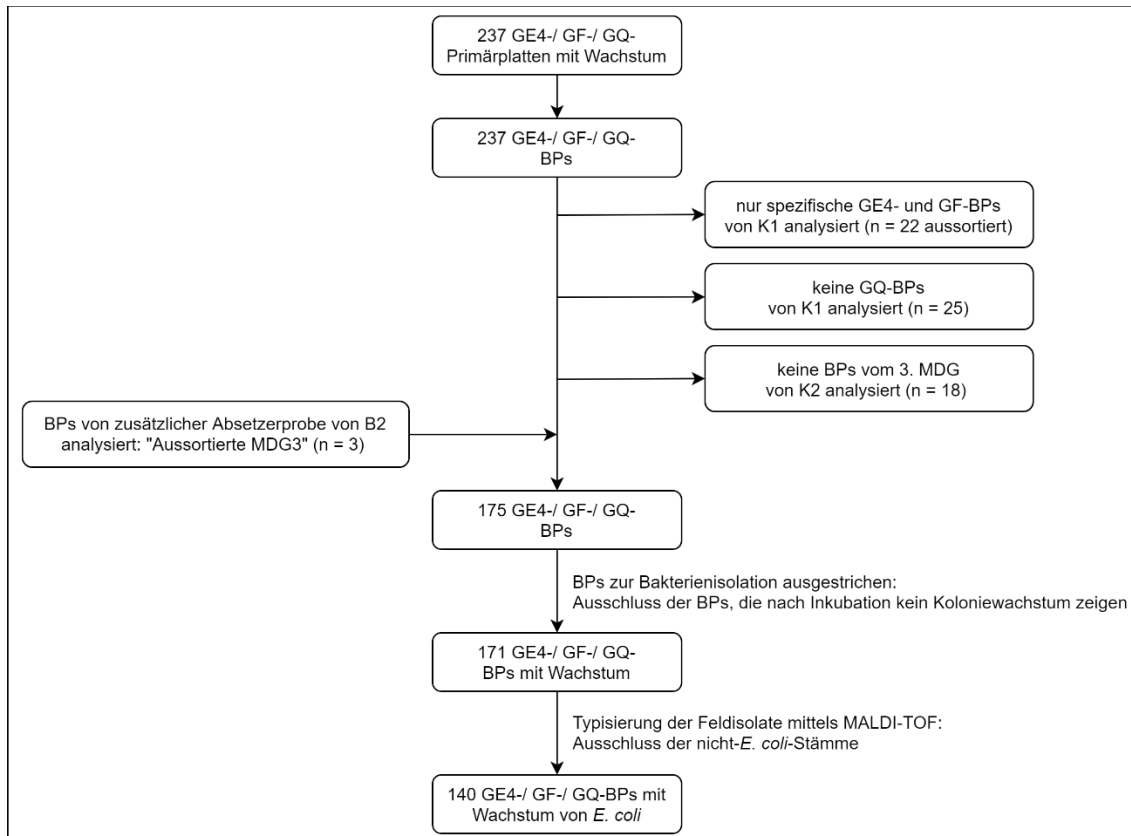


Abb. 30: Flusdiagramm zur Auswahl der Bakterienpools (BP) für die qualitative Bearbeitung

MDG = Mastdurchgang; Plattenbezeichnungen siehe Tabelle 3.

4.6.1 Anzahl isolierter Cephalosporin- / Fluorchinolon-resistenter *E. coli*-Stämme

Aus 140 BPs von 64 verschiedenen Kotproben wurden insgesamt 393 CSRE / FQRE isoliert (Tabelle 28, Tabelle 29). Dabei wurden zwischen ein und acht phänotypisch unterschiedliche *E. coli*-Stämme pro BP beziehungsweise bis zu 16 *E. coli*-Stämme pro Kotprobe isoliert. Pro SKP von einem konventionellen Betrieb wurden durchschnittlich mehr *E. coli*-Stämme isoliert als pro SKP von einem Bio-Betrieb. Zweihundert *E. coli*-Stämme wurden aus GE4-BPs, 99 aus GF-BPs und 94 aus GQ-BPs isoliert.

Tabelle 28: Pro Altersstufe und Betrieb untersuchte CSR / FQR *E. coli*-Stämme

Betrieb	Absetzer		Läufer		Vormast		Mittelmast		Endmast		Gesamt	
	[n]	(%) ¹	[n]	(%)	[n]	(%)	[n]	(%)	[n]	(%)	[n]	(%)
K1	92	(23)									92	(23)
K2	57	(15)	23	(5,9)	18	(4,6)	18	(4,6)	26	(6,6)	142	(36)
B1	29	(7,4)	23	(5,9)	14	(3,6)	24	(6,1)	21	(5,3)	111	(28)
B2	24	(6,1)	7	(1,8)	1	(0,25)	8	(2,0)	8	(2,0)	48	(12)
Summe	202	(51)	53	(13)	33	(8,4)	50	(13)	55	(14)	393	(100)

¹Prozentueller Anteil bezieht sich auf alle 393 isolierten *E. coli*-Stämme;

\ = entsprechende Probe auf Betrieb K1 nicht genommen.

Tabelle 29: Aus Betrieb K1 pro Abteil und Selektivplatte untersuchte CSRE / FQRE

Absetzer- durchgang	Abteil 1		Abteil 2		Abteil 3		Abteil 4		Abteil 5		Gesamt
	GE4 ¹	GF ²	GE4	GF	GE4	GF	GE4	GF	GE4	GF	
1.	3	1	5	1	4	3	–		5	1	23
2.	2	–	5	4	5	3	4	2	4	3	32
3.	–		–		–		3	1	3	3	10
4.			–		–		5	2	2	3	12
5.	3	–	–		4	2	–		2	1	12
6.	–		–								0
Summe	9		15		21		17		27		92

¹⁺²Plattenbezeichnungen siehe Tabelle 3; \ = keine Kotprobe entnommen.

4.6.2 MLVA-Profile der Cephalosporin- / Fluorchinolon-resistenten *E. coli*-Stämme

MLVA-Profile (MP) wurden für jeden Stamm aus zwei Agarose-Gelbildern abgeleitet, in denen die Auftrennung der Amplifikate aus MLVA-Multiplex- und -Duplex-PCR dargestellt worden war (Abb. 31). Insgesamt wurden 57 unterschiedliche MP identifiziert. Einige Stämme hatten gleiche oder ähnliche MP (siehe 4.6.3), das MP anderer Stämme kam im kompletten Datensatz nur ein einziges Mal vor (siehe 4.6.2.1).

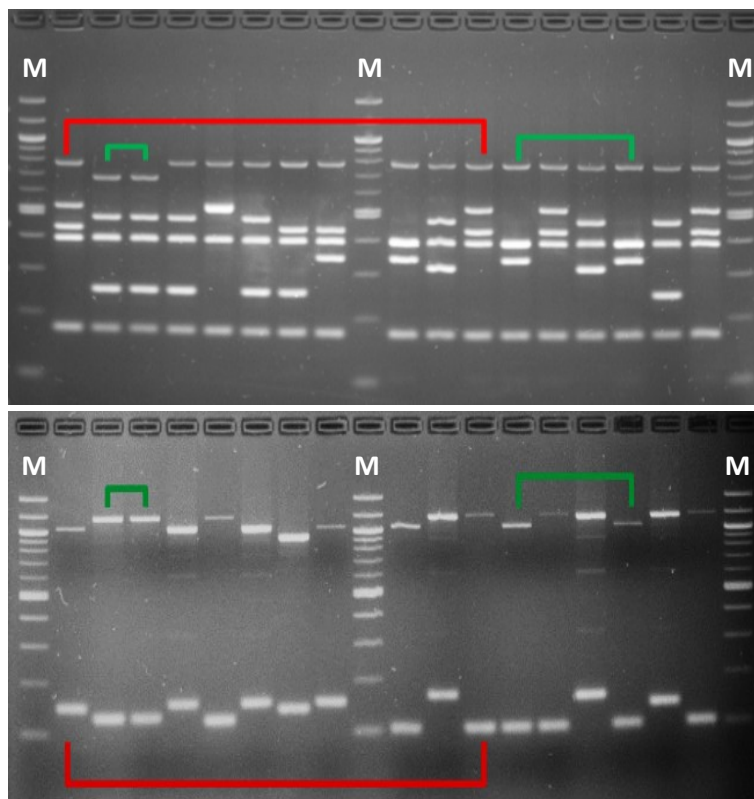


Abb. 31: MLVA-Multiplex-Gelbild (oben) und MLVA-Duplex-Gelbild (unten)

In beiden Gelen sind von links nach rechts die PCR-Amplifikate derselben Stämme aufgetragen. Grün = Bandenprofil aus sieben Banden stimmt überein (zwei Beispiele); rot = Bandenprofil aus sieben Banden stimmt nicht überein; M = 100 bp Marker.

Um die Diversität der Stämme über Betriebe und Altersstufen hinweg vergleichen zu können, wurde der Uniformitätsindex bestimmt (Tabelle 30). Er beschreibt die durchschnittliche Anzahl an Stämmen mit demselben MP und fällt umso höher aus, je ähnlicher sich die einbezogenen Stämme auf Genom-Ebene sind.

Tabelle 30: Anzahl unterschiedlicher MLVA-Profile pro Betrieb und Altersstufe

Betrieb		I ¹	II ²	III ³	IV ⁴	V ⁵	Pro Betrieb	Stämme [n]
K1	MLVA-Profile [n]	10					10	92
	Uniformitätsindex ⁶	9,2					9,2	
K2	MLVA-Profile [n]	19	8	11	7	12	34	142
	Uniformitätsindex	3,0	2,9	1,6	2,6	2,2	4,2	
B1	MLVA-Profile [n]	7	10	6	6	6	13	111
	Uniformitätsindex	4,1	2,3	2,3	4,0	3,5	8,5	
B2	MLVA-Profile [n]	10	3	1	3	2	15	48
	Uniformitätsindex	2,4	2,3	1,0	2,7	4,0	3,2	
Pro Altersst. ⁷	MLVA-Profile [n]	35	18	16	15	16	57	
	Uniformitätsindex	5,8	2,9	2,1	3,3	3,4	6,9	
Stämme [n]		202	53	33	50	55		393

¹I = Absetzer; ²II = Läufer; ³III = Vormast; ⁴IV = Mittelmast; ⁵V = Endmast;

⁶Uniformitätsindex (fett gedruckt) = [n] isolierte Stämme / [n] unterschiedliche MP dieser Stämme; für die Anzahl der isolierten Stämme pro Altersstufe und Betrieb siehe Tabelle 28;

⁷Altersst. = Altersstufe; \ = entsprechende Probe auf Betrieb K1 nicht genommen.

Bezogen auf alle Stämme des Datensatzes wiesen im Durchschnitt 6,9 Stämme dasselbe MP auf. Die Betriebe K2 und B2 hatten einen eher niedrigen Uniformitätsindex (4,2 bzw. 3,2), während der Uniformitätsindex der Betriebe B1 und K1 relativ hoch war. Dabei fällt bei B1 auf, dass der Gesamt-Uniformitätsindex des Betriebs deutlich höher war als die Uniformitätsindizes der einzelnen Altersstufen von diesem Betrieb. Dies ist ein Hinweis darauf, dass sich die Stämme der verschiedenen Altersstufen häufig chromosomal ähnelten, obwohl die Ähnlichkeit innerhalb einer Altersstufe nicht sehr groß war. Der hohe Uniformitätsindex von Betrieb K1 (9,2), der sich nur aus Stämmen von Absetzerschweinen ableitet, führte zu einem hohen allgemeinen Uniformitätsindex der Absetzer-Altersstufe (5,8). In der Vormast-Altersstufe war der Uniformitätsindex am niedrigsten, er stieg im Laufe der Mast aber leicht an.

4.6.2.1 Betriebs-singletons und echte singletons

Aus jedem Betrieb wurden Stämme mit einem MP isoliert, das nur bei einer einzigen Beprobung auf dem jeweiligen Betrieb detektiert und als Betriebs-singleton bezeichnet wurde (n = 34). Aus Betrieb B1 waren dies drei der 13 vorgefundenen MP (23%),

bei Betrieb B2 acht von 15 (53 %), aus Betrieb K1 sechs von zehn (60 %) und aus Betrieb K2 17 von 34 (50 %). Die MP von 18 dieser Betriebs-*singletons* wurden nur ein einziges Mal im kompletten Datensatz detektiert, weshalb sie echte *singletons* in dieser Studie darstellen.

4.6.3 Gruppierung der Cephalosporin- / Fluorchinolon-resistenten *E. coli*-Stämme basierend auf ihren MLVA-Profilen

Wiesen zwei oder mehr Stämme dasselbe MP auf, so wurden sie zu einem MLVA-*cluster* zusammengefasst. Die MLVA-*cluster* ließen sich drei Kladen zuordnen. Das größte MLVA-*cluster* setzte sich aus 55 Stämmen aus zwei Betrieben zusammen (#6 in Abb. 32).

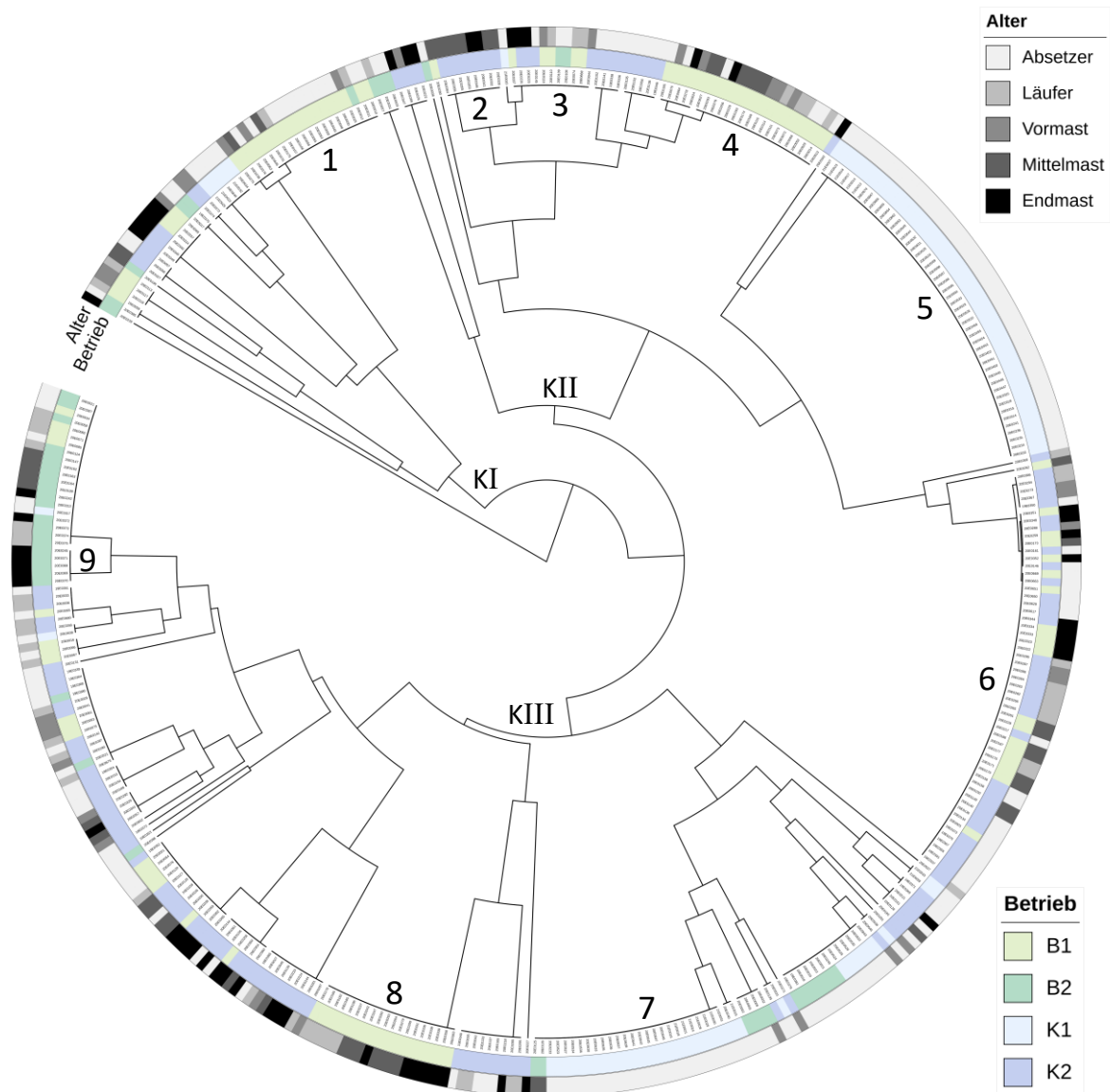


Abb. 32: Phylogeniebaum aller 393 CSRE / FQRE basierend auf ihrem MLVA-Profil
KI – KIII = Drei Kladen, in denen exemplarisch einige MLVA-*cluster* benannt wurden (Zahlen 1 – 9), auf die im weiteren Text eingegangen wird. Der Vergleich der MLVA-Profile basiert auf dem *Dice*-Koeffizienten. *Cluster* wurden mit UPGMA erstellt (siehe 3.7.3).

Viele der MLVA-cluster waren betriebsspezifisch (#1, #4 und #8 von Betrieb B1; #9 von Betrieb B2; #5 und #7 von Betrieb K1; #2 von Betrieb K2). Häufig stammten die zugehörigen Stämme aus unterschiedlichen Altersstufen (Abb. 32: Grau-Abstufung äußerer Ring) und MDG, oder sie wurden aus unterschiedlichen Stallabteilen isoliert.

Allerdings kam es auch vor, dass mehrere *E. coli*-Stämme aus einer SKP oder sogar von derselben Selektivplatte dasselbe MP aufwiesen. In diesem Fall wurde für den Stamm phänotypische Varianz beim Wachstum auf Gassner-Agar oder in antibiotischer Umgebung festgestellt, weshalb er mehrmals unabhängig voneinander isoliert wurde. Aus BP 20BP0175 der Kotprobe 20SC0065 wurden z. B. fünf Stämme mit demselben MP isoliert (Abb. 33).

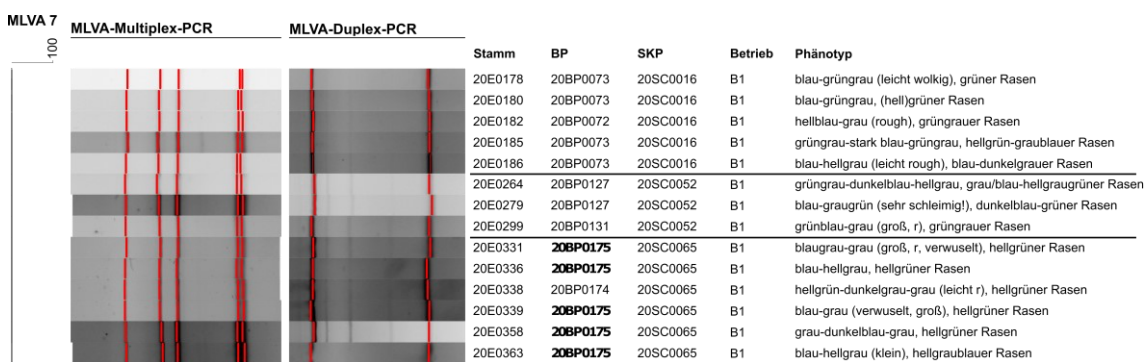


Abb. 33: Stämme mit demselben MLVA-Profil aus einer SKP sowie aus einem BP
 MLVA-Banden sind in den Agarose-Gelen rot markiert;
 BP (Bakterienpool) = BP-spezifische Identifikationsnummer;
 SKP (Sammelkotprobe) = SKP-spezifische Identifikationsnummer;
 Phänotyp = Koloniephänotyp des *E. coli*-Stammes.

4.6.3.1 Gruppierungen innerhalb eines Betriebs

Innerhalb eines Mastdurchgangs

Wurde dasselbe MP bei mindestens drei Alterszeitpunkten pro MDG bei mindestens einem Stamm aus der jeweiligen Probe detektiert, so wurden die zu diesem MLVA-cluster gehörenden Stämme als persistent innerhalb eines MDGs bzw. als Tiergruppen-persistent definiert (fortan als „MDGs- / Tiergruppen-persistentes MP“ bezeichnet). In Betrieb B1 waren sechs der 13 MP (46 %) und in Betrieb K2 sieben der 34 MP (21 %) persistent in einem MDG, wie in Abb. 34 exemplarisch für MP 10 und 12 aus B1 sowie für MP 11 und 16 aus K2 gezeigt. In Betrieb B2 hingegen entsprach kein MP diesen Kriterien. Da in Betrieb K1 keine vollständigen MDG beprobt worden waren, konnte das Vorkommen von Tiergruppen-persistenten Stämmen nicht überprüft werden.

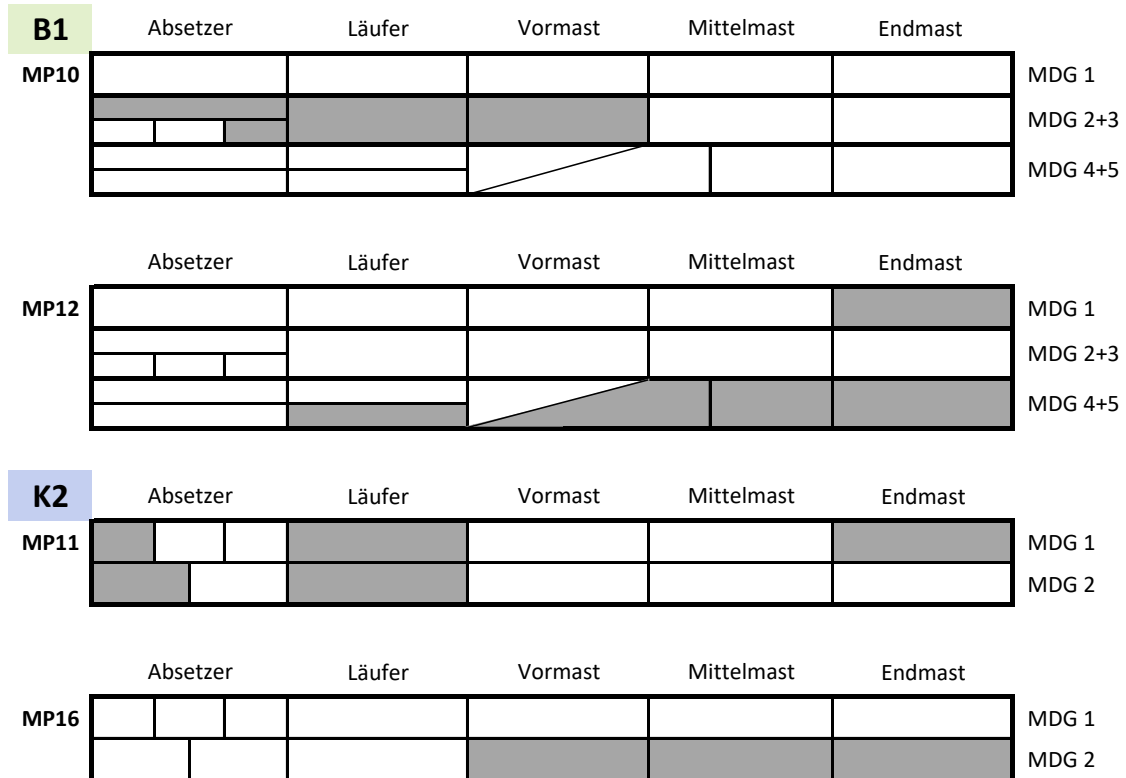


Abb. 34: Beispiele für Tiergruppen-persistente MLVA-Profile
 Aufbau heatmaps siehe 4.5.4; MP = MLVA-Profil (links angegeben);
 MDG = Mastdurchgang; Graufärbung = mindestens ein Stamm aus dieser SKP
 mit entsprechendem MP detektiert; Betriebe farbig markiert.

Über Mastdurchgänge hinweg

Wurde dasselbe MP an mindestens drei Beprobungszeitpunkten in einem MDG und zusätzlich bei mindestens einem weiteren MDG detektiert, so wurden die zu diesem MLVA-cluster gehörenden Stämme als Betriebs-persistent definiert (MP5 aus B1; MP8 aus K2 – Abb. 35). Ebenfalls als persistent innerhalb des Betriebs wurden Stämme eines MLVA-clusters bezeichnet, wenn das entsprechende MP jeweils mindestens einmal in drei oder mehr MDG detektiert wurde (fortan als „Betriebs-persistentes MP“ bezeichnet; MP7 aus B2 und MP13 aus B1 – Abb. 35). In Betrieb B1 waren sechs der 13 MP (46 %) Betriebs-persistent. Fünf dieser sechs MLVA-cluster erfüllten auch das Kriterium der Tiergruppen-Persistenz. In Betrieb B2 traten drei der 15 MP (20 %) persistent innerhalb des Betriebs auf, ohne dabei Tiergruppen-persistent zu sein. Aus Betrieb K2 wurden fünf der 34 MP (15 %) als Betriebs-persistent klassifiziert, die alle auch Tiergruppen-persistent waren.

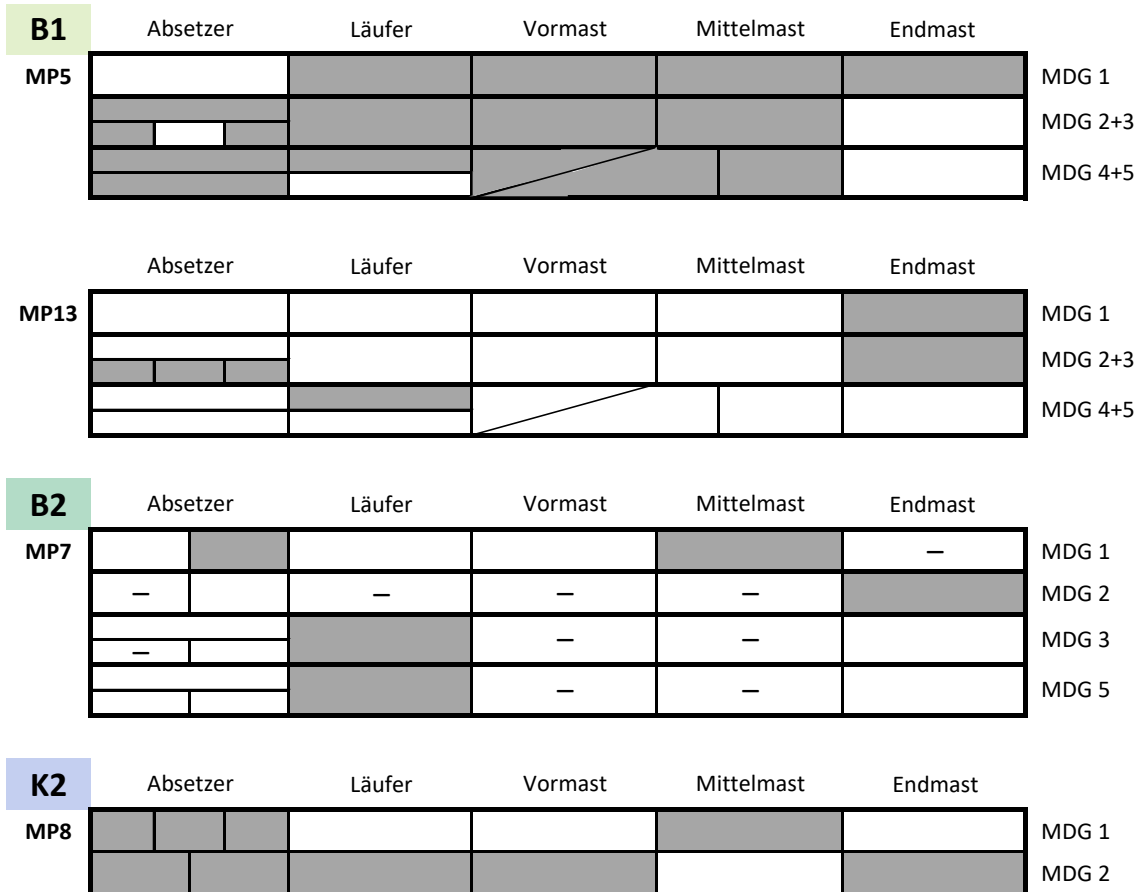


Abb. 35: Beispiele für Betriebs-persistente MLVA-Profile
 Aufbau Grafik siehe Abb. 34; — = aus der SKP wurden kein CSRE / FQRE isoliert.

Für K1 wurde Betriebs-Persistenz als das Vorkommen eines MPs in mehr als einem Drittel der qualitativ analysierten Proben definiert (Abb. 36). Anhand dieses Kriteriums wurden zwei der zehn MP als Betriebs-persistent eingestuft (20 %). Beide wurden in 14 von 16 qualitativ analysierten SKP detektiert.



Abb. 36: Beispiel für ein Betriebs-persistentes MLVA-Profil aus Betrieb K1
 Aufbau Grafik siehe Abb. 35; ADG = Absetzerdurchgang.

Sporadisch auftretende MLVA-Profile

Stämme mit einem MP, das zwar mehr als einmal auf einem Betrieb isoliert worden war, die Kriterien für „Tiergruppen-Persistenz“ oder „Betriebs-Persistenz“ aber nicht erfüllte, wurden als sporadische Stämme bezeichnet (Abb. 37). Von Betrieb B1 wurden drei der

13 MP (23 %) als sporadisch klassifiziert, von Betrieb B2 vier von 15 MP (27 %), von Betrieb K1 zwei der zehn MP (20 %) und von Betrieb K2 zehn der 34 MP (29 %).

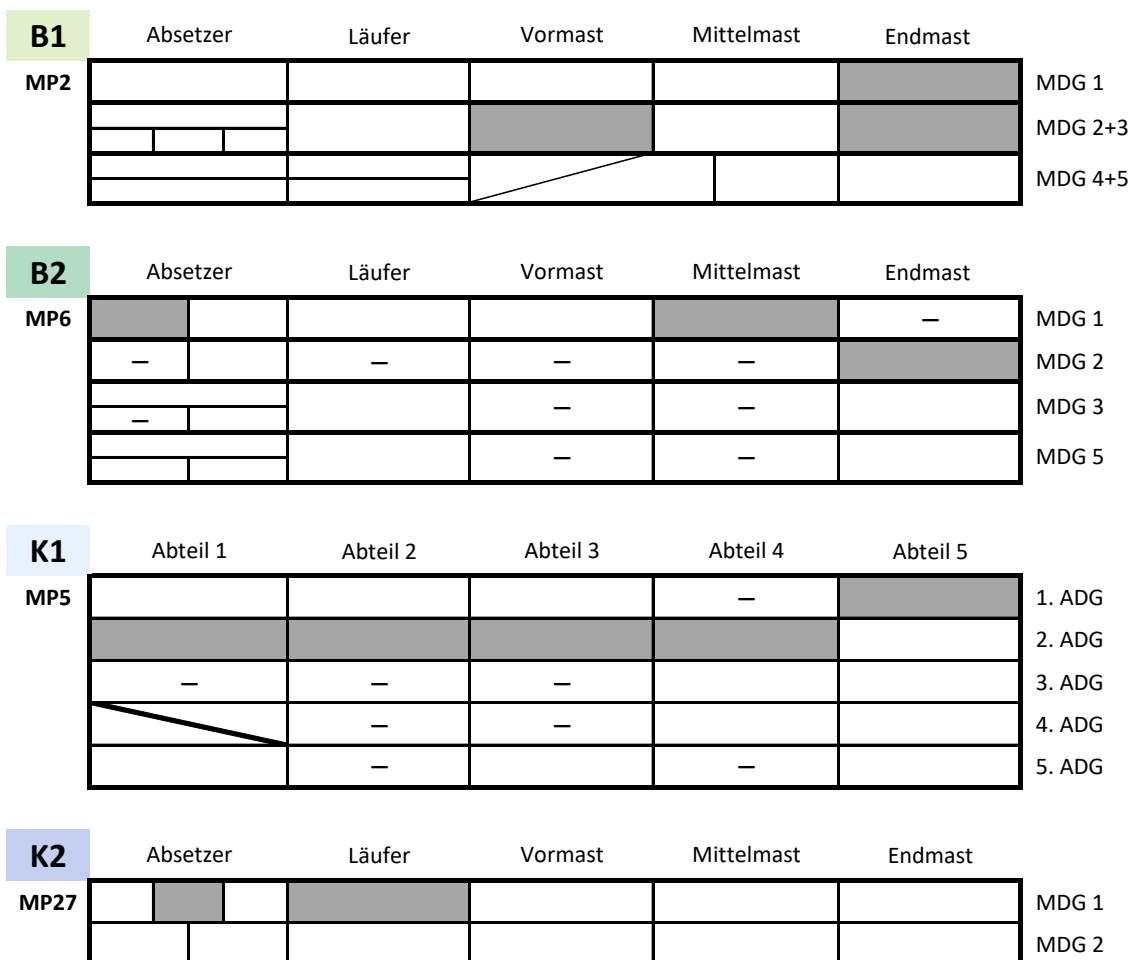


Abb. 37: Beispiele für sporadisch auftretende MLVA-Profile
 Aufbau Grafik und Abkürzungen siehe Abb. 36.

4.6.3.2 Gruppierungen über die Betriebe hinweg

Ein großes MLVA-cluster (#6 in Abb. 32) wurde von den Stämmen (n = 55) der Betriebe B1 und K2 gebildet. Die meisten dieser Stämme waren aus SKP von Absetzer- (n = 22) und Läufer Schweinen (n = 10) isoliert worden. Basierend auf dieser Beobachtung wurden alle Stämme einer Altersstufe verglichen. Bei den meisten Altersstufen setzten sich viele MLVA-cluster ebenfalls wieder aus Stämmen der Betriebe B1 und K2 zusammen. Lediglich bei den Stämmen der Vor- und Mittelmast gab es kein cluster aus Stämmen dieser Betriebe. Zusätzlich bildeten einige Stämme beider Bio-Betriebe oder beider konventionellen Betriebe gemeinsame MLVA-cluster (Abb. 38). Insgesamt war die Verteilung der MP aber primär betriebsspezifisch.

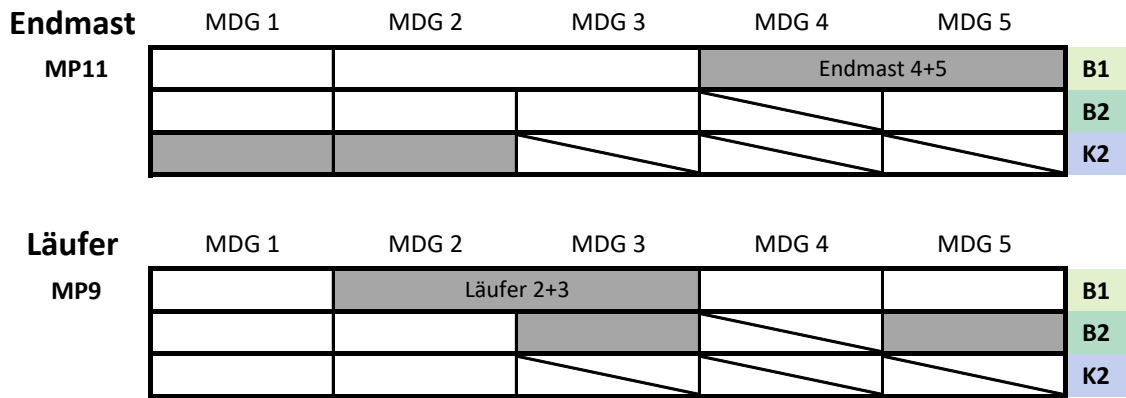


Abb. 38: Beispiele für auf mehreren Betrieben detektierte MLVA-Profile
 Aufbau Grafik siehe Abb. 34; MDG = Mastdurchgang; \ = entsprechende Probe auf dem jeweiligen Betrieb nicht genommen.

Zusätzlich wurde ein MP auf allen vier Betrieben detektiert (#3 in Abb. 32; Abb. 39).

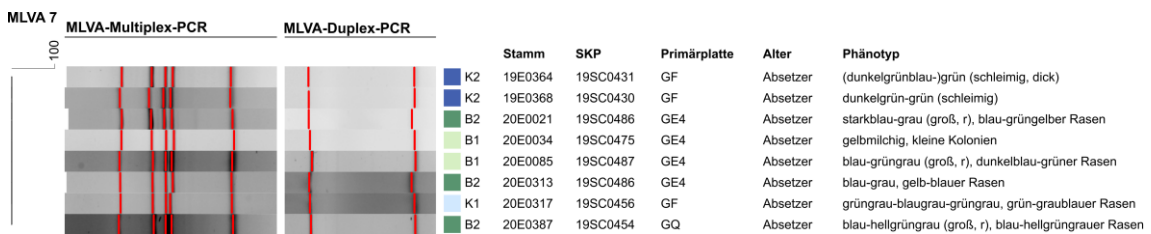


Abb. 39: Stämme mit einem auf allen vier Betrieben detektierten MLVA-Profil
 Betriebe: B1, B2, K1, K2 (farblich markiert); weitere Erklärungen siehe Abb. 33; Plattenbezeichnungen siehe Tabelle 3.

4.6.3.3 Altersassoziation der MLVA-Profile innerhalb eines Betriebs

Einige MP wurden gehäuft in bestimmten Altersgruppen detektiert (Abb. 40). So gab es jeweils auf den Betrieben B1 und K2 MP, die vor allem im Absetzer- und Läuferalter auftraten (MP3 aus B1; MP20 aus K2), und solche, die vor allem während der Mast isoliert worden waren (MP8 aus B1; MP29 aus K2). Die beiden altersassoziierten MLVA-cluster von Betrieb B1 waren gleichzeitig Betriebs-persistent.

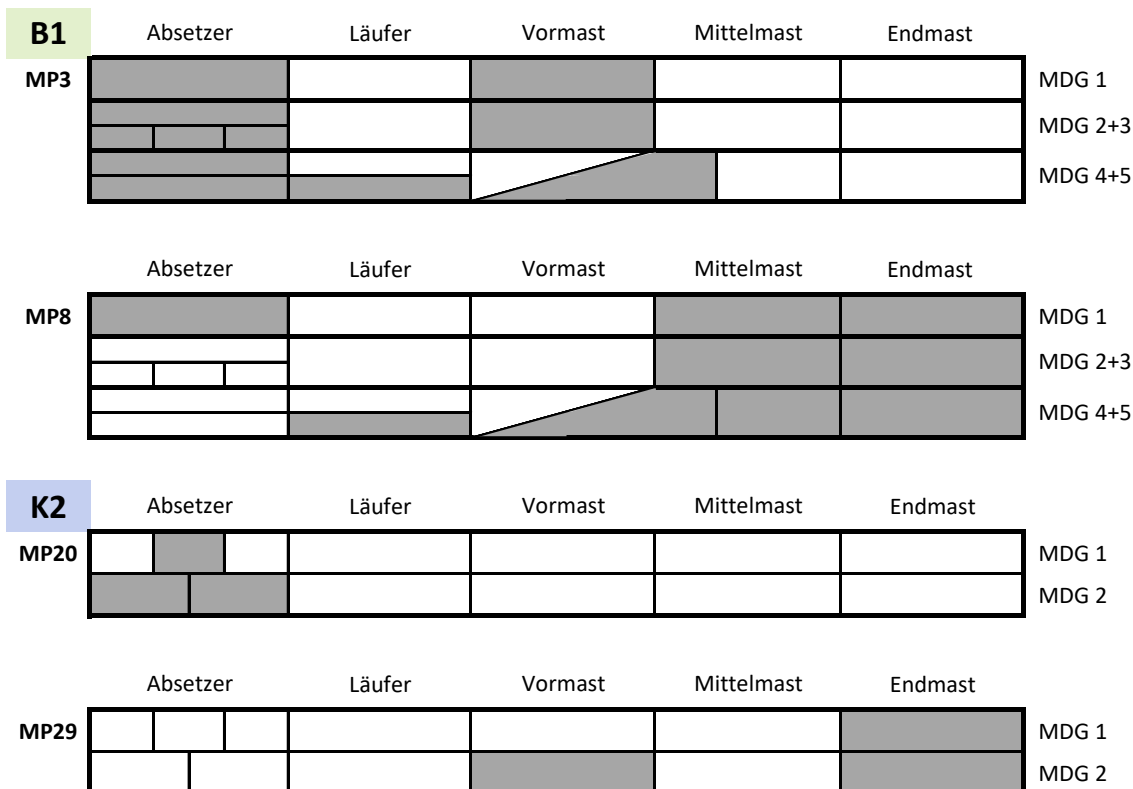


Abb. 40: Beispiele für altersassoziierte MLVA-Profile
Abkürzungen und Aufbau Grafik siehe Abb. 34.

4.6.4 Antibiotikaresistenz-Profile der Cephalosporin- / Fluorchinolon-resistenten *E. coli*-Stämme

4.6.4.1 Anzahl Cephalosporin- / Fluorchinolon-resistenter *E. coli*-Stämme

Bei 390 der 393 *E. coli*-Stämme konnte die Resistenz gegen dasjenige Antibiotikum (AB), das in der Selektivplatte enthalten war, von der der Stamm isoliert worden war (GE4, GF oder GQ), im Mikrodilutionsverfahren bestätigt werden. Nur drei von einer GE4-Platte isolierte Stämme (0,76 %) wiesen keinen Enrofloxacin-MHK-Wert auf, der ihre Einteilung als „resistent“ erlaubt hätte. Darüber hinaus wurden in vielen Stämmen zusätzliche Resistenzen gegenüber den zur Selektion genutzten AB (FQ und CS3/4) identifiziert, unabhängig vom AB in der Selektivplatte, von der die Stämme isoliert worden waren. Zum Beispiel waren alle von GQ-Platten isolierten Stämme auch resistent gegenüber Ceftiofur. So zeigte sich, dass von den 393 isolierten *E. coli*-Stämmen insgesamt 93 (24 %) resistent gegenüber CS3/4 waren, 142 (36 %) eine Resistenz gegenüber FQ aufwiesen und 155 (39 %) resistent gegenüber beiden AB-Klassen waren. Insgesamt waren damit 297 Stämme Enrofloxacin- und insgesamt 248 Stämme Ceftiofur-resistent.

Vergleich des Anteils isolierter CSRE und / oder FQRE pro Betrieb

Der Anteil an einfach (CSR oder FQR) bzw. doppelt-resistenten Stämmen (CSR und FQR) variierte deutlich zwischen den Betrieben (Abb. 41). Während aus Betrieb B1 kaum Stämme (6,3 %) mit beiden Resistenzen isoliert worden waren, betrug der Anteil dieser Stämme bei B2 fast ein Sechstel (17 %), bei K1 mehr als die Hälfte (52 %) und bei K2 sogar 65 % aller von dem jeweiligen Betrieb isolierten Stämme. Dafür lag der Anteil rein FQR Stämme bei K2 lediglich bei 10 %, während dieser Anteil bei den anderen Betrieben circa die Hälfte aller isolierten Stämme ausmachte. Aus K1 waren dafür nur sehr wenige rein CSR *E. coli* isoliert worden (1,1 %), während CSR Stämme bei den anderen Betrieben ein Viertel (K2, B2) oder sogar mehr als ein Drittel der Stämme darstellten (B1). Aus Betrieb B2 waren die drei zuvor beschriebenen Stämme isoliert worden, die trotz Wachstums auf einer GE4-Platte keine FQR aufwiesen, aber auch nicht CSR waren.

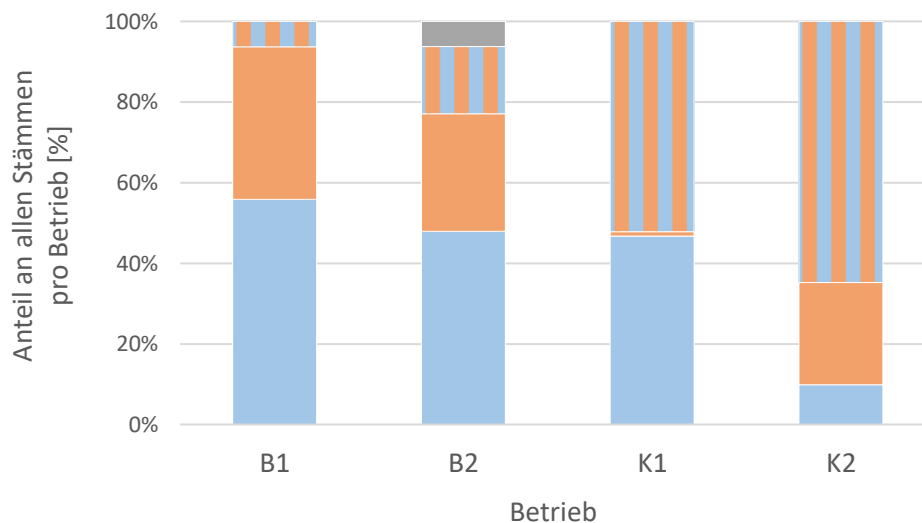


Abb. 41: Anteil Cephalosporin- und/oder Fluorchinolon-resistenter *E. coli*-Stämme an allen Stämmen pro Betrieb

Blau = FQRE; orange = CSRE; blau-orange-gestreift = FQ- und CS-resistente *E. coli*-Stämme; grau = weder FQ- noch CS-resistente *E. coli*-Stämme.

4.6.4.2 Resistenz-Profile der Cephalosporin- / Fluorchinolon-resistenten *E. coli*-Stämme

Für alle *E. coli*-Stämme wurde ein phänotypisches Resistenz-Profil gegenüber den 14 auf der Micronautplatte getesteten AB erstellt. Bei den 393 *E. coli*-Stämme wurden 168 unterschiedliche Resistenz-Profile ermittelt (BioNumerics Software, kategorischer Vergleich der Einteilung in suszeptibel, intermediär oder resistent gegenüber den getesteten AB mit UPGMA Methode). Einige dieser Resistenz-Profile traten bei Stämmen aus verschiedenen Betrieben auf (n = 27; 16 %). Allerdings zeigte sich kein für konventionelle Betriebe oder für Bio-Betriebe typisches Resistenz-Profil.

Da die FQ- bzw. CS-Resistenz das Selektionskriterium bei der Stammauswahl war, war die Prozentzahl an *E. coli*-Stämmen mit einer oder beiden dieser Resistenzen sehr hoch (Abb. 42; FQRE: 76 %; CSRE: 63 %). Aber auch der Anteil an Stämmen mit Resistenz gegenüber weiteren AB-Klassen war unter den isolierten CSRE / FQRE teils sehr groß. So lag der Anteil an Bakterien mit Resistenz gegenüber Ampicillin, Tiamulin oder Tilmicosin über 90 % (Ampicillin: 95 %; Tiamulin: 97 %; Tilmicosin: 99 %). Auch gegenüber Cefalotin waren nur 3,3 % der Bakterien suszeptibel. Zusätzlich gab es bei diesem AB noch eine größere Population an Bakterien mit intermediärem Phänotyp (15 %). Der Anteil an Tulathromycin-resistenten Bakterien war hingegen sehr niedrig (1,0 %). CSRE / FQRE mit Resistenz gegenüber Amoxicillin-Clavulansäure oder Colistin wurden nicht detektiert. Es gab lediglich Stämme, die als intermediär gegenüber diesen AB eingeordnet wurden (Amoxicillin-Clavulansäure: 2,0 %; Colistin: 23 %). Der Anteil an Florfenicol- oder Gentamicin-resistenten *E. coli* war ebenfalls niedrig (Florfenicol: 9,2 %; Gentamicin: 11 %). Auffällig war, dass der Anteil an Bakterien mit Resistenzen gegenüber den getesteten EMA-Kategorie D AB zu großen Teilen über 60 % lag (Ampicillin: 95 %; Spectinomycin: 39 %; Trimethoprim/Sulfamethoxazol (Cotrimoxazol): 62 %; Tetrazyklin: 63 %).

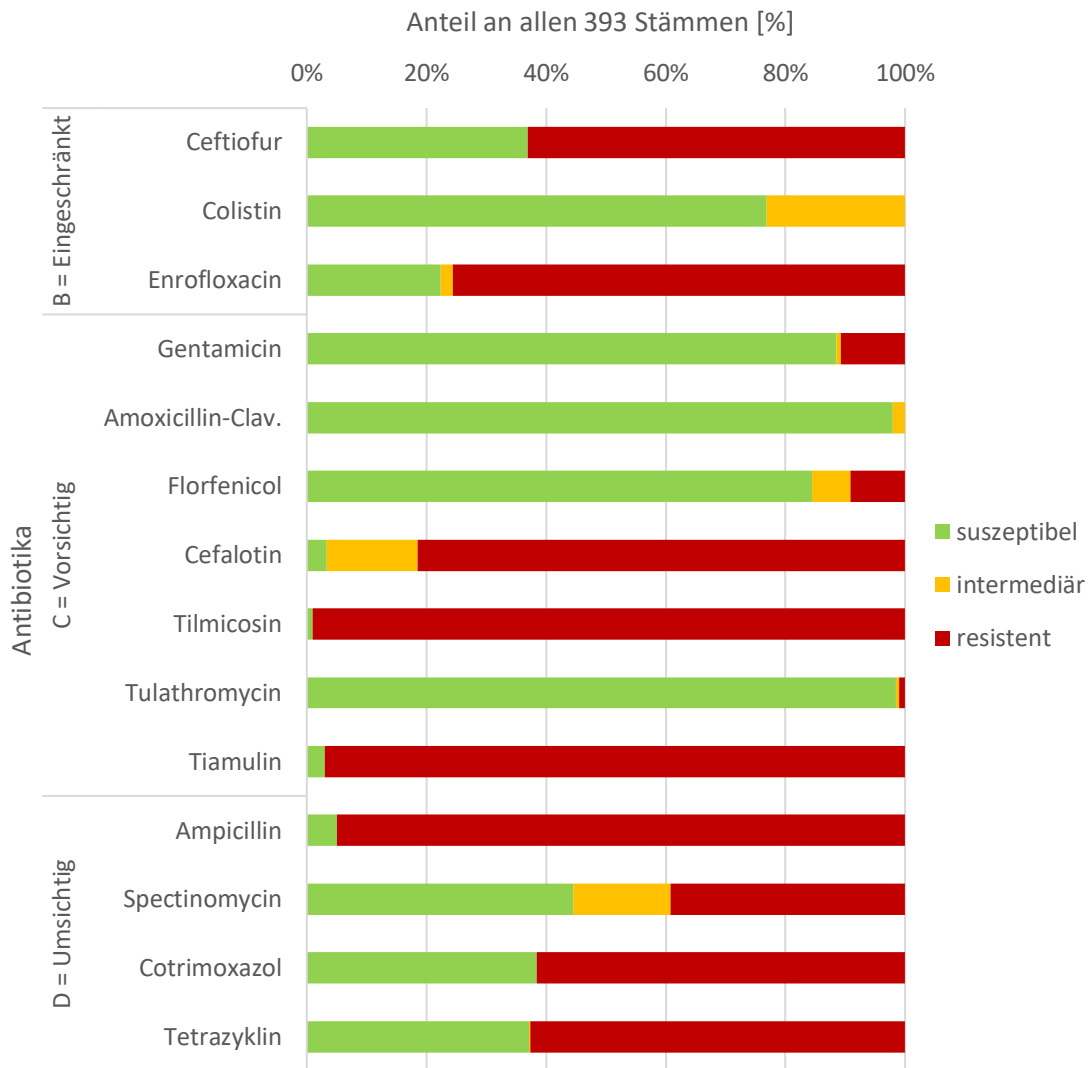


Abb. 42: Anteil suszeptibler, intermediärer und resistenter *E. coli*-Stämme für jedes getestete Antibiotikum

Einteilung der 14 Antibiotika nach EMA-Kriterien (siehe 2.2.3.1); Amoxicillin-Clav. = Amoxicillin-Clavulansäure.

Vergleich der Einteilung nach ECOFF-Wert gegenüber der nach klinischen Grenzwerten

Für die AB Cefalotin und Florfenicol lag der ECOFF-Grenzwert zur Unterscheidung von Wildtyp- und Nicht-Wildtyp-Population über der jeweils höchsten gemessenen Konzentration auf der Micronautplatte. Ihre Einteilung wurde daher anhand der Ergebnisse aus den entsprechenden Resistenzgen-PCRs vorgenommen (siehe 4.6.5.3).

Vergleicht man die Einteilung der MHK-Werte mittels klinischem Grenzwert mit der Einteilung nach ECOFF-Kriterien für diejenigen AB, für die beide Grenzwerte existieren (n = 11; siehe 3.8.3), so entsprach der Prozentsatz der resistenten Stämme für die meisten AB dem jeweiligen Anteil an Nicht-Wildtyp-Stämmen. Bei vier AB unterschieden sich die Werte jedoch (Abb. 43). Bei Cotrimoxazol lag der Anteil der

Nicht-Wildtyp-Stämme (66 %) um 4 Prozentpunkte höher als der der resistenten Stämme. Bei Enrofloxacin übertraf der Anteil der Nicht-Wildtyp-Population (87 %) den Anteil der resistenten Population sogar um 11 Prozentpunkte. Bei Amoxicillin-Clavulansäure glich der Anteil der Nicht-Wildtyp-Stämme dem Anteil an Stämmen mit intermediärem Phänotyp (2,0 %), während gegenüber Colistin alle Stämme als Wildtyp eingestuft wurden, obwohl ein Teil der Stämme bei der Einteilung nach klinischem Grenzwert als intermediär klassifiziert worden war (23 %).



Abb. 43: Vergleich des Anteils an Wildtyp-Stämmen nach ECOFF mit dem Anteil suszeptibler Stämme nach klinischem Grenzwert pro Antibiotikum

CET = Ceftiofur; COL = Colistin; ENR = Enrofloxacin; GEN = Gentamicin; AMC = Amoxicillin-Clavulansäure; FLL = Florfenicol; CTN = Cefalotin; AMP = Ampicillin; SPT = Spectinomycin; T/S = Cotrimoxazol; TET = Tetracyclin; Einteilung der Antibiotika siehe Abb. 42; klin. GW = klinischer Grenzwert; *ECOFF: Zugehörigkeit zur Wildtyp- bzw. Nicht-Wildtyp-Population wurde genotypisch mittels PCR bestimmt (siehe 4.6.5.3).

4.6.4.3 Vergleich der Resistenzsituation zwischen den verschiedenen Altersstufen

Vergleicht man die Ergebnisse der phänotypischen Suszeptibilitätstestung zwischen der jüngsten und ältesten beprobten Altersstufe (Abb. 44), so nahm der Anteil an *E. coli*-Stämmen, die gegenüber dem jeweiligen AB resistent oder intermediär waren, vom Absetzeralter bis zur Endmast für neun AB ab (Ceftiofur, Enrofloxacin, Gentamicin, Amoxicillin-Clavulansäure, Cefalotin, Tilmicosin, Tiamulin, Cotrimoxazol, Tetrazyklin). Während noch 68 % der *E. coli*-Stämme, die aus Absetzerkotproben isoliert worden waren, jeweils resistent gegenüber Tetrazyklin und Cotrimoxazol waren, belief sich dieser Anteil bei den Endmast-Stämmen nur auf 38 % (Tetrazyklin) beziehungsweise 56 % (Cotrimoxazol). Gegenüber Gentamicin wurden 11 % der Bakterien aus den Absetzerproben als resistent klassifiziert, während in den Endmastproben kein Stamm diese Resistenz aufwies. Auch der Anteil der Stämme mit den zur Selektion gewählten Antibiotikaresistenzen war in den Absetzerproben circa 10 Prozentpunkte höher als in den Endmastproben. Für die restlichen fünf getesteten AB (Colistin, Florfenicol, Tulathromycin, Ampicillin, Spectinomycin) nahm der Anteil resistenter Bakterien vom Absetzeralter bis zur Endmast zu. Gegenüber Spectinomycin waren nur 33 % der Stämme aus den Absetzerproben resistent, während der Anteil dieser Stämme bei den Endmastproben 49 % ausmachte. Dafür nahm der Anteil an Stämmen mit intermediärem Phänotyp gegenüber Spectinomycin gleichzeitig um über 50 % ab (Absetzer: 20 %; Endmast: 9,1 %). Der Anteil an Stämmen, die als intermediär gegenüber Colistin klassifiziert worden waren, stieg von den Absetzern (22 %) bis zur Endmast (33 %) um etwa 50 %. Der Anteil an Stämmen mit resistentem oder intermediärem Phänotyp gegenüber Cefalotin, Amoxicillin-Clavulansäure oder Florfenicol änderte sich nur geringfügig.

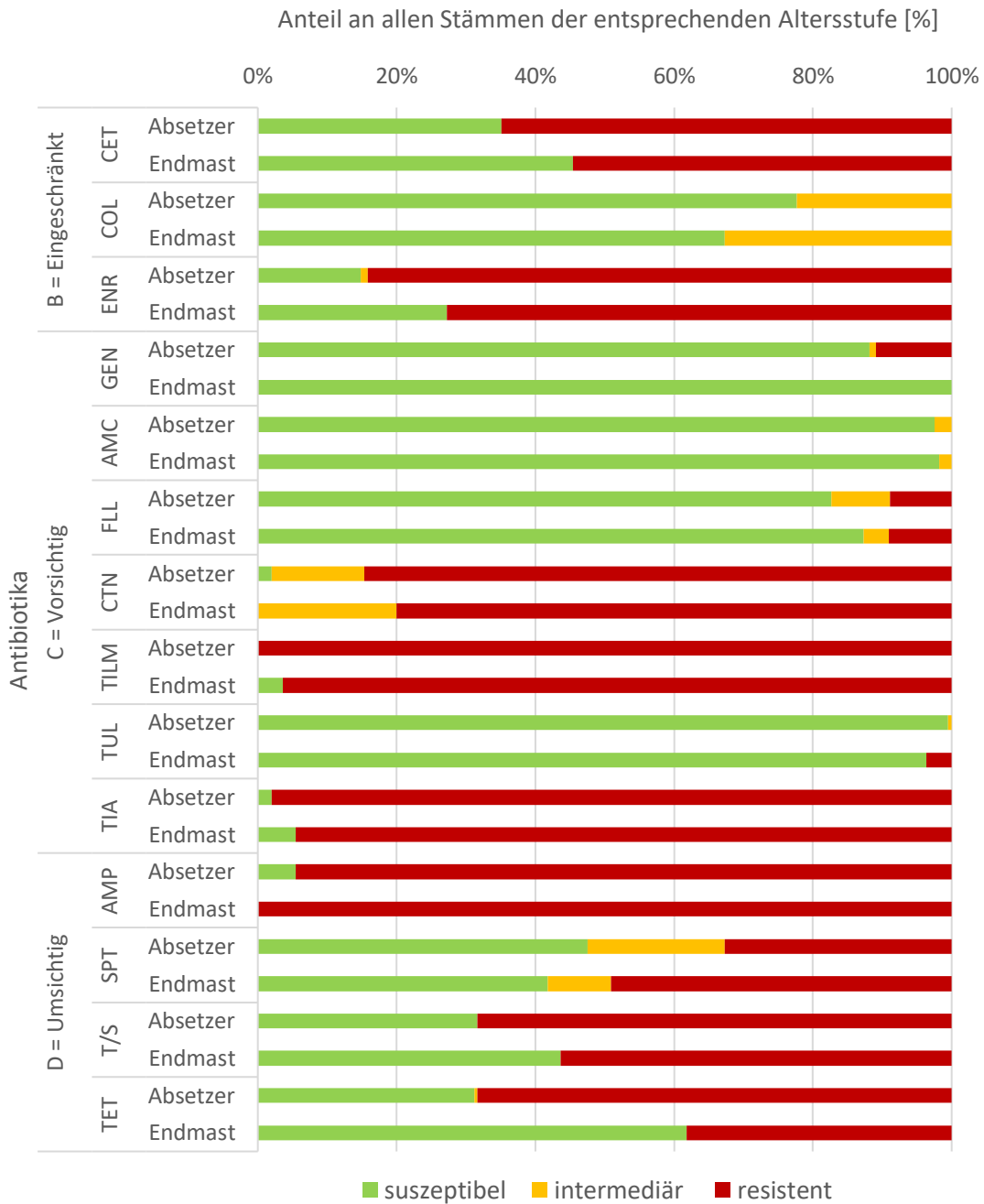


Abb. 44: Vergleich des Anteils suszeptibler, intermediärer und resistenter *E. coli*-Stämme zwischen Absetzer- und Endmastproben pro Antibiotikum
Einteilung der Antibiotika siehe Abb. 42; Abkürzungen siehe Abb. 43.

Sieht man sich die Verteilung der resistenten Stämme auch für die anderen Altersstufen (Läufer, Vormast und Mittelmast) an, wird deutlich, dass es zum Teil große Unterschiede in der Prozentzahl resistenter Stämme pro AB und Altersstufe gab (Abb. 45). So verlief die zuvor beschriebene Ab- oder Zunahme resistenter Bakterien mit steigendem Alter der beprobten Schweine bei einigen AB nicht immer linear. Bei Ceftiofur sowie Gentamicin und Tetrazyklin nahm der Anteil resistenter *E. coli*-Stämme

zwar insgesamt ab, der höchste Anteil an jeweils resistenten Stämmen wurde aber in den Vormastproben detektiert (Ceftiofur: 76 %; Gentamicin: 18 %; Tetrazyklin: 73 %). Bei Gentamicin sank der Anteil resistenter Stämme anschließend von der Mittelmast (14 %) zur Endmast auf 0%. Und auch bei Tetrazyklin kam es von der Vor- zur Mittelmast zu einer starken Abnahme des Anteils resistenter Stämme um mehr als 20 Prozentpunkte (Mittelmast: 52 %). Obwohl bei Enrofloxacin und Cotrimoxazol der Anteil resistenter *E. coli* aus den Absetzerproben gegenüber dem der Endmastproben abnahm, war dieser Anteil bei den dazwischenliegenden Beprobungszeitpunkten teils noch geringer als in der Endmast. Der Anteil an *E. coli*-Stämmen mit Resistenz gegenüber Enrofloxacin war z. B. bei den Läufer-schweinen am niedrigsten (57 %). Bei Florfenicol war der Anteil resistenter *E. coli* aus den Absetzerproben und den Endmastproben annähernd gleich. Bei den dazwischenliegenden Altersstufen aber schwankte dieser Wert um das zehnfache (Läufer: 21 %; Mittelmast: 2,0 %). Tulathromycin-resistente Stämme wurden in den Läufer-, Vormast- und Endmastproben detektiert, während in den Absetzer- und Mittelmastproben nur einige Stämme mit intermediärem Phänotyp auftraten.

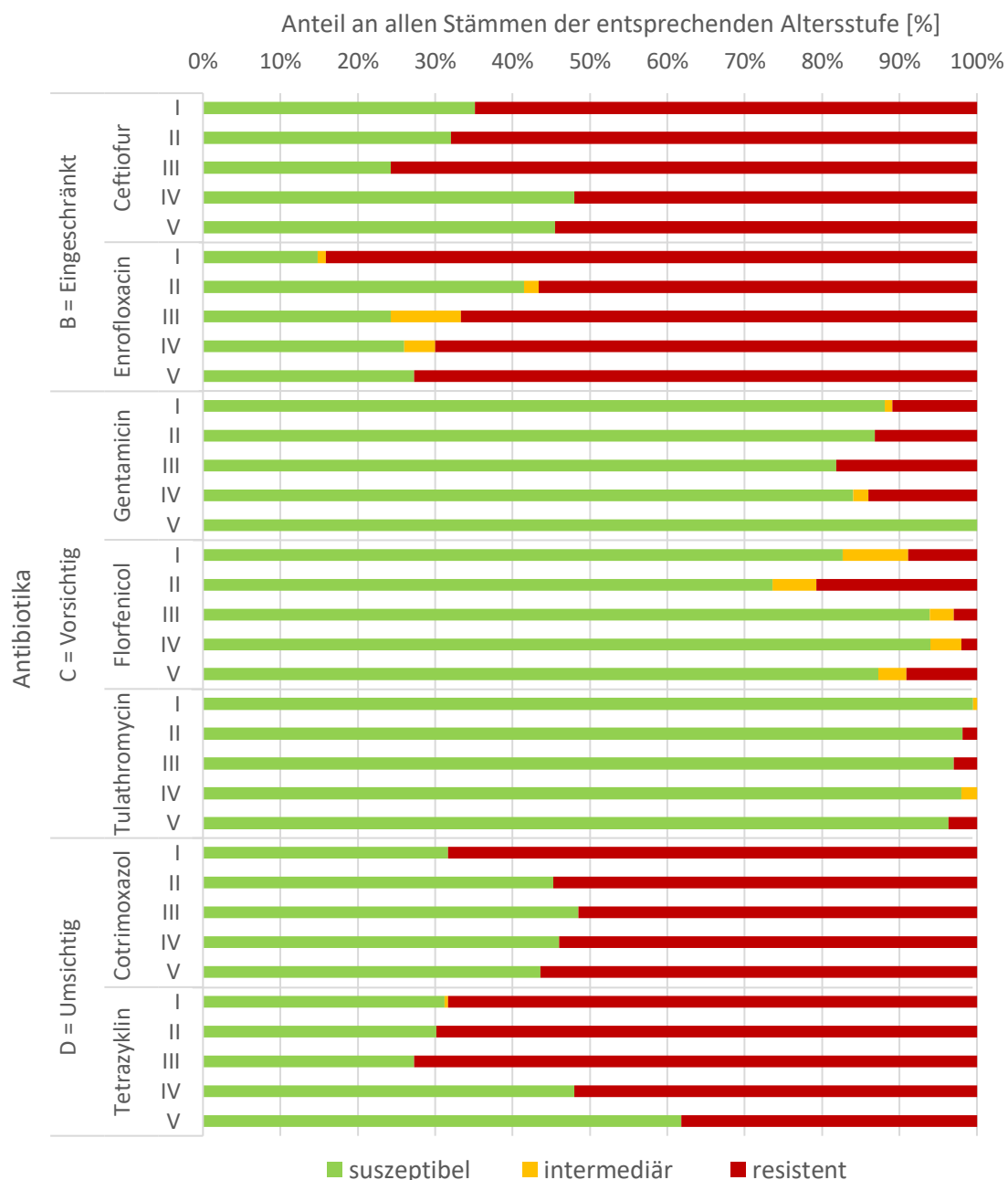


Abb. 45: Entwicklung des Anteils suszeptibler Stämme über die Lebensspanne der beprobten Tiere für ausgewählte Antibiotika
 Einteilung der Antibiotika siehe Abb. 42; I = Absetzer; II = Läufer; III = Vormast; IV = Mittelmast; V = Endmast.

Vergleicht man die Resistenzprävalenzen im Absetzeralter mit und ohne Berücksichtigung der Stämme von Betrieb K1, so variierten diese für einzelne AB deutlich (Abb. 46). Der Anteil an *E. coli* mit Resistenz gegenüber Cotrimoxazol lag im Durchschnitt der Betriebe B1, B2 und K2 im Absetzeralter bei 45 %, während er im Durchschnitt aller Betriebe bei 68 % lag. Auch der Anteil Enrofloxacin-resistenter Stämmen war unter Einbeziehung der Stämme von Betrieb K1 deutlich höher (ohne K1: 72 %; mit K1: 84 %).

Der Anteil an *E. coli* mit Resistenz gegenüber Gentamicin und Ceftiofur hingegen verringerte sich, wenn man die Stämme von Betrieb K1 beim Resistenz-Profil der Absetzerproben berücksichtigt (ohne K1: Gentamicin 19 % und Ceftiofur 75 %; mit K1: Gentamicin 11 % und Ceftiofur 65 %). Auch der Anteil Florfenicol-resistenter Stämme nahm unter Einbeziehung der K1-Stämme um 36 % ab (ohne K1: 14 %; mit K1: 8,9 %).

