

# Vergleichende molekulare Charakterisierung ESBL-produzierender *Enterobacteriaceae*-Isolate von Menschen und Tieren

---

Judith Ricarda Thekla Schmiedel



Inauguraldissertation eingereicht im Fachbereich Medizin  
in Erfüllung der Anforderungen zur Erlangung des  
akademischen Grades eines Ph.D.  
der Fachbereiche Veterinärmedizin und Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen



edition wissenschaft  
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den 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 2015

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.

1<sup>st</sup> Edition 2015

© 2015 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

**Vergleichende molekulare Charakterisierung  
ESBL-produzierender *Enterobacteriaceae*-Isolate  
von Menschen und Tieren**

Inauguraldissertation eingereicht im Fachbereich Medizin  
in Erfüllung der Anforderungen zur Erlangung des  
akademischen Grades eines Ph.D.  
der Fachbereiche Veterinärmedizin und Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Judith Ricarda Thekla Schmiedel  
aus Düsseldorf

Gießen 2015

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen (Direktor: Prof. Dr. Trinad Chakraborty)

1. Gutachter und Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Trinad Chakraborty

2. Gutachter und Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Volkhard Kempf

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission: Prof. Dr. Martin Diener

Prof. Dr. Christoph Lämmler

Tag der Disputation: 28.08.2015

*Meiner Familie*

# Zusammenfassung

## Hintergrund

Multiresistente Gram-negative Bakterien, die *Extended-Spectrum*  $\beta$ -Lactamases (ESBLs) produzieren, sind ein immer größer werdendes Problem in der Human- und Tiermedizin. Diese Studie konzentrierte sich auf die vergleichende molekulare Charakterisierung von  $\beta$ -Laktamase- und ESBL-produzierenden *Enterobacteriaceae*-Isolaten aus Mittelhessen. Die untersuchten Isolate stammten von Menschen, Heimtieren (Hunde und Katzen), Pferden und Nutztieren (Rinder und Schweine).

## Methoden

Der phänotypische Nachweis der ESBL-Produktion wurde durch den *Double Disc Synergie Test* (DDST) und Anfertigung eines Antibiogramms erbracht. Die initiale Charakterisierung der Resistenzgene  $bla_{TEM}$ ,  $bla_{SHV}$  und  $bla_{CTX-M}$  erfolgte durch PCR mit anschließender Sequenzierung der Amplikons. Weitere genotypische Tests wurden durchgeführt, um *Plasmid-mediated Quinolone Resistance* (PMQR)-Gene ( $qnrA$ ,  $qnrB$ ,  $qnrC$ ,  $qnrD$ ,  $qnrS$ ,  $qepA$ ,  $aac(6')-Ib-cr$ ) sowie die  $\beta$ -Laktamasegene  $bla_{OXA-1}$  und  $bla_{OXA-48}$  zu identifizieren. *Escherichia coli*-Isolate wurden den phylogenetischen Gruppen A, B1, B2 und D unter Verwendung eines PCR-basierten Typisierungsschemas zugeordnet. Eine Auswahl CTX-M-1- und CTX-M-15-positiver *E. coli*-Human- (10 Isolate) und -Heimtierisolate (10 Isolate) wurde hinsichtlich ihrer Resistenz- und Virulenzeigenschaften eingehender charakterisiert. Neben der Erstellung eines Plamidprofils (Anzahl, Größe, kodierte Resistenzgene, Inc-Gruppen) wurde eine Genomsequenzierung mit anschließender Untersuchung auf Virulenzgene durchgeführt. Zusätzlich wurde die Virulenz dieser Isolate mit Hilfe des Modellorganismus *Galleria mellonella* überprüft.

## Ergebnisse

Die am häufigsten gefundenen multiresistenten Bakterienspezies in dieser Studie waren *E. coli* (73,8 %), gefolgt von *Klebsiella pneumoniae* (17,7 %) und *Enterobacter cloacae* (4,4 %). Die Untersuchung der phylogenetischen *E. coli*-Gruppen ergab, dass die Gruppe B2 unter den Tierisolaten im Vergleich zu den Humanisolaten unterrepräsentiert war. Es wurden mittels PCR und Amplikonsequenzierung 153 (83,6 %) der Humanisolate (n = 183) und 187 (90,3 %) der tierischen Isolate (n = 207) als ESBL-Produzenten bestätigt. Die vorherrschenden

ESBL-Subtypen waren CTX-M-15 (49,5 % aller 390 *Enterobacteriaceae*-Isolate) und CTX-M-1 (25,4 %). Der Subtyp *bla*<sub>CTX-M-2</sub> wurde fast ausschließlich in Pferde- und nicht in Humanisolaten gefunden. Die Carbapenemase OXA-48 wurde in 23 Ertapenem-resistenten Tierisolaten nachgewiesen. Das *aac*(6)-*Ib-cr*-Gen war das am häufigsten identifizierte PMQR-Antibiotikaresistenz-Gen. Es war in 27,9 % der Humanisolate und 35,5 % der Tierisolate vorhanden. Kombinationen von 2 bis zu 6 verschiedenen Resistenzgenen (Penicillinasen, ESBLs und PMQRs) wurden in 70 % aller untersuchten Isolate nachgewiesen. Plasmide wurden bei 95 % der 20 eingehender charakterisierten Isolate nachgewiesen und den Inc-Gruppen FIA, FIB, FIC, FII, I1 und N zugeordnet. Dabei war das Vorkommen von IncN auf die Humanisolate beschränkt. Insgesamt konnten in den untersuchten Plasmidsequenzen 8 verschiedene Resistenzgenklassen detektiert und eine Assoziation zwischen den Genen *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub> und *aac* (6)-*Ib-cr* festgestellt werden. Zwölf der 20 Isolate konnten als extraintestinal-pathogene *E. coli* (ExPEC) klassifiziert werden, wobei eine Kumulation von Virulenz- und Virulenz-assoziierten Faktoren bei den phylogenetischen Gruppen B2 und D (durchschnittlich 20 Gene) zu beobachten war. Statistisch konnte die Präsenz eines Toxingens, der Genkombination *sitA/iuca/iss* und der Gene *lpfA* und *traJ* als Risikofaktoren für das Versterben der mit diesen Bakterien infizierten *G. mellonella*-Larven identifiziert werden.

### **Schlussfolgerungen**

Obwohl Isolate von Mensch, Haustieren, Pferden und Nutztieren mehrere Merkmale in Bezug auf Vorhandensein von ESBL- und PMQR-Gene teilen, bleibt die Beurteilung hinsichtlich einer Übertragung von ESBL-kodierenden *Enterobacteriaceae* zwischen Menschen und Tieren schwierig. Zwar wurden in beiden Populationen die gleichen Resistenzgene in ähnlicher Häufigkeit identifiziert und auch die untersuchten Plasmide zeigen ähnliche Inc-Typen. Allerdings wurden keine identischen Plasmide zwischen Mensch und Tier gefunden und die Untersuchung der Plasmid-kodierten Resistenzgene ergab bei allen untersuchten Isolaten ein individuelles Resistenzgenmuster. Daher muss davon ausgegangen werden, dass in beiden Populationen zwar die gleichen Resistenzgene gefunden werden, aber die Träger dieser Gene (Bakterienstämme und Plasmide) in der Human- und Tierpopulation und auch untereinander verschieden sind.

# Summary

## Background

Multiresistant Gram-negative bacteria producing extended-spectrum- $\beta$ -lactamases (ESBLs) are an emerging problem in human and veterinary medicine. This study focused on comparative molecular characterization of  $\beta$ -lactamase and ESBL-producing *Enterobacteriaceae* isolates from central Hesse in Germany. Isolates originated from humans, companion animals (dogs and cats), horses and farm animals (cattle und pigs).

## Methods

Phenotypic detection of ESBL-producers was performed by double disc synergy test (DDST) and antimicrobial susceptibility testing. Initial molecular characterization of resistance genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> and *bla*<sub>CTX-M</sub> was done by PCR and subsequent sequencing of the amplicons. Additional genotypic testing was performed to identify plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *qepA*, *aac(6')-Ib-cr*), *bla*<sub>OXA-1</sub> and *bla*<sub>OXA-48</sub>. *Escherichia coli* isolates were assigned to phylogenetic groups A, B1, B2 and D using a PCR-based typing scheme. A selection of CTX-M-1 and CTX-M-15 positive human (10 isolates) and companion animal (10 isolates) *E. coli* isolates was characterized in terms of their virulence and plasmid characteristics. Besides generation of plasmid profiles (number, size, encoded resistance genes, Inc-groups) whole genome sequencing was performed, followed by screening for virulence genes. In addition, the virulence was investigated using the model organism *Galleria mellonella*.

## Results

The most frequently identified species in this study was *E. coli* (73.8 %), followed by *Klebsiella pneumoniae* (17.7 %), and *Enterobacter cloacae* (4.4 %). Detailed investigation of *E. coli* phylogenetic groups revealed an underrepresentation of group B2 within the animal isolates in comparison to the human isolates. In this study 153 (83.6 %) of the human isolates (n = 183) and 187 (90.3 %) of the animal isolates (n = 207) were confirmed as ESBL-producers by PCR and subsequent sequencing of the PCR amplicons. Predominant ESBL subtypes in human and animal samples were CTX-M-15 (49.5 %) and CTX-M-1 (25.4 %) respectively. Subtype *bla*<sub>CTX-M-2</sub> was found almost exclusively in equine and was absent from human isolates. The carbapenemase OXA-48 was detected in 23 Ertapenem-resistant animal

isolates in this study. The *aac(6)-Ib-cr* gene was the most frequently detected PMQR antibiotic resistance gene present in 27,9 % of the human isolates and 35,5 % of the animal isolates. Combinations of 2 up to 6 different resistance genes (penicillinases, ESBLs and PMQR) were detected in 70% of all isolates investigated. Plasmids were present in 95 % of the in depth characterized isolates (n = 20) and the Inc groups FIA FIB FIC, FII, I1 and N were detected. Occurrence of IncN was limited to the human isolates. Eight different resistance gene classes were identified on the investigated plasmid-associated sequences and an association of the genes *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub> und *aac (6)-Ib-cr* discovered. Twelve isolates out of 20 were classified as extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC), with an accumulation of virulence and virulence-associated factors among phylogenetic groups B2 and D (average of 20 genes). A statistical analysis was able to identify the presence of a toxin gene, the gene combination *sitA/iuca/iss* and the genes *lpfA* and *traJ* as risk factors for decreased survival rates of *G. mellonella* larvae.

## Conclusions

Although isolates from humans, pets, horses and livestock share several characteristics regarding presence of ESBL and PMQR genes, the assessment in terms of transmission of ESBL-encoding Enterobacteriaceae between humans and animals remains difficult. The same resistance genes were identified in similar frequency in both populations and the investigated plasmids show similar Inc types. However, no identical plasmids between humans and animals have been found and the study of plasmid-encoded resistance genes revealed an individual resistance gene pattern for all examined isolates. It must therefore be assumed that, despite the same resistance genes are found in both populations, the carrier of these genes (bacterial strains and plasmids) are different in animal and human populations, and also differ from each other.

## Verwendete Abkürzungen

<b>A. dest.</b>	<i>Aqua destillata</i> (destilliertes Wasser)
<b>AmpC</b>	AmpC- $\beta$ -Laktamase
<b>AS</b>	Aminosäure
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>CTX-M</b>	Cefotaximase
<b>DDST</b>	<i>Double-Disc Synergy Test</i>
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
<b>DSMZ</b>	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
<b>dNTP</b>	Desoxyribonukleotidtriphosphat
<b>ECDC</b>	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>ESBL</b>	<i>Extended-Spectrum Beta-Lactamase</i>
<b>EtBr</b>	Ethidiumbromid
<b>etc.</b>	<i>et cetera</i>
<b>ExPEC</b>	Extraintestinal pathogene <i>E. coli</i>
<b>HCl</b>	Salzsäure
<b><i>K. pneumoniae</i></b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<b>KbE</b>	Kolonie-bildende Einheiten
<b>Kbp</b>	Kilobasenpaare
<b>LB</b>	Luria Bertani
<b>MH</b>	Müller-Hinton
<b>MHK</b>	Minimale Hemmkonzentration
<b>MLST</b>	<i>Multilocus sequence typing</i> (Multilocus-Sequenztypisierung)
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>NGS</b>	<i>Next Generation Sequencing</i>
<b>Nr.</b>	Nummer
<b>OXA</b>	Oxacillinase
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
<b>PFGE</b>	Pulsfeld Gel Elektrophorese
<b>PMQR</b>	<i>Plasmid-Mediated Quinolone Resistance</i>
<b>Ref.</b>	Referenz
<b>S.</b>	Seite
<b>SEM</b>	<i>Standard Error of the Mean</i> (Standardfehler)
<b>SHV</b>	<i>Sulphydryl variable</i>
<b>ST</b>	Sequenztyp
<b>STC</b>	Sequenztyp-Cluster
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>TEM</b>	Temoniera
<b>TRIS</b>	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>UKGM</b>	Universitätsklinikum Gießen/Marburg
<b>ÜNK</b>	Übernachtkultur
<b>vs.</b>	versus
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i>
<b>ZVK</b>	Zentraler Venenkatheter

## Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	3
Summary.....	5
Abkürzungsverzeichnis.....	7
Inhaltsverzeichnis.....	8
1 Einleitung.....	12
2 Literaturübersicht.....	14
2.1 Die Familie der <i>Enterobacteriaceae</i> .....	14
2.1.1 <i>Escherichia coli</i> .....	15
2.1.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	18
2.2 Antibiotika.....	18
2.2.1 $\beta$ -Laktam-Antibiotika.....	19
2.2.1.1 Pencilline.....	20
2.2.1.2 Cephalosporine.....	21
2.2.2.3 Carbapeneme.....	22
2.2.2 Chinolon-Antibiotika.....	22
2.2.3 Makrolid-Antibiotika.....	23
2.2.4 Aminoglykosid-Antibiotika.....	23
2.2.5 Tetracyclin-Antibiotika.....	23
2.3 Resistenzgen-tragende mobile genetische Elemente.....	24
2.3.1 Plasmide.....	24
2.3.2 Transposons.....	25
2.3.3 Integrons und Genkassetten.....	26
2.3.4 Bakteriophagen.....	27
2.4 Beta-Laktamasen.....	28
2.4.1 Wichtige Vertreter der <i>Extended-Spectrum <math>\beta</math>-Lactamases</i> (ESBL).....	29
2.4.1.1 TEM-ESBLs.....	29
2.4.1.2 SHV-ESBLs.....	30

2.4.1.3	CTX-M-ESBLs.....	31
2.4.2	Andere $\beta$ -Laktamasen.....	31
2.4.2.1	OXA- $\beta$ -Laktamasen.....	31
2.4.2.2	AmpC- $\beta$ -Laktamasen.....	32
2.4.2.3	Carbapenemasen.....	32
2.5	Plasmid-vermittelte Resistenz gegen Chinolone .....	33
2.5.1	Das Chinolon-Resistenzgen <i>qnr</i> .....	34
2.5.2	Das Chinolon-Resistenzgen <i>aac(6)-1b-cr</i> .....	34
2.5.3	Das Chinolon-Resistenzgen <i>qepA</i> .....	34
2.6	Darstellung des Problems und Zielsetzung der Arbeit .....	35
3	Material und Methoden .....	39
3.1	Material.....	39
3.1.1	Bakterienstämme .....	39
3.1.1.1	Bakterienisolate von Menschen.....	39
3.1.1.2	Tierische Bakterienisolate.....	39
3.1.1.3	Auswahl der Isolate.....	39
3.1.1.3	Referenzstämme.....	41
3.1.2	Oligonukleotid-Primer .....	42
3.1.3	Chemikalien, Nährmedien, Puffer und Lösungen .....	44
3.1.8	Enzyme.....	47
3.1.9	Kits .....	47
3.1.10	Software .....	48
3.1.10.1	Lokal ausführbare Software.....	48
3.1.10.2	Web-basierte Software und Ressourcen.....	48
3.2	Methoden .....	49
3.2.1	Bakterienanzucht.....	49
3.2.2	Herstellung und Lagerung der Reinkulturen .....	49

3.2.3	Resistenztestung.....	49
3.2.3.1	VITEK2-System.....	50
3.2.3.2	E-Teststreifen.....	50
3.2.4	Identifizierung von ESBL/AmpC Produzenten .....	51
3.2.4.1	<i>Double-Disc Synergy Test</i> (DDST).....	51
3.2.4.2	Phänotypischer AmpC- und Carbapenemasenachweis.....	51
3.2.5	DNA-Isolation.....	52
3.2.6	DNA-Aufreinigung.....	52
3.2.7	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	52
3.2.8	Identifizierung von PMQR-Allelen .....	53
3.2.9	Identifizierung der phylogenetischen Gruppen von <i>E. coli</i> .....	54
3.2.10	<i>Multi-Locus Sequence Typing</i> (MLST) von ESBL-Produzenten .....	54
3.2.11	<i>Inc Typing</i> der <i>E. coli</i> Plasmide .....	55
3.2.12	Gelelektrophorese .....	55
3.2.12.1	Horizontale Gelelektrophorese.....	55
3.2.12.2	<i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i> (PFGE).....	56
3.2.13	DNA-Sequenzierung.....	58
3.2.13.1	Sequenzierung von PCR-Amplikons.....	58
3.2.13.2	Genomsequenzierung.....	58
3.2.14	<i>Galleria mellonella</i> -Modell .....	59
3.2.15	Genomanalyse und Bioinformatik.....	61
3.2.16	Statistik .....	67
4.	Ergebnisse.....	68
4.1	Charakterisierung der ESBL-verdächtigen Bakterienisolate.....	68
4.1.1	Häufigkeitsverteilung der Isolate nach dem Probenmaterial .....	68
4.1.2	Häufigkeitsverteilung der Isolate nach der Erkrankung der Patienten .....	69
4.1.3	Häufigkeitsverteilung der Isolate nach taxonomischer Zugehörigkeit .....	69

4.1.4	Resistenzquoten .....	70
4.1.5	Nachweis und Klassifizierung von $\beta$ -Laktamasen bei Cephalosporin-resistenten Isolaten .....	73
4.1.5.1	Identifizierte ESBL-/AmpC-Produzenten.....	73
4.1.5.2	Identifizierte $\beta$ -Laktamase und ESBL Allele.....	74
4.1.6	Eigenschaften der Carbapenem-resistenten Isolate .....	79
4.1.7	Eigenschaften der Ciprofloxacin-resistenten Isolate.....	80
4.1.8	Kombination zwischen $\beta$ -Laktamase- und PMQR-Typen .....	82
4.1.9	Phylogenetische Gruppen unter den <i>Escherichia coli</i> -Isolaten.....	88
4.2	Nähere Charakterisierung von ausgewählten CTX-M-1- und CTX-M-15-bildenden <i>E. coli</i> -Isolaten.....	91
4.2.1	Sequenztypen .....	92
4.2.2	Plasmidprofil.....	94
4.2.3	Resistenzgene .....	98
4.2.5	Virulenzgene und Virulenz-assoziierte Gene.....	101
4.2.6	Virulenz im <i>Galleria mellonella</i> Modell .....	107
4.2.7	Risikofaktoren für einen hohen larviziden Effekt.....	111
5	Diskussion .....	112
6	Zusammenfassung.....	128
7	Literaturverzeichnis .....	129
8	Veröffentlichungen.....	138
9	Eidesstatliche Erklärung.....	139
10	Curriculum vitae .....	140
11	Danksagung.....	142
12	Anhang.....	144

## 1 Einleitung

Mit der Entdeckung des Penicillins 1928 durch Alexander Flemming begann der weltweite Siegeszug der Antibiotika. Seit diesem Zeitpunkt sind sie wichtige und unersetzbare Werkzeuge zur Bekämpfung bakterieller Infektionskrankheiten bei Mensch und Tier. Leider haben diese Wirkstoffe durch die Zunahme von Antibiotikaresistenzen viel von ihrer Effektivität eingebüßt. Während in der Human- und Veterinärmedizin zunächst multiresistente Gram-positive Infektionserreger wie Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) und Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) große Aufmerksamkeit erregten, verschiebt sich der Fokus in den letzten Jahren immer stärker in Richtung Gram-negativer Erreger mit Resistenzen gegen  $\beta$ -Laktame und andere wichtige Antibiotikagruppen, vor allem Aminoglykoside und Fluorochinolone. Treibende Kraft in dieser bedenklichen Entwicklung ist der durch die Anwendung der Wirkstoffe ausgeübte Selektionsdruck, welcher der Ausbreitung bereits resistenter Erreger bzw. der für die Resistenz verantwortlichen Gene Vorschub leistet. Ungefähr seit dem Jahr 2000 steigen die Nachweisraten für  $\beta$ -Laktamase-produzierende *Enterobacteriaceae*-Isolate weltweit rasch an (Coque *et al.*, 2008a). Große Bedeutung kommt in diesem Zusammenhang den *Extended-Spectrum*  $\beta$ -Lactamases-(ESBL)-bildenden Stämmen zu, die meist der Bakteriengattung *Klebsiella* und der Spezies *Escherichia coli*, angehören. ESBLs sind bakterielle Enzyme, die in der Lage sind Penicilline, Cephalosporine (1. - 3. Generation) und Monobaktame zu hydrolysieren. Allerdings sind sie nicht aktiv gegen Cephamycine und Carbapeneme und werden üblicherweise von  $\beta$ -Laktamase-Inhibitoren wie Clavulansäure gehemmt (Bush und Jacoby, 2010). Von den inzwischen ungefähr 1.000 beschriebenen bakteriellen  $\beta$  Laktamasen sind mehr als die Hälfte als ESBL einzustufen (Lahey Clinic, 2014). Die dabei am stärksten vertretenen ESBL-Typen gehören den  $\beta$ -Laktamase-Typen TEM, SHV und CTX-M an. Dabei ist der bei *E. coli* primär identifizierte ESBL-Typ die CTX-M-Typ- $\beta$ -Laktamase. Je nach Region, Land und Institution (Klinik, Krankenhaus) ist die Häufigkeitsverteilung der gefunden ESBL-Subtypen unterschiedlich. Der ESBL- $\beta$ -Laktamase CTX-M-15 kommt hierbei eine besondere Bedeutung zu, da sie sich während der letzten Jahre sogar pandemisch ausgebreitet hat (Livermore *et al.*, 2006). Ihre Verbreitung spiegelt insbesondere auch die Ausbreitung des hochvirulenten *E. coli*-Stammes B2-ST131-O25:H4 wider, der das Gen für die CTX-M-15-ESBL besitzt (Nicolas-Chanoine *et al.*, 2007). Wenn auch ESBL-bildende Bakterien als Erreger nosokomialer Infektionen besonders häufig in

Erscheinung treten, ist ihr Vorkommen nicht auf Krankenhäuser und Kliniken beschränkt. Vielmehr werden sie auch bei ambulant behandelten Patienten sowie bei gesunden Personen der Normalbevölkerung gefunden, wobei es sich vor allem im letztgenannten Fall meist um eine reine Besiedelung mit ESBL-Produzenten handelt (Valenza *et al.*, 2014). Außerdem konnten ESBL-bildende Bakterien wiederholt auch in Proben von Haus- (Nutz- und Heimtiere) und Wildtieren (Hordijk *et al.*, 2013), sowie in Umweltproben nachgewiesen werden (Guenther *et al.*, 2011; Tamang *et al.*, 2013). Ungefähr zeitgleich mit der Expansion von ESBL-bildenden Bakterien breiteten sich auch bakterielle Infektionserreger mit der sogenannten *Plasmid-mediated Quinolone Resistance* (PMQR; Plasmid-kodierte Chinolonresistenz) aus (Corkill, 2005; Yang *et al.*, 2013). Diese Entwicklung wurde höchstwahrscheinlich durch den vermehrten Einsatz von Fluorchinolonen zur Behandlung bei Infektionen mit  $\beta$ -Laktam-resistenten Erregern begünstigt (Zhanel *et al.*, 2002). Infolge der Co-Selektion der verantwortlichen Resistenzgene zeigen viele ESBL- und PMQR-produzierende Erreger zusätzlich zur  $\beta$ -Laktam- und Fluorchinolonresistenz auch Resistenz gegen Aminoglykoside und Sulfonamide (Coque *et al.*, 2008b). Die für diese Resistenzphänotypen kodierenden Gene sind häufig Bestandteil mobiler genetischer Elemente, wie z. B. Plasmiden, sodass sie innerhalb von Bakterienpopulationen über horizontalen Gentransfer vergleichsweise rasch verteilt werden können. Die vom *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network* (EARS-Net) vorgestellten Daten unterstreichen diesen gefährlichen Trend. So war die Mehrheit der in 2012 vom EARS-Net in Europa erfassten *E. coli*- und *K. pneumoniae*-Isolate gegen mindestens ein Antibiotikum unter Beobachtung (Fluorchinolone,  $\beta$ -Laktame oder Aminoglykoside) resistent. Zusätzlich traten häufig bei ein und demselben Bakterienstamm Resistenzen gegen verschiedene Wirkstoffklassen (Mehrfachresistenzen) auf. Dieser Entwicklung kann nur durch Begrenzung der Ausbreitung resistenter Erreger und die Vermeidung eines einseitigen Selektionsdrucks Einhalt geboten werden. Eine wichtige Rolle kommt in diesem Zusammenhang dem *One Health*-Konzept zu, welches interdisziplinäre Zusammenarbeit und Kommunikation in allen Aspekten der Gesundheitsversorgung für Mensch und Tier fördert (Bidaisee und Macpherson, 2014). Die Problematik der Entstehung und Ausbreitung resistenter Erreger betrifft alle oben genannten Bereiche und die Entwicklung einer gemeinsamen Strategie ist dringend erforderlich. Wenn nicht, dann droht uns eine post-antibiotische Ära (WHO, 2014).

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Die Familie der *Enterobacteriaceae*

Eines der bedeutendsten bakteriellen Taxons in der Medizin und Veterinärmedizin ist die Familie *Enterobacteriaceae*. Mitglieder dieser Familie sind Gram-negative, meist bewegliche und fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien. Das natürliche Habitat vieler Vertreter ist der Magen-Darmtrakt von Mensch und Wirbeltier. Der Familie *Enterobacteriaceae* gehören Gattungen und Arten an, die definierte Krankheiten mit eindeutiger klinischer Symptomatik verursachen wie z. B. Typhus, Ruhr und Pest (Kayser, 2010).

Allerdings zählen auch viele Opportunisten und fakultativ pathogene Erreger zu dieser Familie. Sie sind oftmals Ursache von infektiösen Faktorenkrankheiten und nosokomialen Infektionskrankheiten (z. B. infektiöse Harnwegserkrankungen, Wundinfektionen, Sepsis). Die Taxonomie der *Enterobacteriaceae* ist in den letzten Jahren mehrfach verändert und korrigiert worden und darf bis heute nicht als abgeschlossen betrachtet werden. Die Familie *Enterobacteriaceae* umfasst zurzeit mehr als 100 Gattungen und Spezies (Neumeister, 2009). Laktose-positive *Enterobacteriaceae* werden in die Gruppe der Coliformen *Enterobacteriaceae* gezählt, wohingegen Salmonellen und Shigellen in der Regel Laktose-negativ sind. Viele Bakterien dieser Familie sind auf einfachen Nährmedien z. B. Luria Bertani-(LB)-Agar gut anzuzüchten. Ihre mittlere Generationszeit beträgt 20 bis 30 min. Ein im Rahmen der medizinischen/veterinärmedizinischen Routinediagnostik bewährtes Selektions- und Differenzierungsnährmedium für *Enterobacteriaceae* ist der MacConkey-Agar, der das Wachstum vieler Gram-positiver Bakterien unterdrückt und bei den anzüchtbaren Keimen deren Laktoseabbau anzeigt (Rolle und Mayr, 2007; Neumeister, 2009).

Bei vielen *Enterobacteriaceae* hat die Feindifferenzierung innerhalb einer Spezies oder Subspezies große Bedeutung erlangt, da es gerade bei weit verbreiteten Bakterien nur auf diese Weise gelingt, epidemiologische Zusammenhänge zu erkennen. Eines der ältesten Feindifferenzierungsverfahren ist die Serotypisierung, bei der anhand von Antigenen – meist Oberflächenantigenen – verschiedene Serovare unterschieden werden. Taxonomisch wichtige Antigene bei *Enterobacteriaceae* sind O-, H-, K- und F-Antigene. Das biochemische Substrat der O-Antigene sind die Polysaccharid-Seitenketten des Lipopolysaccharid-Moleküls in der äußeren Membran der Zellwand der Gram-negativen Bakterien. Die Geißelschaftproteine werden als H-Antigene bezeichnet, während es sich bei den

F-Antigenen um die Strukturproteine bakterieller Fimbrien handelt. Die K-Antigene sind lineare Polymere aus sauren Polysacchariden, die der äußeren Membran in Form einer mehr oder weniger dicken und unterschiedlich mit Wasser angereicherten Kapsel aufgelagert sind. Bei den *Enterobacteriaceae* sind heute viele Faktoren bekannt, die für die Pathogenität der einzelnen pathogenen Spezies bzw. für die Virulenz der einzelnen Stämmen verantwortlich sind. Zu erwähnen sind u.a. Adhäsine, Invasine, Enterotoxine, Zytotoxine, Effektoren des Typ-III-Sekretionssystems, Endotoxin (Lipid A) und Siderophore (Rolle und Mayr, 2007; Neumeister, 2009). Da *E. coli* und *K. pneumoniae* die mit Abstand am häufigsten vertretene Spezies in dieser Ph. D.-Thesis waren, werden sie im Folgenden eingehender beschrieben.

### 2.1.1 *Escherichia coli*

*E. coli* ist eine sehr heterogene Spezies, die zahlreiche medizinisch/veterinärmedizinisch unterschiedlich bedeutsame Varianten umfasst (Rolle und Mayr, 2007; Kayser, 2010). Die geraden Stäbchen sind peritrich begeißelt und in der Regel Laktose-positiv (Kayser, 2010). Neben kommensalischen Dickdarmbewohnern gibt es bei *E. coli* obligat pathogene Varianten, die nach der Lokalisation der von ihnen verursachten Infektionskrankheit weiter in intestinal pathogene *E. coli* (InPEC) und extraintestinal pathogene (ExPEC) differenziert werden (Neumeister, 2009). In beiden Gruppen kann man weiter verschiedene Pathovaren unterscheiden, die jeweils anhand bestimmter Virulenzfaktoren oder Virulenzfaktorkombinationen zu identifizieren sind. Die entsprechenden Gene sind häufig auf mobilen Elementen z. B. Plasmiden oder Prophagen zu finden (Kaper *et al.*, 2004).

*E. coli*-Darmerkrankungen werden vor allem von Stämmen der Pathovaren EPEC, ETEC, EIEC, EHEC, EAEC und DAEC verursacht. EPEC (Enteropathogene *E. coli*) verursachen Diarrhoe bei Säuglingen und Jungtieren. Charakteristisch sind die von ihnen verursachten *Attaching-and-effacing*-(AE)-Läsionen an den Darmepithelzellen. Alle EPEC besitzen die Pathogenitätsinsel LEE (*Locus of enterocyte effacement*), auf der die für die Auslösung der AE-Läsion wichtigsten Proteine kodiert sind (Nataro *et al.*, 1998). ETEC (Enterotoxische *E. coli*) besiedeln mit ihren afimbrialen und fimbrialen Adhäsinen den Dünndarm empfänglicher Wirtsspezies und sezernieren hitzestabile und hitzelabile Enterotoxine. Diese verursachen beim Menschen ein cholera-ähnliches Krankheitsbild, das häufig bei Reisenden in Drittweltländer zu beobachten ist (Reisediarrhoe) (Daniels, 2005). Bei Rindern, Schweinen und anderen Tierarten treten tierartlich spezifische ETEC-Stämme auf, die vor allem bei Neugeborenen und Jungtieren

schwere, wässrige Durchfälle verursachen (Rolle und Mayr, 2007). Die Colidiarrhoe der Saug- und Absetzferkel ist eine in Deutschland und anderen Ländern mit intensiver Schweinehaltung häufige ETEC-bedingte Krankheit (Alexander, 1994). EIEC (Enteroinvasive *E. coli*) lösen beim Menschen eine ruhrähnliche Erkrankung des Dickdarmes aus. Tierpathogenität ist bisher nicht bekannt (Rolle und Mayr, 2007; Kayser, 2010). Die EHEC (Enterohämorrhagische *E. coli*) sind eine im Wirtssystem Mensch hochvirulente Untergruppe der sog. Shigatoxin-bildenden *E. coli* (Synonyme: STEC; Verotoxin-bildende *E. coli*, VTEC). EHEC bilden eines oder mehrere Shigatoxine und sind beim Menschen das ätiologische Agens der hämorrhagischen Kolitis (HK). Eine gefürchtete EHEC-(Folge)erkrankung ist das hämolytisch urämische Syndrom (HUS) (Nataro *et al.*, 1998). Eine andere, an das Schwein angepasste Untergruppe der STEC löst bei jungen Schweinen die oft tödlich verlaufende Ödemkrankheit aus (*edema disease E. coli*, EDEC)(Imberechts *et al.*, 1992). Die EAEC (Enter aggregative *E. coli*) heften sich mit spezifischen Fimbrien an die Darmmukosa fest und lösen bei betroffenen Personen eine sekretorische Diarrhoe aus (Kaper *et al.*, 2004). Erkrankungen bei Tieren sind bisher nicht beobachtet worden (Beutin, 1999). Diffus adhärente *E. coli* (DAEC) werden bei durchfallkranken Menschen aus Stuhlproben häufig isoliert und tragen spezifische Fimbrien. Toxinbildung und Tierpathogenität sind bei diesem Pathovar nicht bekannt.

Extraintestinale *E. coli*-Infektionen entstehen dann, wenn *E. coli*-Bakterien außerhalb des Darmes vermehrungsfreundliche Bedingungen vorfinden. Häufig betroffen sind der Urogenitaltrakt und die Milchdrüse, es kommen aber auch septikämische Erkrankungen vor (Johnson *et al.*, 2003). Nur in einigen Fällen sind spezifische *E. coli*-Varianten oder sogar Pathovaren als Ursache dieser extraintestinalen Infektionen und Krankheitsmanifestationen identifiziert. Hierzu gehören die uropathogenen *E. coli* (UPEC), die durch Virulenzfaktoren wie P-Fimbrien, Hämolysin und den zytotoxisch nekrotisierenden Faktor (CNF) gekennzeichnet sind (Kaper *et al.*, 2004). Andere *E. coli*-Stämme sind immer wieder Auslöser von Meningitis und Sepsis bei menschlichen Neugeborenen, weshalb sie zum Pathovar NMEC (Neonatale Meningitis-*E. coli*) gezählt werden (Gaschignard *et al.*, 2012). In der Tiermedizin sind neben UPEC vor allem die APEC (*Avian Pathogenic E. coli*) von Bedeutung, welche das ätiologische Agens der Coliseptikämie des Geflügels repräsentieren (Dho-Moulin und Fairbrother, 1999).

Die Spezies *E. coli* kann phylogenetisch in die Gruppen A, B1, B2 und D eingeteilt werden. Diese Einteilung beruht auf der Anwesenheit oder dem Fehlen bestimmter

Stoffwechsellenzyme (Selander *et al.*, 1986). Die Gruppen A und B1 werden als Schwestergruppen betrachtet während einige Autoren die Gruppe B2 als Stammlinie von *E. coli* bezeichnen (Lecointre *et al.*, 1998). Die 4 Gruppen unterscheiden sich voneinander auch in phänotypischen Eigenschaften, wie ihrer Fähigkeit, bestimmte Zucker zu verstoffwechseln, und ihren Antibiotika-Resistenzprofilen (Gordon, 2004). Die Genomgröße der Gruppen ist ebenfalls verschieden. So haben Stämme der Gruppen A und B1 kleinere Genome als B2- oder D-Stämme (Clermont *et al.*, 2013). Unterschiede bestehen auch bezüglich ihrer ökologischen Nischen und ihrer Virulenz sowie in der Verteilung von Genen und Genkombinationen, die mit der Erzeugung von extraintestinalen Infektion assoziiert sind (Clermont *et al.*, 2013). Die meisten kommensalen *E. coli*-Stämme gehören der phylogenetischen Gruppe A an, wohingegen extraintestinal pathogene Stämme typischerweise den Gruppen B2 und D zugeordnet werden. Außerdem kodieren B2- und D-Stämme in den meisten Fällen für deutlich mehr Virulenzfaktoren als Stämme der Gruppe A oder B1 (Clermont *et al.*, 2000). Wenigstens zwei Studien deuten darauf hin, dass manche phylogenetische Gruppen bei bestimmten Probenmaterialien und Infektionen häufiger vorkommen als bei anderen (Yong *et al.*, 2009, Stolle *et al.*, 2013). Yong *et al.* konnten z. B. eine Häufung der Gruppe B2 unter den *E. coli*-Isolaten aus menschlichem Urin nachweisen (Yong *et al.*, 2009).

Mit der Methode des *Multilocus Sequence Typing* (Multilocus-Sequenztypisierung; MLST) ist heute eine Differenzierung von *E. coli*-Bakterien möglich, die phylogenetische Unterschiede viel feiner auflösen vermag als die oben genannte Differenzierung anhand der Enzymausstattung. Bei diesem Verfahren werden die Isolate anhand der DNA-Sequenzen von internen Abschnitten in 7 hochkonservierten, chromosomalen Genen des Basisstoffwechsels, sogenannten *Housekeeping*-Genen, klassifiziert. Für *E. coli* sind das die *Housekeeping*-Gene *adk* (Adenylat-Kinase), *fumC* (Fumarat-Hydratase), *gyrB* (DNA-Gyrase), *icd* (Isocitrat/Isopropylmalat-Dehydrogenase), *mdh* (Malat-Dehydrogenase), *purA* (Adenylosuccinat-Dehydrogenase) und *recA* (ATP/GTP *Binding Motif*). Die beim MLST analysierten Sequenzabschnitte haben im Durchschnitt eine Größe von 500 Basenpaaren. Von jedem Gen gibt es viele verschiedene Allele innerhalb der Spezies. Die bei einem Isolat an den fraglichen 7 Genloci konkret vorhandene Allel-Kombination, ergibt den sogenannten Sequenztyp (ST), zu dem dieses Isolat gehört. Mehrere STs können wiederum bestimmten ST-*Clustern* (STC) zugeordnet werden. STCs sind Gruppen von nahe verwandeten STs, die vermutlich ursprünglich aus einem einzigen Isolat bzw. ST hervorgegangen sind. Mit dem

MLST können Isolate unterschiedlicher Herkunft hinsichtlich ihrer Verwandtschaft und dadurch epidemiologische Fragen (z. B. Epidemien, Infektketten, Ansteckungsquellen, Erregerreservoir) beantwortet werden (Wirth *et al.*, 2006).

### 2.1.2 *Klebsiella pneumoniae*

*K. pneumoniae* gehört zu den Opportunisten innerhalb der Familie *Enterobacteriaceae*. Sie sind unbeweglich und viele Stämme können eine Polysaccharidkapsel ausbilden. *K. pneumoniae* ist ubiquitär (Erdboden, Gewässer, Vegetation) verbreitet. Als Krankheitserreger sind beim Menschen die drei *K. pneumoniae*-Subspezies *pneumoniae*, *ozaenae* und *rhinoscleromatis* bedeutend. Diese weisen nur geringes pathogenes Potential auf und verursachen Infektionen und Erkrankungen nur bei entsprechend disponierten Patienten, beispielsweise bei Individuen mit schweren, das Immunabwehr beeinträchtigenden Grunderkrankungen. Alle drei *K. pneumoniae*-Subspezies treten heutzutage in der Humanmedizin als Erreger nosokomialer Infektionen wie Wund- und Harnwegsinfekten, Pneumonien und Sepsen häufig in Erscheinung. Kapselbildung, Endotoxin, Adhäsionsantigene und Enterotoxine sind häufige Virulenzfaktoren. In der Tiermedizin ist nur *K. pneumoniae* ssp. *pneumoniae* von vorrangiger Bedeutung, da dieser Erreger bei Equiden entzündliche Genitalerkrankungen wie Endometritis, Cervicitis und Vaginitis auslöst, die bis zum Abort führen können. Bei Rindern ist *K. pneumoniae* als Ursache für Mastitiden bekannt während sie bei Hunden entzündliche Harnwegsinfekte verursachen können (Kayser, 2010; Rolle und Mayr, 2007).

## 2.2 Antibiotika

Antibiotika (von griech. ἀντί- anti- „anstelle, gegen“ und βίος bios „Leben“) sind von Pilzen und Bakterien auf natürlichem Weg produzierte oder im Labor synthetisch bzw. halbsynthetisch hergestellte Wirkstoffe, die in der Lage sind das Wachstum von prokaryonten Mikroorganismen zu hemmen oder diese abzutöten. Aus diesem Grund werden sie in der Human- und Tiermedizin zur Behandlung von bakteriellen Infektionserkrankungen angewendet. Hinsichtlich ihrer Wirkungsweise lassen sich zwei Wirkungstypen unterscheiden. Bei einem bakteriostatischen Wirkstoff werden die Bakterien in ihrer Vermehrung behindert, aber nicht abgetötet. Ein Wirkstoff mit bakteriziden Eigenschaften führt irreversibel zum Tod der Bakterien z. B. durch Lyse der Zellwand. In

beiden Fällen haben die Wirkstoffe einen Ansatzpunkt in der zellulären Struktur oder im Stoffwechsel der Bakterien der in humanen bzw. tierischen Zellen nicht existiert oder dort schlechter zugänglich oder weniger empfindlich ist (Forth und Aktories, 2005).

Je nach Wirkmechanismus bzw. Angriffsort unterscheidet man verschiedene Antibiotikagruppen. Die folgenden Abschnitte sollen einen Überblick über die wichtigsten Gruppen vermitteln. Die  $\beta$ -Laktam-Antibiotika werden wegen ihrer Relevanz für die in dieser Ph. D.-Thesis untersuchten Resistenzmechanismen intensiver besprochen.

### 2.2.1 $\beta$ -Laktam-Antibiotika

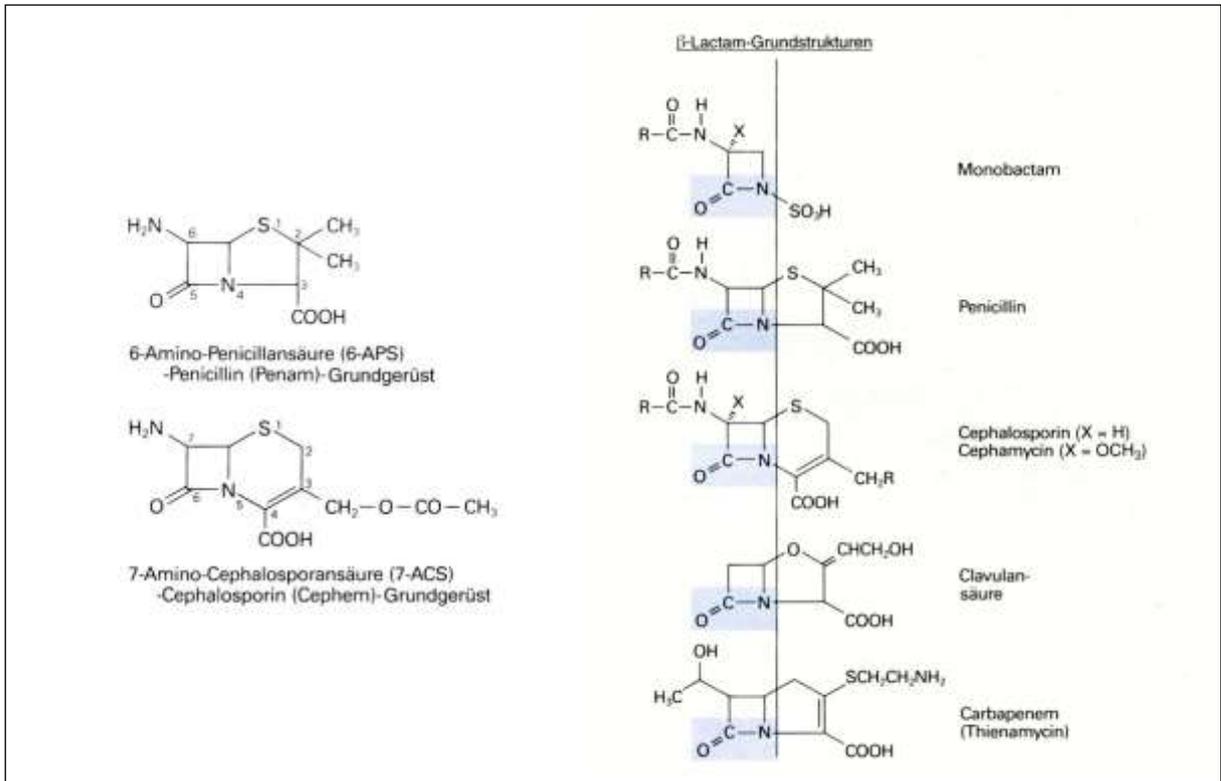
Das gemeinsame Charakteristikum dieser Antibiotikagruppe ist der namensgebende  $\beta$ -Laktamring in ihrer Molekularstruktur. Er ist das antibakteriell wirksame Zentrum, in dem er durch Acylierung das aktive Zentrum der bakteriellen Peptidoglykansynthetasen (Mureinsynthetasen) blockiert. Der Aufbau der bakteriellen Zellwand wird so blockiert. Anhand weiterer Molekülkomponenten des  $\beta$ -Laktamringes (u.a. Seitenketten) können insgesamt 4 Wirkstoffklassen unterschieden werden: die Penicilline, die Cephalosporine, die Monobactame und die Carbapeneme (Forth und Aktories, 2005).

Der Grundstoff der Penicilline wird aus Kulturen des Schimmelpilzes *Penicillium notatum/chrysogenum* gewonnen. Aus dem natürlichen Wirkstoff Penicillin G lässt sich durch enzymatischen Abbau 6-Amino-Penicillansäure (6-APS) herstellen (Abbildung 1). 6-APS dient dann als Ausgangsstoff der semisynthetischen Penicillin-Derivate. Das von *Cephalosporium acremonium* gebildete Cephalosporin C ist Ausgangsstoff für die Cephalosporine. Durch Hydrolyse wird hier die 7-Amino-Cephalosporinsäure (7-ACS) erzeugt (Abbildung 1). Sie dient als Basis zur Herstellung der therapeutisch eingesetzten semisynthetischen Substanzen (Forth und Aktories, 2005).

Carbapeneme unterscheiden sich von den Penicillinen durch ein C-Atom an Stelle des Schwefels in Position 1 und eine Doppelbindung im 5er-Ring.

Zusätzlich zu den Penicillinen und Cephalosporinen werden therapeutisch  $\beta$ -Laktamase-Inhibitoren wie Clavulansäure oder Tazobactam angewendet. Sie besitzen zwar keine direkte antibiotische Wirksamkeit, blockieren aber bestimmte bakterielle  $\beta$ -Laktamasen (Drawz und Bonomo, 2010). Die monocyclischen Monobactame werden von Gram-negativen Stäbchenbakterien wie *Chromobacterium violaceum* und *Acetobacter* sp. gebildet. Das therapeutisch angewendete Aztreonam ist aber vollsynthetisch (Forth und Aktories, 2005).

Carbapeneme und Monobactame sind in der Tiermedizin nicht zugelassen, da sie als Reserveantibiotika in der Humanmedizin verwendet werden (Frey, 2002). Die Grundstrukturen der  $\beta$ -Laktame sind in der Abbildung 1 abgebildet.



**Abbildung 1** Grundstrukturen therapeutisch eingesetzter  $\beta$ -Laktam-Verbindungen (Forth und Aktories, 2005)

### 2.2.1.1 Penicilline

Die Gruppe der Penicilline lässt sich in Benzylpenicilline, Aminopenicilline, Isoazolylpenicilline (Penicilline mit Penicillinase-Resistenz), Oralpenicilline und Acylaminopenicilline unterteilen. Benzylpenicillin (Penicillin G) wird meist in Form seines Natriumsalzes eingesetzt. Sein Wirkungsspektrum umfasst überwiegend Gram-positive Bakterien wie z. B. *Staphylococcus aureus* (Forth und Aktories, 2005).

Durch die Einführung von Aminoresten in der Benzylseitenkette wurde das Wirkungsspektrum der Penicilline auf Gram-negative Keime ausgeweitet. Die sogenannten Aminopenicilline zeigen Wirksamkeit gegen Salmonellen, *E. coli*, *Proteus mirabilis* und Listerien. Allerdings sind sie nicht unempfindlich gegen Penicillinasen. Der Prototyp der Gruppe ist das Ampicillin, welches wie das Amoxicillin zur Behandlung von Tieren, heutzutage häufig verwendet wird (Mateus *et al.*, 2011; Forth und Aktories, 2005).

Der bekannteste Vertreter der Isoazolylpenicilline ist Oxacillin. Diese Gruppe ist gegen  $\beta$ -Laktamase-produzierende Staphylokokken bis zu 250-fach besser wirksam als Benzylpenicillin, da eine heterocyclische Seitenkette den Angriff der  $\beta$ -Laktamase auf den  $\beta$ -Laktamring erschwert. In der Humanmedizin wird Flucloxacillin gegen Penicillinase-bildende Staphylokokken eingesetzt. In der Tiermedizin sind die Wirkstoffe Oxa-, Cloxa- und Dicloxacillin zur Behandlung von Mastitiden durch Gram-positive Kokken gebräuchlich.

Die nachfolgend beschriebenen Wirkstoffe werden fast nur in der Humanmedizin eingesetzt und sind in der Tiermedizin, mit Ausnahme von Penicillin V, nicht zugelassen. Die Gruppe der Oralpenicilline (Penicillin V, Propicillin, Acidocillin) wurde durch die Einführung einer Sauerstoffbrücke in der Seitenkette säurefest. Die Carboxypenicilline Carbenicillin und Ticarcillin sind nicht gegen Gram-positive Kokken wirksam (Frey, 2002).

Die wichtigsten Vertreter der Acylaminopenicilline sind Piperacillin, Azlocillin und Mezlocillin. Sie sind sowohl wirksam gegen Gram-positive Erreger, als auch gegen *Enterobacteriaceae* und Pasteurellen (Frey, 2002).

#### **2.2.1.2 Cephalosporine**

Ursprünglich basierten Cephalosporine auf Substanzen die von *Cephalosporium acremonium* gewonnen wurden. Inzwischen wurden allerdings auch Wirkstoffe aus den Produkten von *Streptomyces*-Arten oder auf der Basis von vollsynthetischen Substanzen entwickelt. Aus klinisch-therapeutischer Sicht können die Cephalosporine in parenteral zu verabreichende Stoffe mit oder ohne  $\beta$ -Laktamasestabilität und oral zu verabreichende Substanzen eingeteilt werden. Pharmakologisch lassen sich die Cephalosporine nach ihrem *in-vitro*-Wirkungsspektrum in 5 Generationen einteilen. Zu den Cephalosporinen der 1. Generation zählen die Wirkstoffe Cefalotin, Cefalexin, Cefazolin und Cefadroxil. Sie sind wirksam gegen *S. aureus* (auch bei Penicillinresistenz), Streptokokken, *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Pasteurella* und Salmonellen. Intrinsische Resistenzen gegen diese Substanzen zeigen *Pseudomonas* und *Enterobacter* spp.. Die Cephalosporine der 2. Generation wie Cefalozin, Cefuroxim und Cefoxitin haben deutlich größere Wirksamkeiten im Gram-negativen Bereich. Die Wirkstoffe der 3. Generation (Ceftiofur, Ceftriaxon und Cefoperazon) decken ein breites Spektrum Gram-negativer und Gram-positiver Bakterien ab. Cephalosporine der 4. Generation wie das Cefepim sind deutlich  $\beta$ -Laktamase stabiler und haben nur eine geringe Gram-positive Wirksamkeit (Page, 2004; Frey, 2002). Ceftobiprol ist der bislang einzige zugelassene

Wirkstoff der 5. Generation Cephalosporine, die auch als Anti-MRSA Cephalosporine bezeichnet werden. Sie haben im Gegensatz zu den Cephalosporinen der 1. und 2. Generation eine deutlich verbesserte Wirksamkeit gegen Gram-positive Erreger, insbesondere MRSA. Ihre Wirkung gegen Gram-negative Erreger ist vergleichbar mit der von Cephalosporinen der 3. Generation, einschließlich erhöhter Stabilität gegen viele  $\beta$ -Laktamasen (Lovering *et al.*, 2012).

### 2.2.2.3 Carbapeneme

Von allen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika besitzen Carbapeneme das breiteste Wirkungsspektrum gegen Gram-negative und Gram-positive Erreger. Der Aufbau der Carbapeneme ähnelt dem der Penicilline, allerdings wurde Schwefel durch Kohlenstoff am C-1 ersetzt und eine Doppelbindung zwischen C-2 und C-3 eingeführt. Eine Hydroxyethyl-Seitenkette am C-6 unterscheidet das erste Carbapenem Thienamycin radikal von Penicillinen und Cephalosporinen, die dort eine Acylaminogruppe tragen. Diese Seitenkette ist entscheidend für die Natur der Carbapeneme und bedingt deren Wirksamkeit. Aus dem Naturstoff Thienamycin, der in dem Bakterium *Streptomyces cattleya* entdeckt worden ist, wurden im Laufe der Zeit mehrere Abkömmlinge wie Imipenem und Panipenem entwickelt, die deutlich stabiler in wässriger Lösung sind. Imipenem war das erste Carbapenem, das für die Behandlung komplexer mikrobieller Infektionen eingesetzt werden konnte. Weitere heute verfügbare Carbapeneme sind Meropenem, Ertapenem und Doripenem. Ihre größte Wirksamkeit zeigen sie gegen Erreger des Gram-negativen Spektrums (Papp-Wallace *et al.*, 2011).