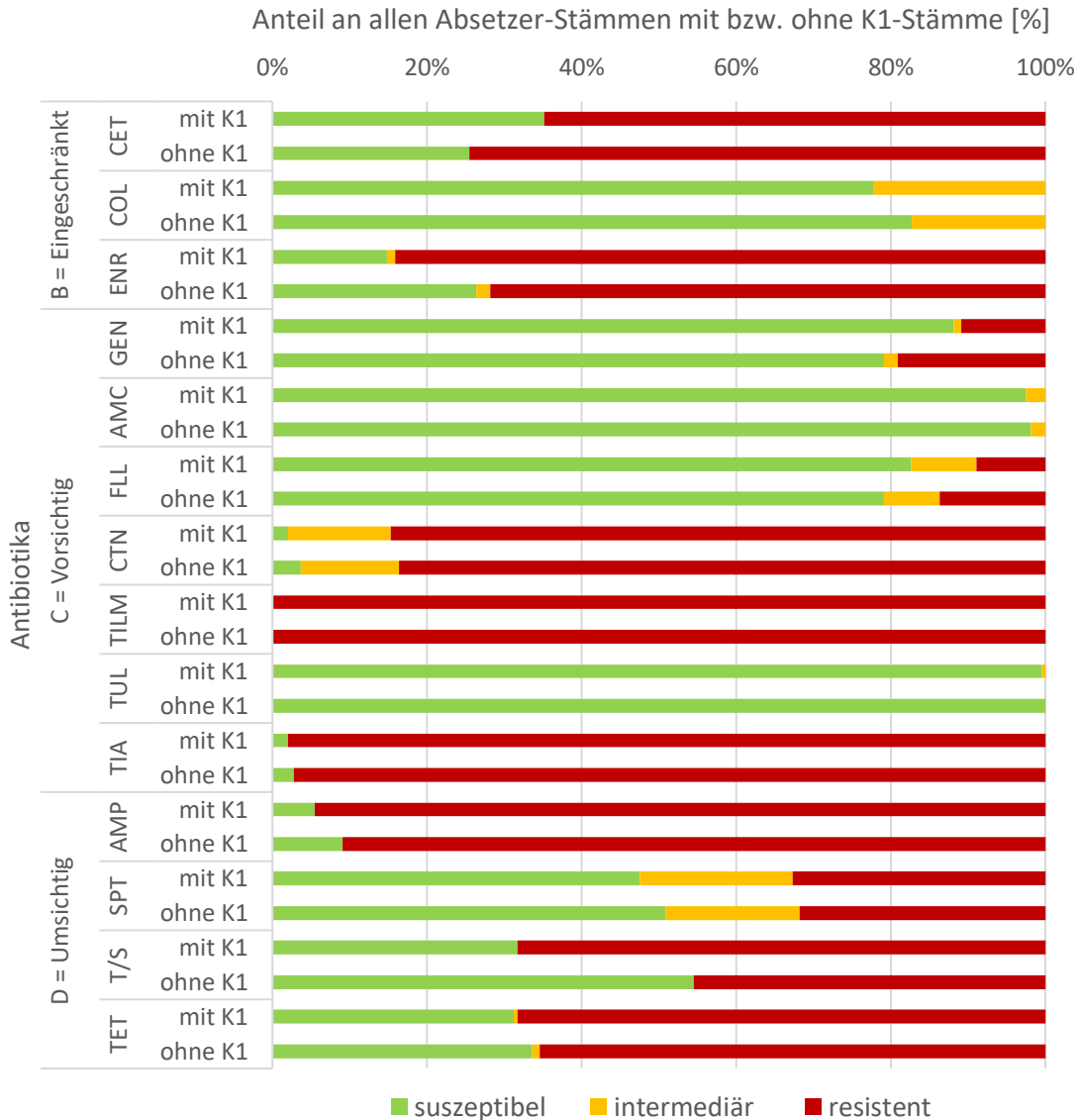


Abb. 46: Vergleich des Anteils suszeptibler, intermediärer und resistenter Stämme in den Absetzerproben unter Einbeziehung und unter Ausschluss der Stämme von Betrieb K1

Einteilung der Antibiotika siehe Abb. 42; Abkürzungen siehe Abb. 43.

4.6.4.4 Vergleich der Resistenzsituation auf den Betrieben

Um die Resistenzsituation der Betriebe vergleichen zu können, wurden alle Stämme eines Betriebs zu einem Gesamt-Resistenz-Profil dieses Betriebs zusammengefasst (Abb. 47 – Abb. 49).

So waren aus den Betrieben B1, K1 und K2 circa zwei Drittel der *E. coli*-Stämme resistent gegenüber Tetrazyklin (B1 66 %; K1 72 %; K2 63 % – Abb. 47), während dies aus Betrieb B2 nur circa ein Drittel der Stämme waren (38 %). Bei der Resistenz gegenüber Cotrimoxazol stach Betrieb K1 heraus, dessen *E. coli*-Stämme fast alle diese Resistenz aufwiesen (96 %), während von den Stämmen der Betriebe B1, B2 und K2 nur circa die Hälfte der Stämme Cotrimoxazol-resistent waren (B1 und B2 jeweils 48 %; K2 55 %).

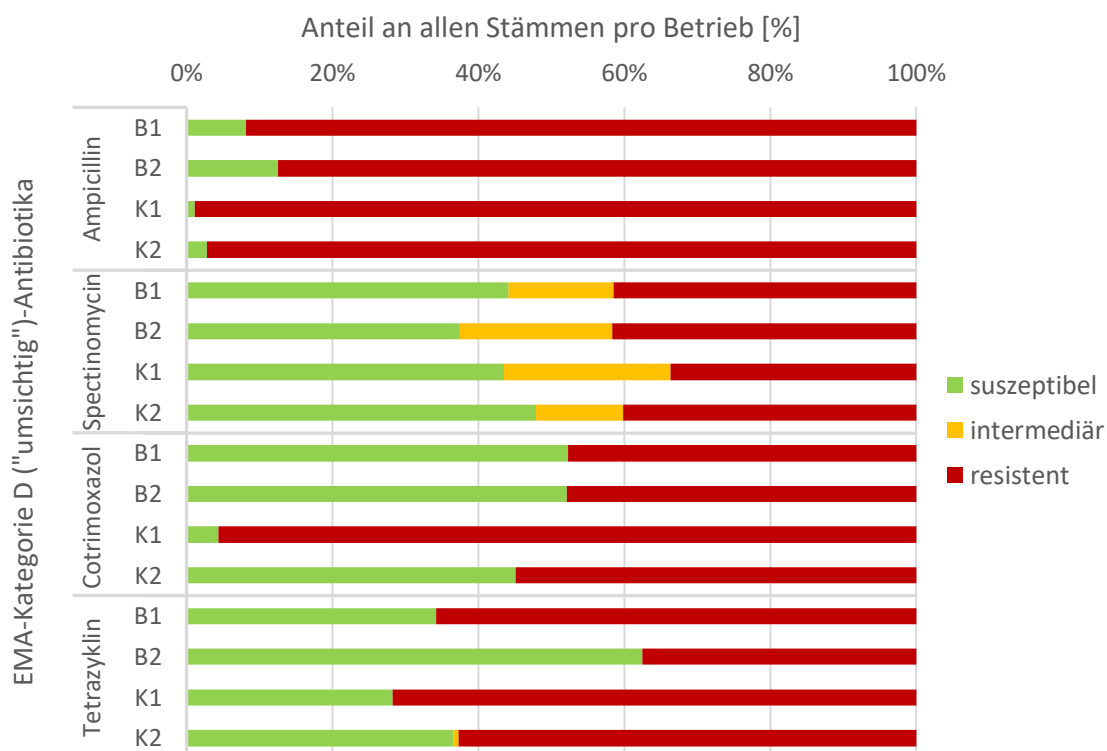


Abb. 47: Anteil suszeptibler, intermediärer und resistenter Stämme pro EMA-Kategorie D-Antibiotikum für jeden Betrieb

Der Anteil an Bakterien mit Resistenz gegenüber Tiamulin und Tilmicosin war auf allen Betrieben hoch (Abb. 48). K2 zeigte den größten Anteil gegenüber Cefalotin resistenter Stämme (94 %). Allerdings wurden aus diesem Betrieb, genauso wie aus dem Betrieb B1, auch einige wenige suszeptible Stämme isoliert. Aus Betrieb B1 waren somit fast alle Stämme resistent (70 %) oder intermediär (29 %) gegenüber Cefalotin. Dies trifft auch auf Betrieb K1 zu, aus dem allerdings keine Cefalotin-suszeptiblen *E. coli* isoliert worden waren. Dafür war hier der Anteil der Cefalotin-resistenten Stämme um 16 Prozentpunkte höher (86 %) als bei Betrieb B1. Betrieb B2 zeigte zusätzlich zum größten Anteil suszeptibler Stämme (15 %) auch den niedrigsten Anteil Cefalotin-resistenter Stämme (60 %). Betrachtet man den Anteil Gentamicin-resistenter Stämme, so lag er auf den Betrieben B2 und K2 bei circa einem Fünftel der Stämme (B2: 23 %; K2: 20 %),

während er auf den Betrieben B1 und K1 nur bei ungefähr 1 % lag. Der Anteil Florfenicol-resistenter Stämme war auf Betrieb K1 am niedrigsten (3,3 %) und auf Betrieb K2 am größten (13 %). Auf den Bio-Betrieben lag der Anteil dieser Stämme bei circa 10 %. Dafür war bei den aus Betrieb B2 isolierten Stämmen der Anteil mit intermediärem Phänotyp gegenüber Florfenicol (8,3 %) zehnfach so groß wie bei den Stämmen aus Betrieb B1 (0,90 %). Der Anteil Tulathromycin- bzw Amoxicillin-Clavulansäure-resistenter *E. coli* war auf allen Betrieben sehr niedrig oder nicht existent.



Abb. 48: Anteil suszeptibler, intermediärer und resistenter Stämme pro EMA-Kategorie C-Antibiotikum für jeden Betrieb

Amoxicillin-Clav. = Amoxicillin-Clavulansäure.

Auch bei der Resistenz gegenüber Enrofloxacin und Ceftiofur zeigten sich große Unterschiede zwischen den Betrieben (Abb. 49). Bezüglich Enrofloxacin wurden die meisten resistenten Bakterien aus K1 isoliert (99 %). Aus Betrieb K2 waren circa drei Viertel der isolierten Stämme Enrofloxacin-resistent (75 %), bei den Bio-Betrieben jeweils nur etwa zwei Drittel der Stämme (B1: 62 %; B2: 65 %). Mit wachsendem Anteil an Enrofloxacin-resistenten Bakterien stieg auf den Betrieben B1, B2 und K2 dabei auch der Anteil an Stämmen mit intermediärem Phänotyp. Bei Ceftiofur hingegen wurde der größte Anteil resistenter Bakterien auf Betrieb K2 isoliert (90 %), während auf allen anderen Betrieben nur ungefähr die Hälfte der Stämme Ceftiofur-resistent waren (B1: 44 %; B2: 46 %; K1: 53 %). Gegenüber Colistin wurden lediglich Stämme mit intermediärem Phänotyp isoliert, die nie mehr als ein Drittel der Stämme pro Betrieb ausmachten.

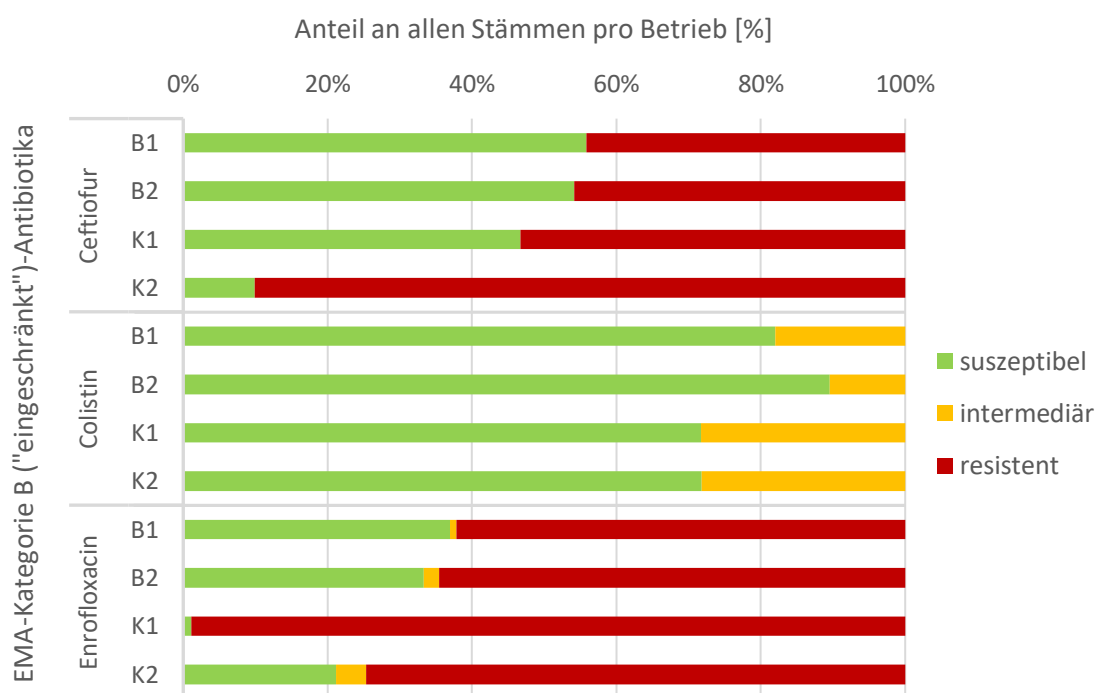


Abb. 49: Anteil suszeptibler, intermediärer und resistenter Stämme pro EMA-Kategorie B-Antibiotikum für jeden Betrieb

Insgesamt wurden damit Gentamicin- und Spectinomycin-resistente *E. coli*-Stämme am häufigsten auf Betrieb B2 isoliert. Für die restlichen AB wies Betrieb B2 fast immer den niedrigsten Anteil resistenter Bakterien auf, während der Anteil resistenter Bakterien auf den konventionellen Betrieben oft am höchsten war. Der Anteil resistenter Stämme pro AB von Betrieb B1 lag im Vergleich der Betriebe häufig im mittleren Wertebereich. Die metrische multidimensionale Skalierung, bei der alle MHK-Werte eines Stammes zu einem Resistenz-Profil zusammengefasst werden und dieses als Datenpunkt in ein

Koordinatensystem eingetragen wird (Abb. 50), zeigt in diesem Zusammenhang sehr deutlich, dass die Stämme der Betriebe K1 und K2 jeweils näher beieinander liegen, während sich die Stämme der Bio-Betriebe weiter über das Datenfeld verteilen.

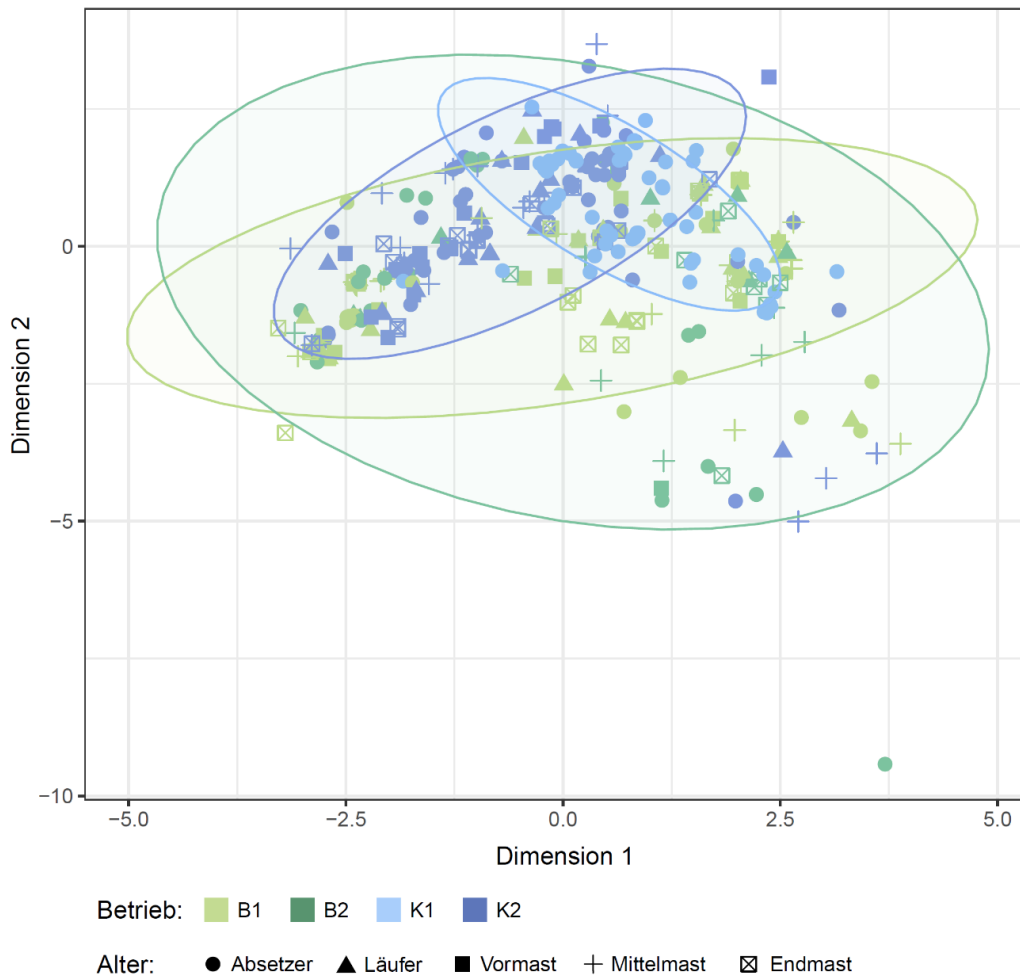


Abb. 50: Metrische multidimensionale Skalierung der phänotypischen Antibiotikaresistenzprofile aller 393 *E. coli*-Stämme

Skalierung mit R Funktion `cmdscale` berechnet; Variablen um Mittelwert bereinigt und mittels Standardabweichung skaliert; Gruppierung von Stämmen gemäß Klassifizierungsmuster als resistent oder suszeptibel gegenüber den 14 getesteten Antibiotika; Kreise umschließen alle Datenpunkte des jeweiligen Betriebs; Dimension 1 und 2 = Achsen der größten Varianz (17 %).

4.6.4.5 Multiresistenz

Alle 393 *E. coli*-Stämme wiesen laut klinischem Grenzwert eine phänotypische Resistenz gegenüber drei oder mehr AB-Klassen entsprechend der WHO-Klassifizierung in *important*, *critically important* sowie *highly critically important* Wirkstoffe auf und waren damit als multiresistent (*multidrug resistant*; MDR) zu bewerten (Magiorakos *et al.* 2012). Zur besseren Differenzierung wurden die Stämme nach der Anzahl an AB-Klassen, gegenüber denen sie resistent waren, eingeteilt (3MDR bis 10MDR – Abb. 51).

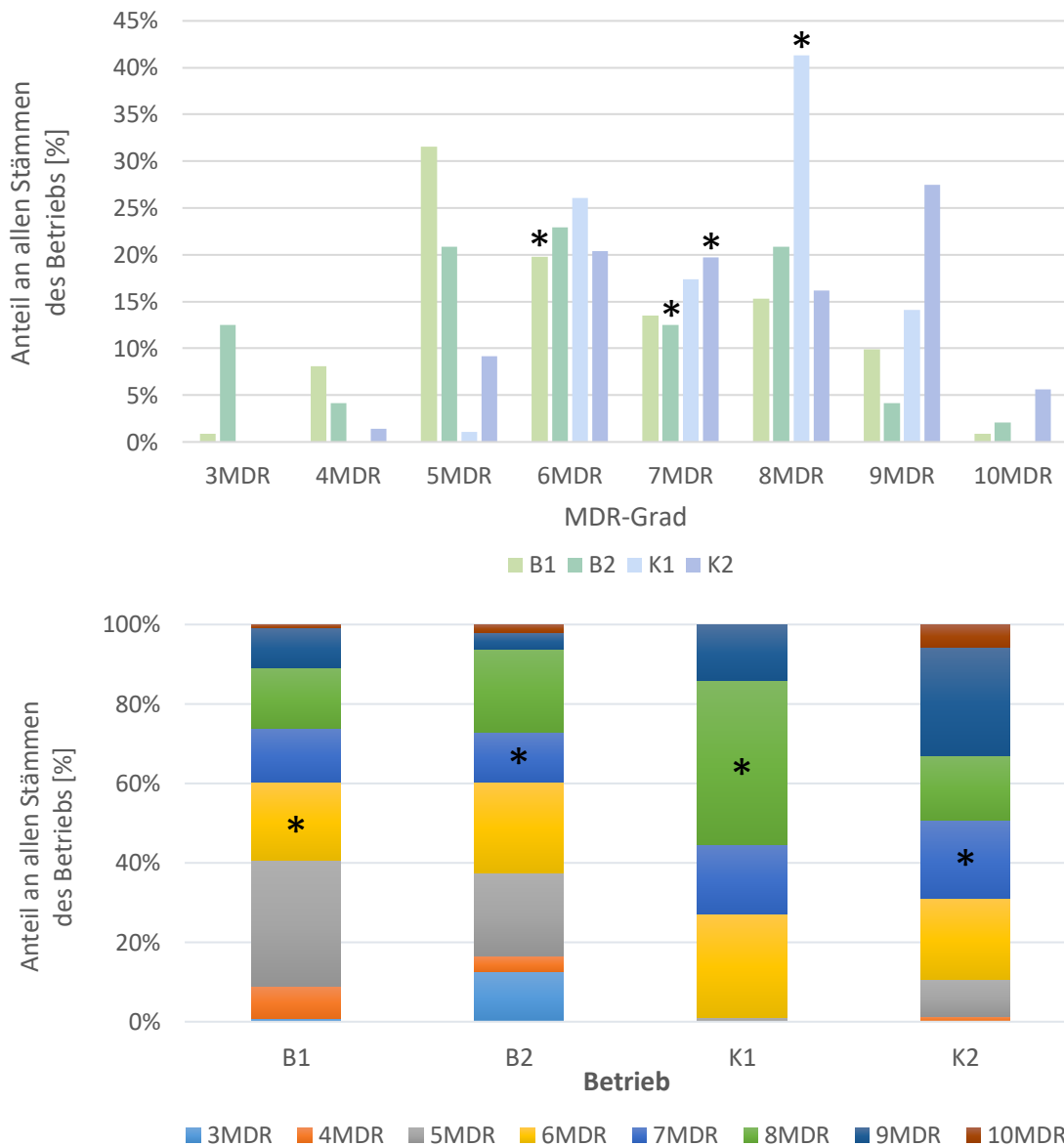


Abb. 51: Anteil an Stämmen pro MDR-Grad für jeden Betrieb als gruppierte Säulen (oben) und als gestapelte Säulen (unten)

MDR = multiresistent; * = MDR-Median des jeweiligen Betriebs, ermittelt aus den Resistenz-Profilen aller aus diesem Betrieb isolierten Stämme.

Die Einteilung in die Multiresistenz-Grade unterschied sich stark zwischen den Betrieben (Abb. 51). Den geringsten Grad an Multiresistenz wiesen einige Stämme aus den

Bio-Betrieben auf, die lediglich gegenüber drei AB-Klassen resistent waren. In diesen Betrieben und in Betrieb K2 fanden sich allerdings auch Stämme, die gegenüber zehn verschiedenen AB-Klassen resistent waren. Die Stämme aus Betrieb K1 wiesen Resistenzen gegenüber fünf bis neun verschiedenen AB-Klassen auf. Unterteilt man die Stämme in 3MDR – 6MDR und in 7MDR – 10MDR, sind die Stämme der Bio-Betriebe zu circa zwei Dritteln (60 %) der unteren Kategorie zuzurechnen, die Stämme der konventionellen Betriebe dagegen zu weniger als einem Drittel (K1: 27 %; K2: 31 %).

Die durchschnittliche Multiresistenz aller *E. coli*-Stämme eines Betriebs unterschied sich dagegen nur in geringem Maß. Sie war bei Betrieb B1 am niedrigsten und bei Betrieb K2 am höchsten (Tabelle 31).

Tabelle 31: Mediane und durchschnittliche Multiresistenz aller Stämme pro Betrieb

Betrieb	B1	B2	K1	K2
MDR¹-Median	6	7	8	7
MDR-Mittelwert	6,3	6,6	7,4	7,5

¹MDR = multiresistent.

Zwischen den Altersstufen waren die Unterschiede noch weniger ausgeprägt als beim Vergleich der Betriebe. Der Anteil einzelner MDR-Grade an der Gesamtverteilung pro Altersstufe schwankte allerdings stark (Abb. 52).

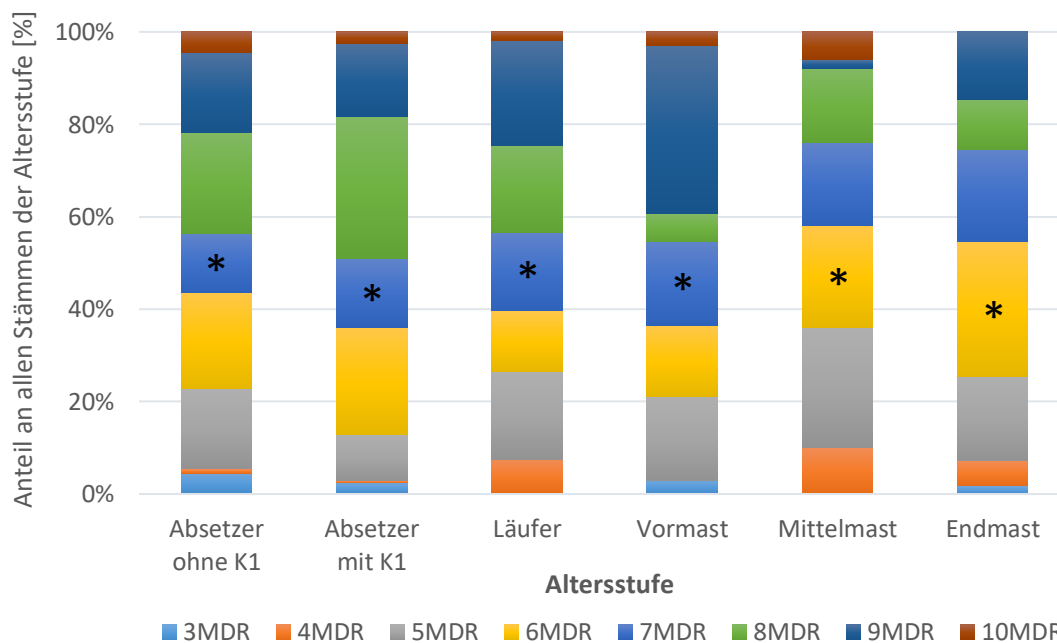


Abb. 52: Anteil an Stämmen pro MDR-Grad für jede Altersstufe

MDR = multiresistent; * = MDR-Median der jeweiligen Altersstufe, ermittelt aus Resistenz-Profilen aller bei dieser Altersstufe isolierten Stämme.

Der Anteil an vielfach-resistenten Stämmen (7MDR – 10MDR) machte vom Absetzeralter bis zur Vormast fast zwei Drittel aller Stämme der entsprechenden Altersstufe aus (Absetzerproben mit K1: 64 %; Absetzerproben ohne K1: 56 %; Läuferproben: 60 %; Vormastproben: 64 %), bei den Mittel- und Endmastproben hingegen weniger als die Hälfte (Mittelmastproben: 42 %; Endmastproben: 45 %; siehe auch Tabelle 32). Die Endmast war die einzige Altersstufe, bei der keine 10MDR-Stämme gefunden wurden.

Tabelle 32: Mediane und durchschnittliche Multiresistenz aller Stämme pro Altersstufe

Altersstufe	Absetzer ohne K1	Absetzer mit K1	Läufer	Vormast	Mittelmast	Endmast
MDR¹-Median	7	7	7	7	6	6
MDR-Mittelwert	6,9	7,2	7,0	7,2	6,3	6,5

¹MDR = multiresistent.

4.6.4.6 Suszeptible oder intermediäre Nicht-Wildtyp-Stämme

Bei der Interpretation der MHK-Werte nach ECOFF-Kriterien und klinischen Grenzwerten wurden einige Stämme als suszeptibel oder intermediär gegenüber einem AB eingestuft, für das sie gleichzeitig als Teil der Nicht-Wildtyp-Population klassifiziert wurden (n = 75 Stämme). Suszeptible oder intermediäre Nicht-Wildtyp-Stämme traten bei fünf AB auf: Enrofloxacin (n = 45), Cotrimoxazol (n = 17), Amoxicillin-Clavulansäure (n = 8), Gentamicin (n = 4) und Ceftiofur (n = 1). Fast die Hälfte dieser Stämme wurde aus Betrieb K2 (45 %) isoliert, 39 % aus Betrieb B1, 9,3 % aus B2 und lediglich 6,7 % dieser Stämme aus Betrieb K1. Am häufigsten trat das Phänomen bei Stämmen von Absetzerferkeln auf (52 % der suszeptiblen oder intermediären Nicht-Wildtyp-Stämme; siehe auch Abb. 53). Mit zunehmendem Alter wurden suszeptible oder intermediäre Nicht-Wildtyp-Stämme hingegen seltener isoliert (Endmast: 9,3 % dieser Stämme). Die entsprechenden Endmast-Stämme wurden alle aus Betrieb K2 isoliert.

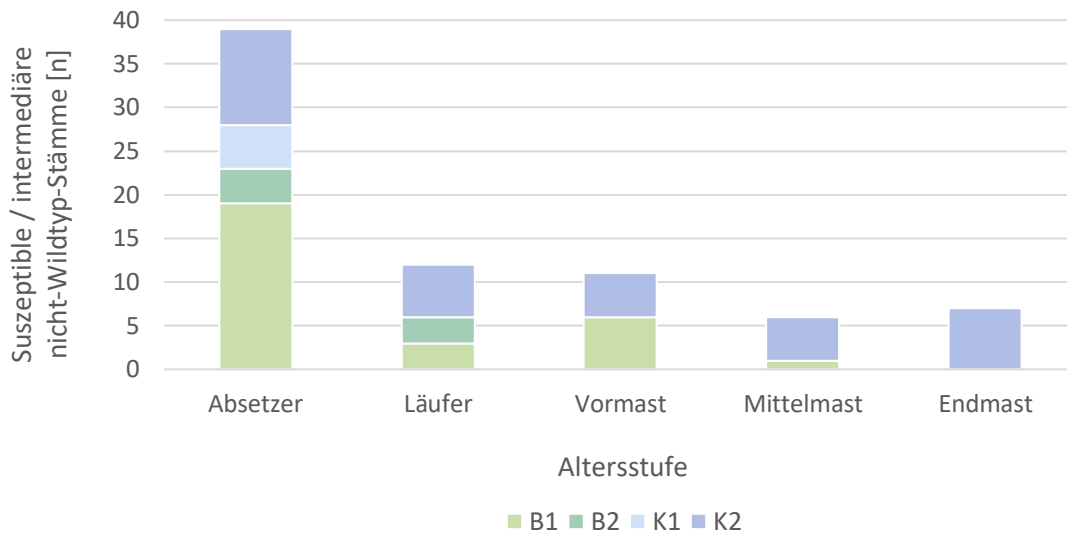


Abb. 53: Anzahl susceptibler oder intermediärer Nicht-Wildtyp-Stämme

Gegenüber Amoxicillin-Clavulansäure wurden die entsprechenden Stämme alle als intermediär eingestuft (MHK-Wert = 16/8 µg/ml), während bei Ceftiofur und Cotrimoxazol alle entsprechenden Stämme susceptibel waren. Bei Enrofloxacin und Gentamicin gab es sowohl susceptible als auch intermediäre Stämme.

4.6.4.7 Vergleich der Resistenz-Profile von Cephalosporin- und Fluorchinolon-resistenten *E. coli*-Stämmen

Die Prävalenz von Resistenzen gegenüber den β-Laktam-AB Cefalotin und Ampicillin war bei Stämmen mit CSR höher als bei FQRE (Abb. 54). Auch die Gentamicin-Resistenz war stärker mit CSR assoziiert, trat allerdings insgesamt häufiger bei Stämmen mit Doppelresistenz (FQR und CSR) auf. Dagegen korrelierte vor allem die Resistenz gegenüber Cotrimoxazol mit der Resistenz gegenüber Enrofloxacin. Auch die Spectinomycin-Resistenz trat bei FQRE häufiger auf und zeigte sogar die höchste Prävalenz in FQR Stämmen, die nicht gleichzeitig CSR waren. Es scheint also eine negative Korrelation zwischen der Resistenz gegenüber CS3/4 und der gegenüber Spectinomycin zu geben. Zudem gab es Antibiotikaresistenzen, die mit keinem der beiden zur Stammselektion genutzten AB korrelierten, sondern vermehrt in Stämmen mit Doppelresistenz auftraten. Dies traf vor allem auf die Resistenz gegenüber Tetrazyklin zu, war aber auch bei der Florfenicol-Resistenz zu sehen, letztere mit schwacher Tendenz zur Assoziation mit FQR. Für Colistin, Amoxicillin-Clavulansäure, Tiamulin und die Makrolid-AB Tilmicosin und Tulathromycin gab es keine deutlichen Unterschiede in der Resistenzprävalenz zwischen FQRE und CSRE.

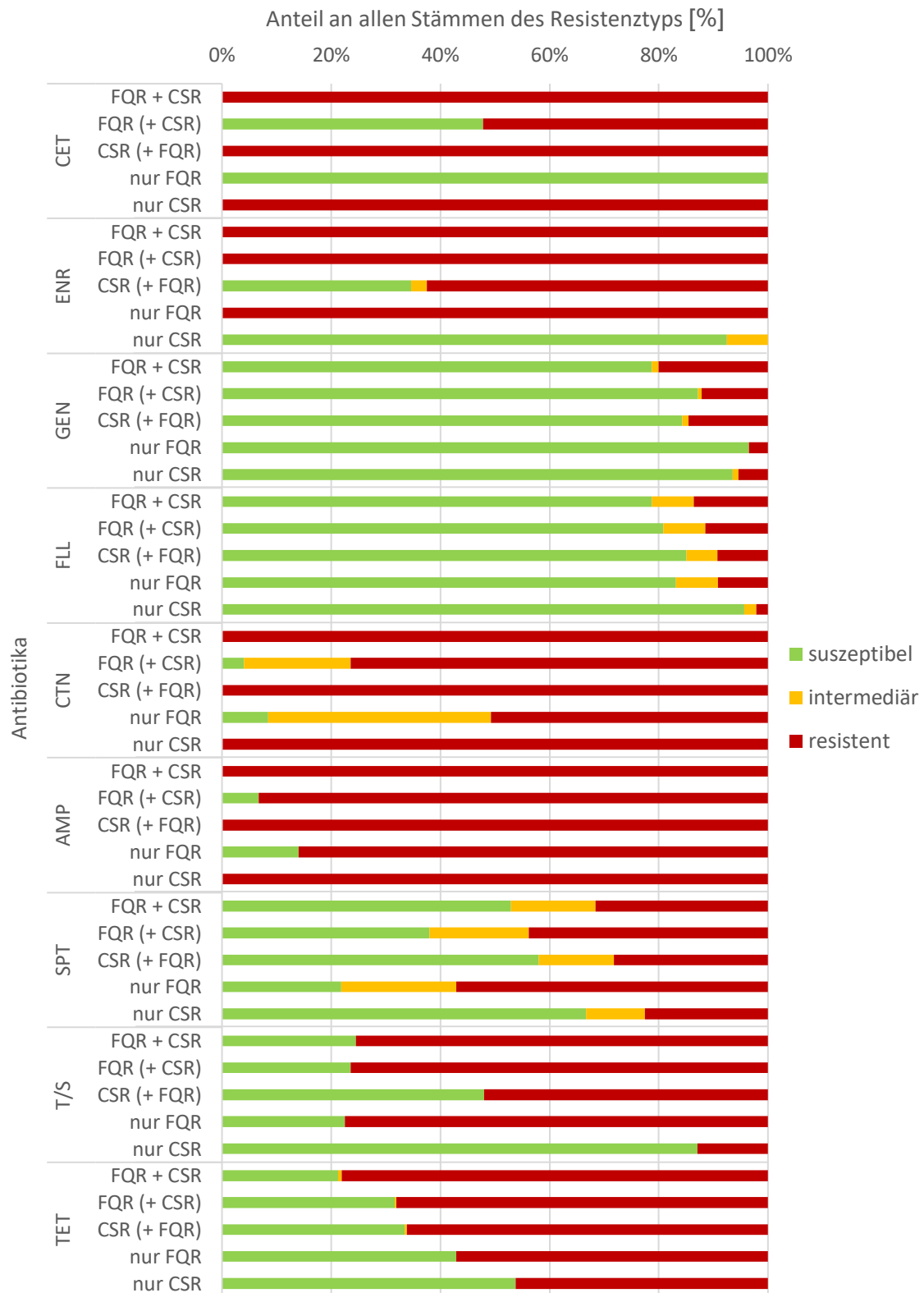


Abb. 54: Anteil resistenter Stämme an allen Stämmen mit FQ- bzw. CS-Resistenz bzw. mit Resistenz gegenüber beiden Antibiotika-Klassen

CSR = Cephalosporin (CS)-resistent; FQR = Fluorchinolon (FQ)-resistent; FQR (+ CSR) = Alle FQR Stämme, von denen einige zusätzlich CSR sind; CSR (+ FQR) = Alle CSR Stämme, von denen einige zusätzlich FQR sind; FQR + CSR = Stämme mit Resistenz gegenüber CS und FQ; Abkürzungen der Antibiotika siehe Abb. 43.

CSRE, die nicht FQR waren (nur CSR), wiesen die wenigsten zusätzlichen Resistenzen gegenüber weiteren AB-Klassen auf (Abb. 55). Der mediane MDR-Grad der FQRE ohne CSR (nur FQR) lag ebenfalls bei sechs AB-Klassen (siehe auch Tabelle 33), obwohl sie mehr 7MDR- und 8MDR-Stämme aufwiesen als die Stämme, die nur CSR waren. Betrachtet man jedoch alle FQRE, also auch solche, die zusätzlich CSR waren (FQR (+CSR)), lag der Median bei der Resistenz gegenüber acht AB-Klassen. Die MDR-Grad-Aufteilung aller FQRE ähnelte der aller CSRE (CSR (+FQR)). Die meisten Resistenzen gegenüber weiteren AB-Klassen zeigten Stämme, die FQ- und CS-resistent waren (FQR + CSR).

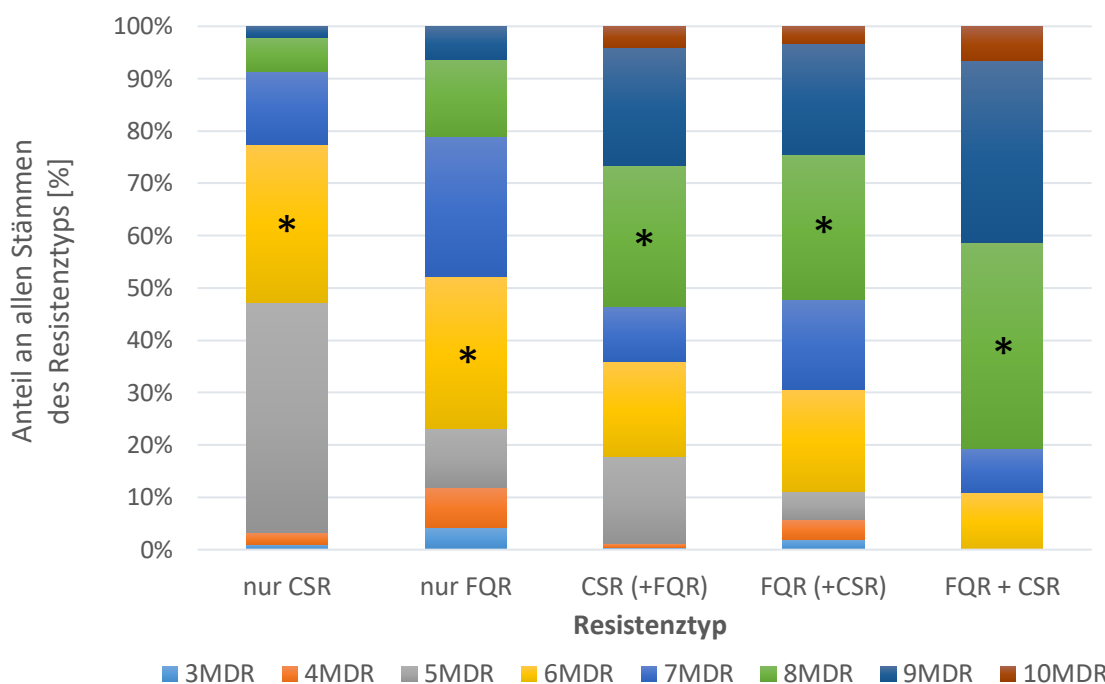


Abb. 55: Anteil an Stämmen pro MDR-Grad für die verschiedenen Fluorchinolon- bzw. Cephalosporin-Resistenztypen

MDR = multiresistent; weitere Abkürzungen siehe Abb. 54;
 * = MDR-Median des jeweiligen Resistenz-Typs, ermittelt aus den Resistenz-Profilen aller entsprechenden Stämme.

Die MDR-Mittelwerte waren bei den Stämmen mit Doppelresistenz am höchsten, bei den FQRE bzw. CSRE um circa eine AB-Klasse verringert und bei den nur-CSR-Stämmen am niedrigsten (Tabelle 33).

Tabelle 33: Mediane und durchschnittliche Multiresistenz aller Fluorchinolon- bzw. Cephalosporin-Resistenztypen

Resistenz	nur CSR ¹	nur FQR ²	CSR (+FQR)	FQR (+CSR)	FQR + CSR
MDR³-Median	6	6	8	8	8
MDR-Mittelwert	5,8	6,4	7,3	7,3	8,2

¹CSR = Cephalosporin (CS)-resistent; ²FQR = Fluorchinolon (FQ)-resistent – siehe auch Abb. 54;

³MDR = multiresistent.

4.6.5 Genetischer Hintergrund der Resistenzen gegenüber Fluorchinolonen sowie Cephalosporinen der dritten und vierten Generation

4.6.5.1 Resistenz gegenüber Fluorchinolonen

Chromosomal-kodierte Fluorchinololon-Resistenzmutationen

Für 10 der 297 *E. coli*-Stämme, die einen Enrofloxacin-MHK-Wert oberhalb des klinischen Grenzwertes zeigten ($\geq 1 \mu\text{g/ml}$), wurden mittels PCR und Teilgenomsequenzierung exemplarisch Mutationen in der QRDR nachgewiesen. Bei drei dieser Stämme wurde zudem auf dieselbe Weise das Vorhandensein einer veränderten Nukleotidsequenz in einem weiteren QRDR-Gen (*parE*) und den Genen *acrR* bzw. *marR* überprüft (Tabelle 34). So wurden die aus der Literatur bekannten FQR-vermittelnden Mutationen der jeweiligen Gene detektiert.

Tabelle 34: FQR-vermittelnde Mutationen – exemplarisch nachgewiesen

Es sind nur Mutationen gelistet, die detektiert werden konnten.

Gen	<i>quinolone resistance determining region</i> ¹				
	<i>gyrA</i>		<i>parC</i>		<i>parE</i>
AS ² -Austausch	S83L/F	D87N/G	A56T	S80R/I	S458A/T
Stämme [n] ³ von 10	10	10	3	10	3

¹QRDR = Region, in der Mutationen zur Resistenz gegenüber Fluorchinolonen (FQR) führen können;

²AS = Aminosäure;

³Stämme, bei denen die beschriebene Mutation detektiert wurde.

Vornehmlich Plasmid-kodierte Fluorchinololon-Resistenzgene

Da FQR-*enabler*-Gene die Entwicklung einer klinischen FQR begünstigen, diese aber meist nur vermitteln, wenn sie gemeinsam mit Mutationen in der QRDR auftreten, wurde die Präsenz von *enabler*-Genen in allen 393 Stämme untersucht. Dazu zählen auch diejenigen *E. coli*-Stämme, die keinen resistenten Enrofloxacin-MHK-Wert aufwiesen (MHK < 1 $\mu\text{g/ml}$). So sollten Informationen zur Häufigkeit des Auftretens von *enabler*-Genen sowie zu deren Auswirkung auf den Enrofloxacin-MHK-Wert gewonnen werden.

FQR-*enabler*-Gene in der Gesamtpopulation – Alle *E. coli*-Stämme wurden in einer *qnr*-Multiplex-PCR getestet, die *qnrA*, *qnrD*, *qnrS* und *qnrB* detektiert. So wurden 148 der 393 *E. coli*-Stämme (38 %) als *qnrS*-positiv identifiziert. Stämme, die in der Multiplex-PCR schwach positiv für *qnrB* waren, wurden anschließend in einer Simplex-PCR für dieses Gen nachgetestet. Unter den 393 Stämmen wurden sieben *qnrB*-positive (1,8 %) detektiert. Drei dieser Stämme trugen gleichzeitig auch *qnrS* (0,76 %). Stämme, die positiv für *qnrA* oder *qnrD* waren, wurden nicht detektiert. Zusätzlich wurden die

Gene *aac(6′)-Ib-cr*, *oqxAb* und *qepA* mittels PMQR2-Triplex-PCR in allen isolierten *E. coli*-Stämmen gesucht und 48 der 393 Stämme (12 %) als positiv für *aac(6′)-Ib-cr* identifiziert. Keiner dieser Stämme enthielt zusätzlich ein *qnr* Gen. Träger der Gene *oqxAb* oder *qepA* wurden nicht identifiziert.

FQR-enabler-Gene in FQR *E. coli* – Betrachtet man nur die 297 Enrofloxacin-resistenten Stämme, so war die Hälfte (n = 152; 51 %) Träger eines FQR-enablers. Einhundert FQRE (34 %) waren positiv für *qnrS* und sieben für *qnrB* (2,4 %). Zudem waren 48 FQRE (16 %) positiv für *aac(6′)-Ib-cr*. Damit waren alle Träger von *aac(6′)-Ib-cr* oder *qnrB* Enrofloxacin-resistent, während nur 100 der 148 *qnrS*-Träger (68 %) einen Enrofloxacin-MHK-Wert ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$ aufwiesen (Tabelle 35).

FQR-enabler-Gene in nicht-FQR *E. coli* – Von den 96 Stämmen, die nicht als FQ-resistent identifiziert worden waren, war ebenfalls die Hälfte (n = 48) Träger eines enablers. Diese Stämme waren positiv für *qnrS* und wiesen Enrofloxacin-MHK-Werte im suszeptiblen oder intermediären Bereich auf (Tabelle 35).

Tabelle 35: Enrofloxacin-MHK-Werte aller Stämme mit einem FQR-enabler-Gen

Enro-MHK-Wert ¹	0,03125	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	≥ 2
<i>qnrS</i> -Träger [n]	3	–	–	37	8	19	81
<i>qnrB</i> -Träger [n]	–	–	–	–	–	2	5
<i>aac(6′)-Ib-cr</i> -Träger [n]	–	–	–	–	–	–	48

¹Enro-MHK-Wert = Wert der minimalen Hemmkonzentration von Enrofloxacin in $\mu\text{g/ml}$;
Klinische Grenzwerte (CLSI): Grün = suszeptibel, gelb = intermediär, rot = resistent – siehe 3.8.3;
vertikaler Strich = ECOFF-Grenzwert für *E. coli*.

Sowohl bei FQRE als auch bei nicht-FQRE war demnach die Hälfte der Stämme Träger eines FQR-enabler-Gens. Allerdings waren je nach Enrofloxacin-MHK-Wert andere enabler oder Kombinationen dieser Gene nachweisbar.

Vergleich des Vorkommens von FQR-enablern in den vier Betrieben – Das *qnrS*-Gen wurde in Stämmen aus allen vier Betrieben detektiert. Allerdings war nur circa ein Viertel der Stämme aus den Betrieben B1 und K1 *qnrS*-positiv (B1: 24 %; K1: 28 %), während dies bei den Betrieben B2 und K2 circa die Hälfte war (B2: 46 %; K2: 51 %). *QnrB*-positive Stämme wurden nur aus Betrieb K1 isoliert. Die Aminoacyltransferase *aac(6′)-Ib-cr* wurde nur in Stämmen von konventionellen Betrieben detektiert. Allerdings war nur einer der 142 Stämme von Betrieb K2 (0,70 %) Träger des Gens, während es bei Betrieb K1 47 von 92 Stämmen (51 %) waren.

4.6.5.2 Resistenz gegenüber Cephalosporinen

***bla*_{CTX-M}** – Für alle 248 *E. coli*-Stämme, die mit einem Ceftiofur-MHK-Wert $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ eine Resistenz gegenüber diesem AB zeigten, wurde überprüft, ob sie ein *bla*_{CTX-M-1}⁻ oder *bla*_{CTX-M-15}-Allel tragen (siehe 3.6.2.1). Alle CSRE waren *bla*_{CTX-M}-positiv, wobei 158 der 248 Stämme (64 %) positiv für *bla*_{CTX-M-1} und 90 Stämme (36 %) positiv für *bla*_{CTX-M-15} waren.

***bla*_{TEM}** – In einer PCR, die verschiedene *bla*_{TEM}-Varianten wie *bla*_{TEM-1}, *bla*_{TEM-2} und *bla*_{TEM-3} detektiert, zeigten 228 der 393 Stämme eine positive Reaktion (58 %). Stämme, die Träger von *bla*_{TEM} waren, bei denen aber kein *bla*_{CTX-M} nachgewiesen wurde, hatten im Vergleich zu Stämmen, die über keine dieser β -Laktamase-Gene verfügten, einen höheren durchschnittlichen Amoxicillin-Clavulansäure-MHK-Wert, der jedoch weiterhin im suszeptiblen Bereich lag (Tabelle 36). Zudem vermittelte *bla*_{TEM} eine Resistenz gegenüber Ampicillin. Bei Ceftiofur gab es keinen Unterschied zwischen den beiden β -Laktamase-Profilen, während der Cefalotin-MHK-Wert bei Stämmen mit *bla*_{TEM} eine Log2-Stufe höher lag als bei Stämmen ohne *bla*_{TEM}. So waren *bla*_{TEM}⁻ und *bla*_{CTX-M}⁻ negative Stämme meist intermediär gegenüber Cefalotin, während *bla*_{TEM}-positive Stämme meist resistent waren.

Tabelle 36: Einfluss von *bla*_{TEM} auf den MHK-Wert gegenüber β -Laktam-Antibiotika

β -Laktam-AB ¹	β -Laktamase-Profil	MHK-Wert [$\mu\text{g/ml}$]								
		0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	≥ 32
Amoxi.-Clav. ²	<i>bla</i> _{TEM} -Träger ³ [n]					3	28	28	2	–
	– ⁴ [n]					8	–	1	–	–
Ampicillin	<i>bla</i> _{TEM} -Träger [n]		–	–	1	1	–	–	–	59
	– [n]		–	1	–	5	2	–	–	1
Ceftiofur	<i>bla</i> _{TEM} -Träger [n]	1	2	48	9	1	–	–		
	– [n]	1	2	4	2	–	–	–		
Cefalotin	<i>bla</i> _{TEM} -Träger [n]				–	–	–	1	22	38
	– [n]				–	1	–	2	4	2

¹AB = Antibiotika

²Amoxi.-Clav. = Amoxicillin-Clavulansäure: Zahlenwerte geben nur die Amoxicillin-Konzentration an, die doppelt so hoch wie die jeweilige Clavulansäure-Konzentration ist;

³Stämme, die *bla*_{TEM}-positiv, aber *bla*_{CTX-M}⁻ negativ sind [n = 61].

⁴Stämme, die sowohl *bla*_{TEM} als auch *bla*_{CTX-M}⁻ negativ sind [n = 9].

Details siehe Tabelle 35; graue Felder = nicht gemessene Antibiotika-Konzentrationen; fettgedruckte Buchstaben = Häufigster MHK-Wert pro Antibiotikum und β -Laktamase-Profil.

4.6.5.3 Resistenz gegenüber Cefalotin und Florfenicol

Da für die Auswertung nach ECOFF-Wert gegenüber dem AB Cefalotin nicht alle benötigten Konzentrationen durch die verwendete Micronautplatte abgedeckt worden waren, wurde auf Basis der Resistenzgen-PCRs überprüft, ob sie Träger einer Resistenzdeterminante gegen dieses AB waren (*bla*_{CTX-M} oder *bla*_{TEM}). Von allen Stämmen mit einem Cefalotin-MHK-Wert > 16 µg/ml (n = 320) waren 143 positiv für *bla*_{CTX-M}, 69 waren Träger von *bla*_{TEM} und 106 Stämme waren positiv für beide β-Laktamasen. Diese Stämme (n = 318) wurden daher der Nicht-Wildtyp-Population gegenüber Cefalotin zugeschrieben (siehe auch Abb. 43). Zwei Stämme trugen hingegen keine der beiden β-Laktamasen und wurden zur Wildtyp-Population gezählt.

Auch für Florfenicol war die Auswertung nach ECOFF-Wert anhand der auf der Micronautplatte getesteten AB-Konzentrationen nicht möglich. Daher wurden die Stämme mit einem Florfenicol-MHK-Wert > 8 µg/ml (n = 36) hinsichtlich des Vorkommens der *floR*-Resistenzdeterminante untersucht. Von 36 Stämmen waren 31 (86 %) *floR*-positiv, weshalb sie der Nicht-Wildtyp-Population gegenüber Florfenicol zugeordnet wurden (siehe auch Abb. 43).

4.6.6 Gel-basierte Plasmid-Profile der Cephalosporin- / Fluorchinolon-resistenten *E. coli*-Stämme

Da sich die CS-Resistenz vor allem über horizontalen Gentransfer ausbreitet, wurde für alle 248 CSRE die Präparation und Darstellung ihrer Plasmide durchgeführt. Darüber hinaus wurde stichenprobenartig auch die Plasmid-DNA von 51 FQRE isoliert und dargestellt. Somit wurde ein Gel-basiertes Plasmid-Profil von 299 der 393 Stämme (76 %) erstellt. Von 16 der 393 Stämme ließen sich die großen Plasmide allerdings nicht darstellen, da es stets zu unscharfen Banden bzw. unspezifischem DNase-Verdau kam. Bei elf Stämmen zeigten sich keine Plasmidbanden im Gel. Die maximale Anzahl insgesamt pro Stamm dargestellter Plasmidbanden war hingegen 13. Die maximale Anzahl kleiner Plasmidbanden eines Stammes betrug zehn, die großer Plasmidbanden fünf. Die kleinste dargestellte Plasmidbande lag knapp über der 1 kb-Plasmid-Markerbande (circa 1,2 kb), die größte knapp über der 240 kb Plasmid-Markerbande (circa 280 kb; Beispielbilder siehe Abb. 71 und Abb. 97).

4.7 Analyse der Vollgenomsequenzen

Auf Basis der MLVA-, der Antibiotikaresistenz- sowie der Plasmid-Profile wurden 216 der 393 *E. coli*-Stämme (55 %) zur Vollgenomsequenzierung ausgewählt. Diese waren aus Kotproben von Schweinen jeder Altersstufe aller vier Betriebe isoliert worden (Tabelle 37). Die Stämme wurden dabei so ausgewählt, dass aus jedem MLVA-Profil mindestens ein Stamm sequenziert wurde. Es wurden zusätzlich Stämme mit demselben MLVA-Profil ausgewählt, die aus unterschiedlichen Altersstufen eines MDGs oder sogar aus mehreren MDG isoliert worden waren, um ihre Persistenz abzubilden. Außerdem wurden Stämme für die Vollgenomsequenzierung ausgewählt, die dasselbe Resistenzprofil, aber unterschiedliche MLVA-Profile und dieselben oder unterschiedliche Plasmid-Profile aufwiesen. Stämme mit Resistenzen, die in der Gesamtpopulation selten vorkamen, wurden ebenfalls sequenziert.

Tabelle 37: Pro Altersstufe und Betrieb sequenzierte CSR / FQR *E. coli*-Stämme

Betrieb	Absetzer		Läufer		Vormast		Mittelmast		Endmast		Gesamt	
	[n]	(%) ¹	[n]	(%)	[n]	(%)	[n]	(%)	[n]	(%)	[n]	(%)
K1	44	(48)	–	–	–	–	–	–	–	–	44	(48)
K2	34	(60)	17	(74)	11	(61)	8	(44)	12	(46)	82	(58)
B1	12	(41)	15	(65)	8	(57)	14	(58)	11	(52)	60	(54)
B2	14	(58)	4	(57)	1	(100)	7	(88)	4	(50)	30	(63)
Summe	104	(51)	36	(68)	20	(61)	29	(58)	27	(49)	216	(55)

¹Der prozentuelle Anteil bezieht sich auf alle zu diesem Alterszeitpunkt und aus dem jeweiligen Betrieb isolierten *E. coli*-Stämme – siehe dazu Tabelle 28.

Qualitätsparameter der Sequenzierung und der Assemblierung

Die von Eurofins sequenzierten Stämme wiesen durchschnittlich eine 435-fache Sequenzabdeckung des Genoms auf (Minimum 234; Maximum 613; Standardabweichung 82). Bei LGC gab es einen Stamm mit schlechter Sequenzierqualität, dessen Genom lediglich 5-fach abgedeckt war. Die restlichen Stämme zeigten eine durchschnittliche Sequenzabdeckung von 127 (Minimum 75; Maximum 214; Standardabweichung 26). Der PHRED-Score lag bei 98 % der FASTQ-Dateien über 30 (Eurofins Sequenzierung: Standardabweichung 0,52; LGC Sequenzierung: Standardabweichung 0,33).

Die Illumina Sequenzierung lieferte Genom-Entwürfe mit einer durchschnittlichen Größe der Assemblierung von 5×10^6 bp, die wiederum aus durchschnittlich 147 *contigs* bestanden und einen mittleren N50-Wert von 119×10^3 bp hatten. Der *E. coli* K-12-Stamm MG1655 wurde als Referenzgenom verwendet.

4.7.1 Diversität der sequenzierten Stämme

4.7.1.1 Identifikation von Dubletten im Datensatz

Aus jedem Bakterienpool waren alle Stämme mit unterschiedlichem, coliformen Phänotyp isoliert worden. Allerdings kann derselbe Stamm mehrmals vereinzelt worden sein, wenn er phänotypische Varianz auf den Selektivplatten aufwies oder wenn er aufgrund von Multiresistenz sowohl von einer Enrofloxacin- als auch von einer der Cephalosporin-Platten isoliert worden war. Um potenzielle Dubletten im Vollgenom-Datensatz auszusortieren, wurden diejenigen sequenzierten Stämme identifiziert, die aus derselben Kotprobe stammten, basierend auf ihrem MLVA-Profil demselben *cluster* zugeordnet wurden (siehe 4.7.1.3) und derselben Phylogruppe sowie demselben ST angehörten. Anschließend wurden für diese Stämme die Ergebnisse aus AMRfinderPlus, VFDB und PlasmidFinder verglichen. Zusätzlich wurde die Anzahl an *k*-mer-basierten SNP-Unterschieden (kSNP) zwischen den Stämmen berechnet. Bei drei Stammpaarungen mit gleichen Resistenz- und Virulenzgenen gab es keinen kSNP-Unterschied (20E0162 und 20E0163, 20E0176 und 20E0177, 20E0178 und 20E0186), allerdings verfügte 20E0163 laut PlasmidFinder gegenüber 20E0162 über einen zusätzlichen ColpVC-Replikationsursprung. Da die Anzahl an Stämmen derselben Kotprobe ohne kSNP-Unterschied somit sehr gering war und da Stämme aus unterschiedlichen Kotproben, die aus aufeinanderfolgenden MDG entnommen worden waren, teilweise ebenfalls nur kSNP-Unterschiede im einstelligen Bereich aufwiesen (siehe 4.7.4.1), wurden die beiden potenziellen Dublettenpaare im Datensatz belassen.

4.7.1.2 Phylogruppen und Sequenztypen

Die 216 sequenzierten Stämme gehörten hauptsächlich den Phylogruppen A (n = 125) und B1 (n = 52) an. Stämme der Phylogruppen E (n = 17), D (n = 12), B2 (n = 4) sowie C, F und G (jeweils n = 1) kamen seltener vor. Für drei Stämme konnte keine Phylogruppe bestimmt werden. Die Stämme verteilten sich außerdem auf 47 verschiedene ST. Dazu gehörten 21 ST, die nur ein einziges Mal vorkamen (*singleton*-ST: 20, 100, 117, 131, 137, 167, 206, 301, 362, 398, 410, 641, 648, 1122, 1589, 1851, 2067, 2074, 2973, 3631, 8979). Gleichzeitig gab es ST, die sehr häufig vorkamen (Abb. 56).

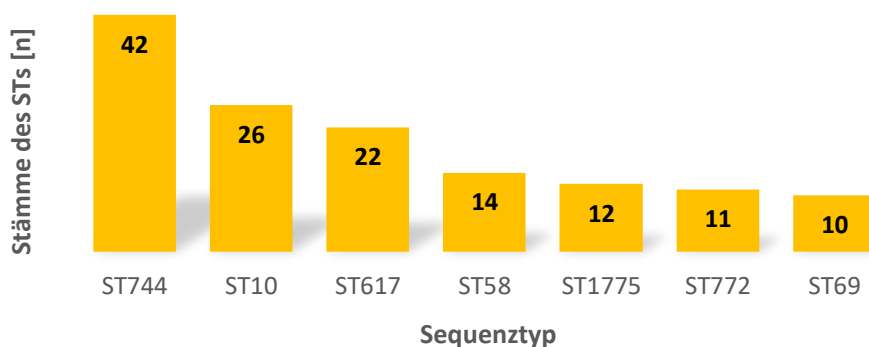


Abb. 56: Häufig vorkommende Sequenztypen (ST)

Korrelation der Phylogruppen bzw. ST mit CSR / FQR – Es gab nur wenig Assoziationen zwischen einem Resistenztyp und einer bestimmten Phylogruppe. Lediglich Stämme der Phylogruppen D und E waren überdurchschnittlich oft CSRE. Einige ST traten ebenfalls nur bei CSR (ST69, ST1775), andere nur bei FQR Stämmen auf (ST58, ST86, ST744, ST772). Wieder andere traten vor allem bei Stämmen auf, die sowohl CS- als auch FQ-resistent waren (ST617, ST744). Den meisten ST konnte allerdings kein bestimmter Resistenztyp zugeordnet werden. So wurden keine ST identifiziert, die bei mehreren Stämmen aus verschiedenen Betrieben mit CSR oder FQR assoziiert waren.

Betrachtet man hingegen die durchschnittliche Anzahl an Stämmen, die pro Resistenztyp derselben Phylogruppe bzw. demselben ST angehörten, lässt sich erkennen, dass bei der eher chromosomal-kodierten FQR, die meist klonal vererbt wird, mehr Stämme pro Phylogruppe bzw. ST auftraten (Tabelle 38). Bei der Plasmid-kodierten CSR hingegen gehörten weniger Stämme derselben Phylogruppe bzw. demselben ST an, da die Resistenz auch horizontal weitergegeben wird und somit in unterschiedlichen ST-Hintergründen auftritt.

Tabelle 38: Durchschnittliche Anzahl an CSRE / FQRE pro Phylogruppe und Sequenztyp

Resistenz- typ	Sequenzierte Stämme mit entsprechender Resistenz ¹ [n]	Bei Stämmen des Resistenztyps vorkommende:		Durchschnittliche Anzahl an Stämmen:	
		Phylo. ² [n]	ST ³ [n]	pro Phylo.	pro ST
CSRE⁴	57	6	18	9,5	3,2
CS- + FQRE	86	3	24	14,3	3,6
FQRE⁵	71	6	16	23,7	4,4

¹Von den 216 sequenzierten Stämmen waren zwei Stämme weder CS- noch FQ-resistent;

²Phylo. = Phylogruppen; ³ST = Sequenztypen;

⁴CSRE = Cephalosporin (CS)-resistente *E. coli*; ⁵FQRE = Fluorchinolon (FQ)-resistente *E. coli*.

Korrelation der Phylogruppen bzw. ST mit einer Altersstufe – Etwas mehr als die Hälfte der Stämme jeder Altersgruppe gehörten zu Phylogruppe A, während circa jeweils 20 % (Absetzer: 30 %) Phylogruppe B1-Stämme waren. Phylogruppe B2-Stämme machten jeweils nur weniger als 5 % der Stämme einer Altergruppe aus, traten aber wie Stämme der Phylogruppe D während der Mast häufiger auf als im Absetzer- und Läuferalter (Abb. 57). Stämme der Phylogruppe E waren etwas seltener aus Läufer- und Mittelmastproben isoliert worden als aus Proben der restlichen Alterszeitpunkte, machten aber nie mehr als 11 % (Endmast) der Stämme einer Altersstufe aus.

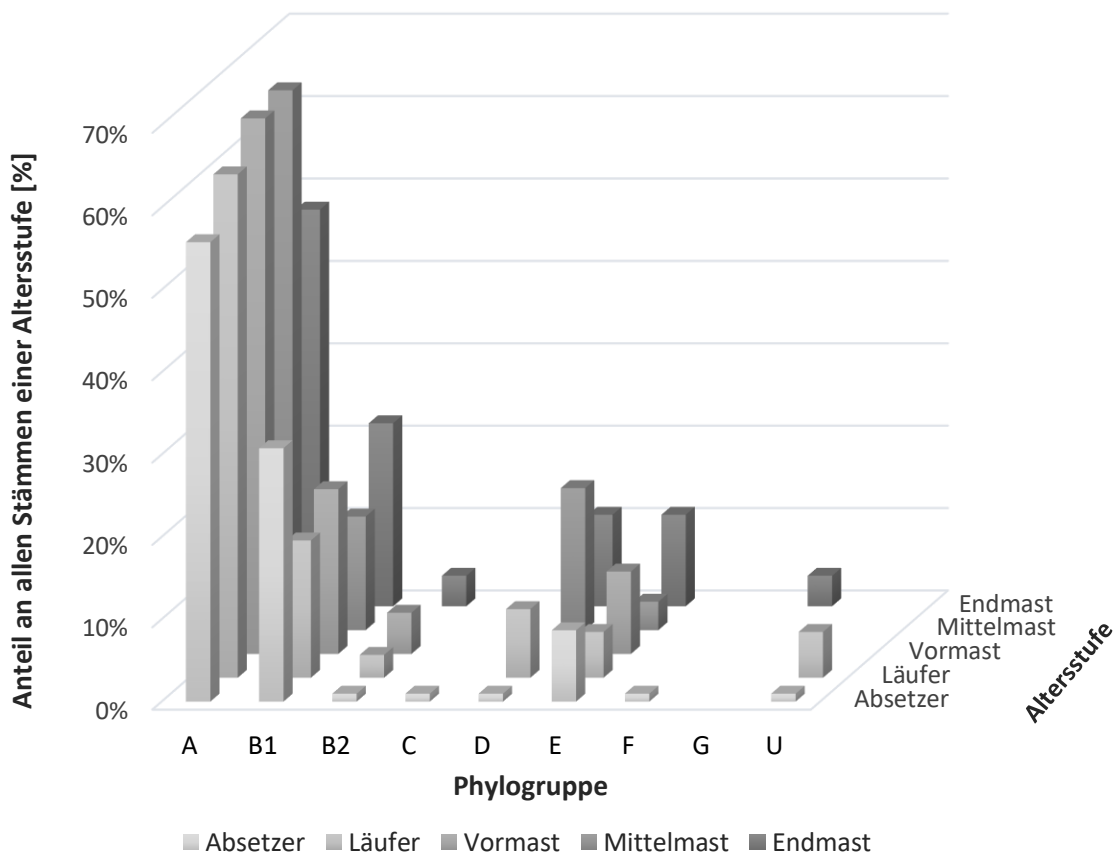


Abb. 57: Relative Häufigkeit der Stämme jeder Phylogruppe pro Altersstufe
Phylogruppe U = Phylogruppe konnte nicht bestimmt werden.

Nur ST744 und ST10 kamen bei allen Altersstufen vor. ST1775 kam bei allen Altersstufen außer der Endmast, ST5122 bei allen außer der Mittelmast und ST345 sowie ST772 bei allen Altersstufen außer der Vormast vor. Die Absetzer-Altersstufe wies den größten Anteil an Altersstufen-spezifischen *singleton*-ST auf ($n = 18$; Abb. 58). Da wegen Betrieb K1 aber mehr Stämme von Absetzern als von anderen Altersstufen sequenziert worden waren, unterschieden sich die Absetzer-, Mittelmast- und Endmastaltersstufe prozentual in ihrem *singleton*-Anteil kaum.

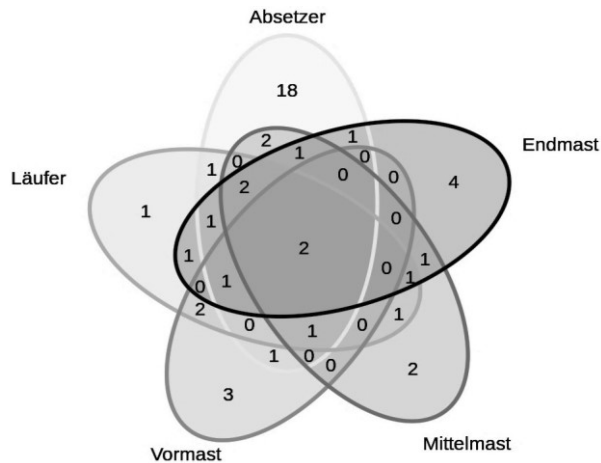


Abb. 58: Verteilung der Sequenztypen auf die Altersstufen
Venn-Diagramm ohne Unterscheidung der Stämme nach Betriebsherkunft.

Korrelation der Phylogruppen bzw. ST mit einem Betrieb – Aus jedem Betrieb gehörten mindestens die Hälfte der sequenzierten Stämme zu Phylogruppe A (B1 = 53 %; B2 = 50 %; K1 = 55 %; K2 = 66 %). Phylogruppe B1-zugehörige Stämme stammten vor allem aus den konventionellen Betrieben, wobei ihr Anteil an allen sequenzierten Stämmen pro Betrieb bei K1 wiederum fast die Hälfte ausmachte (43 %) und bei K2 sowie B2 circa ein Drittel betrug (jeweils 27 %). Aus Betrieb B1 gehörten nur 5,0 % der sequenzierten Stämme zu Phylogruppe B1. Stämme der Phylogruppen B2 und D wurden ausschließlich aus den Bio-Betrieben isoliert (Abb. 59). Von den sequenzierten Stämmen aus Betrieb B2 entfielen jeweils 6,7 % auf diese beiden Phylogruppen, während nur 3,3 % der Stämme aus Betrieb B1 zu Phylogruppe B2 gehörte, 17 % hingegen zu Phylogruppe D. Auch die Stämme der Phylogruppe E setzten sich größtenteils aus Isolaten der Bio-Betriebe zusammen (B1 = 18 %, B2 = 10 %), während dieser Phylogruppe 3,7 % der sequenzierten Stämme von K2 zugeordnet wurden.

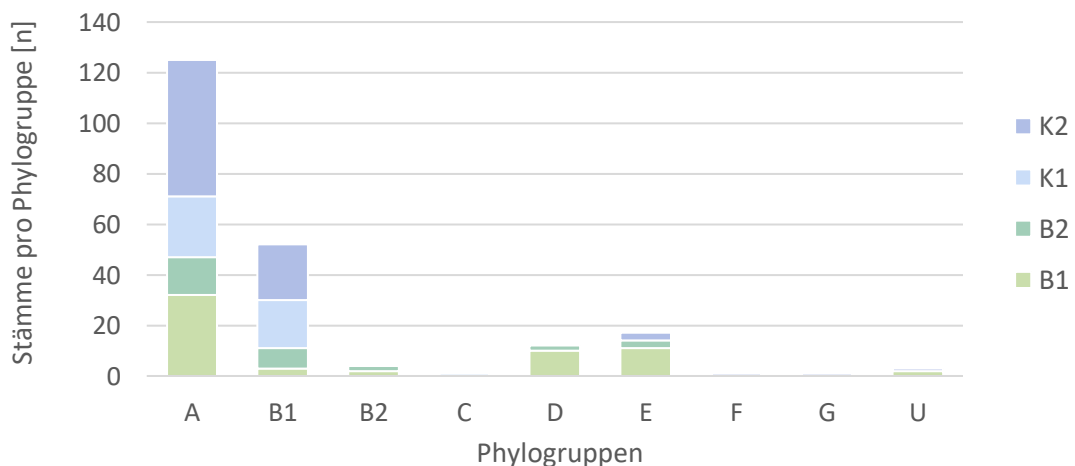


Abb. 59: Anzahl der Stämme jeder Phylogruppe pro Betrieb

Die Stämme aus Betrieb B1 wurden insgesamt zwölf ST zugeordnet, von denen 58 % nur bei B1 vorkamen. Betrieb B2 wies 13 verschiedene ST auf, von denen 69 % Betriebs-*singletons* darstellten. Die Stämme aus Betrieb K1 verteilten sich auf acht ST, von denen 50 % nur bei K1 auftraten, während K2 24 verschiedene ST aufwies, von denen 79 % Betriebs-*singletons* darstellten. Lediglich ST10 kam auf allen vier Betrieben vor. Dafür gab es keinen ST, der in drei Betrieben vorgefunden wurde. Die meisten gemeinsamen ST zeigten die Betriebe B1 und K2 (ST162, 345, 744), gefolgt von den Betrieben K1 und B2 (ST453, 58). Auf beiden Bio-Betrieben wurden Stämme des STs 1775 detektiert, während Stämme beider konventioneller Betriebe ST101 zugeordnet wurden. Insgesamt war das Profil der ST sehr betriebspezifisch (Abb. 60).

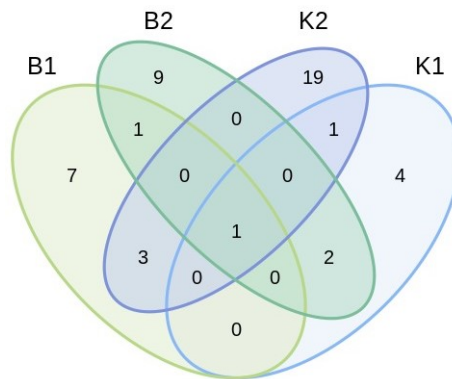


Abb. 60: Verteilung der Sequenztypen auf die Betriebe

Der Uniformitätsindex (durchschnittliche Anzahl an Stämmen desselben STs) nahm mit steigendem Alter der Tiere fast linear ab (Absetzer = 3,4; Läufer = 2,6; Vormast = 2; Mittelmast = 2,2; Endmast = 1,8). Die Betriebe K1 und B1 hatten einen hohen Uniformitätsindex (K1 = 5,5; B1 = 5), K2 lag im Mittelfeld (3,4) und B2 hatte den niedrigsten Uniformitätsindex (2,3).

4.7.1.3 Phylogenetische Einteilung auf Basis von *k*-mer-SNPs

Die *k*-mer-basierte Analyse von Einzelnukleotid-Polymorphismen (kSNP) ergab, dass die Stämme innerhalb eines STs (z. B. ST10) teilweise eine hohe Anzahl an kSNPs aufwiesen. Stämme anderer ST waren innerhalb eines Betriebs hingegen genetisch fast identisch (siehe 4.7.4.1). Es wurden aber auch Stämme eines STs (z. B. ST58) aus demselben Betrieb isoliert, die zwei klonale, aber gegeneinander abgrenzbare Populationen bildeten (Abb. 61).

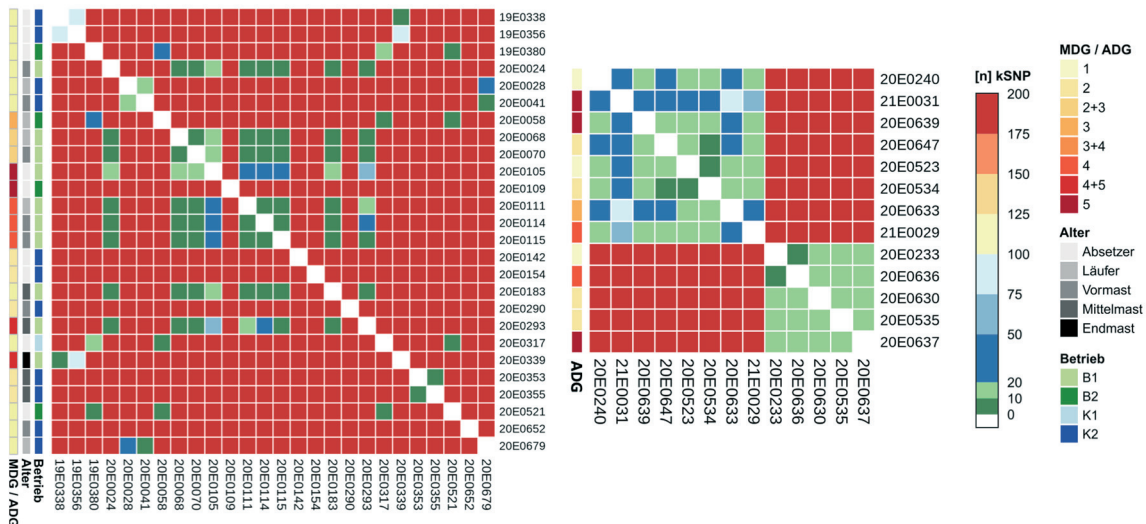


Abb. 61: *heatmap* zur kSNP-Distanz von ST10-Stämmen aus allen vier Betrieben (links) und von ST58-Stämmen aus Betrieb K1 (rechts)

MDG = Mastdurchgang; ADG = Absetzerdurchgang; kSNP = k -mer-basierte Einzelnukleotid-Polymorphismen; gibt es keinen kSNP zwischen zwei Stämmen, ist die Kachel weiß gefärbt; die *heatmaps* wurden unter der Verwendung von veröffentlichten Arbeitspaketen (Kolde 2019) in R erstellt.

Wegen dieser Variabilität innerhalb von ST wurde die Phylogenie der 216 *E. coli*-Stämme basierend auf ihren kSNP nach der *maximum-likelihood* Methode berechnet. Danach ließen sich die sequenzierten Stämme in fünf Kladen einteilen (Abb. 62; KI – KV). Die Stämme wurden entsprechend ihrer Phylogruppe angeordnet. Lediglich ein Stamm aus der Phylogruppe A lag in einem *cluster* mit Phylogruppe B1-Stämmen. Innerhalb der Phylogruppen wurden die Stämme in den meisten Fällen entsprechend ihres STs separiert. Nur Stämme des ST10 befanden sich an mehreren Stellen des Phylogeniebaums, wobei sie stets an nah verwandte ST (ST34, ST44, ST167, ST617, ST744, ST772) angrenzten. Innerhalb eines STs waren die Stämme wiederum entsprechend ihrer Betriebsherkunft gruppiert und wiesen häufig ähnliche Resistenzdeterminanten (RD) auf. Das Alter und der Mast- bzw. Absetzerdurchgang hatten nur geringen Einfluss auf die Phylogenie. Abbildung 62 zeigt, dass Stämme desselben STs mit identischen Resistenzeigenschaften über verschiedene Altersstufen eines MDGs und über mehrere MDG hinweg auftreten (z. B. ST744-Stämme aus Betrieb B1; ST772-Stämme aus Betrieb B2; ST58- und ST744-Stämme aus Betrieb K2 – siehe auch 4.7.4).

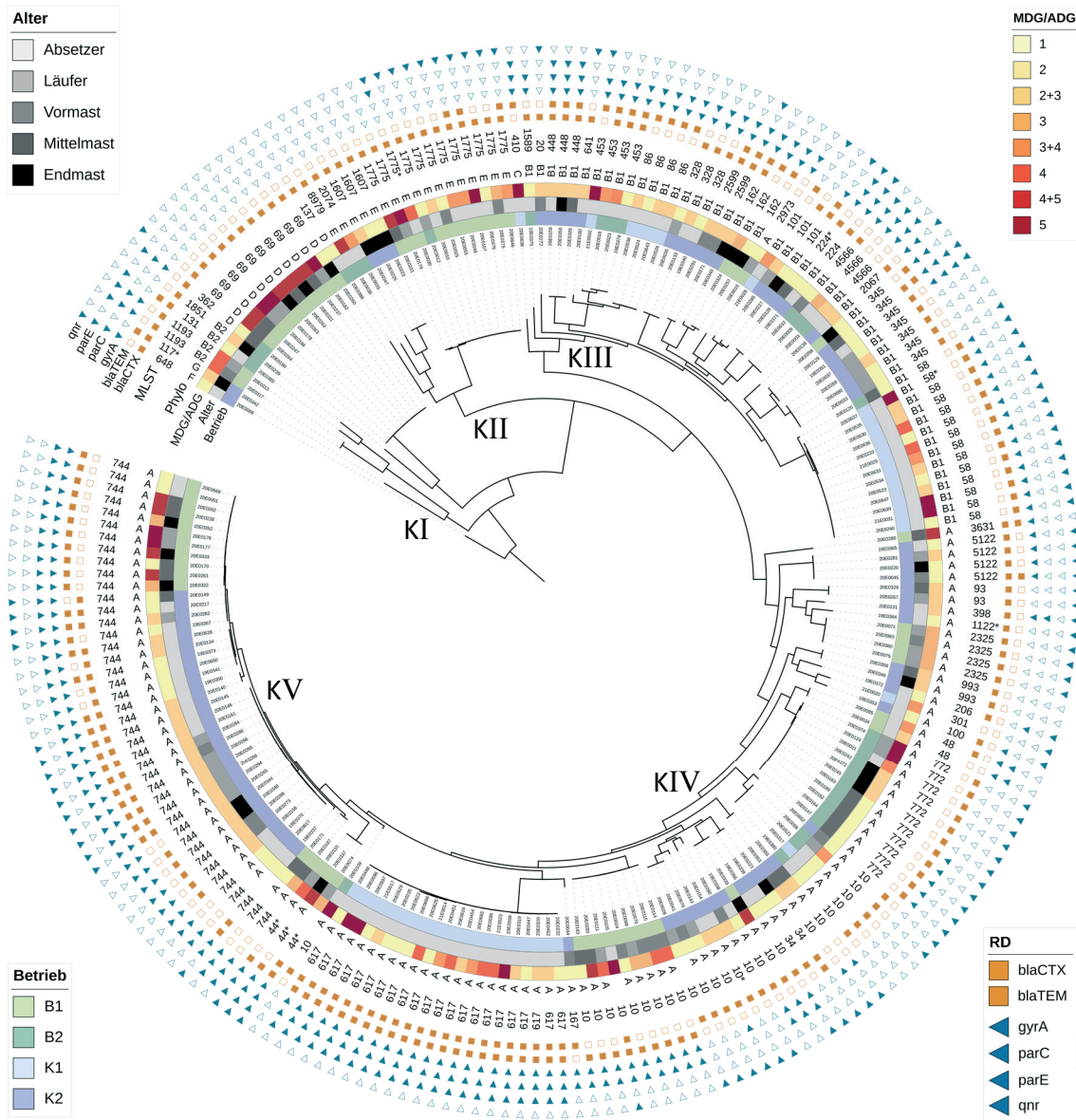


Abb. 62: *Maximum-likelihood* Phylogeniebaum basierend auf kSNP im Pangenom der 216 sequenzierten CSRE / FQRE

MDG = Mastdurchgang; ADG = Absetzerdurchgang; RD = Resistenzdeterminante; Phylo = Phylogruppe; KI – KV = Klade 1 bis 5; orangene Quadrate = β -Laktam-RD; blaue Dreiecke = Fluorchinolon-RD; Zuordnung der RD basierend auf AMRFinderPlus.

4.7.1.4 Vergleich mit den Stämmen der ECOR-Kollektion

In den phylogenetischen Baum der ECOR-Stämme wurden 68 der sequenzierten CSRE / FQRE eingefügt. Diese umfassten mindestens einen Stamm aus jedem der 57 MLVA-Profile. Wiesen Stämme eines MLVA-Profiles mehrere ST auf, wurde zudem aus jedem ST ein Stamm ausgewählt. Die sequenzierten Stämme verteilten sich zu großen Teilen gleichmäßig über den kompletten ECOR-Baum und wurden meist entsprechend ihrer Phylogruppe und ihres STs separiert (Abb. 63). Die Stämme des klonalen Komplexes 10 (ST: 10, 34, 44, 617, 167, 744, 772), dessen ST sich durch maximal zwei Alleldifferenzen

in den sieben Genen der Achtmann-MLST unterscheiden, wurden lediglich von wenigen ECOR-Stämmen abgebildet. Bei den sequenzierten Stämmen war dieser klonale Komplex überrepräsentiert und bildete das obere Viertel des Phylogeniebaums ab. Die pathogenen Vertreter der ECOR-Kollektion am Ende des Baums, die den Phylogruppen B2, D sowie teilweise F angehören, wurden hingegen durch die sequenzierten Stämme kaum abgebildet und formten ein *cluster* für sich. Dies, sowie der große Bereich an Stämmen der Phylogruppen A und B1, spricht dafür, dass sich die Auswahl der isolierten und sequenzierten CSRE / FQRE zu großen Teilen auf kommensale *E. coli* beschränkte.

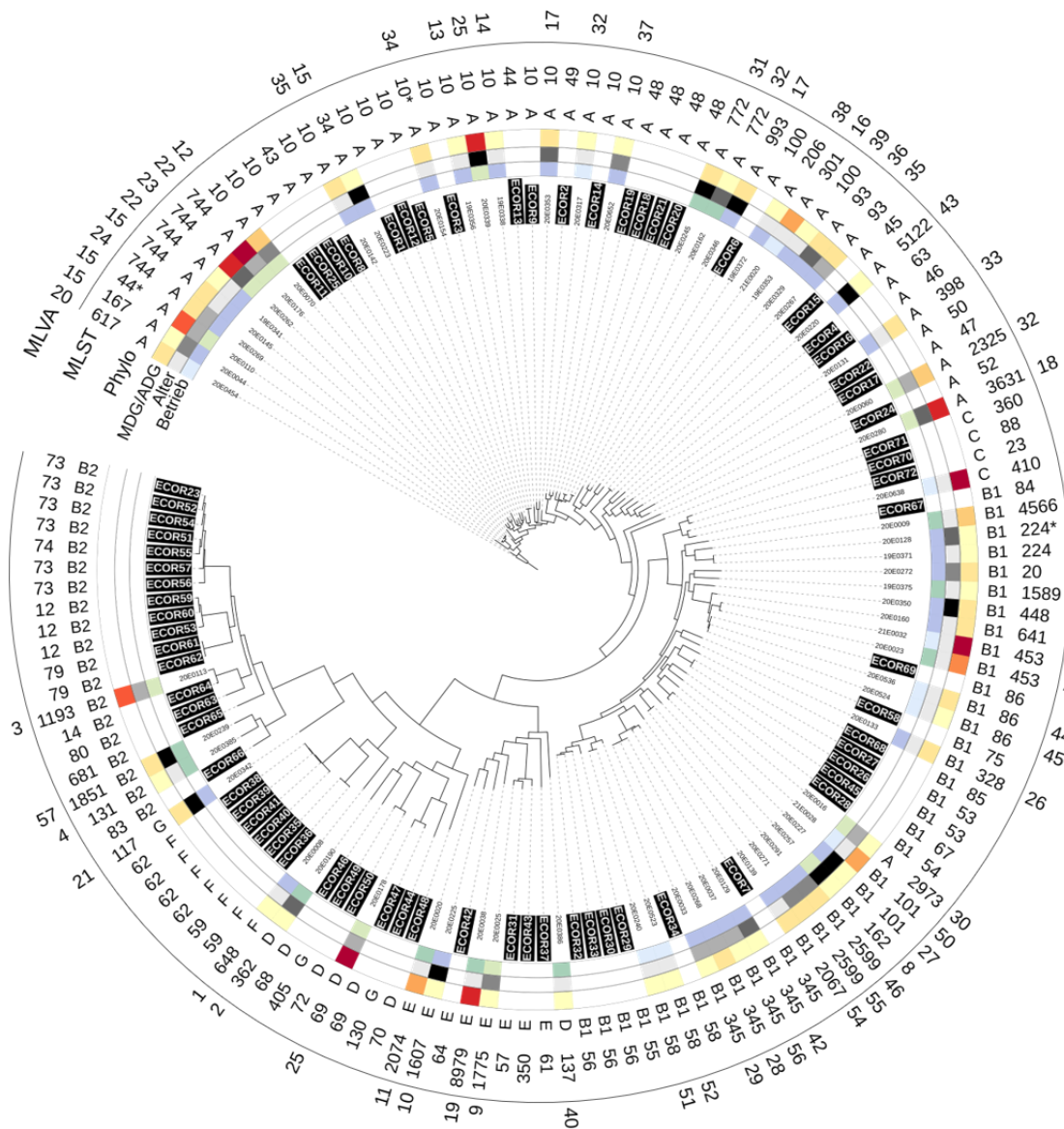


Abb. 63: *Maximum-likelihood* Phylogeniebaum basierend auf kSNP im Pangenom der ECOR-Stämme und 68 ausgewählter CSRE / FQRE

MDG = Mastdurchgang; ADG = Absetzerdurchgang; Phylo = Phylogruppe; MLVA = MLVA-Profil-Nummer (1 – 57); Zuordnung der Farbringe siehe Abb. 62; die ECOR-Stämme (Patel *et al.* 2018) sind durch weiße Schrift auf schwarzem Hintergrund gekennzeichnet.

4.7.2 Vorkommen von Antibiotikaresistenz-vermittelnden Determinanten

Die Analyse des genetischen Resistenz-Profiles basierte auf den Ergebnissen des Programms AMRFinderPlus und wurde bei davon abweichenden Ergebnissen des Programms ResFinder durch diese ergänzt.

Neben den Genen, die Resistenz gegenüber FQ und CS3/4 vermitteln, wurden bei der Analyse der Vollgenomsequenzen zusätzliche RD gegenüber weiteren AB detektiert (Tabelle 39). Allerdings wurden keine Gene identifiziert, die Resistenzen gegenüber den kritisch wichtigen AB-Gruppen Carbapeneme und Polymyxine vermitteln.

Tabelle 39: Detektierte Antibiotika-Resistenzdeterminanten
Ergebnisse ermittelt mit AMRFinderPlus.

Antibiotika-Klasse	Resistenzdeterminanten	Auf Micronautplatte getestet
Fenicole	<i>catA1, catB3, cmlA1, floR</i>	– ¹
Fosfomycin	<i>glpT E448K, ptsI V25I, uhpT E350Q, cyoA S352T</i>	–
Lincosamide	<i>lnu(F), lnu(G)</i>	–
Sulfonamide	<i>sul1, sul2, sul3</i>	(–) ²
Trimethoprim	<i>dfrA1, dfrA5, dfrA12, dfrA14, dfrA16, dfrA17, dfrA36</i>	(–)
Aminoglykoside	<i>aac(3)-lid, aac(3)-Iva, aadA1, aadA2, aadA5, aadA22, aph(3'')-Ib, aph(3')-Ia, aph(4)-Ia, aph(6)-Id, aac(6')-Ib-cr5</i>	+ ³
β-Laktam-Antibiotika	<i>bla_{CARB-2}, bla_{CTX-M}, bla_{CTX-M-1}, bla_{CTX-M-15}, bla_{CTX-M-27}, bla_{CTX-M-55}, bla_{OXA-1}, bla_{TEM}, bla_{TEM-1}, bla_{TEM-32}</i>	+
Makrolide	<i>mef(B), mef(C), mph(A), mph(G)</i>	+
Tetrazykline	<i>tet(A), tet(B), tet(C), tet(M), tet(Y)</i>	+

¹Antibiotika, die nicht als eigene Substanzen auf der Micronautplatte getestet wurden;

²Antibiotika, die nur als Kombinationspräparat auf der Micronautplatte getestet wurden;

³Antibiotika, von denen mindestens eine Stellvertretersubstanz auf der Micronautplatte getestet wurde.

Auch Gene, die Resistenz gegenüber (Schwer-)Metallen (Arsen, Kupfer, Silber, Quecksilber, Tellur) oder Desinfektionsmitteln (quartäre Ammoniumverbindungen) vermitteln, wurden identifiziert.

4.7.2.1 Resistenz gegenüber Fluorchinolonen

Chromosomal-kodierte Fluorchinololon-Resistenzmutationen

Bei 157 FQRE wurden zwölf verschiedene Mutationen in der QRDR gefunden (Tabelle 40). In zwei Stämmen wurden außerdem Mutationen im AcrAB-TolC-System identifiziert. Die häufigste Mutation, die bei 93 % der sequenzierten FQRE vorkam, war *gyrA* S83L. Zudem zeigten 75 % der FQRE die *parC* S80I-Mutation. Bei 74 % der FQRE wurde eine zweite *gyrA*-Mutation nachgewiesen (D87N/G), die bis auf eine Ausnahme aber nur in Kombination mit *gyrA* S83L auftrat (siehe auch Abb. 65).

Tabelle 40: FQR-vermittelnde Mutationen in 157 sequenzierten FQR *E. coli*

Ergebnisse ermittelt mit AMRFinderPlus.

Bereich der Mutation	Gen	AS ¹ -Austausch	Stämme [n] ²	
<i>quinolone resistance determining region</i> (Region, in der Mutationen zur Resistenz gegenüber Fluorchinolonen führen können)	<i>gyrA</i>	S83L	146	
		D87N/G	116	
	<i>parC</i>	S80I	118	
		A56T	45	
		A108V	9	
		E84G	4	
		<i>parE</i>	S458A/T	38
			L416F	2
			E460D	2
			P439S	1
AcrAB-TolC Regulation	<i>marR</i>	I529L	1	
		S3N	2	

¹AS = Aminosäure;²Stämme, bei denen die beschriebene Mutation detektiert wurde;Vornehmlich Plasmid-kodierte Fluorchinolon-Resistenzgene

Von 216 sequenzierten *E. coli*-Stämmen trugen 119 (55 %) ein Gen für einen FQR-*enabler*. Dabei wurden diese Gene auch in Stämmen detektiert, die keinen Enrofloxacin-resistenten Phänotyp zeigten. So waren 28 % der Stämme mit *enabler*-Gen FQR, 23 % waren CSR und 48 % waren resistent gegenüber beiden AB-Klassen.

AMRFinderPlus identifizierte 91 der 216 *E. coli*-Stämme (42 %) als Träger von *qnrS1*. Weitere drei Stämme (1,4 %) waren *qnrS*-positiv, das Programm konnte ihr *qnrS*-Allel aber nicht definieren. Von den *qnrS1*-Trägern waren zwei Drittel (n = 63; 69 %) FQR. Die anderen 28 Stämme waren ebenfalls Träger von *qnrS1*, wiesen aber einen suszeptiblen oder intermediären Phänotyp gegenüber Enrofloxacin auf (siehe auch Abb. 65). Zwei weitere der 216 Stämme (0,93 %) waren laut AMRFinderPlus *qnrB*-positiv. Beide waren resistent gegenüber FQ. Darüber hinaus wurden 23 der 216 Stämme (11 %) als *aac(6')-Ib-cr*-positiv identifiziert, die alle FQR waren und aus den konventionellen Betrieben isoliert worden waren. Kein Stamm war Träger mehrerer FQR-*enabler*.

Die Sequenzumgebung von *qnrS* war stark konserviert. Das *enabler*-Gen war stets von einem *ISKpn19* und einem *ISec36*-Element flankiert, wobei letzteres häufig durch ein Gen für die Tn2 Transposase ergänzt war. *ISKpn19* war zudem in einigen Stämmen mit einem *relB-relE* Toxin-Antitoxin-System assoziiert. Das *aac(6')-Ib-cr*-Gen wurde hingegen nur in Verbindung mit *bla_{OXA-1}* und der Fenicol-RD *catB3* gefunden (siehe 4.7.4.2).

Einfluss der verschiedenen FQ-Resistenzdeterminanten auf die FQ-Resistenz

Das *enabler*-Gen *aac(6′)-Ib-cr* und die QRDR-Mutationen waren alle stark mit einer FQR assoziiert, weshalb sie weit oben im Koordinatensystem angesiedelt sind (Abb. 64). Sie kamen allerdings unterschiedlich oft in Enrofloxacin-Nicht-Wildtyp-Stämmen oder Enrofloxacin-resistenten Stämmen vor. Während *gyrA* S83L, gefolgt von *parC* S80I und der zweiten *gyrA*-Mutation (D87N), am häufigsten mit dem FQ-Nicht-Wildtyp-Status bzw. der FQR korrelierten, traten die meisten *parE*-Mutationen und die *marR*-Mutation seltener bei diesen Stämmen auf. Die einzigen QRDR-Mutationen, die auch in FQ-Wildtyp-Stämmen bzw. in -suszeptiblen Stämmen vorkamen, waren *gyrA* D87G und *parE* S458A. Der FQR-*enabler* *qnrS* kam hingegen öfters auch in Enrofloxacin-Wildtyp-Stämmen und zu 50 % auch in -suszeptiblen Stämmen vor. Dies ist somit die einzige FQ-RD, deren Häufigkeit des Vorkommens sich deutlich ändert, wenn entweder alle Enrofloxacin-Nicht-Wildtyp-Stämme oder alle -resistenten Stämme betrachtet werden.

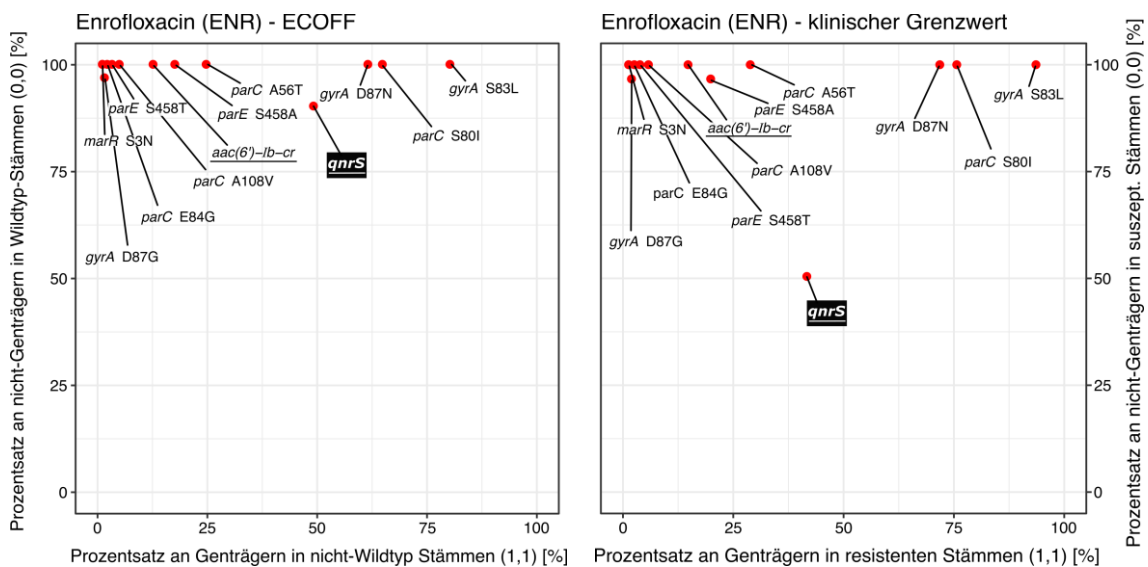


Abb. 64: Einfluss von FQR-vermittelnden Mutationen und *enabler*-Genen auf den Enrofloxacin-Resistenzstatus nach ECOFF (links) und nach klinischem Grenzwert (rechts)

Suszept. = suszeptibel; ECOFF = *epidemiological cut-off* Wert; Grenzwerte siehe 3.8.3; FQR-*enabler*-Gene sind unterstrichen; Ergebnisse ermittelt mit AMRFinderPlus.

Bei 29 sequenzierten Stämmen wurde lediglich eine einzelne QRDR-Mutation in *gyrA* oder *parC* identifiziert, obwohl sie FQR war. Diese Stämme waren aber alle zusätzlich *qnrS*-Träger. Neun weitere Träger eines *qnr*-Allels, die keine Mutation in der QRDR aufwiesen, waren allerdings ebenfalls FQR (Tabelle 41). Ein weiterer Stamm zeigte sogar weder eine QRDR-Mutation noch ein *enabler*-Gen und war FQR.

Tabelle 41: *enabler*-Gene bei FQRE mit maximal einer QRDR-Mutation

Ergebnisse ermittelt mit AMRFinderPlus.

Enrofloxacin-MHK-Wert	QRDR ¹ -Mutation		<i>enabler</i> -Gen		Stämme [n]
	<i>gyrA</i> S83L	<i>parC</i> A56T	<i>qnrS</i>	<i>qnrB</i>	
1	+	-	+	-	8
	-	-	+	-	2
	-	-	-	+	1
2	+	-	+	-	20
	-	+	+	-	1
	-	-	+	-	5
	-	-	-	+	1
	-	-	-	-	1
					39

¹Region, in der Mutationen zur Resistenz gegenüber Fluorchinolonen führen können.

Andererseits wurden auch drei FQ-suszeptible Stämme mit einer Mutation in der QRDR detektiert. Ein Stamm wies die *gyrA* D87G-Mutation auf (Enrofloxacin-MHK-Wert 0,0625), ein weiterer die *parE* I529L-Mutation (Enrofloxacin-MHK-Wert 0,03125) und der dritte Stamm ebenfalls in *parE* die Mutation S458A (Enrofloxacin-MHK-Wert 0,25). Dieser letzte Stamm verfügte auch über *qnrS1* (Abb. 65).

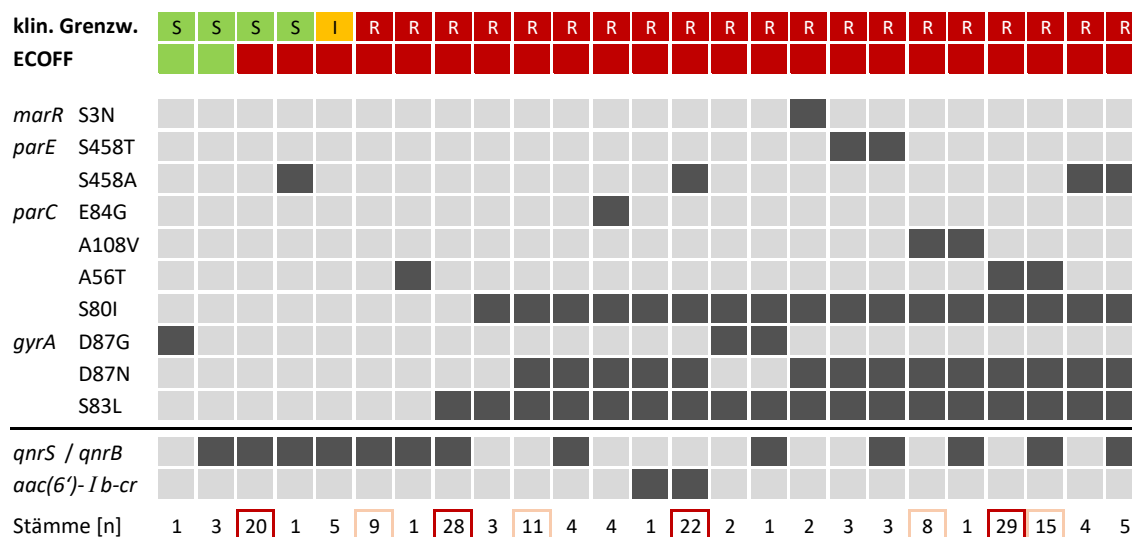


Abb. 65: Häufigkeit des gemeinsamen Auftretens verschiedener FQ-Resistenzdeterminanten und Auswirkung auf den Enrofloxacin-MHK-Wert

Mutationen in *parE*, die < 3 Mal vorkamen, wurden nicht betrachtet; Klin. Grenzw. = Einteilung Enrofloxacin-MHK-Wert nach klinischem Grenzwert: Hellgrünes Feld mit „S“ = suszeptibel, gelbes Feld mit „I“ = intermediär, rotes Feld mit „R“ = resistent; ECOFF = Einteilung Enrofloxacin-MHK-Wert nach epidemiological cut-off Wert: Hellgrünes Feld = Wildtyp, rotes Feld = Nicht-Wildtyp; Grenzwerte siehe 3.8.3; Stämme [n] = Anzahl an Stämmen mit entsprechendem Resistenzdeterminanten-Profil: Dunkelroter Rand = Profil kam ≥ 20 Mal vor, rosa Rand = Profil kam ≥ 8 Mal vor; Ergebnisse ermittelt mit AMRFinderPlus.

Aus der Gesamtheit der analysierten FQ-RD lässt sich schließen, dass einige FQ-RD, wie die Mutationen S83L und D87N in *gyrA* sowie S80I in *parC*, häufig gemeinsam auftreten. Oft wurde diese Mutations-Kombination durch weitere *parC*- (A56T oder A108V) bzw. *parE*-Mutationen (S458A/T) ergänzt (Abb. 65). In vielen Fällen, aber nicht immer, waren Stämme mit QRDR-Mutationen zusätzlich Träger von *enabler*-Genen. Alle Stämme mit mehr als einer QRDR-Mutation waren klinisch resistent gegenüber FQ.

4.7.2.2 Resistenz gegenüber Cephalosporinen der dritten und vierten Generation

***bla*_{CTX-M}** – Von den 143 vollgenomsequenzierten CSRE waren 61 % *bla*_{CTX-M-1}-positiv und 32 % Träger von *bla*_{CTX-M-15}. Weitere fünf Stämme (3,5 %), die alle aus Betrieb K2 isoliert worden waren, waren *bla*_{CTX-M-55}-positiv. Zwei Stämme (1,4 %) waren Träger von *bla*_{CTX-M-27}. Für drei weitere CSRE konnte das Programm AMRFinderPlus kein *bla*_{CTX-M}-Allel bestimmen (Abb. 66). Dafür wiesen vier Cephalosporin-suszeptible *E. coli*-Stämme ein *bla*_{CTX-M}-Allel auf. Je ein Stamm davon war laut ResFinder-Datenbank *bla*_{CTX-M-138}- bzw. *bla*_{CTX-M-139}-positiv. Für die anderen beiden Cephalosporin-suszeptiblen *E. coli*-Stämme konnte das *bla*_{CTX-M}-Allel von keinem der beiden Programme bestimmt werden.

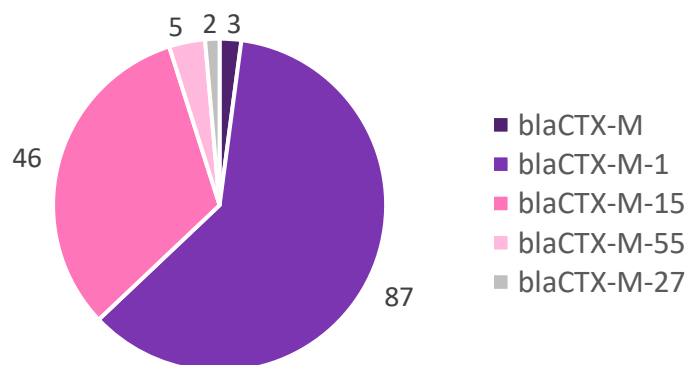


Abb. 66: Anzahl detektierter *bla*_{CTX-M}-Allele in den sequenzierten CSRE
Die Ergebnisse basieren auf dem Programm AMRFinderPlus.

Während *bla*_{CTX-M-15} meist von einem Gen für eine Tn2 Transposase und dem *ISEcp1*-Element flankiert war, befand sich *bla*_{CTX-M-1} entweder ebenfalls in der Nähe von *ISEcp1* oder war zusammen mit einem *ISEc63*-Element kodiert. Letzteres war teilweise durch ein *relB-relE* Toxin-Antitoxin-System ergänzt. Auch *bla*_{CTX-M-55} war mit *ISEcp1*, aber einem *cbeA-cbtA* Toxin-Antitoxin-System assoziiert. Die beiden *bla*_{CTX-M-27} waren gemeinsam mit *IS903* und einem Gen für einen Vitamin B12-Transporter (*btuB*) kodiert, der auch die Funktion eines Bakteriophagen- und Colicin-Rezeptors hat.

ampC – Es wurden keine Plasmid-kodierten Gene für *ampC* detektiert.

***bla*_{TEM} und *bla*_{OXA}** – Von allen 216 sequenzierten *E. coli* wiesen laut AMRFinderPlus 110 (51 %) ein *bla*_{TEM-1}-Allel auf, während ein Stamm *bla*_{TEM-3}-positiv war. ResFinder teilte diese Stämme in 107 *bla*_{TEM-1B}⁻ sowie jeweils zwei *bla*_{TEM-1A}⁻ und *bla*_{TEM-1C}-positive Isolate ein, identifizierte dafür aber kein *bla*_{TEM-3}-Allel. Für fünf weitere Stämme konnte das *bla*_{TEM}-Allel nicht bestimmt werden. Von allen 116 *bla*_{TEM}-Trägern waren 58 (50 %) CSR, die andere Hälfte war CS-suszeptibel. *Bla*_{TEM} war stets mit einem Gen für die Tn2 Transposase kodiert.

Darüber hinaus identifizierte die Vollgenomsequenzierung 23 Stämme als *bla*_{OXA-1}-positiv, die alle CSR waren. *Bla*_{OXA-1} war stets in der Nähe von *bla*_{CTX-M-15} als Genkassette mit dem FQR-*enabler*-Gen *aac(6′)-Ib-cr* und der Fenicol-RD *catB3* kodiert (siehe 4.7.4.2).

Einfluss der verschiedenen β -Laktamasen auf die Resistenz gegenüber Ceftiofur

Die intrinsische *E. coli* β -Laktamase AmpC war in allen Stämmen, auch den CS-suszeptiblen, zu finden, da sie nur in Kombination mit Mutationen in der Promotorregion Resistenz gegenüber CS3/4 vermittelt. Die *bla*_{CTX-M}-Allele waren hingegen deutlich mit CSR assoziiert, da sie fast nur in CSRE vorkamen (Abb. 67). Lediglich die Stämme mit nicht definierbarem *bla*_{CTX-M}-Allel waren teilweise auch CS-suszeptibel. Bei den CSRE wurden *bla*_{CTX-M-1} und *bla*_{CTX-M-15} häufiger als *bla*_{CTX-M-27} und *bla*_{CTX-M-55} detektiert, die daher weiter links im Koordinatensystem angesiedelt sind. Die β -Laktamase *bla*_{OXA-1} wurde nur in CSRE vorgefunden, obwohl sie selbst keine CSR vermittelt, während *bla*_{TEM-1}, das ebenfalls keine CSR vermittelt, auch in vielen CS-suszeptiblen Stämmen detektiert wurde.

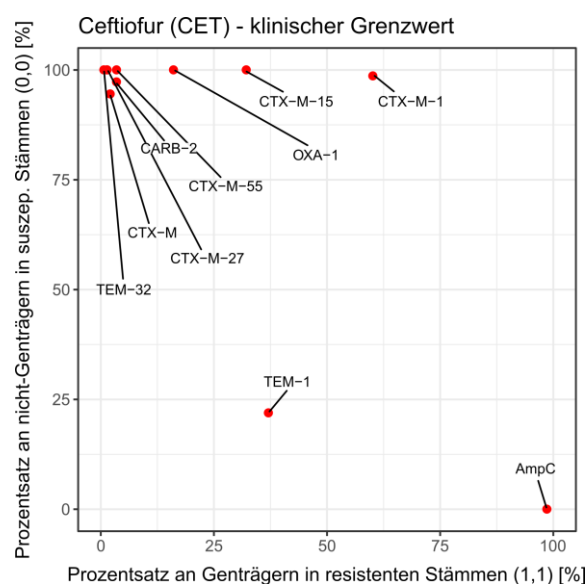


Abb. 67: Einfluss verschiedener β -Laktamasen auf den Ceftiofur-Resistenzstatus
Suszep. = suszeptibel; Grenzwerte siehe 3.8.3; Ergebnisse ermittelt mit AMRFinderPlus.

4.7.2.3 Lokalisation der Cephalosporin- / Fluorchinolon-Resistenzdeterminanten

Die β -Laktamasen *bla*_{CTX-M-1} und *bla*_{CTX-M-15} sowie das FQR-*enabler*-Gen *qnrS1* kamen meist Plasmid-kodiert vor, während die QRDR-Mutationen chromosomal-kodiert waren (Abb. 68). Die selten vorkommenden Gene *bla*_{CTX-M-27} und *qnrB* wurden stets in Plasmid-assoziierten Sequenzen detektiert. Das *bla*_{CTX-M-55}-Allel sowie *aac(6')-Ib-cr* wurden immer bzw. meist als chromosomal-kodiert identifiziert. Die als chromosomal klassifizierten *contigs*, auf denen β -Laktamasen kodiert waren, enthielten trotz dieser Klassifikation häufig Plasmid-spezifische Gene wie *par*, *xer*, *tra* oder *mob*.

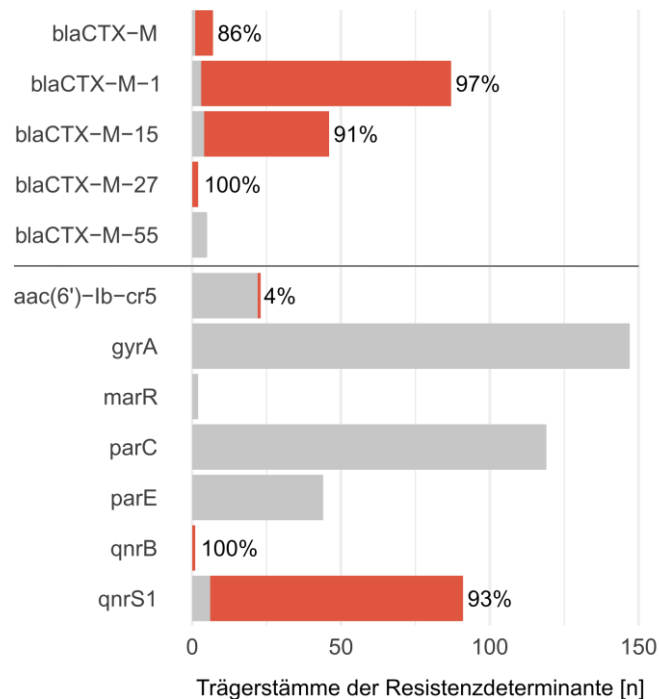


Abb. 68: Anzahl Plasmid-kodierter Vertreter der CS- / FQ-Resistenzdeterminanten

Grau = chromosomal-kodierte Vertreter der Resistenzdeterminanten (RD); rot = Plasmid-kodierte Varianten der RD; Prozentzahl hinter Balken = Anteil Stämme, in denen die RD Plasmid-kodiert war bezogen auf alle Träger-Stämme der RD; verschiedene *gyrA*-, *parC*- und *parE*-Mutationen sind zusammengefasst; Einteilung in Plasmid-kodierte RD mit PLATON.

4.7.3 Plasmidsequenzen

4.7.3.1 Plasmidvorkommen

Von 31.643 *contigs* wurden 3.356 (11 %) durch PLATON als Plasmid-kodiert klassifiziert. Das Programm PlasmidFinder identifizierte 1060 Replikationsursprünge im Datensatz aller sequenzierten *E. coli*-Stämme. Davon gehörten 414 (39 %) zu neun unterschiedlichen Col-Plasmidtypen und 646 (61 %) zu 29 verschiedenen Inkompatibilitätsgruppen (Inc-Gruppe). Die am häufigsten detektierten Replikationsursprünge waren ColRNAI (n = 139), ColMG828 (n = 131) und Col440I (n = 54) sowie IncFIB.AP001918 (n = 143), IncX1 (n = 67), IncI1 α (n = 65) und IncFII (n = 58).

Viele Replikationsursprünge waren in Stämmen aus allen Altersstufen zu finden, wie IncFIA(HI1), IncFIB(AP001918), IncFIC(FII), IncFII, IncFII(pHN7A8), IncI1 α , IncN, IncR, IncX1 und IncY (Abb. 69). IncFIB(AP001918) war dabei in jeder Altersstufe die am häufigsten vorkommende Inc-Gruppe. IncFII(pRSB107) wurde bei allen Altersstufen außer den Absetzerferkeln, IncFIB(pHCM2) und IncX3 bei allen Altersstufen außer der Vormast, IncFIA bei allen Altersstufen außer der Mittelmast und IncFIB(K) sowie IncFII(pCoo) bei allen Altersstufen außer der Endmast detektiert. Lediglich bei Stämmen aus Absetzer- und Mittelmastzeitpunkten wurden Plasmidtypen gefunden, die zu keinem anderen Zeitpunkt isoliert worden waren.

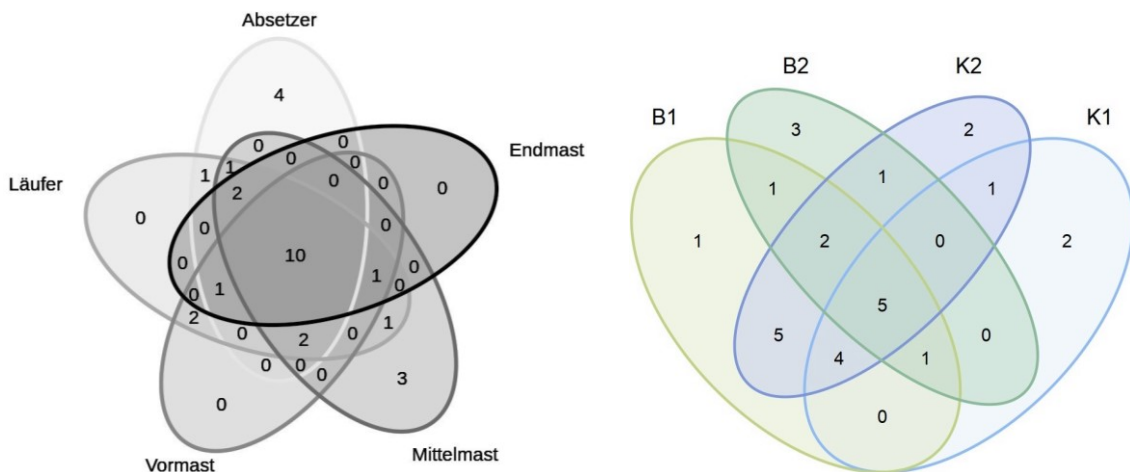


Abb. 69: Verteilung der Plasmidtypen auf die Altersstufen (links) und Betriebe (rechts)

Venn-Diagramm der Plasmid-Inc-Gruppen; Col-Replikationsursprünge nicht berücksichtigt.

Pro Stamm aus Betrieb B1 wurden durchschnittlich 4,5 Replikationsursprünge gefunden, aus Betrieb B2 4,7, aus Betrieb K1 5 und aus Betrieb K2 5,2. IncFIB (AP001918), IncFIC(FII), IncFII, IncI1 α und IncX1 wurden auf allen Betrieben detektiert (Abb. 69), wenn auch mit unterschiedlicher Häufigkeit. IncFIA und IncFII(pHN7A8) wurden nicht aus Betrieb K1 isoliert, während IncFII(pCoo), IncI2 δ , IncN und IncY nicht in Stämmen aus B2 und IncX3 nicht in Stämmen aus K2 vorgefunden wurde. Es gab darüber hinaus viele Plasmidtypen, die nur aus den Betrieben B1 und K2 isoliert worden waren (IncFIA(HI1), IncFIB(K), IncFIB(pHCM2), IncHI1B(R27), IncHI1A). Andere waren spezifisch für die beiden Bio-Betriebe (IncFIB(pB171)), während IncR nur in den konventionellen Betrieben vorkam. Dafür gab es nur wenige Inc-Gruppen, die lediglich auf einem einzigen Betrieb detektiert worden waren.

Plasmidkombinationen

Der am häufigsten detektierte Replikationsursprung, IncFIB, kam auch am häufigsten in Kombinationen mit anderen Replikationsursprüngen wie IncFII, IncI1 α oder IncN im selben Stamm vor (Abb. 70). Betrachtet man weitere oft gemeinsam vorgefundene Inc-Gruppen, ergibt sich allerdings kein Muster präferierter Kombinationen, da fast alle Replikationsursprünge zusammen mit einem oder mehreren der anderen auftraten. Lediglich das gehäufte Vorkommen von IncFIB und IncFII in einem Stamm kann als Hinweis auf das Vorkommen von Multireplikon-Plasmiden gedeutet werden. Dies wird durch die Tatsache unterstützt, dass verschiedene IncF-Replikationsursprünge sogar häufig auf demselben *contig* detektiert wurden: IncFIB(AP001918) drei Mal mit IncFIA(HI1) und vier Mal mit IncFIA, IncFII neun Mal mit IncFIA. Auch Replikationsursprünge von Col-Plasmiden waren öfters ko-lokalisiert (ColRNAI sieben Mal mit Col440I, ColRNAI 17 Mal mit Col440II). Darüber hinaus kam der Plasmidtyp IncX3 immer nur in Verbindung mit IncX1 vor.

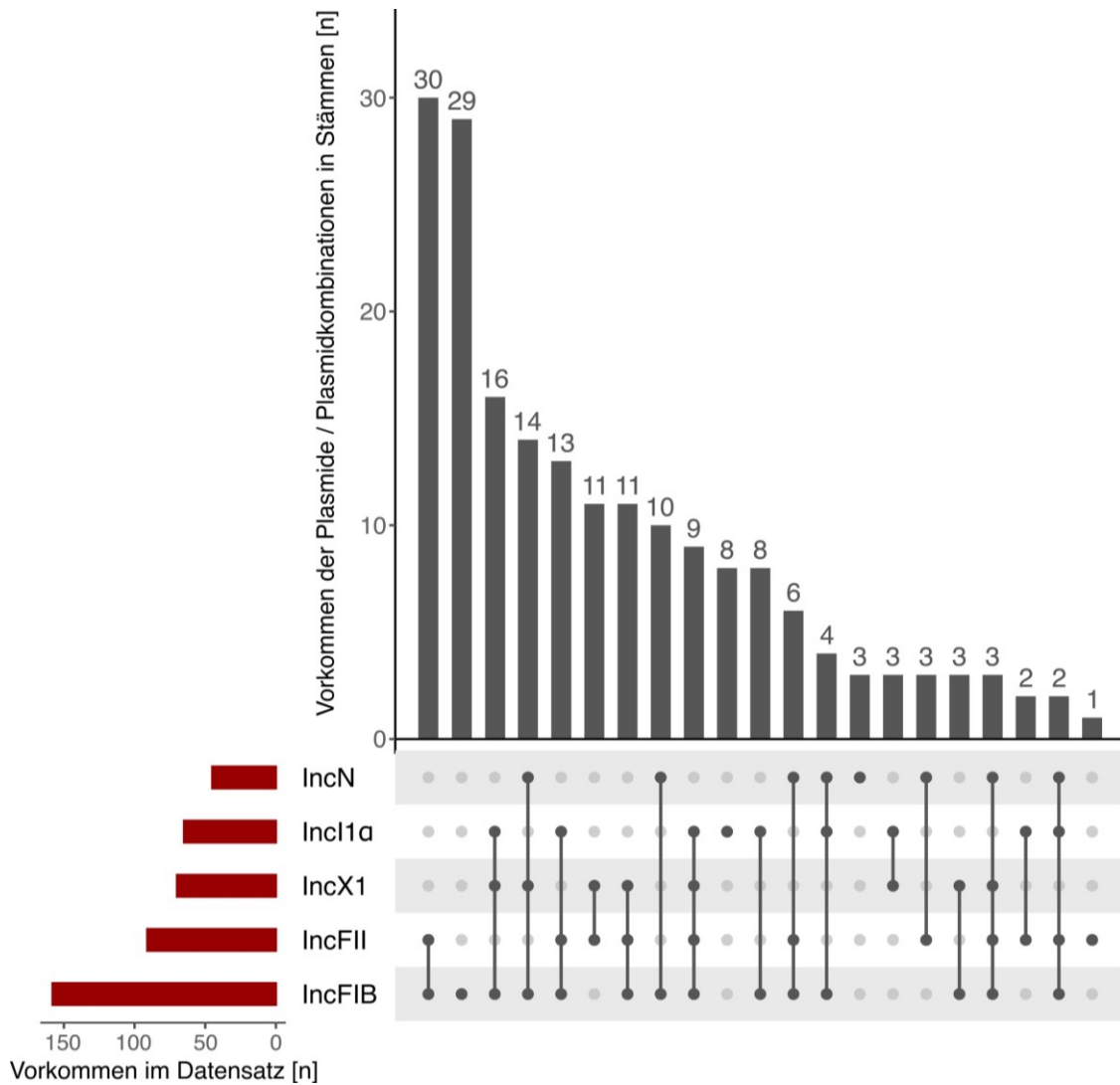


Abb. 70: Häufigkeit des Auftretens bestimmter Kombinationen von Replikationsursprüngen in einem Stamm

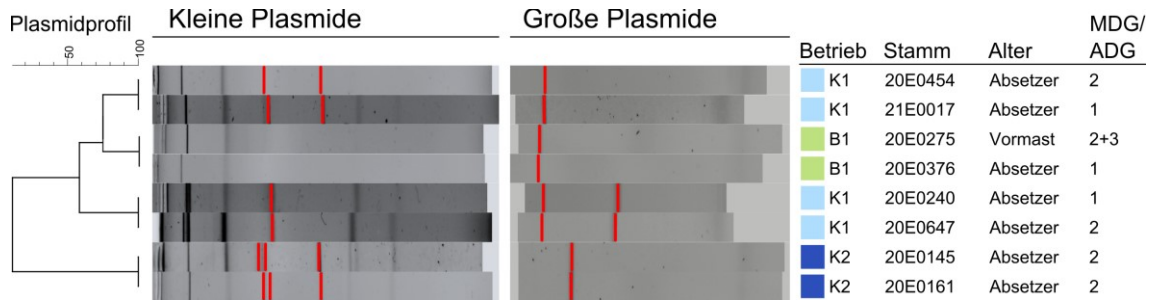
Subtypen der fünf Inc-Gruppen jeweils zusammengefasst; [n]: enthielt ein Stamm mehrere Subtypen derselben Inc-Gruppe, wurde nur ein Subtyp pro Stamm gezählt. Ergebnisse ermittelt mit PlasmidFinder.

4.7.3.2 Korrelation der Sequenz- und Gel-basiert ermittelten Plasmid-Profile

Die phylogenetische Ähnlichkeit der aus den Vollgenomsequenzen abgeleiteten Plasmid-Profile zweier Stämme fand sich in vielen Fällen in der großen Übereinstimmung ihrer Plasmid-DNA-Laufbanden in den Agarose-Gelen wieder (Vergleich Tabelle 42 und Abb. 71). Allerdings war es nicht möglich, spezifische Laufbanden mit einer bestimmten Plasmid-Inc-Gruppe bzw. einem Replikationsursprung zu korrelieren. Dies ist unter anderem in der variablen Plasmidgröße begründet, die sich je nach der Anzahl enthaltener Gene bei demselben Plasmidtyp um einige tausend Basenpaare unterscheiden kann.

Tabelle 42: Stammpaare mit identischen Sequenz-basierten Plasmid-Profilen

Betrieb	Stammpaar	Replikationsursprünge
K1	20E0454 / 21E0017	ColRNAI, FIB.AP001918, IncFII
B1	20E0376 / 20E0275	ColRNAI, FIB.AP001918, IncFII, IncFIA
K1	20E0240 / 20E0647	ColRNAI, FIB.AP001918, IncFII, Col.MG828, IncX1, IncX3
K2	20E0145 / 20E0161	Col.MG828, Col156, Col440I, IncY

**Abb. 71: Stammpaare mit identischen Gel-basierten Plasmid-Profilen**

MDG = Mastdurchgang; ADG = Absetzerdurchgang; Vergleich der Plasmidprofile basierend auf *Dice*-Koeffizienten; *Cluster* mit UPGMA erstellt (siehe 3.7.3).

4.7.3.3 Plasmid-kodierte Resistenzdeterminanten

Betrachtet man neben β -Laktamasen und FQ-RD (vergleiche Abb. 66) auch die anderen in der Vollgenomsequenzierung detektierten RD, waren diese meist Plasmid-kodiert (Abb. 72). Lediglich *tet*, *arsD* und die Genkassette *aac(6')-Ib-cr* / *bla_{OXA-1}* / *catB3* (siehe 4.7.4.2) waren eher chromosomal als auf Plasmiden kodiert. Die am häufigsten vorkommenden, Plasmid-kodierten RD richteten sich gegen viele in der Veterinär- sowie Humanmedizin oft verwendete Antibiotika-Klassen: Aminoglykoside (*aadA*, *aph*), Ampicilline (*bla_{TEM}*), Tetrazykline (*tet*) sowie Trimethoprim/Sulfonamid-Kombinationen (*dfrA*, *sul*) und gegen die hier als Selektionskriterien genutzten Cephalosporine (*bla_{CTX-M}*) sowie Fluorchinolone (*qnrS1*). Auch eine Quecksilberresistenz (*merC*) wurde bei vielen Stämmen identifiziert.

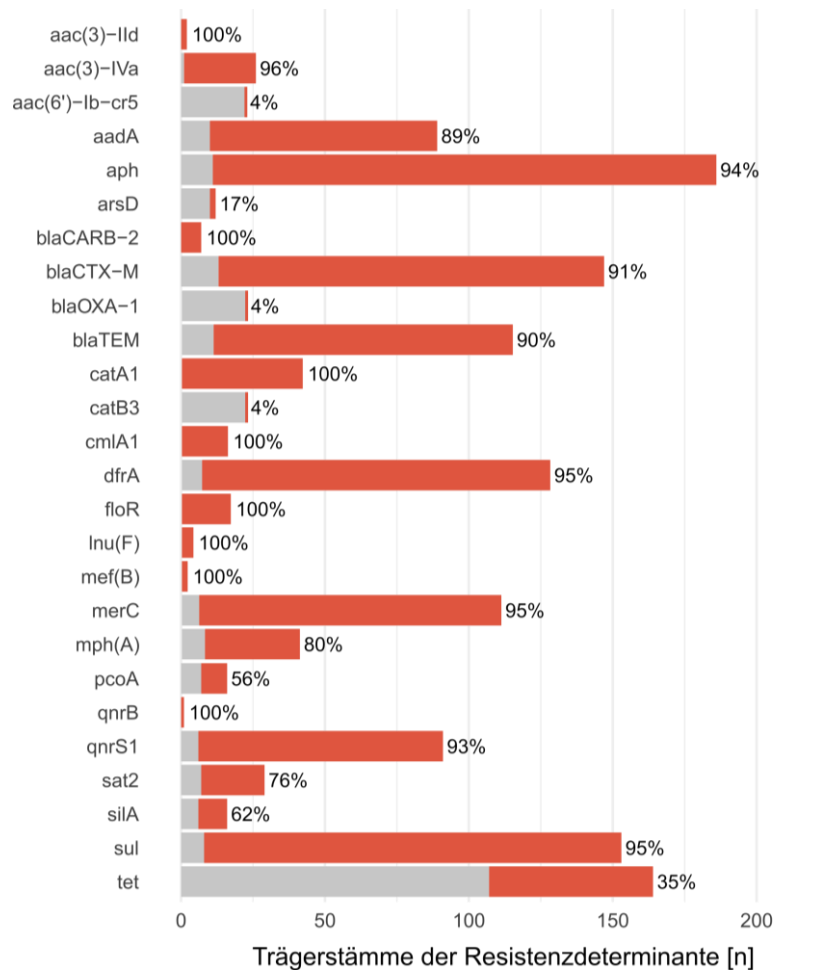


Abb. 72: Anzahl Plasmid-kodierter Vertreter jeder Resistenzdeterminante (RD)

Details siehe Abb. 68; nur Auflistung von RD, die ≥ 3 Mal in den sequenzierten Stämmen vorkamen; falls kein spezifisches Allel angegeben ist, wurden die verschiedenen Allele einer RD zusammengefasst.

4.7.3.4 Hinweise auf konservierte Kombinationen von Resistenzdeterminanten und Replikationsursprüngen

Abb. 73 stellt Verbindungen von RD und Plasmiden dar, wenn diese RD und der Replikationsursprung des Plasmids auf einem gemeinsamen *contig* kodiert waren. Viele RD waren auf diese Weise mit bestimmten Inc-Gruppen assoziiert. Dies traf z. B. auf 16 der 87 *bla*_{CTX-M-1}-Allele (18 %) zu, von denen ein Allel in der Nähe eines IncF- und die anderen 15 in der Nähe eines IncI1-Replikationsursprungs identifiziert wurden. Das FQR-enabler-Gen *qnrS1* kam meist auf IncX-Plasmidtypen vor, während die Silber- / Kupferresistenz-Genkassette *sil* / *pco* immer auf IncH-, IncI- γ - oder IncR-Plasmidtypen identifiziert wurde. Die Quecksilber-RD *merC* war stark mit IncFII-Replikationsursprüngen assoziiert. Die RD *dfrA*, *aadA* und *sul* kamen meist als Kombination (siehe 4.7.4.2) in der Nähe von IncX1- oder IncP6-Replikationsursprüngen vor, während *dfrA*, *aadA* und *tet* auf IncY-Plasmidtypen kodiert waren.

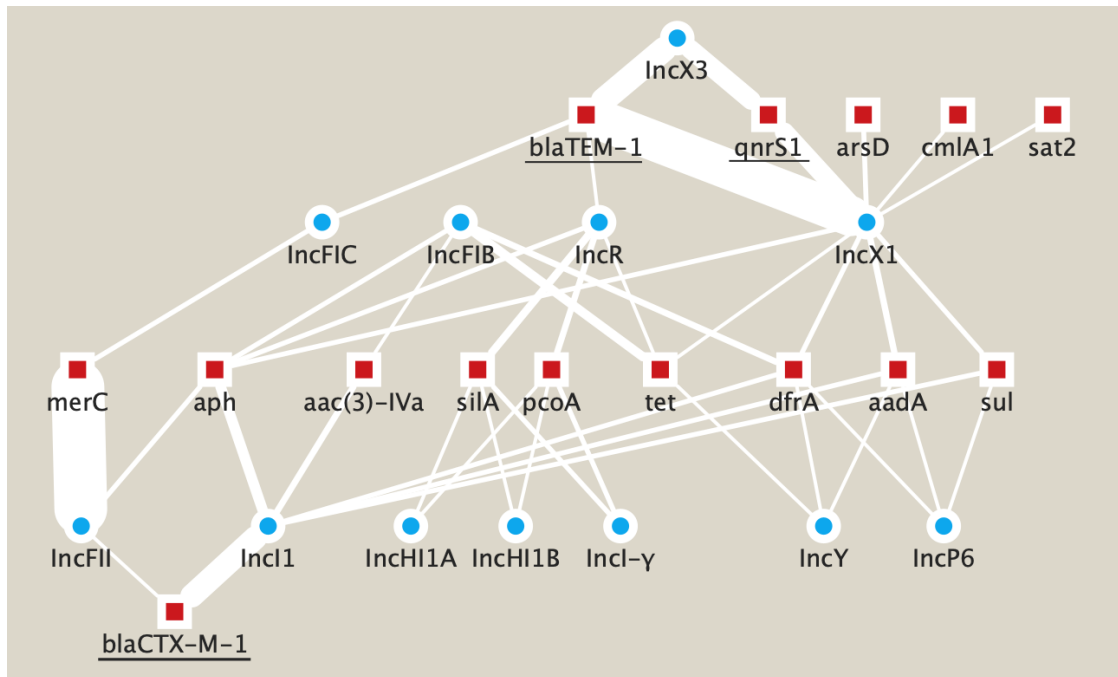


Abb. 73: Assoziationen von Resistenzdeterminanten und Plasmid-Inc-Gruppen
 Verbindungslinien = Resistenzdeterminante (RD) und Inc-Gruppe auf demselben *contig* kodiert; Stärke der Linie $\hat{=}$ Häufigkeit der Assoziation von RD und Inc-Gruppe; Resistenzen gegenüber Kupfer, Arsen, Silber und Quecksilber nur anhand der am häufigsten vorkommenden RD dargestellt, da meist mehrere RD gleicher Funktion gemeinsam in einem Stamm vorkamen; β -Laktamase- und FQR-*enabler*-Gene unterstrichen; Ergebnisse ermittelt mit PlasmidFinder und AMRFinderPlus.

Dieselbe Analyse wurde auch für alle Col-Replikationsursprünge durchgeführt, allerdings waren diese nicht mit RD assoziiert.

4.7.4 Persistenz der Cephalosporin- und Fluorchinolon-Resistenz

4.7.4.1 Persistente Cephalosporin- / Fluorchinolon-resistente *E. coli*-Stämme

Um die Persistenz von Stämmen basierend auf ihren ST zu beurteilen, wurden die bereits beim MLVA-Profil verwendeten Kriterien angewandt (siehe 4.6.3.1). In den Betrieben B1, B2 und K2 wurden *E. coli*-Stämme mit identischem ST an mindestens drei Beprobungszeitpunkten pro MDG isoliert (fortan als „MDGs-persistente ST“ bezeichnet; z. B. ST448 – Abb. 74). Stämme der meisten dieser ST waren darüber hinaus auch Betriebs-persistent, da sie zusätzlich aus mindestens einem weiteren MDG isoliert worden waren (fortan als „Betriebs-persistente ST“ bezeichnet; z. B. ST10, ST345, ST1775). Stämme anderer ST waren ebenfalls Betriebs-persistent, da sie mindestens einmal in drei oder mehr MDG detektiert worden waren (z. B. ST772). In Betrieb K1 wurden ST ebenfalls als Betriebs-persistent klassifiziert, wenn Stämme desselben STs aus mehr als einem Drittel der qualitativ analysierten Proben isoliert worden waren (ST58, ST617).

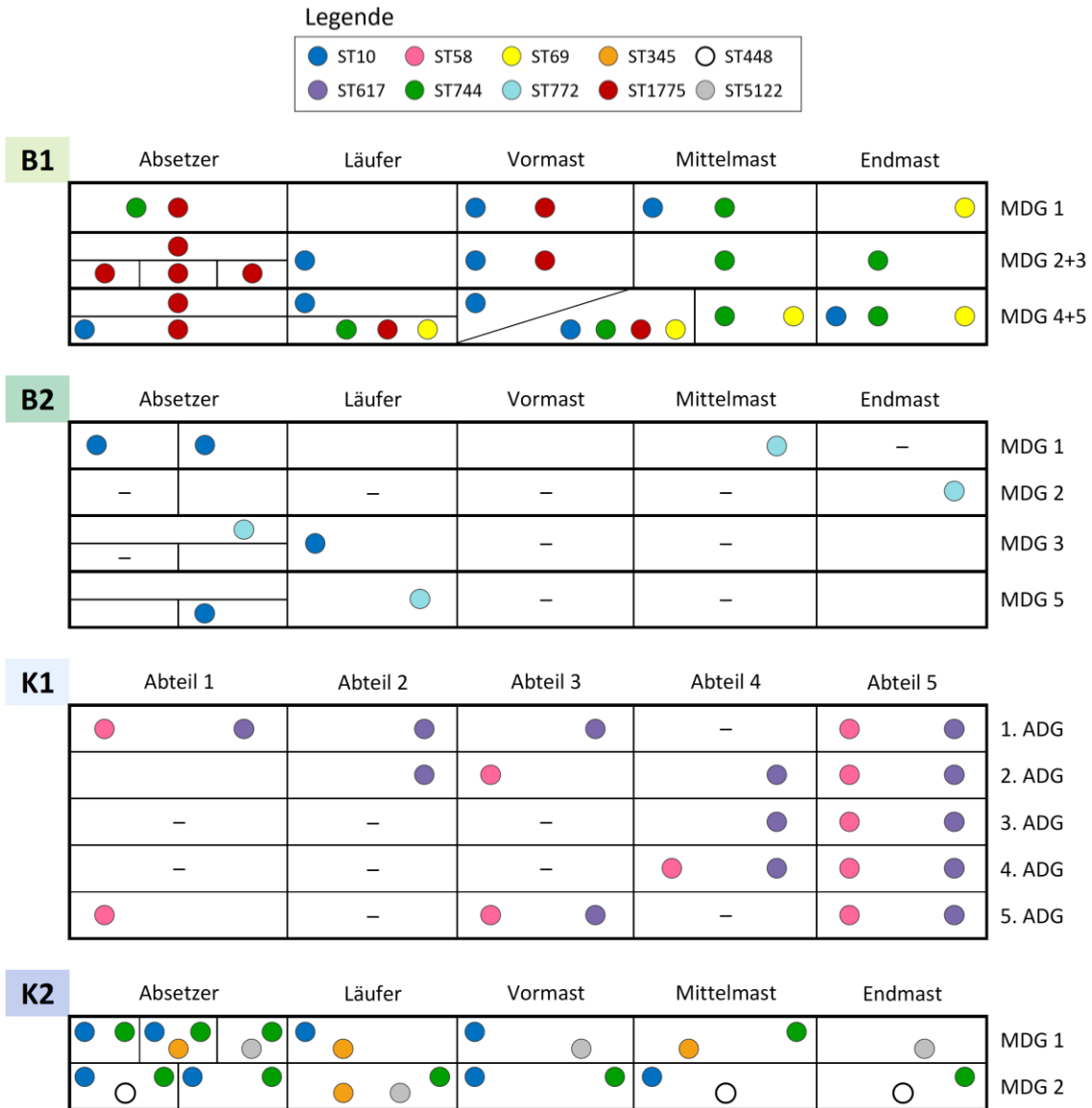


Abb. 74: Übersichtsgrafik zu persistenten Sequenztypen (ST)
 Aufbau der *heatmaps* siehe 4.5.4; Betrieb farbig markiert; farbiger Punkt = Mindestens ein Stamm des entsprechenden Betriebs-persistenten STs aus dieser Sammelkotprobe isoliert; Ring = Mindestens ein Stamm des MDGs-persistenten STs aus dieser Sammelkotprobe isoliert; MDG = Mastdurchgang; ADG = Absetzerdurchgang; – = keine CSRE / FQRE isoliert.