### 2.2.2 Chinolon-Antibiotika

Chinolone gehören der Gruppe der bakteriziden Antibiotika an. Ursprüngliche Ausgangssubstanz ist die heutzutage als Therapeutikum nicht mehr angewendete Nalidixinsäure. Chinolone unterscheiden sich hinsichtlich ihres (Chinolon-)Grundgerüsts und insbesondere in ihren Substituenten. Die Gruppe der Fluorchinolone hat z. B. einen Fluor-Substituenten der ihre Aktivität gegen Bakterien deutlich verbessert. Das Ziel der Chinolone sind die bakteriellen DNA-Topoisomerasen vom Typ II (Gyrase) und vom Typ IV. Beide Enzyme sind in die Spiralisierung der DNA involviert. Durch Einsatz eines Chinolonpräparates wird die Spiralisierung der bakteriellen DNA verhindert, wodurch nach und nach die

Chromosomenlänge zunimmt. Daher kann die DNA nicht mehr richtig abgelesen und vervielfältigt werden, was letzten Endes zum Absterben der Bakterienzelle führt. Die Gruppe der Chinolone kann in 4 Substanzklassen mit unterschiedlichem Wirkungsspektrum (Gram-negativ und Gram-positiv) eingeteilt werden. Typische Vertreter sind Ciprofloxacin, Enrofloxacin und Levofloxacin (Frey, 2002; Forth und Aktories, 2005).

### **2.2.3 Makrolid-Antibiotika**

Makrolide sind bakteriostatisch wirkende Antibiotika. Die Bezeichnung Makrolid ist eine Kurzform und gilt eigentlich nur für das in allen Makrolidantibiotika vorhandene Makrolidmolekül. Dabei handelt es sich um ein Lacton mit 12-18 Gliedern, an das verschiedene Zucker gebunden sind. Makrolidantibiotika hemmen die bakterielle Proteinbiosynthese durch Anlagerung an die 50S-Untereinheit der Ribosomen. Dabei wird die bakterielle Proteinsynthese durch Hemmung der Translokase verhindert. Durch diesen Wirkmechanismus werden vor allem proliferierende Bakterien getroffen. Das Erregerspektrum umfasst Gram-positive Kokken und Stäbchen sowie Gram-negative Kokken. Zu den Makroliden zählen Erythromycin und Spiramycin sowie das halbsynthetische Azithromycin (Frey, 2002; Forth und Aktories, 2005).

### **2.2.4 Aminoglykosid-Antibiotika**

Die Aminoglykoside sind eine uneinheitliche Gruppe verschiedener Oligosaccharid-Antibiotika. Bei dieser Gruppe sind zwei oder mehr Zucker- bzw. Aminozykermoleküle durch eine Glykosidbindung miteinander verknüpft. Die bakteriziden Aminoglykoside binden an die 30S-Unterheit der Ribosomen und induzieren dort Fehlablesungen an der mRNA. Auf diese Weise kommt es zur Produktion fehlerhafter Proteine, was in der Folge zum Tod des Bakteriums führt. Durch ihr breites Wirkungsspektrum können Aminoglykoside gegen viele bakterielle Infektionen angewendet werden. Wichtige Vertreter sind Streptomycin, Tobramycin und Neomycin sowie Gentamicin und Amikacin (Frey 2002, Forth und Aktories 2005).

### **2.2.5 Tetracyclin-Antibiotika**

Die Leitsubstanz dieser Antibiotikagruppe wurde ursprünglich ebenfalls aus Bakterien der Gattung *Streptomyces* isoliert. Chlortetracyclin und Oxytetracyclin waren die zuerst

gewonnenen Substanzen. Die heute in der Medizin verwendeten Tetracycline sind chemisch modifizierte Derivate. Tetracycline wirken bakteriostatisch indem sie die Anlagerung der Aminoacyl-t-RNA an die 30S-Untereinheit der bakteriellen Ribosomen verhindern. Dadurch kommt es im Rahmen der Proteinsynthese zum vorzeitigen Abbruch der wachsenden Peptidkette. Diese Beeinträchtigung der Proteinbiosynthese führt schließlich zum bakteriellen Zelltod. Tetracycline sind sowohl gegen Gram-positive als auch Gram-negative Bakterien und sogar gegen obligat zellwandlose Bakterien wie die Mykoplasmen wirksam. In der Anwendung befindliche Tetracycline sind Doxycyclin und Minocyclin (Frey, 2002; Forth und Aktories, 2005).

### **2.3 Resistenzgen-tragende mobile genetische Elemente**

Der Verbreitung von Resistenzen innerhalb der Familie der *Enterobacteriaceae* liegen verschiedene molekulare Mechanismen des horizontalen Gentransfers und der DNA-Rekombination zu Grunde. Diese Mechanismen beschleunigen zusammen mit dem hohen Selektionsdruck, der durch den massiven Einsatz von antimikrobiellen Wirkstoffen in der Human- und Tiermedizin auf Bakterienpopulationen ausgeübt wird, die Entstehung und Ausbreitung von resistenten und multiresistenten Erregervarianten. Neben dem Austausch der Antibiotikaresistenz-kodierenden Plasmide durch Konjugation erfolgt die Weiterverbreitung auch durch Transposons, Genkassetten und Bakteriophagen. Diese Vielzahl an unterschiedlichen und auf ihre Weise sehr effektiven Mechanismen sind mit ein Grund für die rasche Ausbreitung resistenter Bakterien. In ihrer Gesamtheit werden sie als mobile genetische Elemente (MGE) bezeichnet (Brown-Jaque *et al.*, 2015).

#### **2.3.1 Plasmide**

Plasmide sind kleine ringförmige DNA-Stücke, die innerhalb der Bakterienzelle unabhängig vom Chromosom existieren und sich autonom replizieren. Plasmide tragen üblicherweise Gene, die vom Bakterium nicht zwangsläufig für sein Überleben oder seine Reproduktion benötigt werden. Die auf dem Plasmid kodierten Gene können unter ungünstigen Umweltbedingungen, z. B. bei Exposition gegenüber Antibiotika, aber von Vorteil sein. R-Plasmide sind eine spezielle Klasse von Plasmiden, die Gene für Antibiotikaresistenzen (z. B.  $\beta$ -Laktamase-Gene) tragen. Diese Plasmide können wie das F-Plasmid sehr leicht durch Konjugation auf andere Bakterienzellen übertragen werden. Sie können eine große Anzahl

von Genen tragen, die Resistenzen gegen Antibiotika und/oder Metallionen vermitteln (Campbell, 2009).

Die Übertragung eines Plasmides von einer auf eine andere Bakterienzelle erfolgt mittels Konjugation. Als Konjugation bezeichnet man den direkten Transfer genetischen Materials (meist Plasmiden) zwischen zwei Bakterienzellen, die sich dazu vorübergehend verbunden haben. Dieser Mechanismus dient der genetischen Rekombination. Der Transfer genetischer Information verläuft gerichtet, indem eine Zelle als Spender (Donor) und eine Zelle als Empfänger fungiert. Der DNA-Donor besitzt Zellfortsätze, die sogenannten Sexpili, mit denen er sich mit dem Empfänger verbindet. Nachdem der Kontakt mit einer anderen Zelle stattgefunden hat, zieht sich der Pilus zusammen und verbindet so beide Zellen miteinander. Es kommt zur Ausbildung einer temporären Zytoplasmabrücke, welche für den DNA-Transfer benutzt wird. Die Fähigkeit, Sexpili auszubilden, beruht auf der Anwesenheit des sogenannten F-Plasmids (F für Fertilität), das ungefähr 25 Gene enthält, die zur Ausbildung der Sexpili benötigt werden. Das Symbol  $F^+$  kennzeichnet eine Bakterienzelle, die ein F-Plasmid trägt, wohingegen  $F^-$  die Abwesenheit des F-Plasmides kenntlich macht (Campbell, 2009).

### 2.3.2 Transposons

Transposons, auch „transponierbare genetische Elemente“ genannt, sind mobile genetische Elemente, die sich von einer Position im Genom zu einer anderen verschieben können. (Hayes, 2003) Sie replizieren im Gegensatz zu Plasmiden nicht selbstständig. Ihre Transposition beruht auf der Rekombination zwischen dem Transposon und seiner Zielsequenz (*target*) in einem Plasmid oder in einem bakteriellen Chromosom. Innerhalb einer Bakterienzelle kann dies zur Transposition zwischen einzelnen Genomabschnitten, aber auch zur Transposition zwischen dem Chromosom und Plasmiden führen. Man kann die konservative Transposition von der replikativen Transposition unterscheiden. Bei der konservativen Transposition werden die Gene des Transposons nicht dupliziert und an einer anderen Position des Genomes wieder eingebaut. Daher bleibt die Anzahl der vorhandenen Genkopien konstant (konserviert). Im Fall der replikativen Transposition repliziert sich das Transposon an seiner ursprünglichen Position und eine Kopie wird an anderer Stelle eingebaut. Der ursprüngliche Insertionsort bleibt also erhalten. Die Besonderheit der Transposons ist ihre Eigenschaft, keine spezifische Integrationsstelle zu besitzen, auch wenn

ihre Integration an bestimmten Stellen des Genoms häufiger stattfindet. Diese Tatsache unterscheidet sie von allen anderen genetischen Rekombinationsvorgängen. Bei der homologen Rekombination kommt es zum Austausch von Allelen DNA-Segmenten zwischen homologen Regionen der DNA. Die Integration von Plasmiden erfolgt im Allgemeinen an bestimmten Positionen des Genoms. Bei der Transposition werden DNA-Abschnitte an Orten eingebaut, an denen sie sich noch nie zuvor befunden haben. Die einfachsten und kleinsten Transposons werden als Insertionssequenz-(IS)-Elemente bezeichnet. Sie bestehen aus dem DNA-Abschnitt welcher für den Transpositionsvorgang verantwortlich ist. In diesem Abschnitt befindet sich auch das Gen für das Enzym Transposase, welches den gesamten Transpositionsvorgang katalysiert (Hayes, 2003; Campbell, 2009).

Das IS-Element wird von gegenläufigen, sich wiederholenden Endsequenzen (*inverted repeats*) flankiert. Es existieren zum heutigen Zeitpunkt zwei verschiedene Nomenklaturen. Ein System ordnet den Elementen einzelne Nummern zu (z. B. *IS1*) und das andere nennt zusätzlich noch die Anfangsbuchstaben der Spezies aus dem das Element isoliert wurde (z. B. *ISRm1* für *Rhizobium meliloti*) (Mahillon und Chandler, 1998). In Bezug auf ESBL-Gene sind die IS-Elemente *ISEcp1* and *ISCR1* oft mit bestimmten Genen verbunden. So zeigt *ISEcp1* eine Assoziation mit vielen *bla*<sub>CTX-M</sub>-Genen und *ISCR1* mit *bla*<sub>CTX-M-2</sub> oder *bla*<sub>CTX-M-9</sub>. Die CTX-M-kodierenden Gene liegen häufig in Multiresistenz-Regionen, die verschiedene Transposons und IS-Elemente enthalten. Diese Multiresistenz-Regionen können auf Plasmiden oder integriert in das bakterielle Chromosom vorliegen (Cantón und Coque, 2006).

### 2.3.3 Integrons und Genkassetten

Integrons sind genetische Elemente, die ein ortsspezifisches Rekombinationssystem enthalten, das in der Lage ist, spezifische DNA-Elemente, sogenannte Genkassetten, zu integrieren, exprimieren oder auszutauschen (Domingues *et al.*, 2012). Integrons können in bakteriellen Chromosomen, Plasmiden und Transposons gefunden werden. Da sie einen Promotor beinhalten, um die Genkassetten zu exprimieren, funktionieren Integrons als natürliche Klonsysteme und Expressionsvektoren (Kayser, 2010). Integrons bestehen aus 3 Elementen: dem Tyrosin-Rekombinase-Gen *intI* (Integrase) das für die ortsspezifische Rekombination im Integron benötigt wird, der angrenzenden Rekombinationsstelle (*AttI*) die von der Integrase erkannt wird und dem Promotor ( $P_c$ ), oberhalb der Integrationsstelle, der

für eine effiziente Transkription und Expression der im Intergon vorhandenen Genkassetten notwendig ist (Domingues *et al.*, 2012). Es können mehrere Genkassetten hintereinander inseriert werden (z. B. verschiedene Resistenzgene) und durch die Integrase kann es zu exzessiven Rekombinationen kommen, die auch den Verlust der Genkassette mit sich bringen können. Durch ihre Fähigkeit, neue Gene aquirieren zu können, spielen Integrons eine wichtige Rolle in der Evolution bakterieller Genome, Plasmide und Transposons (Collis *et al.*, 2002).

Genkassetten sind mobile genetische Elemente die neben einem kompletten Gen (üblicherweise ein Resistenzgen) eine spezifische Rekombinationsstelle (*59 base element*) enthalten. Sie liegen entweder als freie, zirkuläre DNA oder linear integriert in größerer „DNA-Moleküle“ (Plasmide, Chromosomen) vor. Sie sind nicht in der Lage sich selbst zu replizieren, haben kein Transpositionssystem und keinen Promotor. Ihre Transkription wird üblicherweise vom Promotor des jeweiligen Integrons eingeleitet (Collis und Hall, 1995).

#### **2.3.4 Bakteriophagen**

Bakteriophagen, auch Phagen genannt, sind Viren, deren natürlicher Wirt Bakterien sind. Durch den Rekombinationsmechanismus der Transduktion können auch sie zur Verbreitung von Resistenzgenen beitragen, da bei diesem Vorgang bakterielle DNA-Abschnitte von einer Wirtszelle auf eine andere übertragen werden können. Man unterscheidet die allgemeine und die spezielle Form der Transduktion. Bei der allgemeinen Transduktion wird während des lytischen Zyklus eines Phagen ein kleines DNA-Fragment der bakteriellen Wirtszelle anstelle des Phagen-genoms in das Phagenkapsid eingebaut. Obwohl der so entstandene Phage nicht voll funktionsfähig ist, kann er sich immer noch an eine neuer Wirtszelle anlagern und das DNA-Fragment in diese injizieren. Dort kann dieses dann in das Chromosom oder ein vorhandenes mobiles genetische Element integriert werden. Die Bezeichnung allgemeine Transduktion rührt daher, dass jedes beliebige Stück bakterieller DNA, das in einen Phagen gepackt wird, auch in eine andere Wirtszelle transportiert wird. Die spezielle Transduktion findet nur bei einer Bakterienzelle statt, die mit einem temperenten Phagen infiziert ist. Bei dieser Infektion ist ein Prophage an einer spezifischen Stelle in das Chromosom der Wirtszelle integriert. Wenn das Phagen-genom später aus dem Chromosom herausgeschnitten wird, können kleine Stücke bakterieller DNA mitgenommen werden, die dicht neben dem Integrationsort des Prophagen liegen. Auch in diesem Fall wird bei der Infektion einer neuen Wirtszelle die Bakterien-DNA zusammen mit dem

Phagengenom injiziert. Dieser Mechanismus wird spezielle Transduktion genannt, da hier nur spezifisch bakterielle DNA-Abschnitte übertragen werden, die nahe der Integrationsstelle des Prophagen liegen (Campell, 2009).

In der Literatur lassen sich viele Beispiele für die Mobilisierung und Übertragung von Resistenzgenen durch Bakteriophagen finden. So wurde nachgewiesen, dass P1-*like*-Phagen aus *E. coli* und P22-Phagen aus *Salmonellen*  $\beta$ -Laktamasegene tragen können (Billard-Pomares *et al.*, 2014; Schmieger *et al.*, 1999).

## 2.4 Beta-Laktamasen

Der enzymatische Wirkmechanismus der  $\beta$ -Laktamasen ist die Hydrolyse des  $\beta$ -Laktamringes. Die  $\beta$ -Laktamasen lassen sich nach dem aktiven Zentrum des Enzyms generell in zwei Gruppen einteilen: die Serin- $\beta$ -Laktamasen und die Metallo- $\beta$ -Laktamasen (Di Guilmi *et al.*, 2003, Kohlrausch und Holtje 1991). Serin- $\beta$ -Laktamasen hydrolysieren  $\beta$ -Laktame, indem sie einen Acyl-Enzym-Komplex mit dem Antibiotikum bilden, wodurch der  $\beta$ -Laktamring geöffnet wird. Bei der anschließenden Deacetylierung wird Wasser abgespalten und das Antibiotikum ist nicht mehr wirksam. Die Gene für diese  $\beta$ -Laktamasen waren ursprünglich chromosomal kodiert, inzwischen sind sie auch auf Plasmiden zu finden. Das Gen für eine  $\beta$ -Laktamase wird als *bla*-(*beta-lactamase*)-Gen bezeichnet. Im tiefergestellten Index wird dann der spezifische  $\beta$ -Laktamase-Typ/-Subtyp genannt. So bedeute z. B. *bla*<sub>CTX-M</sub> das es sich um ein  $\beta$ -Laktamasegen des CTX-M-Types handelt. Durch Punktmutationen entstehen sehr schnell neue Allele. Letztere wurden dann mit Zahlen benannt d. h. *bla*<sub>CTX-M-15</sub> steht für das Gen des Subtyps 15 der CTX-M- $\beta$ -Laktamase.

Mit dem Sprung auf Plasmide begann eine rasche Ausbreitung von  $\beta$ -Laktamasegenen innerhalb der Familie der *Enterobacteriaceae*. Inzwischen sind mehr als 1.000  $\beta$ -Laktamasen weltweit beschrieben worden (Lahey Clinic, 2014). Die große Zahl an  $\beta$ -Laktamasen mit gleichem Wirkmechanismus, aber unterschiedlichen Substratspektren, verschiedenen Empfindlichkeiten gegen  $\beta$ -Laktamase-Inhibitoren und unterschiedlicher Primärstruktur führte zur Entwicklung verschiedener Klassifizierungsschemata. Die heute am häufigsten verwendeten Schemata sind das System von Bush (Bush und Jacoby, 2010), welches auf der Aktivität der Enzyme gegen verschiedene  $\beta$ -Laktame beruht, und das System von Ambler (Ambler, 1980) welches die  $\beta$ -Laktamasen auf Basis ihrer Aminosäuresequenz in 4 Klassen (A, B, C und D) einteilt (Tabelle 1). Das System nach Bush teilt die  $\beta$ -Laktamasen ebenfalls in

4 Gruppen ein. Die Gruppe 1 enthält Cephalosporinasen der Molekülklasse C, die nicht durch Clavulansäure inhibiert werden. In Gruppe 2 sind Penicillinasen und Cephalosporinasen der Molekülklassen A und D, die durch Clavulansäure inhibiert werden, zu finden. Metalloenzyme, die der Molekülklasse B anhängen und nicht durch Clavulansäure inhibiert werden, sind in der Gruppe 3 zugeordnet. In Gruppe 4 sind Penicillinasen eingeordnet, die keiner Ambler-Molekülklasse anhängen und die nicht durch Clavulansäure inhibiert werden (Bush und Jacoby, 2010). Die Einteilung nach Ambler deckt sich mit der strukturellen Einteilung in Serin- (Gruppe A, C, D) und Metalloproteinasen (Gruppe B) (Ambler 1980).

#### **2.4.1 Wichtige Vertreter der *Extended-Spectrum* $\beta$ -Lactamasen (ESBL)**

*Extended-Spectrum*  $\beta$ -Lactamasen (ESBLs) sind bakterielle Enzyme, die in der Lage sind Penicillinderivate und Aminopenicilline sowie  $\beta$ -Laktame mit einer Oxyimino-Gruppe (z. B. Ceftazidim, Cefotaxim) und Monobaktame (Aztreonam) zu hydrolysieren. Allerdings sind sie nicht aktiv gegen Cephamycine und Carbapeneme und werden üblicherweise von  $\beta$ -Laktamase-Inhibitoren wie Clavulansäure gehemmt (Bush und Jacoby, 2010). Die meisten ESBLs gehören der Ambler-Klasse A und der Bush-Gruppe 2be an (Tabelle 1). Die Bezeichnung *Extended-Spectrum* beschreibt die Fähigkeit der ESBLs, ein weitaus breiteres Spektrum an  $\beta$ -Laktam-Antibiotika hydrolysieren zu können als die Enzyme (z. B. TEM-1, TEM-2 oder SHV-1), von denen sie abstammen.

##### **2.4.1.1 TEM-ESBLs**

Alle heute bekannten TEM-Typ- $\beta$ -Laktamasen sind Abkömmlinge der Subtypen TEM-1 und TEM-2. TEM-1 wurde erstmals 1965 von einem Patienten Namens Temoneira in Athen, Griechenland, isoliert und ist die erste bekannte Plasmid-kodierte  $\beta$ -Laktamase. Obwohl viele Vertreter des TEM-Typs den ESBLs anhängen, hydrolysieren Subtypen wie TEM-1, TEM-2, TEM-13 und TEM-55 nur Penicillinderivate wie Ampicillin oder Piperacillin (Livermore, 1995).

**Tabelle 1** Klassifikation der bakteriellen  $\beta$ -Laktamasen nach Bush und Ambler (Bush und Jacoby,2010)

Bush- Jacoby- Medeiros Gruppe	Molekulare Klasse (Subklasse)	Bevorzugtes Substrat	Hemmbar durch:		Repräsentative Enzyme
			CA <sup>a</sup>	EDTA	
1	C	Cephalosporine	-	-	<i>E. coli</i> AmpC, CMY-2, FOX-1
1e	C	Cephalosporine	-	-	GC1, CMY-37
2a	A	Penicilline	+	-	PC1
2b	A	Penicilline, Cephalosporine	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Penicilline, Schmal- und Breitspektrumcephalosporine, Monobaktame	+	-	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15
2br	A	Penicilline	+/-	-	TEM-30, TEM-36
2ber	A	Breitspektrumcephalosporine, Monobaktame	+	-	TEM-50
2c	A	Carbencillin	+	-	PSE-1, PSE-3,
2ce	A	Carbencillin, Cefepim	+	-	RTG-4
2d	D	Penicilline, Oxacillin	+/-	-	OXA-1 bis OXA-10
2de	D	Breitspektrumcephalosporine	+/-	-	OXA-11, OXA-15
2df	D	Carbapeneme	+/-	-	OXA-23, OXA-48
2e	A	Breitspektrumcephalosporine	+	-	CepA
2f	A	Carbapeneme	+/-	-	
3a	B (B1)	Die meisten $\beta$ -Laktame, Carbapeneme	-	+	IMP-1, VIM-1
	B (B3)				L1, CAU-1, GOB-1
3b	B (B2)	Carbapeneme	-	+	CphA, Sfh-1
(4)	Unbekannt				

<sup>a</sup>CA, Clavulanic acid (Clavulansäure)

#### 2.4.1.2 SHV-ESBLs

Die Bezeichnung SHV steht für *sulphydryl variable*. SHV-Enzyme stammen ursprünglich aus *Klebsiella* spp. und der Subtyp SHV-1 gilt gemeinhin als Ursprung aller heute bekannten Plasmid-kodierten SHV-Derivate (Livermore, 1995). Ebenso wie bei den TEM-Typ- $\beta$ -Laktamasen gehört der Großteil der SHV-Subtypen ebenfalls den ESBLs an. Nur der Subtyp SHV-1 vermittelt lediglich eine Resistenz gegen Breitbandpenicilline. Die ESBL SHV-2 ist bereits in der Lage das Cephalosporin Cefotaxim zu hydrolysieren. SHV-2 wurde

erstmals 1983 bei einem in Deutschland isolierten *Klebsiella ozaenae*-Stamm nachgewiesen (Paterson und Bonomo, 2005).

### 2.4.1.3 CTX-M-ESBLs

Bis in die späten 1990er Jahre waren TEM und SHV bei klinischen *Enterbacteriaceae*-Isolaten die vorherrschenden ESBLs. Inzwischen sind allerdings ESBLs vom CTX-M-Typ zahlenmäßig am bedeutendsten. CTX-M-Typ- $\beta$ -Laktamasen erhielten ihre Bezeichnung nach ihrer Fähigkeit, Cefotaxim (CTX) äußerst effektiv zu hydrolysieren. Daher kommt auch der synonyme Begriff Cefotaximase. Der Buchstabe M in „CTX-M“ steht für München, den Ort des ersten Nachweises einer Cefotaximase (Bauernfeind *et al.*, 1990). Phylogenetische Analysen lassen den Ursprung dieser Enzyme im Chromosom von *Kluyvera* spp. vermuten, von wo aus sie wahrscheinlich mit Hilfe von mobilen genetischen Elementen auf Plasmide übertragen wurden (Cantón *et al.*, 2012). Aktuell sind ungefähr 150 verschiedene CTX-M- $\beta$ -Laktamasen beschrieben (Lahey Clinic, 2014). Auf Grund ihrer Aminosäuresequenz kann man die verschiedenen Subtypen in 5 Gruppen einteilen (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 und CTX-M-25) (Pitout, 2010). Gruppe 1 und 2 entstammen höchstwahrscheinlich chromosomalen Genen von *Kluyvera ascorbata*, während der Ursprung der Gruppen 8, 9 und 25 in Genen von *Kluyvera georgiana* vermutet wird. Das Resistenzgen  $bla_{CTX-M}$  kann in verschiedenen mobilen genetischen Elementen gefunden werden, allerdings ist es gehäuft auf großen Multiresistenzplasmiden lokalisiert. Die Insertionssequenz *ISEcp1* ist oft in die initiale Mobilisation involviert, allerdings nicht zwangsläufig (Livermore *et al.*, 2006).

## 2.4.2 Andere $\beta$ -Laktamasen

### 2.4.2.1 OXA- $\beta$ -Laktamasen

Die OXA-Typ- $\beta$ -Laktamasen, auch Oxacillinasen genannt, werden der molekularen Klasse D und den funktionellen Gruppen 2d, 2de und 2df zugeordnet (Tabelle 1). Die Gruppe 2d enthält Penicillinasen, die Gruppe 2de ESBLs und die Gruppe 2df Carbapenemasen vom OXA-Typ. OXA-Typ-ESBLs haben das gleiche Substratspektrum wie TEM-, SHV- und CTX-M-ESBLs. Sie werden nicht von Clavulansäure gehemmt und sind in der Lage Oxacillin und Cloxacillin sehr effektiv zu hydrolysieren. Ursprünglich wurden sie in überwiegenderem Maße bei *Pseudomonas aeruginosa* und *Acinetobacter baumannii* nachgewiesen (Bradford, 2001),

inzwischen allerdings auch vermehrt bei anderen *Enterobacteriaceae*. Wie beschrieben gehören einige Vertreter dieser Gruppe, z. B. OXA-48, der Gruppe der Carbapenemasen an.

#### 2.4.2.2 AmpC- $\beta$ -Laktamasen

Nach der strukturellen Klassifikation von Ambler gehören AmpC- $\beta$ -Laktamasen der Klasse C an (Tabelle 1). Bei der funktionalen Klassifikation nach Bush werden sie der Gruppe 1 zugeordnet (Bush und Jacoby, 2010). Viele *Enterobacteriaceae* exprimieren ein chromosomal-kodiertes AmpC-Enzym, welches Resistenz gegen viele Penicilline, Cephalosporine und  $\beta$ -Laktam/ $\beta$ -Laktamase-Inhibitorkombinationen vermittelt. Ausgenommen von dieser Resistenz sind Cefepim, ein Methoxy-Imino-Cephalosporin, und Carbapeneme. Allerdings kann das *bla*<sub>AmpC</sub>-Gen, wie auch die ESBL-Gene, auch auf Plasmiden lokalisiert sein. Bei vielen Bakterien ist die Expression der AmpC-Enzyme durch den therapeutischen Einsatz von  $\beta$ -Laktamen induzierbar und infolge von Mutationen dann auf hohem Level möglich. Die induzierte Überexpression einer chromosomal-kodierten AmpC kann ein Grund für die unter der Antibiotikatherapie auftretende klinische Resistenz gegen Breitspektrum-Cephalosporine sein (Caroff *et al.*, 2000). Die Plasmid-kodierten AmpC- $\beta$ -Laktamasen treten inzwischen auch bei Bakterien auf, die kein oder zusätzlich ein nur schwach exprimiertes chromosomales *bla*<sub>AmpC</sub>-Gen besitzen wie *E. coli* oder *K. pneumoniae*. Typische Vertreter sind CMY, MOX, FOX und DHA (Pfeifer *et al.*, 2010). Ihr phänotypischer Nachweis ist allerdings deutlich schwieriger, als der Nachweis einer ESBL. Besonders schwierig ist die diagnostische Klassifikation eines Bakterienstammes, wenn in ihm chromosomal- und Plasmid-kodierte, induzierbare AmpC- $\beta$ -Laktamasen miteinander kombiniert sind. Auch Kombinationen aus AmpC (chromosomal- und/oder Plasmid-kodiert) und ESBL kommen immer häufiger vor und erschweren die genaue Identifikation des für die Resistenz eines Stammes verantwortlichen Mechanismus. Durch die erschwerte Diagnostik und geringe Prävalenz werden die AmpC- $\beta$ -Laktamasen häufig unterschätzt. Üblicherweise kann bei Erkrankungen, die durch einen AmpC-produzierenden Erreger verursacht sind, ätiologisch mit Carbapenemen interveniert werden.

#### 2.4.2.3 Carbapenemasen

Carbapenemasen sind  $\beta$ -Laktamasen mit der Fähigkeit Carbapeneme zu hydrolysieren. Sie sind strukturell heterogen und gehören deshalb verschiedenen  $\beta$ -Laktamase-Gruppen an. So

finden sich Carbapenemasen in der Einteilung nach Ambler sowohl in der Gruppe A (Serin- $\beta$ -Laktamasen) als auch in den Gruppen D (Oxacillinasen) und B (Metallo- $\beta$ -Laktamasen, MBL). Bei der Klassifizierung nach Bush sind sie in den Klassen 2df, 2f und 3 zu finden. Die Metallo-Carbapenemasen (Ambler-Gruppe B) wurden zunächst als molekulare Ursache der natürlich vorhandenen Carbapenem-Resistenzen bei Bakterien wie *Stenotrophomonas maltophilia* und *Bacillus cereus* bekannt. Generell kann die hydrolytische Wirkung von MBL mit Clavulansäure nicht gehemmt werden, wohl aber durch Chelatoren wie EDTA. Dies gilt auch für die Carbapenemasen in dieser Gruppe. In Deutschland und Europa häufig beobachtete Metallo-Carbapenemase-Typen sind KPC (*K. pneumoniae carbapenemase*), VIM (*Verona integron-encoded MBL*), IMP (IMP-Typ MBL) und die 2009 erstmals aufgetretene NDM-1 (Neu Dehli MBL) (Yong et al., 2009).

OXA-48-Carbapenemasen gehören zur Ambler-Klasse D und zur Bush-Gruppe 2df. Bekannte Carbapenem-Resistenz vermittelnde OXA-Enzyme sind OXA-23, OXA-48, OXA-51 und OXA-58. Am häufigsten treten diese Enzyme bei *Acinetobacter baumannii* auf und sind oft chromosomal kodiert (Walther-Rasmussen, 2006). Es sind aber auch Plasmid-kodierte OXA-Enzyme bei verschiedenen *Enterobacteriaceae* bekannt (Poirel et al., 2004). Diese Enzyme wurden lange Zeit nur bei *Enterobacteriaceae*-Isolaten von Menschen nachgewiesen. Mittlerweile hat man die Oxacillinase-Carbapenemase OXA-48 auch bei *K. pneumoniae*- und *E. coli*-Isolaten von Hunden (Stolle et al., 2013) sowie VIM-1 auch bei *Salmonella enterica*-Isolaten von Geflügel und Schweinen (Fischer et al., 2013) detektiert.

## 2.5 Plasmid-vermittelte Resistenz gegen Chinolone

Die häufigsten chromosomal-kodierten Resistenzmechanismen gegen Chinolone basieren auf Mutationen in den Genen der DNA-Gyrase/DNA-Topoisomerase und auf der vermehrten Bildung von *Multi Drug*-Efflux-Pumpen (Jacoby, 2005). Daneben beobachtet man bei *Enterobacteriaceae* aber auch immer öfter verschiedene Plasmid-kodierte Resistenzmechanismen, deren phänotypische Ausprägung man in der englischen Fachliteratur als *Plasmid-mediated Quinolone Resistance* (PMQR) bezeichnet (Guan et al., 2013).

### 2.5.1 Das Chinolon-Resistenzgen *qnr*

Die erste Form einer Plasmid-kodierten Resistenz wurde bei einem *K. pneumoniae*-Isolat in den USA entdeckt (Martínez-Martínez *et al.*, 1998). Das betreffende Resistenzgen *qnr* kodiert für ein 218 Aminosäuren (AS) langes *Pentapeptide Repeat*-Protein, welches in der Lage ist, die Hemmung der DNA-Gyrase und der DNA-Topoisomerase IV zu unterbinden (Tran, 2002). Inzwischen wurden mehrere Typen dieses *Quinolone Resistance-(qnr)*-Gens bei verschiedenen *Enterobacteriaceae* gefunden (Mammeri *et al.*, 2004). Die *qnr*-Gene werden in die Familien *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* und *qnrS* eingeteilt, die sich in der Nukleotidsequenz 40 % oder mehr voneinander unterscheiden. Ihre Genprodukte differieren daher teils deutlich in ihrer AS-Sequenz (Jacoby *et al.*, 2008). Die *qnr*-Gene sind häufig mit ESBL- und AmpC-Genen gekoppelt (Mayers *et al.*, 2009). Allerdings reicht das alleinige Vorkommen eines *qnr*-Gens nicht aus, um eine vollständige Resistenz gegen Chinolone zu vermitteln. PMQR-Gene induzieren in der Regel eine sogenannte Low Level-Chinolon-Resistenz (Martínez-Martínez *et al.*, 1998). Bei vielen Chinolon-resistenten Stämmen liegt mutmaßlich zusätzlich eine chromosomal bedingte Resistenz, klassischerweise eine Mutation des *gyrA*- oder *gyrB*-Genes, vor (Jacoby, 2005).

### 2.5.2 Das Chinolon-Resistenzgen *aac(6)-1b-cr*

Ein weiterer Mechanismus der PMQR, die der Resistenz von *Enterobacteriaceae* gegen Chinolone wie Ciprofloxacin und Norfloxacin zugrunde liegt, ist die enzymatisch katalysierte Acetylierung des Chinolonmoleküls. Für diesen Prozess die Inaktivierung ist die bakterielle Aminoglykosid-Acetyltransferase AAC(6′)-1b-cr verantwortlich, die von dem Gen *aac(6′)-1b-cr* kodiert wird. Das Enzym ist eine Variante der Aminoglykosid-Acetyltransferase AAC(6′)-1b, die mit dem Austausch von zwei Aminosäuren (Trp 102 → Arg, Asp 179 → Tyr) ihr Substratspektrum um die oben genannten Chinolone erweitert hat (Robicsek *et al.*, 2006).

### 2.5.3 Das Chinolon-Resistenzgen *qepA*

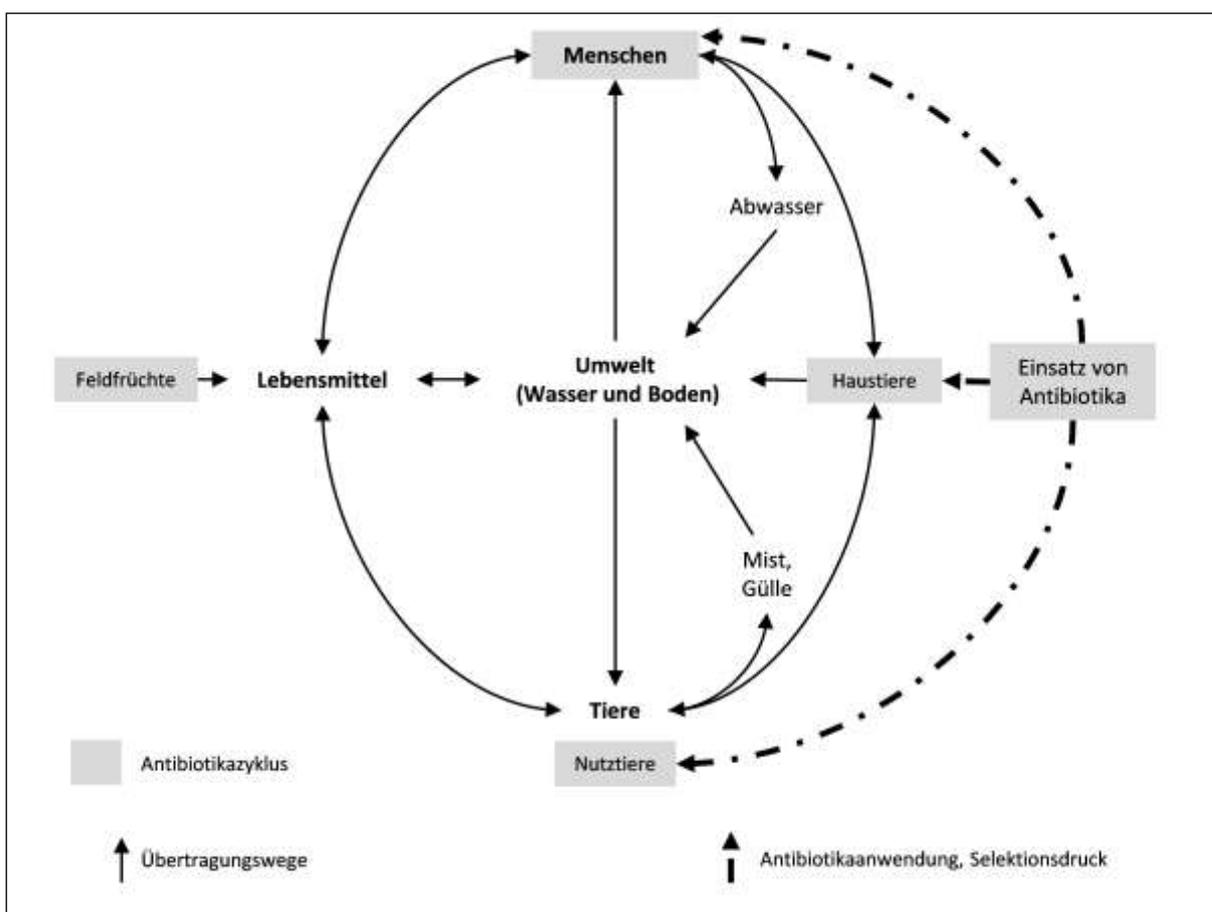
Das Gen *qepA* kodiert für die Effluxpumpe „Quinolone Efflux Pump A“ (QepA) und wurde erstmals bei einem *E. coli*-Isolat aus menschlichem Urin in Japan entdeckt (Yamane *et al.*, 2007). QepA gehört zu den Proteinen der „Major Facilitator Superfamily“ (MFS), der verschiedene Membrantransporter angehören (Perichon *et al.*, 2007). Die QEP

transportiert eingedrungene Chinolonmoleküle so schnell wieder aus der Bakterienzelle, dass das Bakterium durch diesen Wirkstoff nicht geschädigt wird (Yamane *et al.*, 2007).

## 2.6 Darstellung des Problems und Zielsetzung der Arbeit

Wie beschrieben sind multiresistente Gram-negative Bakterien weltweit als Erreger von nosokomial und ambulant erworbenen Infektionen von dramatisch zunehmender Bedeutung. Eine der hierbei wichtigsten Resistenzeigenschaften, nämlich die Resistenz gegen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika, ist vor allem auf den Erwerb von  $\beta$ -Laktamase-Gen-tragenden Plasmiden zurückzuführen (Dolejska *et al.*, 2013).  $\beta$ -Laktamase-produzierende Erreger, insbesondere ESBL-Produzenten, schränken die antibiotischen Therapieoptionen vor allem auf Intensivstationen und bei immunsupprimierten Patienten zunehmend ein. Die weltweit am häufigsten nachgewiesenen  $\beta$ -Laktamase-Typen sind TEM, SHV und CTX-M (Livermore, 2005). Da durch Mutationen stetig neue  $\beta$ -Laktamase-Varianten entstehen, sind heute bereits mehr als 1.000 Typen und Subtypen bekannt. ESBLs finden sich vor allem bei Angehörigen der Bakterienfamilie *Enterobacteriaceae*, am häufigsten bei *Klebsiella* spp., *E. coli* und *Enterobacter* spp. (Coque *et al.*, 2008a). Da ESBLs meist Plasmid-kodiert sind, können ihre Gene auch zwischen den Vertretern verschiedener *Enterobacteriaceae*-Spezies übertragen werden. Die Situation wird dadurch verschärft, dass ESBL-kodierende Plasmide neben dem ESBL-Gen meistens auch noch andere Resistenzgene (Fluorchinolon-Resistenz, Aminoglykosid-Resistenz etc.) sowie Faktoren tragen, welche die Mobilität der Resistenzgene verstärken (Partridge *et al.*, 2011). Durch letztere wird die Transposition der ESBL-Gene von Plasmid zu Plasmid, aber auch von einem Plasmid in das bakterielle Chromosom und umgekehrt, gefördert. Wenn das mobile, mit einem ESBL-Gen beladene genetische Element dann in ein konjugatives Plasmid integriert wird, kann sich das Gen per Konjugation schnell horizontal ausbreiten, wobei bakterielle Speziesgrenzen kein Hindernis darstellen. Das gleiche Plasmid lässt sich dann in verschiedenen Bakterienspezies nachweisen, welche alle ein ähnliches *in vitro*-Resistenzmuster zeigen (Yao *et al.*, 2014). Im Vergleich zu z. B. MRSA, der sich bei nosokomialen Ausbrüchen ausschließlich klonal ausbreitet, zeigt sich hierdurch ein anderes epidemiologisches Bild, da die Resistenz hier nicht nur von der Mutter- auf die Tochterzellen, sondern auch auf benachbarte Bakterien der gleichen oder verwandten Spezies übertragen werden können.

ESBLs werden zunehmend auch in Gram-negativen *Enterobacteriaceae* aus tierischem Probenmaterial nachgewiesen (Totsika *et al.*, 2011; Ewers *et al.*, 2010). Eine Übertragung von ESBL-kodierenden Bakterien, Plasmiden oder Genen von Menschen auf Tiere und umgekehrt wurde bereits in mehreren Studien diskutiert (Meyer *et al.*, 2012, Schmiedel *et al.*, 2014; Valentin *et al.*, 2014). So wurden von Schmiedel *et al.* und Valentin *et al.* die gleichen ESBL-Gene in untersuchten Human- und Tierisolaten gefunden. Accogli *et al.* gelang es 2013 identische CTX-M-1-kodierende IncI1-Plasmide bei Salmonellen-Isolaten von Menschen und *E. coli*-Isolaten von Hühner nachzuweisen (Accogli *et al.*, 2013).



**Abbildung 2** Hypothese zu den Hauptübertragungswegen von Antibiotikaresistenzgenen zwischen Menschen, Tieren, Lebensmitteln und der Umwelt (Joint Working Group of DARC and ARHAI, 2012)

Die Abbildung 2 zeigt eine Hypothese zu den Hauptübertragungswegen von Antibiotikaresistenzgenen. Im Zentrum steht dabei die Umwelt. Der Einsatz von Antibiotika bei Menschen und Tieren erzeugt einen Selektionsdruck auf die human- und tieradaptierte Bakterienpopulation und die dort jeweils vorhandenen Resistenzgen-tragenden Elemente (z. B. Plasmide oder Transposons). Auf diese Weise wird die Vermehrung von resistenten

Bakterien gefördert und das Verbleiben der Resistenzgen-tragende Elemente in dem dargestellten Kreislauf begünstigt. Über Abwässer und Dung (Mist, Gülle) gelangen diese in die Umwelt wo es zur horizontalen Übertragung der Resistenzgen-tragenden Elemente zwischen human- und tieradaptierter Bakterien kommen kann. Anschließend können diese Bakterien über Lebens- bzw. Futtermittel wieder von Menschen und Tieren aufgenommen werden und finden so erneut Zugang zu den jeweiligen Erregerkreisläufen (Mensch-Mensch, Tier-Tier). Zusätzlich zu diesem Weg können sie aber auch durch Mensch-Tier-Kontakt weiter verbreitet werden. Diese vielfältigen Möglichkeiten der Ausbreitung machen die Aufdeckung, Überwachung und Unterbrechung der Übertragungswege so schwierig.

Hauptziel der *Ph. D.*-Thesis ist die Untersuchung von Cephalosporin-resistenten *Enterobacteriaceae*-Isolaten von Menschen und Tieren aus dem geografischen Raum Mittelhessen auf vorhandener  $\beta$ -Laktamase-, ESBL- und PMQR-Typen. Im Fokus der gesamten Arbeit steht dabei der intensive Vergleich der Gruppe der Humanisolate mit der Gruppe der Tierisolate.

Um die Frage nach den beteiligten Bakterienspezies der human- und tieradaptierten Bakterienpopulation und deren Reservoir (z. B. Urogenitaltrakt, Magen-Darmtrakt) zu klären, werden die Häufigkeitsverteilungen der Cephalosporin-resistenten Isolate bezüglich des verwendeten Probenmaterials, der zugrundeliegenden Erkrankung der Patienten und der taxonomische Zugehörigkeit ermittelt werden.

Die zentrale Fragestellung der anschließenden molekulargenetischen Untersuchung wird sein, ob bei Cephalosporin-resistenten Isolaten von Menschen und Tieren, aus dem gleichen geografischen Raum, die gleichen ESBL-Typen bzw. –Subtypen gefunden werden können. Da ESBL-produzierende Erreger in vielen Fällen resistent gegen mehrere Antibiotika sind, werden die in dieser *Ph. D.*-Thesis untersuchten Isolate auf ihre Resistenz gegen repräsentative Vertreter der wichtigsten Antibiotikaklassen getestet werden. Auf diese Weise soll geklärt werden, bei welchen Isolaten es sich um multiresistente Erreger handelt und wie großer deren Anteil an den insgesamt untersuchten Cephalosporin-resistenten Isolaten ist. Da ESBL-Gene oft mit PMQR-Genen vergesellschaftet sind, werden alle Cephalosporin-/Ciprofloxacin-resistenten Isolate zusätzlich auf die Präsenz von PMQR-Genen überprüft. Anschließend werden alle Isolate auf Assoziationen zwischen ESBL- und PMQR-Genen untersucht werden, um Hinweise auf vorhandene Multidrug-Resistance-(MDR)-Kassetten/-Regionen und Plasmide zu bekommen.

Da sich ESBLs in der letzten Zeit vor allem bei der Spezies *E. coli* zu finden sind und nachweislich zu deren Ausbreitung beitragen, werden alle in der Studie vorhandenen *E. coli* den bekannten phylogenetischen Gruppen zugeordnet. Auf diese Weise soll ermittelt werden, ob ESBL-kodierende *E. coli* mit bestimmten phylogenetischen Gruppen assoziiert sind und ob diesbezüglich Unterschiede zwischen der Human- und Tierpopulation feststellbar sind.

Auf Grund der genannten Bedeutung der Spezies *E. coli* für die Ausbreitung von ESBL-Genen werden in einem weiteren Schritt 20 ausgewählte CTX-M-1- und CTX-M-15-kodierende *E. coli*-Isolate eingehender hinsichtlich verschiedener Eigenschaften charakterisiert werden. Ziel ist es die Resistenz- und Virulenzeigenschaften diese Isolate genauer zu untersuchen. Da ESBL-Gene klassischerweise auf Plasmiden zu finden sind, wird von allen Isolaten ein Plasmidprofil erstellt werden. Dieses wird Anzahl, Größe, Inc-Typ und auf dem Plasmid liegende Resistenzgene beinhalten. Zusätzlich dazu wird untersucht werden, ob Assoziationen zwischen bestimmten Resistenzgenen mit bestimmten Inc-Typen bestehen.

Da bis jetzt wenig über die Virulenz von ESBL-produzierenden *E. coli* bekannt ist, wird bei den 20 CTX-M-1- und CTX-M-15-kodierenden *E. coli*-Isolaten eine Untersuchung auf Virulenzgene bzw. Virulenz-assoziierte Gene durchgeführt werden. Anschließend wird die phänotypische Virulenz der *E. coli*-Isolate in einem Infektionsmodell mit der großen Wachsmotte *Galleria mellonella*, anhand des dort zu beobachtenden larviziden Effektes, bestimmt werden. Ziel ist es, in Kombination mit der Untersuchung auf Virulenzgene, Risikofaktoren für einen hohen larviziden Effekt im *Galleria mellonella*-Modell zu identifizieren.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Material**

##### **3.1.1 Bakterienstämme**

###### **3.1.1.1 Bakterienisolate von Menschen**

Die untersuchten Humanisolate (n = 200) wurden der Stammsammlung des Instituts für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen, entnommen. Alle Isolate waren in den Jahren 2009 bis 2010 im Rahmen der Routinediagnostik von Patienten des Universitätsklinikums isoliert worden. Unter den verwendeten Isolaten befanden sich solche, die von erkrankten Patienten stammten, und solche, die bei der gezielten Untersuchung auf ESBL-Besiedelung gefunden worden waren. Für die Erstellung einer anonymisierten Stammsammlung im Rahmen der Doktorarbeit lag ein positives Votum der Ethikkommission des Fachbereichs Medizin sowie eine positive Stellungnahme der Rechtsabteilung des UKGM vor.

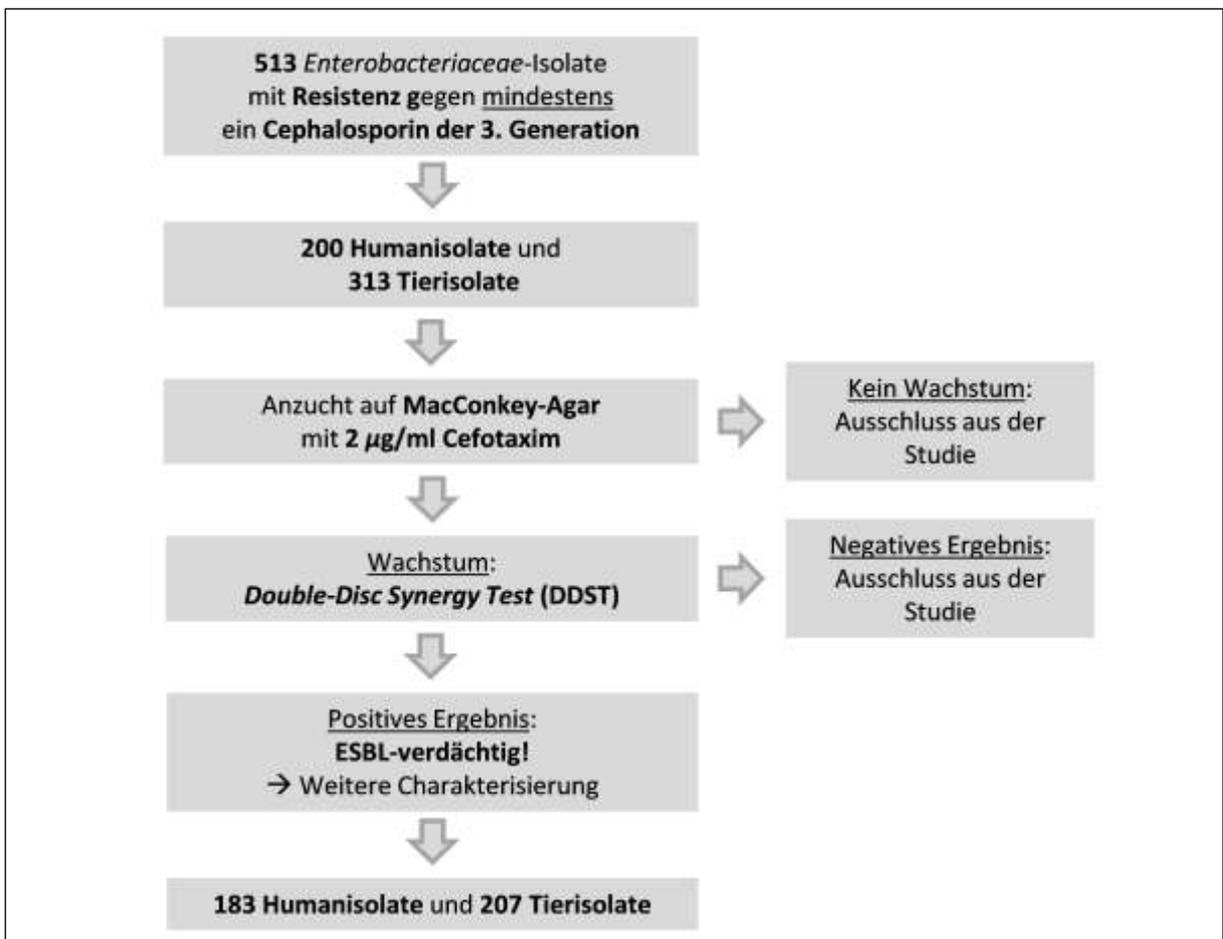
###### **3.1.1.2 Tierische Bakterienisolate**

Die Tierisolate (n = 313) gehörten zur der Stammsammlung des Institutes für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der JLU Gießen. Im Zeitraum 2009 bis 2011 waren dort gezielt alle Gram-negativen Bakterienisolate archiviert worden, die sich auf MacConkey-Agar mit dem Zusatz von Cefotaxim (1 µg/ml) anzüchten ließen. Alle Isolate stammten von Tieren, die als klinisch kranken Patienten in den Tierkliniken der JLU vorgestellt worden waren.