Die Betriebe B1 und K2 zeigten eine große Anzahl persistenter ST, während aus Betrieb B2 nur wenige persistente ST isoliert worden waren. Allerdings war die Anzahl isolierter CSRE / FQRE aus diesem Betrieb generell sehr gering. In Betrieb K1 wurden ebenfalls nur zwei Betriebs-persistente ST detektiert.

Um zu analysieren, wie sehr sich die Stämme eines persistenten STs über den Zeitraum, in dem sie isoliert worden waren, veränderten, wurden kSNP-Berechnungen durchgeführt. Dabei wurden alle potenziellen Stammpaarungen aus den Stämmen des STs, die aus einem Betrieb isoliert worden waren, gebildet und ihre kSNP-Differenzen berechnet. Die minimale kSNP-Differenz innerhalb eines STs lag meist im einstelligen Bereich, während die maximale kSNP-Differenz ohne deutliche Korrelation mit der Anzahl an Stämmen, die zum jeweiligen persistenten ST zählten, zwischen 22 (ST448) und 109.690 (ST10 aus Betrieb B2) variierte. Die mediane kSNP-Differenz war zu 69 % kleiner oder gleich 20. Lediglich zwei persistente ST aus Betrieb K2 (ST10 und ST744) stachen mit Werten im vierstelligen Bereich deutlich heraus (Tabelle 43).

Um anschließend zu überprüfen, wie sehr sich Stämme eines STs über ihren Persistenzzeitraum genetisch veränderten, wurde die kSNP-Differenz zwischen Stämmen dieses STs verglichen, die mit großem zeitlichen Abstand isoliert worden waren. Den kürzesten Zeitraum (weniger als drei Monate) zwischen der Erst- und Letztisolierung von Stämmen desselben STs wiesen zwei ST10-Stämme aus Betrieb B2 auf, deren kSNP-Differenz 10.823 betrug. Über den längsten Zeitraum (fast zehn Monate) wurden Stämme des ST744 aus Betrieb K2 detektiert, die lediglich 35 kSNP aufwiesen. Die kSNP-Differenz von Stämmen der am weitesten auseinanderliegenden Beprobungszeitpunkte lag bei fünf der 13 persistenten ST (38 %) im drei- bis vierstelligen Bereich, während die restlichen persistenten ST (62 %) kSNP-Differenzen zwischen fünf und 35 aufwiesen. Es zeigte sich damit kein Zusammenhang zwischen der zeitlichen Entfernung zweier Beprobungszeitpunkte und der kSNP-Differenz der aus den Proben isolierten Stämme desselben STs.

Tabelle 43: kSNP-Differenz zwischen Stämmen von persistenten Sequenztypen

Benennung und Zuordnung der Sammelkotproben siehe Abb. 18, Abb. 20 und Abb. 23.

Sequenz- typ	Betrieb	Stämme [n]	kSNP-Differenz ¹			Stämme des Sequenztyps aus Kotproben, deren Entnahmezeitpunkt am weitesten auseinander liegt				
			Median	Min. ²	Max. ³	Früheste SKP ⁴	– Datum	Späteste SKP	– Datum	kSNP Differenz
ST10	B1	10	7	1	7.241	Vormast 1	– 30.10.2019	Endmast 4+5	– 27.05.2020	6.507
	B2	4	15	4	109.690	Absetzer 1	– 18.09.2019	Absetzer 5	– 10.12.2019	10.823
	K2	11	6.729	3	12.733	Absetzer 1	– 09.09.2019	Mittelmast 2	– 25.05.2020	9.047
ST58	K1	13	48	4	459	Absetzer 1.1 ⁵	– 11.09.2019	Absetzer 5.5 ⁶	– 26.02.2020	18
ST69	B1	10	11	5	48	Läufer 5	– 03.02.2020	Endmast 4+5	– 27.05.2020	5
ST345	K2	6	26	8	3.432	Absetzer 1	– 09.09.2019	Läufer 2	– 17.03.2020	2.674
ST448	K2	3	13	13	22	Absetzer 2	– 14.01.2020	Endmast 2	– 07.07.2020	22
ST617	K1	22	12	1	594	Absetzer 1.1	– 11.09.2019	Absetzer 5.5	– 26.02.2020	11
ST744	B1	13	16	3	2.224	Absetzer 1	– 24.09.2019	Endmast 4+5	– 27.05.2020	14
	K2	29	1.233	2	2.219	Absetzer 1	– 09.09.2019	Endmast 2	– 07.07.2020	35
ST772	B2	11	10	2	707	Aussortierte Absetzer 2	– 29.10.2019	Endmast 2	– 11.03.2020	5
ST1775	B1	11	20	5	809	Absetzer 1	– 24.09.2019	Mittelmast 4 / Vormast 5	– 24.02.2020	601
ST5122	K2	4	14	11	28	Absetzer 1	– 09.09.2019	Läufer 2	– 17.03.2020	11

¹kSNP-Differenz = Anzahl an k-mer-basierten Einzelnukleotid-Polymorphismen zwischen zwei Stämmen;

²Min. = Minimale kSNP-Anzahl zwischen den Stämmen des STs;

³Max. = Maximale kSNP-Anzahl zwischen den Stämmen des STs;

⁴SKP = Sammelkotprobe;

⁵Absetzer 1.1 = Absetzer des ersten Absetzerdurchgangs aus Abteil 1;

⁶Absetzer 5.5 = Absetzer des fünften Absetzerdurchgangs aus Abteil 5.

Beispiele Betriebs-persistenter ST

B1 – Der Betriebs-persistente ST1775 setzte sich aus elf CSRE zusammen, von denen ein Stamm (20E0055) auch FQR war. Die CSR war Plasmid-vermittelt und wurde bei neun Stämmen durch *bla*_{CTX-M-15} kodiert. Diese Stämme wiesen untereinander eine meist niedrige kSNP-Differenz auf (10 – 20 kSNP), obwohl sie aus unterschiedlichen MDG und Altersstufen isoliert worden waren (Abb. 75). Die anderen beiden Stämme (20E0179 und 20E0231) waren Träger von *bla*_{CTX-M-1} und wiesen eine erhöhte kSNP-Differenz gegenüber den restlichen Stämmen des STs auf. Gleichzeitig hatten sie ein anderes genetisches Resistenz- sowie Plasmid-Profil. Daher ist unter anderem ein horizontaler Gentransfer mit der Aufnahme eines *bla*_{CTX-M-1}-kodierenden Plasmids sowie vorausgegangenen bzw. anschließenden chromosomalen Anpassungen möglich.

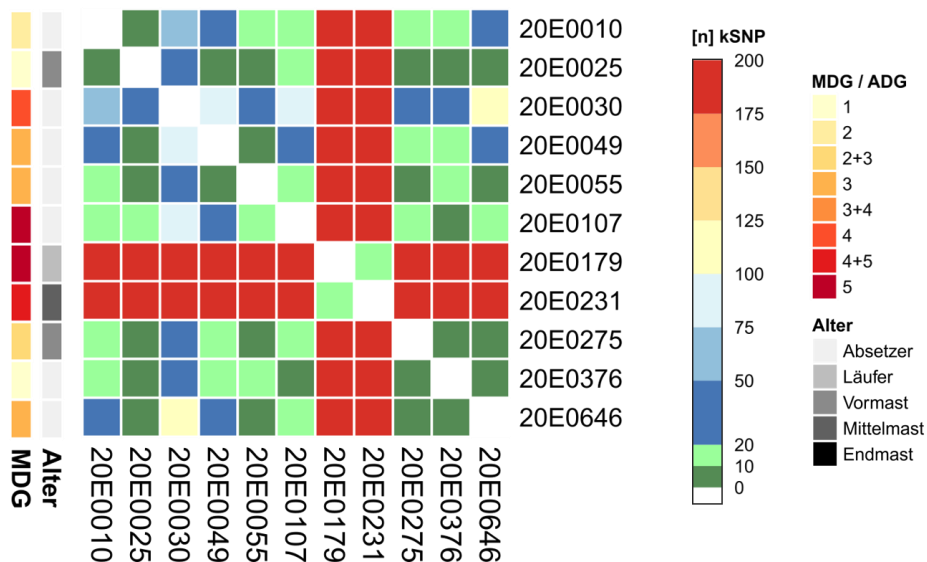


Abb. 75: kSNP-Distanz des Betriebs-persistenten Sequenztyps 1775 aus Betrieb B1

kSNP = *k-mer*-basierte Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP);
 MDG = Mastdurchgang; ADG = Absetzerdurchgang.

Bei ST1775-Stämmen, die Träger von *bla*_{CTX-M-15} waren, waren in unmittelbarer Nähe dieser RD auch *qnrS* und mehrere Insertionssequenzen sowie Transposasen auf den *contigs* kodiert (Abb. 76), die von PLATON als Plasmid-assoziiert klassifiziert wurden. In fünf Stämmen lagen auf dem jeweiligen *contig* zudem noch die Gene für ein Toxin-Antitoxin-System.

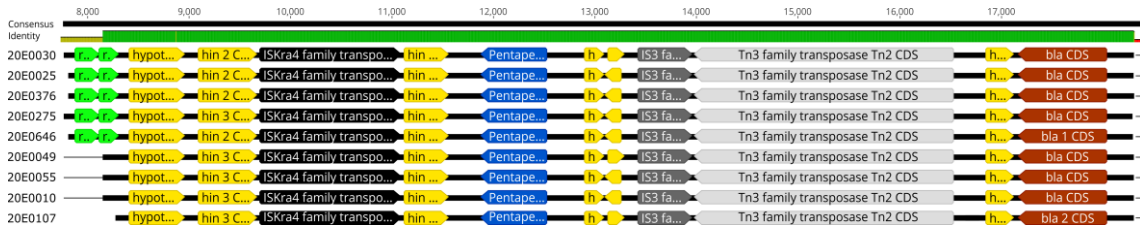


Abb. 76: MAUVE-Alignierung der konservierten *bla*_{CTX-M-15}- und *qnrS*-Resistenzregion von Sequenztyp 1775

Blaue Annotation = *qnrS*; dunkelrot = *bla*_{CTX-M-15}; grau und schwarz = Insertionssequenzen und Transposasen; neongrün = *reIB-reIE* Toxin-Antitoxin-System; grüner Balken = 100 % Sequenzhomologie; Grafik in Geneious prime unter Verwendung der Annotations-Anwendung erstellt.

B2 – ST772-Stämme wurden in jedem MDG einmal, jedoch nie mehrmals pro MDG isoliert (Abb. 74). Von den elf zugehörigen Stämmen waren neun FQRE, die alle *qnrS*-positiv waren. Fünf davon zeigten zusätzlich eine *gyrA* S83L-Mutation. Die anderen beiden Stämme, 20E0124 und 20E0374, waren hingegen weder resistent gegenüber FQ noch gegenüber CS3/4 (siehe 4.6.4.1). Sie bildeten eine homogene Subpopulation, während die restlichen Stämme untereinander ebenfalls eine sehr niedrige kSNP-Differenz aufwiesen (Abb. 77). Die Stämme 20E0162 und 20E0163 wiesen gar keinen kSNP-Unterschied auf und stellen eins der potenziellen Dubletten-Paare dar (siehe 4.7.1.1). Trotz der zwei Subpopulationen waren alle ST772-Stämme Träger von ColRNAI, Inc11 α , IncX1 sowie IncX3 und hatten ein größtenteils übereinstimmendes RD- sowie Virulenzgen-Profil. Lediglich die zwei FQ-suszeptiblen Stämme wiesen 14 zusätzliche Schwermetall- und acht zusätzliche Antibiotika-RD sowie zusätzliche Virulenzfaktoren auf. Ihnen fehlten zwar die Replikationsursprünge Col.MG828, Col440II und IncFIB.AP001918, über die die anderen Stämme verfügten, dafür hatten sie aber zusätzliche IncFIB- und IncFII-Replikationsursprünge.

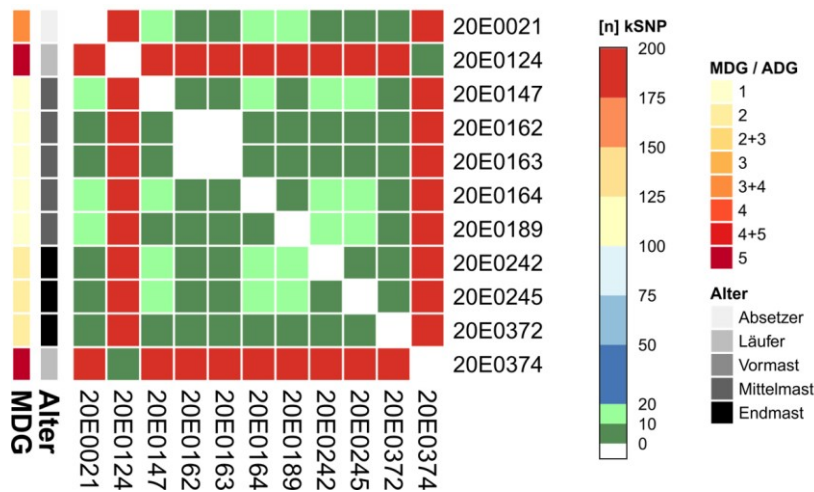


Abb. 77 kSNP-Distanz des Betriebs-persistenten Sequenztyps 772 aus Betrieb B2
Abkürzungen siehe Abb. 75.

Bei den Stämmen von ST772 war *bla*_{TEM} in unmittelbarer Nähe von *qnrS* auf Plasmid-assoziierten *contigs* kodiert (Abb. 78). Obwohl der ST aus zwei Subpopulationen bestand, war diese Sequenz in allen Stämmen identisch, wenn auch das *contig* von 20E0124 nicht das komplette *bla*_{TEM} abbildete.

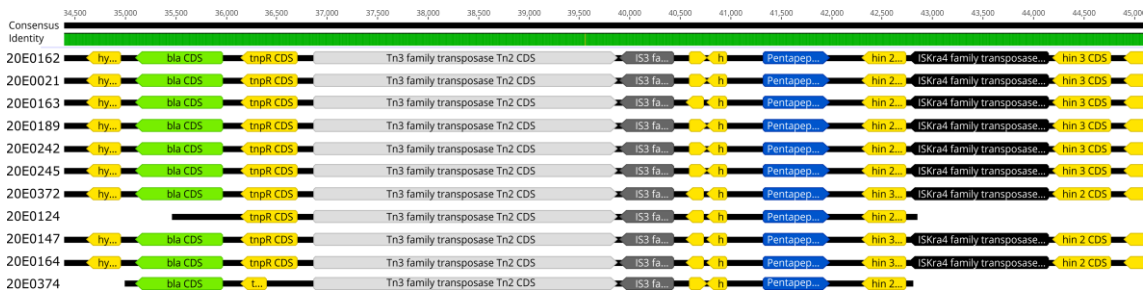


Abb. 78: MAUVE-Alignierung der konservierten *bla*_{TEM}- und *qnrS*-Resistenzregion von Sequenztyp 772
Hellgrüne Annotation = *bla*_{TEM}; weitere Details siehe Abb. 76.

K1 – Die ST617-Stämme waren größtenteils sehr homogen und bildeten kaum Subpopulationen, obwohl die 22 zugehörigen Stämme aus allen Absetzerdurchgängen und allen fünf Abteilen des Betriebs isoliert worden waren (Abb. 79). Das bei allen vorhandene *bla*_{CTX-M-15}-Allel sowie die vier QRDR-Mutationen in *gyrA* (D87N und S83L), *parC* (S80I) und *parE* (S458A) zusammen mit dem *enabler*-Gen *aac(6′)-Ib-cr* vermittelten den Stämmen ihre CS- sowie FQ-Resistenz. Auch sonst hatten Stämme des ST617 ein extrem homogenes genotypisches Resistenz-Profil, das sich phänotypisch in der Resistenz gegenüber acht bzw. neun verschiedenen AB zeigte. Alle waren Träger der Replikationsursprünge ColRNAI, IncFIB.AP001918 und IncFII. Wenige Stämmen trugen einen zusätzlichen IncI1α- oder IncN-Replikationsursprung und wiesen teils zusätzliche RD auf.

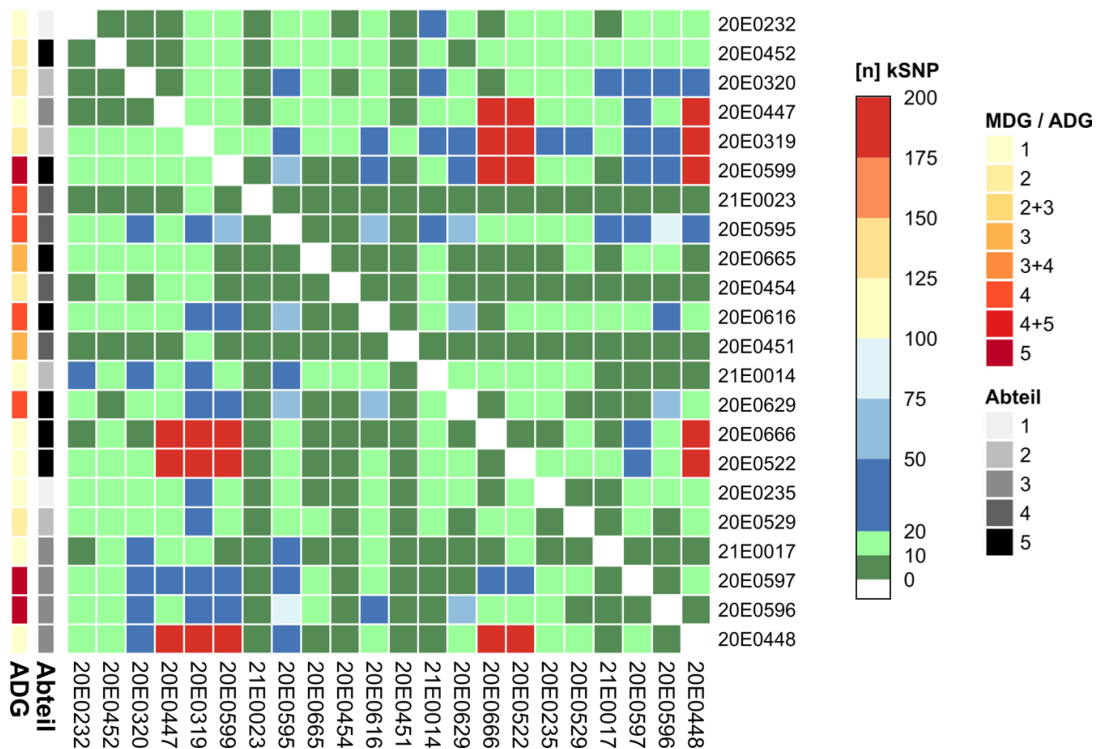


Abb. 79: kSNP-Distanz des Betriebs-persistenten Sequenztyps 617 aus Betrieb K1
Abkürzungen siehe Abb. 75.

Neben einer in allen Stämmen identischen *bla*_{CTX-M-15}-Resistenzregion verfügten die Stämme über die stark konservierte, in der Nähe eines Insertionselements kodierte Genkassette *aac(6′)-Ib-cr / bla*_{OXA-1} / *catB3* (Abb. 80; siehe 4.7.4.2). Bei 20E0447, 20E0448 und 20E0522 war das *contig* abgeschnitten, sodass das *catB3* nicht vollständig dargestellt wurde. Laut AMRFinderPlus sind sie aber Träger von *catB3* und liegt das Gen auf demselben *contig* wie *aac(6′)-Ib-cr* und *bla*_{OXA-1}.

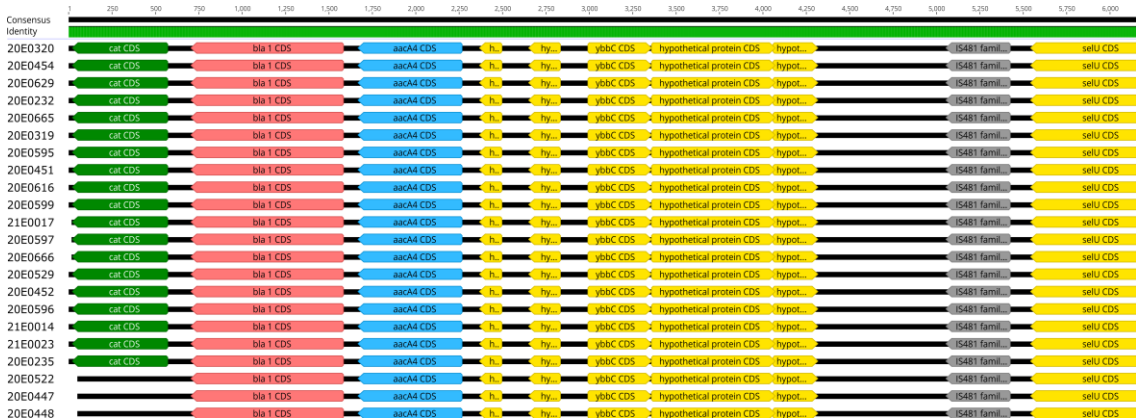


Abb. 80: MAFFT-Alignierung der konservierten *aac(6′)-Ib-cr / bla*_{OXA-1} / *catB3*-Genkassette von Sequenztyp 617

Dunkelgrüne Annotation = *catB3*; rosa = *bla*_{OXA-1}; hellblau = *aac(6′)-Ib-cr*;
weitere Details siehe Abb. 76.

K2 – Das ST744-*cluster* bestand aus 29 Stämmen mit mehreren Subpopulationen, von denen 25 CS- und FQ-resistent waren, während vier Stämme nur FQR waren. Der Resistenzstatus hatte allerdings keinen Einfluss auf ihre kSNP-Differenz (Abb. 81). Das *bla*_{CTX-M}-Allel hingegen, das die CSR vermittelte, korrelierte teilweise mit der Klonalität der Stämme. Elf teils heterogene Stämme waren *bla*_{CTX-M-1}-positiv, während die neun *bla*_{CTX-M-15}- und die fünf *bla*_{CTX-M-55}-positiven Stämme untereinander deutlich niedrigere kSNP-Differenzen aufwiesen. In allen Stämmen war die FQR durch die Mutationen in *gyrA* (D87N und S83L) sowie *parC* (A56T und S80I) kodiert. Alle *bla*_{CTX-M-15}-positiven sowie sechs weitere ST744-Stämme waren darüber hinaus *qnrS*-positiv, während 15 Stämme Träger von *bla*_{TEM} waren. Die diversen RD-Profile spiegeln sich in der großen Anzahl unterschiedlicher Replikationsursprünge von 15 verschiedenen Inc-Gruppen wider, die in den ST744-Stämmen vorkamen.

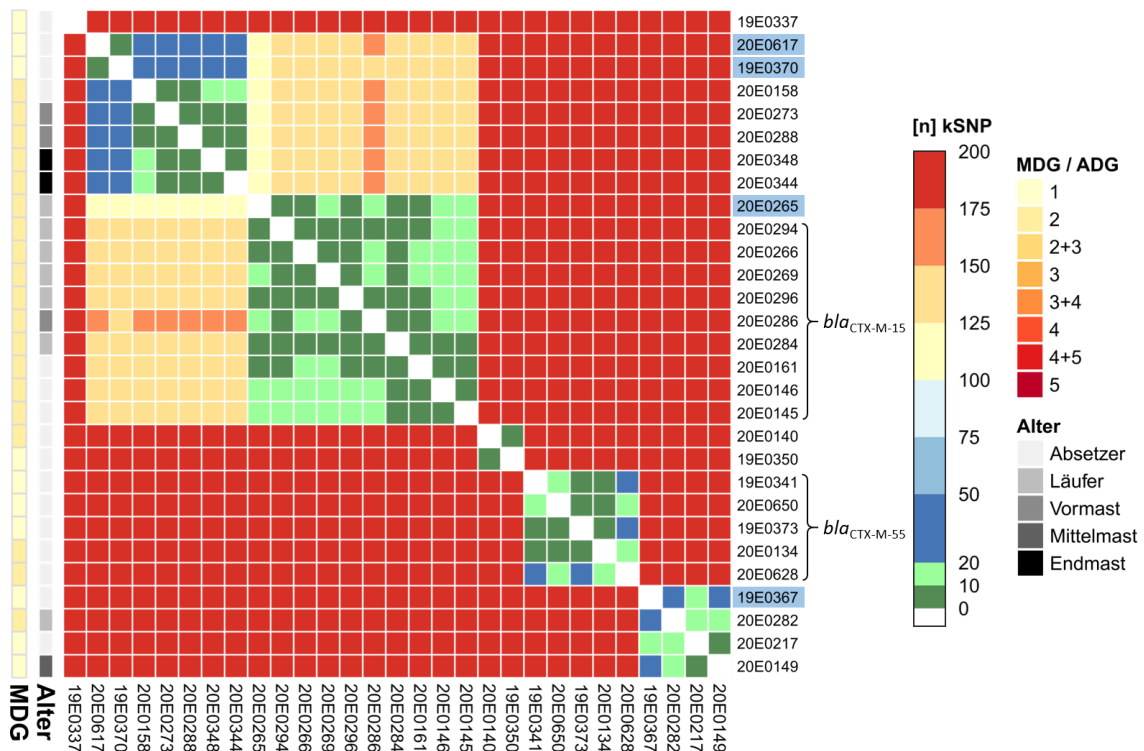


Abb. 81: kSNP-Distanz des Betriebs-persistenten Sequenztyps 744 aus Betrieb K2
Blau hinterlegte Stämme = nur Fluorchinolon-, nicht Cephalosporin-resistent;
Abkürzungen siehe Abb. 75.

Trotz der Vielfältigkeit der RD-Profile war bei allen *bla*_{CTX-M-15}-positiven ST744-Stämmen die Sequenzumgebung dieser RD auf den Plasmid-assoziierten *contigs* stark konserviert. Strangabwärts war *qnrS* kodiert, strangaufwärts *bla*_{TEM}, dazwischen lagen mehrere Insertionssequenzen und Transposasen. *Bla*_{CTX-M-55} war in allen Trägerstämmen mit einem Toxin-Antitoxin-System assoziiert, trug aber strangabwärts dieselbe Insertionssequenz wie *bla*_{CTX-M-15} (Abb. 82).

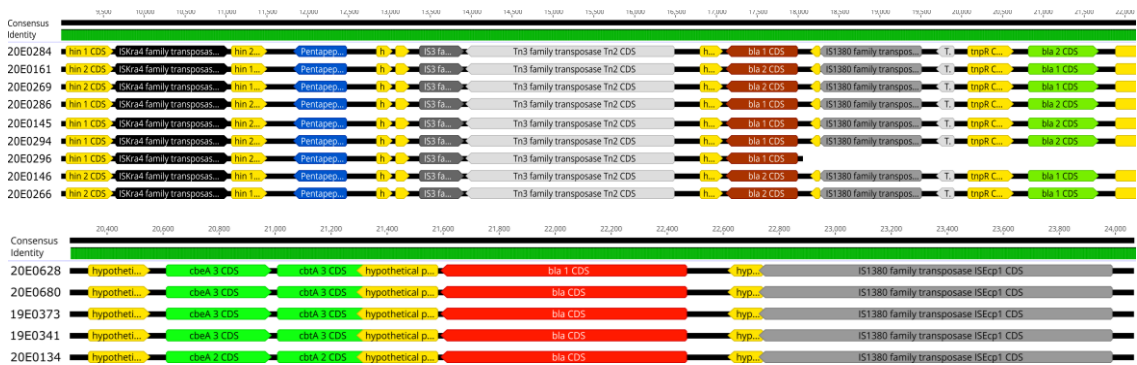


Abb. 82: MAUVE-Alignierung der konservierten *qnrS*-, *bla*_{CTX-M-15}- und *bla*_{TEM}-Resistenzregion (oben) und MAFFT-Alignierung der konservierten *bla*_{CTX-M-55}-Resistenzregion (unten) von Sequenztyp 744

Hellgrüne Annotation = *bla*_{TEM}; hellrote = *bla*_{CTX-M-55}; neongrün = *cbeA-cbtA* Toxin-Antitoxin-System; weitere Details siehe Abb. 76.

In vielen Fällen blieb demnach die Resistenz eines persistenten Stammes sowie die genetische Umgebung der entsprechenden RD über einen langen Zeitraum erhalten. Es kamen aber auch sehr unterschiedliche Resistenzumgebungen desselben Gens in persistenten Stämmen mit niedriger kSNP-Varianz vor (Abb. 83).

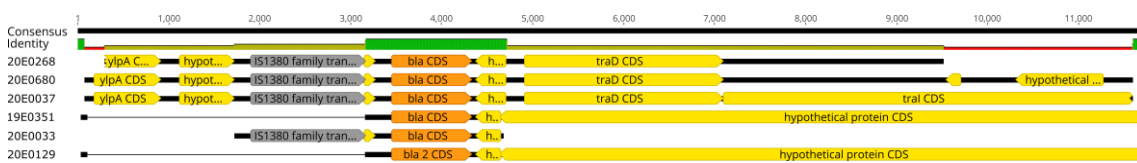


Abb. 83: MAUVE-Alignierung der *bla*_{CTX-M-1}-Resistenzregion von Sequenztyp 345
Orangene Annotation = *bla*_{CTX-M-1}; weitere Details siehe Abb. 76.

4.7.4.2 Persistenz genetischer Elemente

Persistente Plasmide – Einige Stämme aus persistenten ST trugen an den verschiedenen Beprobungszeitpunkten, an denen sie isoliert worden waren, laut PlasmidFinder dieselben Replikationsursprünge. Teilweise konnte in diesen Stämmen basierend auf der Plasmid-MLST-Analyse (pMLST) sogar der identische Plasmid-Sequenztyp nachgewiesen werden. Diese Persistenz von Plasmiden zeigte sich auch in ihrem teils über mehrere Monate unveränderten, Gel-basierten Plasmid-Profil (Abb. 84; 20E0225 isoliert am 17.02.2020 / 20E0347 isoliert am 07.07.2020).

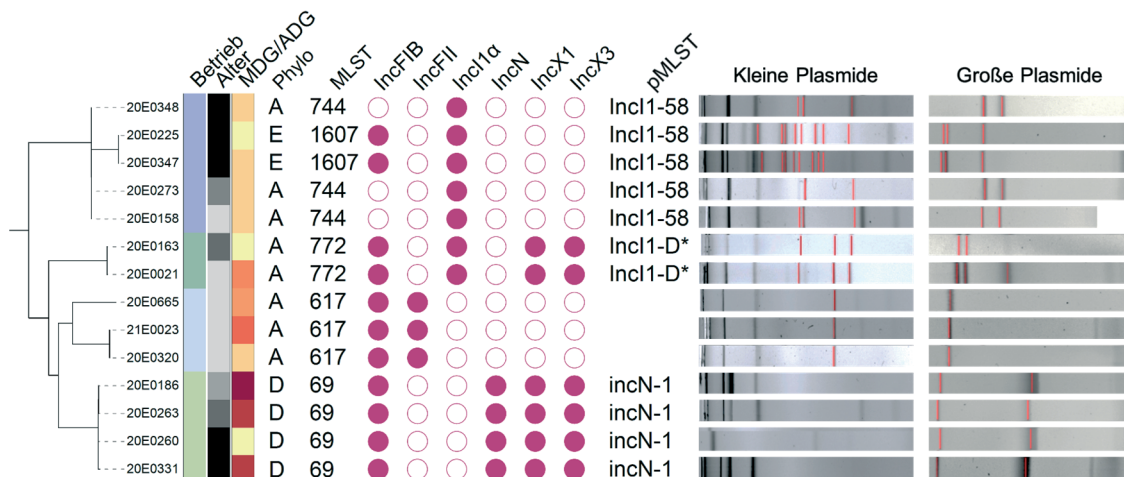


Abb. 84: Plasmid-Profil persistenter Stamm-Plasmid-Kombinationen

Plasmidbanden in den Agarose-Gelen rot markiert; MDG = Mastdurchgang; ADG = Absetzerdurchgang; Phyllo = Phylogruppe; pMLST = Plasmid-MLST; * = Bei der pMLST wurden Allelkombinationen, die keinem Plasmid-Sequenztyp zugewiesen wurden, aber bei mehreren Stämmen auftraten, Buchstaben zugeordnet.

Persistente Genkassetten – Bei der Sequenzanalyse der Resistenz-Profile fiel auf, dass einige RD stets zusammen auf denselben *contigs* kodiert waren (siehe auch Abb. 87). So konnten Resistenz-Genkassetten, also in unterschiedlichen Stämmen vorkommende, im Chromosom oder auf einem Plasmid nah beieinander kodierte RD, identifiziert werden. Dazu gehörte die Genkassette *aac(6′)-Ib-cr / bla_{OXA-1} / catB3*, die Silber- / Kupferresistenz-Genkassette *sil / pco*, die Aminoglykosid-Cotrimoxazol-Resistenzkassette *aadA5 / dfrA17 / sul1* und die Aminoglykosid-Sulfonamid-Resistenzkassette *sul2 / aph(6)-Ia / aph(3′′)-Ib*. Die enthaltenen Genkombinationen sowie ihre Sequenzumgebung waren meist stark konserviert.

Die Genkassette *aac(6′)-Ib-cr / bla_{OXA-1} / catB3* war in allen ST617-Stämmen aus Betrieb K1 (n = 22) und einem ST167-Stamm aus Betrieb K2 nachweisbar. Damit kam die Genkassette in der Hälfte der aus dem erstgenannten Betrieb sequenzierten Stämme vor.

Strangaufwärts der Kasette kam es bei der Sequenzierung immer zum *contig*-Abbruch, was ein Hinweis auf ein mobiles genetisches Element wie ein Insertionselement oder eine Transposase sein kann.

Persistente Fluorchinolon- / Cephalosporin-Resistenzdeterminanten – In den Betrieben B1, B2 und K2 war *bla*_{CTX-M-1} weit verbreitet (Abb. 85). Während die RD in Betrieb B1 vor allem während der Mast auftrat, war sie in den Betrieben B2 und K2 über alle Altersstufen hinweg vorzufinden. In Betrieb K1 war hingegen nur ein Stamm Träger von *bla*_{CTX-M-1}. *bla*_{CTX-M-15} wurde vor allem bei Jungtieren detektiert, trat aber nicht in der Mittel- und Endmast auf. Diese RD wurde über alle Betriebe hinweg lediglich fünf verschiedenen ST zugeordnet, während *bla*_{CTX-M-1}-positive Stämme einer Vielzahl verschiedener STs angehörten. Innerhalb einer SKP wurde *bla*_{CTX-M-1} zudem oft in Stämmen mehrerer ST gefunden, was bei *bla*_{CTX-M-15} nie der Fall war.

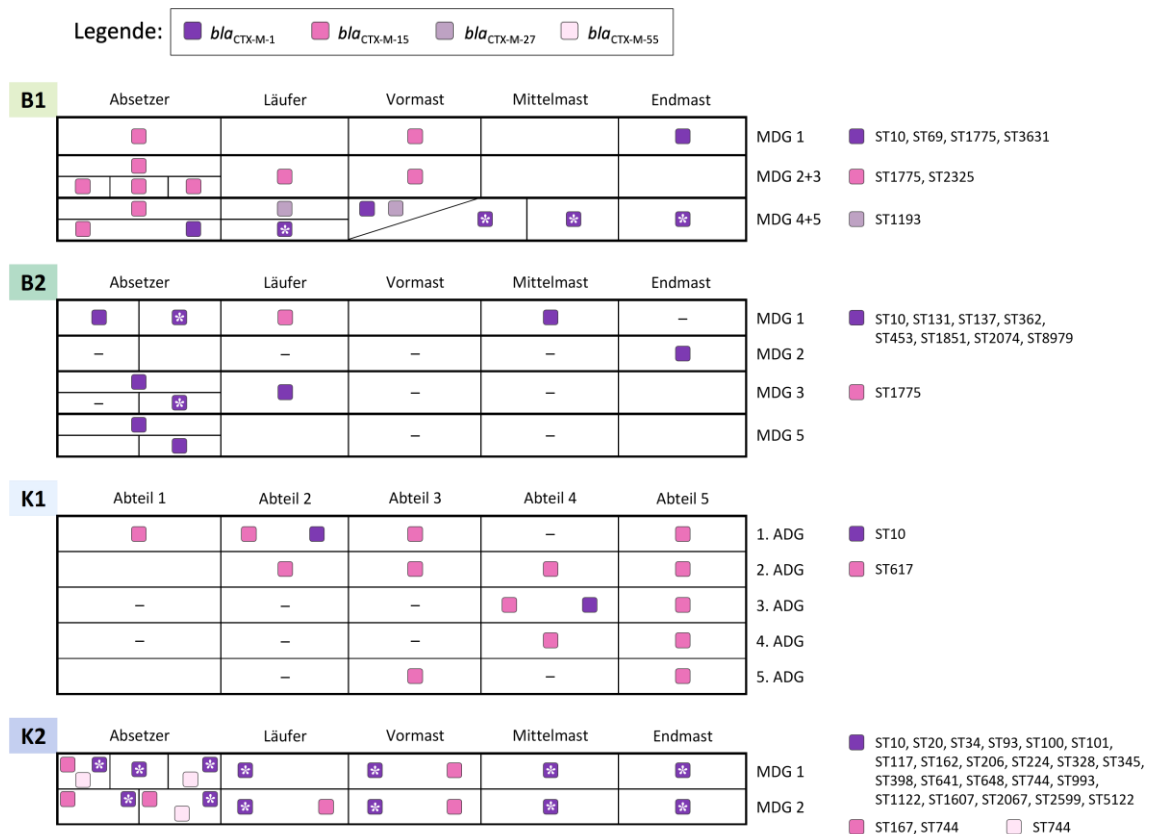


Abb. 85: Übersichtsgrafik zu persistenten CS-Resistenzdeterminanten (RD)
 Aufbau der *heatmaps* siehe 4.5.4; Betrieb farblich markiert; Ergebnisse ermittelt mit LEC-LAMP-PCR, ergänzt durch Allel-Spezifizierung und ST-Ergebnisse aus der Vollgenomsequenzierung; farbiges Quadrat = Mindestens ein Stamm mit der entsprechenden RD aus dieser SKP isoliert; rechts angegebene ST = ST aller Träger-Stämme der RD im jeweiligen Betrieb; * im Quadrat = Träger-Stämme wurden mehr als einem ST zugeordnet; MDG = Mastdurchgang; ADG = Absetzerdurchgang; – = keine CSRE / FQRE isoliert.

Auch das FQR-*enabler*-Gen *qnrS* wurde auf allen Betrieben detektiert, während *aac(6′)-Ib-cr* fast ausschließlich in Betrieb K1 vorkam und zusätzlich nur in einem Stamm von Betrieb K2 auftrat (Abb. 86). Vor allem in Betrieb K2 und in geringerem Ausmaß auch in den anderen Betrieben gehörten Träger-Stämme von *qnrS* zu vielen verschiedenen ST, während *aac(6′)-Ib-cr*-positive Stämme pro Betrieb nur einem ST zugeordnet wurden. In Betrieb K2, aber auch in den Betrieben B1 und K1, waren Stämme mehrerer ST in einer Kotprobe *qnrS*-positiv.

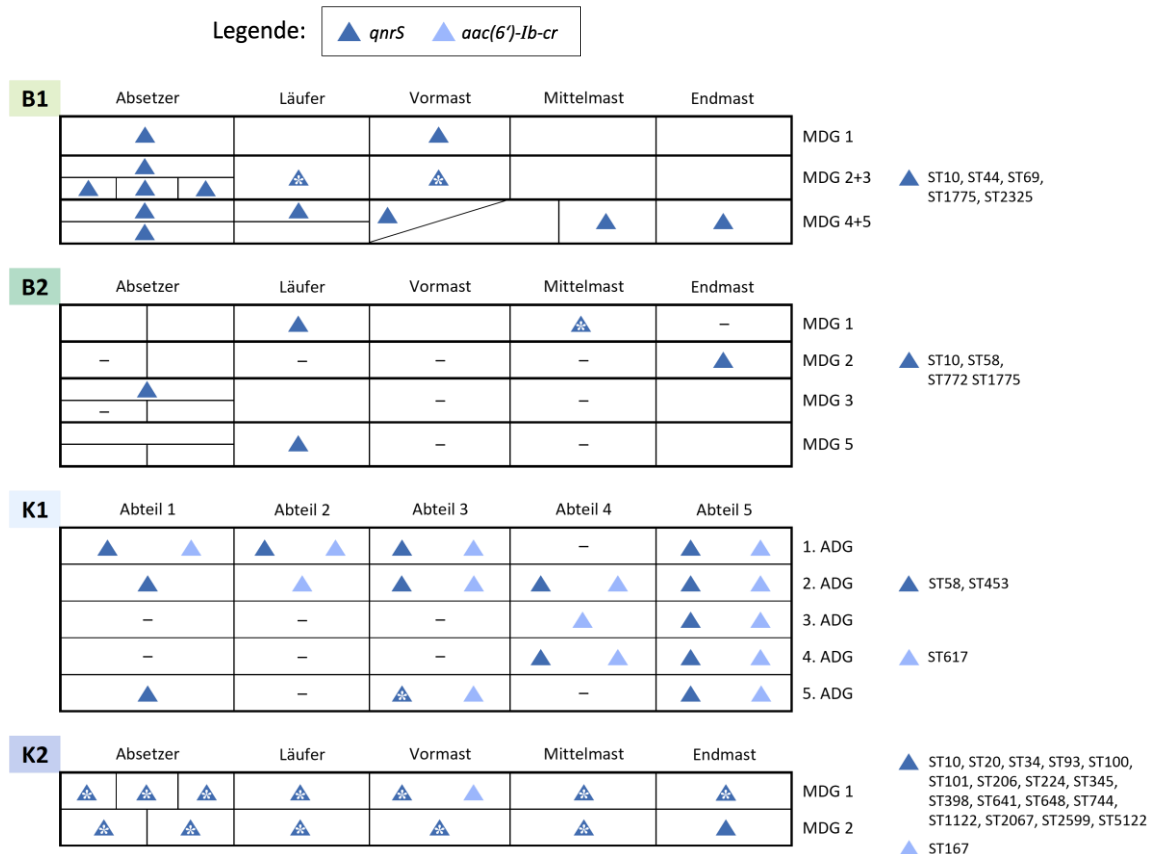


Abb. 86: Übersichtsgrafik zu persistenten FQ-Resistenzdeterminanten (RD)
 Aufbau der *heatmaps* siehe 4.5.4; Betrieb farblich markiert; Ergebnisse ermittelt mit *qnr*-Multiplex-PCR und PMQR2-Triplex-PCR, ergänzt durch ST-Ergebnisse aus der Vollgenomsequenzierung; farbiges Rechteck = Mindestens ein Stamm mit der entsprechenden RD aus dieser SKP isoliert; rechts angegebene ST = ST aller Träger-Stämme der RD im jeweiligen Betrieb; * im Dreieck = Träger-Stämme wurden mehr als einem ST zugeordnet; MDG = Mastdurchgang; ADG = Absetzerdurchgang; - = keine CSRE / FQRE isoliert.

Da nicht alle Stämme sequenziert wurden, die obenstehenden Grafiken aber basierend auf den Ergebnissen der Vollgenomsequenzierung ergänzt wurden, konnte nicht für alle gezeigten RD ermittelt werden, ob sie in einer Kotprobe von Stämmen mehrerer ST kodiert wurden.

4.7.4.3 Zur Persistenz von Resistenzdeterminanten beitragende Faktoren

Ko-Selektion

Sind RD nah beieinander auf demselben genetischen Element kodiert, ist ihre Ko-Selektion wahrscheinlicher. Verbindet man daher zwei RD, die nicht weiter als 10.000 bp voneinander entfernt auf demselben *contig* kodiert waren, so entsteht ein intensives Geflecht von Resistenzgenen gegenüber den verschiedensten AB (Abb. 87). Dabei wurde nicht unterschieden, ob die RD Plasmid-kodiert waren oder im Chromosom vorkamen. Einige RD kamen besonders häufig gemeinsam vor (siehe 4.7.4.2). Die Cephalosporinase-Gene *bla*_{CTX-M-1} und *bla*_{CTX-M-15} waren beispielsweise oft mit dem FQR-enabler *qnrS1* assoziiert. Dabei kam *bla*_{CTX-M-15} gemeinsam mit *qnrS1* häufig in der Nähe der Sulfonamid-RD *sul2*, der Aminoglykosid-RD *aph(6)-Ia* und *aph(3'')-Ib*, der Penicillin-RD *bla*_{TEM-1} sowie der Chloramphenicol- / Florfenicol-RD *floR* vor. Das β -Laktamase-Gen *bla*_{CTX-M-1} war hingegen mit der Makrolid-RD *mph(A)* assoziiert. All diese Gene waren wiederum in der direkten Sequenznachbarschaft anderer RD gegenüber weiteren AB kodiert.

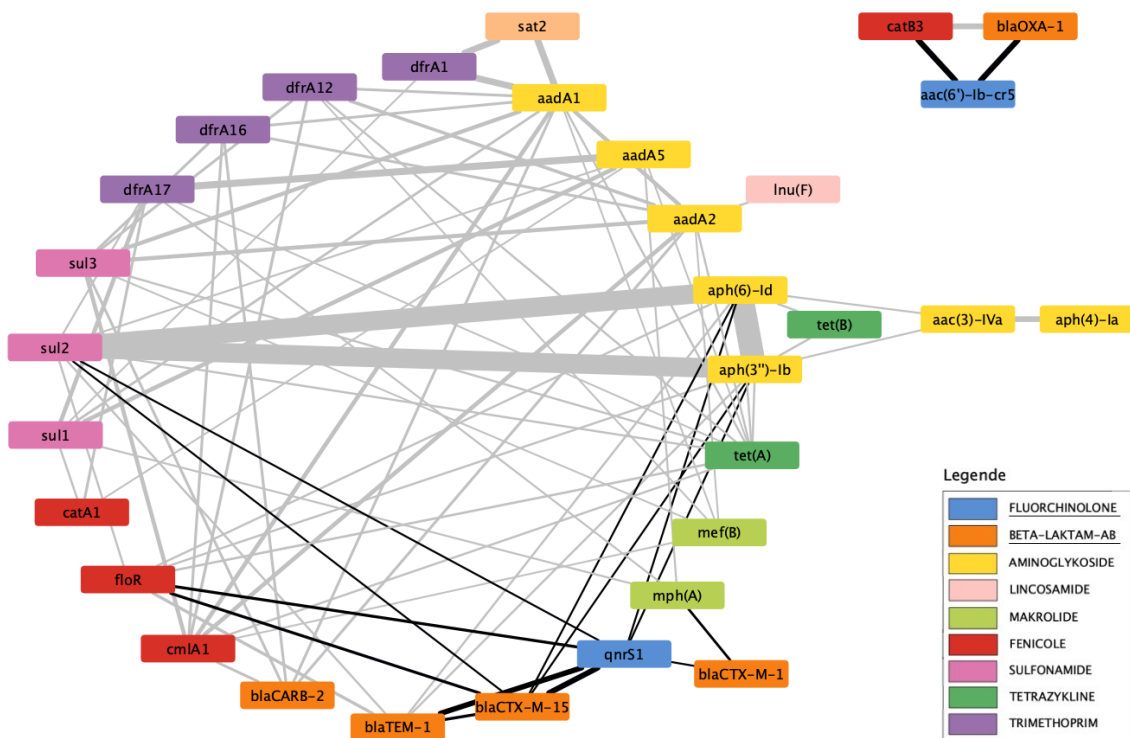


Abb. 87: Durch Sequenznachbarschaft korrelierte Resistenzdeterminanten (RD)
 Verbindungslinien = RD mehr als ein Mal in der Nähe von 10.000 bp zueinander auf einem *contig* kodiert; Stärke der Linie $\hat{=}$ Häufigkeit, mit der sich RD in Sequenznachbarschaft befanden; schwarze Linien = mit FQ- bzw. CS-RD assoziierte RD; Ergebnisse ermittelt mit AMRFinderPlus.

Kreuz-Resistenz

RD, die Resistenz gegenüber CS3/4 vermitteln, vermitteln auch Resistenz gegenüber CS der ersten und zweiten Generation sowie gegenüber Penicillinen. Betrachtet man in diesem Zusammenhang den Einfluss diverser β -Laktamasen auf den Ampicillin-Resistenzstatus der Trägerstämme, so korreliert das Vorkommen der durch das Programm AMRFinderPlus definierten bla_{CTX-M} -Allele immer mit dieser Resistenz. Dabei kam $bla_{CTX-M-1}$ sogar fast so häufig wie bla_{TEM-1} bei Ampicillin-resistenten Stämmen vor (Abb. 88). Die Gene $bla_{CTX-M-15}$, bla_{OXA-1} , $bla_{CTX-M-55}$ sowie $bla_{CTX-M-27}$ traten mit abnehmender Häufigkeit in diesen Stämmen auf, was allerdings mit ihrem generellen Vorkommen im Datensatz übereinstimmt. Die Träger unbestimmter bla_{CTX-M} -Allele waren zu etwas mehr als 25 % Ampicillin-suszeptibel, was ein Hinweis darauf sein könnte, dass diese Gene nicht vollständig und damit nicht funktionell vorlagen.

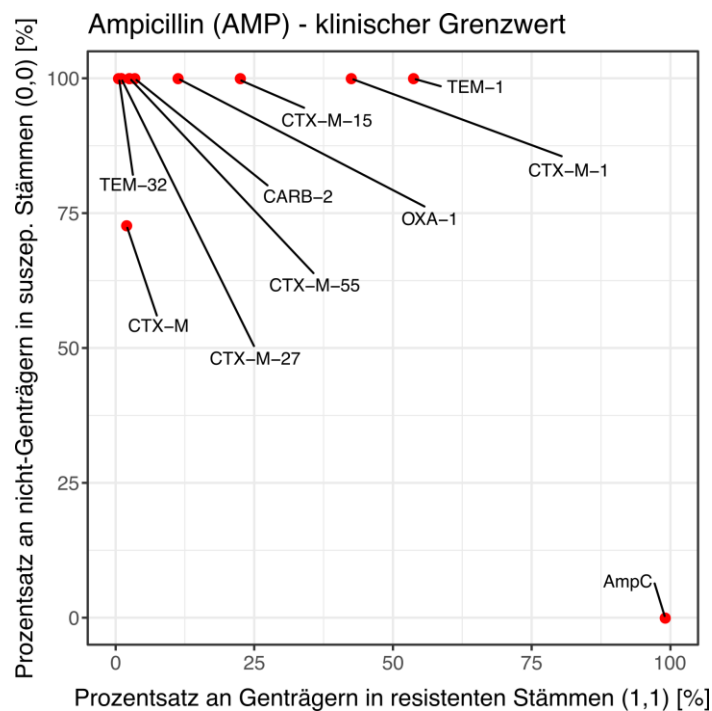


Abb. 88: Einfluss verschiedener β -Laktamasen auf den Ampicillin-Resistenzstatus

Suszept. = suszeptibel; Grenzwerte siehe 3.8.3; Ergebnisse ermittelt mit AMRFinderPlus.

5 Diskussion

Die vorliegende Studie war darauf ausgerichtet, die Prävalenz von Bakterien mit Resistenz gegenüber Fluorchinolonen (FQ) und Cephalosporinen (CS) der dritten und vierten Generation (CS3/4) in vier thüringischen Schweinehaltungen zu bestimmen. Aus den dazu entnommenen Sammelkotproben (SKP) sollten CS- bzw. FQ-resistente (CSR / FQR) *E. coli*-Stämme isoliert und mittels MLVA-PCR typisiert werden, um ähnliche Stämme zu identifizieren. Alle isolierten Stämme wurden in PCR-Analysen hinsichtlich des Vorkommens von Resistenzgenen überprüft und einer Antibiotika (AB)-Empfindlichkeitsprüfung unterzogen, um die für die CSR / FQR verantwortlichen Resistenzdeterminanten (RD) zu identifizieren und Resistenzen gegenüber weiteren AB-Klassen zu detektieren, die mit der CSR / FQR interagieren könnten. Eine Plasmid-Präparation aller CSR sowie einiger FQR *E. coli*-Stämme (CSRE / FQRE) sollte Plasmid-Profile erbringen, deren gleiche Muster auf die Anwesenheit derselben oder sehr ähnlicher Plasmide hinweisen. Anhand dieser gewonnenen Daten wurden ausgewählte CSRE / FQRE einer detaillierten genetischen Sequenzanalyse unterzogen, ihre Phylogruppen sowie Sequenztypen bestimmt und eine Phylogenie basierend auf *k*-mer-basierten Einzelnukleotid-Polymorphismen (kSNP)-Vergleichen erstellt. Die Lokalisation von RD wurde hinsichtlich ihrer durch Sequenznachbarschaft ermittelten Assoziationen untereinander sowie ihrer Verbindungen zu Replikationsursprüngen betrachtet, um den genetischen Hintergrund von FQR und CSR zu beleuchten. Anhand der Daten sollte die Persistenz von CSRE / FQRE bzw. ihrer RD festgestellt werden, um einen Beitrag zum Verständnis der Mechanismen zu leisten, die zum Erhalt von RD unabhängig vom Selektionsdruck der entsprechenden AB beitragen.

5.1 Dynamik des Vorkommens der Enrofloxacin-, Ceftiofur- und Cefquinom-Resistenzprävalenz über den Beprobungszeitraum

In allen Betrieben wurden Gammaproteobakterien mit Resistenz gegenüber Enrofloxacin, Ceftiofur und/oder Cefquinom detektiert, ihre Prävalenzen waren je nach Betrieb allerdings sehr unterschiedlich. Für deutsche Geflügel- sowie Schweinebetriebe wurden bereits große Variationen in der ESBL-Prävalenz nachgewiesen (Daehre *et al.* 2018; Meissner *et al.* 2022). Schulz *et al.* konnten unterschiedlich hohe Vorkommen von FQRE in deutschen Nutztier-Betrieben mit den jeweiligen FQ-Konzentrationen im Stallstaub korrelieren (Schulz *et al.* 2019). Auch innerhalb der Altersstufen eines Betriebs

schwankten die Anteile an Bakterien, die auf AB-haltigen Selektivplatten wuchsen. Durch die wiederholte Beprobung der Betriebe über einen Zeitraum von bis zu 13 Monaten konnte dennoch die Dynamik der Resistenzprävalenzen auf den einzelnen Betrieben dargestellt werden. Die mediane Prävalenz resistenter Bakterien war zwar bei allen Altersstufen niedrig, nahm jedoch mit zunehmendem Alter der Schweine ab, was vor allem bei Betrieb K2 sichtbar war. Dies stimmt mit einer Vielzahl anderer Studien überein (siehe 2.3.2.1), die die höchsten Prävalenzen für Resistenzen gegenüber FQ (Amsler *et al.* 2021) bzw. CS3/4 (Hansen *et al.* 2013; Andersen *et al.* 2015) bei Saugferkeln und die niedrigsten beim Mastschwein detektierten (Dunlop *et al.* 1998a; BVL 2020). Zudem waren die isolierten CSRE / FQRE zum Ende der Mast gegenüber weniger AB-Klassen resistent als in der Aufzuchtphase. Die Abnahme der Resistenzprävalenzen bis zur Vormast ging in der Mastphase in eine Stagnation auf niedrigem Niveau über. Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch eine Studie zu FQRE in Schweinen (Amsler *et al.* 2021). Ein Grund für die niedrigeren Resistenzprävalenzen bei Mastschweinen könnte die Korrelation mit der Behandlungshäufigkeit sein, die bei älteren Schweinen niedriger ausfällt (Birkegard *et al.* 2017). Auch das vor allem auf den konventionellen Betrieben praktizierte *all-in/all-out* Einstellungssystem kann zum Verlust resistenter Stämme beitragen (Hansen *et al.* 2013). Dagegen trägt die größere Anzahl an Stressfaktoren im Aufzuchtalter durch die Kastration, das Absetzen sowie den häufigen Kontakt zu Betriebs-Mitarbeitern vermutlich zur vermehrten Ausscheidung resistenter Bakterien bei (Mathew *et al.* 2003). Die Abnahme der Resistenzprävalenzen ist vor allem hinsichtlich der etablierten deutschen und europäischen Antibiotikaresistenz-Überwachungsprogramme von Bedeutung, die häufig eine Beprobung im Mastalter oder sogar am Schlachthof vorsehen (de Jong *et al.* 2012; BVL 2018; EFSA & ECDC 2021). Der Praktikabilität halber ist dies der kostengünstigste Beprobungszeitpunkt und kann das von tierischen Lebensmitteln ausgehende Gefährdungspotential am direktesten abbilden (WHO 2017a). Die vorliegende Studie zeigt jedoch, dass die Beprobung von Mastschweinen keine Aussage über die Resistenzsituation im Aufzuchtalter zulässt. RD bzw. die sie tragenden Bakterien aus Tierställen können allerdings schon vor der Schlachtung der Tiere zur humanmedizinischen Resistenzproblematik beitragen, wenn sie mit den als Dünger verwendeten Ausscheidungen der Tiere auf zur Nahrungsmittelproduktion genutzte Felder gelangen (Gao *et al.* 2015). Zudem können sie über Insekten,

Vögel und Nagetiere aus dem Stall hinausgelangen und sich in der Umgebung landwirtschaftlicher Betriebe etablieren (Hasan *et al.* 2012; von Salviati *et al.* 2015; Mathys *et al.* 2017; Dolejska *et al.* 2018; Fukuda *et al.* 2019). Auch die antibiotischen Wirkstoffe selbst liegen häufig noch in aktiver Form in den Ausscheidungen vor, da 30 – 90 % der AB im behandelten Tier nicht oder nur partiell metabolisiert werden und sie durch eine Behandlung der Gülle nicht vollständig zerstört werden. So können diese AB außerhalb der Tiere bzw. der Ställe noch Selektionsdruck ausüben und damit ein Problem für die öffentliche Gesundheit darstellen (Sarmah *et al.* 2006). Unabhängig von ihrer Bedeutung für die Humanmedizin sind hohe Resistenzprävalenzen im Aufzuchtalter darüber hinaus auch ein Problem für die Veterinärmedizin und im Sinne des One-Health-Ansatzes zu vermeiden (Noll *et al.* 2018; van Schaik 2022).

Es war kein eindeutiger Unterschied zwischen der Prävalenzdynamik der meist Plasmid-kodierten CS- und der vornehmlich chromosomal-kodierten FQ-Resistenz zu sehen. Auffällig war im Gegenteil, dass die Quotientenwerte der GF- und GQ-Platten sowie der GE- und GE4-Platten entgegen den Erwartungen nicht immer dieselbe Dynamik zeigten. Lediglich bei den konventionellen Betrieben gab es häufiger einen Zusammenhang zwischen der Ceftiofur- und Cefquinom-Resistenzprävalenz. Zusätzlich war hier eine Tendenz der Korrelation des Wachstums mit dem auf den GE4-Platten gegeben, was durch den großen Anteil an Isolaten mit Doppelresistenz (CSR und FQR) erklärt werden kann. Vereinzelt wurde zudem ein Zusammenhang zwischen der Ausprägung des Wachstums auf der GE- und GF-Platte beobachtet, was ein Hinweis auf die Ko-Selektion von FQR-*enabler*-Genen und ESBL sein könnte (Robicsek *et al.* 2006).

5.1.1 Methodische Aspekte der quantitativen Ergebnisse

Bei der Interpretation der Ergebnisse ist zu bedenken, dass die beprobten Betriebe über den Thüringer Schweinegesundheitsdienst vermittelt wurden, der die Veterinärbehörden mit einer beratenden Funktion unterstützt. Es werden tendenziell eher Betriebe betreut, bei denen Herdengesundheits- oder Managementprobleme bestehen. Zudem wurden die vier Betriebe ausgewählt, die im Vorversuch in den meisten SKP die höchsten Resistenzprävalenzen zeigten. Trotz dieser Vorauswahl unterscheiden sich die vier Betriebe grundsätzlich in ihrer Größe, im praktizierten Tiergesundheits- und Hygienemanagement, in der Auswahl und der Quantität des Einsatzes der antibiotischen Wirkstoffe sowie in den bei den gewonnenen Isolaten identifizierten Resistenz-Profilen.

In Thüringen werden auf konventionellen Betrieben durchschnittlich 1700 Mastschweine gehalten (IGS Thüringen 2019). Damit ist Betrieb K1 deutlich größer, Betrieb K2 kleiner als der thüringische Durchschnitt. Im Jahr 2019 existierten in Thüringen außerdem 29 ökologisch wirtschaftende schweinehaltende Betriebe. Bio-Betriebe mit geschlossenem System hielten durchschnittlich 151 Masttiere (Möbius - Thüringer Ökoherz e.V. 2020). Insofern bildet Betrieb B1 in seiner Größe den thüringischen Durchschnitt ab, während Betrieb B2 überdurchschnittlich groß für einen geschlossen geführten schweinehaltenden Bio-Betrieb ist. Die gewählten Betriebe repräsentieren damit verschiedenste Betriebsformen und -größen.

Es muss außerdem bedacht werden, dass die Anzahl detektierter resistenter Bakterien durch die selektive Beprobung wahrscheinlich höher war, als sie bei einer unselektiven Beprobung gewesen wäre (EFSA & ECDC 2021; Storey *et al.* 2022). Die Auswahl der AB-Konzentrationen für die GE4-, GF- und GQ-Platten beruhte auf klinischen Grenzwerten für diverse Tierarten und Indikationen. Es gab keine spezifischen Grenzwerte, da der quantitative Teil verschiedene, unter dem Begriff „Gammaproteobakterien“ zusammengefasste Bakterienspezies betrachtete. Diese waren außerdem vermutlich zu großen Teilen Kommensalen, da kein Fokus auf die Beprobung erkrankter Tiere gelegt wurde. Dennoch gehen wir davon aus, dass die CS-Selektivplatten ausreichend stringent waren, weil alle von GF- und GQ-Platten isolierten *E. coli*-Stämme *bla*_{CTX-M}-positiv waren und weil die von Schink *et al.* analysierten *bla*_{CTX-M-1}- bzw. *bla*_{CTX-M-15}-positiven *E. coli*-Stämme Ceftiofur- und Cefquinom-MHK-Werte $\geq 32 \mu\text{g/ml}$ aufwiesen (Schink *et al.* 2011). Auffällig bleibt unter diesem Aspekt allerdings, dass die GF-Platten häufig mehr Wachstum als die GQ-Platten zeigten.

Da auch die QRDR-Mutationen meist zu FQ-MHK-Werten deutlich oberhalb des klinischen Grenzwertes führen (Huseby *et al.* 2017), ist davon auszugehen, dass durch die Enrofloxacin-Konzentration der GE4-Platte oberhalb des resistenten Grenzwertes kein Wachstum von FQRE gehemmt wurde. Zudem sollte mit dieser FQ-Konzentration, die bereits in einer anderen Studie so gewählt wurde (Römer *et al.* 2017), eine deutliche Abgrenzung zur FQ-Konzentration der GE-Platte geschaffen werden, die sich nach dem ECOFF-Wert für *E. coli* richtete. Bezüglich der Auswirkung der für die Selektivplatten gewählten AB-Konzentrationen auf andere, nicht als *E. coli*-identifizierte Gammaproteobakterien kann allerdings nur schwer eine Aussage getroffen werden,

da dazu die genaue Zusammensetzung der detektierten Gammaproteobakterien hätte bestimmt werden müssen.

Das Wachstum auf den GE-Platten war oft sehr ausgeprägt. So lagen die KbE-Anzahlen der GE-Platten bei sieben von 92 SKP (7,6 %) über denen der jeweiligen antibiotikafreien GA-Platte. Damit war ihre Auswertung im quantitativen Teil schwierig. In der qualitativen Analyse sollten nur CS- bzw. FQ-resistente *E. coli* charakterisiert werden, weshalb keine Stämme aus GE-Bakterienpools mit in die Analyse einfließen. Durch die vielfach aufgetretene Multiresistenz könnten Stämme, die auch auf GE-Platten wachsen würden, allerdings von GF- und GQ-Platten isoliert worden sein. Da *E. coli*-Stämme mit FQR-*enabler*-Gen häufig einen Enrofloxacin-MHK-Wert knapp oberhalb des ECOFF-Grenzwertes zeigen (Rodríguez-Martínez *et al.* 2011; Ruiz 2019), könnten die Quotientenwerte der GE-Platte als Indikator für eine sich entwickelnde oder verschwindende FQR dienen. In einem zukünftigen Schritt sollten die Bakterienpool-Kryopräservate dieser Platten daher in einer Metagenomanalyse hinsichtlich des Vorhandenseins von *enabler*-Genen und der Identifizierung ihrer Trägerstämme untersucht werden. Daran anschließend sollte überprüft werden, ob FQRE mit demselben MLVA-Profil (MP) bzw. desselben Sequenztyps (ST) an einem anderen Zeitpunkt im Beprobungszeitraum detektiert wurden.

Zur Bearbeitung der SKP wurde anfangs die initiale KbE-Bestimmung, ab circa der Hälfte der SKP aber die erweiterte KbE-Bestimmung durchgeführt. Durch das Ausplattieren der Rückstellproben wurde die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse aus der initialen KbE-Bestimmung überprüft. Da die Anzahl wachsender Bakterien auf allen Platten der Rückstellproben niedriger war als bei den Originalproben, sich jedoch das Verhältnis des bakteriellen Wachstums auf den Selektivplatten zur GA-Platte nicht verändert hatte, sind die Werte der Originalproben valide und nur extreme Ausreißer (z. B. Quotientenwerte > 100 %) als Messfehler zu interpretieren.

5.1.2 Quantitative Daten vor dem Hintergrund antibiotischer Interventionen auf den Betrieben

Trotz der aufgrund der TÄHAV-Änderung erwarteten Reduktion des Einsatzes von CS3/4 sowie FQ (EMA 2021) wurde in zwei Betrieben weiterhin mit diesen AB behandelt. Bei den Daten zu antibiotischen Anwendungen in dem der Beprobung vorangegangenen Zeitraum muss allerdings bedacht werden, dass Mehrfachbehandlungen derselben Tiere nicht als solche gekennzeichnet wurden. Mit 20 AB-Gaben wurden also nicht

zwingend 20 verschiedene Tiere behandelt. Außerdem stellten Dunlop *et al.* fest, dass eine Befragung der Betriebsleiter die tatsächlich eingesetzte AB-Menge um 35 % unterschritt (Dunlop *et al.* 1998b).

Betrieb B1 – Die Cefquinom-Behandlung der Läufer Schweine führte zu einem Anstieg der GQ-Quotientenwerte bis zur Vormast (Abb. 89). Anschließend nahm der Anteil Cefquinom-resistenter Gammaproteobakterien wieder ab. Dass das Wachstum Enrofloxacin-resistenter Bakterien in MDG 1 durch die Behandlung der Tiere in der Nachbarbucht mit diesem Wirkstoff stärker anstieg als nach der Behandlung von sechs Läufer Schweinen, ist möglicherweise Zufall. Nachdem aber über die Hälfte der Schweine in der Vormast mit Enrofloxacin behandelt wurde, stiegen die Quotientenwerte der Enrofloxacin-haltigen Platten deutlich an. Unabhängig davon scheint die Gesundheitsproblematik der Gruppe, die sich an der starken Reduktion der Tierzahl ab dem Absetzen zeigt, die erhöhte Resistenzprävalenz aller zur Selektion genutzten AB befördert zu haben. Stress, der durch Krankheit und das Ableben von Artgenossen ausgelöst werden kann, kann durch eine Erhöhung der Darmmotilität zur vermehrten Ausscheidung resistenter Bakterien beitragen (Mathew *et al.* 2003). Der massive Anstieg des Anteils Ceftiofur-resistenter Gammaproteobakterien ab der Mittelmast lässt sich hingegen nicht aus den Metadaten erklären. Eventuell gab es eine Übertragung Ceftiofur-resistenter Stämme aus Tiergruppen benachbarter Stallbuchten. Als Vehikel könnte dabei die Einstreu gedient haben (Marshall *et al.* 1990). Dies ist vor allem wegen des Ausmistungssystems im Maststall von Betrieb B1 denkbar, bei dem die Einstreu aus den hinteren Buchten des Stalls in Richtung der vorderen Buchten geschoben wurde, sodass Schweine einer Bucht mit der Einstreu der Mastschweine in den anderen Buchten in Kontakt kamen. Da die Buchten auf den Bio-Betrieben über Außenbereiche verfügten, ist auch eine Übertragung aus der Umwelt, z. B. von Wildvögeln, denkbar (Söderlund *et al.* 2019; Storey *et al.* 2022). Zudem selektierte die Cefquinom-Anwendung in der Aufzucht vermutlich CS-RD und reduzierte die Anzahl susceptibler *E. coli*-Stämme im Darm der Tiere (Pereira *et al.* 2014). Durch diese Diversitäts-Abnahme des Mikrobioms (Fjalstad *et al.* 2018) könnten die CSR Stämme Nischen besetzt haben, woraufhin sie sich mit zeitlichem Abstand exponentiell vermehren konnten. Außerdem konnten Pereira *et al.* eine Zunahme der CSR durch Behandlungen mit Enrofloxacin nachweisen (Pereira *et al.* 2014). Da bei zwölf Stämmen aus Betrieb B1 *qnrS* in Sequenznachbarschaft

(< 10.000 bp) zu *bla*_{CTX-M} auf einem *contig* kodiert war, könnten die bis zur Vormast stattgefundenen Enrofloxacin-Behandlungen die CSR ko-selektiert haben.

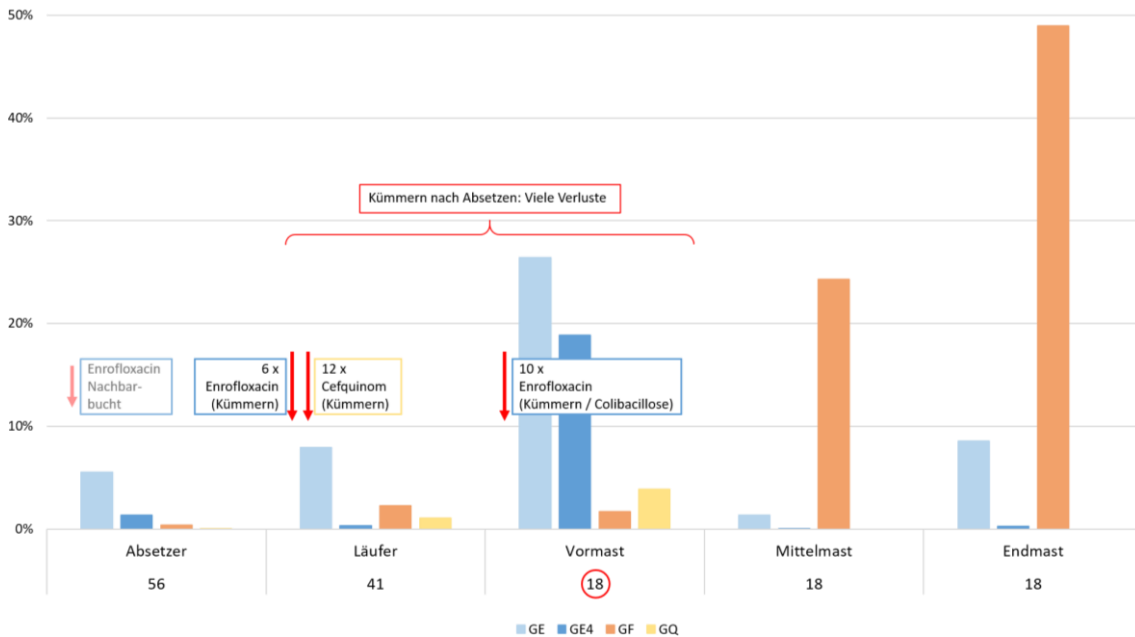


Abb. 89: Quotientenwerte der Sammelkotproben von Mastdurchgang 1 aus Betrieb B1 mit Darstellung der antibiotischen Behandlungen der beprobten Tiergruppe

Roter Pfeil = Antibiotische Anwendung: Anzahl gegebener Dosen, Antibiotikum und Behandlungsgrund im zugehörigen Kasten angegeben; Zahl unter Altersstufe = Anzahl Tiere in Tiergruppe; Plattenbezeichnungen siehe Tabelle 3.

Betrieb B2 – Im kompletten Beprobungszeitraum wurden keine AB bei den beprobten Tieren eingesetzt. Es wurden vergleichsweise niedrige Mittelwerte der Quotientenwerte für die drei Selektivplattenarten ermittelt, da fast nur Werte im einstelligen Prozentbereich detektiert wurden. SKP dieses Betriebs wiesen zudem von allen Betrieben am häufigsten kein Wachstum auf den Selektivplatten auf, enthielten also häufiger vollständig susceptible Isolate. Dies ist auf Betrieben ohne AB-Einsatz zu erwarten (Thakur *et al.* 2005). Dennoch konnten einige CSRE / FQRE isoliert werden, die jedoch gegenüber weniger AB-Klassen resistent waren als Stämme anderer Betriebe. Dass der Grad der Multiresistenz bei Stämmen von Bio-Betrieben weniger stark ausgeprägt ist als bei Stämmen von konventionell geführten Betrieben, wurde bereits beschrieben (BVL 2018). Für die erhöhte Resistenzprävalenz in den Proben des Vorversuchs wurde keine Erklärung gefunden. Während Hering *et al.* feststellten, dass bereits wenige SKP ausreichen, um die allgemeine Betriebsprävalenz EBSL-produzierender *E. coli* zu bestimmen (Hering *et al.* 2014), zeigen die Ergebnisse unserer Studie, dass eine einmalige Beprobung von Betrieben deren Gesamt-Resistenzsituation nicht repräsentativ abbildet.

Betrieb K1 – Bei jedem Absetzerdurchgang wurden dieselben antibiotischen Wirkstoffe in ähnlichem Ausmaß eingesetzt (Abb. 90). Dieser gleichförmige AB-Einsatz zeigte sich auch im homogenen Resistenz-Profil der isolierten Stämme, das sich auch zwischen den fünf Abferkelabteilen kaum unterschied (Daten nicht gezeigt). Der regelmäßige Einsatz von Amoxicillin schien keine CSR durch Kreuz-Resistenz zu selektieren (Abb. 90). Allerdings wurde in jedem Absetzerdurchgang nur ein kleiner Teil der Saugferkel mit diesem AB behandelt. Im phänotypischen Resistenz-Profil des Betriebs spiegelte sich der häufige Einsatz von Amoxicillin und Cotrimoxazol dafür wider. K1 zeigte außerdem die höchste Enrofloxacin-Resistenzprävalenz aller Betriebe, obwohl der Betrieb seit der TÄHAV-Änderung kaum noch FQ einsetzt und im kompletten Beprobungszeitraum nicht mit Wirkstoffen dieser Klasse behandelte. Auch Thakur *et al.* und Amsler *et al.* fanden FQR Bakterien in Betrieben, die keine FQ anwendeten (Thakur *et al.* 2005; Amsler *et al.* 2021). Der Einsatz von FQ kann daher nicht die einzige treibende Kraft hinter der in Betrieb K1 allgemein hohen sowie einer kurzfristig stark erhöhten (im 3. Absetzerdurchgang beobachteten) FQR-Prävalenz sein. Viel mehr müssen auch andere Mechanismen, wie Ko-Selektion und Kreuz-Resistenz, einen Einfluss haben. So könnten die in allen Proben hohen Quotientenwerte der GE-Platten durch die Anwesenheit unspezifischer *multidrug*-Transporter bedingt gewesen sein (Delsol *et al.* 2010). Alternativ könnten Cotrimoxazol-RD, die bereits in anderen Studien mit FQ-RD assoziiert wurden (Lautenbach *et al.* 2001), diese ko-selektiert haben und damit für die hohen GE4-Quotientenwerte verantwortlich gewesen sein. Auch eine Ko-Selektion von *qnrS* und *bla_{TEM}* ist aufgrund der zuvor angesprochenen hohen Ampicillin-Resistenz in Betrieb K1, für die *bla_{TEM}* verantwortlich sein kann (Bergspica *et al.* 2020), denkbar. Sogar eine antibiotische Behandlung der Muttersauen kann durch Ko-Selektion zu erhöhter FQ-Resistenzprävalenz der Absetzerferkel führen (Callens *et al.* 2015). Da über die Hälfte der Stämme aus K1 gleichzeitig FQ- und CS-resistent waren, könnte die hohe FQ-Resistenzprävalenz auch durch eine chromosomale Lokalisation von *bla_{CTX-M}* in Stämmen mit QRDR-Mutationen verursacht worden sein. Mit Ko-Selektion lassen sich allerdings nicht die sehr hohen Quotientenwerte der GE- und GE4-Platte des dritten Absetzerdurchgangs trotz gleichbleibender antibiotischer Behandlungen erklären (Abb. 90). Damit zeigt sich, dass beim Einsatz derselben AB in mehr oder weniger gleicher Intensität die Resistenzprävalenzen unabhängiger AB stark variieren können.

In diesem Zusammenhang muss auch der Einfluss von Virulenzgenen und die metabolische Ausstattung der Stämme zur Verwertung von Nährstoffen bei der Resistenz-Problematik mitbedacht werden. Erfolgreiche *E. coli*-Stämme können z. B. Nischen im Darm von Tieren besetzen und sich auf die Verwertung bestimmter Nährstoffe einstellen, um sich einen selektiven Vorteil zu verschaffen (Stecher *et al.* 2013).

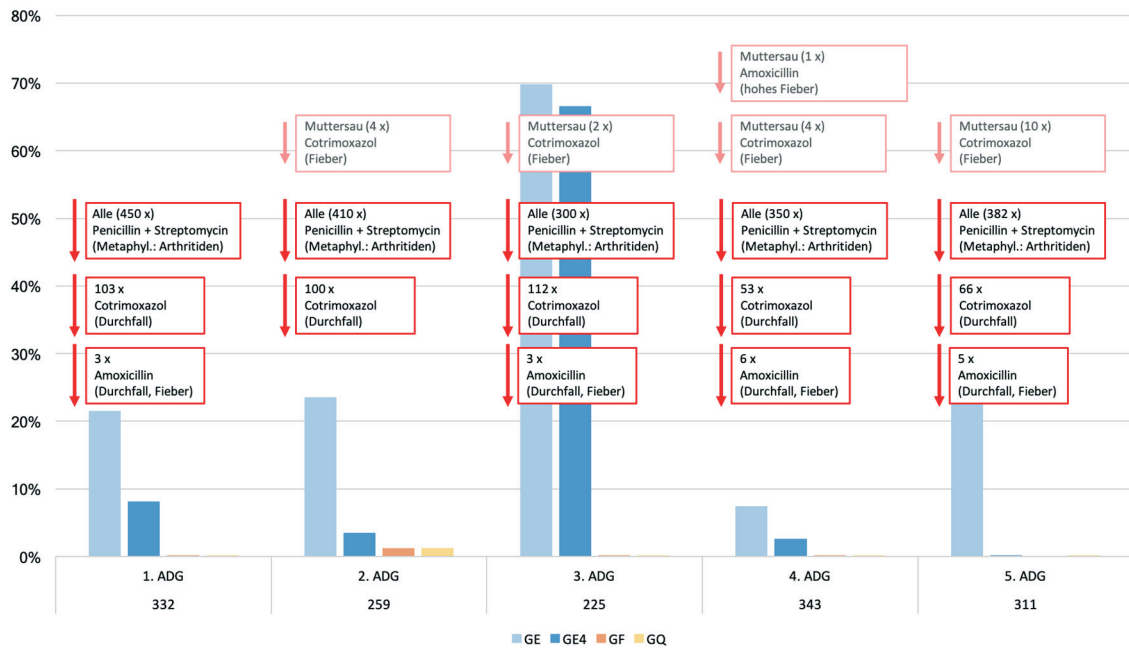


Abb. 90: Quotientenwerte der Sammelkotproben von **Abteil 4** aus **Betrieb K1** mit **Darstellung der antibiotischen Behandlungen der beprobten Tiergruppe**
 Details siehe Abb. 89; ADG = Absetzerdurchgang; Metaphyl. = Metaphylaktisch.

Betrieb K2 – Der Betrieb zeichnete sich durch eine große Bandbreite der eingesetzten AB aus (Abb. 91). Neben Einzeltierbehandlungen fanden regelmäßig auch meta- und prophylaktische Behandlungen statt, die eigentlich vermieden werden sollten (BTK 2015). Durch den häufigen Einsatz von AB können sich resistente Stämme in kurzer Zeit stark vermehren, da suszeptible Anteile des Mikrobioms getötet werden, wodurch die von ihnen ausgeübte Kolonisierungsresistenz fehlt, während das Nährstoffangebot für die resistenten Stämme steigt (Looft *et al.* 2012b; Forslund *et al.* 2013; DART 2020 2015). Es ist daher nicht verwunderlich, dass die Untersuchungen auf Betrieb K2 die meisten Ausreißer im oberen Wertebereich und vergleichsweise hohe Mittelwerte der Quotientenwerte für die Selektivplatten ergaben. Diese Ausreißer könnten auch von durch Stress im Wirtstier ausgelöste Dysbiosen (Looft *et al.* 2012a) und das nachfolgende Aufblühen bestimmter *E. coli*-Stämme verursacht worden sein (Stecher *et al.* 2013), wenn auch Dysbiosen einzelner Tiere durch die Verwendung von

SKP in dieser Studie ausgeglichen worden sein sollten. Zuletzt könnte der Grund für die hohen Quotientenwerte auch in der Zusammensetzung der suszeptiblen Gammaproteobakterien liegen. Sollten Stämme, die nicht auf den Selektivplatten wachsen konnten, auf der antibiotikafreien Gassner-Platte andere Bakterien durch Colicine getötet haben (Kamenšek *et al.* 2013), verringert sich der Bezugswert für das Wachstum auf den Selektivplatten und der Quotientenwert steigt.

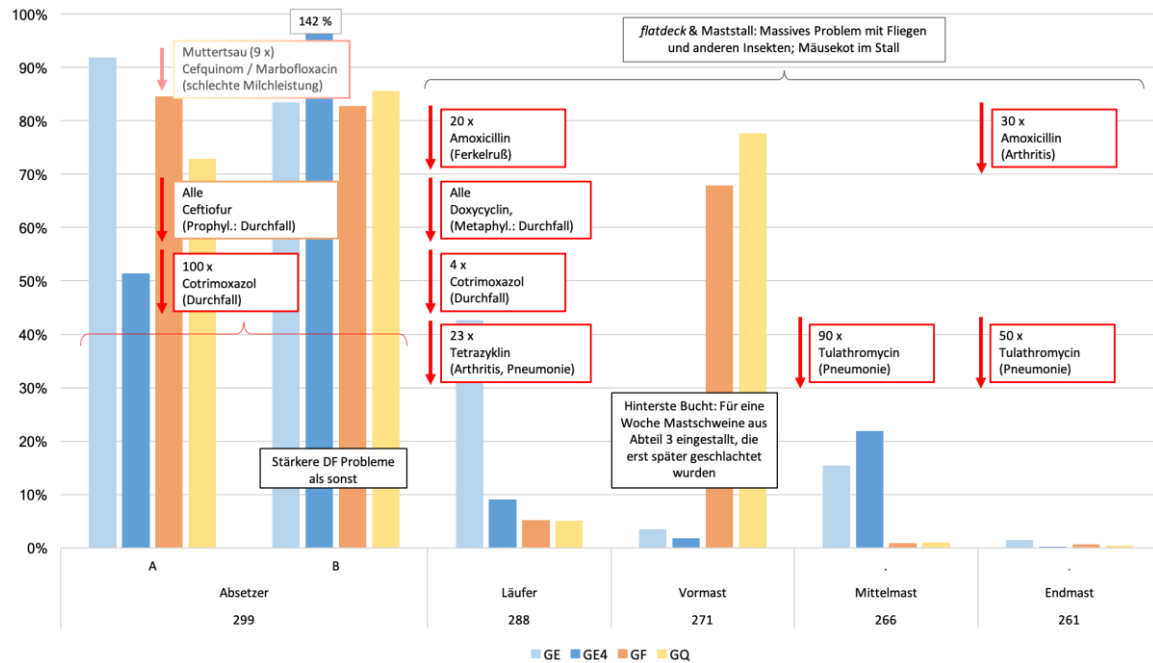


Abb. 91: Quotientenwerte der Sammelkotproben von Mastdurchgang 2 aus Betrieb K2 mit Darstellung der antibiotischen Behandlungen der beprobten Tiergruppe

Details siehe Abb. 90; Prophyl. = Prophylaktisch; Wo. = Woche.

Die hohen FQ-Resistenzprävalenzen bei den Absetzerferkeln (Abb. 91) könnten eine Folge der Marbofloxacin-Behandlungen von circa einem Drittel der Muttersauen sein (Belloc *et al.* 2005; Callens *et al.* 2015), während die CS-Resistenzprävalenz durch die Behandlung mit Cefitiofur erklärt werden kann (Andersen *et al.* 2015). Die darauffolgende deutliche Abnahme aller Quotientenwerte bis zur Läufer-Beprobung kann Folge des Absetzens und der damit verbundenen Umbauprozesse im Mikrobiom sein, durch die sich das Vorkommen einiger mit Antibiotikaresistenzen assoziierter Bakterientaxa reduziert (Frese *et al.* 2015; Holman *et al.* 2021). Die hohen Werte der CS-Selektivplatten in der Vormast könnten auf das Aufblühen eines CSR Bakterienstammes hindeuten, was durch antibiotische Behandlungen von Jungtieren, die die Diversität des Mikrobioms vermindern und damit die Kolonisierung durch resistente

Bakterien ermöglichen, gefördert wird (Fjalstad *et al.* 2018). Diese Vergrößerung des Resistoms durch intensiven AB-Einsatz könnte erklären, warum aus Betrieb K2 die meisten CSRE / FQRE isoliert wurden. Zudem wiesen Verrette *et al.* nach, dass eine Beendigung des Einsatzes von CS3/4 nicht zur Abnahme *bla*_{CTX-M}-positiver Isolate führte, wenn die Behandlung durch andere AB ersetzt wurde (Verrette *et al.* 2019). Die bei den Läufer Schweinen eingesetzten Wirkstoffe anderer AB-Klassen könnten demnach CSR selektiert haben. Der häufige Einsatz von β -Laktam-AB und CS3/4 auf Betrieb K2 zeigte sich im Resistenz-Profil des Betriebs auch in den Resistenzprävalenzen gegenüber Amoxicillin, Cefalotin und Ceftiofur. Trotz der Vielzahl angewandter AB waren die Quotientenwerte der Tiere in der Endmast niedrig. Die sich daraus ergebenden Probleme wurden schon anfangs in Absatz 5.1 ausführlich beschrieben.

Da der Einsatz eines ABs teils einen unmittelbaren Anstieg der entsprechenden Resistenzprävalenz nach sich zog, können wir einen Teil der Dynamik durch die Metadaten zu antibiotischen Behandlungen erklären. Auch andere Studien haben bereits auf den Zusammenhang zwischen dem Einsatz von CS3/4 (Bergspica *et al.* 2020) sowie FQ (Belloc *et al.* 2005; Usui *et al.* 2014) und der Resistenz gegenüber den entsprechenden AB hingewiesen. Da größere Betriebe eine höhere Therapiehäufigkeit haben (BMEL 2019) und konventionelle Betriebe meist deutlich mehr Tiere als Bio-Betriebe halten, ist der AB-Einsatz, vor allem in der konventionellen Haltung, ein wichtiger Treiber der Erhaltung sowie Verbreitung von Antibiotikaresistenzen. Diese Erkenntnis wird von Mencía-Ares *et al.* bestätigt, die auf konventionellen Betrieben eine signifikant höhere Dichte des Vorkommens von RD sowie von resistenzkodierenden mobilen genetischen Elementen und einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Einsatz von AB und den entsprechenden Resistenzprävalenzen fanden (Mencía-Ares *et al.* 2020). Weitere Gründe für die detektierte Resistenzdynamik könnten (I) in der Ko-Selektion und Kreuz-Resistenz mit anderen AB-RD sowie mit Schwermetall- oder Desinfektionsmittel-RD liegen oder (II) durch metabolische Unterschiede bzw. Virulenzeigenschaften der Stämme begründet sein. Somit ist der Einsatz eines ABs nicht immer der einzige und oft nicht der bedeutendste Einflussfaktor für die entsprechende Resistenzprävalenz (Birkegard *et al.* 2017). Es ist daher schwierig, aus einzelnen Beprobungen repräsentative Daten für eine Altersstufe oder einen Betrieb zu erlangen. Trotz der unterschiedlichen Resistenzprävalenzen konnten aber über alle Betriebe und Altersstufen hinweg zahlreiche

CSRE / FQRE isoliert werden. Im Hinblick auf die Eigenschaften dieser Stämme ergibt sich die Frage, inwiefern die Ergebnisse des quantitativen Datensatzes auf die Diversität der Stämme beziehungsweise die Persistenz einzelner Stämme zurückzuführen sind.

5.2 Diversität der Cephalosporin- bzw. Fluorchinolon-Resistenz-kodierenden Elemente

Trotz der Selektion auf CSR / FQR zeigten die isolierten *E. coli*-Stämme große Diversität, was sich in einer Vielzahl verschiedener MLVA- und Resistenz-Profile äußerte und sich durch die Zuordnung der 216 sequenzierten Stämme zu acht Phylogruppen sowie zahlreichen ST bestätigte. Dass sich Vertreter aller MP über den kompletten ECOR-Baum verteilten, zeigt, dass der Datensatz viele verschiedene Stammlinien der *E. coli*-Population abdeckt. Um die Prävalenz der CS- und FQ-Resistenz auf den beprobten Betrieben zu reduzieren, müssen demnach sehr viele Stämme mit unterschiedlichen Eigenschaften aus den Betrieben eliminiert werden.

Die *E. coli*-Stämme unterschieden sich vor allem zwischen den Betrieben, oft aber auch zwischen den Altersstufen und sogar zwischen aufeinanderfolgenden MDG eines Betriebs. Da nur wenige Stämme identifiziert wurden, die präferenziell aus biologischer oder konventioneller Haltung isoliert worden waren, scheint das Haltungssystem nur einen untergeordneten Einfluss auf die *E. coli*-Population zu haben. Diese Erkenntnis wird auch dadurch gestützt, dass ein größeres *cluster* an Stämmen mit demselben MP aus den Betrieben B1 und K2 detektiert wurde, obwohl diese Betriebe unterschiedliche Haltungsformen praktizieren und epidemiologisch nicht verbunden sind. Auch andere Autoren stellten bereits fest, dass sich das Mikrobiom von Schweinen derselben Altersstufe aus unterschiedlichen Betrieben mit unterschiedlichen Haltungssystemen ähneln kann (Frese *et al.* 2015; BVL 2020). Die in unserem Datensatz teils dennoch auftretende Betriebsspezifität der MP-, ST- und vor allem der Resistenz-Profile weist darauf hin, dass auf den einzelnen Betrieben *E. coli*-Stämme existieren, die gut an den Betrieb und die jeweilige Fütterung bzw. das jeweilige (Hygiene-)Management oder den AB-Einsatz angepasst sind. Dies kann eine Folge der Beprobung von Betrieben mit geschlossener Haltungsform sein, bei denen neue Bakterienstämme seltener durch den Zukauf von Tieren in das Betriebsumfeld gelangen. Wegen der möglicherweise ausgeprägten Adaptation der Stämme steht zu befürchten, dass sie durch einen einfachen Wechsel des AB-Regimes nicht verschwinden werden.

Innerhalb der Betriebe gab es einige Stämme, die mit einer gewissen Altersassoziation auftraten. Dass sich das Mikrobiom über die Lebensspanne eines Tieres durch verschiedene Einflüsse und natürliche Umbauprozesse verändert, ist aus der Literatur bekannt (Lu *et al.* 2018; Wang *et al.* 2019). In unserer Studie war der Uniformitätsindex der MP, und in gewissem Maße auch der der ST, bei Jungtieren am höchsten, fiel dann bis zur Vormast stark ab und stieg anschließend wieder leicht an. Mit steigendem Alter der Tiere nahm also die Diversität der CSRE / FQRE im Mikrobiom der Tiergruppe zu. Das Alter der Tiere hatte darüber hinaus auch einen Einfluss auf das Vorkommen von CS-RD: *bla*_{CTX-M-15} trat eher im Mikrobiom von Jungtieren auf, *bla*_{CTX-M-1} war entweder generell weit verbreitet (K2) oder etablierte sich bis zur Endmast in der Population (B1). Diese beobachtete größere Diversität von CS-RD bei Jungtieren korreliert mit den im quantitativen Teil gemessenen höheren Resistenzprävalenzen im Aufzuchtalter. Da Jungtiere häufig mit verschiedenen AB-Klassen behandelt wurden, während Mastschweinen seltener und nur mit wenigen verschiedenen Wirkstoffen antibiotisch therapiert wurden (siehe 5.1.2), bestätigt die Studie die aus der Literatur bekannte Diversifikation des Resistoms (Mencía-Ares *et al.* 2020) bei gleichzeitiger Abnahme der Diversität des Mikrobioms durch antibiotischen Selektionsdruck (Looft *et al.* 2012b).

Bei der Analyse der Diversität der isolierten CSRE / FQRE muss bedacht werden, dass stets alle phänotypisch unterschiedlichen Stämme pro Selektivplatte isoliert wurden. Diese Selektion hinsichtlich phänotypischer Variabilität in antibiotischer Umgebung ist allerdings keine statistisch abgesicherte Methode zur Ermittlung der Diversität einer Population. Dopfer *et al.* gehen davon aus, dass circa 16 *E. coli*-Stämme pro Kotprobe charakterisiert werden müssen, um mit einer Gewissheit von 95 % alle vorhandenen Stämme zu detektieren (Dopfer *et al.* 2008). Eine andere Studie spricht von 40 bis 80 Isolaten, um die molekulare Diversität eines Reservoirs zu beschreiben (Dorado-Garcia *et al.* 2018). Da die niedrigste Anzahl pro Betrieb isolierter CSRE / FQRE 48 betrug und da trotz der Vorselektion bezüglich CSR / FQR durchschnittlich 6,7 *E. coli*-Stämme pro SKP isoliert wurden, ist davon auszugehen, dass der vorhandene Datensatz die Diversität der CSRE / FQRE auf den Betrieben zufriedenstellend abbildet. Bei den Vollgenomsequenz-Ergebnissen zur Diversität muss allerdings bedacht werden, dass viele der sequenzierten Stämme im Hinblick auf den Nachweis der Persistenz ausgewählt wurden.

Daher kam es zur Häufung von Isolaten mit ähnlichen Eigenschaften, sodass hier die Diversität der Stämme vermutlich unterschätzt wurde.

Während Phylogenie und Diversität bei einem Teil der Stämme basierend auf den Vollgenomsequenzen beurteilt wurde, wurden alle isolierten Stämme anhand ihres MPs verglichen. Betrachtet man das *tanglegram* aus Kerngenom- und MLVA-Phylogeniebaum, sieht man die blockweise Verschiebung einzelner *cluster*, größtenteils aber viele parallel verlaufende Linien (Abb. 92). Damit spiegelt sich die MLVA-Phylogenie in großen Teilen in der Kerngenom-Phylogenie wider. Dass von 13 Betriebs-persistenten ST neun (69 %) jeweils nur ein MP zeigten bzw. dass Stämme persistenter MP häufig demselben ST angehörten, zeigt ebenfalls, dass eine auf MP basierende Persistenz-Analyse zu robusten, verwertbaren Ergebnissen führt.

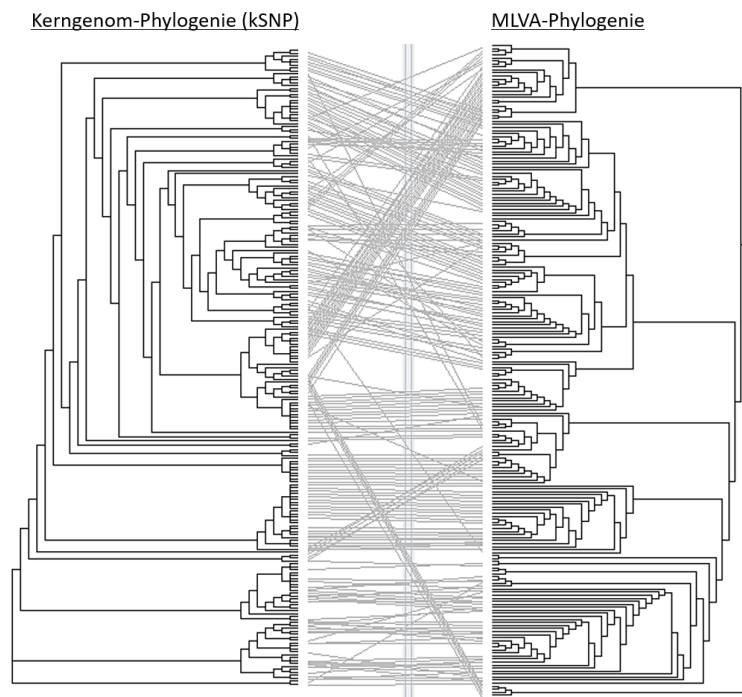


Abb. 92: *Tanglegram* aus Kerngenom- und MLVA-Phylogeniebaum der 216 sequenzierten Stämme

Der Kerngenom-Phylogeniebaum wurde auf Basis von kSNP-Differenzen mit dem Programm kSNP berechnet, das die Phylogenie mit der *parsimony* Methode darstellt. Details zum MLVA-Phylogeniebaum siehe Abb. 32.

Die schnelle, einfache und kostengünstige Methode der MLVA-PCR kann daher zur initialen phylogenetischen Einteilung von Stämmen verwendet werden. Ihr Diskriminierungspotential ist mit dem der MLST vergleichbar (Wirth *et al.* 2006; Camelena *et al.* 2019), was die Entscheidung unterstützt, nur ausgewählte *E. coli*-Stämme zu sequenzieren. Woodford *et al.* empfehlen sogar, bei Ausbruchsgeschehen

sowohl Populations-basierte Typisierungsmethoden wie die MLST mit Stamm-basierten Methoden wie der MLVA zu kombinieren (Woodford *et al.* 2011).

5.3 Genetischer Hintergrund der Resistenzen gegenüber Fluorchinolonen sowie Cephalosporinen der dritten und vierten Generation

Während die Stämme große Diversität zeigten, waren ihre CS-RD sehr homogen. Der ESBL-Phänotyp aller CSRE ließ sich durch ein *bla*_{CTX-M}-Allel erklären. Dieses war laut LEC-LAMP-PCR und Vollgenomsequenzierung bei fast zwei Dritteln der Isolate ein *bla*_{CTX-M-1}, bei fast einem Drittel ein *bla*_{CTX-M-15}-Allel, was aufgrund der Untersuchung von Isolaten von Tieren im Rahmen dieser Arbeit zu erwarten war (Paterson 2006; Ewers *et al.* 2012; Ramos *et al.* 2013; Hammerum *et al.* 2014). Allerdings war der Unterschied des Anteils an *bla*_{CTX-M-1} und *bla*_{CTX-M-15}-positiven Stämmen bei CSRE von Schweinen in anderen Studien deutlich größer (Agersø *et al.* 2013; Ceccarelli *et al.* 2019; Poulin-Laprade *et al.* 2021). Insofern scheint sich die Verteilung der beiden Allele dahingehend zu entwickeln, dass ihre Zuordnung zu unterschiedlichen Reservoiren weniger eindeutig wird. Ihre Verteilung unterschied sich zudem je nach Betrieb und Alter stark. Aus Betrieb K1 war nur ein Stamm *bla*_{CTX-M-1}-positiv, während bei K2 85 %, bei Betrieb B2 sogar 95 % der CSRE Träger von *bla*_{CTX-M-1} waren. Bei den CSRE von Betrieb B1 war das Verhältnis von *bla*_{CTX-M-1} und *bla*_{CTX-M-15} ausgeglichen. Dass die eher human-assoziierten *bla*_{CTX-M-15}-Allele vor allem in Betrieb K1 und insgesamt bei jüngeren Schweinen detektiert wurden, könnte mit den häufigen medizinischen Interventionen bei Saugferkeln (Geburtshilfe, Impfungen, Kastration) zusammenhängen. Diese gehen mit einem intensiven Kontakt zwischen Schweinen und Betriebs-Mitarbeitenden einher, wodurch die Übertragung der RD vom Mensch auf das Tier erleichtert wird (Skurnik *et al.* 2006; Dorado-Garcia *et al.* 2018). Dabei hängt das Risiko einer Übertragung zwischen Schweinen und Mitarbeitern direkt mit der Dauer ihres Kontakts zusammen (Dohmen *et al.* 2015). Zum Ende der Mast wurde in den Betrieben hingegen nur noch *bla*_{CTX-M-1} detektiert. Dies kann auch darin begründet sein, dass *bla*_{CTX-M-1} eher in Stämmen unterschiedlicher ST vorkam als *bla*_{CTX-M-15}, was die Wahrscheinlichkeit erhöhte, dass sich einer der *bla*_{CTX-M-1}-positiven Stämme bis zur Endmast erhalten konnte, während sich die wenigen *bla*_{CTX-M-15}-positiven Stämme nicht etablierten. Darin könnte sich die im Vergleich zu *bla*_{CTX-M-1} geringere Adaptation von *bla*_{CTX-M-15}-Allelen an tierische Wirte und ihre daraus resultierende geringere Verbreitung bei von Tieren isolierten *E. coli*-Stämmen widerspiegeln.

Es könnte aber auch durch das Wirtsspektrum der Plasmide, auf denen die verschiedenen *bla*_{CTX-M}-Allele kodiert waren, bedingt sein.

Das in Betrieb K2 identifizierte *bla*_{CTX-M-55}-Allel war ursprünglich vor allem bei Haus- und Nutztieren verbreitet, kursiert aber in Asien seit einigen Jahren vermehrt auch im human-assoziierten Bereich (Zhang *et al.* 2014) und wurde in Frankreich bereits in ST744-Stämmen detektiert (Haenni *et al.* 2018). *Bla*_{CTX-M-27} ist Teil der *bla*_{CTX-M-9}-Genfamilie (Lucas *et al.* 2018), die in Spanien vorherrschend ist (Pfeifer *et al.* 2010). Die RD wurde bei Betriebsleitern schweinehaltender Betriebe in Dänemark (Hammerum *et al.* 2014) und bei niederländischen Schlachthaus-Mitarbeitenden identifiziert (Dohmen *et al.* 2017). Bei *E. coli*-Isolaten aus europäischen Schweinen tritt sie jedoch selten auf (Hansen *et al.* 2014; Lucas *et al.* 2018).

Der FQR-Phänotyp war weniger homogen kodiert als der ESBL-Phänotyp, was in der Anzahl und häufigen Kombination der verantwortlichen *enabler*-Gene und QRDR-Mutationen begründet ist. Dabei deckte sich die Häufigkeit des Auftretens der einzelnen QRDR-Mutationen und ihr Beitrag zur FQR zu großen Teilen mit Daten aus der Literatur (siehe 2.5.1.1). Das bei uns am häufigsten vorkommende FQR-*enabler*-Gen war *qnrS1*, was mit einer Studie zu *E. coli*-Stämmen aus der deutschen Lebensmittelkette übereinstimmt (Juraschek *et al.* 2021). Überraschend war, dass viele Stämme mit nur einer Mutation in der QRDR bereits resistent gegenüber FQ waren. Zusätzlich lagen die Enrofloxacin-MHK-Werte der nicht-FQR Stämme, die ein *enabler*-Gen kodierten, im hohen nicht-resistenten Bereich. Eine Erklärung hierfür könnte in der potenziellen chromosomalen Lokalisation der FQR-*enabler*-Gene liegen, die mit verminderter Suszeptibilität gegenüber FQ assoziiert wird (Ruiz 2019; Chang *et al.* 2021). Da *qnrS* in der vorliegenden Studie allerdings vornehmlich auf Plasmiden kodiert war, dürfte dies von geringer Bedeutung sein. Auch ein gesteigertes Ausschleusen von FQ durch unspezifische Membrantransporter oder Porine kann zur FQR beitragen (Karczmarczyk *et al.* 2011; Correia *et al.* 2017). Unabhängig von den Ursachen entwickelte sich FQR in unseren Daten teils viel leichter und über weniger Schritte als in der Literatur angegeben (Fabrega *et al.* 2009; Chang *et al.* 2021). Dabei muss allerdings bedacht werden, dass bei der phänotypischen Resistenztestung beim mehrmaligen Messen desselben Stamms der MHK-Wert eines ABs um bis zu zwei Log₂-Stufen schwanken kann (eigene Daten; Thakur *et al.* 2005). Insofern könnten einige der im Mikrodilutionsverfahren als

Enrofloxacin-resistent identifizierten Stämme eigentlich eine intermediäre Suszeptibilität gegenüber Enrofloxacin aufweisen.

Ein Großteil der RD gegenüber CS3/4 bzw. FQ war Plasmid-kodiert. Für die meisten dieser RD konnte allerdings nicht ermittelt werden, auf welchen Plasmiden sie kodiert waren, da die Trägerstämme meist über eine Vielzahl an Replikationsursprüngen verfügten. Lediglich basierend auf der Sequenznachbarschaft mit dem entsprechenden Replikationsursprung wurde *bla*_{CTX-M-1} mit IncFII- und häufig mit IncI1-Plasmiden assoziiert, während *qnrS* auf IncX-Plasmiden kodiert war. Diese Assoziationen wurden bereits von anderen Autoren beobachtet (Dorado-Garcia *et al.* 2018; Rozwandowicz *et al.* 2018; Juraschek *et al.* 2021; Poulin-Laprade *et al.* 2021). Neben *aac(6')-Ib-cr* war allerdings auch ein geringer Teil der *qnrS*- und *bla*_{CTX-M}-Gene chromosomal kodiert. Die chromosomale Lokalisation von *bla*_{CTX-M} ist aus der Literatur bekannt (Fischer *et al.* 2014; Rodriguez *et al.* 2014) und erhöht vermutlich die Stabilität sowie den Erhalt der RD in den Bakterienstämmen und damit in der Population, da sich ESBL-Determinanten somit auch klonal verbreiten können (Oteo *et al.* 2009; Ludden *et al.* 2021).

5.4 Persistenz der Cephalosporin- / Fluorchinolon-Resistenz

Trotz großer Diversität der isolierten CSRE / FQRE wurden Stämme eines Betriebs mit demselben MP bzw. desselben STs aus Proben mehrerer Zeitpunkte innerhalb eines MDGs und teils sogar aus SKP weiterer MDG isoliert. Dies weist auf die Persistenz CS- / FQ-resistenter Bakterienstämme unabhängig vom Selektionsdruck durch den Einsatz der entsprechenden AB hin, wie bereits in anderen Studien gezeigt wurde (de Been *et al.* 2014; Usui *et al.* 2014; Cummings *et al.* 2017; Abraham *et al.* 2018). MDGs- und Betriebs-persistente Stämme konnten sich trotz Bucht- bzw. Abteil-Wechsel und sogar nach Umstallung in andere Stallgebäude in den Tiergruppen halten. Die entsprechenden Stämme müssen daher in bzw. an den beprobten Tieren persistiert haben. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass sie bereits vor der Einstallung der Tiere in den Ställen des jeweiligen Betriebs vorhanden waren, obwohl die Stallbuchten bzw. -abteile vorher gereinigt und auf den konventionellen Betrieben auch konsequent desinfiziert wurden. In diesem Fall muss man davon ausgehen, dass Reinigung und Desinfektion die Persistenz resistenter Stämme nicht völlig unterbinden können, wie bereits für die Geflügelhaltung gezeigt wurde (Luyckx *et al.* 2016; Daehre *et al.* 2018).

Die persistenten Stämme bildeten in den MLVA- bzw. kSNP-basierten Phylogeniebäumen *cluster*. Dass häufig nur geringe kSNP-Differenzen zwischen Stämmen desselben STs nachgewiesen wurden, ist ein Hinweis auf ihre klonale Verbreitung. In der Literatur wurde diese hohe genetische Ähnlichkeit von Stämmen meist im Zusammenhang mit Ausbruchsstämmen beschrieben (Leekitcharoenphon *et al.* 2014; Riley 2020). Da sich die kSNP-Berechnungen sowohl auf Plasmid-assoziierte als auch auf chromosomal-kodierte Genbereiche bezogen, scheinen sowohl die Stämme selbst als auch ihre Plasmide konserviert gewesen zu sein. Allerdings konnten nur kSNP berechnet werden, wenn das *k*-mer bzw. das Plasmid in beiden Stämmen einer Stammpaarung gefunden wurde. Häufig wiesen Betriebs-persistente Stämme jedoch dasselbe Gel-basierte Plasmid-Profil und dieselben Replikationsursprünge auf, weshalb in vielen Fällen tatsächlich von persistenten Stamm-Plasmid-Kombinationen auszugehen ist. Diese können durch die Expression von Toxin-Antitoxin-Systemen und Mechanismen zur aktiven Weitergabe (Englisch: *active partitioning*) von Plasmiden gefördert werden (Daniel *et al.* 2020). Auch die CS- bzw. FQ-Resistenzregionen der persistenten Stämme desselben STs änderten sich über einen längeren Zeitraum kaum, was auf das Vorkommen konservierter mobiler genetischer Elemente hindeutet, die in den entsprechenden Trägerstämmen persistieren und auf diese Weise klonal verbreitet werden. Dafür spricht auch die Identifizierung persistenter Genkassetten.

Vermutlich unterschätzt die von uns durchgeführte Studie die Anzahl persistenter Stämme und die Häufigkeit des Auftretens dieser Stämme, da (I) Stämme in einer SKP von anderen Stämmen überwuchert werden können (Cameron-Veas *et al.* 2015), (II) nicht immer alle Stämme einer Probe isoliert und (III) vor allem nicht alle isolierten Stämme sequenziert wurden. Letzteres muss vor allem im Hinblick auf die ST-basierte Persistenzdarstellung bedacht werden. Da allerdings auch die Vielfalt der CSRE / FQRE beurteilt werden sollte, musste bei der Stammisolation und Auswahl für die Vollgenomsequenzierung ein Kompromiss zwischen Diversität und Konserviertheit gefunden werden. So kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Persistenz einzelner, als sporadisch klassifizierter Stämme durch das Studiendesign nicht erfasst wurde. Andererseits wurden durch die Selektion auf Diversität auch Hinweise auf horizontalen Gentransfer (HGT) detektiert (siehe 5.4.2), die wir bei einer ausschließlichen Suche nach persistenten Stämmen nicht erhalten hätten.

Da die Persistenz nur für die anhand ihrer CSR / FQR vorselektierten Stämme nachgewiesen wurde, kann keine Aussage zu suszeptiblen persistenten Stämmen gemacht werden. Um dazu Erkenntnisse zu erlangen, müssten die antibiotikafreien GA-Bakterienpools untersucht werden. Methodisch bedingt können wir zudem keine Aussage zur Quantität der persistenten Stämme treffen, da der Anteil der persistenten Stämme an der gesamten Population der Gammaproteobakterien einer SKP nicht bestimmt wurde. Weil Stämme sich auch erst ausbreiten und anschließend Resistenzen aufnehmen könnten, sodass die Resistenz nicht das ursprüngliche Kriterium für die Ausbreitung war (Deschamps *et al.* 2009; Reid *et al.* 2022), sollte kritisch hinterfragt werden, wie repräsentativ die selektierten CSRE / FQRE für persistente *E. coli* im Allgemeinen sind.

In dieser Studie wurde bewusst kein Fokus auf die Beprobung erkrankter Tiere gelegt. Die meisten Programme zur Überwachung von Antibiotikaresistenzen zielen hingegen auf pathogene Spezies ab (BVL 2018; 2020). Die Analyse von Indikator-*E. coli*-Stämmen erlaubt aber eine bessere Aussage zur Gesamt-Resistenzsituation, da stets in großer Anzahl vorhandene, apathogene, resistente Stämme im Mikrobiom als Resistenz-Hintergrund dienen (ECDC & EFSA & EMA 2021) und durch HGT von Plasmiden zur Reversion des suszeptiblen Phänotyps von seltener vorhandenen, pathogenen Stämmen führen können. Zudem unterliegen Kommensalen demselben Selektionsdruck wie Pathogene einschließlich Ko-Selektion und Kreuz-Resistenz (siehe 2.4.3). Daher sollte in unserer Studie die vorhandene resistente *E. coli*-Flora möglichst umfassend beschrieben werden. Zudem wäre die Fokussierung auf erkrankte Tiere oder Pathogene nicht mit einem longitudinalen Beprobungsdesign und der Detektion persistenter Stämme vereinbar gewesen. Zuletzt verfügten auch die in der vorliegenden Studie isolierten CSRE / FQRE über einige Virulenzfaktoren (nicht gezeigte Daten), weshalb nicht ausgeschlossen werden kann, dass sie mit der Zeit virulenter werden und in Zukunft als Pathogene klassifiziert werden würden.

Hinsichtlich der Ergebnisse zur Persistenz ist darüber hinaus zu bedenken, dass vor allem bei der Beprobung der Bio-Betriebe die Verfolgung separater MDG schwierig war, da bei diesen Betrieben regelmäßig Tiere verschiedener MDG zusammengelegt wurden. Auf den konventionell geführten Betrieben war das Tiergruppen-Management koordinierter, doch auch hier wurden Tiere anderer MDG zu den beprobten MDG hinzugesellt

oder in separaten Buchten desselben Abteils gehalten. Andererseits bildet das Tiergruppen-Management der vier sehr unterschiedlichen Betriebe die Realität in deutschen schweinehaltenden Betrieben ab. Zudem trägt auch die wiederholte Kontamination mit bzw. die Transmission von resistenten Stämmen aus anderen Tiergruppen im Betrieb zur Persistenz von Resistenzen ohne den Einsatz der entsprechenden AB bei. Unabhängig davon muss bedacht werden, dass die MDG nicht konsequent zeitlich aufeinander folgten und dass Tiere aufeinanderfolgender MDG daher nicht immer in denselben Buchten und Abteilen gehalten wurden. Bei den Bio-Betrieben lebten die Schweine der beprobten MDG z. B. um circa drei Wochen versetzt parallel zueinander. Die Mastschweine dieser Betriebe wurden zudem mehrmals innerhalb des Maststalls von einer Bucht in eine andere Bucht umgestallt. Auch bei Betrieb K2 war lediglich das Läufer-Abteil aller MDG dasselbe. Daher könnte in dieser Studie nicht nur eine besonders ausgeprägte Fähigkeit der Stämme sowie ihrer genetischen Elemente, in einer Nische lange Zeit zu bestehen, für die gefundene Persistenz ursächlich sein, sondern auch die weitflächige Verbreitung und damit Dominanz von Stämmen in einem Betrieb.

5.4.1 Ko-Selektion und Kreuz-Resistenz

Die Menge der eingesetzten AB wurde in Deutschland für die meisten AB-Klassen inklusive FQ und CS3/4 von 2011 bis 2018 drastisch reduziert. Da einige Studien davon ausgehen, dass die Reduktion oder Beendigung der Anwendung von CS3/4 bzw. FQ die Verbreitung der entsprechenden Resistenzen vermindert (Belloc *et al.* 2005; Agersø *et al.* 2013; Callens *et al.* 2018; Verliat *et al.* 2021), müsste die Prävalenz der CS- und FQ-Resistenz in Deutschland sinken. Der verminderte Einsatz bestimmter AB ist allerdings meist mit dem vermehrten Einsatz anderer AB verbunden (Birkegard *et al.* 2017), was erklärt, warum die Abgabemengen einiger AB-Klassen in den letzten Jahren wieder anstiegen (Gefeller *et al.* 2021). In diesem Zusammenhang zeigten Verrette *et al.*, dass die Beendigung des Einsatzes von Ceftiofur kaum Auswirkungen auf den Anteil *bla*_{CTX-M}-positiver *E. coli* hatte, wenn stattdessen Lincomycin-Spectinomycin eingesetzt wurde (Verrette *et al.* 2019). Dass die Resistenzprävalenz eines spezifischen ABs stärker mit dem allgemeinen Einsatz von AB als mit dem Einsatz des entsprechenden ABs korreliert (Dorado-Garcia *et al.* 2016), hebt die Bedeutung von Ko-Selektion und Kreuz-Resistenz auf den Erhalt von RD hervor.

Bei den isolierten CSRE / FQRE waren zwei Voraussetzungen gegeben, die die Wahrscheinlichkeit von Ko-Selektion deutlich erhöhen. (I) Der Großteil der detektierten RD war Plasmid-kodiert, was ein Zeichen dafür sein kann, dass Selektionsdruck auf diese Gene ausgeübt wird (Martínez *et al.* 2015), und (II) alle isolierten CSRE / FQRE waren multiresistent. Sie verfügten zusätzlich zur CSR bzw. FQR über Resistenzen gegenüber durchschnittlich sechs weiteren AB-Klassen. Die Auswertung der Vollgenomsequenzen der Stämme legte in diesem Zusammenhang eine vielfältige Ko-Lokalisation von RD gegenüber unterschiedlichen AB-Klassen in benachbarten Sequenzabschnitten offen. Dabei waren die gemeinsam lokalisierten RD meist auch mit denselben Replikationsursprüngen assoziiert: *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id* und *sul2* mit IncI1 oder IncX1; *aadA5*, *dfrA17* und *sul1* mit IncI1, IncP6 oder IncX1; *qnrS* und *bla_{TEM}* mit IncX3; *aadA2/5*, *dfrA12/17* und *tet(A)* mit IncY oder IncX1. Dies ist als Hinweis auf die Organisation von RD in Genkassetten zu werten, durch die die Persistenz der RD auf dem kodierenden, mobilen genetischen Element unterstützt wird (Partridge *et al.* 2018). Dabei muss allerdings bedacht werden, dass durch den von uns gewählten *cutoff* einer Sequenznachbarschaft von < 10.000 bp das Ausmaß der Ko-Selektion vermutlich unterschätzt wird. Manche Plasmidtypen wie z. B. IncF und IncI1 sind sehr groß und tragen viele RD, auch in mehreren voneinander getrennten Resistenzgenkassetten (Rozwandowicz *et al.* 2018). Folglich können auch RD in größerem Sequenzabstand auf demselben mobilen genetischen Element kodiert sein. So waren z. B. diverse *sil*- und *pco*-Allele zwar untereinander assoziiert, es wurden jedoch keine AB-RD in der Sequenznachbarschaft detektiert, obwohl in der Literatur allgemein von einer Ko-Selektion dieser Gene mit AB-RD ausgegangen wird (Baker-Austin *et al.* 2006). Laut Pal *et al.* sind Schwermetall-RD allerdings häufig chromosomal-kodiert, während AB-RD öfter Plasmid-assoziiert sind, was das Ausbleiben einer Korrelation in unserem Datensatz erklären könnte (Pal *et al.* 2015).

Ko-Selektion erklärt zudem die phänotypisch detektierten Korrelationen von CSR oder FQR mit den Resistenzprävalenzen anderer AB. So beruht die im Vergleich zu FQRE erhöhte Gentamicin-Resistenz von CSRE, die aus der Literatur bekannt ist (de Been *et al.* 2014; Cameron-Veas *et al.* 2015; Jahanbakhsh *et al.* 2016), vermutlich auf der Ko-Selektion von *bla_{CTX-M-15}* und einer Aminoglykosid-Genkassette (*aph(3/4/6)* und *aac(3)*). Die Ko-Selektion dieser Genkassette und *qnrS*, die ebenfalls bereits beschrieben wurde (Lautenbach *et al.* 2001), erklärt wiederum die vermehrte

Spectinomycin-Resistenz bei FQRE. In Anbetracht dessen ist es alarmierend, dass die Abgabemengen von Aminoglykosiden in den letzten Jahren wieder auf das Niveau von 2014 angestiegen sind (Gefeller *et al.* 2021). Ebenfalls besorgniserregend ist das in dieser Studie und in der Literatur beschriebene häufige Vorkommen von CS- und FQ-Resistenz in denselben Stämmen (Lautenbach *et al.* 2001; Goyanes *et al.* 2007; Cantón *et al.* 2008; Zurfluh *et al.* 2015). Diese Doppelresistenz zeigte sich vor allem bei den konventionellen Betrieben auch im quantitativen Datensatz.

Neben Ko-Selektion wurde auch Kreuz-Resistenz nachgewiesen. So waren CSRE stets resistent gegenüber anderen β -Laktam-AB, was beim Fehlen von *bla*_{TEM} in einem Stamm auf der Expression von *bla*_{CTX-M} basierte. Verwunderlich ist in diesem Zusammenhang jedoch, dass in Betrieb K1 nur wenig Wachstum auf den CS-Selektivplatten vorgefunden wurde, obwohl der Betrieb immer wieder Amoxicillin einsetzte und im Resistenz-Profil eine hohe Ampicillin-Resistenzprävalenz zeigte.

5.4.2 Persistenz resistenzdeterminierender genetischer Elemente

Da ein Großteil der detektierten RD auf Plasmid-assoziierten *contigs* kodiert war, ist davon auszugehen, dass Plasmide einen erheblichen Einfluss auf die Resistenz-situation in den schweinehaltenden Betrieben ausüben. Dies zeigte sich auch in der großen Anzahl unterschiedlicher Resistenz-Profile ($n = 168$), deren Diversität vermutlich auf dem häufigen RD-Austausch zwischen Stämmen beruht und durch eine Lokalisation der RD auf mobilen genetischen Elementen erleichtert wird (Lambrecht *et al.* 2018). Auch andere Studien gehen davon aus, dass Plasmide maßgeblich zur Verbreitung von RD beitragen und sogar epidemische Charakterzüge erhalten können (Carattoli 2009; Poulin-Laprade *et al.* 2021). Dass die Verteilung von Plasmiden deutlich weniger betriebsspezifisch als die Verteilung der ST oder MP war, weist auf eine schnellere Ausbreitung von Plasmiden als von Bakterienstämme in den schweinehaltenden Betrieben hin. Dies ist darin begründet, dass neue Plasmide von Donor-Bakterien, die den Darm nur durchwandern, auf die residente Flora übertragen werden können (de Been *et al.* 2014), während neue resistente Bakterienstämme sich erst im Mikrobiom etablieren müssen. Aus diesem Grund schreibt der JIACRA-Bericht Plasmid-kodierten RD hinsichtlich der Übertragung von Resistenzen aus landwirtschaftlichen Bereichen in den Kontext der Humanmedizin eine größere Rolle zu als resistenten Zoonoseerregern (ECDC & EFSA & EMA 2021).

Aus den identifizierten Replikationsursprüngen konnte abgeleitet werden, dass es häufig vorkommende und wiederholt auftretende Plasmide sowie Plasmidkombinationen gab. Zu persistenten Plasmiden konnte allerdings keine Aussage gemacht werden, da dafür eine andere Analyse-Strategie basierend auf *long read* Sequenzierungen nötig gewesen wäre, die eine größere Länge der sequenzierten DNA-Stränge erbracht hätten (Arredondo-Alonso *et al.* 2017). Damit hätte man resistenzkodierende, mobile genetische Elemente eindeutiger charakterisieren (Wyrsh *et al.* 2016) und ihre Zuordnung zu Plasmidrückgraten beschreiben können. Zusätzlich hätte man spezifische Sequenzanalysen von *long read* Sequenzierungen der Träger-Stämme durchführen müssen. Basierend auf den *short read* Sequenzierungen konnten hingegen lediglich exemplarisch Plasmid-assoziierte *contigs* mehrerer Stämme von unterschiedlichen Zeitpunkten eines MDGs identifiziert werden, die ähnliche Sequenzen aufwiesen. Da diese Stämme meist denselben ST angehörten und eine niedrige kSNP-Differenz aufwiesen, ist von stabilen und deshalb persistierenden Stamm-Plasmid-Kombinationen auszugehen, wobei eine klonale Verbreitung von Plasmiden bereits beschrieben wurde (Kaspersen *et al.* 2020b). Dass mehr persistente Stämme als Plasmide identifiziert wurden, ist daher vermutlich auf den Fokus der Beprobung und Sequenzierung auf persistente Stämme zurückzuführen.

In allen vier Betrieben konnten dieselben RD gegenüber CS3/4 und FQ über den kompletten Beprobungszeitraum aus einer Vielzahl von Proben isoliert werden. Damit wurde ihre Persistenz in einem Betrieb trotz fehlenden antibiotischen Selektionsdrucks nachgewiesen, was in der Literatur durch niedrige Fitnesskosten der RD erklärt wird (Melnik *et al.* 2015; Durao *et al.* 2018; Bergspica *et al.* 2020; siehe 2.3.2). Insbesondere *bla*_{CTX-M-1} und *qnrS* kamen häufig in vielen verschiedenen ST vor, was ein Hinweis auf die vor allem für ESBL bereits oft beschriebene Verbreitung über bzw. Persistenz durch HGT und erfolgreiche Plasmidlinien sein kann (Cottell *et al.* 2012; Lambrecht *et al.* 2018; Lucas *et al.* 2018; siehe 2.6.2). Die wiederholte Detektion dieser beiden RD in unterschiedlichen ST innerhalb einer SKP deutet darauf hin, dass sie bzw. die Plasmide, auf denen sie kodiert waren, weit in der *E. coli*-Population der Tiergruppe verbreitet und etabliert waren. Diese weite Verbreitung wird in der Literatur eher Resistenzen gegenüber schon lange eingesetzten AB-Klassen zugeschrieben und könnte mit dem Ausgleich der durch die RD

entstehenden Fitnesskosten mittels kompensatorischer Mutationen zusammenhängen. Sie wird allerdings auch mit einer langsamen, erschwerten Eliminierung der Resistenz in Verbindung gebracht (Enne *et al.* 2005; Volkova *et al.* 2013). Andere RD wurden jedoch in nur ein oder zwei ST pro Betrieb detektiert, was im Falle Plasmid-kodierter RD für persistente Stamm-Plasmid-Kombinationen bzw. im Falle chromosomal kodierter RD für eine klonale Ausbreitung spricht und die Ergebnisse zur Persistenz von Stämmen sowie diesbezügliche Aussagen anderer Autoren bestärkt (Nilsson *et al.* 2014; Storey *et al.* 2022).

Stellt man die gewonnenen Erkenntnisse zu persistenten ST und RD in einer gemeinsamen Grafik dar, erhält man weitere Erkenntnisse zur Persistenz von CS- / FQ-RD. Behält ein persistenter Stamm über einen langen Zeitraum eine bestimmte RD, ist von klonaler Disseminierung auszugehen (Abb. 93 – ST1775 in Betrieb B1 mit *bla*_{CTX-M-15}: Rotes Dreieck). Für ESBL wurde eine Verbreitung durch erfolgreiche Bakterienstämme bereits öfter beschrieben (Nicolas-Chanoine *et al.* 2008; Rodrigues *et al.* 2013; Haenni *et al.* 2018; Bergspica *et al.* 2020). Im Gegensatz dazu fanden Hansen *et al.* in ihrer Studie heraus, dass sich ab dem Läuferalter häufig ein dominanter *bla*_{CTX-M}-positiver Stamm etablierte, der beim selben Tier im Saugferkelalter meist noch nicht detektiert werden konnte (Hansen *et al.* 2014). Dies trifft bei uns nur auf B1 zu (ST69: Gelbe Raute), während die CSR-Stämme der Endmast-Proben auf den anderen Betrieben bereits bei der Absetzerbeprobung derselben Tiergruppe detektiert worden waren. Ist ein persistenter Stamm hingegen abwechselnd *bla*_{CTX-M}-negativ oder -positiv (ST744 in Betrieb K2: Grüne Raute / grüner Kreis), deutet dies auf HGT der RD hin.

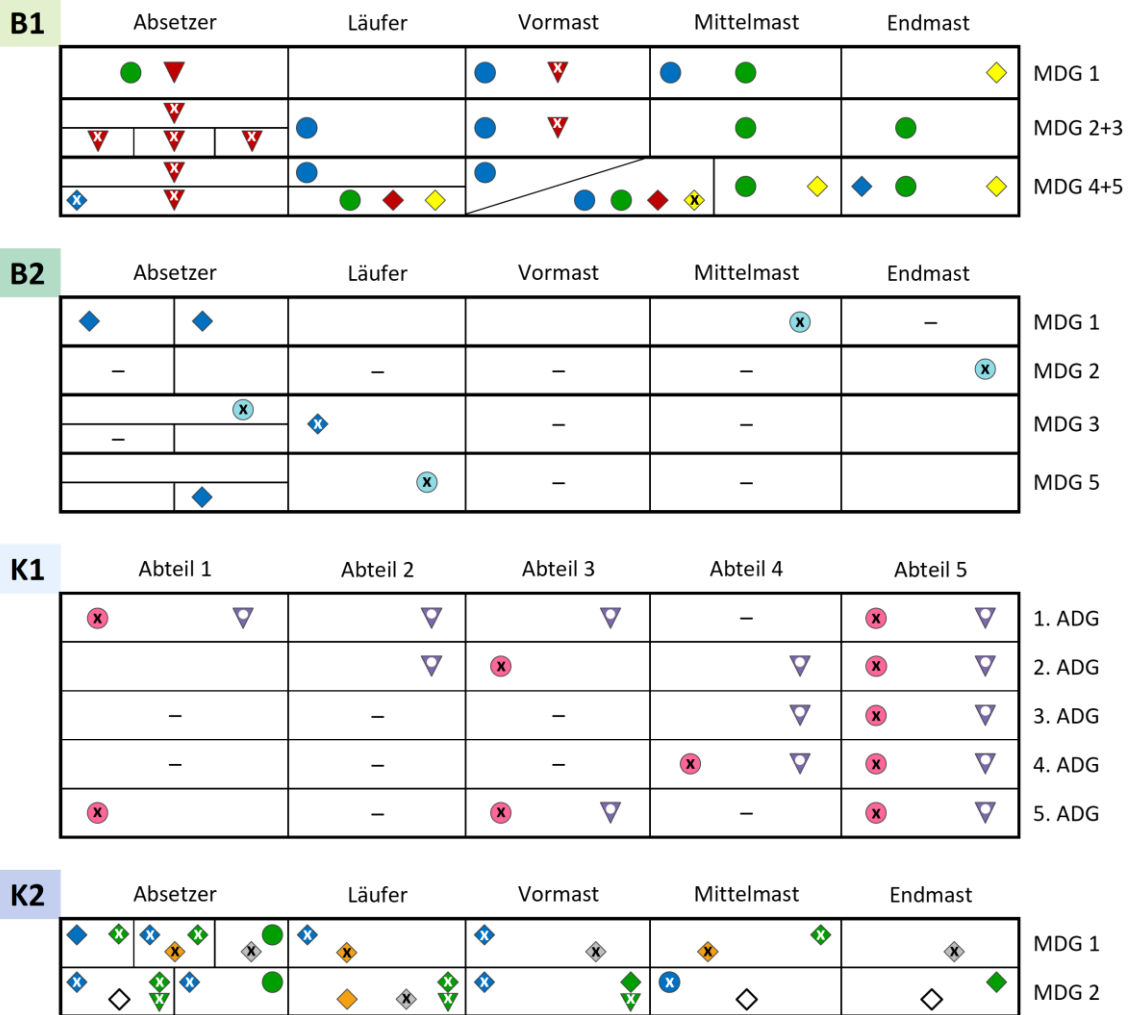


Abb. 93: Übersichtsgrafik zu persistenten Sequenztypen (ST) mit ihren Fluorchinolon- / Cephalosporin-Resistenzdeterminanten

Aufbau, Farben und Abkürzungen siehe Abb. 74; farbiges Symbol = Mindestens ein Stamm des entsprechenden Betriebs-persistenten STs aus dieser Sammelkotprobe isoliert; farbloses Symbol = Mindestens ein Stamm des MDG-persistenten STs aus dieser Sammelkotprobe isoliert; Raute = Stamm mit *bla_{CTX-M-1}*; Dreieck = Stamm mit *bla_{CTX-M-15}*; X = Stamm trägt zusätzlich zur β -Laktamase *qnrS*; weißer Punkt = Stamm trägt zusätzlich zur β -Laktamase *aac(6')-Ib-cr*.

5.4.3 Eigenschaften persistenter Stämme

Es gab keinen Zusammenhang zwischen Persistenz und Betriebszugehörigkeit oder der Verbreitung eines STs auf mehreren Betrieben. So fanden sich persistente ST bei Betriebs-*singletons* aller vier Betriebe, aber auch bei ST, die auf zwei der vier oder sogar auf allen vier Betrieben vorkamen (Abb. 94). Auch bei unterschiedlichem Betriebsmanagement, Haltungssystem, unterschiedlicher Fütterung und unterschiedlichen betreuenden Tierärzten kommt es also zur Persistenz von CSRE / FQRE.

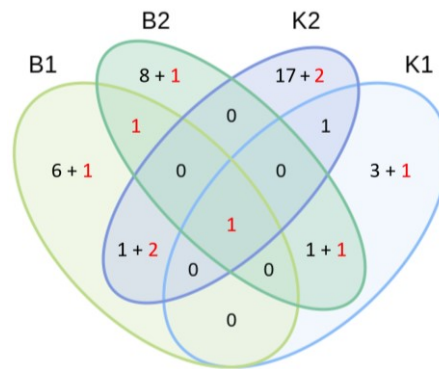


Abb. 94: Verteilung persistenter und nicht-persistenter Sequenztypen (ST) auf die Betriebe

Rote Ziffern = persistente ST; schwarze Ziffern = nicht-persistente ST.

Überraschend ist lediglich, dass aus Betrieb B2 deutlich weniger MDGs- bzw. Betriebs-persistente MP und ST isoliert wurden als aus den Betrieben B1 und K2, auf denen auch ganze MDG beprobt wurden, obwohl auf Betrieb B2 nur die Abferkelbuchten desinfiziert worden waren. Da aus Betrieb B2 aber generell nur wenige CSRE / FQRE isoliert wurden, könnten hier susceptible, persistente Stämme vorhanden sein, die mit unserer Methodik nicht detektiert wurden. Zudem wurde in Betrieb B2 während der Mast nur noch ein Teil der ursprünglichen Tiergruppe beprobt, weshalb manche Stämme ab der Vormast eventuell nicht mehr erfasst wurden, falls sie nur von bestimmten Tieren der Gruppe ausgeschieden wurden.

Dass von dreizehn MDGs-persistenten MP zehn (77 %) gleichzeitig Betriebs-persistent waren und von elf MDGs-persistenten ST sieben (64 %) gleichzeitig Betriebs-persistent waren, zeigt, dass sich *E. coli*-Stämme, die sich länger in einer Tiergruppe halten können, häufig effektiv im ganzen Betrieb ausbreiten. Die Korrelation entsteht vor allem durch diejenigen Betriebs-persistenten MP bzw. ST, die drei Mal in einem MDG und zusätzlich in einem weiteren MDG detektiert wurden. Die vermehrte oder prolongierte Ausscheidung eines Stammes könnte mehr Möglichkeiten zur Kontamination und Transmission bieten. Es könnte sich aber auch um sehr anpassungsfähige Stämme handeln, die sich schnell und effizient verbreiten, weshalb man von Generalisten-ST bzw. -MP spricht (van Schaik 2022).

Es wurden insgesamt mehr FQRE als CSRE isoliert, was darauf hinweist, dass FQR in mehr phänotypisch unterschiedlichen Stämmen verbreitet war oder dass sich Stämme mit dieser Resistenz besser auf den Betrieben erhalten haben, sodass sie öfter isoliert

werden konnten. Dies könnte in der erhöhten Mutationsrate begründet sein, die mit der Entwicklung von FQR verbunden wird (Marcusson *et al.* 2009), und eine schnelle Anpassung an wechselnde Umwelteinflüsse ermöglicht. Betrachtet man allerdings lediglich die 19 MDGs- bzw. Betriebs-persistenten MP, so bestanden diese zu fast gleichen Anteilen größtenteils entweder aus FQRE (n = 7; 37 %), aus CSRE (n = 4; 21 %) oder aus Stämmen mit Doppelresistenz (n = 6,3 %). Zwei persistente MP (11 %) enthielten CSRE und FQRE. Die persistenten ST enthielten fast gleich verteilt nur CSRE (n = 4), nur FQRE (n = 3) oder Stämme mit Doppelresistenz (n = 4), während sich die ST10 Stämme von Betrieb K2 aus CSRE und FQRE zusammensetzten. Bezieht man auch die Resistenzen gegenüber anderen AB-Klassen mit ein, so waren die Multiresistenz-Mittelwerte aller Stämme eines persistenten STs von einem Betrieb sehr unterschiedlich: Der niedrigste Mittelwert war 4,8 (ST69), der höchste 8,5 (ST744 aus Betrieb K2). Die Persistenz lässt sich somit nicht mit einem Resistenztyp oder dem Multiresistenz-Status assoziieren.