###### **3.1.1.3. Auswahl der Isolate**

Zu Beginn standen insgesamt 513 Isolate (Humanisolate: n = 200, Tierisolate: n = 313) mit einer vorberichtlichen phänotypischen Resistenz gegen ein oder mehrere Cephalosporine der 3. Generation zur Verfügung. Die Resistenz war per Plattendiffusionstest in den Diagnostiken der Institute für Medizinische Mikrobiologie und für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere ermittelt worden. Nach ihrer Reinkultivierung wurde versucht, die Isolate auf MacConkey-Agar mit dem Zusatz von 2 µg/ml Cefotaxim anzuzüchten. Isolate, die auf diesem Agar nicht anwuchsen, wurden aus der Studie

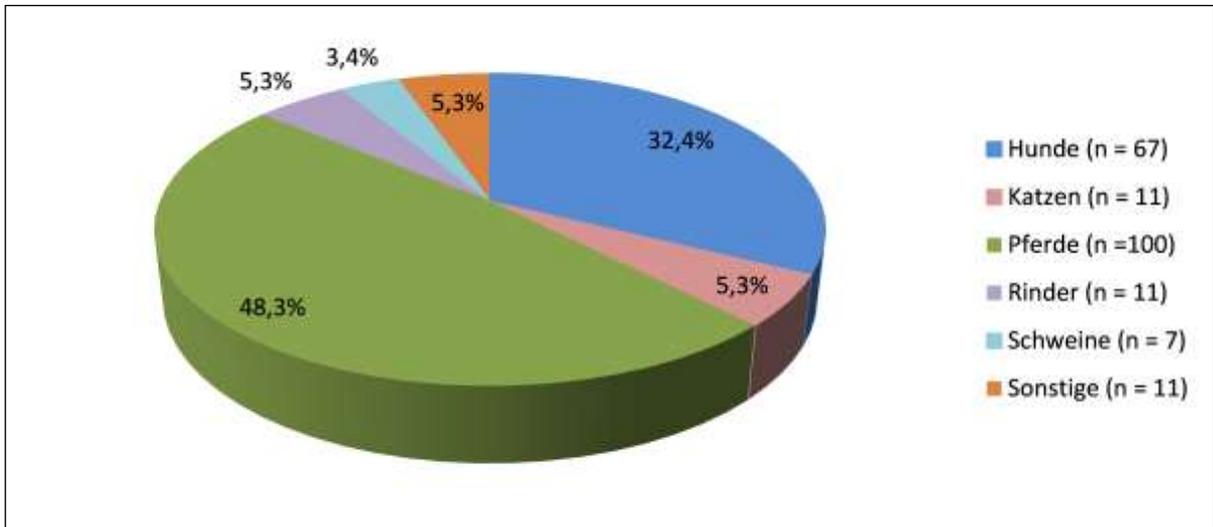
ausgeschlossen. Anschließend wurde der *Double-Disc Synergy Test* (DDST) durchgeführt, um ESBL-Produzenten phänotypisch zu identifizieren. Nur die 390 DDST-positiven Isolate (Humanisolate: n = 183, Tierisolate: n = 207) und wurden weitergehend bearbeitet und in die Stammsammlung für diese *Ph. D.*-Thesis aufgenommen. Isolate ohne positives Ergebnis im DDST wurden ebenfalls aus der Studie ausgeschlossen.



**Abbildung 3** Schematische Darstellung der Selektion der ESBL-verdächtigen Human- und Tierisolate

Eine detaillierte Auflistung der insgesamt 390 DDST-positiven und damit ESBL-verdächtigen Isolate (befindet sich im Anhang der vorliegenden *Ph.D.*-Thesis (Tabellen 32 und 33)). Die Abbildung 3 zeigt das Schema des Auswahlprozesses. Die 183 DDST-positiven Humanisolate stammten zu 30,1 % von ambulant behandelten Patienten und zu 69,9 % von stationär aufgenommenen Patienten. Die Bezeichnungen ambulant und stationär bedeuteten in diesem Fall einen Krankenhausaufenthalt von  $\leq 24$  Stunden bzw.  $> 24$  Stunden. Eine Unterscheidung zwischen Infektion und Besiedelung durch ESBL-bildende Bakterien war auf Grund der anonymisierten Patientendaten nicht möglich. Die 207 DDST-positiven Tierisolate

waren von klinisch kranken Hunden, Katzen, Pferden, Rindern, Schweinen und Tieren einiger anderer Arten isoliert worden (Abbildung 4).



**Abbildung 4** Verteilung der DDST-positiven Tierisolate nach ihrer Herkunft. Gesamtanzahl der Isolate n = 207. Sonstige Tierisolate: Kaninchen: 3, Meerschweinchen: 2, Kanarienvogel: 2, Ratte: 1, Maus: 1, Löwe: 1, Huhn: 1.

### 3.1.1.3 Referenzstämme

Die in Tabelle 2 aufgelisteten Referenzstämme wurden als Positivkontrollen für die durchgeführten PCRs verwendet.

**Tabelle 2** Übersicht über die verwendeten Referenzstämme

Stamm	Spezies	Herkunft	Relevante Eigenschaft
H59	<i>K. pneumoniae</i>	Laborstamm <sup>a</sup>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>aac</i> (6')-Ib
714	<i>K. pneumoniae</i>	Laborstamm <sup>a</sup>	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>
K12 MG1655	<i>E. coli</i>	DSMZ	Phylogenetische Gruppe A
V148	<i>Enterobacter cloacae</i>	Laborstamm <sup>a</sup>	<i>qnrA</i>
V167	<i>Enterobacter cloacae</i>	Laborstamm <sup>a</sup>	<i>qnrB</i>
V60	<i>K. pneumoniae</i>	Laborstamm <sup>a</sup>	<i>qnrD</i>
V61	<i>K. pneumoniae</i>	Laborstamm <sup>a</sup>	<i>qnrS</i>
613	<i>K. pneumoniae</i>	Laborstamm <sup>a</sup>	IncFIA
pCT119	<i>E. coli</i>	Transformant <sup>b</sup>	IncFIB
pCX2 <sup>b</sup>	<i>E. coli</i>	Transformant <sup>b</sup>	IncN
pCT71 <sup>b</sup>	<i>E. coli</i>	Transformant <sup>b</sup>	IncI1

<sup>a</sup>Vor der Verwendung als Positivkontrollen wurde das PCR-Amplikon dieser Stämme sequenziert um das vorhandene Resistenzgen mit Hilfe des NCBI BLASTn-Algorithmus exakt zu bestätigen.

<sup>b</sup>die Stämme wurden von Verbundpartnern zu Verfügung gestellt. Die Präsenz der Gene wurde bereits in den Partnerinstitutionen bestätigt.

### 3.1.2 Oligonukleotid-Primer

Die eingesetzten Oligonukleotid-Primer werden in den Tabellen 3 bis 7 aufgelistet. Sie wurden von der Firma Eurofins MWG/Operon (Ebersberg, Deutschland) bezogen.

**Tabelle 3** Übersicht über die für das MLST von *E. coli* verwendeten Primer

Name	Sequenz 5' → 3'	Nachweis von	Produkt (bp)	Annealing-Temperatur (°C)	Ref.
adkF	ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG	<i>adk</i>	583	54	1
adkR	CCGTCAACTTTCGCGTATTT				
fumCF	TCACAGGTCGCCAGCGCTTC	<i>fumC</i>	806	54	1
fumCR	GTACGCAGCGAAAAAGATTC				
gyrBF	TCGGCGACACGGATGACGGC	<i>gyrB</i>	911	60	1
gyrBR	ATCAGGCCTTCACGCGCATC				
icdF	ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA	<i>icd</i>	878	54	1
icdR	GGACGCAGCAGGATCTGTT				
mdhF	ATGAAAGTCGCAGTCTCGGCGCTGCTGGCGG	<i>mdh</i>	932	60	1
mdhR	TTAACGAACTCCTGCCCCAGAGCGATATCTTTCTT				
purAF1	TCGGTAACGGTGTGTGCTG	<i>purA</i>	816	54	1
purAF	CGCGCTGATGAAAGAGATGA				
purAR	CATACGGTAAGCCACGCAGA				
recAR1	AGCGTGAAGGTAACCTGTG	<i>recA</i>	780	58	1
recAF	CGCATTTCGCTTTACCCTGACC				
recAF1	ACCTTTGTAGCTGTACCACG				
recAR	TCGTCGAAATCTACGGACCGGA				

<sup>1</sup>Wirth *et al.* (2006)

**Tabelle 4** Übersicht über die für das *E. coli* Phylogenetic Typing verwendeten Primer

Name	Sequenz 5' → 3'	Nachweis von	Produkt (bp)	Annealing-Temperatur (°C)	Ref.
ChuA.1	GACGAACCAACGGTCAGGAT	<i>ChuA</i>	279	59	2
ChuA.2	TGCCGCCAGTACCAAAGACA				
YjaA.1	TGAAGTGTCCAGGAGACGCTG	<i>YajA</i>	211	59	2
YjaA.2	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC				
TspE4C2.1	GAGTAATGTCGGGGCATTCA	TspE4C2	152	59	2
TspE4C2.2	CGCGCCAACAAAGTATTACG				

<sup>2</sup>Clermont *et al.* (2000)

**Tabelle 5** Übersicht über die zum Nachweis der  $\beta$ -Laktamasegene verwendeten Primer

Name	Sequenz 5' → 3'	Nachweis von	Produkt (bp)	Annealing-Temperatur (°C)	Ref.
TEM_f	ATGAGTATTCAACATTTCCG	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	851	58	3
TEM_r	TTAATCAGTGAGGCACCTAT				
SHV_f	GCAAAACGCCGGTTATTC	<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	940	58	3
SHV_r	GGTTAGCGTTGCCAGTGCT				
CTX-M_f	TCTTCCAGAATAAGGAATCCC	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	909	60	4
CTX-M_r	CCGTTTCCGCTATTACAAAC				
OXA-1f	AGCAGCGCCAGTGATCA	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	700	56	5
OXA-1r	ATTCGACCCCAAGTTTCC				
OXA-48f	AAATCACAGGGCGTAGTTGTG	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	555	58	6
OXA-48r	GACCCACCAGCCAATCTTAG				

<sup>3</sup>Gröbner *et al.* (2009); <sup>4</sup>Kiratisin *et al.* (2008); <sup>5</sup>Guerra *et al.* (2000); <sup>6</sup>Fischer *et al.* (2013)

**Tabelle 6** Übersicht über die zum Nachweis der PMQR-Gene verwendeten Primer

Name	Sequenz 5' → 3'	Nachweis von	Produkt (bp)	Annealing-Temperatur (°C)	Ref.
qnrA_f	AGAGGATTTCTCACGCCAGG	<i>qnrA</i>	619	56	7
qnrA_r	GCAGCACTATKACTCCCAAGG				
qnrB_f	GGMATHGAAATTCGCCACTG	<i>qnrB</i>	264	57	8
qnrB_r	TTTGCGYGYCGCCAGTCGAA				
qnrC_f	GGGTTGTACATTTATTGAATC	<i>qnrC</i>	447	53	9
qnrC_r	TCCACTTTACGAGGTTCT				
qnrD_f	CGAGATCAATTTACGGGGAATA	<i>qnrD</i>	582	56	10
qnrD_r	AACAAGCTGAAGCGCCTG				
qnrS_f	GCAAGTTCATTGAACAGGCT	<i>qnrS</i>	428	58	8
qnrS_r	TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG				
qepA_f	CTGCAGGTAAGTGCATG	<i>qepA</i>	596	58	11
qepA_r	CGTGTTGCTGGAGTTCTTC				
aac_f	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	<i>aac(6')</i> -1b	482	60	12
aac_r	CTCGAATGCCTGGCGTGT				

<sup>7</sup>Chen *et al.* (2012); <sup>8</sup>Cattoir *et al.* (2007); <sup>9</sup>Wang *et al.* (2009); <sup>10</sup>Cavaco *et al.* (2009); <sup>11</sup>Cattoir *et al.* (2008); <sup>12</sup>Park *et al.* (2006)

**Tabelle 7** Übersicht über die für das *Plasmid-based Replicon Typing* verwendeten Primer

Name	Sequenz 5' → 3'	Nachweis von	Produkt (bp)	Annealing-Temperatur (°C)	Ref.
FIA_f	CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG	FIA Replikon	462	60	13
FIA_r	GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG				
FIB_f	GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG	FIB Replikon	702	60	13
FIB_r	CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT				
FII_s_f	CTGTCGTAAGCTGATGGC	FII Replikon	270	60	13
FII_s_r	CTCTGCCACAAACTTCAGC				
N_f	GTCTAACGAGCTTACCGAAG	N Replikon	559	60	13
N_r	GTTTCAACTCTGCCAAGTTC				
I1_f	CGAAAGCCGGACGGCAGAA	I1 Replikon	139	60	13
I1_r	TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT				

<sup>13</sup>Caratoli *et al.* (2005)

### 3.1.3 Chemikalien, Nährmedien, Puffer und Lösungen

Die verwendeten Chemikalien, Antibiotika, Nährmedien, Puffer und Lösungen sind in den Tabellen 8 bis 12 aufgelistet.

**Tabelle 8** Übersicht über die verwendeten Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Agarose NEO Ultra Qualität	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
EDTA	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Sigma Aldrich
Ethidiumbromid 1%	Carl Roth GmbH + Co. KG
Isopropanol	Sigma Aldrich
Natriumchlorid	Sigma Aldrich
<i>Pulsed Field Certified</i> Agarose	Bio-Rad, München, Deutschland
<i>Sodium N-Lauroylsarcosyl</i> (Sarcosyl) 10 %	Sigma Aldrich
TRIS	Carl Roth GmbH + Co. KG

Die MHK-Werte der in Tabelle 9 genannten Antibiotika wurden an den Bakterienisolaten und -stämmen mit Hilfe des VITEK®-2-XL-Vollautomatensystems (BioMérieux) und mit E-Teststreifen (Liofilchen) bestimmt. Die Tabelle 10 listet die verwendeten Antibiotikateststreifen und -karten auf. Zusätzlich vermerkt sind die für den DDST verwendeten Antibiotikatestplättchen und die zur Herstellung der Selektivmedien benötigten Antibiotikapulver.

**Tabelle 9** Übersicht über die in den MHK-Tests verwendeten Antibiotikagruppen

Antibiotikagruppe	Untergruppe	Wirkstoff
Aminoglykoside		Amikacin
		Gentamicin
β-Laktame	Aminopenicilline	Amoxicillin
	Cephalosporine	Cefotaxim
		Ceftazidim
		Cefepim
	Carbapeneme	Ertapenem
		Imipenem
Chinolone		Nalidixinsäure
	Fluorchinolone	Ciprofloxacin
Phenicole		Chloramphenicol
Tetracycline		Tetracyclin
Trimethoprim-Sulfonamid-Kombination		Trimethoprim-Sulfamethoxazol

**Tabelle 10** Übersicht über die verwendeten Antibiotika-Testplättchen, -streifen und -karten

Antibiotika	Hersteller
Amoxicillin/Clavulansäure Sensi Disc(30/10 µg)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Cefepim Sensi Disc (30 µg)	Becton Dickinson
Cefotaxim Sensi Disc (30 µg)	Becton Dickinson
Ceftazidim Sensi Disc (30 µg)	Becton Dickinson
Ceftriaxon Sensi Disc (30 µg)	Becton Dickinson
Cefotaxim Natrium Pulver	Fresenius SE & Co. KGaA, Bad Homburg ,Deutschland
Flucloxacillin Natrium Pulver	Stragen Pharma GmbH, Köln, Deutschland
<i>Antimicrobial Susceptibility Testing Cards: AST-N117</i>	BioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich
<i>MIC test strip Cefepime</i>	Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italien
<i>MIC test strip Chloramphenicol</i>	Liofilchem
<i>MIC test strip Nalidixic acid</i>	Liofilchem
<i>MIC test strip Ertapenem</i>	Liofilchem

**Tabelle 11** Herstellung und Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien

Wachstumsmedien	Hersteller
Luria-Bertani-(LB)-Medium	NaCl 5,00 g/l (Sigma Aldrich), Pankreatisches Pepton 10,00 g/l (Oxoid GmbH), Hefeextrakt 5,00 g/l (Becton Dickinson), eingestellt auf pH 7,0, autoklaviert bei 121 °C, 15 min
ESBL-MacConkey-Agar	50 g/l MacConkey-Agar (Merck KGaA) mit Zusatz von 2 µg/ml Cefotaxim (Fresenius SE & Co. KGaA)
ESBL-Testplatte	LB-Agar mit Zusatz von 200 µg/ml Fluocloxacillin (Stragen Pharma GmbH)
LB-Agar	LB-Medium (1l), Agar 15,00 g/l (Oxoid GmbH), eingestellt auf pH 7,0, autoklaviert bei 121 °C, 15 min
MacConkey-Agar	Merck KGaA
Müller-Hinton-Agar	Oxoid GmbH

**Tabelle 12** Herstellung und Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen	Hersteller/Zusammensetzung
TBE-Puffer-Stammlösung (10 x)	108 g TRIS (Sigma Aldrich), 55 g Borsäure (Sigma Aldrich), 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) (Sigma Aldrich), <i>ad</i> 1.000 ml mit <i>A. dest</i>
0,5 M EDTA pH 8	18,615 g EDTA (Sigma Aldrich), pH 8 mit NaOH (Carl Roth GmbH + Co. KG) eingestellt, <i>ad</i> 100 ml mit <i>A. dest</i>
1 M TRIS-HCl	121,14 g TRIS (Sigma Aldrich) <i>ad</i> 1.000 ml mit <i>A. dest</i>
Enzypuffer S <sub>1</sub> Nuclease	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, Hampshire, U.K.
BSA 10 mg/ml	New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland
Enzypuffer für <i>Sna</i> BI	New England Biolabs GmbH
Enzypuffer <i>Bts</i> CI (FokI)	New England Biolabs GmbH
Enzypuffer <i>Nde</i> I	New England Biolabs GmbH
Natriumchloridlösung 0,9 %	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
PCR-Laufpuffer	2,5 g Ficoll (Typ 400) (Carl Roth GmbH + Co. KG), 0,03 g Bromphenolblau (Sigma Aldrich), <i>ad</i> 10 ml mit <i>A. dest</i>
PCR-Puffer (10 x)	200 µl TRIS-HCl (pH 8,3) 200 mM, 20 µl KCl 250 mM (Carl Roth GmbH + Co. KG), 250 µl MgCl <sub>2</sub> 20 mM (Carl Roth GmbH + Co. KG), 50 µl Tween 20 0,5 % (Sigma Aldrich), 100 µl Gelatine 1 mg/ml (Carl Roth GmbH + Co. KG)
TE-Puffer (1X)	1,21 g TRIS (Sigma Aldrich), 3,72 g EDTA (Sigma Aldrich) pH 8 mit NaOH (Carl Roth GmbH + Co. KG) eingestellt, <i>ad</i> 1.000 ml mit <i>A. dest</i>
Zelllysepuffer für PFGE	25 ml 1 M Tris-HCl, 50 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) (Sigma Aldrich), 50 ml 10 % Sarcosyl (Sigma Aldrich), <i>ad</i> 500 ml mit <i>A. dest</i>

### 3.1.7 DNA-Marker

In der Gelelektrophorese wurden die in Tabelle 13 aufgelisteten DNA-Marker eingesetzt.

**Tabelle 13** Herkunft der verwendeten DNA-Marker

Marker	Hersteller
1 kb plus DNA Ladder	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Lambda Ladder PFG Marker	New England Biolabs GmbH
Low Range Marker PFGE	New England Biolabs GmbH

### 3.1.8 Enzyme

Die Tabelle 14 gibt eine Übersicht über die Herkunft und den Zweck der eingesetzten Enzyme.

**Tabelle 14** Übersicht über die eingesetzten Enzyme

Enzyme	Hersteller	Verwendungszweck
<i>Bts</i> CI (FokI)	New England Biolabs GmbH	Restriktionsverdau
Lysozym	Sigma Aldrich	Zellyse vor der PFGE
<i>Nde</i> I	New England Biolabs GmbH	Restriktionsverdau
Proteinase K	Carl Roth GmbH + Co KG	Proteinverdau vor dem rPFGE
S <sub>1</sub> Nuclease	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH	Restriktionsverdau
<i>Sna</i> BI	New England Biolabs GmbH	Restriktionsverdau
<i>Taq</i> Polymerase	Life Technologies	PCR

### 3.1.9 Kits

Tabelle 15 stellt die verwendeten Kits dar.

**Tabelle 15** Auflistung der eingesetzten Kits

Kits	Hersteller
<i>MASTDISCS</i> <sup>TM</sup> Amp Detection Set D69C	Mast Group Ltd., Reinfeld, Deutschland
<i>MASTDISCS</i> <sup>TM</sup> Carbapenemase Detection Set D70C	Mast Group Ltd.
<i>MSB</i> <sup>®</sup> Spin PCRapace	STRATEC Biomedical AG, Birkenfeld, Deutschland
<i>QIAquick</i> PCR Purification Kit	Qiagen N.V., Hilden, Deutschland
<i>ABI Prism</i> <sup>®</sup> BigDye <sup>®</sup> Terminator Cycle Sequencing Kit	Life Technologies GmbH
<i>PureLink</i> <sup>®</sup> Genomic DNA Kit	Life Technologies GmbH
<i>Nextera XT</i> Sample prep Kit	Illumina Netherlands, Eindhoven, Niederlande

### 3.1.10 Software

#### 3.1.10.1 Lokal ausführbare Software

- Analyse von DNA-Sequenzen: Seqman Pro (DNASTAR, Madison, Wisconsin, USA)
- Contig Assemblierung: Spades Version 3.0 (Bankevich *et al.*, 2012; St. Petersburg Academic University of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russland)
- Statistik-Programm: R (R Core Team, 2014, GNU General Public License)  
Zusätzlich geladene Workpackages: MASS, reshape2, survival, splines, grid, GGally

#### 3.1.10.2 Web-basierte Software und Ressourcen

- Zuordnung zu den *E. coli* Sequenztypen (STs):  
*Multi Locus Sequence Typing* (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>)
- Vergleich von eigenen Sequenzdaten mit bekannten Sequenzen:  
NCBI Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)
- Erstellung des *Minimum Spanning Trees*:  
(<http://pubmlst.org/>)
- Identifizierung von Plasmid-kodierten Resistenzgenen:  
*ResFinder* 2.1 (03. - 06.03.2014) (<https://cge.cbs.dtu.dk//services/ResFinder/>)
- Identifizierung von Inc-Typen:  
*PlasmidFinder* 1.2 (03. -06.03.2014)  
(<http://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>)
- Identifizierung von Virulenzgenen:  
*VirulenceFinder* 1.2 (03. - 06.03.2014)  
(<http://cge.cbs.dtu.dk/services/VirulenceFinder/>)  
*Virulence Factors of Pathogenic Bacteria* (03. - 06.03.2014)  
(<http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>)
- Erstellung der Heat Maps und Clustering der Resistenzgene:  
GENE-E (12.05.2014) (<http://www.broadinstitute.org/cancer/software/GENE-E/index.html>)

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Bakterienanzucht

Die Bakterienisolate und -stämme wurden unter einer Sterilwerkbank (Mikrobiologische Sicherheitskabine, Karl Bleyemehl Reinraumtechnik GmbH, Deutschland) mit einer sterilen Öse aus der Glycerinkultur der Stammsammlungen entnommen und anschließend auf MacConkey-Agar mit 2 µg/ml Cefotaxim ausgestrichen. Die Bebrütung der Platten erfolgte 16 h über Nacht bei 37 °C im Brutschrank (B6060 Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland).

### 3.2.2 Herstellung und Lagerung der Reinkulturen

Von jedem reinkultivierten Isolat wurde eine Glycerinkultur hergestellt. Dazu wurden in einen sterilen 100 ml-Erlenmeyer-Flasken 10 ml LB-Medium mit Zusatz von 2 µg/ml Cefotaxim abgefüllt und mit einer sterilen Öse 2 – 3 Kolonien eingerührt. Anschließend wurde dieser 100 ml-Erlenmeyer-Flasken in einem Schüttler (BBI – 8865027, Sartorius, Göttingen, Deutschland) bei 37 °C bebrütet. Nach 16 h Inkubation wurden 750 µl der ÜNK mit 750 µl BHI mit 60 % Glycerol in einer 2 ml Micro-Schraubröhre (Sarstedt Ag & Co., Deutschland) vermischt und bei -80 °C eingefroren.

### 3.2.3 Resistenztestung

Die minimale Hemmkonzentration (MHK) wurde mit zwei verschiedenen Methoden ermittelt. Ziel war es, eine möglichst große Breite verschiedener Antibiotikagruppen zu testen. Dabei wurde der Schwerpunkt auf die Prüfung von β-Laktamen gelegt. Die zu testenden Isolate wurden auf LB-Agar mit 2 µg/ml Cefotaxim ausgestrichen. Die Bebrütung erfolgte über Nacht bei 37 °C. Dann wurden 2 - 3 Kolonien in 3 ml 0,45 % NaCl suspendiert und anschließend auf eine Dichte von 0,5 McFarland ( $\cong 1,5 \times 10^8$  Kolonie-bildende Einheiten) eingestellt. Anschließend wurden das VITEK2-System und E-Teststreifen eingesetzt um die MHK zu bestimmen. Die Resistenztestung wurde für jedes Isolat nur einmal durchgeführt. Die Einteilung der Isolate in sensibel (S), intermediär (I) und resistent (R) erfolgte mit den vom *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) festgelegten Grenzwerten (EUCAST, 2012). Für die Antibiotika Nalidixinsäure und Tetrazyclin wurden die Grenzwerte des *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, (2012) verwendet, da EUCAST für diese Wirkstoffe bis jetzt keine Grenzwerte festgelegt hat.

### 3.2.3.1 VITEK2-System

Der VITEK® 2 XL (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich; in dieser Arbeit als VITEK-2 abgekürzt) ist ein Vollautomatensystem, das auch zur Ermittlung der MHK von Antibiotika gegenüber Bakterienisolaten dient. Dazu werden sogenannte AST-Karten (BioMérieux) verwendet, die im Wesentlichen eine miniaturisierte, verkürzte Version der geometrischen Verdünnungsreihe für die MHK-Bestimmung mit Hilfe der Mikrodilutionsmethode sind. Jede AST-Karte enthält 64 Nöpfchen, die genau bemessene Mengen spezifischer Antibiotika und Kulturmedium enthalten. Die hergestellte Testsuspension des fraglichen Bakterienisolates wird automatisch in die Karte eingesogen, versiegelt und in ein Inkubator-Karussell gesetzt. Das Gerät misst das Wachstum in den einzelnen Nöpfchen über einen Zeitraum von 24 h (VITEK 2 User Manual, 2008). Am Ende der Inkubationszeit werden anhand der gemessenen Wachstumsraten die MHK-Werte für jedes auf der Karte enthaltene Antibiotikum durch ein EDV-Expertensystem (*Advanced Expert System*) abgerufen. Das VITEK-2-System wurde in der vorliegenden *Ph.D.*-Thesis zur MHK-Bestimmung von Ampicillin, Ceftazidim, Cefotaxim, Imipenem, Gentamicin, Amikacin, Ciprofloxacin, Trimethoprim/Sulfmethoxazol und Tetracyclin eingesetzt.

### 3.2.3.2 E-Teststreifen

Der E-Test wurde nach Angaben des Teststreifen-Herstellers zur MHK-Bestimmung der Antibiotika Cefepim, Ertapenem, Chloramphenicol und Nalidixinsäure angewendet (*MIC Test Strip*, Liofilchen). Dazu wurde die Suspension des fraglichen Bakterienisolates mit einem sterilen Wattetupfer auf eine Müller-Hinton-(MH)-Platte ausgestrichen. Die Platte wurde dabei während des Ausstriches 3 Mal im 60°-Winkel gedreht und der Wattetupfer gleichmäßig darüber geführt. Die E-Teststreifen wurden mit Hilfe einer sterilen Pinzette in der Mitte der Platte aufgebracht. Die Bebrütung der Platten erfolgte für 16 h bei 37 °C. Die MHK wurde dort abgelesen, wo der Rand des elliptisch geformten Hemmhofs den Teststreifen schnitt (*MIC Test Strip*, Liofilchen).

### 3.2.4 Identifizierung von ESBL/AmpC Produzenten

#### 3.2.4.1 *Double-Disc Synergy Test (DDST)*

Die Durchführung des Testes erfolgte nach Vorgaben des *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) mit einer Modifikation nach Drieux *et al.* 2008 (CLSI, 2005; Drieux *et al.*, 2008). Die Bakteriensuspension für den DDST wurde in der gleichen Art und Weise wie für die MHK-Bestimmung mittels E-Test und VITEK-2-System hergestellt. Die Suspension wurde parallel auf eine MH-Platte und eine MH-Platte mit Zusatz von 200 mg/l Flucloxacillin ausgestrichen. Anschließend wurden 4 Antibiotikaplättchen mit einer sterilen Pinzette im Abstand von 1,5 cm auf die Platte aufgelegt. Folgende Antibiotika wurden verwendet: Ceftriaxon (30 µg), Ceftazidim (30 µg), Cefepim (30 µg) und Amoxicillin/Clavulansäure (30 µg/10 µg). Dabei wurde letzteres Plättchen in der Mitte der 3 anderen Plättchen positioniert. Die Bebrütung der Platten erfolgte über 16 h bei 37 °C. Bei der Auswertung wurde auf die Ausbildung der sogenannten *Ghost zone* geachtet. Diese wird als schlüssellochförmige Ausweitung der Hemmhöfe zwischen Ceftriaxon/Ceftazidim/Cefepim und dem Amoxicillin/Clavulansäure-Plättchen erkennbar. Als ESBL-Positivkontrolle wurde der Laborstamm *K. pneumoniae* H59 mit bestätigter ESBL-Produktion mitgeführt. Der Stamm *E. coli* K12 MG1655 diente als Negativkontrolle.

Die Verwendung der MH-Platten mit Flucloxacillin diente der Identifizierung von eventuell vorhandenen AmpC-Enzymen. Diese können die Präsenz von ESBLs verschleiern, da sie nicht empfindlich gegen Clavulansäure sind. Produziert ein Stamm gleichzeitig sowohl eine ESBL als auch eine AmpC-β-Laktamase, dann zeigt sich auf der normalen MH-Platte keine *Ghost zone*. Enthält die MH-Platte zusätzlich Flucloxacillin, wird die AmpC gehemmt und die durch eine ESBL verursachte Zone ist wieder sichtbar.

#### 3.2.4.2 **Phänotypischer AmpC- und Carbapenemasenachweis**

Das *MASTDISCS<sup>TM</sup> AmpC Detection Set D69C* wurde bei fraglichen AmpC-Ergebnissen im DDST verwendet. Dieser Kit dient speziell dem Nachweis der AmpC-Enzym-Produktion. Zusätzlich wurde das *MASTDISCS<sup>TM</sup> Carbapenemase Detection Set D70C* bei allen Ertapenem- und Imipenem-resistenten Isolaten verwendet, um eine eventuell vorhandene Carbapenemase zu identifizieren. Die Carbapenemresistenz kann auch auf AmpC-Produktion in Kombination mit einem Porinverlust basieren (Shi *et al.*, 2013). Diese Gegebenheit kann durch das *MASTDISCS<sup>TM</sup> Carbapenemase Detection Set D70C* ebenfalls nachgewiesen

werden. Die Anwendung beider Kits erfolgte gemäß Herstelleranleitung. Dazu wurden die fragliche, auf 0,5 McFarland eingestellte Bakteriensuspension auf einer MH-Platte ausgestrichen und die im jeweiligen Kit enthaltenen Antibiotikatestplättchen in einem Abstand von mindestens 2,5 cm auf dem Agar ausgelegt. Nach einer 16-stündigen Bebrütung werden die Hemmhöfe um die Plättchen abgelesen und gemäß Beipackzettel bewertet.

### **3.2.5 DNA-Isolation**

Zur Durchführung von PCR-Untersuchungen wurde die DNA aus den Bakterienzelle durch Hitzelyse freigesetzt. Hierzu wurden 2 - 3 Kolonien des fraglichen Bakterienisolates in 100  $\mu$ l *A. dest.* durch gründliches Mischen suspendiert und dann für 10 Minuten im Thermomixer (Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) auf 95 °C erhitzt. Danach wurden das Lysat für 10 min bei 14.550 x *g* abzentrifugiert und 5  $\mu$ l des Überstandes in die PCR-Reaktion eingesetzt.

### **3.2.6 DNA-Aufreinigung**

PCR-Produkte aus den  $\beta$ -Laktamase- und MLST-PCRs wurden für die anschließende Sequenzierung sowie für den Restriktionsverdau mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* und dem *MSB® Spin PCRapace Kit* nach Herstellerprotokoll aufgereinigt. Bei beiden Kits wird die DNA mit einem Reinigungspuffer vermischt und auf eine Säule mit einer Membran aufgebracht. Anschließend wird das Reaktionsgefäß zentrifugiert, wobei die DNA an die Säulenmatrix gebunden wird. Dann wird die Säule gewaschen und in ein neues Reaktionsgefäß verbracht. Die Eluation der DNA erfolgt durch Aufbringen von Wasser auf die Säule und anschließender Zentrifugation. Die DNA befindet sich danach in gelöster Form in der unterhalb der Membran aufgefangenen Flüssigkeit.

### **3.2.7 Polymerase Chain Reaction (PCR)**

Alle PCR-Ansätze wurden auf Eis pipettiert und setzten sich nach dem in Tabelle 16 dargestellten Rezept zusammen. Als Matrize (*Syn. Template*) wurde jeweils die durch Hitzelyse gewonnene DNA eingesetzt.

**Tabelle 16** Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die PCR

Volumen	Reagenz
5 $\mu$ l	DNA-Lösung oder –Hitzelysat ( <i>Template</i> )
5 $\mu$ l	PCR Puffer
2 $\mu$ l	dNTP Mix (0,2 mM)
1 $\mu$ l	<i>Forward Primer</i> (10 pmol/ $\mu$ l)
1 $\mu$ l	<i>Reverse Primer</i> (10 pmol/ $\mu$ l)
0,2 $\mu$ l	Taq (5U/ $\mu$ l)
36,8 $\mu$ l	<i>A. dest.</i>

Soweit nicht anders angegeben, wurde für alle PCRs der folgende Amplifikationszyklus verwendet:

Initialisierung	95 °C	5 min	} 30 Zyklen
Denaturierung	95 °C	1 min	
Annealing	variabel	1 min	
Elongation	72 °C	1 min	
Finale Elongation	72 °C	7 min	
Ende	4 °C	$\infty$	

### 3.2.8 Identifizierung von PMQR-Allelen

Die Auswahl der Isolate, von denen eine PCR zum Nachweis von PMQR-Genen durchgeführt wurde, erfolgte anhand der MHK von Ciprofloxacin. Alle Isolate, bei denen die MHK  $\geq 1 \mu\text{g/ml}$  war, wurden per PCR (3.2.4.) auf die Gene *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *qepA* und *aac(6')-1b* getestet, da sie nach EUCAST ab diesem Grenzwert als resistent beurteilt werden (EUCAST, 2012).

Der Nachweis der *aac(6')-1b-cr*-Variante erfolgte nach Jones *et al.* (2008) durch die Analyse des Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP) der mit den Primern *aac\_f* und *aac\_r* erzeugten PCR-Produkte. Nach ihrer Aufreinigung wurden die PCR-Produkte sowohl mit *NdeI*, als auch mit *BtsCI* (*FokI*) für 2 h bei 37 °C und 800 rpm in einem Thermomixer (Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) verdaut. Diejenigen Amplikons, welche sich aus dem Gen für die native Aminoglykosid-Acetyltransferase (*aac(6')-1b*) amplifizieren lassen, werden nur von *BtsCI* verdaut, wohingegen diejenigen Amplikons aus dem Gen für die *aac(6')-1b-cr*-Variante nur eine Schnittstelle für *NdeI* besitzen. So ergibt sich in der horizontalen Gelelektrophorese ein eindeutiges Schnittbild. Tabelle 17 zeigt eine Aufstellung des Reaktionsansatzes für den Restriktionsverdau.

**Tabelle 17** Standardansatz (20  $\mu$ l) für den Restriktionsverdau mit *Nde*I/*Bts*CI

Volumen	Reagenz
5 $\mu$ l	DNA-Lösung (aufgereinigtes PCR-Produkt)
2 $\mu$ l	<i>Buffer</i> 4
0,5 $\mu$ l	Enzym (5U/ $\mu$ l <i>Nde</i> I/ <i>Bts</i> CI)
12,5 $\mu$ l	<i>A. dest.</i>

### 3.2.9 Identifizierung der phylogenetischen Gruppen von *E. coli*

Alle in dieser Arbeit untersuchten *E. coli*-Isolate wurden mit der Methode von Clermont *et al.* (Clermont *et al.*, 2000) in die 4 phylogenetischen Gruppen (A, B1, B2, and D) eingeteilt. Die Methode basiert auf einer Triplex-PCR, die die Gene *chuA* and *yjaA* und das DNA-Fragment TspE4C2 nachweist. Bei Präsenz der Gene *chuA* und *yjaA* gehört das betreffende *E. coli*-Isolat der Gruppe B2 an. Wenn nur *chuA* vorhanden ist, dann ist es der Gruppe D zuzuordnen. Bei Nachweis von TspE4C2 gehört es der Gruppe B1 an. Bei Zugehörigkeit zu Gruppe A kann keines der 3 Gene nachgewiesen werden.

### 3.2.10 Multi-Locus Sequence Typing (MLST) von ESBL Produzenten

Zwanzig ausgewählte *E. coli* Isolate wurden entsprechend dem mit *Multi-Locus Sequence Typing* nach Wirth *et al.* eingeteilt (Wirth *et al.*, 2006). Dazu wurden mittels Multiplex-PCR Abschnitte der 7 Gene *adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* und *recA* amplifiziert und die Amplikons anschließend sequenziert. Durch Eingabe der Gensequenzen in die MLST-Datenbank (University of Warwick, 2014) konnten die 20 Isolate ihren entsprechenden Sequenztypen (STs) zugeordnet werden.

Für die PCR wurde der folgende Amplifikationszyklus verwendet (Wirth *et al.*, 2006):

Initialisierung	95 °C	2 min	} 30 Zyklen
Denaturierung	95 °C	1 min	
Annealing	Variabel	1 min	
Elongation	72 °C	2 min	
Finale Elongation	72 °C	5 min	
Ende	4 °C	$\infty$	

Um die MLST-Daten miteinander zu vergleichen und die Verwandtschaftsverhältnisse der *E. coli* genauer zu untersuchen, wurden die Sequenzen der 7 *Housekeeping*-Gene geclustert um einen *Minimum Spanning Tree* (MST) zu erzeugen. Unter einem MST versteht man einen

Graphen in Gestalt eines Baumes, der alle vorhandenen Datenpunkte miteinander verbindet. In vorliegenden Fall steht jeder Datenpunkt für 7 *Housekeeping*-Gene eines einzelnen Isolates. Ein Algorithmus kann auf Basis dieser Daten berechnen, inwiefern sich die einzelnen Isolate in der Zusammensetzung der Genvarianten unterscheiden. Die Grafik die mit Hilfe der Daten gezeichnet werden kann, gibt dann wieder wie eng verwandt die einzelnen Isolate sind. Das Clustering und die Zeichnung des MST wurden mit Hilfe der PubMLST-Datenbank durchgeführt. Das Clustering geschah mit Hilfe des Prim's Algorithmus unter Zuhilfenahme des BURST (*Based Upon Related Sequence Types*) Algorithmus.

### 3.2.11 *Inc Typing* der *E. coli* Plasmide

Das sogenannte *Inc typing* (Syn. *Plasmid-based Replicon Typing*) charakterisiert Plasmide nach ihrer Fähigkeit, mit anderen Plasmiden im gleichen Bakterienstamm zu koexistieren. Plasmide sind inkompatibel, wenn sie den gleichen Replikationsmechanismus (*Rep type*) haben, d.h. sie können nicht gleichzeitig in einer Bakterienzelle existieren (Carattoli *et al.*, 2005). Die Begriffe *Inc type* und *Rep type* werden synonym verwendet. Das *Inc typing* ist ein wichtiges Instrument, um die Verbreitung von Resistenzgen-tragenden Plasmiden sowie ihre Evolution zu verfolgen (Carattoli, 2013). In der vorliegenden *Ph.D.*-Thesis wurden die am häufigsten bei *Enterobacteriaceae* auftretenden Replikationstypen FIA, FIB, FII<sub>s</sub>, N und I1 per PCR (Carattoli *et al.*, 2005) abgeprüft. Nach den Replikationstypen FII und FUC wurde *in-silico* mittels Nukleotidsequenzanalyse unter der Verwendung der Software PlasmidFinder gesucht. Bei PlasmidFinder handelt es sich um eine Online-Plattform auf die Gensequenzen aus der Genomsequenzierung hochgeladen werden können. Mit Hilfe eines Algorithmus werden die zu testenden Sequenzen gegen die bekannten Sequenzen der Replikationstypen FII und FUC abgeglichen. Stimmen beide Sequenzen überein, wird der entsprechende Replikations-Typ als vorhanden angezeigt (Carattoli *et al.*, 2014).

### 3.2.12 Gelelektrophorese

#### 3.2.12.1 Horizontale Gelelektrophorese

Agarose (4 g) wurden in 400 ml 1 x TBE-Puffer so lange gekocht bis eine klare Lösung vorlag. Nach dem Abkühlen auf 50 °C wurden der Lösung 25 µl Ethidiumbromidlösung (5 mg/ml) zugegeben. Die flüssige Agarose wurde in einem Gelschlitten gegossen, und nach dem Aushärten wurde das Gel in die entsprechende mit 1 x TBE-Puffer gefüllte horizontale

Elektrophoresekammer gelegt. Anschließend wurden die PCR-Produkte mit PCR-Laufpuffer (10  $\mu$ l PCR-Produkt mit 6  $\mu$ l Laufpuffer) versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Als Größenstandard wurde die 1 kb plus *DNA Ladder* verwendet. Der Lauf erfolgte bei 150 V für 1 h. Danach erfolgte die Fotografie und Speicherung des Bildes in einem Transilluminators (Bio-Rad Universal Hood II Gel Imager, Bio-Rad, Hercules, USA). Die Gelelektrophorese stellt ein physikalisches Verfahren dar, mit Hilfe dessen geladene Moleküle durch ihre unterschiedliche Polarität in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden können (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982). Dementsprechend kann es auch zur Auftrennung unterschiedlich großer DNA-Moleküle verwendet werden. Diese wandern auf Grund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen in Richtung der Anode durch das Agarosegel. Dem Gel kommt dabei die Rolle eines Filters zu, da kleinere DNA Stücke schneller durch das Gel wandern können. Daher kann eine Auftrennung der DNA nach Größe erfolgen und mit Stücken bekannter Größe (DNA-Marker) verglichen werden.

### **3.2.12.2 Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)**

Die sogenannte *Contour-Clamped Homogeneous Electric Field* - Pulsfeld-Gelelektrophorese (CHEF-PFGE) wurde zur Bestimmung von Anzahl und Größe der Plasmide eingesetzt. Dabei wurde zunächst ein Restriktionsverdau der genomischen DNA mit dem Enzym  $S_1$ -Nuklease durchgeführt und anschließend eine PFGE gefahren.

### **Herstellung der Agaroseblöckchen**

Von einer LB-Platte mit 2  $\mu$ g/ml Cefotaxim wurden 2 - 3 Bakterienolonien mit einer sterilen Öse abgenommen und in 10 ml LB-Medium mit 2  $\mu$ g/ml Cefotaxim übergeimpft. Nach 16 h Wachstum wurde die optische Dichte bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) photometrisch bestimmt und die Bakteriensuspension durch Verdünnung mit LB-Medium auf eine  $OD_{600} = 1,35$  eingestellt ( $\cong 9 \times 10^6$  KBE). 1.000  $\mu$ l dieses Ansatzes wurden dann bei Raumtemperatur 10 min bei 3100 x g abzentrifugiert (Zentrifuge 5418, Eppendorf, Deutschland). Anschließend wurde das Bakterienpellet 4 Mal mit 1 x TE-Puffer gewaschen und dabei für jeweils 4 min bei 14550 x g zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet in 384  $\mu$ l 1 x TE-Puffer gelöst und dann mit 16  $\mu$ l Lysozym-Lösung (20 mg/ml) versetzt. Anschließend folgte ein Inkubationsschritt von 10 min bei 37 °C auf dem Thermoblock (Thermomixer comfort, Eppendorf, Deutschland). Nach diesem Schritt wurde der Ansatz mit 400  $\mu$ l 50 °C warmer

flüssiger *Pulsed Field Certified*-Agarose (16 mg/ml) und 20  $\mu$ l Proteinase K-Lösung (20 mg/ml) vermischt. Dieses Gemisch wurde dann in vorgefertigte Gelblöckchenformen (*Disposable Plug Mold*, Bio-Rad, Hercules, USA) pipettiert. Nach dem Erstarren der Agarose wurden die Blöckchen mit Hilfe eines kleinen Spatels aus den Formen herausgelöst, in einem 20 ml-Polypropylen-Röhrchen (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) mit 5 ml Zellysepuffer mit Zusatz von 25  $\mu$ l Proteinase K (20 mg/ml) gegeben und für 2 h im Wasserbad bei 54 °C geschüttelt. Anschließend folgten insgesamt 6 Waschschriffe mit jeweils 5 ml Flüssigkeit im Abstand von 15 min im Wasserbad bei 54 °C. Dabei wurde jeweils zuerst die verbrauchte Waschflüssigkeit mit einer Pipette aus den 20 ml-Polypropylen-Röhrchen abgenommen und anschließend wieder 5 ml frische Waschflüssigkeit hinzugegeben. Die ersten beiden Male wurden die Blöckchen mit *A. dest.* gewaschen, danach mit 1 x TE-Puffer. Sowohl das Wasser also auch der Puffer wurden vorher auf 54 °C erwärmt. Die Blöckchen wurden nach dem letzten Waschschriff in 5 ml 1 x TE-Puffer im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

### **Restriktionsverdau mit S<sub>1</sub>-Nuklease (Größenbestimmung der Plasmide)**

Der Restriktionsverdau wurde entsprechend dem *Pulse Net Protocol of Center for Disease Control and Prevention* (CDC, 2013) durchgeführt. Die verwendete S<sub>1</sub>-Nuklease hydrolysiert Einzelstrangregionen wie Lücken oder Loops in doppelsträngiger DNA. Auf diese Weise werden in den Isolaten eventuell vorhandene Plasmide linearisiert. Allerdings wird auch das bakterielle Chromosom in Stücke geschnitten (Oleson und Sasakuma, 1980). In einem *Pulsed-Field Gel* können die Plasmide aber identifiziert werden, da sie im Vergleich mit chromosomalen Stücken deutlich kürzer sind und im gleichen Zeitraum deutlich weiter im Gel laufen. Durch diese Methode können mit einer anschließenden PFGE sowohl die Anzahl der Plasmide als auch deren Größe relativ genau bestimmt werden (Barton *et al.*, 1995).

Jeweils ein Blöckchen wurde zunächst bei Raumtemperatur für 20 min in einem 20 ml-Polypropylen-Röhrchen in 200  $\mu$ l S<sub>1</sub>-Nuklease-Puffer äquilibriert. Anschließend wurde der Puffer abgenommen und pro Blöckchen 300  $\mu$ l S<sub>1</sub>-Nuklease-Puffer mit 40 Units S<sub>1</sub>-Nuklease zugegeben. Dieser Ansatz wurde in einem 20 ml-Polypropylen-Röhrchen 2 h bei 37 °C im Wasserbad geschüttelt. Anschließend wurde der Verdau mit Zugabe von 50  $\mu$ l 0,5 M EDTA für 30 min bei Raumtemperatur abgestoppt. Danach wurden die Blöckchen zweimal mit 1.000  $\mu$ l 0,5 x TBE-Puffer gewaschen und in die Probenvertiefung eines einprozentigen Agarosegels (*Pulsed Field Certified*-Agarose) in einem speziellen PFGE-Schlitten eingesetzt.

Als Laufpuffer in der PFGE-Kammer wurden 3.000 ml 0,5 x TBE-Puffer verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 6 V, mit einem Switch von 1 bis 25 s über 18 h. Anschließend wurde das Gel vor der Geldokumentation für 10 min in einem Ethidiumbromidbad (25 µl EtBr-Stammlösung (5 mg/ml) auf 400 ml 0,5 x TBE-Puffer) gefärbt und über 20 min in 0,5 x TBE-Puffer entfärbt.

### 3.2.13 DNA-Sequenzierung

#### 3.2.13.1 Sequenzierung von PCR-Amplikons

Um die kodierten  $\beta$ -Laktamase-Subtypen präzise zu bestimmen, wurden alle Amplikons aus den PCR-Reaktionen für TEM, SHV, CTX-M und OXA-48 sequenziert. Auch die Amplikons aus der MLST-PCR wurden sequenziert. Die Sequenzierreaktion wurde nach dem in Tabelle 18 dargestellten Protokoll angesetzt. Die Sequenzanalyse wurde mit dem Automated Sequencer ABI Prism® 3100 (Life Technologies, Carlsbad, USA) im Institut durchgeführt. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit dem Programm Seqman Pro (Lasergene, DNASTAR, USA) und dem blastn-Algorithmus von NCBI (Datenbanksuche) (NCBI, 2012).

**Tabelle 18** Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die Sequenzierreaktion (25 µl)

Volumen	Reagenz	Hersteller
5 µl	DNA Template (aufgereinigtes PCR-Produkt)	
4 µl	ABI Prism® BigDye® Terminator 5x Sequencing Buffer	Applied Biosystems, Life Technologies, USA
1 µl	Primer (10 pmol/µl)	Eurofins MWG Operon, Deutschland
1 µl	ABI Prism® BigDye® Terminator Ready Reaction Mix	Applied Biosystems, Life Technologies, USA
4 µl	<i>A. dest.</i>	

Die Sequenzierreaktion wurde durch den folgenden Amplifikationszyklusermöglich:

Denaturierung	96 °C	10 sec	} 20 Zyklen
Annealing	50 °C	10 sec	
Elongation	60 °C	4 min	
Ende	4 °C	∞	

#### 3.2.13.2 Genomsequenzierung

Das Genom d.h. bakterielle Chromosom und die jeweils vorhandenen Plasmide wurde bei ausgewählten Bakterienisolaten mit einer Methode des *Next Generation Sequencing* (NGS)

sequenziert. Als Sequenziergerät wurde ein Miseq (Illumina, San Diego, USA) eingesetzt. Die Sequenzierung begann mit der Anzucht der Isolate in LB-Medium über 16 h bei 37 °C und der anschließenden DNA-Isolierung mit dem *PureLink® Genomic DNA Kit*. Um die DNA für die Sequenzierung vorzubereiten, wurde eine sogenannte *Library* hergestellt. Darunter versteht man einen Pool von DNA-Fragmenten, der nach einem bestimmten Protokoll erzeugt wurde. In diesem Fall wurde der *Nextera XT Sample prep Kit* verwendet. Dabei wurde die DNA-Probe (*Template-DNA*) zunächst in kleine Stücke fragmentiert und an die Enden der Stücke unspezifisch Adapter-Oligonukleotide ligiert. Nach einem Validierungsschritt wurde diese *Library* anschließend auf eine *Flowcell* (Flusszelle) aufgebracht. Die *Template-DNA* wird über spezifische Adapter an die *Flowcell* gebunden, auf der die Sequenzierreaktion stattfindet. Durch einen PCR-ähnlichen Schritt werden von dem gebundenen Startmolekül ausgehend *Cluster* (Anhäufungen) aus identischen Molekülen gebildet (*Bridge-amplification*). Die Sequenzierung erfolgt dann zyklusweise und verwendet fluoreszenzmarkierte Nukleotide. Während jedem Sequenzierzyklus wird genau ein Nukleotid komplementär zur *Template-DNA* eingebaut. Mittels zweier Laser werden die Fluoreszenzgruppen der eingebauten Nukleotide angeregt und das basenspezifische emittierte Fluoreszenzsignal detektiert. Anschließend werden die Fluoreszenzgruppe und der reversible Terminator, der zunächst eine Anlagerung weiterer Nukleotide verhindert, abgespalten. Im folgenden Zyklus wird dann ein weiteres Nukleotid eingebaut. Die Abfolge der Farben wird schließlich für jede Koordinate direkt in die DNA-Sequenzen übersetzt. Die Rohdaten der Sequenzierung wurden anschließend mit dem Programm Spades 3.0 assembliert (Bankevich *et al.*, 2012). Unter Assemblierung versteht man das Zusammenfügen der einzelnen, einander überlappenden, Reads, also den vom Sequenziergerät ausgegebenen Basenabfolgen, zu größeren Genomstücken den sogenannten *Contigs*. Auf Grund der extrem großen Datenmengen werden dafür eigene Computerprogramme, sogenannte Assembler, verwendet. Die so generierten *Contigs* können meist nicht miteinander zu einer einzigen zusammenhängenden Basensequenz verbunden werden, da zwischen ihnen Sequenzlücken (*Gaps*) zurückbleiben. Dennoch sind sie dann geeignet, um die auf ihnen liegenden Gene zu identifizieren.

### **3.2.14 *Galleria mellonella*-Modell**

Essentielle Aspekte der angeborenen Immunantwort gegen mikrobielle Infektionen sind sowohl bei Menschen, als auch bei Insekten in vergleichbarer Art und Weise zu finden.

Daher werden Insekten als Modellorganismen für Erreger-Wirt-Interaktionen eingesetzt. Im Institut für Medizinische Mikrobiologie der JLU Gießen wurden Larven der großen Wachsmotte *Galleria (G.) mellonella* schon erfolgreich als Modell für die Unterscheidung von *Listeria monocytogenes*-Stämmen nach ihrer Virulenz eingesetzt (Mukherjee *et al.*, 2009). Die Unterscheidung zwischen virulenten und nicht-virulenten Listerienstämmen ist gut möglich. Das *G. mellonella*-Modell stellt eine einfache Möglichkeit zur Beurteilung der Virulenz dar. In dieser Arbeit wurde es jetzt das erste Mal auf ESBL-produzierende *E. coli* angewendet.

### **Anzucht der Larven**

Die Larven wurden von der Firma Fauna Topics (Marbach, Deutschland) bezogen und in großen Petrischalen (145/20 mm, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich) mit einer Futtermischung bestehend aus Maismehl (22 %), Weizenkeimen (22 %), Trockenhefe (11 %), Bienenwachs (17,5 %), Honig (11 %) und Glycerin (11 %) bei 30 °C lichtgeschützt aufgezogen.

### **Anzucht der Bakterienisolate**

Die zu testenden Isolate wurden über 16 h bei 37 °C auf dem Schüttler in 10 ml LB-Medium mit Zusatz von 2 µg/ml Cefotaxim angezogen. Am nächsten Tag wurden sie mit LB-Medium (ohne Antibiotikum) 1:40 verdünnt und erneut bei 37 °C bis  $OD_{600} = 1$  ( $\cong 6,5 \times 10^6$  KbE) wachsen gelassen. Dann wurden 1.000 µl der Bakteriensuspension 3 min bei 3.100 x g abzentrifugiert. Im Anschluss folgten 3 Waschschriffe mit 0,9 % NaCl. Zuletzt wurde das Bakterienpellet wieder in 1.000 µl 0,9 % NaCl resuspendiert. Von dieser Bakteriensuspension wurde eine  $\log_{10}$ -Verdünnungsreihe bis zur Verdünnung  $10^{-6}$  pipettiert und von dieser dann 100 µl auf LB-Platten ausplattiert. Auf diese Weise konnte das tatsächliche Inokulum für die Larveninfektion bestimmt werden. Für die Injektion in die Wachsmottenlarven wurde die unverdünnte Suspension verwendet.

### **Infektion der Larven**

Von der unverdünnten Bakteriensuspension wurden den Gallerienlarven 10 µl ventral in das Cölom injiziert. Dazu wurde eine Einmal-Feindosierspritze (Omnican®F, B. Braun Melsungen AG, Kronberg im Tanus, Deutschland) verwendet. Die Spritze wurde zunächst in einer *Manual Microsyringe Pump* (World Precision Instruments, Sarasota, USA) eingespannt. Die

Larve wurde anschließend mit 2 Pinzetten fixiert und zwischen dem letzten und vorletzten Beinpaar per Injektion mit der Bakteriensuspension infiziert (Abbildung 5). Nach der Injektion wurden die Larven wieder lichtgeschützt bei 37 °C inkubiert. Pro Bakterienisolat wurden 3 Experimente mit jeweils 10 Larven durchgeführt. Das Experiment wurde pro Isolat 3 Mal wiederholt. Als Negativkontrolle wurde 0,9 % NaCl verwendet und *E. coli* K12 MG 1655 als Beispiel für einen avirulenten *E. coli* Stamm. Die infizierten Larven wurden an 5 aufeinander folgenden Tagen gezählt, d.h. überlebende und tote Tiere ausgezählt. Eine Larve wurde als tot bezeichnet, wenn sie auf Berührung keine Reaktion mehr zeigte. Zudem kommt es bei *G. mellonella* im Laufe von Erkrankungen zu einer Melanisierung der Cuticula. Dementsprechend waren die verstorbenen Larven zumeist schwarz verfärbt.



**Abbildung 5** Inokulation einer *Galleria mellonella*-Larve mit eine ESBL-*E. coli*-Bakteriensuspension

### 3.2.15 Genomanalyse und Bioinformatik

#### Durchmustern auf Virulenzgene und Plasmid-kodierten Resistenzgene

Die mittels NGS generierten *Contigs* wurden auf die Präsenz verschiedener Plasmid-kodierter Resistenz- und Virulenz- bzw. Virulenz-assoziierte Gene durchgemustert. Zu

diesem Zweck wurden verschiedene Internetdatenbanken verwendet. Zum Nachweis Plasmid-kodierter Resistenzgene wurden die *Contigs* in die Datenbank *ResFinder* hochgeladen. Diese Datenbank überprüft Sequenzen nur auf Resistenzgene die laut Literatur Plasmid-kodiert sind. Zum Nachweis von Virulenzgenen wurden die *Contigs* in die Datenbank *VirulenceFinder* hochgeladen und dort überprüft. Aus der Datenbank *Virulence Factors of Pathogenic Bacteria* (VFDB) wurden die Sequenzen wichtiger Virulenzgene für intestinal und extraintestinal pathogene *E. coli* (ExPEC) heruntergeladen (Tabellen 19 und 20) und deren Präsenz mit Hilfe des *blastn*-Algorithmus von NCBI in den ermittelten DNA-Sequenzen geprüft. Alle Ergebnisse mit einer *Identity* von  $\geq 99\%$ , einer *Query Coverage* von  $\geq 95\%$  und einem E-Wert = 0 wurden als Treffer (= Gen/Operon vorhanden) gewertet. Als Virulenzfaktor bzw. Virulenz-assoziiertes Faktor wurde in dieser Studie ein Gen z. B. *pic* bzw. ein Operon z. B. Aerobactin (*IucABCD/IutA*) bezeichnet. Ein Operon wurde nur als vorhanden bezeichnet, wenn alle dazu gehörigen Gene nach den eben genannten Kriterien nachweisbar waren. Zunächst wurde die Präsenz von Virulenzfaktoren der etablierten Pathovaren ETEC, STEC, EPEC, EAEC, EIEC, DAEC nach Kaper *et al.* überprüft (Kaper *et al.*, 2004). Anschließend wurden zusätzlich ExPEC-Virulenzfaktoren getestet, da die überwiegende Zahl der *E. coli*-Isolate aus Proben gewonnen wurde, die auf eine extraintestinale Lokalisation der Infektion schließen ließen (Urin, Abstriche aus dem Urogenitaltrakt, BAL).

### **Analyse der Resistenzgenmuster**

Informationen über die Herkunft der Isolate (Mensch, Hund, Pferd, Katze etc.), die entsprechenden Bakterienarten (*E. coli*, *K. pneumoniae* etc.) sowie die identifizierten Resistenzgene (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub> etc.) wurden in einer Excel-Datei zusammengestellt. Die Daten wurden anschließend auf der Analyse-Plattform GENE-E analysiert (GENE-E, 2014). Mit Hilfe der Plattform wurden *Heat Maps* erstellt, welche die Verteilung der Resistenzgene in Bezug auf die Herkunft und die Bakterienspezies darstellen. Die Visualisierung der Daten diente der Identifizierung bestimmter Resistenzgenkombinationen.

**Tabelle 19** Zusammenstellung wichtiger mit darmpathogenen *E. coli* (InPECs) assoziierten Virulenzgenen, die bei der Genomanalyse berücksichtigt wurden

Pathovar	Bezeichnung	Gen/Operon	Accession Nummer/ Datenbank	
ETEC (Enterotoxische <i>E. coli</i> )	Hitze stabiles Enterotoxin (ST)	<i>esta</i>	VFDB <sup>a</sup>	
	Hitze labiles Enterotoxin (LT-I, LT-II)	<i>eltA/eltB</i>	VFDB	
	Adhäsine	<i>cfa/I, cofA, cooA, cs3, cs5, csbA, cseA, csnA, cssA, csvA, cswA</i>	VFDB	
	F4-Fimbrien	<i>faeG, faeH, faeI, faeJ</i>	Z11700.1	
	F6-Fimbrien	<i>fimbriae 987P subunit gene</i>	ECO987P	
	F41-Fimbrien	<i>adhesin F41 gene</i>	ECOADHF41	
	STEC (Shigatoxin-bildende <i>E. coli</i> ) EHEC (Enterohämorrhagische <i>E. coli</i> )	Shigatoxine (1 und/oder 2)	<i>stxA<sub>1</sub>/stxA<sub>2</sub></i>	VFDB
Intimin		<i>eae</i>	VFDB	
Esp-Proteine		<i>espA, espB, espD, espF, espG, espH</i>	VFDB	
Pathogenitätsinsel (LEE)		<i>LEE (EHEC)</i>	VFDB	
Hämolysin-Operon		<i>hlyA, hlyB, hlyC, hlyD</i>	VFDB	
Serinprotease		<i>espP</i>	VFDB	
Adhäsine		<i>toxB</i>	VFDB	
Shigatoxin (2e)		<i>stxA<sub>2e</sub></i>	JQ812056.1	
F18-Fimbrien		<i>fedF</i>	AY970786.1	
AIDA		<i>aida-I</i>	GQ497943.1	
EDEC (Ödemkrankheit <i>E. coli</i> )				

Pathovar	Bezeichnung	Gen/Operon	Accession Nummer/ Datenbank
EPEC (Enteropathogene <i>E. coli</i> )	Bundle forming pili-Operon	<i>bfp</i> ABCDEFGHIJKLPU	VFDB
	Intimin	<i>eae</i>	VFDB
	Esp-Proteine	<i>espA, espB, espD, espF, espG, espH</i>	VFDB
	EAEC Hitzestabiles Enterotoxin 1 (EAST-1)	<i>asta</i>	AF143819
	Pathogenitätsinsel (LEE)	<i>LEE (EPEC)</i>	VFDB
	Lymphostatin	<i>lifa</i>	VFDB
EAEC (Enteroaggregative <i>E. coli</i> )	Aggregative Adherence Fimbriae	<i>aaf</i> ABCD, <i>agg3A, agg3B, agg3C, agg3D, agg3E, agg3F, agg3G, agg3H, agg3I, agg3J, agg3K, agg3L, agg3M, agg3N, agg3O, agg3P, agg3Q, agg3R, agg3S, agg3T, agg3U, agg3V, agg3W, agg3X, agg3Y, agg3Z, agg3aa, agg3ab, agg3ac, agg3ad, agg3ae, agg3af, agg3ag, agg3ah, agg3ai, agg3aj, agg3ak, agg3al, agg3am, agg3an, agg3ao, agg3ap, agg3aq, agg3ar, agg3as, agg3at, agg3au, agg3av, agg3aw, agg3ax, agg3ay, agg3az, agg3ba, agg3bb, agg3bc, agg3bd, agg3be, agg3bf, agg3bg, agg3bh, agg3bi, agg3bj, agg3bk, agg3bl, agg3bm, agg3bn, agg3bo, agg3bp, agg3bq, agg3br, agg3bs, agg3bt, agg3bu, agg3bv, agg3bw, agg3bx, agg3by, agg3bz, agg3ca, agg3cb, agg3cc, agg3cd, agg3ce, agg3cf, agg3cg, agg3ch, agg3ci, agg3cj, agg3ck, agg3cl, agg3cm, agg3cn, agg3co, agg3cp, agg3cq, agg3cr, agg3cs, agg3ct, agg3cu, agg3cv, agg3cw, agg3cx, agg3cy, agg3cz, agg3da, agg3db, agg3dc, agg3dd, agg3de, agg3df, agg3dg, agg3dh, agg3di, agg3dj, agg3dk, agg3dl, agg3dm, agg3dn, agg3do, agg3dp, agg3dq, agg3dr, agg3ds, agg3dt, agg3du, agg3dv, agg3dw, agg3dx, agg3dy, agg3dz, agg3ea, agg3eb, agg3ec, agg3ed, agg3ee, agg3ef, agg3eg, agg3eh, agg3ei, agg3ej, agg3ek, agg3el, agg3em, agg3en, agg3eo, agg3ep, agg3eq, agg3er, agg3es, agg3et, agg3eu, agg3ev, agg3ew, agg3ex, agg3ey, agg3ez, agg3fa, agg3fb, agg3fc, agg3fd, agg3fe, agg3ff, agg3fg, agg3fh, agg3fi, agg3fj, agg3fk, agg3fl, agg3fm, agg3fn, agg3fo, agg3fp, agg3fq, agg3fr, agg3fs, agg3ft, agg3fu, agg3fv, agg3fw, agg3fx, agg3fy, agg3fz, agg3ga, agg3gb, agg3gc, agg3gd, agg3ge, agg3gf, agg3gg, agg3gh, agg3gi, agg3gj, agg3gk, agg3gl, agg3gm, agg3gn, agg3go, agg3gp, agg3gq, agg3gr, agg3gs, agg3gt, agg3gu, agg3gv, agg3gw, agg3gx, agg3gy, agg3gz, agg3ha, agg3hb, agg3hc, agg3hd, agg3he, agg3hf, agg3hg, agg3hh, agg3hi, agg3hj, agg3hk, agg3hl, agg3hm, agg3hn, agg3ho, agg3hp, agg3hq, agg3hr, agg3hs, agg3ht, agg3hu, agg3hv, agg3hw, agg3hx, agg3hy, agg3hz, agg3ia, agg3ib, agg3ic, agg3id, agg3ie, agg3if, agg3ig, agg3ih, agg3ii, agg3ij, agg3ik, agg3il, agg3im, agg3in, agg3io, agg3ip, agg3iq, agg3ir, agg3is, agg3it, agg3iu, agg3iv, agg3iw, agg3ix, agg3iy, agg3iz, agg3ja, agg3jb, agg3jc, agg3jd, agg3je, agg3jf, agg3jg, agg3jh, agg3ji, agg3jj, agg3jk, agg3jl, agg3jm, agg3jn, agg3jo, agg3jp, agg3jq, agg3jr, agg3js, agg3jt, agg3ju, agg3jv, agg3jw, agg3jx, agg3jy, agg3jz, agg3ka, agg3kb, agg3kc, agg3kd, agg3ke, agg3kf, agg3kg, agg3kh, agg3ki, agg3kj, agg3kk, agg3kl, agg3km, agg3kn, agg3ko, agg3kp, agg3kq, agg3kr, agg3ks, agg3kt, agg3ku, agg3kv, agg3kw, agg3kx, agg3ky, agg3kz, agg3la, agg3lb, agg3lc, agg3ld, agg3le, agg3lf, agg3lg, agg3lh, agg3li, agg3lj, agg3lk, agg3ll, agg3lm, agg3ln, agg3lo, agg3lp, agg3lq, agg3lr, agg3ls, agg3lt, agg3lu, agg3lv, agg3lw, agg3lx, agg3ly, agg3lz, agg3ma, agg3mb, agg3mc, agg3md, agg3me, agg3mf, agg3mg, agg3mh, agg3mi, agg3mj, agg3mk, agg3ml, agg3mn, agg3mo, agg3mp, agg3mq, agg3mr, agg3ms, agg3mt, agg3mu, agg3mv, agg3mw, agg3mx, agg3my, agg3mz, agg3na, agg3nb, agg3nc, agg3nd, agg3ne, agg3nf, agg3ng, agg3nh, agg3ni, agg3nj, agg3nk, agg3nl, agg3nm, agg3nn, agg3no, agg3np, agg3nq, agg3nr, agg3ns, agg3nt, agg3nu, agg3nv, agg3nw, agg3nx, agg3ny, agg3nz, agg3oa, agg3ob, agg3oc, agg3od, agg3oe, agg3of, agg3og, agg3oh, agg3oi, agg3oj, agg3ok, agg3ol, agg3om, agg3on, agg3oo, agg3op, agg3oq, agg3or, agg3os, agg3ot, agg3ou, agg3ov, agg3ow, agg3ox, agg3oy, agg3oz, agg3pa, agg3pb, agg3pc, agg3pd, agg3pe, agg3pf, agg3pg, agg3ph, agg3pi, agg3pj, agg3pk, agg3pl, agg3pm, agg3pn, agg3po, agg3pp, agg3pq, agg3pr, agg3ps, agg3pt, agg3pu, agg3pv, agg3pw, agg3px, agg3py, agg3pz, agg3qa, agg3qb, agg3qc, agg3qd, agg3qe, agg3qf, agg3qg, agg3qh, agg3qi, agg3qj, agg3qk, agg3ql, agg3qm, agg3qn, agg3qo, agg3qp, agg3qq, agg3qr, agg3qs, agg3qt, agg3qu, agg3qv, agg3qw, agg3qx, agg3qy, agg3qz, agg3ra, agg3rb, agg3rc, agg3rd, agg3re, agg3rf, agg3rg, agg3rh, agg3ri, agg3rj, agg3rk, agg3rl, agg3rm, agg3rn, agg3ro, agg3rp, agg3rq, agg3rr, agg3rs, agg3rt, agg3ru, agg3rv, agg3rw, agg3rx, agg3ry, agg3rz, agg3sa, agg3sb, agg3sc, agg3sd, agg3se, agg3sf, agg3sg, agg3sh, agg3si, agg3sj, agg3sk, agg3sl, agg3sm, agg3sn, agg3so, agg3sp, agg3sq, agg3sr, agg3ss, agg3st, agg3su, agg3sv, agg3sw, agg3sx, agg3sy, agg3sz, agg3ta, agg3tb, agg3tc, agg3td, agg3te, agg3tf, agg3tg, agg3th, agg3ti, agg3tj, agg3tk, agg3tl, agg3tm, agg3tn, agg3to, agg3tp, agg3tq, agg3tr, agg3ts, agg3tt, agg3tu, agg3tv, agg3tw, agg3tx, agg3ty, agg3tz, agg3ua, agg3ub, agg3uc, agg3ud, agg3ue, agg3uf, agg3ug, agg3uh, agg3ui, agg3uj, agg3uk, agg3ul, agg3um, agg3un, agg3uo, agg3up, agg3uq, agg3ur, agg3us, agg3ut, agg3uu, agg3uv, agg3uw, agg3ux, agg3uy, agg3uz, agg3va, agg3vb, agg3vc, agg3vd, agg3ve, agg3vf, agg3vg, agg3vh, agg3vi, agg3vj, agg3vk, agg3vl, agg3vm, agg3vn, agg3vo, agg3vp, agg3vq, agg3vr, agg3vs, agg3vt, agg3vu, agg3vv, agg3vw, agg3vx, agg3vy, agg3vz, agg3wa, agg3wb, agg3wc, agg3wd, agg3we, agg3wf, agg3wg, agg3wh, agg3wi, agg3wj, agg3wk, agg3wl, agg3wm, agg3wn, agg3wo, agg3wp, agg3wq, agg3wr, agg3ws, agg3wt, agg3wu, agg3wv, agg3ww, agg3wx, agg3wy, agg3wz, agg3xa, agg3xb, agg3xc, agg3xd, agg3xe, agg3xf, agg3xg, agg3xh, agg3xi, agg3xj, agg3xk, agg3xl, agg3xm, agg3xn, agg3xo, agg3xp, agg3xq, agg3xr, agg3xs, agg3xt, agg3xu, agg3xv, agg3xw, agg3xx, agg3xy, agg3xz, agg3ya, agg3yb, agg3yc, agg3yd, agg3ye, agg3yf, agg3yg, agg3yh, agg3yi, agg3yj, agg3yk, agg3yl, agg3ym, agg3yn, agg3yo, agg3yp, agg3yq, agg3yr, agg3ys, agg3yt, agg3yu, agg3yv, agg3yw, agg3yx, agg3yy, agg3yz, agg3za, agg3zb, agg3zc, agg3zd, agg3ze, agg3zf, agg3zg, agg3zh, agg3zi, agg3zj, agg3zk, agg3zl, agg3zm, agg3zn, agg3zo, agg3zp, agg3zq, agg3zr, agg3zs, agg3zt, agg3zu, agg3zv, agg3zw, agg3zx, agg3zy, agg3zz</i>	VFDB
	EAEC Hitzestabiles Enterotoxin 1 (EAST-1)	<i>asta</i>	AF143819
	Plasmid-kodiertes Enterotoxin	<i>pet</i>	VFDB
	Serinprotease-Autotransporter (SPATE) pic	<i>pic</i>	CP006784.1
	Shigella enterotoxin 1 (ShET1)	<i>set1A; set1B;</i>	VFDB
	Intercellular spread-Autotransporter	<i>icsA</i> <i>ipg</i> ABCEF <i>mxi</i> ACDEGHJNKLM <i>spa9, spa13, spa24, spa29, spa32, spa33, spa40, spa47</i> <i>ipa</i> ABCD F1845 <i>aida-1</i>	VFDB
DAEC (Diffusadhärente <i>E. coli</i> )	F1845-Fimbrien	F1845	M27725.1
	AIDA	<i>aida-1</i>	GQ497943.1

VFDB = Virulence Factor Database (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/>)

**Tabelle 20** Zusammenstellung wichtiger mit extraintestinal-pathogenen *E. coli* (ExPECs) assoziierten Virulenzgenen, die bei der Genomanalyse berücksichtigt wurden

Funktion	Bezeichnung	Gen/Operon	Accession Nummer/Datenbank	
Adhäsion	S/1FC-Fimbrien	<i>sfaA/focACDFGHI</i>	VFDB <sup>a</sup>	
	P-Fimbrien	<i>papABCDEFGHIJK</i>	VFDB	
	Typ 1-Fimbrien	<i>fimABCDEFGHI</i>	VFDB	
	Long Polar Fimbriae	<i>lpfA</i>	Virulencefinder DB <sup>b</sup>	
	Iron-regulated-Gene Homologue adhesin	<i>iha</i>	Virulencefinder DB	
	dra-Adhäsine	<i>draACDEP</i>	VFDB	
	afa-Adhäsine	<i>afaABCD</i>	VFDB	
	Temperatursensitives Adhäsine	<i>tsh</i>	AF218073.1	
	M-Agglutinin	<i>bmaE</i>	M15677	
	N-Acetyl D-Glucosamine-specific Fimbriae	<i>gafD</i>	L33969	
	Hämolyisin		<i>hlyABCD</i>	VFDB
		Zytotoxisch nekrotisierender Faktor (CNF) 1/2	<i>CNF-1/2</i>	VFDB
		Serinprotease-Autotransporter (SPATE) pic	<i>pic</i>	CP006784.1
		Serinprotease-Autotransporter (SPATE) sat	<i>sat</i>	VFDB
		Serinprotease-Autotransporter (SPATE) Ag43	<i>Ag43</i>	U24429.1
		Hitzestabiles Agglutinin	<i>hra</i>	U07174.1

Funktion	Bezeichnung	Gen/Operon	Accession Nummer/Datenbank	
<b>Protektine</b>	<i>Increased Serum Survival</i>	<i>iss</i>	Virulencefinder DB	
	Kapsel	<i>kpsDMT</i>	VFDBa	
	<i>Conjugal Transfer Surface Exclusion Protein</i>	<i>traJ</i>	J01769.1	
	<i>Outer Membrane ProteaseT</i>	<i>ompT</i>	DQ381420.1	
	K1-Kapselpolysaccharid	<i>neuC</i>	M84026	
	Colicine	<i>cba/cma</i>	Virulencefinder DB	
	<b>Eisenstoffwechsel</b>	Aerobactin	<i>iucABCD/iutA</i>	VFDB
		Yersiniabactin	<i>fyxA/irp12/yptAEPQSTX</i>	VFDB
		Salmocheilin	<i>iroN</i>	VFDB
		<i>Periplasmic Iron binding Protein</i>	<i>sitA</i>	DQ381420.1
<i>Hemin Uptake</i>		<i>chuASTUWXY</i>	VFDB	
Siderophor-Rezeptor		<i>IreA</i>	AF320691	
<b>Andere</b>		Phosphotransferase	<i>malX</i>	AF003742
		<i>Uropathogenic Specific Protein</i>	<i>usp</i>	AB056440.1
		Flagellin (Serotyp H7)	<i>H7 fljC</i>	JF308285.1
		<i>Invasion of the Brain Endothelium</i>	<i>ibeA</i>	VFDB
	<i>Invasion of the Brain Endothelium</i>	<i>ibeB</i>	VFDB	
	<i>Invasion of the Brain Endothelium</i>	<i>ibeC</i>	VFDB	
	<i>Outer Membrane Protein</i>	<i>ompA</i>	VFDB	
	<i>Genetic Island Meningitis</i>	<i>gimB</i>	AJ810519	
	<i>Arylsulfatase-like Gene</i>	<i>asIA</i>	VFDB	

VFDB = Virulence Factor Database (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/>)<sup>b</sup> VirulenceFinder Database (<http://cge.cbs.dtu.dk/services/VirulenceFinder/>)

### 3.2.16 Statistik

#### Analyse der Risikofaktoren für einen erhöhten larviziden Effekt

Ziel der Analyse war es, Faktoren zu identifizieren, die für einen stärkeren larviziden Effekt in *Galleria mellonella*-Larven verantwortlich sind. Zu diesem Zweck wurde die schrittweise Cox-Regressionsanalyse verwendet. Bei diesem Regressionsmodell wird der Effekt mehrerer Einflussgrößen auf eine Zielvariable, in diesem Fall die Überlebenszeit, untersucht. Mit dem Modell wird untersucht, ob das Vorhandensein bestimmter Virulenzgene oder Virulenzgenkombinationen einen Einfluss auf die Überlebenszeit der Larven hat. Eine schrittweise Auswahl von Faktoren, die die Überlebensrate beeinflussen, erfolgte mit Hilfe des Akaike Informationkriterium (AIC). Dies ist ein Maß für die Güte von Modellen und wird zum Vergleich einzelner Modelle untereinander herangezogen, um das passendste Modell auszuwählen. Anschließend wurden die jeweiligen Faktoren kombiniert, die durch die schrittweise Anpassung des Modells die Verkürzung der Überlebenszeiten am besten erklären.

Wichtig für die weitere Auswertung der Ergebnisse sind die *Hazard Rate* und die *Hazard Ratio*. Mit *Hazard* (Gefahr, Risiko) ist die Wahrscheinlichkeit gemeint, mit der eine Larve, die für eine bestimmte Zeit unter Beobachtung steht, in dieser Zeit verstirbt. Die *Hazard Rate*  $h(t)$  wird dabei als Risiko pro Zeiteinheit für das Sterben zur Zeit  $t$  interpretiert. Sie wird folgendermaßen beschrieben:

$$h(t) = \frac{\text{Anzahl der Larven mit Zielereignis im Intervall das bei } t \text{ beginnt}}{(\text{Anzahl der Larven, die überlebten}) \times \text{Intervallbreite}}$$

Bei der *Hazard Ratio* werden verschiedene *Hazard Rates* in Beziehung zueinander gesetzt. Unter Rate versteht man die Anzahl der Ereignisse in einer bestimmten Zeit. Die Rate in einer Gruppe wird dann mit der Rate in einer anderen Gruppe verglichen. Eine *Hazard Ratio* von 1 ( $HR = 1$ ) bedeutet, dass es keinen Unterschied zwischen zwei Gruppen gibt. Liegt die HR über 1, ist das Risiko für die beobachtete Gruppe größer, in einer bestimmten Zeit ein Ereignis zu haben. Liegt die HR unter 1, ist das Risiko für die beobachtete Gruppe kleiner als in der Vergleichsgruppe. Die Berechnungen wurden mit dem Programm R von Anita Höland aus dem Institut für Medizinische Informatik der JLU Gießen durchgeführt.

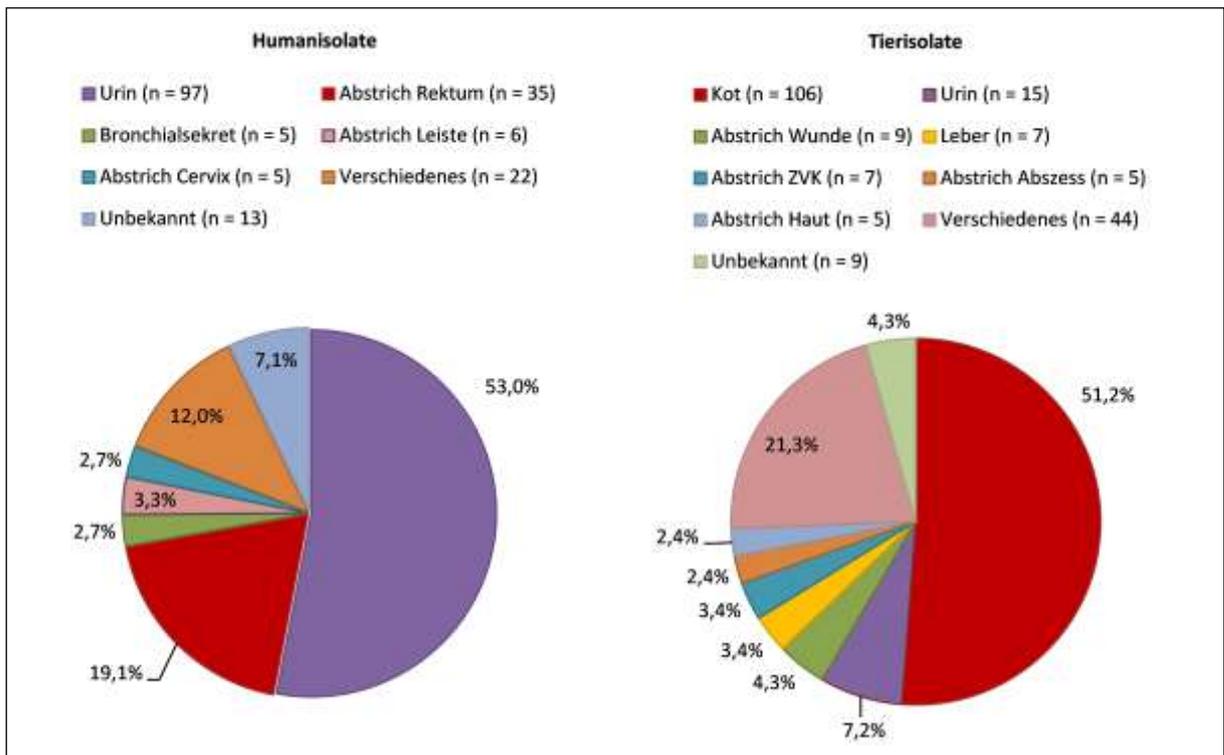
## 4. Ergebnisse

### 4.1 Charakterisierung der ESBL-verdächtigen Bakterienisolate

Insgesamt wurden 207 Tierisolate und 183 Humanisolate als ESBL-verdächtig eingestuft und weiter charakterisiert. Alle untersuchten Isolate kamen aus der Region Gießen und waren im Zeitraum von 2009 bis 2011 isoliert worden.

#### 4.1.1 Häufigkeitsverteilung der Isolate nach dem Probenmaterial

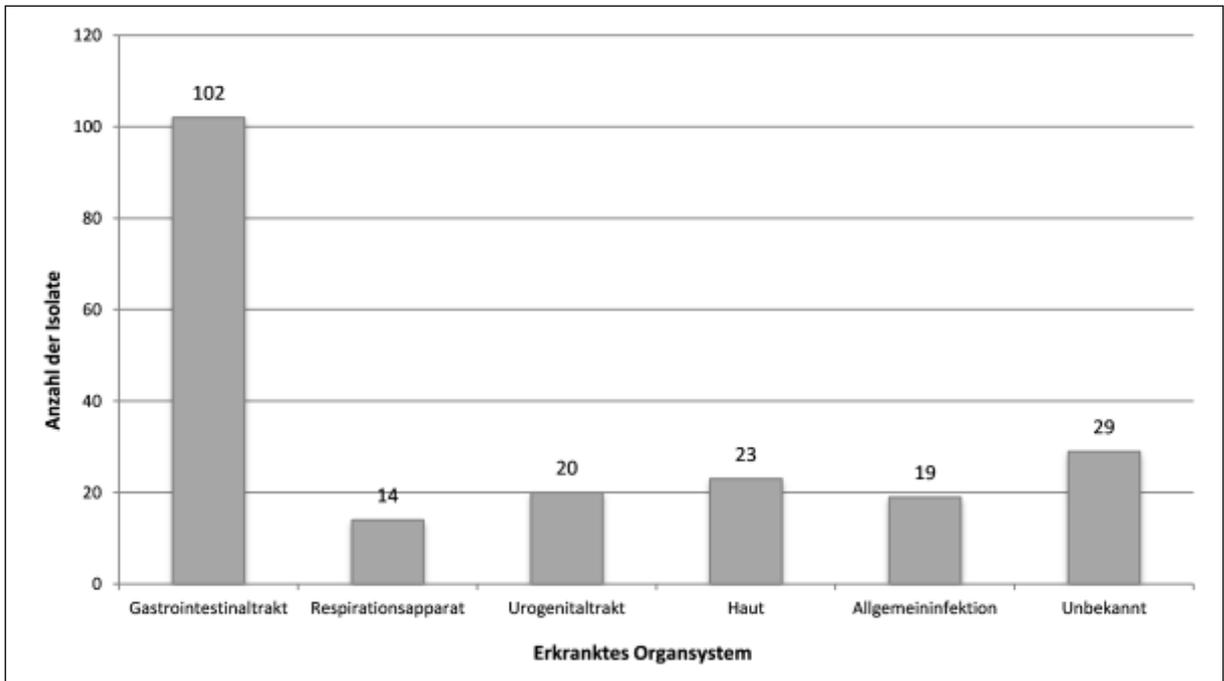
Bezüglich der Herkunft des Probenmaterials zeigten sich deutliche Unterschiede. Während die Humanisolate überwiegend aus Urin (53 %) und Rektalabstrichen (19 %) isoliert worden waren, stammte mehr als die Hälfte der Tierisolate (51 %) aus Kotproben (Abbildung 6). Die Bandbreite des Herkunftsmaterials war bei den Tierisolaten deutlich größer, als bei den Humanisolaten.



**Abbildung 6** Relative Häufigkeit des Probenmaterials, aus dem die untersuchten Human- (n = 183) und Tierisolate (n = 207) isoliert worden waren, Verschiedenes: s. Tabellen 32 und 33 im Anhang

#### 4.1.2 Häufigkeitsverteilung der Isolate nach der Erkrankung der Patienten

Bei den Humanisolaten kann keine Aussage über die Erkrankung der betroffenen Patienten gemacht werden. Eine Zuordnung wäre nur anhand des Materials oder der Herkunft der genommenen Probe möglich und daher vage. Allerdings ist eine Unterteilung in Isolate von ambulant behandelten und stationär aufgenommenen Patienten möglich. So stammen 55 Isolate (30,1 %) von ambulant behandelten und 128 (69,9 %) von stationär aufgenommenen Patienten. Bei den veterinärmedizinischen Isolaten kann eine genauere Einteilung der vorliegenden Erkrankung des Tieres vorgenommen werden. Den größten Anteil machen mit 49 % gastrointestinale Leiden aus, gefolgt von 11 % Hauterkrankungen, 10 % urogenitalen und 7 % respiratorischen Erkrankungen (Abbildung 7).

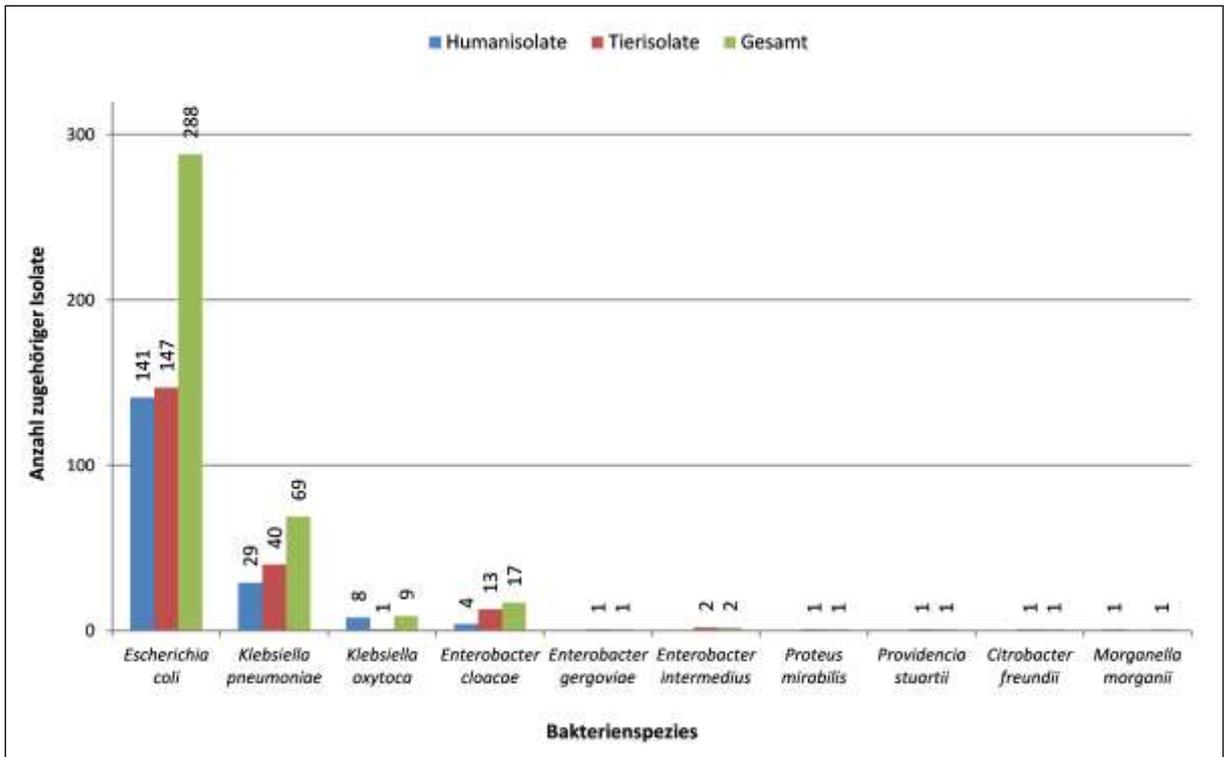


**Abbildung 7** Einteilung der untersuchten Tierisolate (n = 207) anhand des ursprünglich erkrankten Organsystems

#### 4.1.3 Häufigkeitsverteilung der Isolate nach taxonomischer Zugehörigkeit

Die Abbildung 8 zeigt die Häufigkeitsverteilung der charakterisierten 390 Human- und Tierisolate nach ihrer taxonomischen Zugehörigkeit. Den größten Teil der Isolate machte die Art *E. coli* (73,8 %) aus. Ebenfalls öfter vertreten waren *K. pneumoniae* (17,7 %) und *Enterobacter cloacae* (4,4 %) (Abbildung 8). Dabei war die Verteilung von *E. coli* und *K. pneumoniae* in beiden Gruppen (Human- und Tierisolate) ähnlich (*E. coli*: Humanisolate

77 %, Tierisolate 71 %; *K. pneumoniae*: Humanisolate 15,8 %, Tierisolate 19,3 %). Des Weiteren wurden bei den Humanisolaten die Spezies *Klebsiella oxytoca* und *Morganella morganii* nachgewiesen. Bei den Tierisolaten konnten vereinzelt die Spezies *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter intermedius*, *Citrobacter freundii*, *Providencia stuartii*, *Enterobacter gergoviae* und *Proteus mirabilis* identifiziert werden.



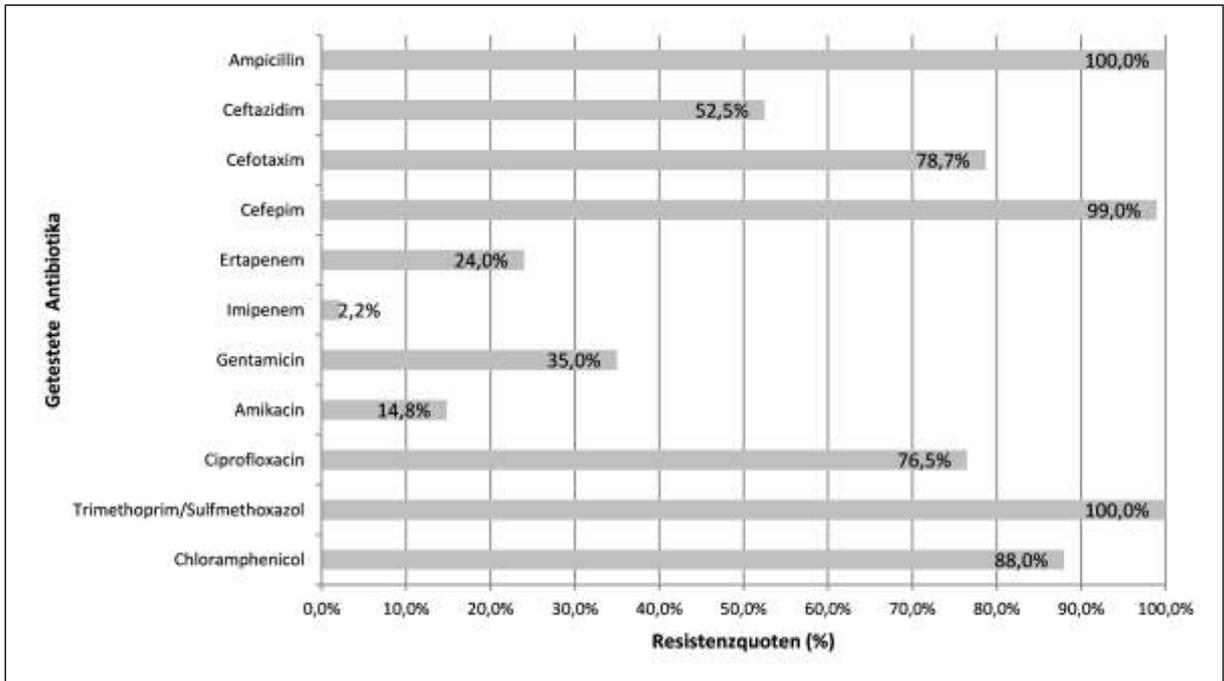
**Abbildung 8** Verteilung der ESBL-verdächtigen Bakterienisolate nach ihrer taxonomischen Zugehörigkeit zu Spezies *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter gergoviae*, *Enterobacter intermedius*, *Proteus mirabilis*, *Providencia stuartii*, *Citrobacter freundii* und *Morganella morganii*

#### 4.1.4 Resistenzquoten

Neben der Resistenz gegen  $\beta$ -Laktame zeigen ESBL-Produzenten oft auch Resistenzen gegen andere Antibiotikaklassen. Daher wurden die in dieser Arbeit untersuchten Isolate auf ihre Resistenz gegen die folgenden Antibiotika getestet: Ampicillin, Ceftazidim, Cefotaxim, Cefepim, Ertapenem, Imipenem, Gentamicin, Amikacin, Ciprofloxacin, Trimethoprim/Sulfmethoxazol, Chloramphenicol, Tetracyclin und Nalidixinsäure. Die Beurteilung ihrer MHK erfolgte nach den Kriterien des *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) von 2012 mit Ausnahme der MHKs für Nalidixinsäure und

Tetracyclin, da für diese Wirkstoffe bis jetzt keine Breakpoints angegeben wurden. Daher wurden für diese beiden Antibiotika die Kriterien des *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* von 2012 angewendet.

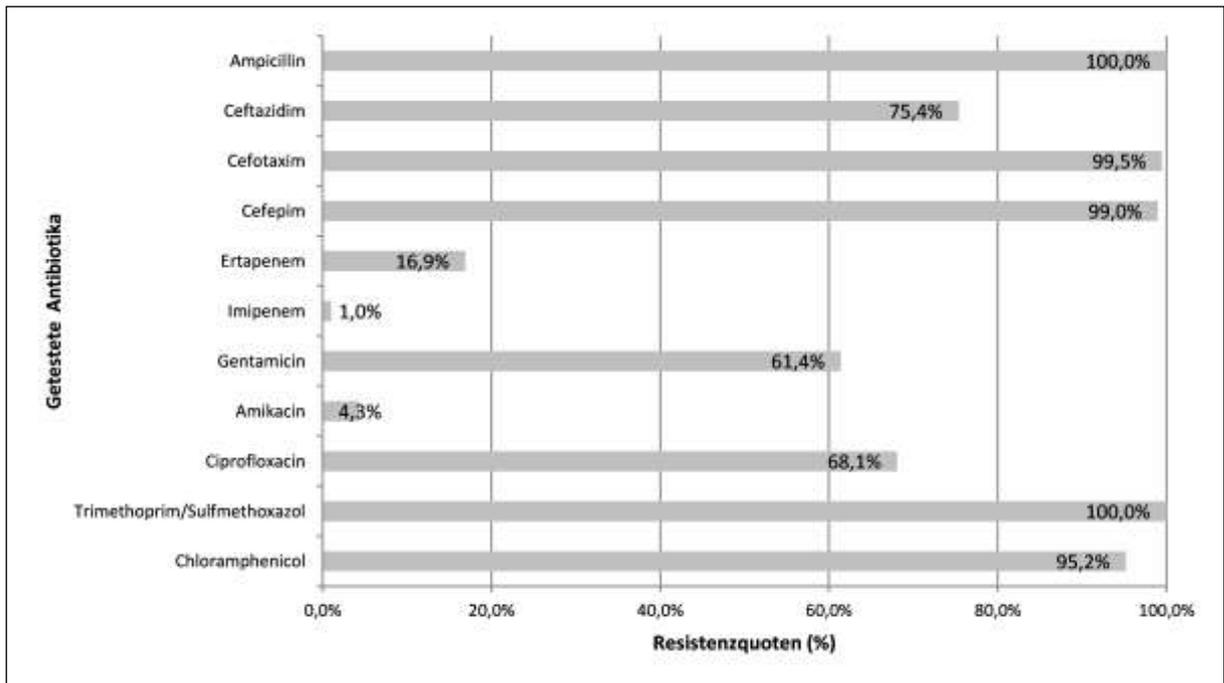
## Humanisolate



**Abbildung 9** Resistenzquoten der ESBL-verdächtigen Humanisolate (n = 183) Die Interpretation (resistent/sensibel) der MHK erfolgte nach den Kriterien des *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)* von 2012.

Die Resistenzquoten für die Humanisolate werden in Abbildung 9 dargestellt. Alle getesteten Isolate (n = 183) zeigten Resistenz gegen Trimethoprim/Sulfmethoxazol und Ampicillin. Für die Cephalosporine der 3. und 4. Generation wurden Resistenzquoten von 52,5 % (Ceftazidim), 78,7 % (Cefotaxim) und 99 % (Cefepim) nachgewiesen. In der Gruppe der Carbapeneme zeigten sich deutliche Diskrepanzen. Eine Resistenz gegen Imipenem lag nur in 2,2 % der Fälle vor. Im Gegensatz dazu waren ein Viertel aller Isolate (24 %) gegen Ertapenem resistent (einschließlich der 4 Imipenem-resistenten Isolate). In der Gruppe der Aminoglykoside, vertreten durch Amikacin und Gentamicin, traten Resistenzquoten von 14,8 % (Amikacin) und 35 % (Gentamicin) auf. Gegen das Fluorchinolon Ciprofloxacin wurde Resistenz bei 76,5 % aller Isolate festgestellt. Für Chloramphenicol lag die Quote resistenter Isolate bei 88 %. Für Nalidixinsäure wurde eine Resistenzquote von 83,6 % nachgewiesen. Für Tetracyclin lag sie bei 60,7 %.

## Tierisolate



**Abbildung 10** Resistenzquoten der ESBL-verdächtigen Tierisolate (n = 207) Die Interpretation (resistent/sensibel) der MHK der einzelnen Isolate erfolgte nach den Kriterien des European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) von 2012.

Die Resistenzquoten für die untersuchten Tierisolate sind in Abbildung 10 dargestellt. Alle getesteten Isolate (n = 207) waren resistent gegen Trimethoprim/Sulfmethoxazol und Ampicillin. Die Resistenz gegen Cephalosporine zeigte folgende Ausprägungen: 75,4 % Resistenz gegen Ceftazidim, 99,5 % Resistenz gegen Cefotaxim und 99 % Resistenz gegen Cefepim. Auch hier war ein deutlicher Unterschied in der Gruppe der Carbapeneme zu verzeichnen. Nur 1 % der Isolate war resistent gegen Imipenem, aber 16,9 % waren Ertapenem-resistent, was aber nur 2 der 4 Imipenem-resistenten Isolate einschloss. Amikacinresistenz war bei 4,3 % und Resistenz gegen Gentamicin bei 61,4 % zu finden. Eine Unempfindlichkeit gegen Ciprofloxacin trat bei 68,1 % der Isolate auf und Resistenz gegen Chloramphenicol bei 95,2 %. Nalidixinsäure 76,8 %. Die Resistenzquoten für Nalidixinsäure und Tetracylin lagen bei 76,8 % und 76,3 %.

In ihren Resistenzquoten waren sich die Human- und Tierisolate in den meisten Fällen sehr ähnlich, wenn nicht sogar identisch wie in den Fällen von Ampicillin und Trimethoprim/Sulfamethoxazol (100 % resistent) sowie Cefepim (99 % bzw. 99,5 % resistent). Unterschiede waren insbesondere bei den Cephalosporinen Ceftazidim und Cefotaxim auszumachen. Hier war die Quote resistent getesteter Isolate in der Gruppe der

Tierisolate (75,4 % und 99,5 %) deutlich höher als bei den Humanisolaten (52,5 % und 78,7 %). Ein ähnlicher Unterschied ließ sich bei dem Aminoglykosid Gentamicin feststellen, bei dem 61,4 % der Tier- aber nur 35 % der Humanisolate resistent waren. Umgekehrte Verhältnisse fanden sich allerdings bei Amikacin. Dort waren nur 4,3 % der Tierisolate resistent, aber 14,8 % der Humanisolate. Während die Resistenzquoten für Imipenem in beiden Gruppen niedrig war (2,2 % vs. 1,0 %), waren gegen Ertapenem immerhin 24 % der Human- und 16,9 % der Tierisolate resistent.

#### 4.1.5 Nachweis und Klassifizierung von $\beta$ -Laktamasen bei Cephalosporin-resistenten Isolaten

##### 4.1.5.1 Identifizierte ESBL-/AmpC-Produzenten

Die Detektion von ESBL-Produzenten unter den Human- und Tierisolaten erfolgte mit dem DDST. Isolate, die in diesem Test keine *Ghost zone* aufwiesen, aber bei keinem Antibiotikaplättchen einen Hemmhof zeigten, wurden ebenfalls weiter charakterisiert, da hier Verdacht auf ein Carbapenemase-produzierendes Isolat oder einen anderen Resistenzmechanismus bestand wie z. B. der Produktion einer AmpC in Kombination mit einem Porinverlust. Durch die parallele Untersuchung aller Isolate auf MH-Platten mit Flucloxacillin-Zusatz und und MH-Platten ohne diesen Zusatz konnte eine relativ sichere Identifikation von AmpC-bildenden Isolaten erfolgen.

**Tabelle 21** Übersicht über die Ergebnisse der untersuchten Isolate auf ESBLs und AmpC mittels DDST und *MAST AmpC Detection Set*

Merkmal	Anzahl an Bakterienisolaten	
	vom Menschen	von Tieren
Gesamtanzahl untersuchter Isolate	200	313
DDST		
verdächtig auf ESBL-Bildung	183	207
verdächtig auf ESBL- und AmpC-Bildung	16 <sup>a</sup>	23 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>in allen Fällen wurde die Produktion einer AmpC mittels *MASTDISCSTM AmpC Detection Set D69C* nachgewiesen

#### Humanisolate

Von den insgesamt 200 untersuchten Humanisolaten, die Resistenz gegen ein oder mehrere Cephalosporine der 3. Generation zeigten, wiesen 183 (91,5 %) ein positives Ergebnis im DDST auf und waren somit verdächtig, eine ESBL zu bilden. Ein Teil dieser 183 Isolate (n = 16;

8,7 %) wurde per DDST außerdem als AmpC-Produzent identifiziert. Dieses Ergebnis wurde in allen 16 Fällen mit dem *MAST AmpC Detection Set* bestätigt (Tabelle 21).

### **Tierisolate**

Von 313 ursprünglich aus der Stammsammlung des Institutes für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere stammenden Isolaten, reagierten 207 (66 %) im DDST positiv. Diese 207 Isolate wurden zur weiteren molekularbiologischen Charakterisierung herangezogen. Im DDST gaben 23 der 207 Isolate Hinweise auf eine AmpC-Bildung. Diese 207 Isolate wurden deshalb der weitergehenden molekularbiologischen Charakterisierung unterzogen. Im DDST waren 23 (11,1 %) der 207 DDST-positiven Isolate außerdem verdächtig, neben einer ESBL auch eine AmpC zu bilden. Bei allen 23 Isolaten wurde die AmpC-Bildung mit dem *MAST AmpC Detection Set* bestätigt (Tabelle 21).