Da von zehn persistenten ST fünf der Phylogruppe A (klonaler Komplex 10 (ST10, ST167, ST772, ST744), ST5122), drei der Phylogruppe B1 (ST58, ST345, ST448) und jeweils ein ST den Phylogruppen D (ST69) oder E (ST1775) angehörten, lässt sich kein eindeutiger Zusammenhang mit einer Phylogruppe herstellen. Das Überwiegen der kommensalen Phylogruppen A und B1 liegt vermutlich eher an der Auswahl der Stämme bzw. der Entscheidung gegen eine Fokussierung auf Isolate aus kranken Tieren, in denen verstärkt pathogene Keime erwartet worden wären. Zudem sind Stämme der Phylogruppe A besonders empfänglich für RD (Tenailon *et al.* 2010), was mit den Kriterien zur Selektion übereinstimmt. Allerdings wurden Stämme dieser Phylogruppe im Kontext der Geflügelhaltung mit einer erhöhten Überlebensrate außerhalb der Wirtstiere in Verbindung gebracht, was die Übertragung von Tier zu Tier über die Stallumgebung und eine damit einhergehende Persistenz ermöglicht (Huijbers *et al.* 2016).

Einige der ST der persistenten Stämme sind aus der Literatur als weltweit verbreitete und leicht übertragbare Risikoklone mit hoher Virulenz- und/oder Resistenzlast bekannt (ST10, ST58, ST69, ST617, ST744 – Hayer *et al.* 2020; Denamur *et al.* 2021) und gehören teilweise zu erfolgreichen ExPEC-Linien (ST10, ST58, ST69 – Massella *et al.* 2021). Andere sind weniger bekannt (ST448, ST1775, ST5122) oder sind MLST-Doppelmutanten von bekannten Risikoklonen (ST345 von ST410 – Mutation in *gyrB* und *purA*;

ST772 von ST10 – Mutation in *adk* und *icd*; Hayer *et al.* 2020). Die Stämme aus dem klonalen Komplex 10 (CC10; Abb. 95) überwogen sowohl unter den persistenten Stämmen als auch im gesamten Datensatz. So stellten Stämme dieses CC die komplette untere Hälfte des kSNP-basierten Pangenom-Phylogeniebaums dar, wobei sie nach ST und Betriebszugehörigkeit geordnet waren (Abb. 62).

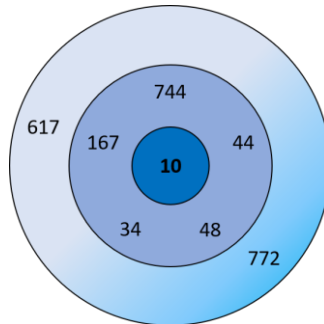


Abb. 95: Zum klonalen Komplex 10 gehörende detektierte Sequenztypen

Pro Ring kommt eine Allel-Differenz in den Nukleotidsequenzen von *adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* und *recA* im Vergleich zum innen anliegenden Ring bzw. Kreis hinzu.

CC10-Stämme gehören meist zu Phylogruppe A, sind sehr divers und weltweit sowohl in der Human- als auch Veterinärmedizin (Haus-, Wild- und Nutztiere), in Lebensmittelproben, in der Bevölkerung und der Umwelt verbreitet (Rodrigues *et al.* 2013; Hammerum *et al.* 2014; Abraham *et al.* 2015; Dorado-Garcia *et al.* 2018; Magaña-Lizárraga *et al.* 2022). Während Stämme dieses CC laut Literatur meist Träger von *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{OXA-1} und *aac(6′)-Ib-cr* sind, die auf großen Multireplikon-Plasmiden vom Typ IncFIA/FIB/FII kodiert sind (Fischer *et al.* 2014; Afema *et al.* 2018; Magaña-Lizárraga *et al.* 2022), traf dies bei uns lediglich auf ST617-Stämme zu. Die Stämme der restlichen ST von CC10 waren *bla*_{OXA-1}⁻ und *bla*_{CTX-M-15}⁻ negativ, dafür aber *bla*_{CTX-M-1}⁻ positiv. Das Vorkommen von Stämmen desselben CCs in verschiedenen, epidemiologisch nicht miteinander verknüpften Betrieben ist ein Hinweis auf ihre weitläufige Verbreitung sowie ihre Anpassungsfähigkeit und deutet darauf hin, dass es dominante, an das jeweilige Betriebsmanagement und die Haltungsform adaptierte Stämme dieses erfolgreichen CC gibt. Die genetische Flexibilität von ST10 allein sieht man dabei bereits an den zahlreichen kSNP-Unterschieden zwischen Stämmen dieses STs, die von verschiedenen Betrieben isoliert wurden, aber auch von ST10-Stämmen desselben Betriebs.

Um mehr über die genetische Ausstattung der persistenten Stämme zu erfahren, wurde das Kerngenom aller sequenzierten Stämme mit ihrem akzessorischen Genom verglichen (Abb. 96). Während die meisten persistenten ST in beiden Bäumen geschlossen gruppiert waren, waren ST10-Stämme jeweils an vier Positionen zu finden. Im Phylogeniebaum des Kerngenoms war der Großteil der Stämme dieses STs bei den Stämmen von ST617 gruppiert, im Baum des akzessorischen Genoms zwischen Stämmen von ST617 und ST1775, wobei letzterer nicht zum CC10 gehört. Der Rest der ST10-Stämme fand sich in der Nähe der Stämme von ST772. Diese auf genetischer Diversität basierte Auftrennung beruhte allerdings nicht auf der Betriebszugehörigkeit der ST10-Stämme (Daten nicht gezeigt), was erneut verdeutlicht, dass sich verschiedene Subtypen des STs auf einem Betrieb etablieren konnten.

In beiden Phylogeniebäumen waren die persistenten Stämme in ähnlicher Reihenfolge über den kompletten Baum verteilt. Abweichende Reihenfolgen in den beiden Bäumen, durch die jeweils andere ST phylogenetisch benachbart waren, kamen meist in Form von *clustern* vor, was durch Blöcke aus schrägen Linien abgebildet wird, und nur sehr selten in Form einzelner Stämme. Dennoch waren die persistenten Stämme im Phylogeniebaum des akzessorischen Genoms näher beieinander gruppiert. Dies spricht dafür, dass vor allem Gene des akzessorischen Genoms die Persistenz der Stämme ermöglichen. Hintergrund könnten neben den RD selbst z. B. Mutationen sein, die die Fitnesskosten der RD besonders effektiv aufwiegen (Baker *et al.* 2018). Es könnte sich auch um Virulenzfaktoren handeln, die zum Erfolg weltweit verbreiteter Stämme beitragen können (Schierack *et al.* 2009; Mathers *et al.* 2015) und die bereits mit dem Auftreten von RD auf gemeinsamen mobilen genetischen Elementen in Verbindung gebracht wurden (Carattoli 2009; Schaufler *et al.* 2016). Zudem fand Barth *et al.* heraus, dass persistente STEC-Stämme trotz ihres diversen genetischen Hintergrunds eine ähnliche Zusammenstellung an Virulenzfaktoren aufwiesen (Barth *et al.* 2016). Eine andere Studie entgegnet wiederum, dass bisher keine spezifischen Virulenzfaktoren die erhöhte Übertragbarkeit von pathogenen Risikoklonen erklären und damit nicht für ihre weltweite Verbreitung verantwortlich sein können (Riley 2020). Allerdings könnten auch andere biologische Faktoren wie die Ausstattung mit Pili zur Adhäsion (Licht *et al.* 2005) bzw. weitere kolonisierungsfördernde Faktoren (Vimont *et al.* 2012) oder die Fähigkeit, bestimmte Nährstoffe zu verwerten (Freter *et al.* 1983; Berry *et al.* 2016;

Foster-Nyarko *et al.* 2022), den persistenten Stämmen Wachstumsvorteile gegenüber anderen Stämmen verleihen und zu ihrem Erfolg beitragen. Bei resistenten Risikoklonen besteht dabei die Gefahr, dass sich ihre Population durch den Einsatz von AB lokal stark vermehrt und dann in eine pandemische Expansion übergeht (Baker *et al.* 2018).

Die persistenten Stämme waren im akzessorischen Phylogeniebaum an drei Stellen gruppiert. Dies kann darauf hinweisen, dass Bakterienstämme drei unterschiedliche genetische Möglichkeiten nutzen, um persistent zu werden. Die Persistenz kann bei Stämmen aller ST aber auch durch wenige, gleiche Gene bedingt sein, die aufgrund ihrer geringen Anzahl bei der Berechnung der Phylogenie durch andere akzessorische Gene überlagert wurden, wodurch drei Gruppierungen entstanden.

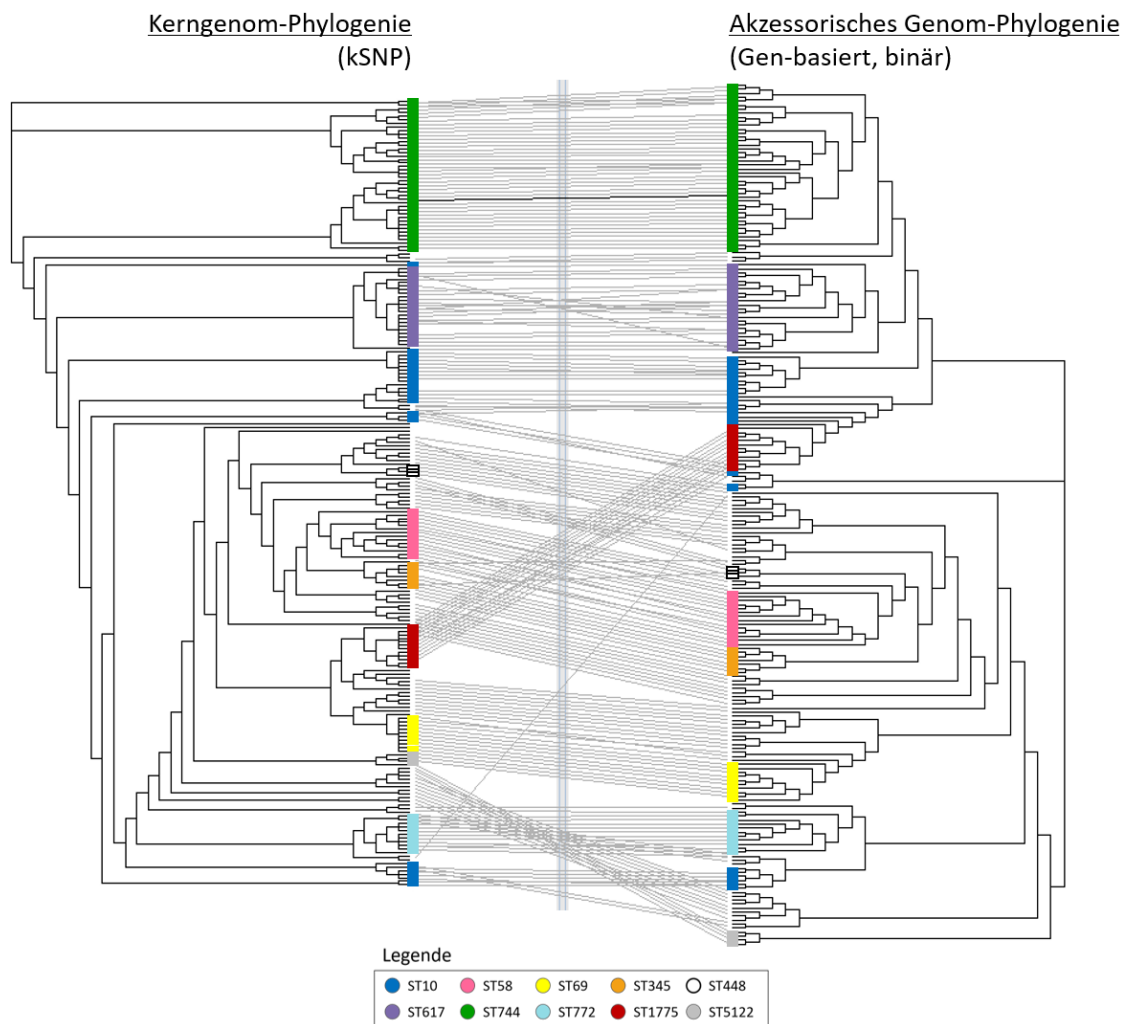


Abb. 96: Tanglegram aus Kerngenom- und akzessorischem Genom-Phylogeniebaum der 216 sequenzierten Stämme

Kerngenom-Phylogeniebaum siehe Abb. 92; der auf dem akzessorischen Genom beruhende Phylogeniebaum wurde auf Basis der An- bzw. Abwesenheit akzessorischer Gene mit Roary berechnet, das die Verwandtschaftsverhältnisse mit der *neighbour-joining* Methode mittels FastTree2 darstellt.

Zusammenfassend betrachtet erfüllen die von uns als persistent identifizierten Stämme einen Großteil der gängigen Kriterien von Risikoklonen. Viele der Stämme sind (I) weltweit verbreitet, (II) multiresistent, (III) gute Kolonisierer und können leicht übertragen werden, da sie pro Betrieb in mehreren MDG detektiert wurden, (IV) können in den Betrieben persistieren und (V) wurden laut Literatur bereits in vielen unterschiedlichen Tierarten und Reservoirs detektiert (Woodford *et al.* 2011; Mathers *et al.* 2015; de Lagarde *et al.* 2021). Einzig das Kriterium der Virulenz wurde in unserem Datensatz nicht überprüft, weshalb die Stämme hier als Protopathogene zu bezeichnen sind. Ihre große Anpassungsfähigkeit, die sie zu guten Kolonisierern und Persistierern macht, ermöglicht ihnen auch ihre weltweite Verbreitung (Baker *et al.* 2018) bzw. kann die Stämme der ST, die noch nicht weltweit verbreitet sind, zu aufkommenden Risikoklonen werden lassen.

5.5 Schlussfolgerung

Trotz der 2018 verabschiedeten Reglementierung des veterinärmedizinischen Einsatzes von CS3/4 und FQ wurden in den Betrieben während des kompletten Beprobungszeitraums CSR / FQR Bakterien detektiert. Die RD gegenüber diesen AB-Klassen blieben vermutlich unabhängig vom Einsatz der jeweiligen AB aufgrund von Ko-Selektion und Kreuz-Resistenz, durch die Persistenz von Trägerstämmen sowie durch die konservierte Lokalisation auf Plasmiden bzw. durch erfolgreiche Stamm-Plasmid-Kombinationen erhalten. Um ein besseres Verständnis der Flexibilität dieser Plasmidstrukturen sowie der Dynamik des RD-Transfers zwischen den unterschiedlichen mobilen genetischen Elementen zu erlangen, sollten weitere Analysen der Plasmide durch *long read* Sequenzierung durchgeführt werden. Basierend auf den in der vorliegenden Studie erlangten Erkenntnissen können wir aber bereits schließen, dass die alleinige Beschränkung des Einsatzes bestimmter AB oder ganzer AB-Klassen, auf der auch das Prinzip der TÄHAV-Änderung beruht, nicht ausreichen wird, um die Prävalenz der entsprechenden Resistenzen nachhaltig zu senken. Außerdem gehen die an der 16. Arzneimittelgesetzesänderung beteiligten Berufsgruppen davon aus, dass eine weitere Reduktion des AB-Einsatzes in der Veterinärmedizin nur unter der Bedingung einer gleichzeitigen Verbesserung der Tiergesundheit gelingen kann (BMEL 2019). Diese sollte durch Hygiene- und Bio-Sicherheitsmaßnahmen, durch eine Anpassung der Haltungsbedingungen, bedarfsgerechte Fütterung und strukturiertes Herdenmanagement

erreicht werden (BVL 2016; Groot *et al.* 2021). Zudem sollten weitere Maßnahmen zur Unterbindung der Persistenz von CSRE / FQRE bzw. zu ihrer Ausmerzungen ergriffen werden (Lim *et al.* 2010; Fleury *et al.* 2015; DART 2020 2015). Ziel muss es sein, das Resistenzreservoir gegenüber in der Humanmedizin kritisch wichtigen AB im Mikrobiom der Schweine zu minimieren und so das Risiko zur Entstehung neuer CSRE / FQRE, die sich zu Stämmen von humanmedizinischer Relevanz entwickeln könnten, zu vermindern (Mathers *et al.* 2015; Baker *et al.* 2018; Hayer *et al.* 2020). Dazu zählt der Ersatz antibiotischer Therapien durch z. B. Phytotherapeutika, die Unterbindung des Zukaufs CSRE- / FQRE-positiver Schweine, die Eliminierung von Kontaminationsquellen auf den Betrieben oder die Vakzinbasierte-Prävention resistenter Stämme (Berry *et al.* 2016; Hoelzer *et al.* 2018; Groot *et al.* 2021). Allerdings wird der umsichtige Einsatz vor allem kritisch wichtiger AB in Human- und Veterinärmedizin weiterhin als wichtigste Maßnahme zur Senkung der Resistenzprävalenz betrachtet, obwohl die alleinige Reduktion der Menge an eingesetzten antibiotischen Wirkstoffen der komplexen Problematik der Resistenzentwicklung sowie -persistenz nicht gerecht wird (Volkova *et al.* 2013; BVL 2016). So zeigten einige Studien bereits, dass RD oder ihre Trägerstämme, die sich im Mikrobiom etabliert und verteilt haben, auch ohne den Selektionsdruck der entsprechenden AB lange Zeit bestehen bleiben (Wittum 2012; Fleury *et al.* 2015; Abraham *et al.* 2018; Kaspersen *et al.* 2020a; Poulin-Laprade *et al.* 2021). Für die Entwicklung neuer Konzepte zur Bekämpfung steigender Resistenzprävalenzen in der Nutztierhaltung benötigt man weitere Kenntnis über die zugrundeliegenden Resistenzmechanismen, ihrer Verbreitung und die Mechanismen, die ihre Retention in den Tiergruppen ermöglichen (Melnik *et al.* 2015; Hayer *et al.* 2020). Da die genetische Grundlage für die Persistenz vermutlich im akzessorischen Genom zu finden ist, sollte dieses tiefergehend mittels genomweiter Assoziationsstudien analysiert werden. In diesem Zusammenhang leistet die vorliegende Studie einen Beitrag zum Verständnis des Resistoms und seiner Dynamik auf schweinehaltenden Betrieben und soll Anregungen zu weiteren Analysen liefern, die zur Aufklärung der Persistenz von Antibiotikaresistenzen beitragen können.

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Studie war die Bestimmung der Prävalenz Cephalosporin- bzw. Fluorchinolone-resistenter Gammaproteobakterien auf vier thüringischen Betrieben über einen längeren Zeitraum. Dabei wurden Informationen zu den beprobten Tiergruppen und zu antibiotischen Therapien gesammelt sowie als Indikatororganismen dienende Cephalosporin- bzw. Fluorchinolone-resistente *E. coli*-Stämme isoliert und charakterisiert. Aus den gewonnenen Daten sollte die mögliche Persistenz einzelner Stämme nachgewiesen und damit der Erhalt der Cephalosporin- bzw. Fluorchinolone-Resistenzdeterminanten analysiert werden. Trotz der 2018 verabschiedeten Reglementierung des veterinärmedizinischen Einsatzes von Fluorchinolonen sowie Cephalosporinen der dritten und vierten Generation wurden in allen Betrieben Gammaproteobakterien mit Resistenzen gegenüber diesen Antibiotikaklassen detektiert. Allerdings schwankte ihr Anteil an der Gesamtpopulation zwischen den Betrieben, den verschiedenen Altersstufen der beprobten Schweine und zwischen den Mastdurchgängen eines Betriebs. Durch die intensive, longitudinale Beprobung ließ sich die Dynamik der Resistenzprävalenzen innerhalb eines Mastdurchgangs und über mehrere Mastdurchgänge für jeden Betrieb darstellen. Dabei nahm die Resistenzprävalenz meist mit zunehmendem Alter der Tiere ab. Diese Reduktion und die restliche Dynamik ließ sich allerdings nur teilweise mit den durchgeführten Antibiotikatherapien erklären. Aus den Sammelkotproben aller Betriebe und Altersstufen wurden Cephalosporin- bzw. Fluorchinolone-resistente *E. coli*-Stämme isoliert, die alle multiresistent waren sowie häufig Resistenzen gegenüber Wirkstoffen aufwiesen, die die Europäische Arzneimittel-Agentur in Kategorie D einordnet, da sie als therapeutische Antibiotika der ersten Wahl angewandt werden sollten. Die auf der *multiple-locus variable-number tandem-repeat* Analyse beruhenden Profile der Stämme erlaubten es, ähnliche Stämme an verschiedenen Beprobungszeitpunkten auf den Betrieben, aber auch Stamm-*cluster* über die Betriebe hinweg zu identifizieren. Anhand der Vollgenomsequenzen von etwa der Hälfte der Stämme konnten Sequenztypen identifiziert werden, die auf den einzelnen Betrieben persistent auftraten und auch über mehrere Monate große genetische Übereinstimmung zeigten – inklusive der Cephalosporin- bzw. Fluorchinolone-Resistenzdeterminanten sowie ihrer Sequenzumgebung. Viele persistente Stämme gehörten zum klonalen Komplex 10,

aber auch andere persistente Stämme wurden als Sequenztypen identifiziert, die aus der Literatur als Risikoklone für eine weltweite Verbreitung mit pathogenem Potenzial bekannt sind. Die genetische Grundlage der Persistenz in Betrieben mit geschlossener Haltungsform ist wahrscheinlich im akzessorischen Genom zu finden, konnte jedoch mit den vorhandenen Daten noch nicht genauer bestimmt werden. Es zeigte sich aber, dass Eigenschaften wie die Betriebszugehörigkeit, die Phylogruppe oder die Anzahl an Resistenzen gegenüber verschiedenen AB-Klassen in dieser Studie keinen maßgeblichen Einfluss auf das Vermögen zur Persistenz hatten. Auch die Persistenz der Cephalosporin- und Fluorchinolon-Resistenzdeterminanten selbst konnte dargestellt und unter anderem in Zusammenhang mit Ko-Selektion und Kreuz-Resistenz, aber auch mit der konservierten Lokalisation auf Plasmiden bzw. erfolgreichen Stamm-Plasmid-Kombinationen gebracht werden. Die vorliegende Studie zeigte damit, dass der Einsatz eines Antibiotikums nicht der einzige Einflussfaktor auf die entsprechende Resistenzprävalenz bzw. die Ausbreitung und Erhaltung von Resistenzdeterminanten in landwirtschaftlichen Betrieben ist. Daher wird die alleinige Beschränkung des Einsatzes bestimmter Antibiotika in der Veterinärmedizin nicht ausreichen, um die Prävalenz der entsprechenden Resistenzen nachhaltig zu senken. Eine Analyse der Mechanismen, die der Persistenz von resistenten Stämmen und Resistenzdeterminanten zugrunde liegen, und die Aufklärung ihrer Komplexität ist nötig, um diese Mechanismen bei zukünftigen Maßnahmen zur Bekämpfung steigender Resistenzprävalenzen berücksichtigen zu können.

7 Summary

This study set out to determine the prevalence of cephalosporin- and fluoroquinolone-resistant bacteria on four farms in Thuringia over an extended period of time while collecting information on the sampled animal groups, especially any antibiotic treatments they received. Cephalosporin- and fluoroquinolone-resistant *E. coli* strains, serving as indicator bacteria, were isolated and characterized. The data was collected in an attempt to investigate possible persistence of individual strains and thereby analyse the retention of cephalosporin and fluoroquinolone resistance determinants. Despite government amendments adopted in 2018 restricting veterinary usage of fluoroquinolones as well as third and fourth generation cephalosporins, fluoroquinolone- and cephalosporin-resistant bacteria were detected in pooled fecal samples from pigs on all farms. Yet, their percentage of the total bacterial population growing on Gassner agar varied strongly between farms, different age groups of the pigs sampled and between different fattening runs on a farm. Intensive longitudinal sampling allowed us to depict the dynamics of resistance prevalences within a fattening run and between several fattening runs for each farm. On all farms, the prevalences of cephalosporin- and fluoroquinolone-resistant bacteria were higher in piglets and declined thereafter. However, this reduction and the remaining dynamics could only be partially explained by the antibiotic treatments. Cephalosporin- and fluoroquinolone-resistant *E. coli* strains were isolated from fecal samples of all farms and age groups. They were all multidrug-resistant and frequently exhibited resistance to agents that the European Medicines Agency classifies as category D, meaning that they should be used as first-line therapeutic antibiotics. Strain profiles based on multiple-locus variable-number tandem-repeat typing analysis yielded similar strains at different sampling time points on the farms, but also strain clusters spanning more than one farm. Whole-genome sequencing of about half of the strains identified sequence types that occurred persistently on individual farms and showed high genetic similarity over several months, including the cephalosporin- or fluoroquinolone-resistance determinants and their sequence surroundings. Many persistent strains belonged to clonal complex 10, but other persistent strains were also identified featuring sequence types described in the literature as high-risk clones for global expansion with pathogenic potential. The genetic basis enabling persistence in a closed-farm environment is likely to be found

in the accessory genome, but could not yet be narrowed down more precisely with the data available. However, traits, such as association with one or several farms, phylogroup, or number of resistances to different antibiotic classes, were not found to have an influence on the ability to persist in this study. The persistence of cephalosporin and fluoroquinolone resistance determinants themselves could also be demonstrated and was related to, amongst others, co-selection and cross-resistance, but also to conserved localization on plasmids or successful strain-plasmid combinations. The present work showed that the use of an antibiotic cannot be the only factor influencing the respective resistance prevalence or the spread and maintenance of the resistance determinants on a farm. Therefore, restricting the use of certain antibiotics in veterinary medicine alone will not be sufficient to sustainably reduce the prevalence of the corresponding resistances. The complexity of the mechanisms underlying the persistence of resistant strains and resistance determinants needs to be better understood before they can be included in the regulations addressing antibiotic use in future action plans geared towards fighting the presence of antimicrobial resistance.

8 Literaturverzeichnis

- Aarestrup, F. M.** (2004): Monitoring of Antimicrobial Resistance Among Food Animals: Principles and Limitations. *J Vet Med* 51:380-388.
- Aarestrup, F. M.** (2005): Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 96 (4):271-81. doi: 10.1111/j.1742-7843.2005.pto960401.x.
- Abraham, S.; Jordan, D.; Wong, H. S.; Johnson, J. R.; Toleman, M. A.; Wakeham, D. L.; Gordon, D. M.; Turnidge, J. D.; Mollinger, J. L.; Gibson, J. S.; Trott, D. J.** (2015): First detection of extended-spectrum cephalosporin- and fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* in Australian food-producing animals. *J Glob Antimicrob Resist* 3 (4):273-277. doi: 10.1016/j.jgar.2015.08.002.
- Abraham, S.; Kirkwood, R. N.; Laird, T.; Saputra, S.; Mitchell, T.; Singh, M.; Linn, B.; Abraham, R. J.; Pang, S.; Gordon, D. M.; Trott, D. J.; O'Dea, M.** (2018): Dissemination and persistence of extended-spectrum cephalosporin-resistance encoding IncI1-blaCTXM-1 plasmid among *Escherichia coli* in pigs. *ISME J* 12 (10):2352-2362. doi: 10.1038/s41396-018-0200-3.
- Acar, J.** (1997): Broad- and narrow-spectrum antibiotics: an unhelpful categorization. *Clin Microbiol Infect* 3 (4):395-396. doi: 10.1111/j.1469-0691.1997.tb00274.x.
- Achtman, M.; Wain, J.; Weill, F. X.; Nair, S.; Zhou, Z.; Sangal, V.; Krauland, M. G.; Hale, J. L.; Harbottle, H.; Uesbeck, A.; Dougan, G.; Harrison, L. H.; Brisse, S.** (2012): Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. *PLoS Pathog* 8 (6):e1002776. doi: 10.1371/journal.ppat.1002776.
- Afema, J. A.; Ahmed, S.; Besser, T. E.; Jones, L. P.; Sischo, W. M.; Davis, M. A.** (2018): Molecular Epidemiology of Dairy Cattle-Associated *Escherichia coli* Carrying bla(CTX-M) Genes in Washington State. *Appl Environ Microbiol* 84 (6). doi: 10.1128/aem.02430-17.
- Agersø, Y.; Aarestrup, F. M.** (2013): Voluntary ban on cephalosporin use in Danish pig production has effectively reduced extended-spectrum cephalosporinase-producing *Escherichia coli* in slaughter pigs. *J Antimicrob Chemother* 68 (3):569-72. doi: 10.1093/jac/dks427.
- Agersø, Y.; Jensen, J. D.; Hasman, H.; Pedersen, K.** (2014): Spread of extended spectrum cephalosporinase-producing *Escherichia coli* clones and plasmids from parent animals to broilers and to broiler meat in a production without use of cephalosporins. *Foodborne Pathog Dis* 11 (9):740-6. doi: 10.1089/fpd.2014.1742.
- Ahmed, W.; Neubauer, H.; Tomaso, H.; El Hofy, F. I.; Monecke, S.; Abd El-Tawab, A. A.; Hotzel, H.** (2021): Characterization of Enterococci- and ESBL-Producing *Escherichia coli* Isolated from Milk of Bovides with Mastitis in Egypt. *Pathogens* 10 (2). doi: 10.3390/pathogens10020097.
- Ambler, R. P.** (1980): The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 289 (1036):321-31. doi: 10.1098/rstb.1980.0049.
- Amsler, M.; Zurfluh, K.; Hartnack, S.; Sidler, X.; Stephan, R.; Kummerlen, D.** (2021): Occurrence of *Escherichia coli* non-susceptible to quinolones in faecal samples from fluoroquinolone-treated, contact and control pigs of different ages from 24 Swiss pig farms. *Porcine Health Manag* 7 (1):29. doi: 10.1186/s40813-021-00209-y.
- Andersen, V. D.; Jensen, V. F.; Vigre, H.; Andreasen, M.; Agerso, Y.** (2015): The use of third and fourth generation cephalosporins affects the occurrence of extended-spectrum cephalosporinase-producing *Escherichia coli* in Danish pig herds. *Vet J* 204 (3):345-50. doi: 10.1016/j.tvjl.2015.03.014.
- Andersson, D. I.; Levin, B. R.** (1999): The biological cost of antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol* 2 (5):489-493. doi: 10.1016/s1369-5274(99)00005-3.
- Andersson, D. I.; Hughes, D.** (2014): Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nat Rev Microbiol* 12 (7):465-78. doi: 10.1038/nrmicro3270.

- Andremont, A.** (2003): Commensal Flora May Play Key Role in Spreading Antibiotic Resistance. *ASM News* 69:601-607.
- Apley, M. D.; Brown, S. A.; Fedorka-Cray, P. J.; Ferenc, S.; House, J. K.; Riviere, J. E.; Rice, L. B.; Thornsberry, C.; Waddell, J.** (1998): Role of veterinary therapeutics in bacterial resistance development: animal and public health perspectives. *J Am Vet Med Assoc* 212 (8):1209-13.
- Arredondo-Alonso, S.; Willems, R. J.; van Schaik, W.; Schurch, A. C.** (2017): On the (im)possibility of reconstructing plasmids from whole-genome short-read sequencing data. *Microb Genom* 3 (10):e000128. doi: 10.1099/mgen.0.000128.
- ARS:** Antibiotika-Resistenz-Surveillance-Projekt. Robert Koch-Institut (Zugriff am 11.12.2021). <https://ars.rki.de/>.
- AVID-Methodensammlung:** Resistenzbestimmungen schnellwachsender Bakterien (Agardiffusionstest) (Lieferung X 1998); Bewertung der Hemmhofdurchmesser und Grenzwertkonzentrationen der in der Veterinärmedizin zugelassenen Antibiotika (Lieferungen XI 1999 und XII 2000).
- Baharoglu, Z.; Bikard, D.; Mazel, D.** (2010): Conjugative DNA transfer induces the bacterial SOS response and promotes antibiotic resistance development through integron activation. *PLoS Genet* 6 (10):e1001165. doi: 10.1371/journal.pgen.1001165.
- Baker, S.; Thomson, N.; Weill, F. X.; Holt, K. E.** (2018): Genomic insights into the emergence and spread of antimicrobial-resistant bacterial pathogens. *Science* 360 (6390):733-738. doi: 10.1126/science.aar3777.
- Baker-Austin, C.; Wright, M. S.; Stepanauskas, R.; McArthur, J. V.** (2006): Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends Microbiol* 14 (4):176-82. doi: 10.1016/j.tim.2006.02.006.
- Bakkeren, E.; Huisman, J. S.; Fattinger, S. A.; Hausmann, A.; Furter, M.; Egli, A.; Slack, E.; Sellin, M. E.; Bonhoeffer, S.; Regoes, R. R.; Diard, M.; Hardt, W. D.** (2019): Salmonella persists promote the spread of antibiotic resistance plasmids in the gut. *Nature* 573 (7773):276-280. doi: 10.1038/s41586-019-1521-8.
- Baldo, V.; Salogni, C.; Giovannini, S.; D'Incau, M.; Boniotti, M. B.; Birbes, L.; Pitozzi, A.; Formenti, N.; Grassi, A.; Pasquali, P.; Alborali, G. L.** (2020): Pathogenicity of Shiga Toxin Type 2e *Escherichia coli* in Pig Colibacillosis. *Front Vet Sci* 7:545818. doi: 10.3389/fvets.2020.545818.
- Barlow, M.; Reik, R. A.; Jacobs, S. D.; Medina, M.; Meyer, M. P.; McGowan, J. E., Jr.; Tenover, F. C.** (2008): High rate of mobilization for blaCTX-Ms. *Emerg Infect Dis* 14 (3):423-8. doi: 10.3201/eid1403.070405.
- Barth, S. A.** (2003): Untersuchung zur immunologischen Bedeutung des Virulenzfaktors SpvD von *Salmonella enterica*. Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Barth, S. A.; Menge, C.; Eichhorn, I.; Semmler, T.; Wieler, L. H.; Pickard, D.; Belka, A.; Berens, C.; Geue, L.; Besser, T. E.** (2016): The Accessory Genome of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Defines a Persistent Colonization Type in Cattle. *Appl Environ Microbiol* 82 (17):5455-5464. doi: 10.1128/aem.00909-16.
- Becattini, S.; Taur, Y.; Pamer, E. G.** (2016): Antibiotic-Induced Changes in the Intestinal Microbiota and Disease. *Trends Mol Med* 22 (6):458-478. doi: 10.1016/j.molmed.2016.04.003.
- Bednorz, C.; Oelgeschläger, K.; Kinnemann, B.; Hartmann, S.; Neumann, K.; Pieper, R.; Bethe, A.; Semmler, T.; Tedin, K.; Schierack, P.; Wieler, L. H.; Guenther, S.** (2013): The broader context of antibiotic resistance: zinc feed supplementation of piglets increases the proportion of multi-resistant *Escherichia coli* in vivo. *Int J Med Microbiol* 303 (6-7):396-403. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.06.004.
- Belloc, C.; Lam, D. N.; Pellerin, J. L.; Beaudeau, F.; Laval, A.** (2005): Effect of quinolone treatment on selection and persistence of quinolone-resistant *Escherichia coli* in swine faecal flora. *J Appl Microbiol* 99 (4):954-9. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02667.x.

- Bergspica, I.; Kaprou, G.; Alexa, E. A.; Prieto, M.; Alvarez-Ordóñez, A.** (2020): Extended Spectrum beta-Lactamase (ESBL) Producing *Escherichia coli* in Pigs and Pork Meat in the European Union. *Antibiotics (Basel)* 9 (10). doi: 10.3390/antibiotics9100678.
- Bernreiter-Hofer, T.; Schwarz, L.; Müller, E.; Cabal-Rosel, A.; Korus, M.; Misić, D.; Frankenfeld, K.; Abraham, K.; Grunzweil, O.; Weiss, A.; Fessler, A. T.; Allerberger, F.; Schwarz, S.; Szostak, M. P.; Ruppitsch, W.; Ladinig, A.; Spargser, J.; Braun, S. D.; Monecke, S.; Ehrlich, R.; Lončarić, I.** (2021): The Pheno- and Genotypic Characterization of Porcine *Escherichia coli* Isolates. *Microorganisms* 9 (8). doi: 10.3390/microorganisms9081676.
- Berry, E. D.; Wells, J. E.** (2016): Reducing Foodborne Pathogen Persistence and Transmission in Animal Production Environments: Challenges and Opportunities. *Microbiol Spectr* 4 (4). doi: 10.1128/microbiolspec.PFS-0006-2014.
- Bevan, E. R.; Jones, A. M.; Hawkey, P. M.** (2017): Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. *J Antimicrob Chemother* 72 (8):2145-2155. doi: 10.1093/jac/dkx146.
- BIOHAZ – EFSA Panel on Biological Hazards** (2011): Scientific Opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum β -lactamases and/or AmpC β -lactamases in food and food-producing animals. *EFSA Journal*; 9 (8):2322. 95 pp. doi: 10.2903/j.efsa.2011.2322. www.efsa.europa.eu/efsajournal.
- Birkegard, A. C.; Halasa, T.; Graesboll, K.; Clasen, J.; Folkesson, A.; Toft, N.** (2017): Association between selected antimicrobial resistance genes and antimicrobial exposure in Danish pig farms. *Sci Rep* 7 (1):9683. doi: 10.1038/s41598-017-10092-9.
- Blair, J. M.; Webber, M. A.; Baylay, A. J.; Ogbolu, D. O.; Piddock, L. J.** (2015): Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 13 (1):42-51. doi: 10.1038/nrmicro3380.
- Blake, D. P.; Hillman, K.; Fenlon, D. R.; Low, J. C.** (2003): Transfer of antibiotic resistance between commensal and pathogenic members of the *Enterobacteriaceae* under ileal conditions. *J Appl Microbiol* 95 (3):428-36. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.01988.x.
- Blattner, F. R.; Plunkett, G., 3rd; Bloch, C. A.; Perna, N. T.; Burland, V.; Riley, M.; Collado-Vides, J.; Glasner, J. D.; Rode, C. K.; Mayhew, G. F.; Gregor, J.; Davis, N. W.; Kirkpatrick, H. A.; Goeden, M. A.; Rose, D. J.; Mau, B.; Shao, Y.** (1997): The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277 (5331):1453-62. doi: 10.1126/science.277.5331.1453.
- BMEL – Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft** (2019): Bericht des BMEL über die Evaluierung des Antibiotikaminimierungskonzepts der 16. AMG-Novelle – Evaluierung auf Grund des § 58g des Arzneimittelgesetzes. (Evaluierung auf Grund des § 58g des Arzneimittelgesetzes). <https://www.bmel.de/DE/themen/tiere/tierarzneimittel/kurzfassung16-amg-novelle.html>.
- BMJ – Bundesministerium der Justiz** (2014): 16. Gesetz zur Änderung des Arzneimittelgesetzes vom 10.10.2013 (16. AMG-Novelle), Bundesgesetzblatt Teil I S. 3813; zuletzt geändert durch Berichtigung der 16. AMG-Novelle vom 24.03.2014. *Bundesgesetzblatt Teil I*:S 272.
- BMJ – Bundesministerium der Justiz** (2018): Zweite Verordnung zur Änderung der Verordnung über tierärztliche Hausapotheken vom 21.02.2018. *Bundesgesetzblatt Teil I Nr. 7*:S 213-6.
- BMJ – Bundesministerium der Justiz** (2021): 17. Gesetz zur Änderung des Arzneimittelgesetzes vom 10. August 2021, ausgegeben zu Bonn am 17.08.2021. *Bundesgesetzblatt Teil I Nr. 53*:S 3519-22.
- Bokhary, H.; Pangesti, K. N. A.; Rashid, H.; Abd El Ghany, M.; Hill-Cawthorne, G. A.** (2021): Travel-Related Antimicrobial Resistance: A Systematic Review. *Trop Med Infect Dis* 6 (1). doi: 10.3390/tropicalmed6010011.
- Bonnet, R.** (2004): Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 48 (1):1-14. doi: 10.1128/aac.48.1.1-14.2004.

- BTK** (2015): Leitlinien für den sorgfältigen Umgang mit antibakteriell wirksamen Tierarzneimitteln - Überarbeitete Fassung (Stand Januar 2015). Bundestierärztekammer in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgemeinschaft der Leitenden Veterinärbeamten.
- Burow, E.; Rostalski, A.; Harlizius, J.; Gangl, A.; Simoneit, C.; Grobbel, M.; Kollas, C.; Tenhagen, B. A.; Kasbohrer, A.** (2019): Antibiotic resistance in *Escherichia coli* from pigs from birth to slaughter and its association with antibiotic treatment. *Prev Vet Med* 165:52-62. doi: 10.1016/j.prevetmed.2019.02.008.
- Bush, K.; Jacoby, G. A.** (2010): Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 54 (3):969-76. doi: 10.1128/aac.01009-09.
- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) und Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V.** (2016): GERMAP 2015 – Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland.
- BVL – Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit** (2018): Zoonosen-Monitoring Bericht 2017.
- BVL – Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit** (2020): Bericht zur Resistenzmonitoringstudie 2018.
- BVL – Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit** (2021): Antibiotikaabgabemengen. (Zugriff am 02.12.2021). https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Pressemitteilungen/05_tierarzneimittel/2021/2021_10_12_PI_Abgabemengen_Antibiotika_Tiermedizin.html.
- Call, D. R.; Matthews, L.; Subbiah, M.; Liu, J.** (2013): Do antibiotic residues in soils play a role in amplification and transmission of antibiotic resistant bacteria in cattle populations? *Front Microbiol* 4:193. doi: 10.3389/fmicb.2013.00193.
- Callens, B.; Faes, C.; Maes, D.; Catry, B.; Boyen, F.; Francoys, D.; de Jong, E.; Haesebrouck, F.; Dewulf, J.** (2015): Presence of antimicrobial resistance and antimicrobial use in sows are risk factors for antimicrobial resistance in their offspring. *Microb Drug Resist* 21 (1):50-8. doi: 10.1089/mdr.2014.0037.
- Callens, B.; Cargnel, M.; Sarrazin, S.; Dewulf, J.; Hoet, B.; Vermeersch, K.; Wattiau, P.; Welby, S.** (2018): Associations between a decreased veterinary antimicrobial use and resistance in commensal *Escherichia coli* from Belgian livestock species (2011-2015). *Prev Vet Med* 157:50-58. doi: 10.1016/j.prevetmed.2017.10.013.
- Camelena, F.; Birgy, A.; Smail, Y.; Courroux, C.; Mariani-Kurkdjian, P.; Le Hello, S.; Bonacorsi, S.; Bidet, P.** (2019): Rapid and Simple Universal *Escherichia coli* Genotyping Method Based on Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis Using Single-Tube Multiplex PCR and Standard Gel Electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 85 (6). doi: 10.1128/AEM.02812-18.
- Cameron-Veas, K.; Sola-Gines, M.; Moreno, M. A.; Fraile, L.; Migura-Garcia, L.** (2015): Impact of the use of beta-lactam antimicrobials on the emergence of *Escherichia coli* isolates resistant to cephalosporins under standard pig-rearing conditions. *Appl Environ Microbiol* 81 (5):1782-7. doi: 10.1128/AEM.03916-14.
- Cantón, R.; Coque, T. M.** (2006): The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol* 9 (5):466-75. doi: 10.1016/j.mib.2006.08.011.
- Cantón, R.; Novais, A.; Valverde, A.; Machado, E.; Peixe, L.; Baquero, F.; Coque, M.** (2008): Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect* 14:144-153.
- Carattoli, A.** (2009): Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 53 (6):2227-38. doi: 10.1128/AAC.01707-08.
- Carattoli, A.** (2011): Plasmids in Gram negatives: molecular typing of resistance plasmids. *Int J Med Microbiol* 301 (8):654-8. doi: 10.1016/j.ijmm.2011.09.003.

- Carattoli, A.; Zankari, E.; García-Fernández, A.; Voldby Larsen, M.; Lund, O.; Villa, L.; Møller Aarestrup, F.; Hasman, H.** (2014): In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother* 58 (7):3895-903. doi: 10.1128/aac.02412-14.
- Casanova, N. A.; Redondo, L. M.; Dailoff, G. C.; Arenas, D.; Fernández Miyakawa, M. E.** (2018): Overview of the role of Shiga toxins in porcine edema disease pathogenesis. *Toxicon* 148:149-154. doi: 10.1016/j.toxicon.2018.04.019.
- Cavaco, L. M.; Abatih, E.; Aarestrup, F. M.; Guardabassi, L.** (2008): Selection and persistence of CTX-M-producing *Escherichia coli* in the intestinal flora of pigs treated with amoxicillin, ceftiofur, or cefquinome. *Antimicrob Agents Chemother* 52 (10):3612-6. doi: 10.1128/AAC.00354-08.
- Ceccarelli, D.; Kant, A.; van Essen-Zandbergen, A.; Dierikx, C.; Hordijk, J.; Wit, B.; Mevius, D. J.; Veldman, K. T.** (2019): Diversity of Plasmids and Genes Encoding Resistance to Extended Spectrum Cephalosporins in Commensal *Escherichia coli* From Dutch Livestock in 2007-2017. *Front Microbiol* 10:76. doi: 10.3389/fmicb.2019.00076.
- Chang, M. X.; Zhang, J. F.; Sun, Y. H.; Li, R. S.; Lin, X. L.; Yang, L.; Webber, M. A.; Jiang, H. X.** (2021): Contribution of Different Mechanisms to Ciprofloxacin Resistance in *Salmonella* spp. *Front Microbiol* 12:663731. doi: 10.3389/fmicb.2021.663731.
- Chantziaras, I.; Boyen, F.; Callens, B.; Dewulf, J.** (2014): Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries. *J Antimicrob Chemother* 69 (3):827-34. doi: 10.1093/jac/dkt443.
- Chen, X.; Xu, J.; Ren, E.; Su, Y.; Zhu, W.** (2018): Co-occurrence of early gut colonization in neonatal piglets with microbiota in the maternal and surrounding delivery environments. *Anaerobe* 49:30-40. doi: 10.1016/j.anaerobe.2017.12.002.
- Cheng, P.; Yang, Y.; Li, F.; Li, X.; Liu, H.; Fazilani, S. A.; Guo, W.; Xu, G.; Zhang, X.** (2020): The prevalence and mechanism of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolated from swine farms in China. *BMC Vet Res* 16 (1):258. doi: 10.1186/s12917-020-02483-4.
- Ciesielczuk, H.; Hornsey, M.; Choi, V.; Woodford, N.; Wareham, D. W.** (2013): Development and evaluation of a multiplex PCR for eight plasmid-mediated quinolone-resistance determinants. *J Med Microbiol* 62 (Pt 12):1823-1827. doi: 10.1099/jmm.0.064428-0.
- Clermont, O.; Bonacorsi, S.; Bingen, E.** (2000): Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 66 (10):4555-8. doi: 10.1128/aem.66.10.4555-4558.2000.
- Clermont, O.; Christenson, J. K.; Denamur, E.; Gordon, D. M.** (2013): The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep* 5 (1):58-65. doi: 10.1111/1758-2229.12019.
- Clermont, O.; Dixit, O. V. A.; Vangchhia, B.; Condamine, B.; Dion, S.; Bridier-Nahmias, A.; Denamur, E.; Gordon, D.** (2019): Characterization and rapid identification of phylogroup G in *Escherichia coli*, a lineage with high virulence and antibiotic resistance potential. *Environ Microbiol* 21 (8):3107-3117. doi: 10.1111/1462-2920.14713.
- Clermont, O.; Condamine, B.; Dion, S.; Gordon, D. M.; Denamur, E.** (2021): The E phylogroup of *Escherichia coli* is highly diverse and mimics the whole *E. coli* species population structure. *Environ Microbiol* 23 (11):7139-7151. doi: 10.1111/1462-2920.15742.
- CLSI-VET01** (2018): Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. 3rd ed. CLSI standard VET01 Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA; 2018
- CLSI-VET05-R** (2011): Generation, Presentation, and Application of Antimicrobial Susceptibility Test Data for Bacteria of Animal Origin; A Report. CLSI document VET05-R. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA; 2011
- CLSI-VET06** (2017): Methods for antimicrobial susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria isolated from animals; 1st ed. CLSI supplement VET06. Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA; 2017

- CLSI-VET08** (2018): Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. 4th ed. CLSI supplement VET08 Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA; 2018
- Cohen, J.** (1988): Statistical power analysis for the behavioral sciences. Lawrence Erlbaum Associates.
- Correia, S.; Poeta, P.; Hebraud, M.; Capelo, J. L.; Igrejas, G.** (2017): Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand? *J Med Microbiol* 66 (5):551-559. doi: 10.1099/jmm.0.000475.
- Cottell, J. L.; Webber, M. A.; Piddock, L. J.** (2012): Persistence of transferable extended-spectrum-beta-lactamase resistance in the absence of antibiotic pressure. *Antimicrob Agents Chemother* 56 (9):4703-6. doi: 10.1128/AAC.00848-12.
- Coutellier, L.; Arnould, C.; Boissy, A.; Orgeur, P.; Prunier, A.; Veissier, I.; Meunier-Salaün, M.-C.** (2007): Pig's responses to repeated social regrouping and relocation during the growing-finishing period. *Appl Anim Behav Sci* 105 (1-3):102-114. doi: 10.1016/j.applanim.2006.05.007.
- Cummings, K. J.; Rodriguez-Rivera, L. D.; Norman, K. N.; Ohta, N.; Scott, H. M.** (2017): Identification of a Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Gene in Salmonella Isolates from Texas Dairy Farm Environmental Samples. *Zoonoses Public Health* 64 (4):305-307. doi: 10.1111/zph.12318.
- D'Costa, V. M.; King, C. E.; Kalan, L.; Morar, M.; Sung, W. W.; Schwarz, C.; Froese, D.; Zazula, G.; Calmels, F.; Debruyne, R.; Golding, G. B.; Poinar, H. N.; Wright, G. D.** (2011): Antibiotic resistance is ancient. *Nature* 477 (7365):457-61. doi: 10.1038/nature10388.
- Daehre, K.; Projahn, M.; Semmler, T.; Roesler, U.; Friese, A.** (2018): Extended-Spectrum Beta-Lactamase-/AmpC Beta-Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* in Broiler Farms: Transmission Dynamics at Farm Level. *Microb Drug Resist* 24 (4):511-518. doi: 10.1089/mdr.2017.0150.
- Dahmen, S.; Haenni, M.; Madec, J. Y.** (2012): IncI1/ST3 plasmids contribute to the dissemination of the blaCTX-M-1 gene in *Escherichia coli* from several animal species in France. *J Antimicrob Chemother* 67 (12):3011-2. doi: 10.1093/jac/dks308.
- Dallenne, C.; Da Costa, A.; Decre, D.; Favier, C.; Arlet, G.** (2010): Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother* 65 (3):490-5. doi: 10.1093/jac/dkp498.
- Dame-Korevaar, A.; Fischer, E. A. J.; Stegeman, A.; Mevius, D.; van Essen-Zandbergen, A.; Velkers, F.; van der Goot, J.** (2017): Dynamics of CMY-2 producing *E. coli* in a broiler parent flock. *Vet Microbiol* 203:211-214. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.03.024.
- Daniel, S.; Goldlust, K.; Quebre, V.; Shen, M.; Lesterlin, C.; Bouet, J.-Y.; Yamaichi, Y.** (2020): Vertical and Horizontal Transmission of ESBL Plasmid from *Escherichia coli* O104:H4. *Genes* 11 (10). doi: 10.3390/genes11101207.
- Daniels, J. B.; Call, D. R.; Besser, T. E.** (2007): Molecular epidemiology of blaCMY-2 plasmids carried by Salmonella enterica and *Escherichia coli* isolates from cattle in the Pacific Northwest. *Appl Environ Microbiol* 73 (24):8005-11. doi: 10.1128/AEM.01325-07.
- DART - Deutsche Antibiotika-Resistenzstrategie** (2015): Antibiotika-Resistenzen bekämpfen zum Wohl von Mensch und Tier. *Bundesministerium für Gesundheit, Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, Bundesministerium für Bildung und Forschung*. https://www.bundesgesundheitsministerium.de/fileadmin/Dateien/5_Publikationen/Gesundheit/Broschueren/BMG_DART_2020_Bericht_dt.pdf.
- de Been, M.; Lanza, V. F.; de Toro, M.; Scharringa, J.; Dohmen, W.; Du, Y.; Hu, J.; Lei, Y.; Li, N.; Tooming-Klunderud, A.; Heederik, D. J.; Fluit, A. C.; Bonten, M. J.; Willems, R. J.; de la Cruz, F.; van Schaik, W.** (2014): Dissemination of cephalosporin resistance genes between *Escherichia coli* strains from farm animals and humans by specific plasmid lineages. *PLoS Genet* 10 (12):e1004776. doi: 10.1371/journal.pgen.1004776.

- de Jong, A.; Stephan, B.; Silley, P.** (2012): Fluoroquinolone resistance of *Escherichia coli* and Salmonella from healthy livestock and poultry in the EU. *J Appl Microbiol* 112 (2):239-45. doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.05193.x.
- de Lagarde, M.; Vanier, G.; Arsenault, J.; Fairbrother, J. M.** (2021): High Risk Clone: A Proposal of Criteria Adapted to the One Health Context with Application to Enterotoxigenic *Escherichia coli* in the Pig Population. *Antibiotics* 10 (3):244.
- Deblitz C.; Agethen K.; Thobe P.** (2021): Steckbriefe zur Tierhaltung in Deutschland: Ein Überblick. *Braunschweig: Thünen-Institut für Betriebswirtschaft*:17 p.
- Defraigne, V.; Fauvart, M.; Michiels, J.** (2018): Fighting bacterial persistence: Current and emerging anti-persister strategies and therapeutics. *Drug Resist Updat* 38:12-26. doi: 10.1016/j.drug.2018.03.002.
- Delsol, A. A.; Halfhide, D. E.; Bagnall, M. C.; Randall, L. P.; Enne, V. I.; Woodward, M. J.; Roe, J. M.** (2010): Persistence of a wild type *Escherichia coli* and its multiple antibiotic-resistant (MAR) derivatives in the abattoir and on chilled pig carcasses. *Int J Food Microbiol* 140 (2-3):249-53. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.023.
- Denamur, E.; Clermont, O.; Bonacorsi, S.; Gordon, D.** (2021): The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 19 (1):37-54. doi: 10.1038/s41579-020-0416-x.
- DeNap, J. C.; Hergenrother, P. J.** (2005): Bacterial death comes full circle: targeting plasmid replication in drug-resistant bacteria. *Org Biomol Chem* 3 (6):959-66. doi: 10.1039/b500182j.
- Deng, Y.; Bao, X.; Ji, L.; Chen, L.; Liu, J.; Miao, J.; Chen, D.; Bian, H.; Li, Y.; Yu, G.** (2015): Resistance integrons: class 1, 2 and 3 integrons. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 14:45. doi: 10.1186/s12941-015-0100-6.
- Deschamps, C.; Clermont, O.; Hipeaux, M. C.; Arlet, G.; Denamur, E.; Branger, C.** (2009): Multiple acquisitions of CTX-M plasmids in the rare D2 genotype of *Escherichia coli* provide evidence for convergent evolution. *Microbiology (Reading)* 155 (Pt 5):1656-1668. doi: 10.1099/mic.0.023234-0.
- Dierikx, C.; van Essen-Zandbergen, A.; Veldman, K.; Smith, H.; Mevius, D.** (2010): Increased detection of extended spectrum beta-lactamase producing Salmonella enterica and *Escherichia coli* isolates from poultry. *Vet Microbiol* 145 (3-4):273-8. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.03.019.
- DIN** (2000): Medizinische Mikrobiologie und Immunologie: diagnostische Verfahren, 3. Auflage, DIN Taschenbücher, Band 222: 151 - 294. Deutsches Institut für Normung e. V. (Hrsg.)
- Dohmen, W.; Bonten, M. J.; Bos, M. E.; van Marm, S.; Scharringa, J.; Wagenaar, J. A.; Heederik, D. J.** (2015): Carriage of extended-spectrum beta-lactamases in pig farmers is associated with occurrence in pigs. *Clin Microbiol Infect* 21 (10):917-23. doi: 10.1016/j.cmi.2015.05.032.
- Dohmen, W.; Dorado-Garcia, A.; Bonten, M. J.; Wagenaar, J. A.; Mevius, D.; Heederik, D. J.** (2017): Risk factors for ESBL-producing *Escherichia coli* on pig farms: A longitudinal study in the context of reduced use of antimicrobials. *PLoS One* 12 (3):e0174094. doi: 10.1371/journal.pone.0174094.
- Dolejska, M.; Papagiannitsis, C. C.** (2018): Plasmid-mediated resistance is going wild. *Plasmid* 99:99-111. doi: 10.1016/j.plasmid.2018.09.010.
- Dopfer, D.; Buist, W.; Soyer, Y.; Munoz, M. A.; Zadoks, R. N.; Geue, L.; Engel, B.** (2008): Assessing genetic heterogeneity within bacterial species isolated from gastrointestinal and environmental samples: how many isolates does it take? *Appl Environ Microbiol* 74 (11):3490-6. doi: 10.1128/AEM.02789-07.
- Dorado-Garcia, A.; Mevius, D. J.; Jacobs, J. J.; Van Geijlswijk, I. M.; Mouton, J. W.; Wagenaar, J. A.; Heederik, D. J.** (2016): Quantitative assessment of antimicrobial resistance in livestock during the course of a nationwide antimicrobial use reduction in the Netherlands. *J Antimicrob Chemother* 71 (12):3607-3619. doi: 10.1093/jac/dkw308.

- Dorado-Garcia, A.; Smid, J. H.; van Pelt, W.; Bonten, M. J. M.; Fluit, A. C.; van den Bunt, G.; Wagenaar, J. A.; Hordijk, J.; Dierikx, C. M.; Veldman, K. T.; de Koeijer, A.; Dohmen, W.; Schmitt, H.; Liakopoulos, A.; Pacholewicz, E.; Lam, T.; Velthuis, A. G.; Heuvelink, A.; Gonggrijp, M. A.; van Duijkeren, E.; van Hoek, A.; de Roda Husman, A. M.; Blaak, H.; Havelaar, A. H.; Mevius, D. J.; Heederik, D. J. J. (2018): Molecular relatedness of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from humans, animals, food and the environment: a pooled analysis. *J Antimicrob Chemother* 73 (2):339-347. doi: 10.1093/jac/dkx397.
- Dunlop, R. H.; McEwen, S. A.; Meek, A. H.; Clarke, R. C.; Black, W. D.; Friendship, R. M. (1998a): Associations among antimicrobial drug treatments and antimicrobial resistance of fecal *Escherichia coli* of swine on 34 farrow-to-finish farms in Ontario, Canada. *Prev Vet Med* 34 (4):283-305. doi: 10.1016/s0167-5877(97)00095-0.
- Dunlop, R. H.; McEwen, S. A.; Meek, A. H.; Black, W. D.; Clarke, R. C.; Friendship, R. M. (1998b): Individual and group antimicrobial usage rates on 34 farrow-to-finish swine farms in Ontario, Canada. *Prev Vet Med* 34 (4):247-64. doi: 10.1016/s0167-5877(97)00093-7.
- Durao, P.; Balbontin, R.; Gordo, I. (2018): Evolutionary Mechanisms Shaping the Maintenance of Antibiotic Resistance. *Trends Microbiol* 26 (8):677-691. doi: 10.1016/j.tim.2018.01.005.
- DVG-Arbeitskreis „Antibiotikaresistenz“: Luhofer, G.; Böttner, A.; Hafez, H. M.; Kaske, M.; Kehrenberg, C.; Kietzmann, M.; Klarmann, D.; Klein, G.; Krabisch, P.; Kühn, T.; Richter, A.; Sigge, C.; Traeder, W.; Waldmann, K. H.; Wallmann, J.; Werckenthin, C.; Schwarz, S. (2004): Vorschläge der Arbeitsgruppe „Antibiotikaresistenz“ für die Belegung von Mikrotiterplatten zur Empfindlichkeitsprüfung von Bakterien gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen in der Routinediagnostik – Mastitis- und Großtierlayouts. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 117 (7-8):245-51.
- DVG-Arbeitskreis „Antibiotikaresistenz“: Feßler, A. T.; Böttner, A.; Fehr, M.; Kaspar, H.; Kehrenberg, C.; Kietzmann, M.; Klarmann, D.; Klein, G.; Peters, T.; Richter, A.; Schwarz, C.; Sigge, C.; Stephan, B.; Waldmann, K. H.; Verspohl, J.; Wallmann, J.; Werckenthin, C.; Schwarz, S. (2017): Mikrotiterplattenlayouts für Kleintiere, Großtiere und Mastitis - Aktualisierung der Layouts. *Dt TÄBl* 65 (4):472-81.
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), European Food Safety Authority (EFSA) und European Medicines Agency (EMA) (2021): Third joint inter-agency report on integrated analysis of consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals in the EU/EEA, JIACRA III. 2016–2018. *Stockholm, Parma, Amsterdam*. doi: 10.2900/056892.
- European Food Safety Authority (EFSA) und European Centre for Disease Prevention Control (ECDC) (2019): The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017. *EFSA J* 17 (2):e05598. doi: 10.2903/j.efsa.2019.5598. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32626224>.
- European Food Safety Authority (EFSA) und European Centre for Disease Prevention Control (ECDC) (2021): The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2018/2019 - European Food Safety Authority und European Centre for Disease Prevention Control. *EFSA J* 19 (4):e06490. doi: 10.2903/j.efsa.2021.6490. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33868492>.
- European Medicines Agency (EMA) – Antimicrobial Advice Ad Hoc Expert Group (AMEG) (2017): Categorisation of antibiotics in the European Union. (Answer to the request from the European Commission for updating the scientific advice on the impact on public health and animal health of the use of antibiotics in animals).
- EMA – European Medicines Agency (2021): European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption (ESVAC): Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2019 and 2020. *European Medicines Agency/58183/2021*. doi: 10.2809/636389.

- Enne, V. I.; Delsol, A. A.; Davis, G. R.; Hayward, S. L.; Roe, J. M.; Bennett, P. M. (2005): Assessment of the fitness impacts on *Escherichia coli* of acquisition of antibiotic resistance genes encoded by different types of genetic element. *J Antimicrob Chemother* 56 (3):544-51. doi: 10.1093/jac/dki255.
- Erb, A.; Sturmer, T.; Marre, R.; Brenner, H. (2007): Prevalence of antibiotic resistance in *Escherichia coli*: overview of geographical, temporal, and methodological variations. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 26 (2):83-90. doi: 10.1007/s10096-006-0248-2.
- ESAC-Net – European Surveillance of Antimicrobial Consumption Network vom European Centre for Disease Prevention and Control (Zugriff am 05.12.2021). <https://www.ecdc.europa.eu/en/about-us/partnerships-and-networks/disease-and-laboratory-networks/esac-net>.
- ESVAC – European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption von der European Medicines Agency (Zugriff am 02.12.2021). <https://www.ema.europa.eu/en/veterinary-regulatory/overview/antimicrobial-resistance/european-surveillance-veterinary-antimicrobial-consumption-esvac>.
- EUCAST – The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing: Antimicrobial wild type distributions of microorganisms - version 3.3 (Zugriff am 05. Oktober 2021). <https://mic.eucast.org/search/>.
- Evans, B. A.; Amyes, S. G. B. (2014): OXA β -Lactamases. *Clin Microbiol Rev* 27 (2):241-263. doi: 10.1128/cmr.00117-13.
- Ewels, P.; Magnusson, M.; Lundin, S.; Kaller, M. (2016): MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics* 32 (19):3047-8. doi: 10.1093/bioinformatics/btw354.
- Ewers, C.; Bethe, A.; Semmler, T.; Guenther, S.; Wieler, L. H. (2012): Extended-spectrum beta-lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. *Clin Microbiol Infect* 18 (7):646-55. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03850.x.
- Ewers, C.; de Jong, A.; Prenger-Berninghoff, E.; El Garch, F.; Leidner, U.; Tiwari, S. K.; Semmler, T. (2021): Genomic Diversity and Virulence Potential of ESBL- and AmpC-beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Strains From Healthy Food Animals Across Europe. *Front Microbiol* 12:626774. doi: 10.3389/fmicb.2021.626774.
- Fabrega, A.; Madurga, S.; Giralt, E.; Vila, J. (2009): Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microb Biotechnol* 2 (1):40-61. doi: 10.1111/j.1751-7915.2008.00063.x.
- Feldgarden, M.; Brover, V.; Gonzalez-Escalona, N.; Frye, J. G.; Haendiges, J.; Haft, D. H.; Hoffmann, M.; Pettengill, J. B.; Prasad, A. B.; Tillman, G. E.; Tyson, G. H.; Klimke, W. (2021): AMRFinderPlus and the Reference Gene Catalog facilitate examination of the genomic links among antimicrobial resistance, stress response, and virulence. *Sci Rep* 11 (1):12728. doi: 10.1038/s41598-021-91456-0.
- Fischer, J.; Rodríguez, I.; Baumann, B.; Guiral, E.; Beutin, L.; Schroeter, A.; Kaesbohrer, A.; Pfeifer, Y.; Helmuth, R.; Guerra, B. (2014): blaCTX-M₁₅-carrying *Escherichia coli* and Salmonella isolates from livestock and food in Germany. *J Antimicrob Chemother* 69 (11):2951-8. doi: 10.1093/jac/dku270.
- Fischer, W.; Hofreuter, D.; Haas, R. (2001): Natural Transformation, Recombination, and Repair. In *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*, edited by H. L. T. Mobley, G. L. Mendz und S. L. Hazell. Washington (DC): ASM Press.
- Fjalstad, J. W.; Esaiassen, E.; Juvet, L. K.; van den Anker, J. N.; Klingenberg, C. (2018): Antibiotic therapy in neonates and impact on gut microbiota and antibiotic resistance development: a systematic review. *J Antimicrob Chemother* 73 (3):569-580. doi: 10.1093/jac/dkx426.
- Fleury, M. A.; Mourand, G.; Jouy, E.; Touzain, F.; Le Devendec, L.; de Boisseson, C.; Eono, F.; Cariolet, R.; Guerin, A.; Le Goff, O.; Blanquet-Diot, S.; Alric, M.; Kempf, I. (2015): Impact of ceftiofur injection on gut microbiota and *Escherichia coli* resistance in pigs. *Antimicrob Agents Chemother* 59 (9):5171-80. doi: 10.1128/AAC.00177-15.

- Fonseca, E. L.; Dos Santos Freitas, F.; Vieira, V. V.; Vicente, A. C. (2008): New qnr gene cassettes associated with superintegron repeats in *Vibrio cholerae* O1. *Emerg Infect Dis* 14 (7):1129-31. doi: 10.3201/eid1407.080132.
- Forslund, K.; Sunagawa, S.; Kultima, J. R.; Mende, D. R.; Arumugam, M.; Typas, A.; Bork, P. (2013): Country-specific antibiotic use practices impact the human gut resistome. *Genome Res* 23 (7):1163-9. doi: 10.1101/gr.155465.113.
- Foster-Nyarko, E.; Pallen, M. J. (2022): The microbial ecology of *Escherichia coli* in the vertebrate gut. *FEMS Microbiol Rev* 46 (3). doi: 10.1093/femsre/fuac008.
- Fratamico, P. M.; DebRoy, C.; Liu, Y.; Needleman, D. S.; Baranzoni, G. M.; Feng, P. (2016): Advances in Molecular Serotyping and Subtyping of *Escherichia coli*†. *Front Microbiol* 7. doi: 10.3389/fmicb.2016.00644.
- Frese, S. A.; Parker, K.; Calvert, C. C.; Mills, D. A. (2015): Diet shapes the gut microbiome of pigs during nursing and weaning. *Microbiome* 3:28. doi: 10.1186/s40168-015-0091-8.
- Freter, R.; Brickner, H.; Fekete, J.; Vickerman, M. M.; Carey, K. E. (1983): Survival and implantation of *Escherichia coli* in the intestinal tract. *Infect Immun* 39 (2):686-703. doi: 10.1128/jai.39.2.686-703.1983.
- Fukuda, A.; Usui, M.; Okamura, M.; Dong-Liang, H.; Tamura, Y. (2019): Role of Flies in the Maintenance of Antimicrobial Resistance in Farm Environments. *Microb Drug Resist* 25 (1):127-132. doi: 10.1089/mdr.2017.0371.
- Galata, V.; Fehlmann, T.; Backes, C.; Keller, A. (2019): PLSDb: a resource of complete bacterial plasmids. *Nucleic Acids Res* 47 (D1):D195-d202. doi: 10.1093/nar/gky1050.
- Gao, L.; Hu, J.; Zhang, X.; Wei, L.; Li, S.; Miao, Z.; Chai, T. (2015): Application of swine manure on agricultural fields contributes to extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* spread in Tai'an, China. *Front Microbiol* 6. doi: 10.3389/fmicb.2015.00313.
- García-Aljaro, C.; Ballesté, E.; Muniesa, M. (2017): Beyond the canonical strategies of horizontal gene transfer in prokaryotes. *Curr Opin Microbiol* 38:95-105. doi: 10.1016/j.mib.2017.04.011.
- Gardner, S. N.; Slezak, T.; Hall, B. G. (2015): kSNP3.0: SNP detection and phylogenetic analysis of genomes without genome alignment or reference genome. *Bioinformatics* 31 (17):2877-8. doi: 10.1093/bioinformatics/btv271.
- Gefeller, E.-M.; Köper, L. M.; Hofmann, K.; Klabunde-Negatsch, A.; Heberer, T. (2021): Abgabemengenerfassung von Antibiotika in Deutschland 2020. *Dt TÄBl* (69):1420-30.
- Geser, N.; Stephan, R.; Kuhnert, P.; Zbinden, R.; Kaeppli, U.; Cernela, N.; Haechler, H. (2011): Fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in swine and cattle at slaughter in Switzerland. *J Food Prot* 74 (3):446-9. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-10-372.
- Giles, M.; Cawthraw, S. A.; AbuOun, M.; Thomas, C. M.; Munera, D.; Waldor, M. K.; La Ragione, R. M.; Ritchie, J. M. (2018): Host-specific differences in the contribution of an ESBL Inc11 plasmid to intestinal colonization by *Escherichia coli* O104:H4. *J Antimicrob Chemother* 73 (6):1579-1585. doi: 10.1093/jac/dky037.
- Gocke, E. (1991): Mechanism of quinolone mutagenicity in bacteria. *Mutat Res* 248 (1):135-43. doi: 10.1016/0027-5107(91)90095-6.
- Goyanes, M. J.; Cercenado, E.; Insa, R.; Morente, A.; Alcalá, L.; Bouza, E. (2007): High rates of antimicrobial co-resistance among *Enterobacteriaceae*: comparative analysis between clinical isolates resistant and susceptible to third-generation cephalosporins. *Rev Esp Quimioter* 20 (2):216-21.
- Groot, M. J.; Berendsen, B. J. A.; Cleton, N. B. (2021): The Next Step to Further Decrease Veterinary Antibiotic Applications: Phylogenetic Alternatives and Effective Monitoring; the Dutch Approach. *Front Vet Sci* 8:709750. doi: 10.3389/fvets.2021.709750.
- Gullberg, E.; Albrecht, L. M.; Karlsson, C.; Sandegren, L.; Andersson, D. I. (2014): Selection of a multidrug resistance plasmid by sublethal levels of antibiotics and heavy metals. *mBio* 5 (5):e01918-14. doi: 10.1128/mBio.01918-14.