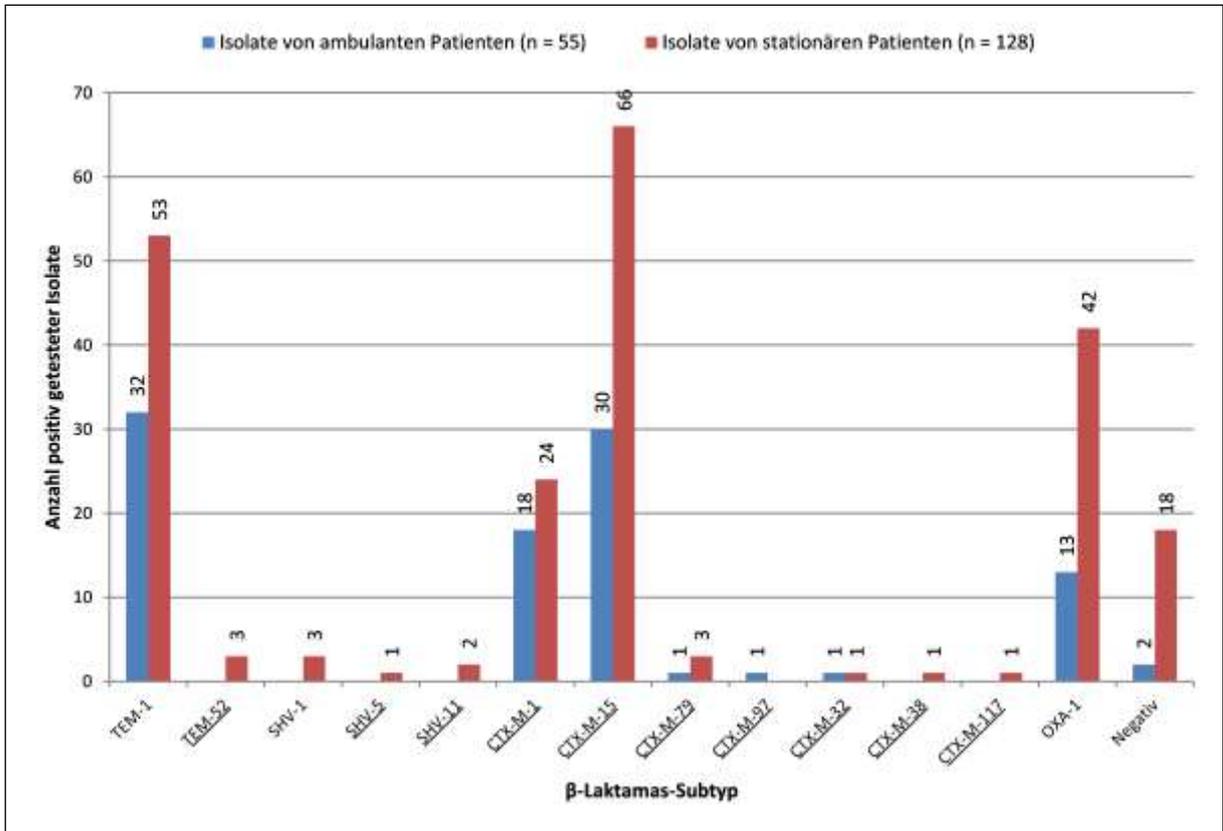
#### **4.1.5.2 Identifizierte $\beta$ -Laktamase und ESBL Allele**

Alle Isolate mit einem positiven Ergebnis im DDST wurden mittel PCR auf das Vorkommen eines *bla*-Gens untersucht. In allen positiven Fällen wurde das Amplikon sequenziert. Zusätzlich wurden alle Isolate einer spezifischen PCR-Untersuchung auf die Präsenz von *bla<sub>OXA-1</sub>* unterzogen, wobei die etwaigen PCR-Amplikons nicht sequenziert wurden. Insgesamt wurden die Gene für 20 verschiedene  $\beta$ -Laktamase-Gene gefunden, darunter 4 Penicillinasen, 15 ESBLs und eine Carbapenemase.

### **Humanisolate**

Beim überwiegenden Teil der weiter untersuchten ESBL-verdächtigen Isolate (n = 183) war mittels PCR mindestens ein *bla*-Gen nachweisbar. Dabei wurden 153 Isolate (83,6 %) als Träger eines ESBL-Gens identifiziert. Das mit Abstand am häufigsten gefundene ESBL-Gen war *bla<sub>CTX-M</sub>*, das bei 147 Isolaten vorhanden war (80,3 % der 183 Isolate bzw. 97,3 % der 151 ESBL-Gen-positiven Isolate). Dabei kodierten 28,6 % dieser 147 Isolate für *bla<sub>CTX-M-1</sub>* und 65,3 % für *bla<sub>CTX-M-15</sub>*. Ferner wurden die CTX-M-Gene *bla<sub>CTX-M-32</sub>* (2 Isolate), *bla<sub>CTX-M-38</sub>* (1 Isolat), *bla<sub>CTX-M-79</sub>* (4 Isolate), *bla<sub>CTX-M-97</sub>* (1 Isolat) und *bla<sub>CTX-M-115</sub>* (1 Isolat) gefunden. Aus der Gruppe der Penicillinasen wurde sowohl *bla<sub>SHV-1</sub>* (3 Isolate) als auch *bla<sub>TEM-1</sub>* (85 Isolate) gefunden. Ein *bla<sub>TEM</sub>*-Gen konnte bei insgesamt 88 (48,1 %) der 183 untersuchten

Humanisolate nachgewiesen werden, wobei es sich in 96,6 % der Fälle um  $bla_{TEM-1}$  handelte. Das Gen für die Penicillinase OXA-1 wurde bei 30,1 % der Isolate gefunden. Bei 20 Isolaten konnte trotz positivem DDST mit den hier eingesetzten Primern, kein  $bla$ -Gen detektiert werden.



**Abbildung 11** Häufigkeit der identifizierten β-Laktamase-Sequenztypen bei den ESBL-verdächtigen Humanisolaten (n = 183). Viele Isolate kodierten für mehr als eine β-Laktamase. ESBL-Subtypen sind unterstrichen

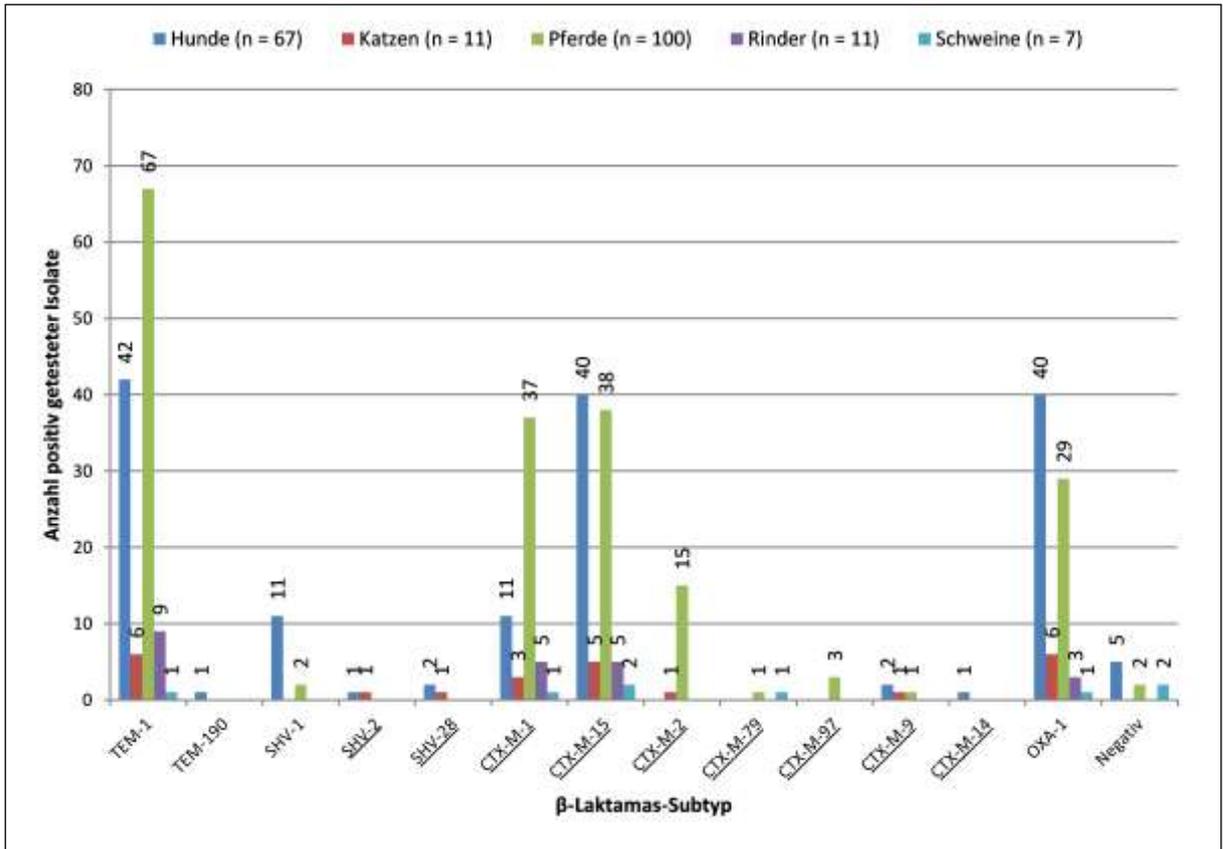
Beim Vergleich der Isolate nach ihrer Herkunft von ambulant behandelten oder stationär aufgenommenen Patienten ließen sich nur geringe Unterschiede feststellen. Mit 58,2 % wurde  $bla_{TEM-1}$  prozentual häufiger bei Isolaten von ambulanten Patienten nachgewiesen als bei den Isolaten von stationären Patienten (41,4 %). Das Gen  $bla_{CTX-M-1}$  war unter den Isolaten von ambulant behandelten Patienten häufiger vertreten als bei solchen von stationär aufgenommenen Patienten (32,7 % vs. 18,8 %), wogegen bei der Verteilung von  $bla_{CTX-M-15}$  kaum Unterschiede zu verzeichnen waren (stationär 51,6 % vs. ambulant 54,5 %). Die Penicillinase TEM-1 wurde innerhalb der Isolate von ambulant behandelten Patienten häufiger als  $bla_{OXA-1}$  gefunden (TEM-1 58,2 % vs. OXA-1 23,6 %). In der Gruppe der Isolate

von stationär aufgenommenen Patienten sind die Unterschiede nicht so groß (TEM-1 41,4 % vs. 32,8 %). Die Ergebnisse sind in der Abbildung 11 und in der Tabelle 22 dargestellt.

### Tierisolate

Auch hier konnte bei der überwiegenden Anzahl der untersuchten ESBL-verdächtigen Bakterienisolaten (196 von 207 Isolaten; 94,7 %) mindestens ein *bla*-Gen detektiert werden. Ein ESBL-Gen wurde bei 187 (90,3 %) aller 207 ESBL-verdächtigen Isolate nachgewiesen (Abbildung 12 und Tabelle 22). Wie bei den Humanisolaten, so war CTX-M auch bei den Tierisolaten der am häufigsten kodierte ESBL-Typ. Die beiden am häufigsten gefundenen CTX-M-Gene waren auch hier *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (46,9 %) und *bla*<sub>CTX-M-1</sub> (27,5 %). Das *bla*<sub>CTX-M-2</sub>-Gen war mit 7,7 % ebenfalls öfter vertreten. Zusätzlich identifizierte Gene waren *bla*<sub>CTX-M-9</sub> (4 Isolate), *bla*<sub>CTX-M-14</sub> (1 Isolat), *bla*<sub>CTX-M-79</sub> (2 Isolate) und *bla*<sub>CTX-M-97</sub> (3 Isolate). Das Gen *bla*<sub>SHV</sub> wurde bei 10,6 % aller 207 untersuchter Tierisolate identifiziert, wobei 68,2 % der *bla*<sub>SHV</sub>-positiven Isolate Träger von *bla*<sub>SHV-1</sub> waren. Zusätzlich wurden die ESBL-SHV-Gene *bla*<sub>SHV-2</sub> (3 Isolate) und *bla*<sub>SHV-28</sub> (4 Isolate) gefunden. Bei 131 Isolaten (63,3 % aller Tierisolate) wurden *bla*<sub>TEM</sub>-Gene gefunden. Davon konnten 99,2 % dem Subtyp *bla*<sub>TEM-1</sub> zugeordnet werden. Bei einem Isolat wurde die Penicillinase-Variante *bla*<sub>TEM-190</sub> identifiziert. Das Gen *bla*<sub>OXA-1</sub> wurde bei 86 Isolaten, also bei 41,5 % aller Tierisolate nachgewiesen. Bei 11 Stämmen konnte mit den verwendeten Primern kein *bla*-Gen nachgewiesen werden. Die Penicillinase TEM-1 wurde in hohem Maße bei Isolaten von Hunden (62,7 %), Pferden (67 %) und Rindern (81,8 %) detektiert. Die *bla*<sub>SHV</sub>-Gene waren am häufigsten in den Hundeisolaten zu finden (*bla*<sub>SHV-1</sub>, *bla*<sub>SHV-2</sub>, *bla*<sub>SHV-28</sub>; 14 von 67 Isolaten). Die höchste Quote von *bla*<sub>CTX-M-15</sub>-positiver Isolate war bei den Isolaten von sonstigen Tierarten (Kaninchen: n = 3, Meerschweinchen: n = 2, Kanarienvogel: n = 2, Ratten: n = 1, Mäuse: n = 1, Löwen: n = 1, Hühner: n = 1) zu verzeichnen (72,7 %), gefolgt von 59,7 % bei den Hunde-, 45,5 % bei den Rinder-, 38 % bei den Pferde- und 36,4 % bei den Katzenisolaten.





**Abbildung 12** Häufigkeit der identifizierten β-Laktamase-Sequenztypen bei den ESBL-verdächtigen Tierisolaten (n = 207). Viele Isolate kodierten für mehr als eine β-Laktamase. Die Gruppe der „anderen Tierarten“ (n = 11) wurde der Übersicht halber nicht dargestellt. ESBL-Subtypen sind unterstrichen

Im Gegensatz zu *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (59,7 %) wurde das ESBL kodierende *bla*<sub>CTX-M-1</sub> nur bei 16,4 % der Hundesolaten identifiziert. Unter den Pferde- und Rinderisolaten hielten sich die Nachweisquoten für *bla*<sub>CTX-M-1</sub> (Rind: 45,5 %, Pferd: 37 %) und *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (Rind: 45,5 %, Pferd: 38 %) die Waage. Die Variante *bla*<sub>CTX-M-2</sub> trat fast ausschließlich bei Isolaten von Pferden auf (93,8 % aller *bla*<sub>CTX-M-2</sub>-positiven Isolate). Ebenso auf diese Tiergruppe beschränkt war der Nachweis von *bla*<sub>CTX-M-97</sub>. OXA-1 wurde überwiegend bei den Hunde- (59,7 %), Katzen- (45,5 %) und Pferdisolaten (29 %) gefunden.

### Vergleich der Humanisolate mit den Tierisolaten

Insgesamt zeigte sich bei beiden Gruppen ein relativ ähnliches Bild was die Häufigkeit der einzelnen β-Laktamasegene betrifft (Tabelle 22). In beiden Gruppen war *bla*<sub>CTX-M-15</sub> das am häufigsten gefundene ESBL-Allel (52,5 % der Humanisolate, 46,9 % der Tierisolate), gefolgt von *bla*<sub>CTX-M-1</sub> (23 % der Humanisolate, 27,5 % der Tierisolate). Das Allel *bla*<sub>TEM-1</sub> wurde häufig bei Hundesolaten (62,7 %), Isolaten von ambulant behandelten Humanpatienten (58,2 %)

sowie bei Rinder- (81,8 %) und Pferdeisolaten (67 %) gefunden. Die insgesamt in beiden Gruppen am häufigsten identifizierten  $\beta$ -Laktamaseallele sind  $bla_{TEM-1}$  mit 215 Isolaten (55,1 % aller Isolate),  $bla_{CTX-M-15}$  mit 193 Isolaten (49,5 %),  $bla_{OXA-1}$  mit 141 Isolaten (36,2 %) und  $bla_{CTX-M-1}$  mit 99 Isolaten (25,4 %). In beiden Gruppen gab es Isolate die zwar im DDST eine positive Reaktion gezeigt haben, bei denen aber mit den in dieser Studie verwendeten Primerpaaren kein Nachweis eines  $bla$ -Gens möglich war (20 Humanisolate, 11 Tierisolate). Folgende ESBL-Subtypen wurden nur in der Gruppe der Humanisolate gefunden: TEM-52, SHV-5, SHV-11, CTX-M-32, CTX-M-38 und CTX-M-117. Wohingegen die ESBL-Subtypen SHV-2, SHV-28, CTX-M-2, CTX-M-9 und CTX-M-14 nur bei den Tierisolaten nachgewiesen worden sind.

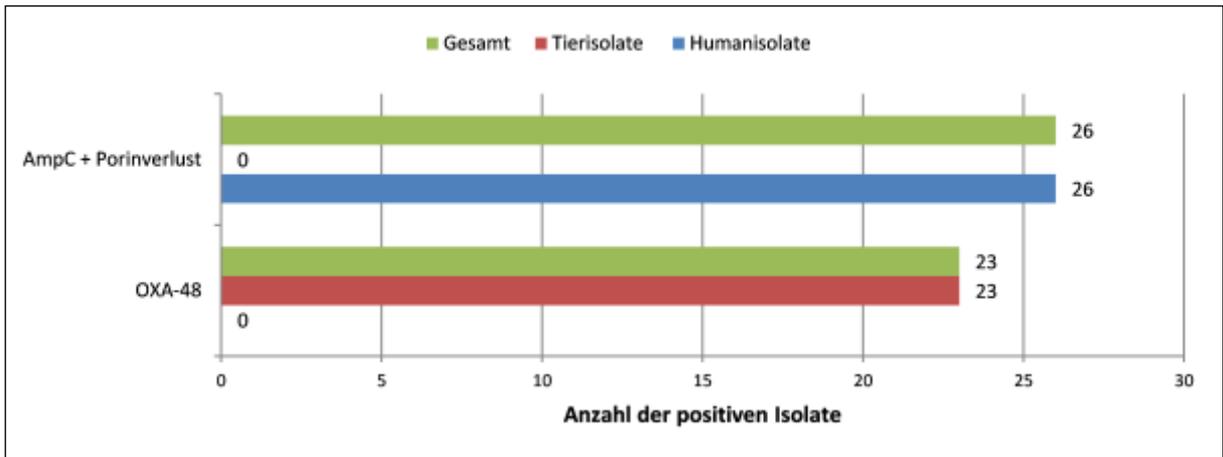
#### 4.1.6 Eigenschaften der Carbapenem-resistenten Isolate

Im Resistenztest hatten sich insgesamt 85 untersuchte Bakterienisolate (48 Humanisolate, 37 Tierisolate) als Imipenem- und/oder Ertapenem-resistent gezeigt. Alle diese phänotypisch als Carbapenem-resistent beurteilten Isolate wurden mit dem *Carbapenemase Detection Set* überprüft. Dieser Kit erlaubt es, zwischen der Produktion einer Carbapenemase und der Kombination aus AmpC-Produktion und Porinverlust zu differenzieren. Beide bakteriellen Eigenschaften können sich phänotypisch als Carbapenemresistenz äußern. Die Präsenz der Carbapenemase  $bla_{OXA-48}$  wurde mit einer spezifischen PCR getestet. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in der Abbildung 13 dargestellt.

Unter den Humanisolaten konnte mit dem *Carbapenemase Detection Set* bei 26 Isolaten (54,2 %) die Kombination aus AmpC-Bildung und Porinverlust nachweisen. Das Carbapenemasegen  $bla_{OXA-48}$  war bei keinem der 48 untersuchten Humanisolate nachweisbar.

Im Gegensatz zu den Befunden bei Humanisolaten konnte die Kombination aus AmpC-Bildung und Porinverlust bei keinem der Tierisolate gefunden werden. Stattdessen wurde  $bla_{OXA-48}$  bei 23 der 37 getesteten Tierisolate (62,2 %) nachgewiesen. Der größte Anteil der  $bla_{OXA-48}$ -positiven Isolate stammte von Hunden (n = 16; 69,6 %). Außerdem war das Gen bei 2 Katzen-, einem Pferde-, einem Meerschweinchen-, einem Kaninchen-, einem Ratten und einem Mausisolat vorhanden. Die Carbapenem-resistenten Humanisolate

gehörten hauptsächlich den Spezies *E. coli* (30 Isolate, 62,5 %) und *K. pneumoniae* (9 Isolate, 18,8 %) an. Im Gegensatz dazu war bei den Carbapenem-resistenten Tierisolaten hauptsächlich *K. pneumoniae* (24 Isolate, 64,9 %) und *Enterobacter cloacae* (12 Isolate, 32,4 %) vertreten. Bei den übrigen 22 Human- und 13 Tierisolaten kann der Phänotyp der Carbapenemresistenz durch Carbapenemasen hervorgerufen worden sein, deren Präsenz in dieser Studie nicht überprüft worden ist.



**Abbildung 13** Anzahl von Isolaten mit AmpC-Bildung und Porinverlust oder OXA-48-Gen unter den untersuchten Carbapenem-resistenten Bakterienisolaten (48 Humanisolate, 37 Tierisolate). Ergebnisse im *Carbapenemase Detection Set* und in der OXA-48-PCR.

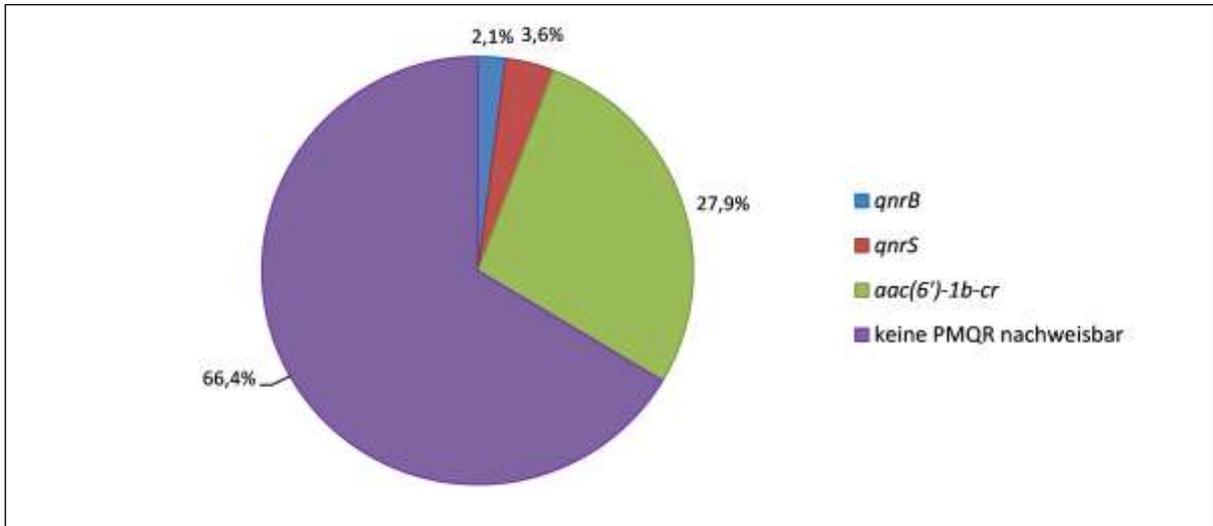
#### 4.1.7 Eigenschaften der Ciprofloxacin-resistenten Isolate

Alle Bakterienisolate, bei denen für Ciprofloxacin eine MHK von  $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$  oder größer ermittelt wurde, galten gemäß EUCAST-Grenzwerten als resistent (EUCAST, 2012) und wurden nachfolgend mittels PCR auf die Präsenz von PMQR-Genen getestet. Dies betraf insgesamt 140 Human- und 141 Tierisolate.

##### Humanisolate

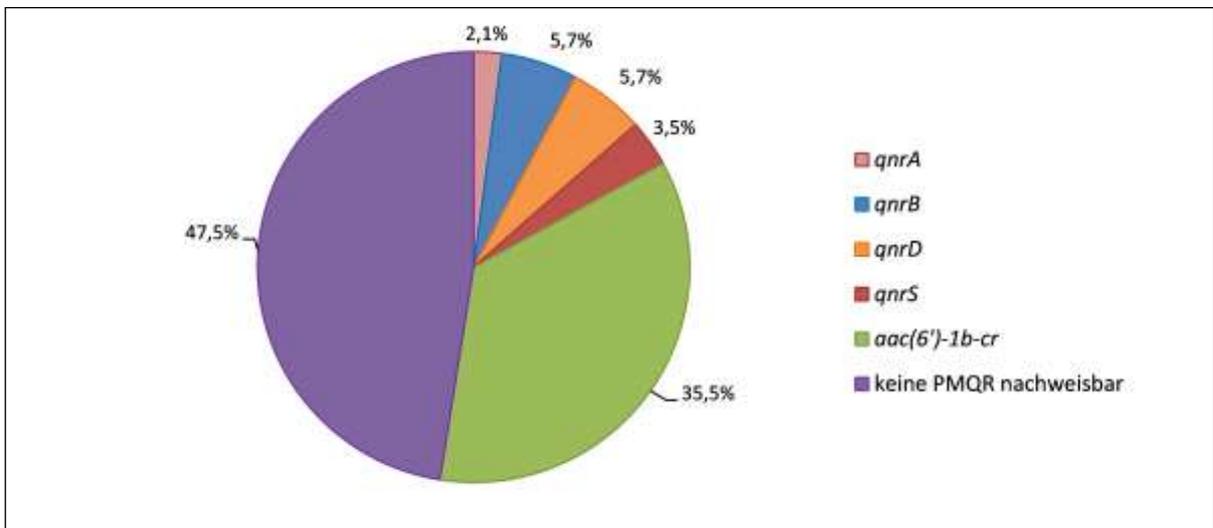
Der größere Teil der Ciprofloxacin-resistenten Humanisolate war von stationär behandelten Patienten isoliert worden (stationäre Patienten: 98 Isolate, ambulante Patienten: 42 Isolate). Bei 47 Isolaten (33,6 %) wurde ein PMQR-Gen detektiert. Den überwiegenden Anteil bildete dabei das Gen für die Aminoglycosid-6'-N-Acetyltransferase-Variante AAC(6')-1b-cr, die auch Chinolone acetylieren kann. Das Gen wurde bei 39 Isolaten, also bei 27,9 % der

Ciprofloxacin-resistenten Isolate gefunden. Außerdem wurden die Gene *qnrB* (3 Isolate; 2,1 %) und *qnrS* (5 Isolate; 3,6 %) nachgewiesen (Abbildung 14 und Tabelle 23).



**Abbildung 14** Relative Häufigkeiten der detektierten PMQR Gene bei den phänotypisch Ciprofloxacin-resistenten ( $\text{MHK} \geq 1 \mu\text{g/ml}$ ) Humanisolaten ( $n = 140$ )

### Tierisolate



**Abbildung 15** Relative Häufigkeiten der detektierten PMQR-Gene bei den phänotypisch Ciprofloxacin-resistenten ( $\text{MHK} \geq 1 \mu\text{g/ml}$ ) Tierisolaten ( $n = 141$ )

Bei den Tierisolaten trugen 74 (52,5 %) ein PMQR-Gen. Auch hier war mit 50 Isolaten (35,5 %) das Gen *aac(6')-1b-cr* am häufigsten, gefolgt von *qnrB* und *qnrD* mit jeweils 8 Isolaten (je 5,7 %). Außerdem waren auch *qnrS* (5 Isolate; 3,5 %) und *qnrA* (3 Isolate, 2,1 %) nachweisbar. Bei 47,5 % der Isolate konnte kein PMQR-Gen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 und Tabelle 23 dargestellt.

## Vergleich der Humanisolate mit den Tierisolaten

In beiden Gruppen war das am häufigsten nachgewiesene PMQR-Gen das Gen für die Aminoglycosid-6'-N-Acetyltransferase-Variante AAC(6')-1b-cr (27,9 % der Humanisolate und 35,5 % der Tierisolate). Im Vergleich mit den Humanisolaten (5,7 %) kamen die die *qnr*-Gene bei den Tierisolaten (17,0 %) fast dreimal so häufig vor. Unter den Tierisolaten war das Spektrum an *qnr*-Genen auch größer. Während bei den Humanisolaten nur die Varianten *qnrB* und *qnrS* auftraten, kamen bei den Tierisolaten außerdem auch *qnrA* und *qnrD* vor. Das Gen für die Effluxpumpe *qepA* wurde in keiner von beiden Gruppen detektiert (Tabelle 23).

**Tabelle 23** Relative Häufigkeiten der identifizierten PMQR-Gene bei den phänotypisch Ciprofloxacin-resistenten Human- (n = 140) und Tierisolaten (n = 141)

Herkunft	Anzahl untersuchte Isolate	Relative Häufigkeit der PMQR-Gene [%] (Isolatanzahl)						
		<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrC</i>	<i>qnrD</i>	<i>qnrS</i>	<i>qepA</i>	<i>aac(6')-1b-cr</i>
<b>Humanisolate</b>								
Ambulant	42					4,8 (2)		19 (8)
Stationär	98		3,1 (3)			3,1 (3)		31,6 (31)
Gesamt	140		2,1 (3)			3,6 (5)		27,9 (39)
<b>Tierisolate</b>								
Hunde	63	1,6 (1)	7,9 (5)		4,8 (3)	1,6 (1)		49,2 (31)
Katzen	10	20 (2)	20 (2)					40 (4)
Pferde	49				10,2 (5)	8,2 (4)		20,4 (10)
Rinder	8							12,5 (1)
Schweine	2							50 (1)
Andere Tierarten	9		11,1 (1)					33,3 (3)
Gesamt	141	2,5 (3)	5,7 (8)		5,7 (8)	4,1 (5)		35,5 (50)
<b>Gesamtanzahl</b>	<b>281</b>	<b>1,1 (3)</b>	<b>3,9 (11)</b>		<b>2,8 (8)</b>	<b>3,6 (10)</b>		<b>31,7 (89)</b>

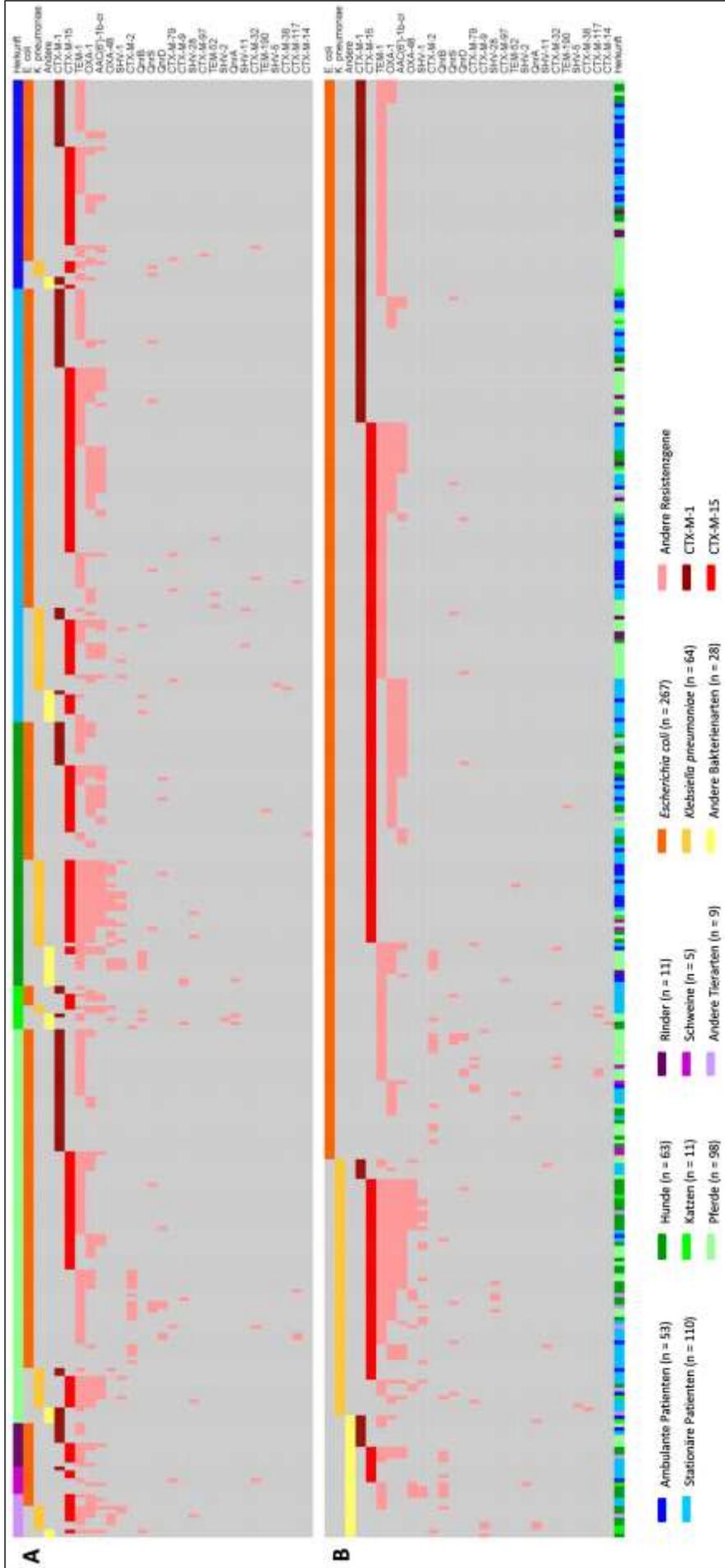
### 4.1.8 Kombination zwischen $\beta$ -Laktamase- und PMQR-Typen

Aus der Fachliteratur ist bekannt, dass verschiedener  $\beta$ -Laktamase-Subtypen in ein und demselben Bakterienstamm vorkommen können. Da sie meist Plasmid-kodiert sind, ist es darüberhinaus möglich, dass sie bei vielen Bakterienstämmen auch in Kombination mit PMQR-Genen auftreten. Deshalb wurde die Kombination aller detektierten  $\beta$ -Laktamase-

(*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub> und *bla*<sub>OXA-48</sub>) und PMQR- (*qnrA*, *qnrB*, *qnrD*, *qnrS*, und *aac(6')-1b-cr*) Gene in den bearbeiteten Human- und Tierisolaten untersucht. Eine vorläufige Erkennung und Visualisierung von Clustern und/oder Resistenzmustern im Kontext von Isolat Herkunft und Bakterienart wurde unter Verwendung des Programmes GENE-E (GENE-E, 2014) durchgeführt. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Form von sogenannten Heatmaps in der Abbildung 16 dargestellt. Die Daten wurden anschließend durch Analyse der absoluten und relativen Zahlen (Prozentsätze) bestätigt (Tabelle 24). Die Vergesellschaftung bestimmter Resistenzgene könnte auf eine möglicherweise vorhandene Multidrug-Resistance-(MDR)-Kassette oder -Region im Plasmid hindeuten.

### Humanisolate

Bei 10,9 % (n = 20) der Isolate wurde kein Resistenzgen identifiziert. Ca. ein Viertel der Isolate (25,1 %, n = 46) trug nur ein Resistenzgen. Am häufigsten waren Isolate mit 2 oder mehr Resistenzgenen (63,9 %, n = 117). Davon entfielen 39,9 % (n = 73) auf Isolate mit 2 Resistenzgenen, 14,8 % (n = 27) auf Isolate mit 3 Resistenzgenen und 8,7 % (n = 16) auf Isolate mit 4 Resistenzgenen. Ein Isolat kodierte 5 Resistenzgene (Tabelle 24 und Abbildung 16). Die am häufigsten vertretene Kombination war die der Pencillinase TEM-1 mit einer ESBL vom CTX-M-Typ (Muster 1). Sie wurde bei 28,4 % (n = 52) der Humanisolate gefunden und war mit 94,2 % fast nur bei *E. coli*-Isolaten vorhanden. Ebenfalls oft detektiert wurden das Muster 8, die Kombination aus einer CTX-M- $\beta$ -Laktamase, der Pencillinase OXA-1 und einem PMQR-Gen (10,9 %, n = 20) und das Muster 4 (TEM-1/OXA-1/CTX-M/PMQR) mit 7,1 % (n = 13). Dabei war Muster 8 ebenfalls fast nur bei *E. coli*-Isolaten zu finden (85 % der Isolate mit Muster 8). Außerdem wurde die Kombination aus CTX-M und OXA-1 (Muster 11) bei 6,6 % (n = 12) der Humanisolate detektiert. Seltene Kombinationen bei Humanisolaten waren: TEM-1/PMQR (n = 3), SHV-11/CTX-M-15/OXA-1/PMQR (n = 1), SHV-1/CTX-M-15 (n = 1), TEM-1/SHV-1/OXA-1/PMQR (n = 1), TEM-1/SHV-11/CTX-M-1 (n = 1), TEM-52/CTX-M-15 (n = 1) und TEM-52/OXA-1 (n = 1).



**Abbildung 16** Heatmaps der kodierten Resistenzgene und Spezieszugehörigkeit der untersuchten Human- und Tierisolate. **A** Primäre Reihung der Isolate nach ihrer Herkunft. **B** Primäre Reihung der Isolate nach Spezieszugehörigkeit. Die identifizierten Resistenzgene und Bakterienspezies sind rechts von der Abbildung nach ihrer Frequenz aufgeführt (Ausnahme: CTX-M-1 und CTX-M-15). Herkunft der Isolate: Ambulant und stationär behandelte Humanpatienten, Hunde, Katzen, Pferde, Rinder, Schweine und andere Tierarten. Nicht enthalten sind Isolate ohne nachweisbares Resistenzgen (n = 31). Andere Bakterienarten umfasst



## Tierisolate

In dieser Gruppe trugen 5,3 % (n = 11) der Isolate keines der gesuchten Resistenzgene. Der Prozentsatz der Isolate mit nur einem Resistenzgen betrug 19,3 % (n = 40). Isolate mit 2 oder mehr Resistenzgenen waren auch hier am häufigsten vertreten (75,4 %, n = 156). Hier entfielen 33,8 % (n = 70) auf Isolate mit 2 Resistenzgenen, 19,8 % (n = 41) auf Isolate mit 3 Resistenzgenen, 12,1 % (n = 25) auf Isolate mit 4 Resistenzgenen, 6,8% (n = 14) auf Isolate mit 5 Resistenzgenen und 6 Isolate trugen sogar eine Kombination von 6 Resistenzgenen (2,9 %) (Abbildung 16 und Tabelle 24). Weiterhin ist eine Unterscheidung zwischen den einzelnen Tiergruppen der Heimtiere (Hunde, Katzen), Pferde, Nutztiere (Rinder, Schweine) und anderer Tierarten nötig.

Die größte Vielfalt an Resistenzgenkombinationen war bei den *Enterobacteriaceae*-Isolaten von Heimtieren vorhanden, da hier insgesamt 19 verschiedene Muster nachweisbar waren. Das Muster 4 (TEM-1/OXA-1/CTX-M/PMQR) trat hier mit 12,8 % der Isolate (n = 10) am häufigsten auf. Die Muster 1 (TEM-1/CTX-M), 7 (TEM-1/CTX-M/OXA-1/OXA-48/PMQR) und 8 (CTX-M/OXA-1/PMQR) wurden jeweils bei 9 % der Hunde- und Katzenisolate gefunden. Bei 6,4 % (n = 5) wurde kein Resistenzgen und in 14,4 % (n = 10) nur ein einziges Resistenzgen identifiziert. Die Resistenzgenkombinationen mit der Carbapenemase OXA-48 (n = 24; Muster 6, 7 und 9) wurde mit einer Ausnahme (ein *K. pneumoniae*-Isolat vom Meerschweinchen) nur bei Isolaten von Hunden und Katzen gefunden. Außerdem war der OXA-48-Nachweis auf *K. pneumoniae*- und *Enterobacter cloacae*-Isolate begrenzt.

Bei den Pferdeisolaten wurden die Muster 1 (TEM-1/CTX-M) mit 36 % (36) und Muster 3 (TEM-1/CTX-M/OXA-1) mit 12 % (n = 12) häufig detektiert. Beide Muster konnten fast ausschließlich bei *E. coli*-Isolaten gefunden werden. Auch in dieser Gruppe kodierte knapp ein Viertel der Isolate (24 %, n = 24) nur ein einziges der gesuchten Resistenzgene.

Bei den Nutztierisolaten wurde das Muster 1 (TEM-1/CTX-M) mit 38,9 % (n = 7) am häufigsten gefunden. Ähnlich wie bei Pferden trugen auch hier 27,8 % (n = 5) der Isolate nur ein einziges der gesuchten Resistenzgene. Bei den Isolaten von der anderen Tierarten wurden überwiegend (36,4 %, n = 4) seltene Kombinationen identifiziert.

Seltene Kombinationen in der Gruppe der Tierisolate waren TEM-1/PMQR (n = 1), TEM-1/OXA-1 (n = 1), OXA-1/PMQR (n = 2), SHV-2/OXA-48 (n = 2), TEM-1/CTX-M/OXA-48 (n = 2), TEM-1/CTX-M/OXA-1/OXA-48 (n = 1), TEM-1/SHV-1/CTX-M/OXA-1 (n = 2), TEM-1/SHV-2/OXA-48/PMQR (n = 1), TEM-1/SHV-28/CTX-M/OXA-1/OXA-48 (n = 2), TEM-1/SHV-28/CTX-M/OXA-1 (n = 1),.

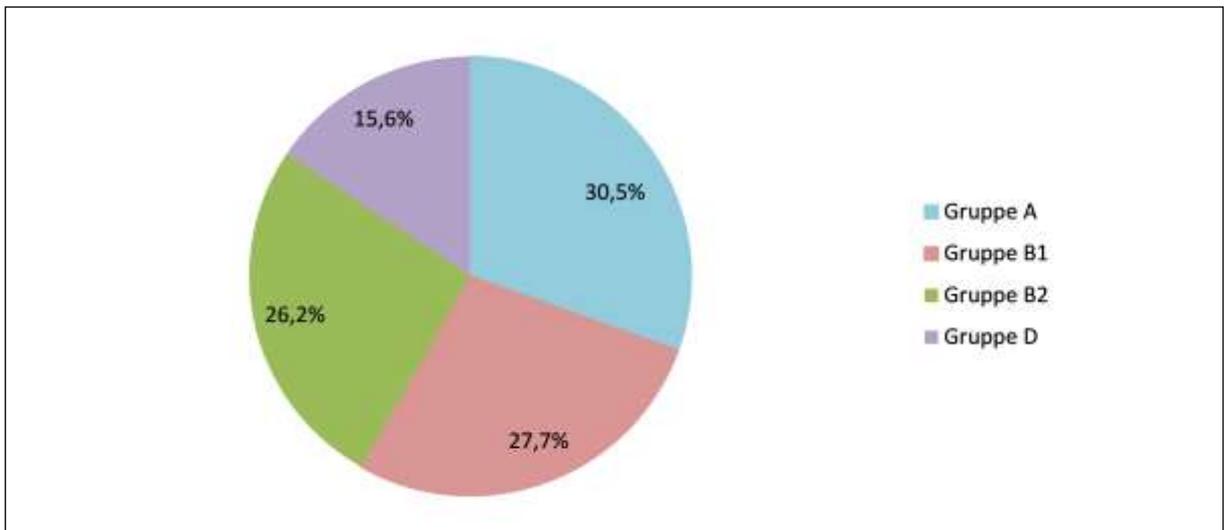
## Vergleich der Humanisolate mit den Tierisolaten

In 7,9 % aller untersuchten Isolate konnte keines der gesuchten Resistenzgene und bei ca. einem Fünftel (22,1 %) der Isolate nur ein einziges dieser Resistenzgen identifiziert werden. Bei 70 % aller in dieser Arbeit untersuchten Isolate traten diese Resistenzgene dagegen in Kombination auf. Die häufigste Kombination war Muster 1 (TEM-1 und eine  $\beta$ -Laktamase des CTX-M-Typs) und betraf 26,2 % aller Isolate. Andere vielfach detektierte Varianten waren das Muster 3 (TEM-1/CTX-M/OXA-1) mit 5,9 %, das Muster 4 (TEM/CTX-M/OXA-1/PMQR) mit 7,7 %, das Muster 8 (CTX-M/OXA-1/PMQR) 7,9 % und das Muster 11 (CTX-M/PMQR) 5,6 %. Beim Vergleich der Human- und Tierisolate fällt zunächst die große Anzahl an Kombinationen bei den Hunde- und Katzenisolaten auf. Dort sind alle 14 häufig gefundenen Muster sowie 8 seltene Muster vertreten, bei den Humanisolaten nur 11 häufige und 7 seltene Muster. Eine Erklärung könnte das relativ häufige Auftreten von *K. pneumoniae* unter den Heimtier-Isolaten liefern. Zwar wurde bei Isolaten von stationär aufgenommenen Patienten ebenfalls öfter *K. pneumoniae* nachgewiesen, allerdings trugen diese Humanisolate meist kein Resistenzgen, nur ein Resistenzgen oder das häufige Muster 1 (TEM-1 und CTX-M- $\beta$ -Laktamase). Die *K. pneumoniae*-Tierisolate kodierten eher für seltene Kombinationen und Kombinationen mit dem Gen für die Carbapenemase OXA-48. Die kleinste Anzahl an Varianten wiesen die Nutztierisolate mit nur 6 verschiedenen Kombinationsmustern auf. Allerdings war diese Gruppe mit nur 18 Isolaten recht klein. In allen Gruppen (Ausnahme: Heimtiere) war das häufigste Muster die Kombination von TEM-1 mit einer CTX-M- $\beta$ -Laktamase (Humanisolate: 28,4 %, Pferdeisolate: 36 % und Nutztierisolate: 38,9 %). Isolate, die nur für ein einzelnes, gesuchtes Resistenzgen kodierten, traten in allen Gruppen (Ausnahme: Andere Tierarten) ebenfalls häufig auf (Humanisolate: 25,1 %, Heimtierisolate: 14,1 %, Pferdeisolate: 24 % und Nutztierisolate: 27,8 %). Die Gruppe der anderen Tierarten zeichnete sich vor allem durch die hohe Präsenz an ungewöhnlichen Kombinationen aus (36,4 %). Kombinationen von mehr als 2 Genen konnten häufiger bei humanen *E. coli*-Isolaten und insbesondere bei den *K. pneumoniae*-Isolaten von Tieren beobachtet werden (Abbildung 16). Die Carbapenemase OXA-48 wurde meistens in Verbindung mit mehreren anderen Resistenzgenen wie TEM-1, CTX-M und PMQR gefunden. Darüber hinaus wurde sie ausschließlich in den *K. pneumoniae*- und *Enterobacter cloacae*-Isolaten von Tieren, nicht aber in den Bakterienisolaten von Menschen nachgewiesen. Außerdem ist festzuhalten, dass beinahe alle bei Humanisolaten gefundenen Resistenzgenkombinationen auch bei den Isolaten von Tieren vorkamen (Ausnahme sind die

6 seltenen Kombinationen: SHV-11/CTX-M-15/OXA-1/PMQR, SHV 1/CTX-M-15, TEM-1/SHV-1/OXA-1/PMQR, TEM-1/SHV-11/CTX-M-1, TEM 52/CTX M 15 und TEM-52/OXA 1. Umgekehrt gab es aber auch 3 Muster (Muster 6, 7 und 9) sowie 10 seltene Kombinationen (TEM-1/OXA-1, OXA-1/PMQR, SHV-2/OXA-48, TEM-1/CTX-M/OXA-48, TEM-1/CTX-M/OXA-1/OXA-48, TEM-1/SHV-1/CTX-M/OXA-1, TEM-1/SHV-2/OXA-48/PMQR, TEM-1/SHV-28/CTX-M/OXA-1, TEM-1/SHV-28/CTX-M/OXA-1/PMQR und TEM-1/SHV-28/CTX-M/OXA-1/OXA-48 ), die nur bei den Isolaten von Tieren zu beobachten zu waren.

#### 4.1.9 Phylogenetische Gruppen unter den *Escherichia coli*-Isolaten

Der Anteil von *E. coli* betrug unter den Humanisolaten 77 %, unter den Tierisolaten 71 % und unter allen ESBL-verdächtigen Bakterienisolaten (n = 390) in dieser *Ph.D.*-Thesis 73,8 %. Alle in dieser Arbeit identifizierten *E. coli*-Isolate vom Menschen (n = 141) und von Tieren (n = 147) wurden mit der PCR-basierten Methode von Clermont *et al.* einer der 4 bekannten phylogenetischen Gruppen A, B1, B2, und D zugeteilt (Clermont *et al.*, 2000).



**Abbildung 17** Verteilung der humanen *E. coli*-Isolate (n = 141) entsprechend der phylogenetischen Gruppen A, B1, B2 und D nach Clermont *et al.* (Clermont *et al.*, 2000)

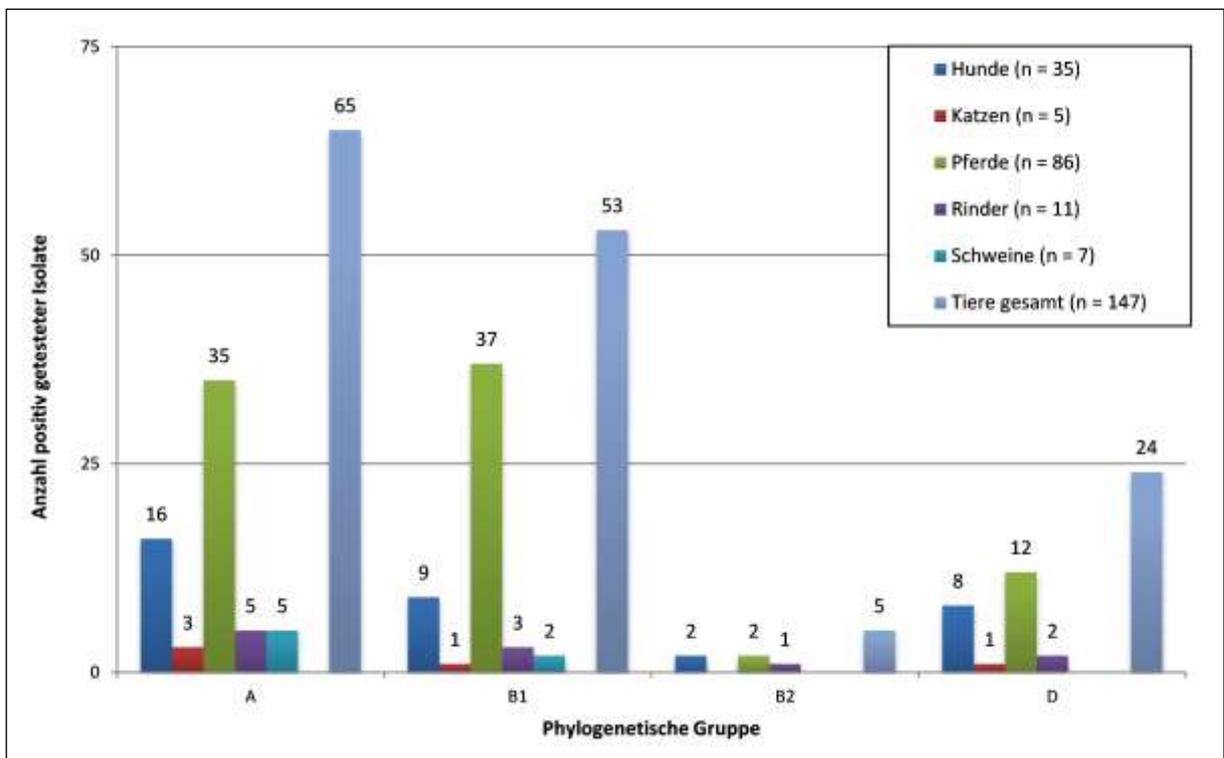
#### Humanisolate

Von den 141 untersuchten *E. coli*-Humanisolaten gehörten 30,5 % der phylogenetischen Gruppe A an. Den Gruppen B1 und B2 wurden 27,7 % bzw. 26,2 % der Isolate zugeteilt. Der

Gruppe D gehörten 15,6 % der Isolate an (Abbildung 17). Zwischen den Isolaten von ambulant und stationär behandelten Patienten bestehen hinsichtlich der Häufigkeitsverteilung der 4 Gruppen nur zwischen 1,2 und 2,7 Prozentpunkten Unterschied (Abbildung 17 und Tabelle 25).

### Tierisolate

Insgesamt wurden 147 *E. coli*-Isolate von verschiedenen Tierarten (Abbildung 18 und Tabelle 25) untersucht. Davon konnten 44,2 % der Gruppe A und 36,1 % der Gruppe B1 zugeordnet werden. Auf die Gruppe D entfielen 16,3 % der Tierisolate. Auffällig war die mit 3,4 % sehr geringe Quote der phylogenetischen Gruppe B2, die nur bei 5 Isolaten detektiert wurde (2 Pferdeisolate, 2 Hundeisolate, 1 Rinderisolat).



**Abbildung 18** Verteilung der *E. coli*-Isolate (n = 147) von Tieren entsprechend der phylogenetischen Gruppen A, B1, B2 und D nach Clermont *et al.* (Clermont *et al.*, 2000). Die Gruppe der sonstigen Tierarten (n = 3; Meerschweinchen, Löwe, Huhn) wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt.

### Vergleich der Humanisolate mit den Tierisolaten

Während *E. coli*-Isolate der Gruppen B1 und D in beiden Isolategruppen ähnlich häufig waren (nur 8,4 bzw. 0,7 Prozentpunkte Unterschied), traf das auf *E. coli*-Isolate der Gruppen A und B2 nicht zu, da hier Unterschiede von 13,7 (A) und 22,8 (B2) Prozentpunkten bestanden.

**Tabelle 25** Verteilung der untersuchten *E. coli*-Isolate von Menschen (n = 141) und Tieren (n = 147) auf die phylogenetischen Gruppen A, B1, B2 und D nach Clermont *et al.* (Clermont *et al.*, 2000).

Isolatherkunft	Anzahl untersuchte Isolate	Anteil der positiven Isolate [%] (Isolatanzahl)			
		A	B1	B2	D
<b>Menschen</b>					
Ambulante Patienten	48	31,3 (15)	29,2 (14)	25 (12)	14,6 (7)
Stationäre Patienten	93	30,1 (28)	26,9 (25)	26,9 (25)	16,1 (15)
Gesamt	141	30,5 (43)	27,7 (39)	26,2 (37)	15,6 (22)
<b>Tiere</b>					
Hunde	35	45,7 (16)	25,7 (9)	5,7 (2)	22,9 (8)
Katzen	5	60 (3)	20 (1)		20 (1)
Pferde	86	40,7 (35)	43 (37)	2,3 (2)	14 (12)
Rinder	11	45,5 (5)	27,3 (3)	9 (1)	18,2 (2)
Schweine	7	71,4 (5)	28,6 (2)		
Andere Tierarten <sup>a</sup>	3	33,3 (1)	33,3 (1)		33,3 (1)
Gesamt	147	44,2 (65)	36,1 (53)	3,4 (5)	16,3 (24)
<b>Gesamtanzahl</b>	<b>288</b>	<b>37,5 (108)</b>	<b>31,9 (92)</b>	<b>14,6 (42)</b>	<b>16 (46)</b>

<sup>a</sup> Andere Tierarten: Meerschweinchen (n = 1), Löwe (n = 1), Huhn (n = 1)

## 4.2 Nähere Charakterisierung von ausgewählten CTX-M-1- und CTX-M-15-bildenden *E. coli*-Isolaten

Eine Stichprobe von 20 ESBL-produzierenden *E. coli*-Isolaten (10 Humanisolate und 10 Tierisolate) wurde eingehender charakterisiert. Dabei wurden ihre genetischen Verwandtschaftsbeziehungen, Plasmide und deren Eigenschaften, Resistenzgene und Virulenzeigenschaften genauer untersucht. Primäres Auswahlkriterium der Isolate war die Präsenz eines Gens, das entweder für eine CTX-M-1- oder eine CTX-M 15-ESBL kodierte. Unter beiden Gruppen (Human- und Tierisolate) wurden deshalb jeweils 5 *bla*<sub>CTX-M-1</sub>- und 5 *bla*<sub>CTX-M-15</sub>-positive Isolate ausgewählt. Bei den Tierisolaten wurden außerdem nur Isolate von Heimtieren, also Hunden und Katzen, eingeschlossen. Die Humanisolate stammten zur Hälfte von ambulant und zur Hälfte von stationär behandelten Patienten aus dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg (UKGM). Eine Übersicht über die ausgewählten Isolate gibt die Tabelle 26.

**Tabelle 26** Herkunft, Probenmaterial, kodierter ESBL-Typ, phylogenetische Gruppe, Sequenztyp (ST) und Sequenztyp-Cluster (SCM) der 20 weitergehend charakterisierten *E. coli*-Isolate von Menschen und Heimtieren (Hunde und Katzen)

Isolat	Herkunft	Probematerial	Erkrankung	Kodierter ESBL-Subtyp	Phylogen. Gruppe	ST	STC
H1	Ambulant (H)	Urin	unbekannt	CTX-M-1	B1	453	86
H44	Ambulant (H)	Urin	unbekannt	CTX-M-1	B1	10	10
H75	Stationär (H)	Urin	unbekannt	CTX-M-15	B2	131	
H92	Stationär(H)	Penisabstrich	unbekannt	CTX-M-15	A	10	10
H93	Ambulant (H)	Urin	unbekannt	CTX-M-15	B1	156	156
H115	Stationär (H)	Urin	unbekannt	CTX-M-1	A	744	
H131	Stationär (H)	Urin	unbekannt	CTX-M-1	B2	131	
H132	Ambulant (H)	unbekannt	unbekannt	CTX-M-15	B2	131	
H139	Stationär(H)	Urin	unbekannt	CTX-M-1	A	88	23
H152	Ambulant (H)	Rachenabstrich	unbekannt	CTX-M-15	B1	224	
V63	Hund	Uterusinhalt	Pyometra	CTX-M-1	B1	162	469
V70	Hund	Urinkatheter	unbekannt	CTX-M-15	A	361	
V74	Hund	Sperma	unbekannt	CTX-M-15	B1	617	10
V76	Hund	Rachenabstrich	Pneumonie	CTX-M-1	B1	1056	
V105	Hund	Urin	unbekannt	CTX-M-1	A	10	10
V143	Katze	Kot	unbekannt	CTX-M-1	A	88	23
V161	Hund	unbekannt	Enteritis	CTX-M-15	A	410	23
V210	Katze	unbekannt	unbekannt	CTX-M-15	A	410	23
V260	Hund	Urin	Cystitis	CTX-M-15	B2	131	
V288	Hund	BAL	Pneumonie	CTX-M-1	D	354	354

H: Humanisolat, BAL: Brochoalveoläre Lavage; ST: Sequenztyp; STC: Sequenztyp-Cluster

#### 4.2.1 Sequenztypen

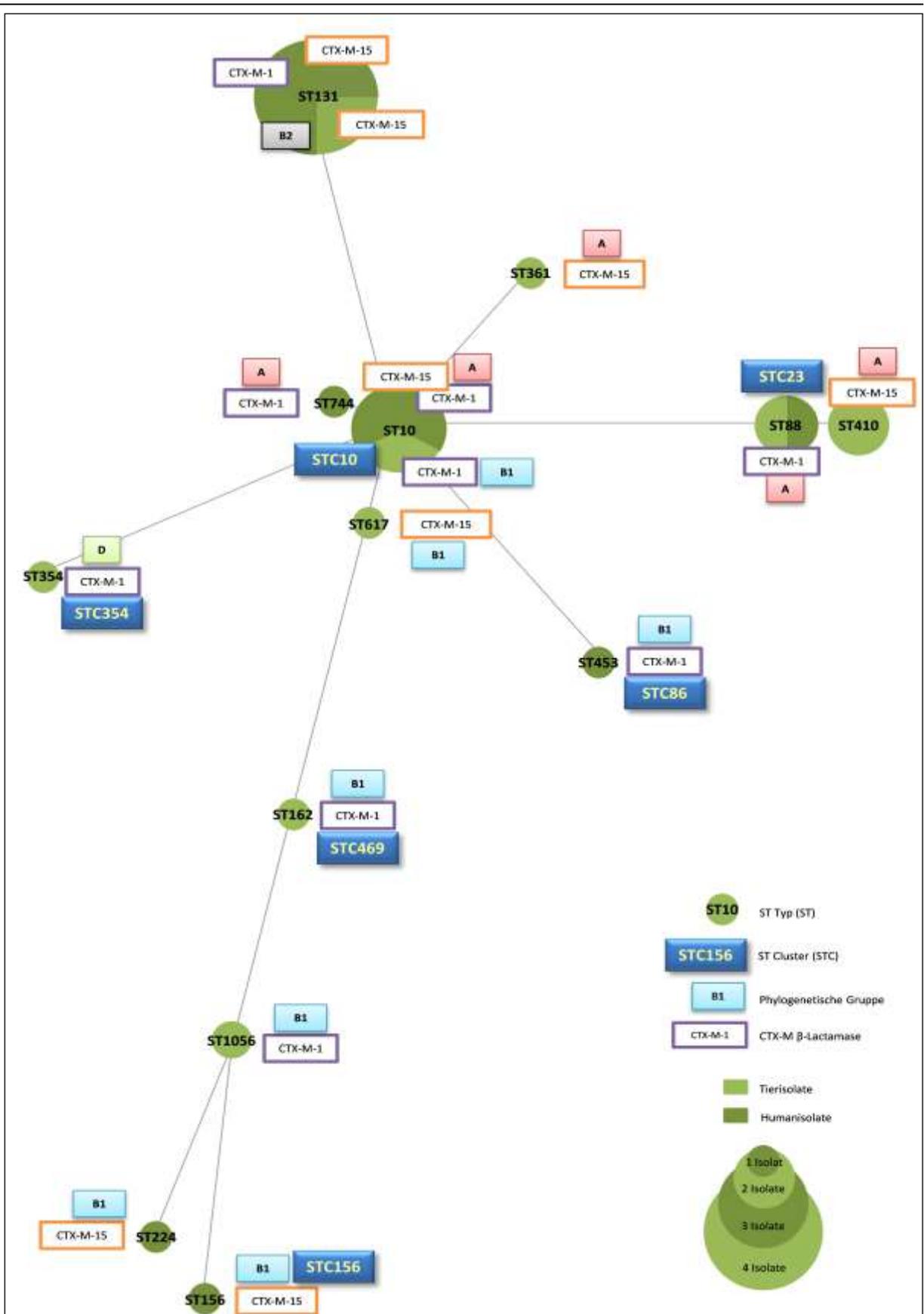
Die Zuordnung der einzelnen *E. coli*-Isolate zu Sequenztypen (ST) und ST-Clustern (STC) erfolgte durch *Multi-Locus Sequence Typing* (MLST). Die allelbasierte Verwandtschaft zwischen den ermittelten Sequenztypen wurden in Abbildung 20 in Form eines *Minimum Spanning Tree* (MST) grafisch dargestellt. Dieser Darstellung liegt die Interpretation der MLST-Daten zugrunde, dass zwei Isolate umso enger miteinander verwandt sind, an je mehr Genloci der 7 untersuchten *Housekeeping*-Gene sie dasselbe Allel besaßen. Kodierten sie an allen 7 Genloci für jeweils dasselbe Allel, dann gehörten sie dem gleichen ST an. Je weiter 2 Isolate in dieser Grafik voneinander entfernt sind, umso geringer ist ihr Verwandtschaftsgrad. STC sind Gruppen von STs die höchstwahrscheinlich einmal aus einem einzigen Isolat bzw. Klon hervorgegangen sind. Daher sind ein großer Teil ihrer 7 *Housekeeping*-Gene identisch. Sie wurden in Abbildung 19 nach dem ST benannt aus dem sie wahrscheinlich hervorgegangen sind z. B. STC10.

#### *E. coli*-Isolate von Menschen

Unter den *E. coli*-Isolaten vom Menschen wurden insgesamt 7 STs gefunden. Vier STs gehörten den vier bekannten ST-Clustern STC10, STC23, STC86 und STC156 an. Bei den Isolaten der ambulant versorgten Patienten kamen ST10, ST156, ST131, ST224 und ST453 vor und bei den stationären Patienten ebenfalls ST10 und ST131 (2 Isolate) sowie außerdem ST88 und ST744 (Tabelle 26, Abbildung 19).

#### *E. coli*-Isolate von Tieren

Die 8 untersuchten Hundeisolate gehörten alle verschiedenen STs an: ST10, ST131, ST162, ST354, ST361, ST410, ST617 und ST1056. Fünf STs bei diesen Isolaten sind Mitglieder der vier STCs STC10, STC23, STC354 und STC469. Die beiden Katzenisolate wurden als ST88 und ST410 klassifiziert welche eng miteinander verwandt sind und zum STC23 gezählt werden (Tabelle 26, Abbildung 19).



**Abbildung 19** Minimum Spanning Tree basierend auf dem MLST der untersuchten *E. coli*-Isolate von Menschen und Tieren ( $n = je\ 10$ ). Zu jedem Isolat wurden die phylogenetische Gruppe, die kodierte CTX-M-β-Laktamase und, wenn vorhanden, das entsprechende ST-Cluster eingetragen. So gehört z. B. das Isolat mit dem ST156 dem Cluster STC156 und der phylogenetischen Gruppe B1 an und kodiert für ein CTX-M-15-ESBL. Gehören mehrere Isolate dem gleichen ST an, dann ist dies durch einen größeren Kreis gekennzeichnet. Je näher 2 Isolate auf dieser Abbildung zusammenliegen, desto enger sind sie genetisch miteinander verwandt.

## Vergleich der *E. coli*-Isolate von Menschen und Tieren

Die 20 ausgewählten CTX-M-1- und CTX-M-15-kodierenden *E. coli*-Isolate waren phylogenetisch heterogen und verteilten sich auf insgesamt 13 STs. Nur 4 STs umfassten mehr als ein Isolat, nämlich ST131 (4 Isolate), ST10 (3), ST88 (2) und ST410 (2). Mit Ausnahme von ST410 traten diese STs sowohl bei Human- als auch bei Tierisolaten auf. ST410 wurde nur bei 2 Tierisolaten detektiert. Außerdem können insgesamt 8 Isolate dem gleichen STC (STC10: Isolate H44, H92, V74, V105; STC23: Isolate H139, V143, V161, V210) zugeordnet werden, was für eine nähere Verwandtschaft zwischen den Isolaten des betreffenden Clusters spricht, obwohl sie bei verschiedenen Wirtsspezies gefunden worden waren.

Bis auf die 3 ST10-Isolate gehörten die Isolate, die denselben ST besaßen, auch derselben phylogenetischen Gruppe an (ST131: Gruppe B2; ST410: Gruppe A). Das Gleiche traf zu, wenn die Isolate Mitglieder desselben STC waren (STC23: Gruppe A). Von den 3 ST10-Isolaten gehörten jedoch 2 der Gruppe A und eines der Gruppe B1 an.

### 4.2.2 Plasmidprofil

Die Anzahl und jeweilige Größe der Plasmide bei den 20 ausgewählten Human- und Tierisolaten wurden mittels PFGE-Analyse bestimmt, nachdem die Plasmid-DNA zuvor durch den Restriktionsverdau mit S<sub>1</sub>-Nuklease linearisiert worden war (Abbildung 21). Die Größe der linearisierten Plasmide wurde durch den Vergleich ihrer elektrophoretischen Mobilität mit derjenigen von DNA-Molekülen bekannter Größe (DNA-Marker) ermittelt und in Kilobasenpaaren (Kbp) angegeben (Tabelle 27). Die Typisierung und Zuordnung zu den entsprechenden Inc-Gruppen erfolgte mittels *Inc typing* der *E. coli*-Plasmide (*Syn. Plasmid-based Replicon Typing*).

### *E. coli*-Isolate von Menschen

Bei 8 von 10 Isolaten dieser Gruppe konnten 2 Plasmide identifiziert werden. Isolat H93 schien kein Plasmid zu besitzen und bei Isolat H1 wurden 4 Plasmide gefunden. Die Plasmidgrößen variierten von 30 Kbp (kleinstes Plasmid) bis 200 Kbp (größtes Plasmid) (Tabelle 27, Abbildung 20). IncFII wurde bei der Hälfte (50 %) der Isolate identifiziert. Mit 40 % positiver Isolate konnten IncFIB und IncI1 am zweithäufigsten nachgewiesen werden,

gefolgt von IncFIA und IncN mit je 30 % Nachweisquote. IncFIC wurden nur einmal bei Isolat H1 detektiert. Kombinationen der verschiedenen Inc-Gruppen wurden bei 70 % der Isolate beobachtet. Sowohl bei den Inc-Gruppen als auch bezüglich der Plasmidgrößen und -anzahlen, besaßen alle Isolate ein individuelles Muster. Somit repräsentierten die Humanisolate 10 verschiedene Inc-Typ-Kombinationen und 10 verschiedene Plasmidprofile

**Tabelle 27** Anzahl, Größe und Inc-Gruppen der bei den 20 ausgewählten *E. coli*-Isolaten gefundenen Plasmide

Isolat	Herkunft	Kodierter CTX-M- Subtyp	ST	Identifizierte Inc-Gruppe						Plasmide (Anzahl; Größe in Kbp) <sup>b</sup>
				FIA	FIB	FIC <sup>a</sup>	FII <sup>a</sup>	I1	N	
H1	Ambulant (H)	1	463		+	+	+	+		200, 130, 100, 95
H44	Ambulant (H)	1	10					+		100, 90
H75	Stationär (H)	15	131	+			+			130, 50
H92	Stationär (H)	15	10				+			200, 60
H93	Ambulant (H)	15	156							Keine Plasmide
H115	Stationär (H)	1	744		+				+	120, 30
H131	Stationär (H)	1	131	+					+	90, 36
H132	Ambulant (H)	15	131		+		+	+		130, 90
H139	Stationär (H)	1	88					+	+	100, 36
H152	Ambulant (H)	15	224	+	+		+			140, 90
V63	Hund	1	162		+	+	+			145, 96
V70	Hund	15	361	+	+		+			160, 95, 47
V74	Hund	15	617	+	+		+			160
V76	Hund	1	1056		+	+	+	+		145, 110, 97, 30
V105	Hund	1	10		+	+	+	+		100, 80
V143	Katze	1	88		+	+	+			100, 80
V161	Hund	15	410	+	+		+			160, 60
V210	Katze	15	410	+	+		+			130, 110, 30
V260	Hund	15	131	+			+			200, 160
V288	Hund	1	354	+	+		+			110, 50

(H), Humanisolat, Kbp = Kilobasenpaare

<sup>a</sup> Die Inc-Gruppen IncFII und IncFIC wurden mit Hilfe der Software Plasmidfinder identifiziert

<sup>b</sup> Quantifizierung und Größenbestimmung mittels PFGE-Analyse nach vorheriger S<sub>1</sub>-Nuklease-Restriktion

### ***E. coli*-Isolate von Tieren**

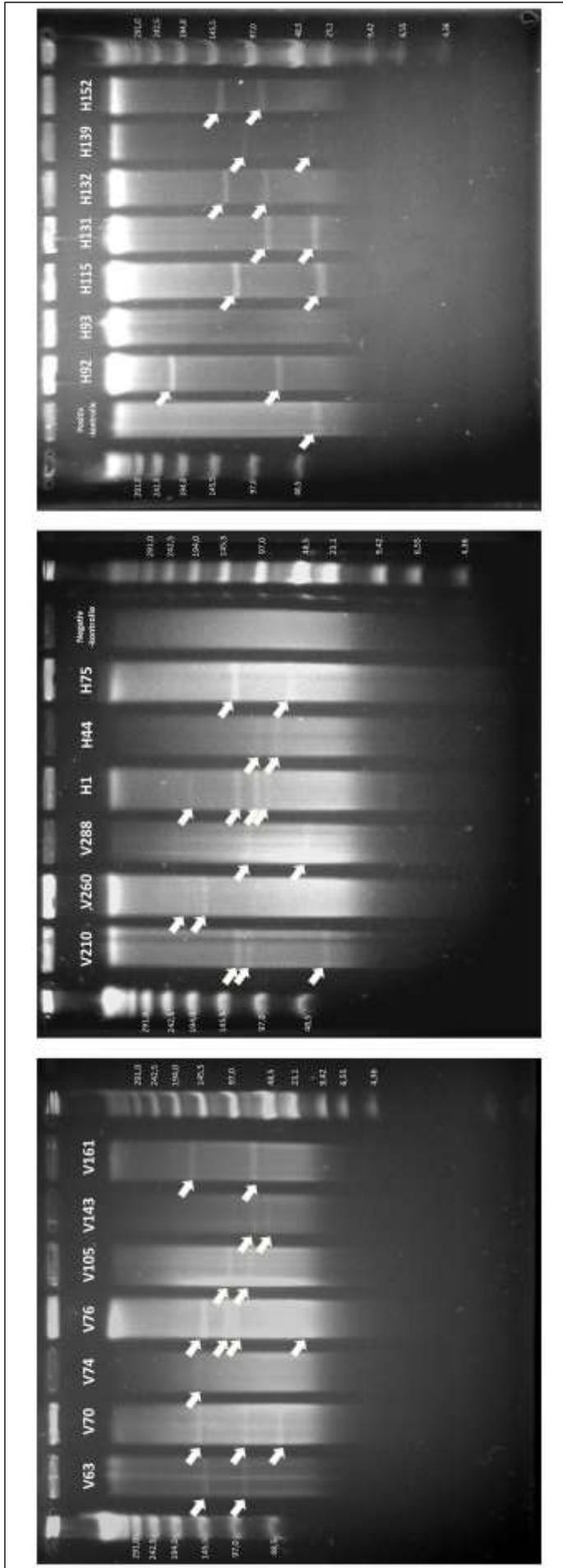
In dieser Gruppe wurden 1 bis 4 Plasmide je Isolat nachgewiesen. Jeweils 40 % der Isolate besaßen 2 bzw. 3 Plasmide. Auch bei dieser Gruppe konnten Plasmide mit Größen zwischen 30 Kbp und 200 Kbp nachgewiesen werden. Bei keinem der untersuchten Tierisolate konnte IncN identifiziert werden, während im Gegensatz dazu IncFII bei allen Isolaten vorkam. Die Typen IncFIB und IncFIA waren mit Nachweisquoten von 90 % und 60 % ebenfalls häufig. Insgesamt konnten 5 verschiedene Inc-Typen-Kombinationen und 9 verschiedene

Plasmidprofile beobachtet werden. Die Kombination aus IncFIA-, IncFIB- und IncFII-Plasmiden wurde in 5 (50 %) der Isolate identifiziert, von denen 4 für CTX-M-15 und eines für CTX-M-1 kodierte. Die Kombination aus IncFIB-, IncFIC-, IncFII- und IncI1-Plasmiden wurde bei 2 Tierisolaten gefunden, ebenso die Kombination IncFIB/IncFIC/IncFII. Diese 4 letztgenannten Tierisolate kodierten alle für die CTX-M-1- $\beta$ -Laktamase. Die beiden Isolate mit identischem Plasmidprofil (V105, V143) kodierten zwar übereinstimmend für die CTX-M-1- $\beta$ -Laktamase waren hinsichtlich der Inc-Typen aber geringgradig verschieden. Sie gehörten auch verschiedenen Sequenztypen an (ST10, ST88).(Tabelle 27, Abbildung 20). Somit stimmten unter den Tierisolaten ebenfalls keine zwei Isolate in allen erhobenen Plasmidmerkmalen überein.

### **Vergleich der *E. coli*-Isolate von Menschen und Tieren**

Bis auf die Ausnahmen H93 (Humanisolat) und V74 (Tierisolat) trugen die untersuchten Isolate mindestens 2 Plasmide. Die Variabilität der Plasmidgrößen war in beiden Gruppen relativ ähnlich (11 verschiedene Größen bei den Humanisolaten vs. 14 verschiedene Größen bei den Tierisolaten). Im Gegensatz zu Isolaten von den Humanpatienten konnten bei den Hunde- und Katzenisolaten keine IncN-Plasmide nachgewiesen werden. IncI1-Plasmide wurden doppelt so häufig bei den Human- wie bei den Tierisolaten gefunden. Dagegen kamen IncFIA-, IncFIB, IncFI- und IncFI-Plasmide jeweils ca. zwei- bis viermal so häufig bei den Tierisolaten vor. Bei den Humanisolaten trug jedes einzelne Isolat eine andere Kombination an Inc-Typen. Dagegen waren mehrere Tierisolate in diesem Merkmal identisch. Die Kombination von IncFIA/IncFIB/IncFII, welche 5 Tierisolate kennzeichnete, war außerdem auch bei dem Humanisolat H152 vorhanden. Die Kombination IncFIB, IncFIC, IncFII und IncI1 wurde bei 2 Tierisolaten und dem Humanisolat H1 gefunden. Weitere Übereinstimmungen gab es zwischen den Isolaten beider Gruppen nicht. Denn gerade hinsichtlich der Plasmidprofile (Anzahl an Plasmiden je Isolat und deren Größe) war die Heterogenität unter den 20 geprüften Isolaten so groß, dass in diesem Merkmal insgesamt nur 2 Tierisolate übereinstimmten, wobei diese, wie oben beschrieben, im IncI1 und im ST voneinander differierten.

Bei 2 Humanisolaten (H44, H92) wurden mittels PFGE-Analyse zwar jeweils 2 Plasmide entdeckt, aber nur ein Inc-Typ nachgewiesen. Umgekehrt reagierten 2 Humanisolate (H131, H152) und 6 Tierisolate (V63, V74, V105, V143, V161, V288) für mehr Inc-Typen positiv als Plasmide gefunden werden konnten.



**Abbildung 20** PFGE-Analyse der Plasmidprofile bei 20 ausgewählten, CTX-M15-kodierenden *E. coli*-Isolaten von Menschen und Tieren. Die plasmide wurde vor der Auftrennung durch S1-Nuklease-Restriktionsverdau linearisiert. Die auf allen Gelen gelegenen Spuren zeigen jeweils einen *Lambda Ladder PFG Marker* (links) und einen *Low Range Marker PFGE* (rechts) zur Bestimmung der Molekülgröße in Kilobasenpaaren. Die Isolate V63 bis V288 sind Tierisolate und die Isolate H1 bis H152 humanen Ursprungs. Die Negativkontrolle (*E. coli* K12 MG 1655) trägt kein Plasmid und die Positivkontrolle ist ein interner Laborstamm bei dem bereits ein Plasmid der Größe 30 Kbp nachgewiesen wurde. Weiße Pfeile markieren die identifizierten Plasmid-DNA-Banden.

### 4.2.3 Resistenzgene

Die Suche nach bekannten Resistenzgenen wurde in den 20 ermittelten Genomsequenzen mit Hilfe des EDV-Programmes *ResFinder* und dessen Datenbank durchgeführt. Der Nachweis der Desinfektionsmittel-Resistenzgene *qacE delta* erfolgte mit dem blastn-Algorithmus. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in der Tabelle 28 zusammengefasst.

#### ***E. coli*-Isolate von Menschen**

Bei den Humanisolaten wurden Resistenzgene gegen 8 verschiedene Antibiotikaklassen sowie Desinfektionsmittel gefunden. Die meisten Resistenzgene (14) wurden bei dem Isolat H92 festgestellt und die niedrigste Anzahl an Genen (5) bei dem Isolat H93. Die durchschnittliche Genanzahl betrug 9,0 Resistenzgene. Bei 9 von 10 Isolaten waren mindestens 2  $\beta$ -Laktamasegene vorhanden. Von den 5 CTX-M-1-Isolaten kodierten 4 Isolate auch für TEM-1. Die zweite häufig gefundene Kombination war die von *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>, *aac(6')Ib-cr* und dem am 3'-Ende teilweise deletierten *catB3*-Gen, welche bei 4 von 5 Isolaten auftrat. Die Genkombination *bla*<sub>TEM-1</sub>, *strA*, *strB*, *mph(A)*, *sul2* und *qacE delta* konnte bei 3 Isolaten nachgewiesen werden. Allerdings besaßen alle 10 Isolate ein individuelles Resistenzgenmuster und repräsentierten 10 verschiedene Kombinationen der untersuchten Resistenzgene.

#### ***E. coli*-Isolate von Tieren**

In dieser Gruppe wurden Resistenzgene gegen dieselben 8 verschiedenen Antibiotikaklassen wie bei den Humanisolaten sowie die Desinfektionsmittel-Resistenzgene *qacE delta* identifiziert. Bei Isolat V288 wurden die meisten Resistenzgene gefunden (15) und bei den Isolaten V76 und V105 mit jeweils 6 Genen die wenigsten. Durchschnittlich kodierten die Tierisolate für 10,6 Resistenzgene pro Isolat. Die Kombination aus *bla*<sub>OXA-1</sub>, *aac(6')Ib-cr* und dem teilweise deletierten *catB3* wurde auch in dieser Gruppe nachgewiesen und betraf hier sogar alle 5 CTX-M-15-kodierenden Isolate und keines der CTX-M-1-kodierenden Isolate. Bei 4 von 5 Tierisolaten war *bla*<sub>CTX-M-15</sub> zusätzlich mit *tet(A)* vergesellschaftet. Dafür besaßen alle 5 *bla*<sub>CTX-M-1</sub>-positiven Isolate die kompletten Gene *strA* und *strB*. Ein fast identisches Resistenzgenmuster zeigte sich bei den Isolaten V161 und V210, die in 29 von 30 Genen exakt übereinstimmten und im *bla*<sub>OXA-1</sub> teilweise (komplettes vs. inkomplettes *bla*<sub>OXA-1</sub>-Gen).

**Tabelle 28** Antibiotika- und Desinfektionsmittel-Resistenzgene in den ermittelten Genomsequenzen der 20 ESBL-kodierenden *E. coli*-Isolate

Isolat	Herkunft	β-Laktame				Aminoglykoside									Fluorchinolone		Makrolide		Phenicole			Sulfonamide			Tetracykline		Trimethoprim				Desinf.mittel					
		<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	<i>aac</i> (3)-IIa	<i>aac</i> (3)-IIb	<i>aac</i> (3)-IVa	<i>aph</i> (3)-Ic	<i>aph</i> (4)-Ia	<i>aadA1</i>	<i>aadA2</i>	<i>aadA5</i>	<i>strA</i>	<i>strB</i>	<i>aac</i> (6)/Ib-cr	<i>mph</i> (A)	<i>mef</i> (B)	<i>catA1</i>	<i>catB3</i>	<i>cmIA1</i>	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>sul3</i>	<i>tet</i> (A)	<i>tet</i> (B)	<i>dfrA1</i>	<i>dfrA12</i>	<i>dfrA14</i>	<i>dfrA17</i>	<i>qacE delta</i>					
V63	Hund	■			■														■						■											
V76	Hund																																			
V105	Hund																																			
V143	Katze																																			
V288	Hund																																			
H1	Ambulant (H)																																			
H44	Ambulant (H)																																			
H115	Stationär (H)																																			
H131	Stationär (H)																																			
H139	Stationär (H)																																			
V70	Hund																																			
V74	Hund																																			
V161	Hund																																			
V210	Katze																																			
V260	Hund																																			
H75	Stationär (H)																																			
H92	Stationär(H)																																			
H93	Ambulant (H)																																			
H132	Ambulant (H)																																			
H152	Ambulant (H)																																			

H: Humanisolat; Desinf.mittel: Desinfektionsmittel.  
 Legende: weiß: Gen nicht gefunden, schwarz: Gen gefunden, Homologie auf DNA-Ebene > 98 %, grau: Gen nur zum Teil gefunden, aber mit hoher Homologie auf DNA-Ebene

Ansonsten gab es zwischen den einzelnen Isolaten große Unterschiede hinsichtlich der kodierten Resistenzgene und Resistenzgenkombinationen. Somit repräsentierten die 10 Tierisolate 10 verschiedene Resistenzgenkombinationen

### Vergleich der *E. coli*-Isolate von Menschen und Tieren

Insgesamt wurden 29 Antibiotikaresistenzgene und auch die beiden Desinfektionsmittel-Resistenzgene *qacE delta* gefunden. Die Resistenzgene richteten sich gegen 8 verschiedene Wirkstoffklassen. Das genetische Auswahlkriterium der 20 *E. coli*-Isolate, nämlich die Präsenz von *bla*<sub>CTX-M-1</sub> und *bla*<sub>CTX-M-15</sub> konnte mit der genomweiten Sequenzanalyse in jedem Fall verifiziert werden. Jedes Isolat beherbergte wenigstens 5 der gesuchten Resistenzgene. Dabei wiesen aber alle Isolate eine jeweils eigene Resistenzgenkombination auf. Nur bei 2 Tierisolaten (V161 von einem Hund und V210 von einer Katze) zeigte sich ein fast identisches Resistenzgenmuster. Bei 9 von 10 CTX-M-15-kodierenden Isolaten war das Gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> mit *aac(6')Ib-cr*, *bla*<sub>OXA-1</sub> und demselben teilweise deletierten *catB3*-Gen (Deletion von 422 Basenpaaren am 3'-Ende) kombiniert. Bei 6 von 10 CTX-M-1-positiven Isolaten zeigte sich *bla*<sub>CTX-M-1</sub> mit TEM-1 vergesellschaftet.

Von den 25 Resistenzgenen, die bei mehr als nur einem Isolat gefunden wurden, treten 7 ausschließlich in einer der beiden Isolategruppen auf. Dabei handelt es sich um *aac(3)-IId*, *aph(3')-Ic*, *aadA2*, *mef(B)*, *cmlA1*, *sul3* und *dfrA12*. Die Gene *aadA2*, *mef(B)*, *cmlA1*, *sul3* und *dfrA12* wurden nur in der Gruppe der Humanisolate gefunden. *AadA2* und *dfrA12* wurden in der Kombination mit TEM-1 und *mph(A)* bei den Isolaten von zwei stationär behandelten Humanpatienten nachgewiesen. Die Gene *aac(3)-IId* und *aph(3')-Ic* wurden nur in der Gruppe der Tierisolate gefunden.

Die Gene *strA* und *strB* wurden eher bei den Tierisolaten identifiziert. Bei den Humanisolaten gab es keine überdurchschnittlich oft vertretenen Gene. Bei insgesamt 11 Isolaten wurden außerdem Gene der Desinfektionsmittel-Resistenz festgestellt (6 Humanisolate, 5 Tierisolate). Die Zahl der im Durchschnitt vorhandenen Resistenzgene lag bei den Tierisolaten mit 10,6 geringfügig höher als bei den Humanisolaten mit 9.

#### 4.2.5 Virulenzgene und Virulenz-assoziierte Gene

Die laut Kaper *et al.* (2004) etablierten und gut untersuchten Pathovaren der intestinal pathogenen *E. coli* (InPEC) sind ETEC, STEC, EPEC, EAEC, EIEC, DAEC. Trägt ein *E. coli*-Stamm eine der Pathovar-spezifischen Virulenzfaktorkombination (Kapitel 3.2.15, Tabelle 19), dann wird er als diesem Pathovar zugehörig angesehen. Ein extraintestinal pathogener *E. coli* (ExPEC) liegt nach den Definitionen von Johnson *et al.* und Köhler *et al.* dann vor, wenn ein *E. coli*-Stamm mindesten 2 der im Kapitel 3.2.15 (Tabelle 20) gelisteten Virulenzfaktoren bzw. Virulenz-assoziierten Faktoren bildet oder dafür kodiert. Diese Faktoren lassen sich in die Kategorien „Adhäsine, Toxine, Protektine“ und „Eisenstoffwechsel“ einteilen. Die Kategorie „Verschiedenes“ enthält bakterielle Produkte, die keiner der genannten Kategorien eindeutig zuzuordnen sind.

Die Suche nach den Genen der InPEC- und ExPEC-Virulenzfaktoren und Virulenz-assoziierten Faktoren wurde in den 20 ermittelten Genomsequenzen mit Hilfe des EDV-Programmes *VirulenceFinder* und dessen Datenbank sowie der *Virulence Factors of Pathogenic Bacteria*-Datenbank und dem blastn Algorithmus von NCBI durchgeführt. Alle Ergebnisse mit einer Identity von  $\geq 99\%$ , einer Query Coverage von  $\geq 95\%$  und einem E-Wert = 0 wurden als Treffer (= Gen/Operon vorhanden) gewertet. Ein Operon wurde nur als vorhanden bezeichnet, wenn alle dazu gehörigen Gene nach den eben genannten Kriterien nachweisbar waren. Zum Vergleich wurde die publizierte genomische DNA-Sequenz des avirulenten *E. coli*-Stammes K12 MG1655 (NCBI Accession number NC\_000913.3) herangezogen. Vereinzelt konnten für einen InPEC charakteristische Gene gefunden werden, allerdings fehlten bei diesen 8 Isolaten dann jeweils zusätzliche für das Pathovar typische Virulenzfaktoren. Daher ist eine eindeutige Zuordnung zu den entsprechenden Pathovaren schwierig. Gemäß der oben zitierten Definition konnten 12 der untersuchten Isolate als ExPEC klassifiziert werden. Die Ergebnisse sind in der Tabellen 29 zusammengefasst.

#### ***E. coli*-Isolate von Menschen**

In der Kategorie „Toxine“ wurden nur wenig Treffer erzielt (n = 9). Mehr Treffer gab es in den Kategorien „Protektine“ (n = 13), „Eisenstoffwechsel“ (n = 18) und „Adhäsine“ (n = 24). Die meisten Treffer wurden in der Kategorie „Verschiedenes“ gefunden (n = 44) (Tabelle 29). Alle untersuchten Isolate trugen das *fim*-Operon und 40 % der Isolate zusätzlich das Gen für *Long Polar Fimbriae* (*lpfA*). Bei den Isolaten mit dem Sequenztyp ST131 (H75, H131 und

H132) waren das Adhäsingen *iha* und die Operons für *afa-/dr*-Adhäsine nachweisbar. In der Kategorie „Toxine“ wurden, ebenfalls bei den ST131-Isolaten die Gene für die Autotransporter *pic* und *sat* identifiziert. Zudem wurde bei den Isolaten H93 und H131 das Gen *astA* für das Toxin EAST-1 detektiert. Das *iss*-Gen determiniert eine erhöhte Serumresistenz des betreffenden Bakteriums und konnte bei 50 % der Isolate nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde bei den Isolaten H75, H115 und H132 das Gen *traJ* gefunden, welches ebenfalls die Fähigkeit zur erhöhten Serumresistenz vermittelt. Bei allen ST131-Isolaten wurden außerdem die Gene *kpsDMT* zur Kapselbildung und die am Eisenstoffwechsel beteiligten Operone für Aerobactin, Yersiniabactin, Hemin Aufnahme und das Gen *sitA* nachgewiesen. Alle bzw. fast alle durchgemusterten Isolate waren Träger der Gene *ompA*, *ibeB* (Ausnahme: H44) und *ibeC*. Die Gene *malX* und *usp* wurden nur bei den ST131-Isolaten gefunden. Vier Isolate (H75, H93, H131, H132) konnten nicht eindeutig als ExPEC klassifiziert werden, da bei ihnen die DAEC-spezifischen Gene *aida-I* und *F1845* und das EAEC/EPEC-spezifische Gen *astA* gefunden wurden. Allerdings war bei allen Isolaten jeweils nur eines dieser Gene vorhanden und weitere Pathovar-spezifische Gene fehlten.

#### **E. coli-Isolate von Tieren**

Auch hier wurden in der Kategorie „Toxine“ (n = 5) wenige und in den Kategorien „Adhäsine“ (n = 17) und „Protektine“ (n = 14) mehr Treffer erzielt. Gene für den Eisenstoffwechsel (n = 29) und für verschiedene andere Faktoren (n = 37) wurden am häufigsten identifiziert (Tabelle 29). Das *fim*-Operon ist auch hier bei allen Isolaten vertreten. Das Adhäsinkodierende Gen *iha* wurde bei dem Isolat V260 und das *bmaE*-Gen bei dem Isolat V288 identifiziert. In der Kategorie „Toxine“ wurden die Autotransportergene *pic* und *sat* bei V260, das ETEC-spezifische Hitzestabiles Enterotoxin *estA* bei V70 und das EAEC/EPEC-spezifische Gen *astA* bei den Isolaten V143 und V288 nachgewiesen. Das *iss*-Gen wurde bei 80 % der Isolate und *ompT* und *traJ* bei 30 % der Isolate gefunden. Die Kombination der Operons für Aerobactin, Yersiniabactin und das Gen *sitA* konnte bei 5 Isolaten detektiert werden. In 3 Fällen wurde zusätzlich das Samochelin-Gen *iroN* nachgewiesen. Außerdem wurde das *sitA*-Gen bei 9 der 10 untersuchten Tierisolate gefunden, *ibeB* bei 6 Isolaten und *ibeC* bei 7 Isolaten. Bei dem Isolat V288 konnte zusätzlich das Gen *ibeA* nachgewiesen werden. Bei den Isolaten V260 und V288 wurden des Weiteren die Gene *malX* und *usp* detektiert. Das DAEC-spezifische Gen *aida-I* wurde bei Isolat V260 identifiziert. Somit wurden

4 Isolate (V70, V143, V260 und V288) nicht eindeutig als ExPEC klassifiziert, da bei ihnen die DAEC-spezifischen Gene *aida-I*, das EAEC/EPEC-spezifische Gen *astA* und das ETEC-spezifische Gen *esta* gefunden wurden. Allerdings war auch hier bei allen Isolaten jeweils nur eines dieser Gene vorhanden und weitere Pathovar-spezifische Gene fehlten.

### Vergleich der *E. coli*-Isolate von Menschen und Tieren

Die Präsenz von 60 verschiedenen Virulenz- bzw. Virulenz-assoziierte Genen und Operons wurde per *in-silico* Nukleotidsequenzanalyse getestet. In den 5 untersuchten Kategorien konnten letztendlich 31 verschiedene Gene bzw. Operons nachgewiesen werden. Insgesamt wurden bei allen 20 *E. coli*-Isolaten in der Kategorie „Toxine“ nur 14 Treffer erzielt. Etwas mehr Treffer waren in den Kategorie „Protektine“ nachweisbar (n = 27). Die Kategorien „Adhäsine“ und „Eisensoffwechsel“ waren mit jeweils 41 bzw. 47 Treffern vertreten. Fast doppelt so viele Treffer wurden allerdings in der Kategorie „Verschiedenes“ erreicht (n = 81). Dennoch unterschied sich die Anzahl der insgesamt erzielten Treffer in beiden Gruppen nur wenig (Humanisolate: 108 Treffer, Tierisolate: 102 Treffer).

Bei Analyse von Verteilung und Anzahl identifizierter Virulenzfaktoren (pro untersuchtem Isolat) entfällt eine deutlich höhere Anzahl auf Isolate der phylogenetischen Gruppen B2 und D. Dort wurden im Durchschnitt 19 Virulenzfaktoren gefunden. Bei Isolaten der Gruppen A und B1 liegt die Zahl durchschnittlich identifizierter Virulenzfaktoren mit 7,5 deutlich niedriger.

Das *fim*-Operon und das *ompA*-Gen wurde bei allen Isolaten nachgewiesen. Beim Vergleich der Humanisolate mit den Tierisolaten in der Kategorie „Adhäsine“ zeigten sich Unterschiede. Während bei den Humanisolaten das Gen *lpfA* identifiziert werden konnte, trat es bei den Tierisolaten nicht in Erscheinung. Allerdings war das Gen *bmaE* nur bei diesen vorhanden. Der Nachweis von *eata* und *ibeA* war ebenfalls auf die Tierisolate beschränkt. Weitere nur bei den Humanisolaten gefundene Gene sind *hra*, *H7 flic* und *F1845*.

Das Serumresistenzgen *iss* war bei 50 % der Humanisolate und 70 % der Tierisolate identifizierbar. Die Operons für Aerobactin und das Gen *sitA* wurden deutlich häufiger in der Gruppe der Tierisolate detektiert (90 % und 100 % vs. 50 % und 50 %, vgl. Tabelle 29). Die Kombination der Operons bzw. Gene für Aerobactin, Yersiniabactin, Hemin Aufnahme und *sitA* wurde bei 4 Humanisolaten und 5 Tierisolaten identifiziert. Die Gene *ibeB* und *ibeC*

---

wurden ebenfalls bei Human- und Tierisolaten detektiert. Allerdings waren beide mit 100 % vs. 60 % und 90 % vs. 70 % häufiger in der Gruppe der Humanisolate zu finden (Tabelle 29).

Bei den Isolaten, die dem Sequenztyp ST131 angehörten (H75, H131, H132, V260), wurde eine Kombination verschiedener Virulenzfaktoren unterschiedlicher Kategorien festgestellt. Dazu gehörten die Operons bzw. Gene *fim*, Aerobactin, Yersiniabactin, Hemin Aufnahme und *sitA*. Des Weiteren zählten die Gene *iha*, *pic*, *sat*, *kpsDMT*, *malX*, *usp*, *aslaA* und *ompA* dazu. ST410-Isolate zeigten die Kombination *fim*-Operon, *iss*, Aerobactin-Operon, *sitA* und *ompA*. Die Kombination der Gene bzw. Operons *fim*, *ompT*, Aerobactin, Yersiniabactin, *iron*, *sitA* und *ompA* wurde bei den Isolaten H1, V63, V76 und V143 gefunden.

12 Isolate können nach der oben genannten Definition als ExPEC klassifiziert werden. Bei 8 Isolaten (H75, H93, H131, H132, V70, V143, V260, V288) konnten DAEC-, EAEC/EPEC- und ETEC-spezifische Virulenzgene nachgewiesen werden. Allerdings trägt jedes dieser Isolate immer nur eines dieser Gene und andere Pathovar-spezifische Gene fehlen. Eine Zuordnung zu den genannten Pathovaren ist daher schwierig und nicht unbedingt eindeutig.

Der avirulente *E. coli* K12 MG1655 besaß im Vergleich zu den in dieser *Ph. D.*-Thesis untersuchten Human- und Tierisolaten nur das *fim*-Operon sowie die Gene *iss* und *ompA*. Per oben genannter Definition muss dieser Stamm daher auch als ExPEC angesehen werden.

Alle 20 Isolate besaßen ein individuelles Virulenzgenmuster und repräsentierten 20 verschiedene Kombinationen der untersuchten Virulenzgene bzw. Virulenz-assoziierten Gene.

**Tabelle 29** Übersicht der InPec und ExPec Virulenz- und Virulenz-assoziierten Faktoren bei ESBL-produzierenden *E. coli* von Menschen (H) und Tieren (V)

Virulenzdeterminante	H1	H44	H75	H92	H93	H115	H131	H132	H139	H152	V63	V70	V74	V76	V105	V143	V161	V210	V260	V288	K12
Sequenztyp (ST)	453	10	131	10	156	744	131	131	88	224	162	361	617	1056	10	88	410	410	131	354	10
Phylogenetische Gruppe	B1	B1	B2	A	B1	A	B2	B2	A	B1	B1	A	B1	B1	A	A	A	A	B2	D	A
<b>Adhäsine</b>																					
<i>fim</i> ABCDEFGHI																					
<i>lpfA</i>																					
<i>iha</i>																					
<i>afa</i> ABCD																					
<i>dra</i> ACDEP																					
<i>bma</i> E																					
<i>aida</i> -I																					
<i>F1845</i>																					
<i>pic</i>																					
<i>sat</i>																					
<i>astA</i>																					
<i>hra</i>																					
<i>esta</i>																					
<i>iss</i>																					
<i>kps</i> MT II																					
<i>tra</i> J																					
<i>omp</i> T																					

Legende: weiß: Gen nicht gefunden, schwarz: Gen gefunden, Identität auf DNA-Sequenzebene > 98 %Sequenzeben



#### **4.2.6 Virulenz im *Galleria mellonella* Modell**

*Galleria mellonella*-Larven wurden per Injektion mit einer mittleren Infektionsdosis von  $7 \times 10^6$  Kolonie bildenden Einheiten (KbE) der 20 ausgewählten ESBL-kodierenden *E. coli*-Isolate infiziert (je 10 Larven in 3 Versuchen je Isolat). Die Überlebensrate der Larven wurde über 5 Tage untersucht. Die Testergebnisse sind in den Abbildungen 21 und 22 sowie in der Tabelle 30 dargestellt.

##### ***E. coli*-Isolate von Menschen**

Die Hälfte der getesteten Humanisolate zeichnete sich durch einen hohen larviziden Effekt aus. So waren die Isolate H1, H92, H132, H139 und H152 (50 %) in der Lage jeweils mindestens 95 % der Larven innerhalb eines Tages und 100 % der Larven innerhalb von 2 Tagen zu töten. Einen geringfügig geringeren larviziden Effekt zeigten die Isolate H93, H115 und H131 mit 13,3 %, 20 % und 3,3 % Überlebenden am Tag 5. Lediglich bei den Isolaten H44 und H75 überlebten 80 % bzw. 100 % der Larven die Infektion über 5 Tage (Abbildung 21).

##### ***E. coli*-Isolate von Tieren**

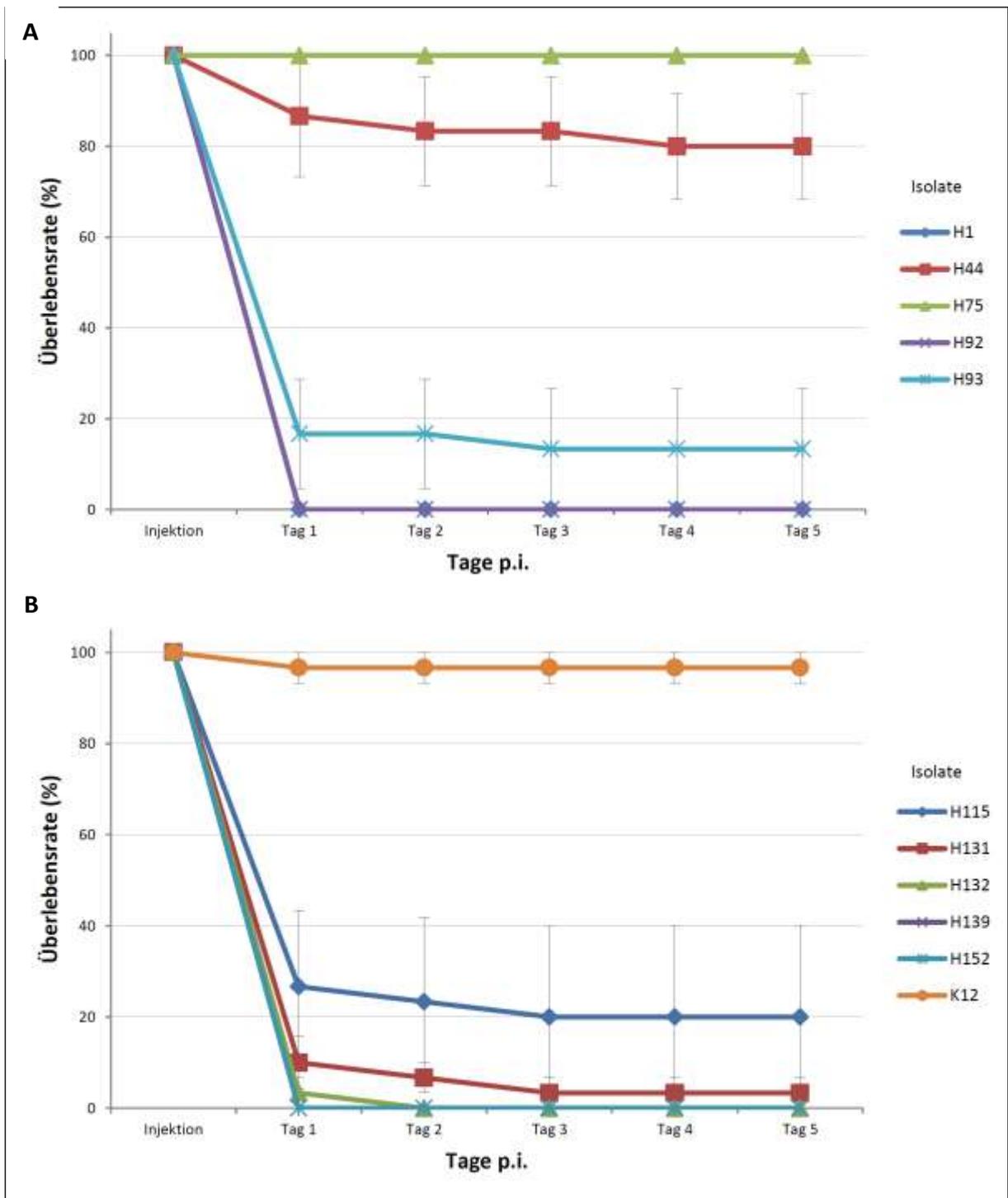
Bei den untersuchten Tierisolaten waren 50 % der Isolate (V70, V74, V76, V161 und V210) in der Lage, alle Larven innerhalb des ersten Tages zu töten. Die Isolate V63, V143, V260 und V288 zeigten mit Überlebensraten von 30 %, 3,3 %, 3,3 % und 6,7 % am Tag 5 einen schwächeren, aber dennoch ausgeprägten larviziden Effekt. Nur die Überlebensrate von V105 war mit 96,7 % sehr hoch (Abbildung 22).