- Gurevich, A.; Saveliev, V.; Vyahhi, N.; Tesler, G.** (2013): QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 29 (8):1072-5. doi: 10.1093/bioinformatics/btt086.
- Haenni, M.; Beyrouthy, R.; Lupo, A.; Chatre, P.; Madec, J. Y.; Bonnet, R.** (2018): Epidemic spread of *Escherichia coli* ST744 isolates carrying mcr-3 and blaCTX-M-55 in cattle in France. *J Antimicrob Chemother* 73 (2):533-536. doi: 10.1093/jac/dkx418.
- Hammerum, A. M.; Larsen, J.; Andersen, V. D.; Lester, C. H.; Skovgaard Skytte, T. S.; Hansen, F.; Olsen, S. S.; Mordhorst, H.; Skov, R. L.; Aarestrup, F. M.; Agerso, Y.** (2014): Characterization of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* obtained from Danish pigs, pig farmers and their families from farms with high or no consumption of third- or fourth-generation cephalosporins. *J Antimicrob Chemother* 69 (10):2650-7. doi: 10.1093/jac/dku180.
- Hansen, K. H.; Damborg, P.; Andreasen, M.; Nielsen, S. S.; Guardabassi, L.** (2013): Carriage and fecal counts of cefotaxime M-producing *Escherichia coli* in pigs: a longitudinal study. *Appl Environ Microbiol* 79 (3):794-8. doi: 10.1128/AEM.02399-12.
- Hansen, K. H.; Bortolaia, V.; Damborg, P.; Guardabassi, L.** (2014): Strain diversity of CTX-M-producing *Enterobacteriaceae* in individual pigs: insights into the dynamics of shedding during the production cycle. *Appl Environ Microbiol* 80 (21):6620-6. doi: 10.1128/AEM.01730-14.
- Hasan, B.; Sandegren, L.; Melhus, A.; Drobni, M.; Hernandez, J.; Waldenström, J.; Alam, M.; Olsen, B.** (2012): Antimicrobial drug-resistant *Escherichia coli* in wild birds and free-range poultry, Bangladesh. *Emerg Infect Dis* 18 (12):2055-8. doi: 10.3201/eid1812.120513.
- Hayer, S. S.; Lim, S.; Hong, S.; Elnekave, E.; Johnson, T.; Rovira, A.; Vannucci, F.; Clayton, J. B.; Perez, A.; Alvarez, J.** (2020): Genetic Determinants of Resistance to Extended-Spectrum Cephalosporin and Fluoroquinolone in *Escherichia coli* Isolated from Diseased Pigs in the United States. *mSphere* 5 (5). doi: 10.1128/mSphere.00990-20.
- Hering, J.; Hille, K.; Fromke, C.; von Munchhausen, C.; Hartmann, M.; Schneider, B.; Friese, A.; Roesler, U.; Merle, R.; Kreienbrock, L.** (2014): Prevalence and potential risk factors for the occurrence of cefotaxime resistant *Escherichia coli* in German fattening pig farms--a cross-sectional study. *Prev Vet Med* 116 (1-2):129-37. doi: 10.1016/j.prevetmed.2014.06.014.
- Higgins, O.; Smith, T. J.** (2020): Loop-Primer Endonuclease Cleavage-Loop-Mediated Isothermal Amplification Technology for Multiplex Pathogen Detection and Single-Nucleotide Polymorphism Identification. *J Mol Diagn* 22 (5):640-651. doi: 10.1016/j.jmoldx.2020.02.002.
- Hoelzer, K.; Bielke, L.; Blake, D. P.; Cox, E.; Cutting, S. M.; Devriendt, B.; Erlacher-Vindel, E.; Goossens, E.; Karaca, K.; Lemiere, S.; Metzner, M.; Raicek, M.; Collell Suriñach, M.; Wong, N. M.; Gay, C.; Van Immerseel, F.** (2018): Vaccines as alternatives to antibiotics for food producing animals. Part 2: new approaches and potential solutions. *Vet Res* 49 (1):70. doi: 10.1186/s13567-018-0561-7.
- Holman, D. B.; Gzyl, K. E.; Mou, K. T.; Allen, H. K.** (2021): Weaning Age and Its Effect on the Development of the Swine Gut Microbiome and Resistome. *mSystems* 6 (6):e0068221. doi: 10.1128/mSystems.00682-21.
- Hornish, R. E.; Kotarski, S. F.** (2002): Cephalosporins in veterinary medicine - ceftiofur use in food animals. *Curr Top Med Chem* 2 (7):717-31. doi: 10.2174/1568026023393679.
- Horton, R. A.; Randall, L. P.; Snary, E. L.; Cockrem, H.; Lotz, S.; Wearing, H.; Duncan, D.; Rabie, A.; McLaren, I.; Watson, E.; La Ragione, R. M.; Coldham, N. G.** (2011): Fecal carriage and shedding density of CTX-M extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in cattle, chickens, and pigs: implications for environmental contamination and food production. *Appl Environ Microbiol* 77 (11):3715-9. doi: 10.1128/AEM.02831-10.

- Huijbers, P. M. C.; Graat, E. A. M.; van Hoek, A.; Veenman, C.; de Jong, M. C. M.; van Duijkeren, E. (2016): Transmission dynamics of extended-spectrum beta-lactamase and AmpC beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in a broiler flock without antibiotic use. *Prev Vet Med* 131:12-19. doi: 10.1016/j.prevetmed.2016.07.001.
- Huseby, D. L.; Pietsch, F.; Brandis, G.; Garoff, L.; Tegehall, A.; Hughes, D. (2017): Mutation Supply and Relative Fitness Shape the Genotypes of Ciprofloxacin-Resistant *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol* 34 (5):1029-1039. doi: 10.1093/molbev/msx052.
- Huson, D. H.; Scornavacca, C. (2012): Dendroscope 3: an interactive tool for rooted phylogenetic trees and networks. *Syst Biol* 61 (6):1061-7. doi: 10.1093/sysbio/sys062.
- IGS Thüringen (2019): Schweinehaltung in Thüringen - Eine Kurzcharakteristik. *Interessengemeinschaft der Schweinehalter in Thüringen e.V.*
- Jahanbakhsh, S.; Smith, M. G.; Kohan-Ghadr, H. R.; Letellier, A.; Abraham, S.; Trott, D. J.; Fairbrother, J. M. (2016): Dynamics of extended-spectrum cephalosporin resistance in pathogenic *Escherichia coli* isolated from diseased pigs in Quebec, Canada. *Int J Antimicrob Agents* 48 (2):194-202. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.05.001.
- Johnning, A.; Kristiansson, E.; Fick, J.; Weijdegard, B.; Larsson, D. G. (2015): Resistance Mutations in gyrA and parC are Common in Escherichia Communities of both Fluoroquinolone-Polluted and Uncontaminated Aquatic Environments. *Front Microbiol* 6:1355. doi: 10.3389/fmicb.2015.01355.
- Johnson, T. J.; Shepard, S. M.; Rivet, B.; Danzeisen, J. L.; Carattoli, A. (2011): Comparative genomics and phylogeny of the Inc11 plasmids: a common plasmid type among porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Plasmid* 66 (3):144-51. doi: 10.1016/j.plasmid.2011.07.003.
- Jolley, K. A.; Bray, J. E.; Maiden, M. C. J. (2018): Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res* 3:124. doi: 10.12688/wellcomeopenres.14826.1.
- Jordan, E.; Voide, C.; Petignat, P. A.; Gobin, N. (2020): Cephalosporins in clinical practice. *Rev Med Suisse* 16 (710):1906-1911.
- Jørgensen, C. J.; Cavaco, L. M.; Hasman, H.; Emborg, H.-D.; Guardabassi, L. (2007): Occurrence of CTX-M-1-producing *Escherichia coli* in pigs treated with ceftiofur. *J Antimicrob Chemother* 59 (5):1040-1042. doi: 10.1093/jac/dkm075.
- Juraschek, K.; Deneke, C.; Schmoger, S.; Grobbel, M.; Malorny, B.; Käsbohrer, A.; Schwarz, S.; Meemken, D.; Hammerl, J. A. (2021): Phenotypic and Genotypic Properties of Fluoroquinolone-Resistant, qnr-Carrying *Escherichia coli* Isolated from the German Food Chain in 2017. *Microorganisms* 9 (6). doi: 10.3390/microorganisms9061308.
- Kaas, R. S.; Friis, C.; Ussery, D. W.; Aarestrup, F. M. (2012): Estimating variation within the genes and inferring the phylogeny of 186 sequenced diverse *Escherichia coli* genomes. *BMC Genomics* 13:577. doi: 10.1186/1471-2164-13-577.
- Kado, C. I.; Liu, S. T. (1981): Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J Bacteriol* 145 (3):1365-73. doi: 10.1128/jb.145.3.1365-1373.1981.
- Kamenšek, S.; Žgur-Bertok, D. (2013): Global transcriptional responses to the bacteriocin colicin M in *Escherichia coli*. *BMC Microbiol* 13:42. doi: 10.1186/1471-2180-13-42.
- Kampf, G. (2018): Biocidal Agents Used for Disinfection Can Enhance Antibiotic Resistance in Gram-Negative Species. *Antibiotics (Basel)* 7 (4). doi: 10.3390/antibiotics7040110.
- Kamruzzaman, M.; Iredell, J. (2019): A ParDE-family toxin antitoxin system in major resistance plasmids of *Enterobacteriaceae* confers antibiotic and heat tolerance. *Sci Rep* 9 (1):9872. doi: 10.1038/s41598-019-46318-1.
- Kaper, J. B.; Nataro, J. P.; Mobley, H. L. (2004): Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2 (2):123-40. doi: 10.1038/nrmicro818.
- Karczmarczyk, M.; Martins, M.; Quinn, T.; Leonard, N.; Fanning, S. (2011): Mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from food-producing animals. *Appl Environ Microbiol* 77 (20):7113-20. doi: 10.1128/aem.00600-11.

- Kaspersen, H.; Urdahl, A. M.; Grøntvedt, C. A.; Gulliksen, S. M.; Tesfamichael, B.; Slette-meås, J. S.; Norström, M.; Sekse, C. (2020a): Actinobacillus pleuropneumoniae Eradication with Enrofloxacin May Lead to Dissemination and Long-Term Persistence of Quinolone Resistant *Escherichia coli* in Pig Herds. *Antibiotics* 9 (12). doi: 10.3390/antibiotics9120910.
- Kaspersen, H.; Sekse, C.; Zeyl Fiskebeck, E.; Slette-meas, J. S.; Simm, R.; Norstrom, M.; Urdahl, A. M.; Lagesen, K. (2020b): Dissemination of Quinolone-Resistant *Escherichia coli* in the Norwegian Broiler and Pig Production Chains and Possible Persistence in the Broiler Production Environment. *Appl Environ Microbiol* 86 (7). doi: 10.1128/AEM.02769-19.
- Kaufmann, M.; Zweifel, C.; Blanco, M.; Blanco, J. E.; Blanco, J.; Beutin, L.; Stephan, R. (2006): *Escherichia coli* O157 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in fecal samples of finished pigs at slaughter in Switzerland. *J Food Prot* 69 (2):260-6. doi: 10.4315/0362-028x-69.2.260.
- Koga, V. L.; Maluta, R. P.; da Silveira, W. D.; Ribeiro, R. A.; Hungria, M.; Vespero, E. C.; Nakazato, G.; Kobayashi, R. K. T. (2019): Characterization of CMY-2-type beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from chicken carcasses and human infection in a city of South Brazil. *BMC Microbiol* 19 (1):174. doi: 10.1186/s12866-019-1550-3.
- Kolde R. Pretty Heatmaps – veröffentlicht am 04.01.2019. <https://cran.r-project.org/web/packages/pheatmap/index.html>.
- Komp Lindgren, P.; Karlsson, A.; Hughes, D. (2003): Mutation rate and evolution of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract infections. *Antimicrob Agents Chemother* 47 (10):3222-32. doi: 10.1128/AAC.47.10.3222-3232.2003.
- Kraychete, G. B.; Botelho, L. A.; Campana, E. H.; Picao, R. C.; Bonelli, R. R. (2016): Updated Multiplex PCR for Detection of All Six Plasmid-Mediated qnr Gene Families. *Antimicrob Agents Chemother* 60 (12):7524-7526. doi: 10.1128/AAC.01447-16.
- Kyung-Hyo, D.; Jae-Won, B.; Wan-Kyu, L. (2020): Antimicrobial Resistance Profiles of *Escherichia coli* from Diarrheic Weaned Piglets after the Ban on Antibiotic Growth Promoters in Feed. *Antibiotics (Basel)* 9 (11). doi: 10.3390/antibiotics9110755.
- Lallès, J.-P.; Boudry, G.; Favier, C.; Le Floc'h, N.; Luron, I.; Montagne, L.; Oswald, I. P.; Pié, S.; Piel, C.; Sève, B. (2004): Gut function and dysfunction in young pigs: physiology. *Anim Res* 53 (4):301-316. doi: 10.1051/animres:2004018.
- Lambrecht, E.; Van Meervenne, E.; Boon, N.; Van de Wiele, T.; Wattiau, P.; Herman, L.; Heyndrickx, M.; Van Coillie, E. (2018): Characterization of Cefotaxime- and Ciprofloxacin-Resistant Commensal *Escherichia coli* Originating from Belgian Farm Animals Indicates High Antibiotic Resistance Transfer Rates. *Microb Drug Resist* 24 (6):707-717. doi: 10.1089/mdr.2017.0226.
- Langlois, B. E.; Dawson, K. A. (1999): Antimicrobial resistance of gram-negative enteric bacteria from pigs in a nonantimicrobial-exposed herd before and after transportation. *J Food Prot* 62 (7):797-9. doi: 10.4315/0362-028x-62.7.797.
- Lautenbach, E.; Strom, B. L.; Bilker, W. B.; Patel, J. B.; Edelstein, P. H.; Fishman, N. O. (2001): Epidemiological investigation of fluoroquinolone resistance in infections due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and Klebsiella pneumoniae. *Clin Infect Dis* 33 (8):1288-94. doi: 10.1086/322667.
- Lazarus, B.; Paterson, D. L.; Mollinger, J. L.; Rogers, B. A. (2015): Do human extraintestinal *Escherichia coli* infections resistant to expanded-spectrum cephalosporins originate from food-producing animals? A systematic review. *Clin Infect Dis* 60 (3):439-52. doi: 10.1093/cid/ciu785.
- Leekitcharoenphon, P.; Nielsen, E. M.; Kaas, R. S.; Lund, O.; Aarestrup, F. M. (2014): Evaluation of whole genome sequencing for outbreak detection of *Salmonella enterica*. *PLoS One* 9 (2):e87991. doi: 10.1371/journal.pone.0087991.

- Letunic, I.; Bork, P.** (2016): Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees (<http://itol.embl.de/>). *Nucleic Acids Res* 44 (W1):W242-5. doi: 10.1093/nar/gkw290.
- Leverstein-van Hall, M. A.; Box, A. T.; Blok, H. E.; Paauw, A.; Fluit, A. C.; Verhoef, J.** (2002): Evidence of extensive interspecies transfer of integron-mediated antimicrobial resistance genes among multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* in a clinical setting. *J Infect Dis* 186 (1):49-56. doi: 10.1086/341078.
- Levin, B. R.; Lipsitch, M.; Perrot, V.; Schrag, S.; Antia, R.; Simonsen, L.; Walker, N. M.; Stewart, F. M.** (1997): The population genetics of antibiotic resistance. *Clin Infect Dis* 24 Suppl 1:S9-16. doi: 10.1093/clinids/24.supplement_1.s9.
- Levin, B. R.** (2001): Minimizing potential resistance: a population dynamics view. *Clin Infect Dis* 33 Suppl 3:S161-9. doi: 10.1086/321843.
- Levy, S. B.** (1997): Antibiotic resistance: an ecological imbalance. *Ciba Found Symp* 207:1-9; discussion 9-14. doi: 10.1002/9780470515358.ch1.
- Licht, T. R.; Wilcks, A.** (2005): Conjugative Gen transfer in the gastrointestinal environment. *Adv Appl Microbiol* 58:77-95. doi: 10.1016/S0065-2164(05)58002-X.
- Liebana, E.; Carattoli, A.; Coque, T. M.; Hasman, H.; Magiorakos, A. P.; Mevius, D.; Peixe, L.; Poirel, L.; Schuepbach-Regula, G.; Torneke, K.; Torren-Edo, J.; Torres, C.; Threlfall, J.** (2013): Public health risks of enterobacterial isolates producing extended-spectrum beta-lactamases or AmpC beta-lactamases in food and food-producing animals: an EU perspective of epidemiology, analytical methods, risk factors, and control options. *Clin Infect Dis* 56 (7):1030-7. doi: 10.1093/cid/cis1043.
- Lim, J. M.; Singh, S. R.; Duong, M. C.; Legido-Quigley, H.; Hsu, L. Y.; Tam, C. C.** (2020): Impact of national interventions to promote responsible antibiotic use: a systematic review. *J Antimicrob Chemother* 75 (1):14-29. doi: 10.1093/jac/dkz348.
- Lim, S. K.; Lim, K. G.; Lee, H. S.; Jung, S. C.; Kang, M. I.; Nam, H. M.** (2010): Prevalence and molecular characterization of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from diarrheic cattle in Korea. *J Vet Med Sci* 72 (5):611-4. doi: 10.1292/jvms.08-0302.
- Loftie-Eaton, W.; Bashford, K.; Quinn, H.; Dong, K.; Millstein, J.; Hunter, S.; Thomason, M. K.; Merrih, H.; Ponciano, J. M.; Top, E. M.** (2017): Compensatory mutations improve general permissiveness to antibiotic resistance plasmids. *Nat Ecol Evol* 1 (9):1354-1363. doi: 10.1038/s41559-017-0243-2.
- Looft, T.; Allen, H. K.** (2012a): Collateral effects of antibiotics on mammalian gut microbiomes. *Gut Microbes* 3 (5):463-7. doi: 10.4161/gmic.21288.
- Looft, T.; Johnson, T. A.; Allen, H. K.; Bayles, D. O.; Alt, D. P.; Stedtfeld, R. D.; Sul, W. J.; Stedtfeld, T. M.; Chai, B.; Cole, J. R.; Hashsham, S. A.; Tiedje, J. M.; Stanton, T. B.** (2012b): In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 (5):1691-6. doi: 10.1073/pnas.1120238109.
- Lu, D.; Tiezzi, F.; Schillebeeckx, C.; McNulty, N. P.; Schwab, C.; Shull, C.; Maltecca, C.** (2018): Host contributes to longitudinal diversity of fecal microbiota in swine selected for lean growth. *Microbiome* 6 (1):4. doi: 10.1186/s40168-017-0384-1.
- Lucas, P.; Jouy, E.; Le Devendec, L.; de Boisseson, C.; Perrin-Guyomard, A.; Jove, T.; Blanchard, Y.; Touzain, F.; Kempf, I.** (2018): Characterization of plasmids harboring blaCTX-M genes in *Escherichia coli* from French pigs. *Vet Microbiol* 224:100-106. doi: 10.1016/j.vetmic.2018.08.005.
- Ludden, C.; Coll, F.; Gouliouris, T.; Restif, O.; Blane, B.; Blackwell, G. A.; Kumar, N.; Naydenova, P.; Crawley, C.; Brown, N. M.; Parkhill, J.; Peacock, S. J.** (2021): Defining nosocomial transmission of *Escherichia coli* and antimicrobial resistance genes: a genomic surveillance study. *The Lancet Microbe* 2 (9):e472-e480. doi: 10.1016/s2666-5247(21)00117-8.

- Luyckx, K.; Millet, S.; Van Weyenberg, S.; Herman, L.; Heyndrickx, M.; Dewulf, J.; De Reu, K.** (2016): A 10-day vacancy period after cleaning and disinfection has no effect on the bacterial load in pig nursery units. *BMC Vet Res* 12 (1):236. doi: 10.1186/s12917-016-0850-1.
- MacFadden, D. R.; McGough, S. F.; Fisman, D.; Santillana, M.; Brownstein, J. S.** (2018): Antibiotic Resistance Increases with Local Temperature. *Nat Clim Chang* 8 (6):510-514. doi: 10.1038/s41558-018-0161-6.
- Machado, E.; Coque, T. M.; Canton, R.; Baquero, F.; Sousa, J. C.; Peixe, L.; Portuguese Resistance Study, G.** (2006): Dissemination in Portugal of CTX-M-15-, OXA-1-, and TEM-1-producing *Enterobacteriaceae* strains containing the aac(6')-Ib-cr gene, which encodes an aminoglycoside- and fluoroquinolone-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 50 (9):3220-1. doi: 10.1128/AAC.00473-06.
- Magaña-Lizárraga, J. A.; Gómez-Gil, B.; Rendón-Maldonado, J. G.; Delgado-Vargas, F.; Vega-López, I. F.; Báez-Flores, M. E.** (2022): Genomic Profiling of Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Surface Water of Agricultural Drainage in North-Western Mexico: Detection of the International High-Risk Lineages ST410 and ST617. *Microorganisms* 10 (3). doi: 10.3390/microorganisms10030662.
- Magiorakos, A. P.; Srinivasan, A.; Carey, R. B.; Carmeli, Y.; Falagas, M. E.; Giske, C. G.; Harbarth, S.; Hindler, J. F.; Kahlmeter, G.; Olsson-Liljequist, B.; Paterson, D. L.; Rice, L. B.; Stelling, J.; Struelens, M. J.; Vatopoulos, A.; Weber, J. T.; Monnet, D. L.** (2012): Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 18 (3):268-81. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.
- Marcusson, L. L.; Frimodt-Moller, N.; Hughes, D.** (2009): Interplay in the selection of fluoroquinolone resistance and bacterial fitness. *PLoS Pathog* 5 (8):e1000541. doi: 10.1371/journal.ppat.1000541.
- Marshall, B.; Petrowski, D.; Levy, S. B.** (1990): Inter- and intraspecies spread of *Escherichia coli* in a farm environment in the absence of antibiotic usage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (17):6609-13. doi: 10.1073/pnas.87.17.6609.
- Martínez, J. L.; Coque, T. M.; Baquero, F.** (2015): What is a resistance gene? Ranking risk in resistomes. *Nat Rev Microbiol* 13 (2):116-23. doi: 10.1038/nrmicro3399.
- Massella, E.; Giacometti, F.; Bonilauri, P.; Reid, C. J.; Djordjevic, S. P.; Merialdi, G.; Bacci, C.; Fiorentini, L.; Massi, P.; Bardasi, L.; Rubini, S.; Savini, F.; Serraino, A.; Piva, S.** (2021): Antimicrobial Resistance Profile and ExPEC Virulence Potential in Commensal *Escherichia coli* of Multiple Sources. *Antibiotics (Basel)* 10 (4). doi: 10.3390/antibiotics10040351.
- Mathers, A. J.; Peirano, G.; Pitout, J. D.** (2015): The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Rev* 28 (3):565-91. doi: 10.1128/CMR.00116-14.
- Mathew, A. G.; Franklin, M. A.; Upchurch, W. G.; Chattin, S. E.** (1996a): Effect of weaning on ileal short-chain fatty acid concentrations in pigs. *Nutr Res* 16 (10):1689-1698. doi: 10.1016/0271-5317(96)00188-1.
- Mathew, A. G.; Franklin, M. A.; Upchurch, W. G.; Chattin, S. E.** (1996b): Influence of weaning age on ileal microflora and fermentation acids in young pigs. *Nutr Res* 16 (5):817-827. doi: 10.1016/0271-5317(96)00074-7.
- Mathew, A. G.; Arnett, D. B.; Cullen, P.; Ebner, P. D.** (2003): Characterization of resistance patterns and detection of apramycin resistance genes in *Escherichia coli* isolated from swine exposed to various environmental conditions. *Int J Food Microbiol* 89 (1):11-20. doi: 10.1016/s0168-1605(03)00124-7.
- Mathys, D. A.; Mathys, B. A.; Mollenkopf, D. F.; Daniels, J. B.; Wittum, T. E.** (2017): *Enterobacteriaceae* Harboring AmpC (bla(CMY)) and ESBL (bla(CTX-M)) in Migratory and Nonmigratory Wild Songbird Populations on Ohio Dairies. *Vector Borne Zoonotic Dis* 17 (4):254-259. doi: 10.1089/vbz.2016.2038.

- Meissner, K.; Sauter-Louis, C.; Heiden, S. E.; Schaufler, K.; Tomaso, H.; Conraths, F. J.; Homeier-Bachmann, T.** (2022): Extended-Spectrum ss-Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Conventional and Organic Pig Fattening Farms. *Microorganisms* 10 (3). doi: 10.3390/microorganisms10030603.
- Melnyk, A. H.; Wong, A.; Kassen, R.** (2015): The fitness costs of antibiotic resistance mutations. *Evol Appl* 8 (3):273-83. doi: 10.1111/eva.12196.
- Mencía-Ares, O.; Cabrera-Rubio, R.; Cobo-Díaz, J. F.; Álvarez-Ordóñez, A.; Gómez-García, M.; Puente, H.; Cotter, P. D.; Crispie, F.; Carvajal, A.; Rubio, P.; Argüello, H.** (2020): Antimicrobial use and production system shape the fecal, environmental, and slurry resistomes of pig farms. *Microbiome* 8 (1):164. doi: 10.1186/s40168-020-00941-7.
- Meunier, D.; Jouy, E.; Lazizzera, C.; Doublet, B.; Kobisch, M.; Cloeckert, A.; Madec, J. Y.** (2010): Plasmid-borne florfenicol and ceftiofur resistance encoded by the floR and blaCMY-2 genes in *Escherichia coli* isolates from diseased cattle in France. *J Med Microbiol* 59 (Pt 4):467-471. doi: 10.1099/jmm.0.016162-0.
- Möbius - Thüringer Ökoherz e.V.,** (2020): Studie zur Thüringer Ökoschweinehaltung - Auswirkungen des Kupierverzichtes. Auftraggeber: Thüringer Landesamt für Landwirtschaft und Ländlichen Raum.
- Moodley, A.; Guardabassi, L.** (2009): Transmission of IncN plasmids carrying blaCTX-M-1 between commensal *Escherichia coli* in pigs and farm workers. *Antimicrob Agents Chemother* 53 (4):1709-11. doi: 10.1128/AAC.01014-08.
- Moro, M. H.; Beran, G. W.; Hoffman, L. J.; Griffith, R. W.** (1998): Effects of cold stress on the antimicrobial drug resistance of *Escherichia coli* of the intestinal flora of swine. *Lett Appl Microbiol* 27 (5):251-4. doi: 10.1046/j.1472-765x.1998.t01-13-00449.x.
- Mourand, G.; Touzain, F.; Jouy, E.; Fleury, M. A.; Denamur, E.; Kempf, I.** (2016): Rare Spontaneous Loss of Multiresistance Gene Carrying IncI/ST12 Plasmid in *Escherichia coli* in Pig Microbiota. *Antimicrob Agents Chemother* 60 (10):6046-9. doi: 10.1128/AAC.00864-16.
- Müller, D.; Greune, L.; Heusipp, G.; Karch, H.; Fruth, A.; Tschape, H.; Schmidt, M. A.** (2007): Identification of unconventional intestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates expressing intermediate virulence factor profiles by using a novel single-step multiplex PCR. *Appl Environ Microbiol* 73 (10):3380-90. doi: 10.1128/AEM.02855-06.
- Munk, P.; Knudsen, B. E.; Lukjancenko, O.; Duarte, A. S. R.; Van Gompel, L.; Luiken, R. E. C.; Smit, L. A. M.; Schmitt, H.; Garcia, A. D.; Hansen, R. B.; Petersen, T. N.; Bossers, A.; Ruppe, E.; Group, E.; Lund, O.; Hald, T.; Pamp, S. J.; Vigre, H.; Heederik, D.; Wagenaar, J. A.; Mevius, D.; Aarestrup, F. M.** (2018): Abundance and diversity of the faecal resistome in slaughter pigs and broilers in nine European countries. *Nat Microbiol* 3 (8):898-908. doi: 10.1038/s41564-018-0192-9.
- Nedialkova, L. P.; Denzler, R.; Koepfel, M. B.; Diehl, M.; Ring, D.; Wille, T.; Gerlach, R. G.; Stecher, B.** (2014): Inflammation fuels colicin Ib-dependent competition of *Salmonella* serovar Typhimurium and *E. coli* in enterobacterial blooms. *PLoS Pathog* 10 (1):e1003844. doi: 10.1371/journal.ppat.1003844.
- Nhung, N. T.; Thuy, C. T.; Trung, N. V.; Campbell, J.; Baker, S.; Thwaites, G.; Hoa, N. T.; Carrique-Mas, J.** (2015): Induction of Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* and Non-Typhoidal *Salmonella* Strains after Adaptation to Disinfectant Commonly Used on Farms in Vietnam. *Antibiotics (Basel)* 4 (4):480-94. doi: 10.3390/antibiotics4040480.
- Nicolas-Chanoine, M. H.; Blanco, J.; Leflon-Guibout, V.; Demarty, R.; Alonso, M. P.; Caniça, M. M.; Park, Y. J.; Lavigne, J. P.; Pitout, J.; Johnson, J. R.** (2008): Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother* 61 (2):273-81. doi: 10.1093/jac/dkm464.
- Nijssen, S.; Fluit, A.; van de Vijver, D.; Top, J.; Willems, R.; Bonten, M. J.** (2010): Effects of reducing beta-lactam antibiotic pressure on intestinal colonization of antibiotic-resistant gram-negative bacteria. *Intensive Care Med* 36 (3):512-9. doi: 10.1007/s00134-009-1714-y.

- Nilsson, O.; Börjesson, S.; Landén, A.; Bengtsson, B.** (2014): Vertical transmission of *Escherichia coli* carrying plasmid-mediated AmpC (pAmpC) through the broiler production pyramid. *J Antimicrob Chemother* 69 (6):1497-500. doi: 10.1093/jac/dku030.
- Noll, I.; Schweickert, B.; Tenhagen, B. A.; Kasbohrer, A.** (2018): Antibiotic consumption and antimicrobial resistance in human and veterinary medicine : An overview of established national surveillance systems in Germany. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 61 (5):522-532. doi: 10.1007/s00103-018-2724-0.
- Novais, A.; Canton, R.; Moreira, R.; Peixe, L.; Baquero, F.; Coque, T. M.** (2007): Emergence and dissemination of *Enterobacteriaceae* isolates producing CTX-M-1-like enzymes in Spain are associated with IncFII (CTX-M-15) and broad-host-range (CTX-M-1, -3, and -32) plasmids. *Antimicrob Agents Chemother* 51 (2):796-9. doi: 10.1128/AAC.01070-06.
- O'Neill J** (2014): Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations. *Review on Antimicrobial Resistance - supported by the Wellcome Trust and commissioned by the UK Government.* https://amr-review.org/sites/default/files/AMR_Review_Paper_-_Tackling_a_crisis_for_the_health_and_wealth_of_nations_1.pdf.
- Ochman, H.; Selander, R. K.** (1984): Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *J Bacteriol* 157 (2):690-3. doi: 10.1128/jb.157.2.690-693.1984.
- OIE – World Organisation for Animal Health** (2019): OIE List of Antimicrobial Agents of Veterinary Importance. www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/AMR/A_OIE_List_antimicrobials_July2019.pdf.
- Oteo, J.; Diestra, K.; Juan, C.; Bautista, V.; Novais, A.; Pérez-Vázquez, M.; Moyá, B.; Miró, E.; Coque, T. M.; Oliver, A.; Cantón, R.; Navarro, F.; Campos, J.** (2009): Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Spain belong to a large variety of multilocus sequence typing types, including ST10 complex/A, ST23 complex/A and ST131/B2. *Int J Antimicrob Agents* 34 (2):173-6. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2009.03.006.
- Pakpour, S.; Jabaji, S.; Chenier, M. R.** (2012): Frequency of antibiotic resistance in a swine facility 2.5 years after a ban on antibiotics. *Microb Ecol* 63 (1):41-50. doi: 10.1007/s00248-011-9954-0.
- Pal, C.; Bengtsson-Palme, J.; Kristiansson, E.; Larsson, D. G.** (2015): Co-occurrence of resistance genes to antibiotics, biocides and metals reveals novel insights into their co-selection potential. *BMC Genomics* 16:964. doi: 10.1186/s12864-015-2153-5.
- Pärnänen, K.; Karkman, A.; Hultman, J.; Lyra, C.; Bengtsson-Palme, J.; Larsson, D. G. J.; Rautava, S.; Isolauri, E.; Salminen, S.; Kumar, H.; Satokari, R.; Virta, M.** (2018): Maternal gut and breast milk microbiota affect infant gut antibiotic resistome and mobile genetic elements. *Nat Commun* 9 (1):3891. doi: 10.1038/s41467-018-06393-w.
- Partridge, S. R.; Kwong, S. M.; Firth, N.; Jensen, S. O.** (2018): Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev* 31 (4). doi: 10.1128/CMR.00088-17.
- Patel, I. R.; Gangiredla, J.; Mammel, M. K.; Lampel, K. A.; Elkins, C. A.; Lacher, D. W.** (2018): Draft Genome Sequences of the *Escherichia coli* Reference (ECOR) Collection. *Microbiol Resour Announc* 7 (14). doi: 10.1128/MRA.01133-18.
- Paterson, D. L.** (2006): Resistance in gram-negative bacteria: *enterobacteriaceae*. *Am J Med* 119 (6 Suppl 1):S20-8; discussion S62-70. doi: 10.1016/j.amjmed.2006.03.013.
- Pereira, R. V.; Siler, J. D.; Ng, J. C.; Davis, M. A.; Grohn, Y. T.; Warnick, L. D.** (2014): Effect of on-farm use of antimicrobial drugs on resistance in fecal *Escherichia coli* of preweaned dairy calves. *J Dairy Sci* 97 (12):7644-54. doi: 10.3168/jds.2014-8521.
- Persoons, D.; Dewulf, J.; Smet, A.; Herman, L.; Heyndrickx, M.; Martel, A.; Catry, B.; Butaye, P.; Haesebrouck, F.** (2010): Prevalence and persistence of antimicrobial resistance in broiler indicator bacteria. *Microb Drug Resist* 16 (1):67-74. doi: 10.1089/mdr.2009.0062.

- Persoons, D.; Haesebrouck, F.; Smet, A.; Herman, L.; Heyndrickx, M.; Martel, A.; Catry, B.; Berge, A. C.; Butaye, P.; Dewulf, J. (2011): Risk factors for ceftiofur resistance in *Escherichia coli* from Belgian broilers. *Epidemiol Infect* 139 (5):765-71. doi: 10.1017/S0950268810001524.
- Pfeifer, Y.; Cullik, A.; Witte, W. (2010): Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *Int J Med Microbiol* 300 (6):371-9. doi: 10.1016/j.ijmm.2010.04.005.
- Pirolo, M.; Sieber, R. N.; Moodley, A.; Visaggio, D.; Artuso, I.; Giofrè, A.; Casalinuovo, F.; Spatari, G.; Guardabassi, L.; Stegger, M.; Visca, P. (2020): Local and Transboundary Transmissions of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Sequence Type 398 through Pig Trading. *Appl Environ Microbiol* 86 (13). doi: 10.1128/aem.00430-20.
- Pitout, J. D.; Laupland, K. B. (2008): Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis* 8 (3):159-66. doi: 10.1016/s1473-3099(08)70041-0.
- Poirel, L.; Decusser, J. W.; Nordmann, P. (2003): Insertion sequence ISEcp1B is involved in expression and mobilization of a bla(CTX-M) beta-lactamase gene. *Antimicrob Agents Chemother* 47 (9):2938-45. doi: 10.1128/AAC.47.9.2938-2945.2003.
- Poirel, L.; Cattoir, V.; Nordmann, P. (2012): Plasmid-Mediated Quinolone Resistance; Interactions between Human, Animal, and Environmental Ecologies. *Front Microbiol* 3:24. doi: 10.3389/fmicb.2012.00024.
- Poirel, L.; Madec, J. Y.; Lupo, A.; Schink, A. K.; Kieffer, N.; Nordmann, P.; Schwarz, S. (2018): Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr* 6 (4). doi: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0026-2017.
- Poon, A. F. Y.; Price, M. N.; Dehal, P. S.; Arkin, A. P. (2010): FastTree 2 – Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments. *PLoS ONE* 5 (3). doi: 10.1371/journal.pone.0009490.
- Poulin-Laprade, D.; Brouard, J. S.; Gagnon, N.; Turcotte, A.; Langlois, A.; Matte, J. J.; Carrillo, C. D.; Zaheer, R.; McAllister, T.; Topp, E.; Talbot, G. (2021): Resistance determinants and their genetic context in *enterobacteria* from a longitudinal study of pigs reared under various husbandry conditions. *Appl Environ Microbiol*. doi: 10.1128/AEM.02612-20.
- Qin, T. T.; Kang, H. Q.; Ma, P.; Li, P. P.; Huang, L. Y.; Gu, B. (2015): SOS response and its regulation on the fluoroquinolone resistance. *Ann Transl Med* 3 (22):358. doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2015.12.09.
- R Core Team (2021): R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.r-project.org/>.
- Rahmani, M.; Peighambari, S. M.; Svendsen, C. A.; Cavaco, L. M.; Agerso, Y.; Hendriksen, R. S. (2013): Molecular clonality and antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Infantis from broilers in three Northern regions of Iran. *BMC Vet Res* 9:66. doi: 10.1186/1746-6148-9-66.
- Ramesh, A.; Bailey, E. S.; Ah Yong, V.; Langelier, C.; Phelps, M.; Neff, N.; Sit, R.; Tato, C.; DeRisi, J. L.; Greer, A. G.; Gray, G. C. (2021): Metagenomic characterization of swine slurry in a North American swine farm operation. *Sci Rep* 11 (1):16994. doi: 10.1038/s41598-021-95804-y.
- Ramos, S.; Silva, N.; Dias, D.; Sousa, M.; Capelo-Martinez, J. L.; Brito, F.; Canica, M.; Igrejas, G.; Poeta, P. (2013): Clonal diversity of ESBL-producing *Escherichia coli* in pigs at slaughter level in Portugal. *Foodborne Pathog Dis* 10 (1):74-9. doi: 10.1089/fpd.2012.1173.
- Reece, R. J.; Maxwell, A. (1991): DNA gyrase: structure and function. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 26 (3-4):335-75. doi: 10.3109/10409239109114072.

- Reid, C. J.; Cummins, M. L.; Borjesson, S.; Brouwer, M. S. M.; Hasman, H.; Hammerum, A. M.; Roer, L.; Hess, S.; Berendonk, T.; Nesporova, K.; Haenni, M.; Madec, J. Y.; Bethe, A.; Michael, G. B.; Schink, A. K.; Schwarz, S.; Dolejska, M.; Djordjevic, S. P. (2022): A role for ColV plasmids in the evolution of pathogenic *Escherichia coli* ST58. *Nat Commun* 13 (1):683. doi: 10.1038/s41467-022-28342-4.
- Reiner, G.; Schollasch, F.; Hillen, S.; Willems, H.; Piechotta, M.; Failing, K. (2012): Effects of meloxicam and flunixin on pain, stress and discomfort in male piglets during and after surgical castration. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 125 (7-8):305-14.
- Riley, L. W. (2020): Distinguishing Pathovars from Nonpathovars: *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr* 8 (4). doi: 10.1128/microbiolspec.AME-0014-2020.
- Riva, F.; Riva, V.; Eckert, E. M.; Colinas, N.; Di Cesare, A.; Borin, S.; Mapelli, F.; Crotti, E. (2020): An Environmental *Escherichia coli* Strain Is Naturally Competent to Acquire Exogenous DNA. *Front Microbiol* 11:574301. doi: 10.3389/fmicb.2020.574301.
- Robicsek, A.; Strahilevitz, J.; Sahm, D. F.; Jacoby, G. A.; Hooper, D. C. (2006): qnr prevalence in ceftazidime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 50 (8):2872-4. doi: 10.1128/AAC.01647-05.
- Rodrigues, C.; Machado, E.; Peixe, L.; Novais, A. (2013): IncI1/ST3 and IncN/ST1 plasmids drive the spread of blaTEM-52 and blaCTX-M-1/-32 in diverse *Escherichia coli* clones from different piggeries. *J Antimicrob Chemother* 68 (10):2245-8. doi: 10.1093/jac/dkt187.
- Rodriguez, I.; Thomas, K.; Van Essen, A.; Schink, A. K.; Day, M.; Chattaway, M.; Wu, G.; Mevius, D.; Helmuth, R.; Guerra, B.; consortium, S.-E. (2014): Chromosomal location of blaCTX-M genes in clinical isolates of *Escherichia coli* from Germany, The Netherlands and the UK. *Int J Antimicrob Agents* 43 (6):553-7. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2014.02.019.
- Rodriguez-Beltran, J.; Hernandez-Beltran, J. C. R.; DelaFuente, J.; Escudero, J. A.; Fuentes-Hernandez, A.; MacLean, R. C.; Pena-Miller, R.; San Millan, A. (2018): Multicopy plasmids allow bacteria to escape from fitness trade-offs during evolutionary innovation. *Nat Ecol Evol* 2 (5):873-881. doi: 10.1038/s41559-018-0529-z.
- Rodríguez-Martínez, J. M.; Cano, M. E.; Velasco, C.; Martínez-Martínez, L.; Pascual, A. (2011): Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. *J Infect Chemother* 17 (2):149-82. doi: 10.1007/s10156-010-0120-2.
- Römer, A.; Scherz, G.; Reupke, S.; Meissner, J.; Wallmann, J.; Kietzmann, M.; Kaspar, H. (2017): Effects of intramuscularly administered enrofloxacin on the susceptibility of commensal intestinal *Escherichia coli* in pigs (*sus scrofa domestica*). *BMC Vet Res* 13 (1):378. doi: 10.1186/s12917-017-1260-8.
- Rozwandowicz, M.; Brouwer, M. S. M.; Fischer, J.; Wagenaar, J. A.; Gonzalez-Zorn, B.; Guerra, B.; Mevius, D. J.; Hordijk, J. (2018): Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother* 73 (5):1121-1137. doi: 10.1093/jac/dkx488.
- Ruiz, J. (2019): Transferable Mechanisms of Quinolone Resistance from 1998 Onward. *Clin Microbiol Rev* 32 (4). doi: 10.1128/CMR.00007-19.
- Salyers, A. A.; Amábile-Cuevas, C. F. (1997): Why are antibiotic resistance genes so resistant to elimination? *Antimicrob Agents Chemother* 41 (11):2321-5. doi: 10.1128/aac.41.11.2321.
- Saravanan, M.; Ramachandran, B.; Barabadi, H. (2018): The prevalence and drug resistance pattern of extended spectrum β -lactamases (ESBLs) producing *Enterobacteriaceae* in Africa. *Microb Pathog* 114:180-192. doi: 10.1016/j.micpath.2017.11.061.
- Sarmah, A. K.; Meyer, M. T.; Boxall, A. B. (2006): A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere* 65 (5):725-59. doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.03.026.

- Sarrazin, S.; Joosten, P.; Van Gompel, L.; Luiken, R. E. C.; Mevius, D. J.; Wagenaar, J. A.; Heederik, D. J. J.; Dewulf, J.; consortium, E. (2019): Quantitative and qualitative analysis of antimicrobial usage patterns in 180 selected farrow-to-finish pig farms from nine European countries based on single batch and purchase data. *J Antimicrob Chemother* 74 (3):807-816. doi: 10.1093/jac/dky503.
- Schaufler, K.; Semmler, T.; Pickard, D. J.; de Toro, M.; de la Cruz, F.; Wieler, L. H.; Ewers, C.; Guenther, S. (2016): Carriage of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Plasmids Does Not Reduce Fitness but Enhances Virulence in Some Strains of Pandemic *E. coli* Lineages. *Front Microbiol* 7:336. doi: 10.3389/fmicb.2016.00336.
- Scheutz, F.; Teel, L. D.; Beutin, L.; Pierard, D.; Buvens, G.; Karch, H.; Mellmann, A.; Caprioli, A.; Tozzoli, R.; Morabito, S.; Strockbine, N. A.; Melton-Celsa, A. R.; Sanchez, M.; Persson, S.; O'Brien, A. D. (2012): Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *J Clin Microbiol* 50 (9):2951-63. doi: 10.1128/JCM.00860-12.
- Schierack, P.; Kadlec, K.; Guenther, S.; Filter, M.; Schwarz, S.; Ewers, C.; Wieler, L. H. (2009): Antimicrobial resistances do not affect colonization parameters of intestinal *E. coli* in a small piglet group. *Gut Pathog* 1 (1):18. doi: 10.1186/1757-4749-1-18.
- Schink, A. K.; Kadlec, K.; Schwarz, S. (2011): Analysis of bla(CTX-M)-carrying plasmids from *Escherichia coli* isolates collected in the BfT-GermVet study. *Appl Environ Microbiol* 77 (20):7142-6. doi: 10.1128/AEM.00559-11.
- Schulz, J.; Kemper, N.; Hartung, J.; Janusch, F.; Mohring, S. A. I.; Hamscher, G. (2019): Analysis of fluoroquinolones in dusts from intensive livestock farming and the co-occurrence of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli*. *Sci Rep* 9 (1):5117. doi: 10.1038/s41598-019-41528-z.
- Schwengers, O.; Barth, P.; Falgenhauer, L.; Hain, T.; Chakraborty, T.; Goesmann, A. (2020): Platon: identification and characterization of bacterial plasmid contigs in short-read draft assemblies exploiting protein sequence-based replicon distribution scores. *Microb Genom* 6 (10). doi: 10.1099/mgen.0.000398.
- Seemann T. (2019a): Abricate. <https://github.com/tseemann/abricate>.
- Seemann T. (2019b): MLST. <https://github.com/tseemann/mlst>.
- Seemann T. (2019c): Shovill. <https://github.com/tseemann/shovill>.
- Sengeløv, G.; Agersø, Y.; Halling-Sørensen, B.; Baloda, S. B.; Andersen, J. S.; Jensen, L. B. (2003): Bacterial antibiotic resistance levels in Danish farmland as a result of treatment with pig manure slurry. *Environ Int* 28 (7):587-95. doi: 10.1016/s0160-4120(02)00084-3.
- Shannon, P.; Markiel, A.; Ozier, O.; Baliga, N. S.; Wang, J. T.; Ramage, D.; Amin, N.; Schwikowski, B.; Ideker, T. (2003): Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 13 (11):2498-504. doi: 10.1101/gr.1239303.
- Shere, J. A.; Bartlett, K. J.; Kaspar, C. W. (1998): Longitudinal study of *Escherichia coli* O157:H7 dissemination on four dairy farms in Wisconsin. *Appl Environ Microbiol* 64 (4):1390-9. doi: 10.1128/AEM.64.4.1390-1399.1998.
- Sierra, J. M.; Cabeza, J. G.; Ruiz Chaler, M.; Montero, T.; Hernandez, J.; Mensa, J.; Llagostera, M.; Vila, J. (2005): The selection of resistance to and the mutagenicity of different fluoroquinolones in *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect* 11 (9):750-8. doi: 10.1111/j.1469-0691.2005.01211.x.
- Singer, R. S.; Finch, R.; Wegener, H. C.; Bywater, R.; Walters, J.; Lipsitch, M. (2003): Antibiotic resistance - the interplay between antibiotic use in animals and human beings. *Lancet Infect Dis* 3 (1):47-51. doi: 10.1016/s1473-3099(03)00490-0.
- Singer, R. S.; Reid-Smith, R.; Sisco, W. M. (2006): Stakeholder position paper: epidemiological perspectives on antibiotic use in animals. *Prev Vet Med* 73 (2-3):153-61. doi: 10.1016/j.prevetmed.2005.09.019.

- Sjölund, M.; Postma, M.; Collineau, L.; Lösken, S.; Backhans, A.; Belloc, C.; Emanuelson, U.; Beilage, E. G.; Stärk, K.; Dewulf, J.** (2016): Quantitative and qualitative antimicrobial usage patterns in farrow-to-finish pig herds in Belgium, France, Germany and Sweden. *Prev Vet Med* 130:41-50. doi: 10.1016/j.prevetmed.2016.06.003.
- Skurnik, D.; Ruimy, R.; Andremont, A.; Amorin, C.; Rouquet, P.; Picard, B.; Denamur, E.** (2006): Effect of human vicinity on antimicrobial resistance and integrons in animal faecal *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 57 (6):1215-9. doi: 10.1093/jac/dkl122.
- Smet, A.; Martel, A.; Persoons, D.; Dewulf, J.; Heyndrickx, M.; Cloeckaert, A.; Praud, K.; Claeys, G.; Catry, B.; Herman, L.; Haesebrouck, F.; Butaye, P.** (2009): Comparative analysis of extended-spectrum- β -lactamase-carrying plasmids from different members of *Enterobacteriaceae* isolated from poultry, pigs and humans: evidence for a shared β -lactam resistance gene pool? *J Antimicrob Chemother* 63 (6):1286-8. doi: 10.1093/jac/dkp101.
- Söderlund, R.; Skarin, H.; Börjesson, S.; Sannö, A.; Jernberg, T.; Aspán, A.; Ågren, E. O.; Hansson, I.** (2019): Prevalence and genomic characteristics of zoonotic gastrointestinal pathogens and ESBL/pAmpC producing *Enterobacteriaceae* among Swedish corvid birds. *Infect Ecol Epidemiol* 9 (1):1701399. doi: 10.1080/20008686.2019.1701399.
- Stecher, B.; Maier, L.; Hardt, W. D.** (2013): 'Blooming' in the gut: how dysbiosis might contribute to pathogen evolution. *Nat Rev Microbiol* 11 (4):277-84. doi: 10.1038/nrmicro2989.
- Steenhard, N. R.; Storey, P. A.; Yelifari, L.; Pit, D. S.; Nansen, P.; Polderman, A. M.** (2000): The role of pigs as transport hosts of the human helminths *Oesophagostomum bifurcum* and *Necator americanus*. *Acta Trop* 76 (2):125-30. doi: 10.1016/s0001-706x(00)00077-2.
- Storey, N.; Cawthraw, S.; Turner, O.; Rambaldi, M.; Lemma, F.; Horton, R.; Randall, L.; Duggett, N. A.; AbuOun, M.; Martelli, F.; Anjum, M. F.** (2022): Use of genomics to explore AMR persistence in an outdoor pig farm with low antimicrobial usage. *Microb Genom* 8 (3). doi: 10.1099/mgen.0.000782.
- Sunde, M.; Fossum, K.; Solberg, A.; Sorum, H.** (1998): Antibiotic resistance in *Escherichia coli* of the normal intestinal flora of swine. *Microb Drug Resist* 4 (4):289-99. doi: 10.1089/mdr.1998.4.289.
- Sundqvist, M.; Geli, P.; Andersson, D. I.; Sjolund-Karlsson, M.; Runeheggen, A.; Cars, H.; Abelson-Storby, K.; Cars, O.; Kahlmeter, G.** (2010): Little evidence for reversibility of trimethoprim resistance after a drastic reduction in trimethoprim use. *J Antimicrob Chemother* 65 (2):350-60. doi: 10.1093/jac/dkp387.
- Tadesse, D. A.; Zhao, S.; Tong, E.; Ayers, S.; Singh, A.; Bartholomew, M. J.; McDermott, P. F.** (2012): Antimicrobial drug resistance in *Escherichia coli* from humans and food animals, United States, 1950-2002. *Emerg Infect Dis* 18 (5):741-9. doi: 10.3201/eid1805.111153.
- Taylor, N. M.; Clifton-Hadley, F. A.; Wales, A. D.; Ridley, A.; Davies, R. H.** (2009): Farm-level risk factors for fluoroquinolone resistance in *E. coli* and thermophilic *Campylobacter* spp. on finisher pig farms. *Epidemiol Infect* 137 (8):1121-34. doi: 10.1017/S0950268808001854.
- Tenaillon, O.; Skurnik, D.; Picard, B.; Denamur, E.** (2010): The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 8 (3):207-17. doi: 10.1038/nrmicro2298.
- Thakur, S.; Gebreyes, W. A.** (2005): Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* in antimicrobial-free and conventional pig production systems. *J Food Prot* 68 (11):2402-10. doi: 10.4315/0362-028x-68.11.2402.
- Turnidge, J.; Christiansen, K.** (2005): Antibiotic use and resistance—proving the obvious. *The Lancet* 365 (9459):548-549. doi: 10.1016/s0140-6736(05)17920-3.
- Tyson, G. H.; McDermott, P. F.; Li, C.; Chen, Y.; Tadesse, D. A.; Mukherjee, S.; Bodeis-Jones, S.; Kabera, C.; Gaines, S. A.; Loneragan, G. H.; Edrington, T. S.; Torrence, M.; Harhay, D. M.; Zhao, S.** (2015): WGS accurately predicts antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 70 (10):2763-9. doi: 10.1093/jac/dkv186.
- Usui, M.; Sakemi, Y.; Uchida, I.; Tamura, Y.** (2014): Effects of fluoroquinolone treatment and group housing of pigs on the selection and spread of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter*. *Vet Microbiol* 170 (3-4):438-41. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.01.036.

- Van Boeckel, T. P.; Brower, C.; Gilbert, M.; Grenfell, B. T.; Levin, S. A.; Robinson, T. P.; Teillant, A.; Laxminarayan, R.** (2015): Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112 (18):5649-54. doi: 10.1073/pnas.1503141112.
- van den Bogaard, A. E.; Stobberingh, E. E.** (1999): Antibiotic usage in animals: impact on bacterial resistance and public health. *Drugs* 58 (4):589-607. doi: 10.2165/00003495-199958040-00002.
- van den Eede, G.; Aarts, H.; Buhk, H. J.; Corthier, G.; Flint, H. J.; Hammes, W.; Jacobsen, B.; Midtvedt, T.; van der Vossen, J.; von Wright, A.; Wackernagel, W.; Wilcks, A.** (2004): The relevance of gene transfer to the safety of food and feed derived from genetically modified (GM) plants. *Food Chem Toxicol* 42 (7):1127-56. doi: 10.1016/j.fct.2004.02.001.
- Van Gompel, L.; Luiken, R. E. C.; Sarrazin, S.; Munk, P.; Knudsen, B. E.; Hansen, R. B.; Bossers, A.; Aarestrup, F. M.; Dewulf, J.; Wagenaar, J. A.; Mevius, D. J.; Schmitt, H.; Heederik, D. J. J.; Dorado-Garcia, A.; Smit, L. A. M.; consortium, E.** (2019): The antimicrobial resistome in relation to antimicrobial use and biosecurity in pig farming, a metagenome-wide association study in nine European countries. *J Antimicrob Chemother* 74 (4):865-876. doi: 10.1093/jac/dky518.
- van Hoek, A. H.; Mevius, D.; Guerra, B.; Mullany, P.; Roberts, A. P.; Aarts, H. J.** (2011): Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front Microbiol* 2:203. doi: 10.3389/fmicb.2011.00203.
- van Schaik, W.** (2022): Baas Becking meets One Health. *Nat Microbiol* 7 (4):482-483. doi: 10.1038/s41564-022-01100-4.
- Verliat, F.; Hemonic, A.; Chouet, S.; Le Coz, P.; Liber, M.; Jouy, E.; Perrin-Guyomard, A.; Chevance, A.; Delzescaux, D.; Chauvin, C.** (2021): An efficient cephalosporin stewardship programme in French swine production. *Vet Med Sci* 7 (2):432-439. doi: 10.1002/vms3.377.
- Verrette, L.; Fairbrother, J. M.; Boulianne, M.** (2019): Effect of Cessation of Ceftiofur and Substitution with Lincomycin-Spectinomycin on Extended-Spectrum-beta-Lactamase/AmpC Genes and Multidrug Resistance in *Escherichia coli* from a Canadian Broiler Production Pyramid. *Appl Environ Microbiol* 85 (13). doi: 10.1128/AEM.00037-19.
- VETIDATA** – Veterinärmedizinischer Informationsdienst für Arzneimittel Anwendung, Toxikologie und Arzneimittelrecht. Universität Leipzig, Germany (Zugriff am 26.08. - 20.12.2021). www.vetidata.de.
- Vila, J.; Ruiz, J.; Marco, F.; Barcelo, A.; Goñi, P.; Giral, E.; Jimenez de Anta, T.** (1994): Association between double mutation in gyrA gene of ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and MICs. *Antimicrob Agents Chemother* 38 (10):2477-9. doi: 10.1128/aac.38.10.2477.
- Vila, J.; Ruiz, J.; Goni, P.; De Anta, M. T.** (1996): Detection of mutations in parC in quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 40 (2):491-3. doi: 10.1128/AAC.40.2.491.
- Vimont, S.; Boyd, A.; Bleibtreu, A.; Bens, M.; Goujon, J. M.; Garry, L.; Clermont, O.; Denamur, E.; Arlet, G.; Vandewalle, A.** (2012): The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clone O25b: H4-ST131 has high intestine colonization and urinary tract infection abilities. *PLoS One* 7 (9):e46547. doi: 10.1371/journal.pone.0046547.
- Volkova, V. V.; Lanzas, C.; Lu, Z.; Grohn, Y. T.** (2012): Mathematical model of plasmid-mediated resistance to ceftiofur in commensal enteric *Escherichia coli* of cattle. *PLoS One* 7 (5):e36738. doi: 10.1371/journal.pone.0036738.
- Volkova, V. V.; Lu, Z.; Lanzas, C.; Grohn, Y. T.** (2013): Evaluating targets for control of plasmid-mediated antimicrobial resistance in enteric commensals of beef cattle: a modelling approach. *Epidemiol Infect* 141 (11):2294-312. doi: 10.1017/S0950268812002993.

- Volkova, V. V.; Cazer, C. L.; Grohn, Y. T.** (2017): Models of antimicrobial pressure on intestinal bacteria of the treated host populations. *Epidemiol Infect* 145 (10):2081-2094. doi: 10.1017/S095026881700084X.
- von Salviati, C.; Laube, H.; Guerra, B.; Roesler, U.; Friese, A.** (2015): Emission of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from pig fattening farms to surrounding areas. *Vet Microbiol* 175 (1):77-84. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.10.010.
- Walsh, T. R.** (2018): A one-health approach to antimicrobial resistance. *Nat Microbiol* 3 (8):854-855. doi: 10.1038/s41564-018-0208-5.
- Wang, L. Y. R.; Jokinen, C. C.; Laing, C. R.; Johnson, R. P.; Ziebell, K.; Gannon, V. P. J.** (2018): Multi-Year Persistence of Verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) in a Closed Canadian Beef Herd: A Cohort Study. *Front Microbiol* 9:2040. doi: 10.3389/fmicb.2018.02040.
- Wang, L. Y. R.; Jokinen, C. C.; Laing, C. R.; Johnson, R. P.; Ziebell, K.; Gannon, V. P. J.** (2020): Assessing the genomic relatedness and evolutionary rates of persistent verotoxigenic *Escherichia coli* serotypes within a closed beef herd in Canada. *Microb Genom* 6 (6). doi: 10.1099/mgen.0.000376.
- Wang, X.; Tsai, T.; Deng, F.; Wei, X.; Chai, J.; Knapp, J.; Apple, J.; Maxwell, C. V.; Lee, J. A.; Li, Y.; Zhao, J.** (2019): Longitudinal investigation of the swine gut microbiome from birth to market reveals stage and growth performance associated bacteria. *Microbiome* 7 (1):109. doi: 10.1186/s40168-019-0721-7.
- Wein, T.; Dagan, T.** (2020): Plasmid evolution. *Curr Biol* 30 (19):R1158-R1163. doi: 10.1016/j.cub.2020.07.003.
- WHO – GAP AMR** (2015): Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. Geneva: World Health Organization (ISBN: 978-92-4-150976-4). <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/global-action-plan/en/>.
- WHO – Weltgesundheitsorganisation** (2017a): Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance in Foodborne Bacteria: Application of a One Health Approach. Geneva: World Health Organization Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- WHO – Weltgesundheitsorganisation** (2017b): WHO guidelines on use of medically important antimicrobials in food-producing animals. Geneva: World Health Organization Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- WHO – AGISAR** (2019): Critically important antimicrobials for human medicine, 6th revision. Geneva: World Health Organization - Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. (ISBN: 978-92-4-151552-8).
- Wirth, T.; Falush, D.; Lan, R.; Colles, F.; Mensa, P.; Wieler, L. H.; Karch, H.; Reeves, P. R.; Maiden, M. C.; Ochman, H.; Achtman, M.** (2006): Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol Microbiol* 60 (5):1136-51. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05172.x.
- Witte, W.** (1998): Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science* 279 (5353):996-7. doi: 10.1126/science.279.5353.996.
- Witte, W.; Mielke, M.** (2003): β -Laktamasen mit breitem Wirkungsspektrum. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 46 (10):881-890. doi: 10.1007/s00103-003-0693-3.
- Wittum, T. E.** (2012): The challenge of regulating agricultural ceftiofur use to slow the emergence of resistance to extended-spectrum cephalosporins. *Appl Environ Microbiol* 78 (22):7819-21. doi: 10.1128/AEM.01967-12.
- Wiuff, C.; Lykkesfeldt, J.; Svendsen, O.; Aarestrup, F. M.** (2003): The effects of oral and intramuscular administration and dose escalation of enrofloxacin on the selection of quinolone resistance among *Salmonella* and coliforms in pigs. *Res Vet Sci* 75 (3):185-193. doi: 10.1016/s0034-5288(03)00112-7.
- Woodford, N.; Turton, J. F.; Livermore, D. M.** (2011): Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 35 (5):736-55. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00268.x.

- Wyrsh, E. R.; Roy Chowdhury, P.; Chapman, T. A.; Charles, I. G.; Hammond, J. M.; Djordjevic, S. P.** (2016): Genomic Microbial Epidemiology Is Needed to Comprehend the Global Problem of Antibiotic Resistance and to Improve Pathogen Diagnosis. *Front Microbiol* 7:843. doi: 10.3389/fmicb.2016.00843.
- Xiong, X.; Tan, B.; Song, M.; Ji, P.; Kim, K.; Yin, Y.; Liu, Y.** (2019): Nutritional Intervention for the Intestinal Development and Health of Weaned Pigs. *Front Vet Sci* 6:46. doi: 10.3389/fvets.2019.00046.
- Zhang, H.-l.; Zhao, Y.-y.; Zhou, Z.-c.; Ding, H.-z.** (2021): Susceptibility breakpoint for cefquinome against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* from pigs. *J Integr Agric* 20 (7):1921-1932. doi: 10.1016/s2095-3119(20)63572-9.
- Zhang, J.; Zheng, B.; Zhao, L.; Wei, Z.; Ji, J.; Li, L.; Xiao, Y.** (2014): Nationwide high prevalence of CTX-M and an increase of CTX-M-55 in *Escherichia coli* isolated from patients with community-onset infections in Chinese county hospitals. *BMC Infect Dis* 14:659. doi: 10.1186/s12879-014-0659-0.
- Zhao, L.; Zhang, J.; Zheng, B.; Wei, Z.; Shen, P.; Li, S.; Li, L.; Xiao, Y.** (2015): Molecular epidemiology and genetic diversity of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* isolates from patients with community-onset infections in 30 Chinese county hospitals. *J Clin Microbiol* 53 (3):766-70. doi: 10.1128/JCM.02594-14.
- Zhao, X.; Xu, C.; Domagala, J.; Drlica, K.** (1997): DNA topoisomerase targets of the fluoroquinolones: a strategy for avoiding bacterial resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (25):13991-6. doi: 10.1073/pnas.94.25.13991.
- Zurfluh, K.; Wang, J.; Klumpp, J.; Nuesch-Inderbinen, M.; Fanning, S.; Stephan, R.** (2014): Vertical transmission of highly similar bla CTX-M-1-harboring Inc11 plasmids in *Escherichia coli* with different MLST types in the poultry production pyramid. *Front Microbiol* 5:519. doi: 10.3389/fmicb.2014.00519.
- Zurfluh, K.; Cernela, N.; Stephan, R.** (2015): Quinolone resistance mechanisms among extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolated from farm animals in Switzerland. *Schweiz Arch Tierheilkd* 157 (1):59-62. doi: 10.17236/sat00006.