**Tabelle 30** Herkunft, genetische Eigenschaften sowie die im *Galleria mellonella*-Modell eingesetzte Infektionsdosis und der damit erzielte larvizide Effekt der ESBL-produzierenden *E. coli*-Human- und Tierisolate

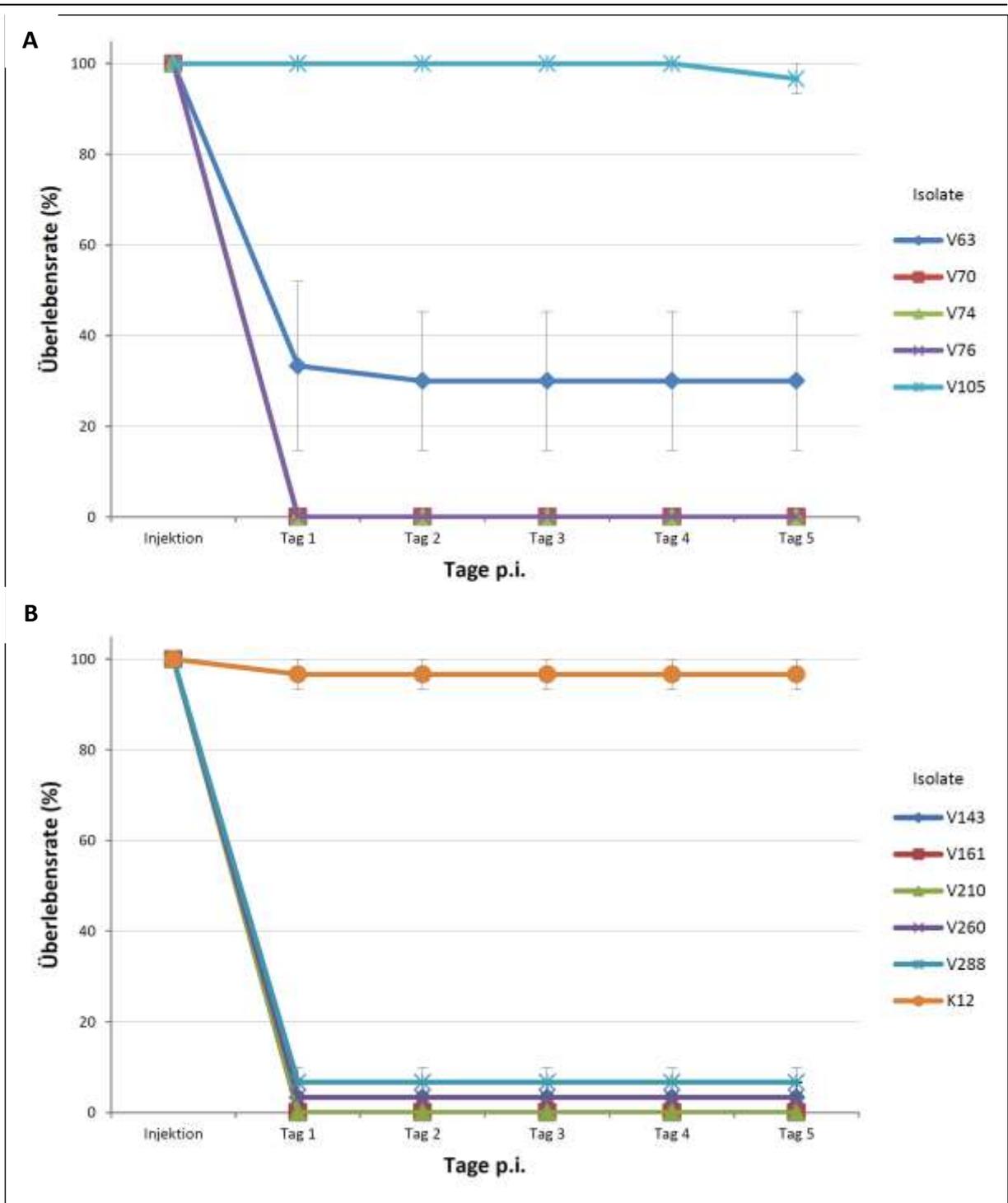
Isolat	Herkunft	Kodierter ESBL-Subtyp	Phylog. Gruppe	Sequenztyp	Anzahl der Virulenz- u. Vir.-assoziierten Gene	Infektionsdosis [KBE/Larve]	Mittlere Überlebenszeit der Larven (Tagen)	Larvizider Effekt [%] <sup>a</sup>
H1	Ambulant (H)	CTX-M-1	B1	453	12	9,10E+06	0	100,0
H44	Ambulant (H)	CTX-M-1	B1	10	4	6,70E+06	4,2	20,0
H75	Stationär (H)	CTX-M-15	B2	131	16	6,47E+06	5	0,0
H92	Stationär (H)	CTX-M-15	A	10	5	6,13E+06	0	100,0
H93	Ambulant (H)	CTX-M-15	B1	156	7	8,37E+06	0,7	86,7
H115	Stationär (H)	CTX-M-1	A	744	6	5,77E+06	1,1	80,0
H131	Stationär (H)	CTX-M-1	B2	131	19	6,43E+06	0,3	96,7
H132	Ambulant (H)	CTX-M-15	B2	131	17	8,27E+06	0	100,0
H139	Stationär (H)	CTX-M-1	A	88	8	7,20E+06	0	100,0
H152	Ambulant (H)	CTX-M-15	B1	224	7	6,47E+06	0	100,0
V63	Hund	CTX-M-1	B1	162	9	6,40E+06	1,5	70,0
V70	Hund	CTX-M-15	A	361	7	6,00E+06	0	100,0
V74	Hund	CTX-M-15	B1	617	8	8,70E+06	0	100,0
V76	Hund	CTX-M-1	B1	1056	11	8,90E+06	0	100,0
V105	Hund	CTX-M-1	A	10	7	8,23E+06	4,9	3,3
V143	Katze	CTX-M-1	A	88	11	4,33E+06	0,2	96,7
V161	Hund	CTX-M-15	A	410	5	12,0E+06	0	100,0
V210	Katze	CTX-M-15	A	410	5	8,77E+06	0	100,0
V260	Hund	CTX-M-15	B2	131	16	5,70E+06	0,2	96,7
V288	Hund	CTX-M-1	D	354	14	8,00E+06	0	93,3
K12	Laborstamm		A	10	3	7,90E+06	4,8	3,3

H: Humanisolat

<sup>a</sup> 100 % larvizider Effekt: am Tag 5 nach der Infektion waren alle 30 Larven aus 3 Versuchen mit je 10 Larven tot.



**Abbildung 21** Überlebensraten von *Galleria mellonella*-Larven gemessen über 5 Tage nach Infektion mit ESBL-produzierenden *E. coli*-Humanisolaten (Abbildung A: H1 – H93, Abbildung B: H115 – H152 und *E. coli* K12). *E. coli* K12 MG1655 diente als avirulenter Kontrollstamm. 0,9% NaCl wurde als Negativkontrolle verwendet. Pro Isolat wurden 30 Larven mit einer mittleren Infektionsdosis von  $7 \times 10^6$  KbE infiziert und die Zahl der lebenden Larven nach jeweils 24, 48, 72, 96 und 120 h dokumentiert. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert +/- SEM. p.i.: post injectionem



**Abbildung 22** Überlebensraten von *Galleria mellonella*-Larven gemessen über 5 Tage nach Infektion mit ESBL-produzierenden *E. coli* Tierisolaten (Abbildung A: V63 – V105, Abbildung B: V143 –V288 und *E. coli* K12). *E. coli* K12 MG1655 diente als avirulenter Kontrollstamm. 0,9% NaCl wurde als Negativkontrolle verwendet. Pro Isolat wurden 30 Larven mit einer mittleren Infektionsdosis von  $7 \times 10^6$  KbE infiziert und die Zahl der lebenden Larven nach jeweils 24, 48, 72, 96 und 120 h dokumentiert. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert +/- SEM. p.i.: post injectionem

#### 4.2.7 Risikofaktoren für einen hohen larviziden Effekt

Um Faktoren zu identifizieren, die möglicherweise für einen stärkeren larviziden Effekt der *E. coli*-Isolate im *Galleria mellonella*-Modell verantwortlich waren, wurden die nachfolgend genannten Parameter mit Hilfe der schrittweisen Cox-Regressionsanalyse auf ihre Assoziation mit dem ermittelten larviziden Effekt geprüft: Infektionsdosis, Anzahl der Virulenzgene, Präsenz eines Toxingens, Kombination der Gene *sitA/iucA/iss*, das Gen *lpfA*, das Gen *traJ* und die Zugehörigkeit zum ST131. In der Analyse wurde die mittlere Überlebenszeit der Larven als Maß des larviziden Effekts der *E. coli*-Isolate verwendet. Die Analyseergebnisse sind in der Tabelle 31 zusammengestellt.

Die Auswahl von Faktoren, welche die Überlebensrate beeinflussen, wurde mit dem Akaike-Informationskriterium vorgenommen (Kletting und Glatting, 2009). Der *E. coli*-Kontrollstamm K12 MG1655) wurde von der Analyse ausgeschlossen. Die schrittweise Auswahl der potentiellen Einflussgrößen identifizierte die Genkombination *sitA/iucA/iss*, das Vorhandensein eines Toxingens, die Zugehörigkeit zu ST131 und die Gene *lpfA* sowie *traJ* als Risikofaktoren. *Galleria mellonella*-Larven, die mit Isolaten infiziert wurden, die die Genkombination *sitA/iucA/iss* aufwiesen, verstarben mit einem 220 % höheren Risiko (Hazard Ratio – HR = 2,2), als ohne die Kombination (Tabelle 31). Besaß ein *E. coli*-Isolat eines der gesuchten Toxingene, dann verstarben die Larven mit einem 1,6-mal höheren Risiko, als wenn das Isolat kein Toxingen besaß. Die Präsenz des Gens *lpfA* erhöht das Risiko zu versterben um das 2,9-fache, während das Vorhandensein von *traJ* das Risiko um das 3-fache erhöht. Die Zugehörigkeit zu ST131 (HR = 0,51) hingegen senkt das Risiko zu versterben.

**Tabelle 31** Ergebnisse der schrittweisen Cox-Regressionsanalyse für den larviziden Effekt der *E. coli*-Isolate im *Galleria mellonella*-Modell

<b>Geprüfte Variable</b>	<b>Hazard Ratio</b>	<b>95 % Konfidenzintervall für das Hazard Ratio</b>	<b>p-Wert (<math>p &lt; 0,001</math>)</b>
<i>sitA/iucA/iss</i> (ja/nein)	2,219	1,701 – 2,893	0,000
Toxingen (ja/nein)	1,606	1,305 – 1,976	0,000
ST131 (ja/nein)	0,508	0,365 – 0,707	0,000
Gen <i>lpfA</i> (ja/nein)	2,860	2,106 – 3,885	0,000
Gen <i>traJ</i> (ja/nein)	2,975	2,273 – 3,893	0,000

## 5 Diskussion

Während der letzten Dekade wurde weltweit eine rasante Ausbreitung multiresistenter ESBL-produzierender *Enterobacteriaceae* beobachtet. Das Vorkommen resistenter Erreger ist dabei nicht auf den Bereich der Humanmedizin beschränkt. Inzwischen werden sie auch regelmäßig in von Tieren isolierten Stämmen nachgewiesen (Hordijk *et al.*, 2013; Guenther *et al.*, 2011). Übertragungswege zwischen Mensch und Tier wurden daher während der letzten Jahre intensiv diskutiert (Meyer *et al.*, 2012; Wieler *et al.*, 2011, Schmiedel *et al.*, 2014; Valentin *et al.*, 2014). Die Ausbreitung von Multiresistenzen kann durch die Übertragung mobiler genetischer Elemente wie z. B. Plasmide erklärt werden. Sie sind in der Lage Antibiotikaresistenzen innerhalb von Bakterienpopulationen über horizontalen Gentransfer relativ schnell zu verteilen. ESBLs sind üblicherweise Plasmid-kodiert und können daher rasch weitergegeben werden. Diese Eigenschaft teilen sie mit den PMQRs. Häufig können ESBL- und PMQR-kodierende Gene auf dem gleichen Plasmid gefunden werden (Shahid *et al.*, 2011). Diese *Ph. D.*-Thesis wurde konzipiert, um die Verteilung von  $\beta$ -Laktamase- und PMQR-Genen bei Isolaten von Menschen und Tieren aus einem abgegrenzten geografischen Gebiet in Deutschland, der Region Mittelhessen, zu untersuchen. Der Schwerpunkt der Untersuchung lag dabei auf der Prävalenz von ESBLs mit anschließender phänotypischer und genotypischer Charakterisierung der ESBL-verdächtigen Isolate. Die entscheidende Frage war, ob ähnliche Resistenzeigenschaften ( $\beta$ -Laktamase-, ESBL- und PMQR-Typen) bei Human- und Tierisolaten identifiziert werden können. Bereits veröffentlichte Studien aus der Region Gießen demonstrieren im Bereich der Human- und der Tiermedizin das Vorkommen multiresistenter *Enterobacteriaceae* (Mshana *et al.*, 2009; Stolle *et al.*, 2013). Zusätzlich wurden Kombinationen von ESBL- und PMQR-Genen untersucht. Eine mögliche Assoziation ESBL-kodierender *E. coli* von Menschen und Tieren mit bestimmten phylogenetischen Gruppen von *E. coli* wurde ebenfalls untersucht. Den Abschluss der Arbeit stellte eine eingehendere Charakterisierung von 20 ausgewählten *E. coli*-Isolaten von Menschen und Tieren dar. Sie wurden hinsichtlich vorhandener Plasmide und deren Eigenschaften untersucht. Zusätzlich erfolgte eine Charakterisierung ihrer Virulenzeigenschaften auf Genomebene und die Untersuchung ihrer phänotypischen Virulenz durch Infektionsversuche mit *Galleria mellonella*, da bis heute wenig über die Virulenz von ESBL-produzierenden *E. coli*-Stämmen bekannt ist.

Insgesamt wurden 390 ESBL-verdächtige Isolate in dieser Studie genauer charakterisiert. Von diesen stammten 183 Isolate von Menschen und 207 Isolate von verschiedenen Tierarten (Hunde, Katzen, Pferde, Rinder, Schweine und anderen Tierarten). Innerhalb der Tierarten waren die Gruppen der Heimtiere (Hunde und Katzen) und Pferde im Gegensatz zu den Nutztierisolaten zahlenmäßig deutlich stärker vertreten. Die Mehrzahl aller Isolate konnte den Spezies *E. coli* (73,8 %) und *K. pneumoniae* (17,7 %) zugeordnet werden. Ähnliche Daten wurden auch von der ECDC für den europäischen Raum erhoben (ECDC, 2012). Somit sind diese Nachweishäufigkeiten kein lokales Phänomen, sondern spiegeln eine europaweite Entwicklung wieder. Die Zuordnung der *E. coli*-Isolate zu den phylogenetischen Gruppen A, B1, B2 und D zeigte folgende Verteilungen. In beiden Stammsammlungen weisen die Gruppen B1 und D eine vergleichbare Verteilung auf. Innerhalb der Gruppe der Tierisolate konnte jedoch nur eine sehr geringe Anzahl Isolate der Gruppe B2 (3,4 %) zugeordnet werden und die Gruppe A ist hier prozentual am stärksten vertreten (44,2 %). Im Gegensatz dazu entfallen 26,2 % der Humanisolate auf die Gruppe B2 und 30,5 % auf die Gruppe A. Der Ursprung des Primärprobenmaterials könnte eine Erklärung für diese Diskrepanz sein. Mehrere Studien deuten darauf hin, dass bestimmte phylogenetische Gruppen bei einigen Probenmaterialien und Infektionsarten häufiger vorkommen (Yong *et al.*, 2009; Stolle *et al.*, 2013). Zhang *et al.* zeigten ein Clustering der Gruppe B2 humaner *E. coli*-Isolaten aus Urin (Yong *et al.*, 2009). Die Tatsache, dass 53 % der Humanisolate dieser Studie aus Urin isoliert worden sind, während nur 19,1 % von Rektalabstrichen stammen, bekräftigt einen Zusammenhang zwischen Gruppe B2 und der Herkunft „Urogenitaltrakt des Menschen“. Im Gegensatz zu den Humanproben war die Hauptquelle (51,2 %) für Tierisolate in dieser Arbeit Kot von Tieren mit Enteritis, Diarrhoe und Kolik. Es ist fraglich, ob die untersuchten Isolate tatsächlich für die beobachteten Symptome verantwortlich sind. Sie könnten ebenso gut Kommensalen-Stämme sein, die nur auf Grund ihrer Resistenz selektioniert worden sind. Bekanntermaßen gehören kommensal lebende *E. coli* tyischerweise den phylogenetischen Gruppe A und B1 an. Dieser Umstand würde die starke Präsenz dieser beiden Gruppen, sowie das fast komplette Fehlen der Gruppe B2 innerhalb der Tierisolate erklären.

In dieser *Ph.D.*-Thesis wurde von allen Isolaten ein Antibiogramm erstellt. Da ESBL-Produzenten oft auch Resistenzen gegen andere Antibiotikaklassen zeigen wurden Wirkstoffe verschiedener Antibiotikaklassen exemplarisch untersucht. Die Antibiogramme erbrachten alarmierende, wenn auch nicht allzu überraschende Ergebnisse. Alle Isolate wurden nach dem vorläufigen internationalen Expertenvorschlag für Standarddefinitionen

für erworbene Resistenzen des *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) als multiresistent kategorisiert (Magiorakos *et al.*, 2012). Voraussetzung für diese Einordnung in diese Kategorie ist Resistenz gegen mindestens einen Wirkstoff aus drei oder mehr Antibiotikaklassen unter Beobachtung (u.a. Aminoglykoside, Fluorchinolone, Penicilline, Cephalosporine 1.-5. Generation, Carbapeneme). Wie zu erwarten, wurden hohe Resistenzquoten gegen Cephalosporine und Penicilline beobachtet. Hier reichten die Quoten von 52,5 % Ceftazidim-resistenten Humanisolaten bis zu 100 % Resistenz beider Gruppen (Human- und Tierisolate) gegen Ampicillin. Sehr bedenklich ist die in den Tierisolaten festgestellte Resistenz gegen die humanmedizinischen Reserveantibiotika Ertapenem und Imipenem. Besonders die Ergebnisse für Ertapenem mit Resistenzraten von 16,9 % bei den Tier- und 24 % bei den Humanisolaten waren besorgniserregend. Insbesondere die Resistenzquoten der Tierisolate sind nur bedingt erklärbar. Die Anwendung von Carbapenemen ist in Deutschland bei Nutztieren verboten und der Einsatz bei Hobbytieren wie Hunden, Katzen und Pferden ist nur bei „Therapienotstand“ nach Umwidmung möglich und unterliegt strengen Regeln durch das Arzneimittelgesetz (AMG). Da fast alle Ertapenem-resistenten Tierisolate (78,3%) von Hunden und Katzen stammen, könnte dies einerseits ein Hinweis für eine Übertragung resistenter Isolate bzw. Resistenzgen-tragender Elemente (z. B. Plasmide) vom Menschen auf Tiere sein. Andererseits kann eine Umwidmung von Carbapenemen für die Behandlung von Hobbytieren nicht komplett ausgeschlossen werden, obwohl diese Wirkstoffe extrem kostspielig sind und ihr Einsatz eher selten ist. Zudem wurden von anderen Arbeitsgruppen in Gießen erst kürzlich Carbapenemase-produzierende *Enterobacteriaceae* in Proben von Heimtieren nachgewiesen (Stolle *et al.*, 2013). Um dieses Phänomen genauer zu untersuchen, wurden alle Carbapenem-resistenten Isolate aus dieser Studie auf die genetische Präsenz der Carbapenemase OXA-48 durchgemustert. Laut Potron *et al.* gilt Ertapenem als das am besten geeignete Carbapenem zur Erkennung von OXA-48-Produzenten (Potron *et al.*, 2013a). Das 21,8 % aller untersuchten Human- und Tierisolate Resistenz gegen Ertapenem zeigten, macht die Präsenz von *bla*<sub>OXA-48</sub> sehr wahrscheinlich. Überraschenderweise konnte aber ein Unterschied hinsichtlich des zugrundeliegenden molekularen Resistenzmechanismus beobachtet werden. Keines der 48 getesteten Humanisolate war positiv für *bla*<sub>OXA-48</sub>, bei 26 dieser Isolate (54,2%) konnte aber eine Kombination aus einer AmpC-β-Laktamase und einer Porindefizienz detektiert werden. Dieser Mechanismus wurde bereits in AmpC-produzierenden *K. pneumoniae* von Shi *et al.* beobachtet. Sie stellten fest, dass ein Porin-Verlust in Kombination mit Produktion einer

AmpC zu einer verminderten Empfindlichkeit für Carbapeneme führen kann (Shi *et al.*, 2013). Im Gegensatz zu diesen Resultaten trugen 62,2 % der untersuchten Carbapenem-resistenten Tierisolate eine OXA-48-Carbapenemase.

Beispielhaft für die Gruppe der Fluorchinolone wurden die Resistenzraten für Ciprofloxacin bestimmt. Die gemessenen Resistenzquoten (Humanisolate: 76,5 %, Tierisolate: 68,1 %) sind insofern bedenklich, da die Klasse der Fluorchinolon-Antibiotika in der klinischen Praxis häufig angewendet wird, wenn die klassischen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika wie Penicilline und Cephalosporine nicht mehr wirksam sind (S2 Leitlinie HNO, 2008). Bei gleichzeitiger Penicillin-, Cephalosporin- und Chinolonresistenz werden die therapeutischen Möglichkeiten daher immer weiter eingeschränkt.

Letztendlich ließen sich hinsichtlich der Resistenzquoten zwischen Human- und Tierisolaten, bis auf wenige Ausnahmen, nur geringe Abweichungen feststellen. Viele Isolate beider Gruppen zeigen die von Östholm *et al.* beschriebene Co-Resistenz zwischen ESBL-produzierenden Isolaten und Nicht- $\beta$ -Laktamantibiotika. (Östholm *et al.*, 2013). Lediglich einige wenige Antibiotika (Amikacin, Nitrofurantoin, Colistin, Tigecyclin und Fosfomycin) sind laut Östholm *et al.* davon ausgenommen. Tatsächlich sind viele der hier untersuchten Isolate noch empfindlich gegen Amikacin. Die Resistenzquoten liegen hier nur bei 4,3 % (Tierisolate) und 14,8 % (Humanisolate), was im Vergleich zu den Resistenzquoten der anderen getesteten Antibiotika als niedrig zu beurteilen ist. Lediglich für Imipenem liegen die gemessenen Resistenzquoten bei beiden Gruppen noch niedriger (Humanisolate: 2,2 %, Tierisolate: 1,0 %).

Unter den 390 ESBL-verdächtigen Isolaten trugen 87,2 % ein ESBL-Gen. Kombinationen von verschiedenen Resistenzgenen die für Pencillinasen, ESBLs, Carbapenemasen und PMQRs kodieren waren bei 70 % der Isolate präsent. Vorherrschende ESBL-Subtypen bei Human- und Tierisolaten waren *bla*<sub>CTX-M-1</sub> und *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. *Bla*<sub>CTX-M-15</sub> war der mit Abstand am häufigsten nachgewiesene ESBL-Subtyp mit 49,5 % positiven Isolaten (52,5 % der Humanisolate, 46,9 % der Tierisolate). Mit einer Gesamtnachweisrate von 25,4 % (23 % der Humanisolate, 27,5 % der Tierisolate) war der Subtyp *bla*<sub>CTX-M-1</sub> ebenfalls häufig vertreten. Laut Livermore *et al.* 2006 wurde *bla*<sub>CTX-M-15</sub> bisher eher mit Humanisolaten assoziiert (Livermore *et al.*, 2006). *Bla*<sub>CTX-M-1</sub> war der überwiegend bei Nutztieren (Schweinen, Rindern, Geflügel) und Heimtieren gefundene CTX-M-Subtyp (Geser *et al.*, 2012 Li *et al.*; 1994; Hordijk *et al.*, 2013). In der Zwischenzeit ist eine Zuordnung der oben genannten CTX-M Subtypen zu Human- oder Tierisolaten nicht mehr haltbar. Mehr und mehr Studien aus Europa

identifizieren  $bla_{\text{CTX-M-1}}$  und  $bla_{\text{CTX-M-15}}$  in beiden Populationen (Grobner *et al.*, 2009; Ewers *et al.*, 2012) und diese Ergebnisse dieser *Ph.D.*-Thesis bestätigen diese Entwicklung. Bei den untersuchten Pferdeisolaten halten sich die Nachweisquoten für  $bla_{\text{CTX-M-1}}$  und  $bla_{\text{CTX-M-15}}$  die Waage ( $bla_{\text{CTX-M-1}}$  37 %;  $bla_{\text{CTX-M-15}}$  38 %). Frühere Studien haben hauptsächlich  $bla_{\text{CTX-M-1}}$  als vorherrschenden Subtyp bei Pferden identifiziert (Johns *et al.*, 2012; Dierikx *et al.*, 2012b), der auch der am häufigsten nachgewiesene Subtyp bei Nutztieren ist. In Deutschland werden Pferde überwiegend als Freizeittiere gehalten, normalerweise nahe bei oder in einer Umgebung mit klassischen Nutztieren wie Rindern oder Schweinen. Jedoch haben sie in der Regel engeren Kontakt zum Menschen und im Falle einer Erkrankung ist die medizinische Versorgung deutlich intensiver als bei landwirtschaftlichen Nutztieren. Damit nehmen sie eine besondere Stellung zwischen den klassischen Heimtieren Hund und Katze und den Nutztieren wie Rind und Schwein ein. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die besonders hohen Nachweisquoten von  $bla_{\text{CTX-M-15}}$  bei Pferdeisolaten in dieser *Ph.D.*-Thesis sein. Ebenfalls interessant ist die Kumulation von  $bla_{\text{CTX-M-2}}$  bei *E. coli*-Pferdeisolaten. Eine Studie aus Belgien identifizierte  $bla_{\text{CTX-M-2}}$  ebenfalls als maßgeblichen CTX-M Subtyp bei klinisch kranken Pferden (Rice, 1999). Die Tiere hatten eine längere Behandlung mit verschiedenen Antibiotika erhalten und das  $bla_{\text{CTX-M-2}}$ -Gen war in den Klasse-1-Integron-Komplexes  $ISCR_1$  integriert. Ferreira *et al.* konnten in ihrer Studie die gleiche Vergesellschaftung feststellen, allerdings im Chromosom von *E. coli*-Isolaten von gesunden Masthähnchen aus Brasilien (Ferreira *et al.*, 2014). Weitere Untersuchungen der genetischen Umgebung von  $bla_{\text{CTX-M-2}}$  sind notwendig, um mögliche Zusammenhänge mit dem Integron  $ISCR_1$  bei den in dieser *Ph.D.*-Thesis untersuchten Isolaten zu identifizieren. Laut der Literatur ist der Nachweis von  $bla_{\text{CTX-M-2}}$  ist nicht auf Pferde- bzw. Tierisolate beschränkt. Es war zuvor auch schon bei *Salmonella enterica* Isolaten aus UK und *E. coli*-Isolaten aus Brasilien von klinisch kranken Patienten detektiert worden (Berman *et al.*, 2014; Burke *et al.*, 2013). Innerhalb der Gruppe der untersuchten Nutztierisolate konnte die gleiche Beobachtung wie bei den untersuchten Pferdeisolaten gemacht werden. Auch bei diesen wurden die Subtypen CTX-M-1 und CTX-M-15 in ungefähr gleicher Zahl nachgewiesen ( $bla_{\text{CTX-M-1}}$ : 6 Isolate,  $bla_{\text{CTX-M-15}}$ : 7 Isolate). Diese Beobachtung unterstreicht ebenfalls die Studienergebnisse von Grobner *et al.* (2009) und Ewers *et al.* (2012), wonach auch im Nutztierbereich vermehrt die ESBL CTX-M-15 nachgewiesen wird. Allerdings ist eine Beurteilung der Häufigkeiten in diesem Fall schwierig, da die Zahl der in dieser Studie eingeschlossenen Nutztierisolate mit nur 18 Isolaten sehr gering ist.

Das Vorkommen verschiedener PMQR-Gene bei ESBL-produzierenden *Enterobacteriaceae*-Isolaten wurde bereits mehrfach beschrieben (Donati *et al.*, 2014; Veldman *et al.*, 2013) und durch Ergebnisse dieser *Ph.D.*-Thesis erneut bestätigt. So wurde bei 33,6 % der Ciprofloxacin-resistenten Humanisolate und 52,5 % der Ciprofloxacin-resistenten Tierisolate ein PMQR-kodierendes Gen nachgewiesen. Der *-cr* Variante der Aminoglykosid-Acetyltransferase AAC(6)-Ib ist dabei der größte Teil zuzurechnen (Humanisolate: 27,9 %, Tierisolate: 35,5 %). Ähnliche Beobachtungen wurden auch von Donati *et al.* bei Heimtieren in Italien gemacht (Donati *et al.*, 2014). Verschiedene *qnr*-kodierende Gene wurden ebenfalls identifiziert, wenn auch nur in geringem Maße (5,7 % der Humanisolate und 17 % der Tierisolate). Die hohen Resistenzquoten für Ciprofloxacin sind mit diesen Zahlen allerdings nicht zu erklären. PMQRs, insbesondere *qnr*-Proteine, induzieren in der Regel eine sogenannte *Low Level*-Chinolon-Resistenz die durch eine MHK von  $\geq 0,25 \mu\text{g/ml}$  für Ciprofloxacin gekennzeichnet ist (Martínez-Martínez *et al.*, 1998). Alle Ciprofloxacin-resistenten Isolate die in dieser *Ph.D.*-Thesis untersucht wurden, zeigten aber bereits eine MHK von mindestens  $1,0 \mu\text{g/ml}$ . Die Präsenz eines zusätzlichen Resistenzmechanismus ist daher sehr wahrscheinlich. Bei vielen untersuchten Isolaten liegt mutmaßlich zusätzlich eine chromosomal bedingte Resistenz, klassischerweise eine Mutation des *gyrA*- oder *gyrB*-Genes, vor (Jacoby, 2005). Um die Basis der Chinolonresistenzen genauer zu untersuchen, sollten die *gyrA*- und *gyrB*-Gene der Ciprofloxacin-resistenten Isolate sequenziert werden. Obwohl PMQR-Gene nur eine Resistenz auf niedrigem Level vermitteln, begünstigen sie dennoch die Selektion zusätzlicher, chromosomal-kodierter, Chinolon-Resistenz-Mechanismen. Der Effekt beruht dabei auf einer Absenkung der Antibiotikakonzentration ab der resistente Isolate selektiert werden. In Anwesenheit von *qnr*-Proteinen, den Produkten der *qnr*-Gene, beginnt die Selektion resistenter Isolate schon bei deutlich geringeren Antibiotikakonzentrationen. So kann die Selektion Chinolon-resistenter Mutanten um mehr als das Hundertfache gesteigert werden. Auf diesem Weg wird auch das Überleben von Mutanten mit einem höheren Resistenzlevel gegen Chinolone (Poirel *et al.*, 2012) erleichtert. Daher stellen *qnr*-positive Isolate eine günstige Basis für eine *in-vivo* Selektion zusätzlicher chromosomal-kodierter Resistenzmechanismen (*qnrA/qnrB*-Mutationen) unter Fluorchinolonthherapie dar (Poirel *et al.*, 2006). Zusätzlich können *qnr*-Proteine die Resistenz gegen Chinolone durch veränderte Chinolon-Zielenzyme, die Aktivierung von Effluxpumpen oder den Verlust von Außenmembranproteinen unterstützen (Poirel *et al.*, 2012).

Bei den meisten untersuchten Isolaten lag eine Kombination verschiedener Resistenzgene vor. In 70 % aller Isolate wurden mindestens 2 Gene welche eine Resistenz gegen  $\beta$ -Laktame oder Chinolone kodieren gefunden. Solche Kombinationen verschiedener  $\beta$ -Laktamasegene wurden schon häufiger innerhalb der Genome Gram-negativer Bakterien beobachtet (Shahid *et al.*, 2011; Munday, 2004). Ferner wurde die Co-Selektion von  $\beta$ -Laktamasegenen und Genen für die Resistenz gegen andere Antibiotika, wie z. B. Fluorchinolone, als ein möglicher Mechanismus für die Ausbreitung dieser Gene postuliert (Cantón und Coque, 2006). Die in dieser *Ph.D.*-Thesis häufig beobachtete Kombination von *bla*<sub>CTX-M-15</sub> und *aac*(6)-*Ib-cr* kann diese schon früher aufgestellte Co-Selektionstheorie unterstützen (Sabtcheva *et al.*, 2008). Die in 12,8 % der Isolate gefundene Resistenzgenkombination *bla*<sub>TEM-1</sub>/*bla*<sub>OXA-1</sub>/*bla*<sub>CTX-M-15</sub>/*aac*(6)-*Ib-cr* wurde bereits in anderen Studien beschrieben (Sandegren *et al.*, 2011; Woodford *et al.*, 2009). Dort konnte eine Vergesellschaftung der genannten Gene in einer Resistenzgenkassette mit den Insertionselementen *ISEcp1* und *IS26* in verschiedenen Transposons nachgewiesen werden. Mit großer Wahrscheinlichkeit ist diese Resistenzgenkassette auch bei den hier genannten Isolaten vorhanden. Weitere Untersuchungen sollten sich gegebenenfalls damit beschäftigen. Alarmierend ist die hier nachgewiesene Assoziation von *bla*<sub>OXA-48</sub> mit mindestens 2 anderen Resistenzgenen, wie z. B. den Penicillinasen TEM-1, SHV-1, SHV-2 oder OXA-1, einem PMQR-Gen oder manchmal sogar einem CTX-M-Gen. Eine räumliche Vergesellschaftung von *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, der am häufigsten gefundenen ESBL dieser Studie, und *bla*<sub>OXA-48</sub> wurde bereits beschrieben (Potron *et al.*, 2013a). Weitere Untersuchungen von Potron *et al.* konnten beiden Gene zusammen in einem Transposon nachweisen (Potron *et al.*, 2013b). *Bla*<sub>CTX-M-15</sub> war dabei mit *ISEcp1* und *bla*<sub>OXA-48</sub> mit *IS1R* assoziiert. Da bei 56,5 % der *bla*<sub>OXA-48</sub> positiven Isolate ebenfalls ein *bla*<sub>CTX-M</sub>-Gen vorhanden war, ist die Präsenz der von Potron *et al.* geschilderten Resistenzgenkassette möglich. Jedoch könnten innerhalb der Human- und Tierisolate noch andere Carbapenemasegene vorhanden sein, die hier nicht getestet worden sind. Interessanterweise wurde das Carbapenemasegen *bla*<sub>OXA-48</sub> nur in der Gruppe der Tierisolate nachgewiesen. Hierbei könnte es sich um ein lokales Phänomen handeln. Eine andere in der Umgebung von Gießen durchgeführte unabhängige Studie hat ebenfalls ESBL-produzierende OXA-48-positive *K. pneumoniae*-Isolate bei Hunden nachweisen können (Stolle *et al.*, 2013). Die OXA-48-positiven Isolate dieser Studie sind zum überwiegenden Teil auch *K. pneumoniae*. Herkunftsort der Isolate beider Studien sind die

---

Kleintierkliniken der JLU Gießen. Möglicherweise handelt es sich hier um einen Ausbruch von OXA-48-tragenden *K. pneumoniae*.

Zwanzig ausgewählte CTX-M-1- und CTX-M-15-produzierende *E. coli*-Isolate von Heimtieren (Hunden, Katzen), stationär aufgenommenen und ambulanten behandelten Patienten wurden eingehender hinsichtlich Verwandtschaft (MLST), Plasmiden und deren Eigenschaften sowie Virulenzeigenschaften untersucht. Ferner wurde ihre phänotypische Virulenz in Infektionsversuchen mit der großen Wachsmotte *Galleria mellonella* getestet.

Der Vergleich des MLST zeigt eine heterogene Population, die mehrere Cluster enthält. Es wurde eine ganze Reihe verschiedener Sequenztypen (STs) beobachtet. Zwischen den Human- und Tierisolaten wurden bezüglich der STs mehrere Überschneidungspunkte festgestellt. Vier STs konnten Isolate aus beiden Gruppen zugeordnet werden (ST10, ST88, ST131 und ST410). Bei Betrachtung der ST-Cluster (STC) zeichnete sich eine noch größere Überlappung ab. So bestanden STC10 und STC23 aus Isolaten von beiden Gruppen. Dies könnte auf einen Austausch zwischen beiden Populationen hinweisen oder darauf, dass sich die ESBL-*E. coli* Populationen bei Menschen und Tieren nicht groß unterscheiden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit anderen Studien, die sich mit dieser Thematik beschäftigen (Overdevest, 2011; Dierikx *et al.*, 2012b). Auch dort wurden ST10, ST88, ST131, ST156 und ST617 bei ESBL-produzierenden *E. coli*-Isolaten von Menschen, Heimtieren und Pferden identifiziert. Abgesehen davon gibt es keine offensichtliche Verbindung zwischen ST, STC und  $\beta$ -Laktamase-Typ/Subtyp. So tragen Isolate die dem gleichen STC angehören, nicht den gleichen CTX-M-Subtyp. Wieler *et al.* postulieren mehrere sich ausbreitende ESBL-*E. coli* STs, die aus verschiedenen Quellen (Menschen, Nutztiere, Heimtieren und Umwelt) isoliert wurden. Dazu gehören die auch in unserer Studie vorhandenen ST10, ST224 und ST131 (Wieler *et al.*, 2011).

Bei Analyse von Verteilung und Anzahl identifizierter Virulenzfaktoren und Virulenz-assoziierten Faktoren (pro untersuchtem Isolat) entfällt eine deutlich höhere Anzahl auf Isolate der phylogenetischen Gruppen B2 und D. Dort wurden im Durchschnitt 19 Virulenzfaktoren gefunden. Bei Isolaten der Gruppen A und B1 liegt die Zahl durchschnittlich identifizierter Virulenzfaktoren mit 7,5 deutlich niedriger. Diese Ergebnisse decken sich mit anderen Studien nach denen Isolate der Gruppen B2/D oft mehr Virulenzfaktoren tragen (Maynard *et al.*, 2004).

Bemerkenswert ist die Präsenz von 4 Isolaten (20 %) die dem ST131 angehören. Möglicherweise handelt es sich hierbei um den, inzwischen weltweit verbreiteten, *E. coli*-Klon B2-O25:H4-ST131, der eine CTX-M-15- $\beta$ -Laktamase produziert (Peirano *et al.*, 2014). Die Zuordnung von Isolat H131 zu dieser Gruppe ist fraglich, da bei diesem Isolat *bla*<sub>CTX-M-1</sub> statt *bla*<sub>CTX-M-15</sub> nachgewiesen wurde. Dennoch zeigen alle 4 Isolate typische Eigenschaften des oben genannten Klons. Dazu zählt unter anderem die Präsenz der nach Rogers *et al.* (Rogers *et al.*, 2010) für diesen Klon typischen Virulenz- bzw. Virulenz-assoziierten Faktoren: *iha* (Adhäsion-Siderophor-Rezeptor), *fimH* (Typ 1 Fimbrien), *sat* (Sezernerter Autotransporter), *kpsM* (Kapselprotein), *fyuA* und *iucA* (Yersiniabacin und Aerobactin), *usp* (*Uropathogenic-specific Protein*), *traJ* (Oberflächenexklusion, begünstigt Serumresistenz) und *malX* (Pathogenitätsinsel-Marker). Zusätzlich zu den oben genannten Faktoren konnten noch die Gene *pic* (Sezernerter Autotransporter), *sitA* (*Periplasmic Iron binding Protein*) und das Hemin Aufnahme-Operon nachgewiesen werden. Damit lässt sich bei den in dieser Studie untersuchten ST131-Isolaten ein eindeutiges Virulenzfaktormuster erkennen. Eine vergleichbare Beobachtung konnte nur bei einem anderen mehrfach vertretenen Sequenztypen (ST10, ST88 und ST410) gemacht werden. Bei den beiden ST410-Isolaten konnte die Virulenzfaktorkombination *fim*-Operon, *iss*, Aerobactin-Operon, *sitA* und *ompA* nachgewiesen werden. Die beiden in dieser *Ph. D.*-Thesis untersuchten Isolate (V161, V210) gehören möglicherweise der klonalen *E. coli* ST410 Linie an (Fischer *et al.*, 2014). Sie zeigen die von López-Cerero *et al.* beschriebenen typischen Eigenschaften. Das ist die Kombination der Resistenzgene *bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *tet(A)*, *catB3* und *aac(6)-Ib-cr*, das Aerobactin-Operon und das *fim*-Operon (López-Cerero *et al.*, 2011).

Die Untersuchung der Human- und Tierisolaten hinsichtlich Plasmidanzahl und -größe sowie Inc-Gruppen erbrachte folgende Ergebnisse. In vielen Fällen konnte zwischen einer bestimmten Inc-Gruppe und einem bestimmten CTX-M-Subtypen eine Vergesellschaftung festgestellt werden. In 5 von 6 Fällen wurde bei *E. coli*-Isolaten, die ein Plasmid der Inc11-Gruppe trugen, auch *bla*<sub>CTX-M-1</sub> nachgewiesen. Dieser Befund bestätigt die Schlussfolgerung einer anderen Studie, wonach Inc11-Plasmide mit der Ausbreitung von CTX-M-1 bei Menschen und Hühner verknüpft zu sein scheinen (Accogli *et al.*, 2013). Bei 4 *bla*<sub>CTX-M-1</sub>-kodierenden Isolaten konnte außerdem die Resistenzgenkombination *bla*<sub>CTX-M-1</sub>/*aadA5*/*dfrA17* nachgewiesen werden. Diese Kombination von Aminoglykosid- und Trimethoprimresistenzgenen konnten bereits von Wang *et al.* auf *bla*<sub>CTX-M-1</sub>-kodierenden Inc11-Plasmiden nachgewiesen werden. Interessanterweise konnte aber nur bei einem der 4

Isolate mit der beschriebenen Resistenzgenkombination ein IncI1-Plasmid detektiert werden. Daher ist nur bei diesem Isolat (V105) die Präsenz eines IncI1-Plasmids mit der von Wang *et al.* beschriebenen Resistenzgenkombination denkbar. Bei den anderen Isolaten liegen höchstwahrscheinlich andere Verhältnisse vor.

Die Inc-Gruppen FIA, FIB und FII konnten in 5 von 6 Fällen bei Isolaten nachgewiesen werden, die auch *bla*<sub>CTX-M-15</sub>-kodierte. Diese Vergesellschaftung wurde zuvor auch schon von Carattoli *et al.* festgestellt (Carattoli *et al.*, 2008). Zusätzlich wurden bei den *bla*<sub>CTX-M-15</sub>-positiven Isolaten häufig *bla*<sub>OXA-1</sub> und *aac(6')-1b-cr* identifiziert. Diese Genkombination wird, hauptsächlich auf Plasmiden der IncF-Gruppe gefunden, was bei den hier untersuchten Isolaten ebenfalls zutreffen würde, da bei allen Isolaten mit der eben genannten Resistenzgenkombination auch IncF gefunden wurde (Carattoli 2009).

IncN-Plasmide wurden nur in der Gruppe der Humanisolate gefunden. Wie in der Literatur beschrieben, wurden IncN-Plasmide bis jetzt bei *E. coli*-Isolaten von Menschen, Nutztieren, Wildvögeln und Pferden nachgewiesen, bei Hunden und Katzen hingegen nur in *K. pneumoniae* und nicht in *E. coli* (Dolejska *et al.*, 2013; Donati *et al.*, 2014). Bei IncN-Plasmiden wurde außerdem eine Vergesellschaftung mit *bla*<sub>CTX-M-1</sub> nachgewiesen (Carattoli, 2009), die mit Daten aus dieser Studie bestätigt wird. Alle Isolate, bei denen IncN identifiziert werden konnte, waren ebenfalls Träger von *bla*<sub>CTX-M-1</sub>.

Zwei von einer Katze und einem Hund isolierte CTX-M-15-positive *E. coli*-Isolate (V161 und V210) trugen zwar Plasmide unterschiedlicher Größe, allerdings konnten bei diesen Isolaten identischen Inc-Gruppen (FIA/FIB/FII) und eine fast identische Resistenzgen-Kombination nachgewiesen werden. Dies deutet auf eine gemeinsame Quelle dieser Plasmide oder auf die Übertragung und Integration der gleichen Resistenzgenkassetten in verwandte Plasmide oder das Chromosom hin.

Obwohl noch andere identische Inc-Gruppen-Kombinationen beobachtet wurden (FIB/FIC/FII/I1: V76, V105, H1; FIA/FIB/FII: V161, V210, V288, H152) unterschieden sich diese deutlich in Resistenzgenmustern und Plasmidgröße. Es wurden keine komplett identischen Plasmide zwischen Mensch und Tier beobachtet, was auf eine Übertragung dieser Plasmide hinweisen würde. Stattdessen repräsentieren alle 20 untersuchten *E. coli*-Isolate 20 verschiedene Resistenzmuster.

In dieser *Ph. D.*-Thesis generierte Daten dokumentieren die Präsenz gleicher Plasmid-kodierter Resistenzgenkombinationen in Human- und Tierisolaten. Diese Tatsache könnte durch Co-Selektion der verantwortlichen Resistenzgene durch verschiedene Antibiotika

erklärt werden (Coque *et al.*, 2008b). Eine häufig in beiden Gruppen auftretende Kombination war *bla*<sub>CTX-M-15</sub>/*bla*<sub>OXA-1</sub>/*aac(6')**lb-cr*. Diese wurde auch schon von anderen Arbeitsgruppen beobachtet (Doumith *et al.*, 2012). In der Literatur wird das Auftreten von ähnlichen Plasmiden bzw. Plasmiden mit ähnlichen Resistenzgenkombinationen mit der Existenz von epidemischen Plasmiden begründet (Carattoli, 2013). Resistenzgene wie *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>VIM-1</sub> oder *bla*<sub>OXA-48</sub> werden häufig über solche epidemische Plasmide verbreitet. Dies führt dazu, dass diese Resistenzgene häufig in genetisch sehr unterschiedlichen Stämmen und in großem geografischen Abstand voneinander identifiziert werden können. Sehr oft gehören epidemische Plasmide zu den am häufigsten auftretenden Plasmid-Familien wie IncI1, IncN oder IncA (Carattoli, 2013). Wird ein Resistenzgen auf einem erfolgreichen Plasmid-Typ integriert, so kann dies entscheidend zu seiner Ausbreitung beitragen. Diese erfolgreichen Plasmide besitzen häufig ein sehr effizientes Konjugationssystem (z. B. IncI1 und IncN), ein breites Wirtsspektrum (z.B. IncA/C) oder die Fähigkeit, *in trans* durch Co-residente Plasmide mobilisiert zu werden. Wenn ein Resistenzgen von einem solchen Plasmid aufgenommen wird, dann steigt die Wahrscheinlichkeit, dass es sich ausbreitet und unter verschiedenen Bedingungen und in unterschiedlichen bakteriellen Wirtsspezies bestehen bleibt, stark an (Carattoli, 2013).

Von den 20 untersuchten Isolaten konnten 12 Isolate nach der Definition von Johnson *et al.* (2005) und Köhler *et al.* (2011) als ExPEC klassifiziert werden. Bei 8 Isolaten (H75, H93, H131, H132, V70, V143, V260, V288) konnten DAEC-, EAEC/EPEC- und ETEC-spezifische Virulenzfaktoren nachgewiesen werden. Allerdings trägt jedes dieser Isolate immer nur einen dieser Faktoren und andere Pathovar-spezifische Faktoren fehlen. Eine Zuordnung zu den genannten Pathovaren ist daher schwierig. Zudem tragen alle 8 Isolate jeweils mehr als 2 Faktoren die sie nach Johnson *et al.* (2005) und Köhler *et al.* (2011) als ExPEC klassifizieren (Johnson *et al.*, 2005; Köhler *et al.* 2011). Im Gegensatz zu den intestinal pathogenen *E. coli* (InPEC), sind extraintestinale pathogene *E. coli* (ExPEC) fakultativ pathogene Erreger, die als Kommensalen in der normalen Darmflora eines Teils der Bevölkerung leben. In den meisten Fällen unterscheiden sie sich phylogenetisch und epidemiologisch eindeutig von InPECs, aber nicht in allen Fällen. Daher ist eine Stammtypisierung nur basierend auf der Detektion von einer begrenzten Anzahl von ExPEC-Virulenz- bzw. Virulenz-assoziierten Faktoren immer mehrdeutig. Vier der oben genannten Isolate (H75, H131, H132, V260) können aber möglicherweise doch der Gruppe der ExPEC zugeordnet werden, da sie auf Grund der bei ihnen nachgewiesenen Virulenzfaktoren und Virulenz-assoziierten Faktoren wahrscheinlich

dem bereits erwähnten *E. coli*- Klon B2 O25:H4 ST131 angehören, der bereits als ExPEC klassifiziert worden ist (Peirano et al., 2014). Bei den restlichen 4 Isolaten ist eine eindeutige Zuordnung zu InPEC oder ExPEC nicht möglich.

Alle 20 Isolate besaßen ein individuelles Virulenzfaktormuster und repräsentierten 20 verschiedene Kombinationen der untersuchten Virulenzfaktoren bzw. Virulenz-assoziierten Faktoren. Nur einige Gene waren jeweils auf die Gruppe der Human- (*lpf*, *hra*, *H7 flic*, *F1845*) bzw. Tierisolate (*bmaE*, *eatA*, *ibeA*) beschränkt. Gene bzw. Operons die für den Eisenstoffwechsel benötigt werden (Aerobactin-Operon, Yersiniabactin-Operon, Hemin Aufnahme-Operon, *sitA*) bzw. Serumresistenz vermitteln (*iss*, *traJ*, *ompT*), waren in beiden Gruppen oft vertreten (Eisenstoffwechsel: 50 % der Humanisolate, 100 % der Tierisolate; Serumresistenz: 70 % der Humanisolate, 80 % der Tierisolate). Diese Faktoren sind nach Köhler *et al.* (2011) typisch für ExPECs. Wie bereits beschrieben wurden Kombinationen bestimmter Virulenzfaktoren bei Isolaten des ST131 und ST410 beobachtet.

Die phänotypische Virulenz der Isolate wurde in einem Modell mit der großen Wachsmotte *G. mellonella* überprüft. Das Immunsystem von *G. mellonella* ist dem angeborenen Immunsystem von Vertebraten sehr ähnlich und hat homologe Eigenschaften wie humorale und zelluläre Abwehrmechanismen. Hämocyten von Insekten phagozytieren und töten Krankheitserreger durch die Produktion von Superoxid genauso wie neutrophile Granulozyten von Säugetieren (Hoffmann, 1995). Diese Eigenschaft macht sie zu einem idealen Modellorganismus zur Beurteilung von bakteriellen Infektionen bei Neugeborenen, Frühgeborenen und immunsupprimierten Patienten. Gerade diese Patientengruppen sind immer häufiger der Gefahr von nosokomialen Infektionen mit multiresistenten Erregern, insbesondere ESBL-Produzenten, ausgesetzt (Gesundheitsberichterstattung des Bundes, 2002). Daher wurde in dieser *Ph. D.*-Thesis die Virulenz ESBL-produzierender *E. coli*-Isolate untersucht. Ziel der Versuche war es Faktoren zu identifizieren, die für einen stärkeren larviziden Effekt verantwortlich sind d. h. eine höhere Virulenz zeigen.

Zunächst wurde versucht die Zahl der Virulenz- bzw. Virulenz-assoziierten Faktoren mit dem beobachteten larviziden Effekt in *G. mellonella* zu korrelieren. Die Annahme war, dass Isolate mit mehr Virulenz- bzw. Virulenz-assoziierten Faktoren auch einen stärkeren larviziden Effekt haben, da dies bereits in einer anderen Studie propagiert wurde. Laut Williamson *et al.* sind Isolate mit einer hohen Virulenzfaktoranzahl in der Lage *G. mellonella*-Larven schneller und in größerer Zahl zu töten. Diese Annahme konnte in der vorliegenden *Ph. D.*-Thesis nicht bestätigt werden. Einige Isolate mit vielen Virulenzfaktoren waren in der Lage

die infizierten Larven innerhalb der ersten 24 h zu töten. Ein Teil der Isolate die weniger Virulenzfaktoren tragen, zeigten auch einen geringeren larviziden Effekt. Allerdings konnten in beiden genannten Gruppen auch Ausnahmen beobachtet werden. So töteten einige Isolate mit wenig Virulenzfaktoren die Larven innerhalb von 24 h, wohingegen einige Isolate mit vielen Virulenzfaktoren keinen larviziden Effekt zeigten.

In einem weiteren Ansatz wurde mit Hilfe der Cox-Regression versucht Parameter zu identifizieren die für einen höheren larviziden Effekt verantwortlich sind. Dabei konnten die Parameter Präsenz eines Toxingens (*astA*), die Präsenz der Genkombination *sitA/iucA/iss*, Zugehörigkeit zu ST131 und die Gene *lpfA* sowie *traJ* als entscheidende Faktoren identifiziert werden. Gallerien, die mit Isolaten infiziert wurden, die die Genkombination *sitA/iucA/iss* aufweisen, verstarben mit einem 220 % höheren Risiko, als ohne die Kombination. Trägt ein Isolat ein Toxinogen, dann versterben die Gallerien mit einem 1,6-mal höheren Risiko. Die Präsenz des Gens *lpfA* erhöht das Risiko um das 2,9-fache, während das Vorhandensein von *traJ* das Risiko zu Versterben um das 3-fache erhöht. Die Zugehörigkeit zu ST131 (HR = 0,51) hingegen senkt das Risiko zu versterben.

Der bei den Isolaten H44, H75, V105, K12 MG1655 beobachtete geringe larvizide Effekt kann bei fast allen Isolaten erklärt werden. Bei Isolat H44 wurde keiner der oben genannten Risikofaktoren (Toxingen, Genkombination *sitA/iucA/iss*, *lpf*, *traJ*) nachgewiesen. Das Isolat V105 trägt nur die Gene *sitA* und *iucA*, aber kein *iss*. Bei dem *E. coli* K12 MG 1655 wurde dagegen nur das Gen für erhöhte Serumresistenz *iss* nachgewiesen. Lediglich die Ergebnisse für Isolat H75 sind überraschend. Dieses Isolat gehört dem ST131 an und trägt die Genkombination *sitA/iucA/iss*. Dennoch lag der larvizide Effekt bei 0 %. Dieser Umstand und die geringe Isolatanzahl bedingen wahrscheinlich die HR von 0,51 für die Zugehörigkeit zu ST131. Diese sagt aus, dass Isolate die zu ST131 gehören ein geringeres Risiko zu versterben haben. Diese Ergebnisse widersprechen aber den anderen 3 ST131 Isolaten, die alle Larven innerhalb von 24 h töten. Der nicht vorhandene larvizide Effekt könnte verschiedene Ursachen und im Folgenden werden einige der möglichen Gründe diskutiert. In dieser Studie wurde ein Gen als vorhanden definiert, wenn auf DNA-Sequenzebene eine Identität von mehr als 98 % bestand. Die Möglichkeit einer Genmutation mit anschließender Funktionslosigkeit der untersuchten Gene kann daher nicht ausgeschlossen werden. Dieser Umstand könnte den fehlenden larviziden Effekt erklären. Eine andere Erklärung könnte ein Unterschied zu den anderen ST131-Isolaten bieten. Im Gegensatz zu den Isolaten H131, H132 und V260 fehlen H75 die *afa/dr*-Adhäsine. Die Familie der *afa/dr*-Adhäsine ist nach den

P- und Typ-1-Fimbrien die am dritthäufigsten beobachtete Gruppe von Kolonisationsfaktoren unter uropathogenen *E. coli* (Nowicki *et al.*, 2001; Pichon *et al.*, 2013). Afa/dr-Adhäsine befähigen *E. coli* zur Invasion von HeLa-Epithelzellen (Nowicki *et al.*, 2001) und zur Bindung an neutrophile Granulozyten. Die Mutation dieser Adhäsine führte im Gegensatz zu der Mutation von P- und Typ- 1- Fimbrien zu einem deutlichen Überlebensvorteil. Die Wirkung der afa/dr-Adhäsine wurde bisher nicht im *G. mellonella*-Modell getestet. Allerdings konnten Mil-Homens *et al.* einen ähnlichen Effekt bei einer *Burkholderia cenocepacia* Mutante, die nicht in der Lage war, *Trimeric Autotransporter Adhesins* (TAAs) zu exprimieren, in *G. mellonella* beobachten (Mil-Homens *et al.*, 2012). Die TAAs werden von vielen Gram-negativen Erregern exprimiert und sind Schlüsselfaktoren für Anheftung und Invasion von Wirtszellen. Damit sind sie der Funktion von afa/dr-Adhäsinen sehr ähnlich. Der larvizide Effekt in *G. mellonella* war bei den TAA-Mutanten deutlich abgeschwächt. Eventuell könnte das Isolat H75 durch das Fehlen der afa/dr-Adhäsine effektiv von der Abwehr der *G. mellonella*-Larven identifiziert und bekämpft werden.