9 Anhang

9.1 Übersicht über verwendete Verbrauchsmaterialien, Geräte, Softwareprogramme, Chemikalien, Puffer und Lösungen sowie Oligonukleotide und Standards

Tabelle 44: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Artikel	Bezugsquelle	Artikel-Nummer
Deckel für 1,2 ml Röhrchen, 8er Strips, PE	BRAND GmbH + Co. KG, Wertheim, D	227261
DNeasy UltraClean Microbial Kit	Qiagen, Hilden, D	12224-50
Einmal-Küvetten (1,5 ml, halbmikro)	BRAND GmbH + Co. KG, Wertheim, D	612-5684
High Pure PCR <i>template</i> Preparation Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D	11796828001
Holzmundspatel	Vivomed GmbH Krankenhausbedarf, Solingen, D	3886.3
Impfeschlingen mit Nadel, 10 µl	Neolab Migge GmbH, Berlin, D	E-1722
MICRONAUT-S Großtier Platte	MERLIN Diagnostika GmbH, Bornheim, D	E1-150-100
Mikrotiterplatte, 96-Loch, Cellstar®	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D	650101
Multiplex PCR Kit Qiagen® mit Q-Solution	Qiagen, Hilden, D	206143
NucleoSpin PCR & Gel Cleanup Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, D	740609.50
OneTaq Master Mix (2x)	New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main, D	M0482L
Pipettenspitzen mit Filter, farblos – verschiedene Größen	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, D	701116, 70760002, 70762
Plattierungsspatel, t-förmig,	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, D	861569005
qPCR Folie, adhäsive, hochtransparent	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, D	95.1999
Quadratische Petrischale ohne Fächer	Corning GmbH Life Sciences, Wiesbaden, D	11708573
Reaktionsgefäß 1,5 ml ohne Standring, mit Schraubdeckel	BRAND GmbH + Co. KG, Wertheim, D	6.802032, 6.901 915
Reaktionsgefäß <i>safelock</i> 1,5 ml / 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg, D	0030120086 / 0030120094
Runddosen zur Probenaufbewahrung	Neolab Migge GmbH, Berlin, D	23 01 21504
Zentrifugationsröhrchen, konisch, 15 ml / 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D	E1415-0200 / E1450-0200

Tabelle 45: Verwendete Geräte

Gerät / Modell	Hersteller	Serien-Nummer
Brutschrank Heraeus Serie 6000	Kendro Laboratory Products, Hanau, D	30017866
Elektrophorese Spannungsgerät CHEF Mapper XA PFGE Powermodul	BIO-RAD Laboratories GmbH, München, D	802BR512
Elektrophoresekammer Compact M	Biometra über Analytik Jena AG, Jena, D	70610971
Elektrophorese-Pufferumwälzer CHEF Mapper XA PFGE Pumpe	BIO-RAD Laboratories GmbH, München, D	260BR5294
ELISA Reader: Tecan Sunrise Reader	Tecan group, Männedorf, CHE	30041770
Gelelektrophorese Maxi-Plus submarine	Hoefer Inc., Massachusetts, USA	SUB25C
Gelelektrophorese Mupid-One	Nippon Genetics EUROPE GmbH, Düren, D	77543
Gelelektrophorese PerfectBlue™ Gelsystem Maxi S Plus	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D	700-0876
Gelelektrophorese PerfectBlue™, Maxi S	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D	PEQL41-1325
Heizblock Kühl-Thermomixer CTM	HTA-BioTec, Bovenden, D	C 100051
Heizblock Thermomixer comfort 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, D	535502669
Koloniezählstift Ecount	Heathrow Scientific, Vernon Hills, USA	HSD03569
Kühlgerät Gelelektrophorese CHEF Mapper XA PFGE Kühlmodul	BIO-RAD Laboratories GmbH, München, D	813BR2823
Kühlinkubator INCU-Line 150R IL15R	VWR International GmbH, Hannover, D	180284
Magnetrührer Heidolph MR	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, D	40112258
MALDI Biotyper UltrafleXtreme	Bruker Daltonik GmbH, Bremen, D	8276601.00560
Mikrotiterplatten-Schüttler	SLT-labinstruments, Achterwehr, D	602369
Mini Zentrifuge FastGene®	Nippon Genetics EUROPE GmbH, Düren, D	NG002-3086
NanoDrop One Mikrovolumen Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot, D	AZY1810649
NanoPhotometer OD600	Implen GmbH, München, D	1418
Optische Einheit des quantitativen PCR-Geräts CFX96 Real Time optics module	BIO-RAD Laboratories GmbH, München, D	785BR03432
Pipette Research (2-20 µl, 10- 100µl, 20-200 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, D	472081, 479309, 480587

Tabelle 45: (Fortsetzung)

Gerät / Modell	Hersteller	Serien-Nummer
Pipettierhelfer Accu-jet® pro	BRAND GmbH + Co. KG, Wertheim, D	01H67919
Quantitative PCR-Maschine C1000 Touch Thermal Cycler	BIO-RAD Laboratories GmbH, München, D	CT037379
Semiquantitative PCR-Maschine Mastercycler nexus GX2	Eppendorf AG, Hamburg, D	63361J120516
Geldokumentationssystem G:BOX EF	Syngene, Cambridge, UK	SYDR4/2606
Tisch-Zentrifuge 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg, D	542602766
Trockentemperiersystem Varitherm	Barkey, Leopoldshöhe, D	2104502
Vortexer Heidolph REAX 2000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, D	99447997
Waage LA 2200 S	Sartorius AG, Göttingen, D	12809859

Tabelle 46: Verwendete Softwareprogramme

Software	Firma	Version
BioNumerics Software	Applied Maths NV, Sint-Martens- Latem, BEL	7.6.3
Geneious prime	Biomatters Limited, Auckland, NZL	2021.0.1
MALDI Biotyper UltrafleXtreme Compass	Bruker Daltonik GmbH, Bremen, D	1.4
MALDI Biotyper UltrafleXtreme Flex Control	Bruker Daltonik GmbH, Bremen, D	3.4
MALDI Biotyper compass Software	Bruker Daltonik GmbH, Bremen, D	4.1
MICRONAUT Software (MCN6)	MERLIN Diagnostika GmbH, Bornheim, D	6.00
Microsoft Office Professional Plus 2019	Microsoft Corporation, Redmond, USA	1808

Tabelle 47: Verwendete Chemikalien

Reagenz	Bezugsquelle	Artikel-Nummer
Acetonitril; ROTISOLV; > 99,95 %; LC-MS Grade	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D	AE70.2
Agarose (peqGOLD Universal, für Routine-Analysen)	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D	732-2789P
α-Cyano-4-Hydroxymethylsäure (HPLC > 99,0 %)	Merck KGaA, Darmstadt, D	70990-1G-F
Ameisensäure; puriss. p.a. ≥ 98 %	Sigma-Aldrich Chemie B.V., Zwijndrecht, NL	33015-1L-M
Amphotericin B (250 µg/ml)	Biochrom GmbH, Berlin, D	A2942

Tabelle 47: (Fortsetzung)

Reagenz	Bezugsquelle	Artikel-Nummer
Cefquinom-Sulfat	Carbosynth Holdings Limited, Berkshire, UK	32472-100MG
Ceftiofur-Hydrochlorid (VETRANAL®)	Sigma-Aldrich Chemie B.V., Zwijndrecht, NL	32422-100MG
Desoxyribonukleosidtriphos- phate (dNTP Mix, je 8 µmol)	New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main, D	N0447S
Dimethylsulfoxid (DMSO BioUltra; für Molekularbiologie, > 99.5 %)	Sigma-Aldrich Chemie B.V., Zwijndrecht, NL	41639-500ML
Dodecylsulfat Natriumsalz (SDS)-Pellets (≥ 99 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D	23262
Enrofloxacin (HPLC ≥ 98 %)	Sigma-Aldrich Chemie B.V., Zwijndrecht, NL	17849-5G-F
Ethanol (HPLC Gradient Grade 99,9 %) ROTISOLV®	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D	P076.1
Ethidiumbromidlösung 1 % (10 mg/ml)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D	2218.3
Ethylendiamintetraessigsäure (≥ 99 %)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D	11278
Gel Loading Dye, Purple (6X), no SDS	New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main, D	B7025S
GelRed (DNA Stain Clear G)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D	39804.01
Illustra™ puReTaq Ready-To-Go PCR Beads	GE Healthcare UK Limited, Bucking- hamshire, UK	27-9557-01
Mc Farland Standard, BSS, 0,5	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D	1307.1
Natriumacetat (≥ 99 %), p.a., ACS, wasserfrei	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D	6773.2
Natriumchlorid-Salz (≥ 99,5 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D	3957.1
Natriumhydroxid (NaOH) EMSURE®	Merck KGaA, Darmstadt, D	1064981000
PCR-Wasser (Nuclease free water)	New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main, D	J60610.XC
Phenol-Chloroform- Isoamylalkohol-Mischung (49,5:49,5:1)	Sigma-Aldrich Chemie B.V., Zwijndrecht, NL	77618
Phosphat-gepufferte Salzlösung, 10x, pH 7,4	Life Technologies GmbH, Eggenstein, D	12579099
Salzsäure, 2 mol/l	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D	T134.1

Tabelle 47: (Fortsetzung)

Reagenz	Bezugsquelle	Artikel-Nummer
Trifluoressigsäure UVASOL	Merck KGgA, Darmstadt, D	1.08262.0025
Tris (Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan, Pufferan®, ≥ 99 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D	4855.2
Tris Hydrochlorid, Pufferan® (≥ 99 %), p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D	9090.1
Tris-Borat-EDTA (TBE) Puffer; ROTIPHORESE® 10X	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D	3061.2
Nährmedium	Bezugsquelle	Artikel-Nummer
Luria-Bertani-Bouillon, modifiziert nach Miller	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D	X968.2
Müller-Hinton-Bouillon	Sigma-Aldrich Chemie B.V., Zwijndrecht, NL	70192
Wasserblau-Metachromgelb-Agar nach Gassner	SIFIN diagnostics GmbH, Berlin, D	TN1194
Marker	Bezugsquelle	Artikel-Nummer
Quick-Load 1 kb Extend DNA Ladder	New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main, D	N3239S
Quick-Load Purple 100 bp DNA Ladder	New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main, D	N0551S
Enzym	Bezugsquelle	Artikel-Nummer
HotStarTaq DNA Polymerase - Teil des HotStarTaq Master Mix	Qiagen, Hilden, D	203446
HotStarTaq DNA Polymerase - Teil des Qiagen Multiplex PCR Kits	Qiagen, Hilden, D	206143
OneTaq DNA Polymerase	New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main, D	M0480S
Phusion High Fidelity DNA Polymerase	New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main, D	M0530S
puReTaq DNA Polymerase - Enthalten in Illustra™ puReTaq Ready-To-Go PCR Beads	GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK	27-9557-01
Ribonuklease A	PanReac AppliChem, Darmstadt, D	A2760.0100

9.1.1 Verwendete Puffer und Lösungen**6x Gel loading buffer**

Xylene Cyanol FF	0,25 g
Ficoll	1,5 g
Aqua dest.	9,5 ml

Ethanol, 70 %ig

Ethanol, 99,9 %	70 ml
Aqua dest.	30 ml

Ethidiumbromid-Färbelösung

Ethidiumbromid	100 µl
Aqua dest.	ad 1 ml

Ameisensäure, 70 %ig

Ameisensäure, ≥ 98 %	700 µl
Aqua dest.	300 µl

Lysepuffer für Plasmidpräparation

SDS, 10 %ig	1,5 ml
Tris 250 mM (ungepuffert)	1 ml
NaOH 5N	0,75 ml
Aqua dest.	2,375 ml

**Matrix-Lösung zur Überschichtung der Probe am *steel target*
(MALDI-TOF MS Analyse)**

Acetonitril	50 µl
Trifluoressigsäure, 5 %	50 µl
α-Cyano-4-Hydroxymethylsäure	1 mg
(Lösung 5 min im Ultraschallbad homogenisieren, dann 2 – 5 min bei voller Drehzahl abzentrifugieren; Überstand zum Überschichten der Probe verwenden)	

NaCl-Lösung 0,9 %

Natriumchlorid	9 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

NaOH, 5N

NaOH	200 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

Natriumacetat, 3N

Natriumacetat	246 g
Salzsäure	ad pH 5,2
Aqua dest.	ad 1000 ml

PBS (1x)	
10x PBS	100 ml
Aqua dest.	ad 1000 ml
Salzsäure 0,1 N	
Salzsäure 2 N	50 ml
Aqua dest.	950 ml
SDS, 10 %ig	
SDS, $\geq 99\%$	100 g
Aqua dest.	900 ml
Salzsäure 0,1 N	ad pH 7,2
TBE-Puffer (1x)	
TBE (10x)	100 ml
Aqua dest.	ad 1000 ml
Tris-EDTA-Puffer	
Tris-Hydrochlorid	10 mM
EDTA	1 mM
Salzsäure	ad pH 7,5
Trifluoressigsäure, 5 %ig	
Trifluoressigsäure, $\geq 99\%$	50 μ l
Aqua dest.	950 μ l
Tris, 250 mM, ungepuffert	
Tris	3,03 g
Aqua dest.	ad 100 ml

9.1.2 Verwendete Oligonukleotid-*primer* sowie Standard- und Marker-*E. coli*-Stämme

Tabelle 48: Verwendete Oligonukleotid-*primer* zum Nachweis von Resistenzdeterminanten sowie für die MLVA- und Shigatoxin-(Sub-)Typisierung

PCR	<i>primer</i> Name	Sequenz (5' → 3')	Zielgen	Amplifikatgröße [bp]	Konz. ¹ [μM]	Referenz
<i>bla</i> _{TEM} -PCR	tem1-RKI445/08-for	ATG AGT ATT CAA CAT TTT CGT GTC G	<i>bla</i> _{TEM}	800	0,4	O. Makarewicz, UK Jena; persönliche Mitteilung (Dallenne <i>et al.</i> 2010)
	MultiTSO-T_rev	CGT TCA TCC ATA GTT GCC TGA C			0,4	
<i>floR</i> -PCR	<i>floR</i> -F	ATG GCA GGC GAT ATT CAT TA	<i>floR</i>	320	0,2	(Rahmani <i>et al.</i> 2013)
	<i>floR</i> -R	AAA CGG GTT GTC ACG ATC AT			0,2	
<i>gyrA-gyrB-parC</i> -Triplex-PCR	<i>gyrA</i> -EcFQR_F	GGT ACA CCG TCG CGT ACT TT	<i>gyrA</i>	331	0,4	(Johnning <i>et al.</i> 2015)
	<i>gyrA</i> -EcFQR_R	CAA CGA AAT CGA CCG TCT CT			0,4	
	<i>gyrB</i> -F	TGA AAT GAC CCG CCG TAA	<i>gyrB</i>	458	0,5	(Zhao <i>et al.</i> 2015)
	<i>gyrB</i> -R	GCT TGC CTT TCT TCA CTT TGT A			0,5	
	<i>parC</i> -FQRVila_F	AAA CCT GTT CAG CGC CGC ATT	<i>parC</i>	395	0,8	(Vila <i>et al.</i> 1996)
<i>parC</i> -FQRVila_R	GTG GTG CCG TTA AGC AAA			0,8		
LEC-LAMP-Multiplex-PCR	LB1	BHQ1-TCTGA(dSpacer)T(FAM-dT)GGT TAA CTA TAA TCC GAT TGC G	<i>bla</i> _{CTX-M-1}		0,4	O. Higgins, NUI Galway; persönliche Mitteilung
	LB15	BHQ1-TCTGA(dSpacer)C(HEX-dT)TGT TAA CTA TAA TCC GAT TGC G	<i>bla</i> _{CTX-M-15}		0,4	
	LF	CGG CCA TCA CTT TAC TGG TGC			0,4	
	FIP	GCT TTC ACT TTT CTT CAG CAC CGC-CGC TTT GCG ATG TGC AG			1,6	
	BIP	CCG AAT CTG TTA AAT CAG CGA GTT GAG A-GAC GTG CTT TTC CGC			1,6	
	B3	GCG CTA AGC TCA GCC AG			0,2	
	F3	GTG GCA TTG ATT AAC ACA GCA G			0,2	

¹Endkonzentration im Reaktionsansatz.

Tabelle 48: (Fortsetzung)

PCR	primer Name	Sequenz (5' → 3')	Zielgen	Amplifikatgröße [bp]	Konz. ¹ [μM]	Referenz
MLVA-Multiplex-PCR	ECMLV1-F	TCC CTG GAC AAA CCA GGA CTG	<i>rhaD</i>	162 – 1597	0,1	(Camelena <i>et al.</i> 2019)
	ECMLV1-R1	CGT GCG GAC TTA TGA GAA AG			0,1	
	ECMLV1-R2	CGT GCG GGC TTA TGA AAA AG			0,5	
	ECMLV2-F	GAA ACA GGC CCA GGC TAC AC	<i>rsxC</i>	575 – 869	0,05	
	ECMLV2-R	CTG GCG CTG GTT ATG GGT AT			0,05	
	ECMLV4-F	ACA ACC GGC TGG GGC GAA TCC	<i>ftsK</i>	413 – 539	0,05	
	ECMLV4-R	GTC AGC AAA TCC AGA GAA GGC A			0,05	
	ECMLV5-F	GCG GCG CTG AAG AAG AAA GC	<i>tolA</i>	375 – 438	0,05	
	ECMLV5-R	CTC CCG GCA GGC GAA GCA TTG T			0,05	
	ECMLV7-F	GTG AAG GAT AAG CTG CAT TTG TCA	<i>ytfL</i>	176 - 211	0,1	
ECMLV7-R	GCC TGA CGC TAA AGA TAA AGA AGA	0,1				
MLVA-Duplex-PCR	ECMLV3-F	TTC AGG AAA TGG ATA AAG TAG T	<i>tRNA-Arg</i>	616 - 1157	0,1	(Camelena <i>et al.</i> 2019)
	ECMLV3-R	GGG AGT ATG CGG TCA AAA GC			0,1	
	ECMLV6-F	CAA AGA GCA ATA ACA CTT TTA GCA	<i>hemY</i>	102 – 149	0,24	
	ECMLV6-R	GCA GCA GGG ACA ACG GAA GCT AA			0,24	
<i>parE-acrR-marR</i> -Triplex-PCR	parEF853*	GAC CGA AAG CTA CGT CAA CC	<i>parE</i>	958	0,2	(Komp Lindgren <i>et al.</i> 2003)
	parER1810	GTT CGG ATC AAG CGT GGT TT			0,2	
	MarORF1139*	GCC AGG CCA AGA AAT AAC GC	<i>marR</i>	872	0,2	
	MarORR2011	GAG TAA CCC GAA CGC TCT GA			0,2	
	AcrR8900F	ACT GTT ACT ACG CCA ACG	<i>acrR</i>	1034	0,6	
	AcrR9934R	CTG AAC CTG AAG AAC GAC CTG			0,6	

¹Endkonzentration im Reaktionsansatz.

Tabelle 48: (Fortsetzung)

PCR	primer Name	Sequenz (5' → 3')	Zielgen	Amplifikatgröße [bp]	Konz. ¹ [μM]	Referenz
PMQR2-Triplex-PCR	aac(6')-Ib-cr-F	TTG GAA GCG GGG ACG GAM	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	260	0,6	(Ciesielczuk <i>et al.</i> 2013)
	aac(6')-Ib-cr-R	ACA CGG CTG GAC CAT A				
	qepA-F	GCA GGT CCA GCA GCG GGT AG	<i>qepA</i>	218	0,6	
	qepA-R	CTT CCT GCC CGA GTA TCG TG				
	oqxAB-F	CCG CAC CGA TAA ATT AGT CC	<i>oqxAB</i>	313	0,6	
	oqxAB-R	GGC GAG GTT TTG ATA GTG GA				
<i>qnr</i> -Multiplex-PCR	Qnr-Sm-F	GCA AGT TCA TTG AAC AGG GT	<i>qnrS</i>	428	0,1	(Kraychete <i>et al.</i> 2016)
	Qnr-Sm-R	TCT AAA CCG TCG AGT TCG GCG				
	Qnr-Am-F	AGA GGA TTT CTC ACG CCA GG	<i>qnrA</i>	580	0,1	
	Qnr-Am-R	TGC CAG GCA CAG ATC TTG AC				
	Qnr-Dm-F	AGG TGT AGC ATG TAT GGA AAA GC	<i>qnrD</i>	691	0,1	
	Qnr-Dm-R	ACA TTG GGG CAT TAG GCG TT				
<i>qnrB</i> -PCR	Qnr-Bm-F	GGM ATH GAA ATT CGC CAC TG	<i>qnrB</i>	264	0,14	
	Qnr-Bm-R	TTT GCY GYY CGC CAG TCG AA				
<i>stx1-stx2</i> -Duplex-PCR	MP4-stx1A-F	CGA TGT TAC GGT TTG TTA CTG TGA CAG C	<i>stx1</i>	224	0,1	(Müller <i>et al.</i> 2007)
	MP4-stx1A-R	AAT GCC ACG CTT CCC AGA ATT G				
	MP3-stx2A-F	GTT TTG ACC ATC TTC GTC TGA TTA TTG AC	<i>stx2</i>	324	0,1	
	MP3-stx2A-R	AGC GTA AGG CTT CTG CTG TGA C				

¹Endkonzentration im Reaktionsansatz.

Tabelle 48: (Fortsetzung)

PCR	primer Name	Sequenz (5' → 3')	Zielgen	Amplifikatgröße [bp]	Konz. ¹ [μM]	Referenz	
stx2-Subtypisierungs-PCRs	stx2a-F2	GCG ATA CTG RGB ACT GTG GCC	<i>stx2a</i>	347	0,5	(Scheutz <i>et al.</i> 2012)	
	stx2a-R2	GCC ACC TTC ACT GTG AAT GTG			0,5		
	stx2b-F1	AAA TAT GAA GAA GAT ATT TGT AGC GGC	<i>stx2b</i>	251	0,31		
	stx2b-R1	CAG CAA ATC CTG AAC CTG ACG			0,31		
	stx2c-F1	GAA AGT CAC AGT TTT TAT ATA CAA CGG GTA	<i>stx2c</i>	177	0,31		
	stx2c-R2	CCG GCC ACY TTT ACT GTG AAT GTA			0,31		
	stx2d-F1	AAA RTC ACA GTC TTT ATA TAC AAC GGG TG	<i>stx2d</i>		0,25		
	stx2d-R1	TTY CCG GCC ACT TTT ACT GTG			179 ²		0,25
	stx2d-O55-R	TCA ACC GAG CAC TTT GCA GTA G			235 ²		0,25
	stx2d-R2	GCC TGA TGC ACA GGT ACT GGA C			280 ²		0,25
	stx2e-F1	CGG AGT ATC GGG GAG AGG C	<i>stx2e</i>	411	0,31		
	stx2e-R2	CTT CCT GAC ACC TTC ACA GTA AAG GT			0,31		
	stx2f-F1	TGG GCG TCA TTC ACT GGT TG	<i>stx2f</i>	424	0,31		
	stx2f-R1	TAA TGG CCG CCC TGT CTC C			0,31		
stx2g-F1	CAC CGG GTA GTT ATA TTT CTG TGG ATA TC	<i>stx2g</i>	573	0,31			
stx2g-R1	GAT GGC AAT TCA GAA TAA CCG CT			0,31			

¹Endkonzentration im Reaktionsansatz;

²Amplifikatgröße je nach *reverse-primer*.

Tabelle 49: Standard- und Marker-*E. coli*-Stämme

Eigene Nummer	Original-Nr. bzw. -Bezeichnung	Herkunft	Kontrolle für den Nachweis von / relevante Eigenschaft
13E0926	EDL 933	Stammsammlung FLI Jena (IMP), D	PK ¹ für die <i>stx1-stx2</i> -Duplex-PCR (<i>stx1</i> - & <i>stx2</i> -positiv)
16E0043	13-05358	RKI Wernigerode, D	PK für die <i>stx2</i> -Subtypisierungs-PCR (<i>stx2a</i> -positiv)
13E0931	EH250	Lutz Geue, FLI Jena (IMP), D (ursprünglich Prof. Dr. Helge Karch, Institut für Hygiene des Universitätsklinikums Münster – Medizinische Fakultät, WWU Münster, D)	PK für die <i>stx2</i> -Subtypisierungs-PCR (<i>stx2b</i> -positiv)
13E0930	E32511/HSC	Lutz Geue, FLI Jena (IMP), D (ursprünglich Prof. Dr. Helge Karch, Institut für Hygiene des Universitätsklinikums Münster – Medizinische Fakultät, WWU Münster, D)	PK für die <i>stx2</i> -Subtypisierungs-PCR (<i>stx2c</i> -positiv)
13E0932	B2F1	Lutz Geue, FLI Jena (IMP), D (ursprünglich Prof. Dr. Helge Karch, Institut für Hygiene des Universitätsklinikums Münster – Medizinische Fakultät, WWU Münster, D)	PK für die <i>stx2</i> -Subtypisierungs-PCR (<i>stx2d</i> -positiv)
13E0933	2771/97	Lutz Geue, FLI Jena (IMP), D (ursprünglich Prof. Dr. Helge Karch, Institut für Hygiene des Universitätsklinikums Münster – Medizinische Fakultät, WWU Münster, D)	PK für die <i>stx2</i> -Subtypisierungs-PCR (<i>stx2e</i> -positiv)
13E0934	T4/97	Lutz Geue, FLI Jena (IMP), D (ursprünglich Prof. Dr. Helge Karch, Institut für Hygiene des Universitätsklinikums Münster – Medizinische Fakultät, WWU Münster, D)	PK für die <i>stx2</i> -Subtypisierungs-PCR (<i>stx2f</i> -positiv)
13E0935	7V	Lutz Geue, FLI Jena (IMP), D (ursprünglich Prof. Dr. Helge Karch, Institut für Hygiene des Universitätsklinikums Münster – Medizinische Fakultät, WWU Münster, D)	PK für die <i>stx2</i> -Subtypisierungs-PCR (<i>stx2g</i> -positiv)
19E0343	MG1655	Stammsammlung, LS Mikrobiologie, FAU Erlangen-Nürnberg, D (ursprünglich CGSC Nr. 7740; Blattner <i>et al.</i> 1997)	PK für die MLVA-PCR; Plasmid-freier Stamm in den Plasmidgelen
18E0045	–	Marta Ferrandis-Vila: paper in press (doi: 10.1186/s12866-022-02508-y) / OUCRU, UK und VN	PK für die <i>bla</i> _{TEM} -PCR; PK für die PMQR2-Triplex-PCR (<i>aac(6')</i> - <i>Ib-cr</i> -positiv)

¹PK = Positivkontrolle.

Tabelle 49: (Fortsetzung)

Eigene Nummer	Original-Nr. bzw. -Bezeichnung	Herkunft	Kontrolle für den Nachweis von / relevante Eigenschaft
18E0131	IMT28138	Marta Ferrandis-Vila: paper in press (doi: 10.1186/s12866-022-02508-y) / FU Berlin, Zentrum für Infektionsmedizin des Instituts für Mikrobiologie und Tierseuchen, D	PK ¹ für die <i>qnr</i> -Multiplex-PCR (<i>qnrS</i> -positiv)
20E0101	21ZN-0154-2	Marta Ferrandis-Vila: paper in press (doi: 10.1186/s12866-022-02508-y)	PK für die <i>qnrB</i> -PCR
20E0071	–	Nicola Pfeifer FLI Jena (IMP), D – eigener Stamm nach WGS ²	PK für die <i>floR</i> -PCR
20E0316	ATCC 25922	Leibniz Institut, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, D – No. 1103	Referenzstamm für die Resistenz-Testung mittels Bouillon-Mikrodilutionsmethode; Wachstumskontrolle auf mit Amphotericin B-versetztem Agar
14E1561	V517	IHIT, Justus-Liebig-Universität Gießen, D	Referenzstamm Plasmidpräparation (54 kb, 5,6 kb, 5,1 kb, 3,9 kb, 3,0 kb, 2,7 kb, 2,1 kb)
14E1559	R478	IHIT, Justus-Liebig-Universität Gießen, D	Referenzstamm Plasmidpräparation (240 kb)
14E1558	R27	IHIT, Justus-Liebig-Universität Gießen, D	Referenzstamm Plasmidpräparation (170 kb)
18E0127	–	Marta Ferrandis-Vila FLI Jena (IMP), D	Referenzstamm Plasmidpräparation (108 kb, 36 kb, 25 kb)

¹PK = Positivkontrolle;

²WGS = *whole genome sequencing* = Vollgenomsequenzierung.

9.2 Fragebögen

9.2.1 Absetzerferkel-Fragebogen

Fragebogen Antibiotikaresistenzen Schweinehaltung

- Absetzerferkel -

- 1.) Wie viele Absetzerferkel sind zum Zeitpunkt der Beprobung in den beprobten Buchten?
- 2.) Wie viele Altersgruppen sind zum Zeitpunkt der Beprobung in den beprobten Buchten?
- 3.) An welchem Datum wurden die beprobten Tiere geboren?
- 4.) Wurden Saugferkel von anderen Sauen zur beprobten Tiergruppe umgesetzt?
 - Nein
 - Ja
 - Warum?
 - Am wievielten Tag nach der Geburt?
 - Wurden sie davor antibiotisch behandelt?
 - Nein
 - Ja
- 5.) Wurden die beprobten Tiere seit der Geburt umgestallt?
 - Nein
 - Ja
 - Warum?
- 6.) Wurde der Abferkelstall per „Rein-Raus-Verfahren“ eingestallt?
 - Nein
 - Ja,
 - Abteil Rein-Raus
 - Stall Rein-Raus
 - Anders:
- 7.) Wurde vor dem Einstallen der Sauen der Abferkelstall gereinigt und desinfiziert?
 - Nein
 - Ja, wie im Desinfektionsplan festgehalten (falls dieser uns vorliegt)
 - Anders:
- 8.) Wurden die Muttersauen der beprobten Ferkel vor dem Umstallen in den Abferkelstall gewaschen?
 - Nein
 - Ja

- 9.) Hat sich bei sonstigen Abläufen, die die Entmistung, Reinigung und Desinfektion betreffen, etwas im Verhältnis zu Ihren Angaben im allgemeinen Fragebogen geändert?
- 10.) Welche Temperatur herrscht zum Zeitpunkt der Beprobung bei den Absetzerferkeln?
- 11.) Wie hoch war das durchschnittliche Geburtsgewicht der beprobten Ferkel?
- 12.) Wurde die Kolostrumaufnahme der beprobten Ferkel in der ersten Stunde nach ihrer Geburt kontrolliert?
- Nein
 - Ja
 - Kolostrumaufnahme aller Ferkel war ausreichend
 - Einzelne Ferkel haben nicht genügend Kolostrum aufgenommen
 - Viele Ferkel haben nicht genügend Kolostrum aufgenommen
 - Kein Ferkel hat genügend Kolostrum aufgenommen
- 13.) Ab welchem Tag nach der Geburt haben die beprobten Saugferkel angefangen, festes Futter zu fressen?
- 14.) Welche Futter(stoffe) wurden bis zum Absetzen gefüttert und wie lange jeweils?
- 15.) Wie hoch ist die Tageszunahme der Absetzerferkel zum Zeitpunkt der Beprobung?
- 16.) Wurden die beprobten Saugferkel mit Milchersatz / mit zusätzlichen Nährstoffen zugefüttert?
- Nein
 - Ja, mit:
- 17.) Gab es Komplikationen bei der Geburt der beprobten Ferkel?
- Nein
 - Ja, folgende Probleme sind aufgetreten:
- 18.) Gab es bei den beprobten Ferkeln gesundheitliche Besonderheiten oder Auffälligkeiten?
- Nein
 - Ja, folgende Auffälligkeiten:
- 19.) Gibt es derzeit Kümmerer bei den beprobten Tieren?
- Nein
 - Ja
 - Wie viele Tiere?
 - Wie zeigt sich dies?
 - Wie viele Tage schon?

20.) Gab es Verluste in der beprobten Gruppe seit der Geburt?

- Nein
- Ja
 - Wie viele?
 - Vermutete Krankheitsursache?
 - Todeshergang
 - Nottötung
 - Tier ist verstorben

21.) Haben die untersuchten Tiere seit der Geburt ein Antibiotikum verabreicht bekommen?

- Nein
- Ja
 - Alle
 - Einzeltiere: Wie viele Tiere?
- Falls ja:
 - a. Welcher Wirkstoff? (Bitte Abgabebeleg anhängen)
 - b. In welcher Dosierung?
 - c. Was war der Grund für die Behandlung?
 - d. Wie wurde das Antibiotikum verabreicht?
 - Über das Futter
 - Über das Tränkwasser
 - Per Injektion
 - Lokal
 - e. Wie oft wurde das Antibiotikum verabreicht?
 - f. Wie lange wurde das Antibiotikum verabreicht
 - g. Wurde vor / während dem Einsatz des Antibiotikums eine bakteriologische Untersuchung mit / ohne Resistenztest durchgeführt?
 - Nein
 - Ja,
 - bakteriologische Untersuchung ohne Resistenztest
 - bakteriologische Untersuchung mit Resistenztest
 - Antibiose wurde erst nach den Ergebnissen des Resistenztests begonnen
 - h. Was ist das Datum der letzten Verabreichung?

22.) Wurden die untersuchten Tiere seit der Geburt mit anderen Medikamenten behandelt?

- Nein
- Ja
 - Alle
 - Einzeltiere: Wie viele Tiere?

- Falls ja:
 - a. Welcher Wirkstoff? (Bitte Abgabebeleg anhängen)
 - b. In welcher Dosierung?
 - c. Was war der Grund für die Behandlung?
 - d. Wie wurde das Medikament verabreicht?
 - Über das Futter
 - Über das Tränkwasser
 - Per Injektion
 - Lokal
 - e. Wie oft wurde das Medikament verabreicht?
 - f. Wie lange wurde das Medikament verabreicht?
 - g. Was ist das Datum der letzten Verabreichung?

23.) Wurden die Muttersauen, von denen die beprobten Ferkel stammen, während der Tragezeit mit Antibiotika behandelt?

- Nein
- Ja
- Falls ja:
 - a. Welcher Wirkstoff? (Bitte Abgabebeleg anhängen)
 - b. In welcher Dosierung?
 - c. Was war der Grund für die Behandlung?
 - d. Wie wurde das Antibiotikum verabreicht?
 - Über das Futter
 - Über das Tränkwasser
 - Per Injektion
 - Lokal
 - e. Wie oft wurde das Antibiotikum verabreicht?
 - f. Wie lange wurde das Antibiotikum verabreicht?
 - g. Wurde vor / während dem Einsatz des Antibiotikums eine bakteriologische Untersuchung mit / ohne Resistenztest durchgeführt?
 - Nein
 - Ja,
 - bakteriologische Untersuchung ohne Resistenztest
 - bakteriologische Untersuchung mit Resistenztest
 - Antibiose wurde erst nach den Ergebnissen des Resistenztests begonnen
 - Bitte Ergebnis an diesen Fragebogen anheften
 - h. Was ist das Datum der letzten Verabreichung?

24.) Wie häufig wurden die beprobten Saugferkel seit der Geburt behandelt (Eisenversorgung, Impfung, Kastration, Ohrmarke einziehen, ...)? Merke: Werden mehrere Praktiken kombiniert (zum Beispiel Kastration und Ohrmarke einziehen), so soll dies hier als eine Behandlung zählen.

25.) Anmerkungen:

9.2.2 Läufer Schwein / *flatdeck*-Fragebogen

Fragebogen Antibiotikaresistenzen Schweinehaltung

- Läufer Schwein / *flatdeck* -

- 1.) Wie viele Tiere sind zum Zeitpunkt der Beprobung in den beprobten Buchten?
- 2.) Wie viele Altersgruppen sind zum Zeitpunkt der Beprobung in den beprobten Buchten?
- 3.) An welchem Datum wurden die beprobten Tiere geboren?
- 4.) Wann wurden die beprobten Tiere in den Aufzuchtstall eingestallt / umgestallt?
- 5.) Wurde das Flatdeck per „Rein-Raus-Verfahren“ eingestallt?
 - Nein
 - Ja,
 - Abteil Rein-Raus
 - Stall Rein-Raus
 - Anders:
- 6.) Wurde das Flatdeck davor gereinigt und desinfiziert?
 - Nein
 - Ja, wie im Desinfektionsplan festgehalten (falls dieser uns vorliegt)
 - Anders:
- 7.) Hat sich bei sonstigen Abläufen, die die Entmistung, Reinigung und Desinfektion betreffen, etwas im Verhältnis zu Ihren Angaben im allgemeinen Fragebogen geändert?
- 8.) Wurden die Tiere während der Flatdeck-Phase umgestallt?
 - Nein
 - Ja
 - Warum?
- 9.) Wurden einzelne Tiere während der Flatdeck-Phase zur beprobten Tiergruppe umgesetzt?
 - Nein
 - Ja
 - Warum?
- 10.) Welche Temperatur herrscht zum Zeitpunkt der Beprobung auf dem Flatdeck?
- 11.) Welche Futter(stoffe) wurden in der Aufzuchtphase gefüttert und wie lange jeweils?
- 12.) Wie hoch ist die Tageszunahme zum Zeitpunkt der Beprobung?

13.) Waren die Tiere seit ihrer Einstallung auf dem Flatdeck schwach / krank?

14.) Gibt es derzeit Kümmerer bei den beprobten Tieren?

- Nein
- Ja
 - Wie viele Tiere?
 - Wie zeigt sich dies?
 - Wie viele Tage schon?

15.) Gab es Verluste in der beprobten Gruppe seit der Einstallung auf dem Flatdeck?

- Nein
- Ja
 - Wie viele?
 - Vermutete Krankheitsursache?
 - Todeshergang
 - Nottötung
 - Tier ist verstorben

16.) Haben die untersuchten Tiere auf dem Flatdeck ein Antibiotikum verabreicht bekommen?

- Nein
 - Ja
 - Alle
 - Einzeltiere: Wie viele Tiere?
- Falls ja:
- a. Welcher Wirkstoff? (Bitte Abgabebeleg anhängen)
 - b. In welcher Dosierung?
 - c. Was war der Grund für die Behandlung?
 - d. Wie wurde das Antibiotikum verabreicht?
 - Über das Futter
 - Über das Tränkwasser
 - Per Injektion
 - Lokal
 - e. Wie oft wurde das Antibiotikum verabreicht?
 - f. Wie lange wurde das Antibiotikum verabreicht?
 - g. Wurde vor / während dem Einsatz des Antibiotikums eine bakteriologische Untersuchung mit / ohne Resistenztest durchgeführt?
 - Nein
 - Ja,
 - bakteriologische Untersuchung ohne Resistenztest
 - bakteriologische Untersuchung mit Resistenztest
 - Antibiose wurde erst nach den Ergebnissen des Resistenztests begonnen
 - h. Was ist das Datum der letzten Verabreichung?

17.) Wurden die untersuchten Tiere auf dem Flatdeck mit anderen Medikamenten behandelt?

- Nein
- Ja
 - Alle
 - Einzeltiere: Wie viele Tiere?

➤ Falls ja:

- a. Welcher Wirkstoff? (Bitte Abgabebeleg anhängen)
- b. In welcher Dosierung?
- c. Was war der Grund für die Behandlung?
- d. Wie wurde das Medikament verabreicht?
 - Über das Futter
 - Über das Tränkwasser
 - Per Injektion
 - Lokal
- e. Wie oft wurde das Medikament verabreicht?
- f. Wie lange wurde das Medikament verabreicht?
- g. Was ist das Datum der letzten Verabreichung?

18.) Wurden die untersuchten Tiere vor dem Absetzen mit Antibiotika behandelt?

- Nein
- Ja
 - Warum?

19.) Gab es sonstige Auffälligkeiten bezüglich der Gesundheit der Tiere?
(Verlustrate höher als normal, geringere Tageszunahme, ...)

20.) Anmerkungen:

9.2.3 Mastschwein-Fragebogen

Fragebogen Antibiotikaresistenzen Schweinehaltung

- Mastschwein -

- 1.) Wie viele Tiere sind zum Zeitpunkt der Beprobung in den beprobten Buchten?
- 2.) Wie viele Altersgruppen sind zum Zeitpunkt der Beprobung in den beprobten Buchten?
- 3.) An welchem Datum wurden die beprobten Tiere geboren?
- 4.) Wann wurden die beprobten Tiere in den Maststall eingestallt / umgestallt?
- 5.) Wurde der Maststall per „Rein-Raus-Verfahren“ eingestallt?
 - Nein
 - Ja,
 - Abteil Rein-Raus
 - Stall Rein-Raus
 - Anders:
- 6.) Wurde der Maststall davor gereinigt und desinfiziert?
 - Nein
 - Ja, wie im Desinfektionsplan festgehalten (falls dieser uns vorliegt)
 - Anders:
- 7.) Hat sich bei sonstigen Abläufen, die die Entmistung, Reinigung und Desinfektion betreffen, etwas im Verhältnis zu Ihren Angaben im allgemeinen Fragebogen geändert?
- 8.) Wurden die Tiere während der Mast-Phase umgestallt?
 - Nein
 - Ja
 - Warum?
- 9.) Wurden einzelne Tiere während der Mast-Phase zur beprobten Tiergruppe umgesetzt?
 - Nein
 - Ja
 - Warum?
- 10.) Welche Temperatur herrscht zum Zeitpunkt der Beprobung im Maststall?
- 11.) Welche Futter(stoffe) wurden in der Mastphase gefüttert und wie lange jeweils?
- 12.) Wie hoch ist die Tageszunahme zum Zeitpunkt der Beprobung?

13.) Waren die Tiere seit ihrer Einstallung im Maststall schwach / krank?

14.) Gibt es derzeit Kümmerer bei den beprobten Tieren?

- Nein
- Ja
 - Wie viele Tiere?
 - Wie zeigt sich dies?
 - Wie viele Tage schon?

15.) Gab es Verluste in der beprobten Gruppe seit der Einstallung im Maststall?

- Nein
- Ja
 - Wie viele?
 - Vermutete Krankheitsursache?
 - Todeshergang
 - Nottötung
 - Tier ist verstorben

16.) Haben die untersuchten Tiere seit dem Eintritt in die Mastphase ein Antibiotikum verabreicht bekommen?

- Nein
 - Ja
 - Alle
 - Einzeltiere: Wie viele Tiere?
- Falls ja:
- a. Welcher Wirkstoff? (Bitte Abgabebeleg anhängen)
 - b. In welcher Dosierung?
 - c. Was war der Grund für die Behandlung?
 - d. Wie wurde das Antibiotikum verabreicht?
 - Über das Futter
 - Über das Tränkwasser
 - Per Injektion
 - Lokal
 - e. Wie oft wurde das Antibiotikum verabreicht?
 - f. Wie lange wurde das Antibiotikum verabreicht?
 - g. Wurde vor / während dem Einsatz des Antibiotikums eine bakteriologische Untersuchung mit / ohne Resistenztest durchgeführt?
 - Nein
 - Ja,
 - bakteriologische Untersuchung ohne Resistenztest
 - bakteriologische Untersuchung mit Resistenztest
 - Antibiose wurde erst nach den Ergebnissen des Resistenztests begonnen
 - h. Was ist das Datum der letzten Verabreichung?

17.) Wurden die untersuchten Tiere seit dem Eintritt in die Mastphase mit anderen Medikamenten behandelt?

- Nein
- Ja
 - Alle
 - Einzeltiere: Wie viele Tiere?

➤ Falls ja:

- a. Welcher Wirkstoff? (Bitte Abgabebeleg anhängen)
- b. In welcher Dosierung?
- c. Was war der Grund für die Behandlung?
- d. Wie wurde das Medikament verabreicht?
 - Über das Futter
 - Über das Tränkwasser
 - Per Injektion
 - Lokal
 - Anders:
- e. Wie oft wurde das Medikament verabreicht?
- f. Wie lange wurde das Medikament verabreicht?
- g. Was ist das Datum der letzten Verabreichung?

18.) Gab es sonstige Auffälligkeiten bezüglich der Gesundheit der Tiere?
(Verlustrate höher als normal, geringere Tageszunahme, ...)

19.) Anmerkungen:

9.3 RNA-Banden in Plasmidgelen

In vielen Gelen zur Darstellung kleiner Plasmide war im Bereich von 1 – 1,5 kb sowie 1,5 – 2 kb jeweils eine unspezifische, leicht diffuse Bande zu sehen (Abb. 97 – links). Um der Vermutung nachzugehen, dass es sich um Banden mit 16S und 23S ribosomaler RNA handelte und nicht um kleine Plasmide, und um eine Verunreinigung auszuschließen, wurde eine Plasmid-Präparation des plasmidlosen *E. coli*-Stammes MG1655 durchgeführt.

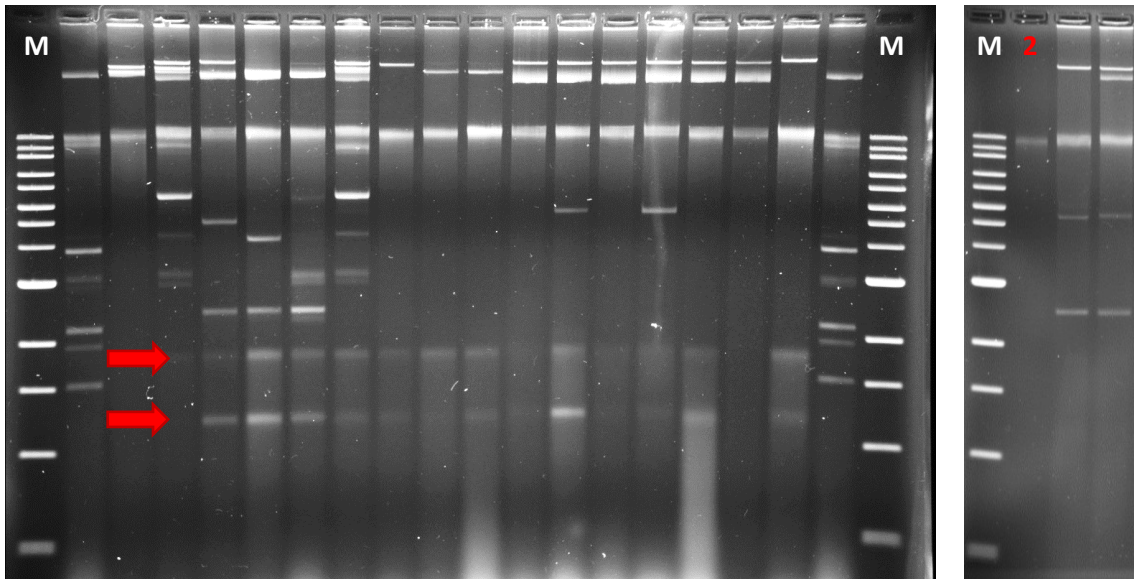


Abb. 97: Gel zur Darstellung kleiner Plasmide mit RNA-Banden (links) und mit dem mit RNase behandelten MG1655 (rechts)

M = Quick-Load 1 kb Extend DNA Ladder; rote Pfeile = RNA-Banden; rote 2 = Spur 2 – MG1655 nach alkoholischer Fällung und anschließender Behandlung mit RNase.

Durch eine alkoholische Fällung des Präparats wurden die im Tris-EDTA-Puffer verbliebenen Phenol-Chloroform-Reste entfernt, die eine RNase-Behandlung behindern könnten. Dazu wurden circa 90 µl der Plasmid-DNA des Stammes in einem 1,5 ml *safelock* Reaktionsgefäß mit 3-molarem Natriumacetat auf einen Natriumacetat-Gehalt von 0,3 M (mol/l) eingestellt und durch kräftiges Stürzen durchmischt. Das 2,5-fache Volumen an zuvor auf -20 °C gekühltem 99 %igen Ethanol wurde zugegeben und der Ansatz nach erneutem Mischen eine Stunde bei -20 °C inkubiert. Anschließend wurde das Alkoholgemisch bei 4 °C und maximaler Geschwindigkeit 45 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Daraufhin folgte ein weiterer Waschschriff mit 1 ml 70 %igem Ethanol und Zentrifugieren bei 4 °C für 20 min. Das Pellet wurde für 10 min mit offenem Deckel in einem Heizblock bei 65 °C getrocknet. Die aufgereinigten Nukleinsäuren

wurden in circa 20 µl Tris-EDTA-Puffer gelöst. Um die noch vorhandene RNA zu entfernen, wurde die Lösung mit RNase auf eine Konzentration von 10 µg/ml eingestellt, die Enzymreaktion eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und der Reaktionsansatz bis zum Auftragen auf das Plasmidgel bei -20 °C gelagert. Beim Beladen des Gels (Abb. 97 – rechts, Spur 2) wurde mit der aufgereinigten Plasmid-DNA von MG1655 wie in 3.7.2 erklärt verfahren.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Auswertungsschema der Primärplatten.....	34
Abb. 2:	Bearbeitungsschema der Sammelkotproben bis zur Bakterienpool-Kryopräservierung.....	36
Abb. 3:	Schema zur Isolierung der <i>E. coli</i> -Stämme aus den BP-Kryopräservaten.....	38
Abb. 4:	Belegung der MICRONAUT-S Großtier Platte zur Antibiotika-Suszeptibilitätstestung mittels Bouillon-Mikrodilution.....	53
Abb. 5:	Layout der 96-Loch Mikrotiterplatte zur Empfindlichkeitstestung gegenüber Cefquinom mittels Bouillon-Mikrodilution.....	54
Abb. 6:	Übersicht über die Beprobung im Stallgebäude von Betrieb B1	69
Abb. 7:	Übersicht über die Beprobung in den Stallgebäuden von Betrieb B2.....	73
Abb. 8:	Übersicht über die Beprobung der Abferkelabteile von Betrieb K1	77
Abb. 9:	Übersicht über die Beprobung in den Stallgebäuden von Betrieb K2.....	81
Abb. 10:	Anzahl der Selektivplatten mit Wachstum pro Selektivplattenart	84
Abb. 11:	Anzahl der Selektivplatten mit Wachstum pro Betrieb.....	84
Abb. 12:	Anteil der Selektivplatten mit Wachstum pro Altersstufe	85
Abb. 13:	Korrelationsdiagramm der (Mittelwerte der) Anzahl koloniebildender Einheiten pro Primärplatte von den Original- bzw. Rückstellproben	86
Abb. 14:	Anteil Cephalosporin- / Fluorchinolon-resistenter Gammaproteobakterien an allen Gammaproteobakterien je Altersstufe	87
Abb. 15:	Anteil Cephalosporin- / Fluorchinolon-resistenter Gammaproteobakterien an allen Gammaproteobakterien je Altersstufe und Betrieb	88
Abb. 16:	Mittelwerte der Quotientenwerte pro Selektivplatte und Altersstufe.....	89
Abb. 17:	Mittelwerte der Quotientenwerte pro Selektivplatte und Betrieb	90
Abb. 18:	Aufbau der <i>heatmaps</i> von Betrieb B1 über alle Beprobungen.....	91
Abb. 19:	Quotientenwerte der GE4-, GF- und GQ-Platten aller Kotproben von Betrieb B1 vergleichend zwischen den Plattenarten	91
Abb. 20:	Aufbau der <i>heatmaps</i> von Betrieb B2 über alle Beprobungen.....	92
Abb. 21:	Quotientenwerte der GE4-, GF- und GQ-Platten aller Kotproben von Betrieb B2 vergleichend zwischen den Plattenarten	93
Abb. 22:	Quotientenwerte der GE4-, GF- und GQ-Platten aller Kotproben von Betrieb K1 vergleichend zwischen den Plattenarten	94
Abb. 23:	Aufbau der <i>heatmaps</i> von Betrieb K2 über alle Beprobungen.....	94
Abb. 24:	Quotientenwerte der GE4-, GF- und GQ-Platten aller Kotprobe von Betrieb K2 vergleichend zwischen den Plattenarten	95
Abb. 25:	Quotientenwerte der GE4-, GF- und GQ-Platten aller Kotproben von Betrieb B1 vergleichend zwischen den Mastdurchgängen.....	95
Abb. 26:	Quotientenwerte der GE4-, GF- und GQ-Platten aller Kotproben von Betrieb K1 vergleichend zwischen den Abteilen.....	96
Abb. 27:	Quotientenwerte der GE4-, GF- und GQ-Platten aller Kotproben von Betrieb K2 vergleichend zwischen den Mastdurchgängen.....	97
Abb. 28:	Flussdiagramm der qualitativen Analyse der CSR / FQR <i>E. coli</i> -Stämme	98

Abb. 29:	Auswahl der Sammelkotproben für die Isolierung von Cephalosporin- / Fluorchinolon-resistenten <i>E. coli</i> -Stämmen aus Betrieb K1	99
Abb. 30:	Flussdiagramm zur Auswahl der Bakterienpools (BP) für die qualitative Bearbeitung	100
Abb. 31:	MLVA-Multiplex-Gelbild (oben) und MLVA-Duplex-Gelbild (unten).....	101
Abb. 32:	Phylogeniebaum aller 393 CSRE / FQRE basierend auf ihrem MLVA-Profil	103
Abb. 33:	Stämme mit demselben MLVA-Profil aus einer SKP sowie aus einem BP.....	104
Abb. 34:	Beispiele für Tiergruppen-persistente MLVA-Profile	105
Abb. 35:	Beispiele für Betriebs-persistente MLVA-Profile	106
Abb. 36:	Beispiel für ein Betriebs-persistentes MLVA-Profil aus Betrieb K1.....	106
Abb. 37:	Beispiele für sporadisch auftretende MLVA-Profile.....	107
Abb. 38:	Beispiele für auf mehreren Betrieben detektierte MLVA-Profile	108
Abb. 39:	Stämme mit einem auf allen vier Betrieben detektierten MLVA-Profil	108
Abb. 40:	Beispiele für altersassoziierte MLVA-Profile.....	109
Abb. 41:	Anteil Cephalosporin- und/oder Fluorchinolon-resistenter <i>E. coli</i> -Stämme an allen Stämmen pro Betrieb	110
Abb. 42:	Anteil suszeptibler, intermediärer und resistenter <i>E. coli</i> -Stämme für jedes getestete Antibiotikum.....	112
Abb. 43:	Vergleich des Anteils an Wildtyp-Stämmen nach ECOFF mit dem Anteil suszeptibler Stämme nach klinischem Grenzwert pro Antibiotikum.....	113
Abb. 44:	Vergleich des Anteils suszeptibler, intermediärer und resistenter <i>E. coli</i> -Stämme zwischen Absetzer- und Endmastproben pro Antibiotikum	115
Abb. 45:	Entwicklung des Anteils suszeptibler Stämme über die Lebensspanne der beprobten Tiere für ausgewählte Antibiotika	117
Abb. 46:	Vergleich des Anteils suszeptibler, intermediärer und resistenter Stämme in den Absetzerproben unter Einbeziehung und unter Ausschluss der Stämme von Betrieb K1	118
Abb. 47:	Anteil suszeptibler, intermediärer und resistenter Stämme pro EMA-Kategorie D-Antibiotikum für jeden Betrieb	119
Abb. 48:	Anteil suszeptibler, intermediärer und resistenter Stämme pro EMA-Kategorie C-Antibiotikum für jeden Betrieb	120
Abb. 49:	Anteil suszeptibler, intermediärer und resistenter Stämme pro EMA-Kategorie B-Antibiotikum für jeden Betrieb	121
Abb. 50:	Metrische multidimensionale Skalierung der phänotypischen Antibiotikaresistenz-Profile aller 393 <i>E. coli</i> -Stämme	122
Abb. 51:	Anteil an Stämmen pro MDR-Grad für jeden Betrieb als gruppierte Säulen (oben) und als gestapelte Säulen (unten)	123
Abb. 52:	Anteil an Stämmen pro MDR-Grad für jede Altersstufe.....	124
Abb. 53:	Anzahl suszeptibler oder intermediärer Nicht-Wildtyp-Stämme	126
Abb. 54:	Anteil resistenter Stämme an allen Stämmen mit FQ- bzw. CS-Resistenz bzw. mit Resistenz gegenüber beiden Antibiotika-Klassen	127
Abb. 55:	Anteil an Stämmen pro MDR-Grad für die verschiedenen Fluorchinolon- bzw. Cephalosporin-Resistenztypen	128
Abb. 56:	Häufig vorkommende Sequenztypen (ST)	135

Abb. 57:	Relative Häufigkeit der Stämme jeder Phylogruppe pro Altersstufe	136
Abb. 58:	Verteilung der Sequenztypen auf die Altersstufen	137
Abb. 59:	Anzahl der Stämme jeder Phylogruppe pro Betrieb	137
Abb. 60:	Verteilung der Sequenztypen auf die Betriebe.....	138
Abb. 61:	<i>heatmap</i> zur kSNP-Distanz von ST10-Stämmen aus allen vier Betrieben (links) und von ST58-Stämmen aus Betrieb K1 (rechts)	139
Abb. 62:	<i>Maximum-likelihood</i> Phylogeniebaum basierend auf kSNP im Pangenom der 216 sequenzierten CSRE / FQRE	140
Abb. 63:	<i>Maximum-likelihood</i> Phylogeniebaum basierend auf kSNP im Pangenom der ECOR-Stämme und 68 ausgewählter CSRE / FQRE	141
Abb. 64:	Einfluss von FQR-vermittelnden Mutationen und <i>enabler</i> -Genen auf den Enrofloxacin-Resistenzstatus nach ECOFF (links) und nach klinischem Grenzwert (rechts)	144
Abb. 65:	Häufigkeit des gemeinsamen Auftretens verschiedener FQ- Resistenzdeterminanten und Auswirkung auf den Enrofloxacin-MHK-Wert.....	145
Abb. 66:	Anzahl detektierter <i>bla</i> _{CTX-M} -Allele in den sequenzierten CSRE	146
Abb. 67:	Einfluss verschiedener β -Laktamasen auf den Ceftiofur-Resistenzstatus.....	147
Abb. 68:	Anzahl Plasmid-kodierter Vertreter der CS- / FQ-Resistenzdeterminanten.....	148
Abb. 69:	Verteilung der Plasmidtypen auf die Altersstufen (links) und Betriebe (rechts)	149
Abb. 70:	Häufigkeit des Auftretens bestimmter Kombinationen von Replikationsursprüngen in einem Stamm	151
Abb. 71:	Stammpaare mit identischen Gel-basierten Plasmid-Profilen	152
Abb. 72:	Anzahl Plasmid-kodierter Vertreter jeder Resistenzdeterminante (RD).....	153
Abb. 73:	Assoziationen von Resistenzdeterminanten und Plasmid-Inc-Gruppen	154
Abb. 74:	Übersichtsgrafik zu persistenten Sequenztypen (ST)	155
Abb. 75:	kSNP-Distanz des Betriebs-persistenten Sequenztyps 1775 aus Betrieb B1	158
Abb. 76:	MAUVE-Alignierung der konservierten <i>bla</i> _{CTX-M-15} ⁻ und <i>qnrS</i> -Resistenzregion von Sequenztyp 1775	159
Abb. 77:	kSNP-Distanz des Betriebs-persistenten Sequenztyps 772 aus Betrieb B2	160
Abb. 78:	MAUVE-Alignierung der konservierten <i>bla</i> _{TEM} ⁻ und <i>qnrS</i> -Resistenzregion von Sequenztyp 772	160
Abb. 79:	kSNP-Distanz des Betriebs-persistenten Sequenztyps 617 aus Betrieb K1	161
Abb. 80:	MAFFT-Alignierung der konservierten <i>aac(6')-Ib-cr</i> / <i>bla</i> _{OXA-1} / <i>catB3</i> - Genkassette von Sequenztyp 617	161
Abb. 81:	kSNP-Distanz des Betriebs-persistenten Sequenztyps 744 aus Betrieb K2	162
Abb. 82:	MAUVE-Alignierung der konservierten <i>qnrS</i> -, <i>bla</i> _{CTX-M-15} ⁻ und <i>bla</i> _{TEM} ⁻ - Resistenzregion (oben) und MAFFT-Alignierung der konservierten <i>bla</i> _{CTX-M-55} ⁻ -Resistenzregion (unten) von Sequenztyp 744.....	163
Abb. 83:	MAUVE-Alignierung der <i>bla</i> _{CTX-M-1} ⁻ -Resistenzregion von Sequenztyp 345	163
Abb. 84:	Plasmid-Profil persistenter Stamm-Plasmid-Kombinationen	164
Abb. 85:	Übersichtsgrafik zu persistenten CS-Resistenzdeterminanten (RD).....	165
Abb. 86:	Übersichtsgrafik zu persistenten FQ-Resistenzdeterminanten (RD).....	166
Abb. 87:	Durch Sequenznachbarschaft korrelierte Resistenzdeterminanten (RD)	167

Abb. 88:	Einfluss verschiedener β -Laktamasen auf den Ampicillin-Resistenzstatus	168
Abb. 89:	Quotientenwerte der Sammelkotproben von Mastdurchgang 1 aus Betrieb B1 mit Darstellung der antibiotischen Behandlungen der beprobten Tiergruppe	175
Abb. 90:	Quotientenwerte der Sammelkotproben von Abteil 4 aus Betrieb K1 mit Darstellung der antibiotischen Behandlungen der beprobten Tiergruppe	177
Abb. 91:	Quotientenwerte der Sammelkotproben von Mastdurchgang 2 aus Betrieb K2 mit Darstellung der antibiotischen Behandlungen der beprobten Tiergruppe	178
Abb. 92:	<i>Tanglegram</i> aus Kerngenom- und MLVA-Phylogeniebaum der 216 sequenzierten Stämme.....	182
Abb. 93:	Übersichtsgrafik zu persistenten Sequenztypen (ST) mit ihren Fluorchinolon- / Cephalosporin-Resistenzdeterminanten	193
Abb. 94:	Verteilung persistenter und nicht-persistenter Sequenztypen (ST) auf die Betriebe	194
Abb. 95:	Zum klonalen Komplex 10 gehörende detektierte Sequenztypen	196
Abb. 96:	<i>Tanglegram</i> aus Kerngenom- und akzessorischem Genom-Phylogeniebaum der 216 sequenzierten Stämme.....	198
Abb. 97:	Gel zur Darstellung kleiner Plasmide mit RNA-Banden (links) und mit dem mit RNase behandelten MG1655 (rechts)	252

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Einteilung wichtiger Veterinär-Antibiotika sowie ihre Klassifizierung nach WHO, WOH und EMA.....	3
Tabelle 2:	Alter der Tiergruppen an den Beprobungszeitpunkten im Hauptversuch	30
Tabelle 3:	Im Vor- und Hauptversuch verwendete Gassner-Agarplatten	32
Tabelle 4:	Klassifizierung des Koloniewachstums auf Gassner-Agarplatten (Vorversuch).....	33
Tabelle 5:	Verwendete Polymerasen sowie Zusätze zum Reaktionsansatz (25 µl)	40
Tabelle 6:	Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen der <i>stx1-stx2</i> -Duplex-PCR.....	41
Tabelle 7:	Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen der <i>stx2</i> -Subtypisierungs-PCRs	42
Tabelle 8:	Durch MLVA-PCR detektierte Gene sowie dazugehörige <i>primer</i>	43
Tabelle 9:	Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen der MLVA-Duplex PCR.....	43
Tabelle 10:	Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen der MLVA-Multiplex-PCR	44
Tabelle 11:	Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen der <i>bla</i> _{TEM} -PCR	44
Tabelle 12:	Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen der <i>gyrA-gyrB-parC</i> -Triplex-PCR	45
Tabelle 13:	Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen der <i>parE-acrR-marR</i> -Triplex-PCR	45
Tabelle 14:	Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen der <i>qnr</i> -Multiplex-PCR	46
Tabelle 15:	Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen der <i>qnrB</i> -PCR	47
Tabelle 16:	Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen der PMQR2-Triplex-PCR	47
Tabelle 17:	Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen der <i>floR</i> -PCR.....	48
Tabelle 18:	Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen der LEC-LAMP-Multiplex-PCR.....	49
Tabelle 19:	Agarose-Konzentrationen und Menge des eingesetzten Amplifikats zur Darstellung der PCR-Ergebnisse.....	50
Tabelle 20:	Getestete Antibiotika inklusive Konzentrationsbereich der MICRONAUT-S Großtier Platte	56
Tabelle 21:	Koloniewachstum auf selektiven Gassner-Agarplatten nach Ausstrich von Sammelkotproben aus Thüringer schweinehaltenden Betrieben	62
Tabelle 22:	Daten zum Betriebsmanagement der Betriebe B1, B2, K1 und K2	63
Tabelle 23:	Übersicht über die Beprobung auf Betrieb B1.....	68
Tabelle 24:	Übersicht über die Beprobung auf Betrieb B2.....	71
Tabelle 25:	Übersicht über die Beprobung auf Betrieb K1.....	77
Tabelle 26:	Übersicht über die Beprobung auf Betrieb K2.....	79
Tabelle 27:	Korrelation der Ergebnisse der Sammelkotproben-Auswertung von den Original- und Rückstellproben	85
Tabelle 28:	Pro Altersstufe und Betrieb untersuchte CSR / FQR <i>E. coli</i> -Stämme	100
Tabelle 29:	Aus Betrieb K1 pro Abteil und Selektivplatte untersuchte CSRE / FQRE.....	101
Tabelle 30:	Anzahl unterschiedlicher MLVA-Profile pro Betrieb und Altersstufe	102
Tabelle 31:	Mediane und durchschnittliche Multiresistenz aller Stämme pro Betrieb	124
Tabelle 32:	Mediane und durchschnittliche Multiresistenz aller Stämme pro Altersstufe.....	125
Tabelle 33:	Mediane und durchschnittliche Multiresistenz aller Fluorchinolon- bzw. Cephalosporin-Resistenztypen	128
Tabelle 34:	FQR-vermittelnde Mutationen – exemplarisch nachgewiesen	129
Tabelle 35:	Enrofloxacin-MHK-Werte aller Stämme mit einem FQR- <i>enabler</i> -Gen.....	130

Tabelle 36: Einfluss von <i>bla</i> _{TEM} auf den MHK-Wert gegenüber β -Laktam-Antibiotika.....	131
Tabelle 37: Pro Altersstufe und Betrieb sequenzierte CSR / FQR <i>E. coli</i> -Stämme.....	133
Tabelle 38: Durchschnittliche Anzahl an CSRE / FQRE pro Phylogruppe und Sequenztyp.....	135
Tabelle 39: Detektierte Antibiotika-Resistenzdeterminanten.....	142
Tabelle 40: FQR-vermittelnde Mutationen in 157 sequenzierten FQR <i>E. coli</i>	143
Tabelle 41: <i>enabler</i> -Gene bei FQRE mit maximal einer QRDR-Mutation.....	145
Tabelle 42: Stammpaare mit identischen Sequenz-basierten Plasmid-Profilen.....	152
Tabelle 43: kSNP-Differenz zwischen Stämmen von persistenten Sequenztypen.....	157
Tabelle 44: Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	229
Tabelle 45: Verwendete Geräte.....	230
Tabelle 46: Verwendete Softwareprogramme.....	231
Tabelle 47: Verwendete Chemikalien.....	231
Tabelle 48: Verwendete Oligonukleotid- <i>primer</i> zum Nachweis von Resistenzdeterminanten sowie für die MLVA- und Shigatoxin- (Sub-)Typisierung.....	236
Tabelle 49: Standard- und Marker- <i>E. coli</i> -Stämme.....	240

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen Personen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit sowohl begleitet als auch unterstützt haben und die damit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Menge für die Bereitstellung des Themas und das mir entgegengebrachte Vertrauen, dieses Thema zu bearbeiten. Ich habe sein umfangreiches Wissen und seinen geschulten Blick, mit dem er sich schnell in komplexe Datensätze einlesen und wichtige Kernaussagen extrahieren kann, sehr zu schätzen gelernt. Seine darauf basierenden konstruktiven Anregungen und die stete Erinnerung daran, das große Ganze bzw. „die Geschichte“ nicht aus den Augen zu verlieren, hat maßgeblich dazu beigetragen, meine wissenschaftliche Tätigkeit auf dem richtigen Weg zu halten und sie erfolgreich zum Abschluss zu bringen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Dr. Berens, der mich bei dieser Arbeit angeleitet und fachlich unterstützt hat. Ganz besonders möchte ich ihm für sein offenes Ohr in unzähligen Gesprächen und fachlichen Diskussionen, die mir viele Denkanstöße für die Dissertation gegeben haben, sowie seine geduldige Beantwortung vieler Fragen danken. Durch sein Zutun und seine Erfahrungen hat er mich beim Verfassen dieser Arbeit unterstützt und zu ihrem Erfolg beigetragen.

Ebenso danke ich Frau Dr. Barth die mich in diverse Labormethoden sowie in die BioNumerics Software eingearbeitet und mich engagiert bei der Auswertung sowie Zusammen- und Darstellung der Ergebnisse beraten hat. Ihre strukturierte Herangehensweise und ihr logisches Denken sowie ihre Zielorientiertheit haben meine wissenschaftliche Arbeit in wichtigen Phasen tatkräftig unterstützt.

Auch Herrn Dr. Weber möchte ich für die Bearbeitung der Daten aus der Vollgenomsequenzierung, die er mir in vielen Gesprächen verständnisvoll erklärt hat, und den Beistand bei zahlreichen informatischen Fragen danken. Seine freundschaftliche Hilfe bei der anschließenden graphischen Auswertung der Arbeit war unersetzlich.

Frau Dr. Wiegand danke ich für die Konzeption und initiale Koordinierung dieser Arbeit. Recht herzlich möchte ich mich außerdem bei Frau Jahn für die fürsorgliche und gründliche Einarbeitung in die Labortätigkeiten, die kompetente Beantwortung technischer Fragen sowie für ihr beständiges Interesse an dem Vorankommen meines

Dissertationsprojektes bedanken. Auch Herrn Witt und Frau Förster möchte ich für ihre tatkräftige Hilfe und die Unterstützung bei bzw. Durchführung von zahlreichen Labortätigkeiten danken. Zuletzt möchte ich Frau Methner für die Zusammenarbeit im Rahmen der MALDI-TOF MS-Aufarbeitung meiner Stämme danken.


Ich möchte mich ganz besonders bei allen Betriebsleitern und Mitarbeitenden auf den schweinehaltenden Betrieben bedanken, die zahllose Fragebögen mit mir ausgefüllt haben und teils sogar ihre betrieblichen Abläufe an meine Beprobungen angepasst haben. Ich wurde dort stets freundlich empfangen und habe einen tollen Einblick in diesen landwirtschaftlichen Zweig erhalten.

Frau Dr. Eger und Herrn Dr. Schwödiauer vom Schweinegesundheitsdienst Thüringen möchte ich für die Vermittlung der Betriebe und die Entnahme der Kotproben für den Vorversuch danken.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dauschies für einige nette Telefonate, in denen er mir die Kokzidiendiagnostik erläutert hat, und Herrn Dr. Lederbach vom Institut für Krankheits- und Zoonosendiagnostik, der diese Diagnostik anschließend durchgeführt hat. Danken möchte ich auch der Tierseuchenkasse Jena, deren Fahrdienst die Kotproben dazu an das Institut in Bad Langensalza überführt hat. Bei den anderen Doktorandinnen der AG260 (Nicole, Marta und Maike) und bei Christiane möchte ich mich für das offene Ohr in Krisen, die gegenseitige Unterstützung, die vielen aufmunternden Gespräche und die vor allem während der Corona-Pandemie so nötige Abwechslung im Labor- und Institutsalltag danken. Mit euch war jede Ablenkung schön!

Zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken, die in dieser Zeit an meiner Seite waren und mich emotional sowie mental unterstützt haben. Meine Eltern, die meiner Schwester und mir tiefe Wurzeln und kräftige Flügel gaben, haben mir durch ihre Erziehung, ihre finanzielle Unterstützung und ihren Glauben an mich ermöglicht, dieser wissenschaftlichen Arbeit nachzugehen und sie fertigzustellen. Meiner Mutter danke ich darüber hinaus für die sprachliche Korrektur der Arbeit. Auch bei meinem Freund Johannes Löhr möchte ich mich für seine seelische Unterstützung bedanken. Er musste sich viele Klagen anhören und hat mich dennoch immer wieder motiviert, weiterzumachen. Dank all dieser tollen Menschen kann ich die Dissertation nun zufrieden abschließen.

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

CNicola 

Nicola Pfeifer

28. August 2022



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-7094-6



9 783835 970946