In den Isolaten H92, H115, H132 wurde ein hoher larvizider Effekt beobachtet, obwohl sie keinen der Risikofaktoren tragen. Isolat H132 trägt nur die Kombination *sitA/iucA* und kein *iss* kodiert viele andere Virulenzfaktoren. Es ist sehr wahrscheinlich, dass andere Faktoren für den hohen larviziden Effekt verantwortlich sind. So kodiert das H132 viele Faktoren die für die Eisenakquirierung verantwortlich sind wie das Yersinibactin-Operon und das *chuA*-Operon. Diese Faktoren werden bei ExPEC traditionell als Virulenz-assoziierte Faktoren betrachtet (Johnson *et al.*, 2005; Köhler *et al.*, 2011). Für die Isolate H92 und H115 lässt sich keine befriedigende Erklärung finden. Beide Isolate tragen nur wenige der hier getesteten Virulenzfaktoren. Das lässt vermuten, dass der hohe larvizide Effekt durch Faktoren ausgelöst wird, die in dieser Studie nicht untersucht worden sind.

Insgesamt bietet das *G. mellonella*-Modell eine gute Möglichkeit die Virulenz extraintestinal pathogener ESBL-*E. coli* zu beurteilen. Möglichweise konnten Risikofaktoren (Präsenz eines Toxingens, der Genkombination *sitA/iucA/iss*, des Gens *lpfA* oder des Gens *traJ*) gefunden werden, die eine Vorhersage über die phänotypische Virulenz eines Isolates zulassen. Diese Vermutung lässt sich nur mit weiterführenden Experimenten bestätigen. Zunächst muss eine größere Anzahl von Isolaten auf die Präsenz der gefunden Risikofaktoren durchgemustert und die Isolate anschließend im *G. mellonella*-Modell getestet werden. Allerdings beruht der larvizide Effekt höchstwahrscheinlich nicht immer nur auf den identifizierten Risikofaktoren, sondern auch auf anderen hier nicht untersuchten oder noch nicht bekannten Faktoren.

Das Vorteil dieses Verfahrens ist die direkte Testung der Isolate in einem *in-vivo*-Modell. Diese Bedingungen können *in-vitro* nicht in ausreichendem Maße simuliert werden. Das Verhalten des Isolates in der Larve kann eine bessere Einschätzung des Verhaltens während einer Infektion in Mensch oder Säugetier liefern. Ein Abfragen möglicherweise relevanter Virulenzfaktoren per PCR oder Genomsequenzierung kann diesen Hinweis nicht erbringen. Wie in dieser Studie gezeigt kann die gleichzeitige Durchführung beider Methoden zur Identifizierung von Risikofaktoren dienen die für einen stärkeren larviziden Effekt bei *G. mellonella* verantwortlich sind. In Zukunft können diese Erkenntnisse dann für die Übertragung auf ein Vertebratentiermodell (z. B. Maus) hilfreich sein und die Beurteilung von ESBL-ExPEC-Infektionen beim Menschen erleichtern.

### Schlussfolgerungen

Eine Beurteilung hinsichtlich der immer wieder beschriebenen möglichen Übertragung von ESBL-kodierenden *Enterobacteriaceae* zwischen Menschen und Tieren bleibt schwierig. Zwar wurden in beiden Populationen die gleichen Resistenzgene ( $bla_{CTX-M-1}$ ,  $bla_{CTX-M-15}$ ,  $bla_{TEM-1}$ ,  $bla_{OXA-1}$ ) in ähnlicher Häufigkeit identifiziert und auch die untersuchten Plasmide zeigen ähnliche Eigenschaften (Inc-Typen, Resistenzgene). Allerdings wurden keine identischen Plasmide zwischen Mensch und Tier gefunden, was ein starkes Indiz für eine Übertragung zwischen beiden Populationen wäre. Weitere Studien sollten sich daher auf die Übertragungswege fokussieren, um den möglichen Austausch zwischen Menschen- und Tierpopulationen zu erforschen. Um diesen Aspekt näher zu untersuchen wäre in Zukunft eine gleichzeitige Untersuchung von Haustieren/Nutztieren und/oder Besitzern, die positiv für ESBL-produzierende *Enterobacteriaceae* sind, sinnvoll. Wenn in diesem Zusammenhang identische Isolate bzw. Plasmide gefunden würden, dann wäre dies ein Beweis für eine Übertragung. Eine solche Übertragung ähnlicher Plasmide von Mensch- zu Tierbakterienpopulationen und umgekehrt konnte bei Masthähnchen und Landwirten in den Niederlanden bereits gezeigt werden (Dierikx *et al.*, 2012a) und deutet darauf hin, dass eine ähnliche Situation auch zwischen Haustier und seinem Besitzer existieren könnte. Da die hier betrachteten Resistenzgene überwiegend Plasmid-kodiert sind, ist es sinnvoll sich weiterhin besonders auf diese zu konzentrieren. Insbesondere die mögliche Präsenz der von Caratolli propagierten epidemischen Plasmide sollte untersucht werden.

Weitere Aspekte wie Kolonisierung und Persistenz in Mensch, Tier und Umwelt, sowie die Adaption an bestimmte Wirte und Übertragung zwischen verschiedenen Bakterienspezies

müssen ebenfalls bei der zukünftigen Untersuchung der Resistenz-tragenden Elemente bzw. Bakterien berücksichtigt werden. Multiresistente Bakterien werden mit steigenden Frequenzen aus Boden- oder Wasserproben und Proben von Wildtieren isoliert (Hartmann *et al.*, 2012). Einige Studien bezeichnen ESBL-produzierende *E. coli* bereits als eine Form der Umweltverschmutzung (Guenther *et al.*, 2011).

Auch wenn zwischen den Human- und Tierisolaten bezüglich der STs mehrere Überschneidungspunkte festgestellt worden sind, gibt es keine offensichtliche Verbindung zwischen ST, STC und  $\beta$ -Laktamase-Typ/Subtyp. So tragen Isolate die dem gleichen STC angehören, nicht den gleichen CTX-M-Subtyp, was gegen eine Übertragung von Bakterienstämmen spricht, aber nicht gegen den möglichen Austausch von Resistenzgen-tragenden mobilen genetischen Elementen. Die einzige Ausnahme bilden Isolate die dem ST131 angehören. Bei den ST131-Isolaten dieser *Ph.D*—Thesis wurden viele Gemeinsamkeiten hinsichtlich der gefundenen Virulenzgene bzw. Virulenz-assoziierten Faktoren festgestellt. Da viele dieser Faktoren chromosomal kodiert sind, handelt es sich wahrscheinlich um den gleichen ST131-Klon. Die Daten zur Virulenz bzw. zu Virulenz-assoziierten Faktoren ESBL-produzierender *E. coli* sind beunruhigend. Zwölf der eingehender untersuchten 20 Isolate konnten als ExPEC klassifiziert werden, wenn auch mit deutlichen Unterschieden hinsichtlich der Anzahl der Virulenzgene bzw. Virulenz-assoziierten Faktoren. Alle 20 Isolate besaßen ein individuelles Virulenzfaktormuster und repräsentierten 20 verschiedene Kombinationen der untersuchten Virulenzfaktoren bzw. Virulenz-assoziierten Faktoren was wiederum gegen einen Austausch zwischen Mensch und Tier spricht. Gleichwohl war die Mehrzahl der Isolate aber in der Lage *G. mellonella*-Larven innerhalb von 24 h zu töten. Dieser Umstand betont die Gefahr, die insbesondere für Personen mit einem schwachen oder noch nicht entwickelten Immunsystem, von ESBL-produzierenden Isolaten ausgehen kann.

## 6 Zusammenfassung

Die Ergebnisse aus dieser Studie untermauern das alarmierende Auftreten und die zunehmende Verbreitung von verschiedenen ESBL-produzierenden, multiresistenten *Enterobacteriaceae*-Stämmen in der Human- und Tierpopulation in der geografischen Region Mittelhessen in Deutschland. Dieser Umstand zeigt sich unter anderem in sehr ähnlichen Resistenzmustern und in beiden Gruppen gefundenen  $\beta$ -Laktamase- und PMQR-Genen. Die häufigsten Bakterienarten in dieser Studie waren *E. coli* (73,8 %) und *K. pneumoniae* (17,7 %). Die Untersuchung der phylogenetischen Gruppen der *E. coli*-Isolate ergab eine Unterrepräsentation der Gruppe B2 innerhalb der Tierisolate. In dieser Studie wurden 83,6 % der Humanisolate (n = 183) und 90,3 % der tierischen Isolate (n = 207) als Träger von ESBL-Genen durch PCR und anschließende Sequenzierung der Amplikons bestätigt. Vorherrschende ESBL-Subtypen in beiden Populationen waren CTX-M-15 (49,5 %) und CTX-M-1 (25,4 %). Der Subtyp *bla*<sub>CTX-M-2</sub> wurde fast ausschließlich in Pferde- und nicht in Humanisolaten gefunden. Die Carbapenemase OXA-48 wurde in dieser Studie in 23 Ertapenem-resistenten *K. pneumoniae* und *Enterobacter cloacae* Tierisolaten nachgewiesen. Mit einer Nachweisrate von 27,9 % der Ciprofloxacin-resistenten Humanisolate und 35,5 % der Ciprofloxacin-resistenten Tierisolate war *aac*(6)-*Ib-cr* das am häufigsten identifizierte PMQR-Gen. Kombinationen von 2 bis zu 6 verschiedenen Resistenzgenen (Penicillinasen, ESBL und PMQR) wurden in 70 % aller untersuchten Isolate nachgewiesen. Plasmide wurden bei 95 % der eingehender charakterisierten Isolate (n = 20) nachgewiesen und die Inc-Gruppen FIA, FIB, FIC, FII, I1 und N identifiziert, wobei das Vorkommen von IncN auf die Humanisolate beschränkt war. Insgesamt konnten bei den untersuchten Plasmid-assoziierten Sequenzen acht verschiedene Resistenzgenklassen detektiert und eine Assoziation der Gene *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub> und *aac*(6)-*Ib-cr* festgestellt werden. Zwölf der 20 Isolate wurden als extraintestinal-pathogene *E. coli* (ExPEC) klassifiziert, wobei eine Kumulation von Virulenz- und Virulenz-assoziierten Faktoren bei den phylogenetischen Gruppen B2 und D zu beobachten war. Die Kombination von Genomsequenzierung und einem *in-vivo* Virulenzmodell (*G. mellonella*) konnte einige Risikofaktoren für einen höheren larviziden Effekt identifizieren (Präsenz eines Toxingens, Präsenz der Genkombination *sitA/iucA/iss*, Präsenz der Gene *lpfA* und *traJ*).

## 7 Literaturverzeichnis

- Abraham, JM; Freitag, CS; Clements, JR; Eisenstein, BI (1985): **An invertible element of DNA controls phase variation of type 1 fimbriae of *Escherichia coli***. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82(17), S. 5724-5727.
- Accogli, M; Fortini, D; Giufrè, M; Graziani, C; Dolejska, M; Carattoli, A; Cerquetti, M (2013): **Incl1 plasmids associated with the spread of CMY-2, CTX-M-1 and SHV-12 in *Escherichia coli* of animal and human origin**. *Clin Microbiol Infect.* 19(5), S. 238-240.
- Alexander, TJL (1994): **Neonatal diarrhea in pigs in *Escherichia coli* in domestic animals and humans**. in CL Gyles, ed. Wallingford. U.K.: CAB International, S. 151 – 170.
- Ambler, RP (1980): **The Structure of  $\beta$ -Lactamases**. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 289(1036), S. 321–331.
- Bankevich, A; Nurk, S; Antipov, D; Gurevich, AA; Dvorkin, M; Kulikov, AS; Lesin, VM; Nikolenko, SI; Pham, S; Pribelski, AD; Pyshkin, AV; Sirotkin, AV; Vyahhi, N; Tesler, G; Alekseyev, MA; Pevzner, PA (2012): **SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing**. *J Comput Biol.* 19(5), S. 455-477.
- Barton, BM; Harding, GP; Zuccarelli, AJ (1995): **A general method for detecting and sizing large plasmids**. *Anal Biochem.* 226(2), S. 235-240.
- Bauernfeind, A; Grimm, H; Schweighart, S (1990): **A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli***. *Infection.* 18(5), S. 294–298.
- Berman, H; Barberino, MG; Moreira, ED; Riley, L; Reis, JN (2014): **Distribution of strain type and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* causing meningitis in a large urban setting in Brazil**. *J Clin Microbiol.* 52(5). S. 1418-1422.
- Beutin, L (1999) ***Escherichia coli* as a pathogen in dogs and cats**. *Vet Res* 30(2-3), S. 285-298.
- Bidaisee, S; Macpherson, CNL (2014): **Zoonoses and One Health: A Review of the Literature**. *J Parasitol Res.* 2014:874345
- Billard-Pomares, T; Fouteau, S; Jacquet, ME; Roche, D3; Barbe, V; Castellanos, M; Bouet, JY; Cruveiller, S; Médigue, C; Blanco, J; Clermont, O; Denamur, E; Branger, C (2014): **Characterization of a P1-like bacteriophage carrying an SHV-2 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase from an *Escherichia coli* strain**. *Antimicrob Agents Chemother.* 58(11), S. 6550-6557.
- Bradford, PA (2001): **Extended-Spectrum -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat**. *Clin Microbiol Rev* 14(4), S. 933–951.
- Brown-Jaque, M; Calero-Cáceres, W; Muniesa, M (2015): **Transfer of antibiotic-resistance genes via phage-related mobile elements**. *Plasmid.* 79, S. 1-7.
- Burke, L; Hopkins, KL; Meunier, D; de Pinna, E; Fitzgerald-Hughes, D; Humphreys, H; Woodford, N (2013): **Resistance to third-generation cephalosporins in human non-typhoidal *Salmonella enterica* isolates from England and Wales, 2010-12**. *J Antimicrob Chemother.* 69(4), S. 977-981.
- Bush, K; Jacoby, GA (2010): **Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases**. *Antimicrob Agents Chemother.* 54(3), S. 969–976.
- Bush, K; Jacoby, GA; Medeiros, AA (1995): **A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure**. *Antimicrob Agents Chemother.* 39(6), S. 1211–1233.
- Calistri, P; Iannetti, S; L. Danzetta, M; Narcisi, V; Cito, F; Di Sabatino, D; Bruno, R; Sauro, F; Atzeni, M; Carvelli, A; Giovannini, A (2013): **The Components of ‘One World - One Health’ Approach**. *Transbound Emerg Dis* 60, S. 4–13.

- Campbell, NA; Reece, JB; Kratochwil, A (2009): **Biologie**. (8. Aufl.)
- Cantón, R; Coque, TM (2006): **The CTX-M  $\beta$ -lactamase pandemic**. *Curr Opin Microbiol*. 9(5), S. 466-475.
- Cantón, R; González-Alba, JM; Galán, JC (2012): **CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion**. *Front Microbiol*. 3:110.
- Carattoli, A; Bertini, A; Villa, L; Falbo, V; Hopkins, KL; Threlfall, EJ (2005): **Identification of plasmids by PCR-based replicon typing**. *J Mikrobiol Methods* 63(3), S. 219–228.
- Carattoli, A; Garcia-Fernandez, A; Varesi, P; Fortini, D; Gerardi, S; Penni, A; Mancini, C; Giordano, A (2008): **Molecular Epidemiology of *Escherichia coli* Producing Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases Isolated in Rome, Italy**. *J Clin Microbiol* 46(1), S. 103–108.
- Carattoli, A (2013): **Plasmids and the spread of resistance**. *Int J Med Microbiol* 303(6-7), S. 298–304.
- Carattoli, A; Zankari, E; Garcia-Fernandez, A; Volby Larsen, M; Lund, O; Villa, L; Aarestrup, FM; Hasman, H (2014): **PlasmidFinder and pMLST: in silico detection and typing of plasmids**. *Antimicrob Agents Chemother*. 58(7), S. 3895-3903.
- Caroff, N; Espaze, E; Gautreau, D; Richet, H; Reynaud, A (2000): **Analysis of the effects of -42 and -32 ampC promoter mutations in clinical isolates of *Escherichia coli* hyperproducing AmpC**. *J Antimicrob Chemother* 45(6), S. 783–788.
- Centers for disease prevention and control (CDC) (2013): <http://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/index.html>
- Clermont, O; Bonarossi, S; Bingen, E (2000): **Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group**. *Appl Environ Microbiol* 66(10), S. 4555–4558.
- Clermont, O; Christenson, JK; Denamur, E; Gordon, DM (2013) **The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups**. *Environ Microbiol Rep*. 5(1), S. 58-65.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (CLSI) (2005): **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**.
- Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (2012) Antimicrobial Susceptibility Testing Standards Dokument M100
- Cold Spring Harbor Laboratory Press (1982): **A Laboratory Manual**.
- Collis, CM; Hall, RM (1995): **Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons**. *Antimicrob Agents Chemother* 39(1), S. 155–162.
- Collis, CM; Kim, MJ; Partridge, SR; Stokes, HW; Hall, RM (2002): **Characterization of the Class 3 Integron and the Site-Specific Recombination System It Determines**. *J Bacteriol* 184(11), S. 3017–3026.
- Coque, TM; Baquero, F; Canton, R (2008a): **Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe**. *Euro Surveill*. 13(47). pii: 19044.
- Coque, TM; Novais, A; Carattoli, A; Poirel, L; Pitout, J; Peixe, L; Baquero, F; Cantón, R; Nordmann, P (2008b): **Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15**. *Emerg Infect Dis*. 14(2), S. 195-200.
- Corkill, JE (2005): **High prevalence of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant qnrA in multidrug-resistant Enterobacteriaceae from blood cultures in Liverpool, UK**. *J Antimicrob Chemother*. 56(6), S. 1115–1117.
- Daniels, NA (2006): **Enterotoxigenic *Escherichia coli*: Traveler's Diarrhea Comes Home**. *Clin Infect Dis* 42(3), S. 335-336.

- Dho-Moulin, M; Fairbrother, JM (1999): **Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC)**. *Vet Res.* 30(2-3), S. 299-316.
- Di Guilmi, AM; Dessen, A; Dideberg, O; Vernet, T (2003): **The Glycosyltransferase Domain of Penicillin-Binding Protein 2a from *Streptococcus pneumoniae* Catalyzes the Polymerization of Murein Glycan Chains**. *JBacteriol* 185(15), S. 4418–4423.
- Dierikx, C; van der Goot, J; Fabri, T; van Essen-Zandbergen, A; Smith, H; Mevius, D (2012a): **Extended-spectrum- $\beta$ -lactamase- and AmpC- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in Dutch broilers and broiler farmers**. *J Antimicrob Chemother.* 68(1), S. 60–67.
- Dierikx, C; van Duijkeren, E; Schoormans, AHW; van Essen-Zandbergen, A; Veldman, K; Kant, A *et al.* (2012b): **Occurrence and characteristics of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase- and AmpC-producing clinical isolates derived from s and horses**. *J Antimicrob Chemother.* 67(6), S. 1368–1374.
- Dolejska, M; Villa, L; Hasman, H; Hansen, L; Carattoli, A (2013): **Characterization of IncN plasmids carrying blaCTX-M-1 and qnr genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* from animals, the environment and humans**. *J Antimicrob Chemother.* 68(2), S. 333–339.
- Domingues, S; da Silva, GJ; Nielsen, KM (2012) **Integrans: Vehicles and pathways for horizontal dissemination in bacteria**. *Mob Genet Elements.* 2(5), S. 211-223.
- Donati, V; Feltrin, F; Hendriksen, RS; Svendsen, Christina A; Cordaro, G; García-Fernández, A; Lorenzetti, S; Lorenzetti, R; Battisti, A; Franco, A1 (2014): **Extended-Spectrum-Beta-Lactamases, AmpC Beta-Lactamases and Plasmid Mediated Quinolone Resistance in *Klebsiella* spp. from Companion Animals in Italy**. *PLoS ONE* 9(3), e90564.
- Doumith, M; Dhanji, H; Ellington, MJ; Hawkey, P; Woodford, N (2012): **Characterization of plasmids encoding extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and their addiction systems circulating among *Escherichia coli* clinical isolates in the UK**. *J Antimicrob Chemother.* 67(4), S. 878–885.
- Drawz, SM; Bonomo, RA (2010) **Three decades of beta-lactamase inhibitors**. *Clin Microbiol Rev.* 23(1), S. 160-201.
- Drieux, L; Brossier, F; Sougakoff, W; Jarlier, V (2008): **Phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide**. *Clin Microbiol Infect.* 14 Suppl 1, S. 90-103.
- Drlica, K (1999): **Mechanism of fluoroquinolone action**. *Cur Opin mikrobiol.* 2(5), S. 504-508.
- Du, B; Long, Y; Liu, H (2002): **Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection: risk factors and clinical outcome**. *Intensive Care Med.* 28(12), S. 1718–1723.
- European center for disease prevention and control (ECDC) (2012): **Antibiotic resistance surveillance in Europe 2012**.
- European committee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST) (2012): **EUCAST 2012 breakpoint table v 2.0**. <http://www.eucast.org/>
- Ewers, C; Bethe, A; Semmler, T; Guenther, S; Wieler, LH (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), S. 646–655.
- Ewers, C; Grobbel, M; Stamm, I; Kopp, PA; Diehl, I; Semmler, T *et al.* (2010): **Emergence of human pandemic O25:H4-ST131 CTX-M-15 extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* among companion animals**. *J Antimicrob Chemother.* 65(4), S. 651–660.
- Ferreira, JC; Penha Filho, RAC; Andrade, LN; Berchieri, A; Darini, ALC; Cutler, S (2014): **Detection of chromosomal blaCTX-M-2 in diverse *Escherichia coli* isolates from healthy broiler chickens**. *Clin Microbiol Infect.* 20(10), S. 623-626.

- Fischer, J; Rodriguez, I; Schmoger, S; Friese, A; Roesler, U; Helmuth, R; Guerra, B (2013): **Salmonella enterica subsp. enterica producing VIM-1 carbapenemase isolated from livestock farms.** *J Antimicrob Chemother.* 68(2), S. 478–480.
- Fischer, J; Rodríguez, I; Baumann, B; Guiral, E; Beutin, L; Schroeter, A1; Kaesbohrer, A; Pfeifer, Y; Helmuth, R; Guerra, B (2014): **blaCTX-M<sub>15</sub>-carrying Escherichia coli and Salmonella isolates from livestock and food in Germany.** *J Antimicrob Chemother.* 69(11), S. 2951-2958.
- Forth, W; Aktories, K (2005): **Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.** (9. Aufl.)
- Frey, HH (2002): **Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin.** (2. Aufl.)
- Gaschignard, J; Levy, C; Bingen, E; Cohen, R (2012): **Épidémiologie des méningites néonatales à Escherichia coli.** *Arch Pediatr.* 19 Suppl 3, S. 129-134.
- GENE-E (12.05.2014): <http://www.broadinstitute.org/cancer/software/GENE-E/>
- Geser, N; Stephan, R; Hächler, H (2012): **Occurrence and characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae in food producing animals, minced meat and raw milk.** *BMC Vet Res* 8 (1), S. 21.
- Gesundheitsberichterstattung des Bundes (2002): **Nosokomiale Infektionen.** Heft Nr. 8
- Grobner, S; Linke, D; Schutz, W; Fladerer, C; Madlung, J; Autenrieth, IB; Witte, W; Pfeifer, Y (2009): **Emergence of carbapenem-non-susceptible extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Klebsiella pneumoniae isolates at the university hospital of Tübingen, Germany.** *J Med Microbiol* 58(7), S. 912–922.
- Guan, X; Xue, X; Liu, Y; Wang, J; Wang, Y; Wang, J; Wang, K; Jiang, H; Zhang, L; Yang, B; Wang, N; Pan, L (2013): **Plasmid-mediated quinolone resistance--current knowledge and future perspectives.** *J Int Med Res.* 41(1), S. 20-30
- Guenther, S; Ewers, C; Wieler, LH (2011): **Extended-Spectrum Beta-Lactamases Producing E. coli in Wildlife, yet Another Form of Environmental Pollution?** *Front. Microbio.* 2:246.
- Ha, YE; Kang, CI; Cha, MK; Park, SY; Wi, YM; Chung, DR; Peck, KR; Lee, NY; Song, JH. (2013): **Epidemiology and clinical outcomes of bloodstream infections caused by extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Escherichia coli in patients with cancer.** *Int J Antimicrob Agents.* 42(5), S. 403–409.
- Hall, RM; Collis, CM (1995): **Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination.** *Mol Microbiol.* 15(4), S. 593–600.
- Hartmann, A; Locatelli, A; Amoureux, L; Depret, G; Jolivet, C; Gueneau, E; Neuwirth, C (2012): **Occurrence of CTX-M Producing Escherichia coli in Soils, Cattle, and Farm Environment in France (Burgundy Region).** *Front. Microbio.* 3:83.
- Hayes, F (2003): **Transposon-based strategies for microbial functional genomics and proteomics.** *Annu Rev Genet.* 37:3-29.
- Hoffmann, JA (1995): **Innate immunity of insects.** *Curr Opin Immunol.* 7 (1), S. 4–10.
- Hordijk, J; Schoormans, A; Kwakernaak, M; Duim, B; Broens, E; Dierikx, C *et al.* (2013): **High prevalence of fecal carriage of extended spectrum  $\beta$ -lactamase/AmpC-producing Enterobacteriaceae in cats and dogs.** *Front. Microbiol.* 3:83.
- Imberechts, H; De Greve, H; Lintermans, P (1992) **The pathogenesis of edema disease in pigs. A review.** *Vet Microbiol.* 31(2-3), S. 221-33.
- Jacoby, GA (2005): **Mechanisms of Resistance to Quinolones.** *Clin Infect Dis.* 41(2), S.120-126.
- Jacoby, G; Cattoir, V; Hooper, D; Martínez-Martínez, L; Nordmann, P; Pascual, A; Poirel, L; Wang, M (2008): **qnr Gene nomenclature.** *Antimicrob Agents Chemother.* 52(7), S. 2297-2299.
- Jacoby, GA (2009): **AmpC  $\beta$ -Lactamases.** *Clin Microbiol Rev* 22(1), S. 161–182.

- Johns, I; Verheyen, K; Good, L; Rycroft, A (2012): **Antimicrobial resistance in faecal *Escherichia coli* isolates from horses treated with antimicrobials: A longitudinal study in hospitalised and non-hospitalised horses.** *Vet Microbiol* 159 (3-4), S. 381–389.
- Johnson, JR; Skubitz, KM; Nowicki, BJ; Jacques-Palaz, K; Rakita, RM (1995): **Nonlethal adherence to human neutrophils mediated by Dr antigen-specific adhesins of *Escherichia coli*.** *Infect Immun.* 63(1), S. 309-316.
- Johnson, JR; Gajewski, A; Lesse, AJ; Russo, TA (2003) **Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* as a Cause of Invasive Nonurinary Infections.** *J Clin Microbiol.* 41(12), S. 5798-5802
- Joint Working Group of DARC and ARHAI (2012): **ESBL - A threat to human and animal health?** <https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads>
- Jones, GLL; Warren, RE; Skidmore, SJ; Davies, VA; Gibreel, T; Upton, M (2008): **Prevalence and distribution of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical isolates of *Escherichia coli* lacking extended-spectrum  $\beta$ -lactamases.** *J Antimicrob Chemother.* 62(6), S. 1245–1251.
- Kaper, JB; Nataro, JP; Mobley, HLT (2004): **Pathogenic *Escherichia coli*.** *Nat Rev Microbiol* 2, 2(2), S. 123-140
- Kayser, FH (2010): **Medizinische Mikrobiologie. Taschenlehrbuch.** (12. Aufl.)
- Kletting, P; Glatting, G (2009): **Model selection for time-activity curves: the corrected Akaike information criterion and the F-test.** *Z Med Phys.* 19(3), S. 200-206.
- Kohlrausch, U; Holtje, JV (1991): **Analysis oh murein and murein precursors during antibiotic-induced lysis of *Escherichia coli*.** *J Bacteriol.* 173(11), S. 3425–3431.
- Köhler, CD; Dobrindt, U (2011): **What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*?** *Int J Med Microbiol.* 301(8), S. 642–647.
- Lahey Clinic clinic (27.11.2014): <http://www.lahey.org/Studies/>.
- Lecointre, G., Rachdi, L., Darlu, P., and Denamur. E. (1998): ***Escherichia coli* molecular phylogeny using the incongruence length difference test.** *Mol Biol Evol.* 15(12), S. 1685-95.
- Leuko, S; Raivio, TL (2012): **Mutations That Impact the Enteropathogenic *Escherichia coli* Cpx Envelope Stress Response Attenuate Virulence in *Galleria mellonella*.** *Infect Immun.* 80(9), S. 3077–3085.
- Li, XZ; Ma, D; Livermore, DM; Nikaido, H (1994): **Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: active efflux as a contributing factor to beta-lactam resistance.** *Antimicrob Agents Chemother.* 38(8), S. 1742–1752.
- Livermore, DM (2005): **CTX-M: changing the face of ESBLs in the UK.** *J Antimicrob Chemother.* 56(3), S. 451–454.
- Livermore, DM; Canton, R; Gniadkowski, M; Nordmann, P; Rossolini, GM; Arlet, G *et al.* (2006): **CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe.** *J Antimicrob Chemother.* 59(2), S. 165–174.
- Livermore, DM (1995): **beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance.** *Clin Microbiol Rev.* 8(4), S. 557–584.
- López-Cerero, L; Egea, P; Serrano, L; Navarroa, D; Morac, A; Blancoc, J; Doid, Y; Patersone, DL; Rodríguez-Bañoa, J; Pascuala, A (2011) **Characterisation of clinical and food animal *Escherichia coli* isolates producing CTX-M-15 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase belonging to ST410 phylogroup A.** *Int J Antimicrob Agents* 37, S. 365-367.
- Lovering, AL; Gretes, MC; Safadi, SS; Danel, F; de Castro, L; Page, MG; Strynadka, NC (2012): **Structural insights into the anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) activity of ceftobiprole.** *J Biol Chem.* 287(38), S. 32096-32102.

- Magiorakos, AP; Srinivasan, A; Carey, RB; Carmeli, Y; Falagas, ME; Giske, CG, Harbarth, S; Hindler, JF; Kahlmeter, G; Olsson-Liljequist, B; Paterson, DL; Rice, LB; Stelling, J; Struelens, MJ; Vatopoulos, A; Weber, JT; Monnet, DL (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), S. 268–281.
- Mahillon, J; Chandler, M (1998): **Insertion Sequences.** *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62(3), S. 725–774.
- Mammeri, H; van de Loo, M; Poirel, L; Martinez-Martinez, L; Nordmann, P (2004): **Emergence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in *Escherichia coli* in Europe.** *Antimicrob Agents Chemother.* 49(1), S. 71–76.
- Martínez-Martínez, L; Pascual, A; Jacoby, GA (1998a): **Quinolone resistance from a transferable plasmid.** *Lancet* 351, S. 797–799.
- Mateus, A; Brodbelt, DC; Barber, N; Stärk, KD (2011): **Antimicrobial usage in dogs and cats in first opinion veterinary practices in the UK.** *J Small Anim Pract.* 52(10), S. 515-521
- Mayers, DL; Sobel, JD; Ouellette, M; Lerner, SA; Ouellette, M; Sobel, JD (2009): **Antimicrobial Drug Resistance.** (1. Aufl.)
- Maynard C, Bekal S, Sanschagrín F, Levesque RC, Brousseau R, Masson L, Larivière S, Harel J (2004): **Heterogeneity among Virulence and Antimicrobial Resistance Gene Profiles of Extraintestinal *Escherichia coli* Isolates of Animal and Human Origin.** *J Clin Microbiol.* 42(12), S. 5444-5452
- Meyer, E; Gastmeier, P; Kola, A; Schwab, F (2012): **Pet animals and foreign travel are risk factors for colonisation with extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli*.** *Infection* 40(6), S. 685–687.
- Mil-Homens, D; Fialho, AM; (2012): **A BCAM0223 mutant of *Burkholderia cenocepacia* is deficient in hemagglutination, serum resistance, adhesion to epithelial cells and virulence.** *PLoS One.* 7(7), e41747.
- Mshana, SE.; Imirzalioglu, C; Hossain, H; Hain, T; Domann, E; Chakraborty, T (2009): **Conjugative IncFI plasmids carrying CTX-M-15 among *Escherichia coli* ESBL producing isolates at a University hospital in Germany.** *BMC Infect Dis* 9(1), S. 97.
- Mukherjee, K; Altincicek, B; Hain, T; Domann, E; Vilcinskis, A; Chakraborty, T (2009): ***Galleria mellonella* as a Model System for Studying *Listeria* Pathogenesis.** *Appl Environ Microbiol.* 76(1), S. 310–317.
- Munday, CJ (2004): **Predominance and genetic diversity of community- and hospital-acquired CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in York, UK.** *J Antimicrob Chemother.* 54(3), S. 628–633.
- Nataro, JP; Kaper JB (1998): **Diarrheagenic *E coli*.** *Clin Microbiol Rev* 11(1), S. 142-201
- National Center for Biotechnology Information (NCBI) (2012): <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Neumeister, B; Geiss, HK; Braun R; Kimmig P (2009): **Mikrobiologische Diagnostik: Bakteriologie - Mykologie - Virologie - Parasitologie.** (2. Aufl.)
- Nicolas-Chanoine, MH; Blanco, J; Leflon-Guibout, V; Demarty, R; Alonso, MP; Canica, MM *et al.* (2007): **Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15.** *J Antimicrob Chemother.* 61(2), S. 273–281.
- Nowicki, B; Selvarangan, R; Nowicki, S (2001): **Family of *Escherichia coli* Dr Adhesins: Decay-Accelerating Factor Receptor Recognition and Invasiveness.** *J Infect Dis.* 1(183), S. 24-27.
- Oleson, AE; Sasakuma, M (1980): **S1 nuclease of *Aspergillus oryzae*: a glycoprotein with an associated nucleotidase activity.** *Arch Biochem Biophys.* 204(1), S. 361-370.
- Östholm, BÅ; Tärnberg, M; Monstein, HJ; Hällgren, A; Hanberger, H; Nilsson, LE (2013): **High frequency of co-resistance in CTX-M-producing *Escherichia coli* to non-beta-lactam antibiotics, with**

- the exceptions of amikacin, nitrofurantoin, colistin, tigecycline, and fosfomycin, in a county of Sweden. *Scand J Infect Dis.* 45(4), S. 271–278.
- Overdeest, I (2011): **Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase Genes of *Escherichia coli* in Chicken Meat and Humans, the Netherlands.** *Emerg. Infect. Dis.* 17(7), S. 1216–1222.
- Page, MG (2004) **Cephalosporins in clinical development.** *Investig. Drugs* 13(8), S. 973-985.
- Papp-Wallace, KM; Endimiani, A; Taracila, MA; Bonomo, RA (2011): **Carbapenems: Past, Present, and Future.** *Antimicrob Agents Chemother.* 55(11), S. 4943–4960.
- Partridge, SR; Zong, Z; Iredell, JR (2011): **Recombination in IS26 and Tn2 in the Evolution of Multiresistance Regions Carrying blaCTX-M-15 on Conjugative IncF Plasmids from *Escherichia coli*.** *Antimicrob Agents Chemother.* 55(11), S. 4971–4978.
- Paterson, DL; Bonomo, RA (2005): **Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: a Clinical Update.** *Clin Microbiol Rev.* 18(4), S. 657–686.
- Paterson, DL (2006): **Resistance in gram-negative bacteria: enterobacteriaceae.** *Am J Med* 119(6), S. 20-28
- Peirano, G; van der Bij, AK; Freeman, JL; Poirel, L; Nordmann, P; Costello, M *et al.* (2014): **The characteristics of *Escherichia coli* ST131 that produce extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: global distribution of the H30-Rx sublineage.** *Antimicrob Agents Chemother.* 58(7): S. 3762-3767.
- Perichon, B; Courvalin, P; Galimand, M (2007): **Transferable Resistance to Aminoglycosides by Methylation of G1405 in 16S rRNA and to Hydrophilic Fluoroquinolones by QepA-Mediated Efflux in *Escherichia coli*.** *Antimicrob Agents Chemother.* 51(7), S. 2464–2469.
- Pfeifer, Y; Cullik, A; Witte, W (2010): **Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens.** *Int J Med Microbiol.* 300(6), S. 371–379.
- Pichon, C; Du Merle, L; Lequeutre, I; Le Bouguenec, C (2013): **The AfaR small RNA controls expression of the AfaD-VIII invasin in pathogenic *Escherichia coli* strains.** *Nucleic Acids Res.* 41(10), S. 5469–5482.
- Pitout, JDD (2010): **Infections with Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae*.** *Drugs* 70(3), S. 313–333.
- Poirel, L; Heritier, C; Tolun, V; Nordmann, P (2004): **Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in *Klebsiella pneumoniae*.** *Antimicrob Agents Chemother.* 48(1), S. 15–22.
- Poirel, L; Pitout, JDD; Calvo, L; Rodriguez-Martinez, JM; Church, D; Nordmann, P (2006): **In Vivo Selection of Fluoroquinolone-Resistant *Escherichia coli* Isolates Expressing Plasmid-Mediated Quinolone Resistance and Expanded-Spectrum  $\beta$ -Lactamase.** *Antimicrob Agents Chemother.* 50(4), S. 1525–1527.
- Poirel, L; Cattoir, V; Nordmann, P (2012): **Plasmid-Mediated Quinolone Resistance; Interactions between Human, Animal, and Environmental Ecologies.** *Front Microbiol.* 3:24.
- Potron, A; Poirel, L; Rondinaud, E; Nordmann, P (18): **Intercontinental spread of OXA-48 beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* over a 11-year period, 2001 to 2011.** *Euro Surveill.* 2013 18(31), pii: 20549.
- Potron, A; Nordmann, P; Rondinaud, E; Jaureguy, F; Poirel, L (2013): **A mosaic transposon encoding OXA-48 and CTX-M-15: towards pan-resistance.** *J Antimicrob Chemother.* 68(2), S. 476–477.
- R Core Team (2014): **R: A language and environment for statistical computing.** R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. (<http://www.R-project.org/>)
- Rice, LB (1999): **Successful Interventions for Gram-Negative Resistance to Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactam Antibiotics.** *Pharmacotherapy.* 19(8), S. 120-128

- Robicsek, A; Strahilevitz, J; Jacoby, GA; Macielag, M; Abbanat, D; Hye Park, C; Bush, K; Hooper, DC (2006): **Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase.** *Nat Med.* 12(1), S. 83–88.
- Rodriguez, I; Barownick, W; Helmuth, R; Mendoza, MC; Rodicio, MR; Schroeter, A; Guerra, B (2009): **Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and AmpC  $\beta$ -lactamases in ceftiofur-resistant *Salmonella enterica* isolates from food and livestock obtained in Germany during 2003-07.** *J Antimicrob Chemother.* 64(2), S. 301–309.
- Rogers, BA; Sidjabat, HE; Paterson, DL (2010): ***Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain.** *J Antimicrob Chemother.* 66(1), S. 10–14.
- Rolle, M; Mayr, A (2007): **Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre.** (8. Aufl.).
- S2 Leitlinie HNO (2008) Antibiotikatherapie der Infektionen an Kopf und Hals. AWMF-Leitlinien-Register Nr. 017/066
- Sabtcheva, S; Kaku, M; Saga, T; Ishii, Y; Kantardjiev, T (2008): **High Prevalence of the *aac(6')*-Ib-cr Gene and Its Dissemination among Enterobacteriaceae Isolates by CTX-M-15 Plasmids in Bulgaria.** *Antimicrob Agents Chemother.* 53(1), S. 335–336.
- Sandegren, L; Linkevicius, M; Lytsy, B; Melhus, A; Andersson, DI (2011): **Transfer of an *Escherichia coli* ST131 multiresistance cassette has created a *Klebsiella pneumoniae*-specific plasmid associated with a major nosocomial outbreak.** *J Antimicrob Chemother.* 67(1), S. 74–83.
- Schmiedel, J; Falgenhauer, L; Domann, E; Bauerfeind, R; Prenger-Berninghoff, E; Imirzalioglu, C; Chakraborty, T. (2014): **Multiresistant extended spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* from humans, companion animals and horses in central Hesse, Germany.** *BMC Microbiol.* 14:187.
- Schmieger, H; Schicklmaier, P (1999): **Transduction of multiple drug resistance of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* DT104.** *FEMS Microbiol Lett.* 170(1): 251-256.
- Selander, RK; Caugant, DA; Ochman, H; Musser, M; Gilmour, MN; Whittam, TS (1986): **Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics.** *Appl Environ Microbiol.* 51(5), S. 873-884.
- Shahid, M; Singh, A; Sobia, F; Rashid, M; Malik, A; Shukla, I; Khan, HM (2011): ***bla*CTX-M, *bla*TEM, and *bla*SHV in Enterobacteriaceae from North-Indian tertiary hospital: high occurrence of combination genes.** *Asian Pac J Trop Med.* 4 (2), S. 101–105.
- Shi, W; Li, K; Ji, Y; Jiang, Q; Wang, Y; Shi, M; Mi, Z (2013): **Carbapenem and cefoxitin resistance of *Klebsiella pneumoniae* strains associated with porin OmpK36 loss and DHA-1  $\beta$ -lactamase production.** *Braz. J. Microbiol.* 44(2), S. 435–442.
- Stolle, I; Prenger-Berninghoff, E; Stamm, I; Scheufen, S; Hassdenteufel, E; Guenther, S; Bethe, A; Pfeifer, Y; Ewers, C (2013): **Emergence of OXA-48 carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in dogs.** *J Antimicrob Chemother.* 68(12), S. 2802-2808.
- Tamang, MD; Nam, HM; Gurung, M; Jang, GC; Kim, SR; Jung, SC; Park, YH; Lim, SK (2013): **Molecular Characterization of CTX-M -Lactamase and Associated Addiction Systems in *Escherichia coli* Circulating among Cattle, Farm Workers, and the Farm Environment.** *Appl Environ Microbiol.* 79(13), S. 3898–3905.
- Totsika, M; Beatson, SA.; Sarkar, S; Phan, MD; Petty, NK; Bachmann, N; Szubert, M; Sidjabat, HE; Paterson, DL; Upton, M; Schembri, MA (2011): **Insights into a Multidrug Resistant *Escherichia coli* Pathogen of the Globally Disseminated ST131 Lineage: Genome Analysis and Virulence Mechanisms.** *PLoS ONE* 6(10), e26578.
- Tran, JH (2002): **Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(8), S. 5638–5642.
- University of Warwick (2014): [mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli](http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli)

- Valentin, L; Sharp, H; Hille, K; Seibt, U; Fischer, J; Pfeifer, Y; Brenner Michael, G; Nickel, S; Schmiedel, J; Falgenhauer, L; Friese, A; Bauerfeind, R, Rösler, U; Imirzalioglu, C; Chakraborty, T; Helmuth, R; Valenza, G; Werner, G; Schwarz, S; Guerra, B; Appel, B; Kreienbrock, L; Käsbohrer, A (2014): **Subgrouping of ESBL-producing *Escherichia coli* from animal and human sources: an approach to quantify the distribution of ESBL types between different reservoirs.** *Int J Med Microbiol.* 304(7), S. 805-816
- Valenza, G; Nickel, S; Pfeifer, Y; Eller, C; Krupa, E; Lehner-Reindl, V; Holler, C (2014): **Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* as Intestinal Colonizers in the German Community.** *Antimicrob Agents Chemother.* 58(2), S. 1228–1230.
- VITEK 2™ User Manual (2008) 510731-10EN1 (06/2008) 24262
- Veldman, K; van Tulden, P; Kant, A; Testerink, J; Mevius, D (2013): **Characteristics of Cefotaxime-Resistant *Escherichia coli* from Wild Birds in The Netherlands.** *Appl Environ Microbiol.* 79(24), S. 7556–7561.
- Walther-Rasmussen, J (2006): **OXA-type carbapenemases.** *J Antimicrob Chemother.* 57(3), S. 373-383.
- Wieler, LH; Ewers, C; Guenther, S; Walther, B; Lübke-Becker, A (2011): **Methicillin-resistant staphylococci (MRS) and extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* in companion animals: Nosocomial infections as one reason for the rising prevalence of these potential zoonotic pathogens in clinical samples.** *Int J Med Microbiol.* 301(8), S. 635–641.
- Williamson, DA; Mills, G; Johnson, JR; Porter, S; Wiles, S (2014): **In vivo correlates of molecularly inferred virulence among extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) in the wax moth *Galleria mellonella* model system.** *Virulence* 5(3), S. 388–393.
- Wirth, T; Falush, D; Lan, R; Colles, F; Mensa, P; Wieler, LH. *et al.* (2006): **Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective.** *Mol Microbiol* 60(5), S. 1136–1151.
- Woodford, N; Carattoli, A; Karisik, E; Underwood, A; Ellington, MJ; Livermore, DM (2009): **Complete Nucleotide Sequences of Plasmids pEK204, pEK499, and pEK516, Encoding CTX-M Enzymes in Three Major *Escherichia coli* Lineages from the United Kingdom, All Belonging to the International O25:H4-ST131 Clone.** *Antimicrob Agents Chemother.* 53(10), S. 4472–4482.
- World health organization (WHO) (2014): **Antimicrobial resistance - Global Report on surveillance 2014.** <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>
- Yang, H; Duan, G; Zhu, J; Zhang, W; Xi, Y; Fan, Q (2013): **Prevalence and characterisation of plasmid-mediated quinolone resistance and mutations in the gyrase and topoisomerase IV genes among *Shigella* isolates from Henan, China, between 2001 and 2008.** *Int J Antimicrob Agents.* 42(2), S. 173-177.
- Yamane, K; Wachino, J; Suzuki, S; Kimura, K; Shibata, N; Kato, H (2007): **New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate.** *Antimicrob Agents Chemother.* 51(9), S. 3354–3360.
- Yao, Y; Imirzalioglu, C; Hain, T; Kaase, M; Gatermann, S; Exner, M; Mielke, M; Hauri, A; Dragneva, Y; Bill, R; Wendt, C; Wirtz, A; Domann, E; Chakraborty, T (2014): **Complete Nucleotide Sequence of a *Citrobacter freundii* Plasmid Carrying KPC-2 in a Unique Genetic Environment.** *Genome Announc.* 2(6) e01157-14.
- Yong, D; Toleman, MA; Giske, CG; Cho, HS; Sundman, K; Lee, K; Walsh, TR (2009): **Characterization of a New Metallo- $\beta$ -Lactamase Gene, blaNDM-1, and a Novel Erythromycin Esterase Gene Carried on a Unique Genetic Structure in *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 14 from India.** *Antimicrob Agents Chemother.* 53(12), S. 5046–5054.
- Zhanel, GG; Ennis, K; Vercaigne, L; Walkty, A; Gin, AS; Embil, J; Smith, H; Hoban, DJ. (2002): **A Critical Review of the Fluoroquinolones.** *Drugs* 62(1), S. 13–59.

## 8 Veröffentlichungen

- 07/2014 Valentin L, Sharp H, Hille K, Seibt U, Fischer J, Pfeifer Y, Brenner Michael G, Nickel S, Schmiedel J, Falgenhauer L, Friese A, Bauerfeind R, Rösler U, Imirzalioglu C, Chakraborty T, Helmuth R, Valenza G, Werner G, Schwarz S, Guerra B, Appel B, Kreienbrock L, Käsbohrer A. (2014) **Subgrouping of ESBL-producing *Escherichia coli* from animal and human sources: an approach to quantify the distribution of ESBL types between different reservoirs.** . *Int J Med Microbiol.* 304(7), S. 805-816
- 07/2014 Schmiedel J, Falgenhauer L, Domann E, Bauerfeind R, Prenger-Berninghoff E, Imirzalioglu C, Chakraborty T. (2014) **Multiresistant extended spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* from humans, companion animals and horses in central Hesse, Germany.** *BMC Microbiol.* 14:187.
- 04/2014 Falgenhauer L, Schmiedel J, Ghosh H, Fritzenwanker M, Yao Y, Bauerfeind R, Imirzalioglu C, Chakraborty T. (2014) **Resistance plasmids in ESBL-encoding *Escherichia coli* isolates from humans, dogs and cats.** *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 127, 458–463
- 04/2014 Falgenhauer L, Yao Y, Fritzenwanker M, Schmiedel J, Imirzalioglu C, Chakraborty T (2014) **Complete Genome Sequence of Phage-Like Plasmid pECO89, Encoding CTX-M-15.** *Genome Announc.* 24;2(2).
- 01/2012 Künne C, Billion A, Mshana SE, Schmiedel J, Domann E, Hossain H, Hain T, Imirzalioglu C, Chakraborty T (2012) **Complete sequences of plasmids from the hemolytic-uremic syndrome-associated *Escherichia coli* strain HUSEC41.** *J Bacteriol.* 194(2):532-533.

## 9 Eidesstattliche Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, 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.“

A handwritten signature in cursive script, reading "Judith Scheuvel". The ink is dark and the handwriting is fluid and personal.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen  
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the  
electronic version of the paper.**

## 11 Danksagung

Herrn Professor Chakraborty möchte ich mich für die Überantwortung des hochaktuellen und hochinteressanten Themas und der Bereitsstellung des Arbeitsplatzes danken. Weiterhin verdanke ich ihm viele anregende Diskussionen und eine hilfreiche Unterstützung bei der Verwirklichung dieses Forschungsprojektes. Ich möchte mich auch besonders für die Freiheit bedanken, die er mir während des gesamten Forschungsprojektes gewährte, was maßgeblich zur Verwirklichung dieser Arbeit beitrug. Sein kompetenter Rat und seine Hilfestellung kamen mir bei zahlreichen Angelegenheiten zugute.

Bei Prof. Dr. Bauerfeind bedanke ich mich für die kritischen aber äußerst konstruktiven und wertvollen inhaltlichen Anmerkungen bei der Planung und Auswertung der vorliegenden Arbeit. Jederzeit war er geduldig und freundlich bereit Ratschläge zu geben und wissenschaftliche Diskussionen zu führen. Für seine Hilfe bei der Korrektur dieser Arbeit möchte mich noch einmal besonders bedanken.

Mein besonderer Dank gilt auch bei Dr. Can Imirzalioglu., der mir bei der Planung, Durchführung und Auswertung der vorliegenden Arbeit jederzeit fachliche, erfahrene und wertvolle Unterstützung gewährte. Seine kreativen und richtungsweisenden Ideen haben wesentlich zur Vollendung dieser Arbeit beigetragen. Ich möchte mich besonders für die immer freundliche, geduldige und kompetente Vermittlung seines großen Wissens über resistente Erreger und deren Diagnostik bedanken.

Dr. Linda Falgenhauer möchte ich herzlich für die vielen konstruktiven Gespräche und ihre unermüdliche Hilfe bei der Auswertung der Daten aus der Genom- und Plasmidsequenzierung bedanken. Vielen Dank auch für ihre Unterstützung bei der Durchführung der PCRs zum Nachweis der PMQR-Gene und bei der Analyse des Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus des *aac(6')-1b*-Gens.

Bei Frau Dr. Dr. Katrin Gentil möchte ich mich für die kompetente und gründliche Durchsicht des Manuskriptes dieser Arbeit bedanken.

Frau Christina Gerstmann gilt mein besonderer Dank für die Durchführung der Genomsequenzierung (NGS) und der PFGE, sowie ihre unermüdliche Hilfe beim Aufbau der Humanisolate-Stammsammlung für diese Arbeit. Außerdem möchte ich mich für die

herzliche und freundschaftliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die gründliche Einarbeitung in die molekulagenetischen Arbeiten bedanken. Vielen Dank für deine Freundschaft!

Frau Alexandra Amend sei herzlich für die viele hilfreiche Tipps in der Laborarbeit und für jeden anderen unterstützenden Ratschlag und Beistand gedankt.

Frau Anja Schwanitz möchte ich für die akkurate und tatkräftige Hilfe beim Aufbau der Tierisolate-Stammsammlung für diese Arbeit danken.

Frau Anita Höland danke ich für die kompetente Beratung in Statistikfragen und die Durchführung der Cox-Regressionsanalyse.

Mein besonderer Dank geht auch an meine Mitdoktoranden sowie alle Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Instituts für die gute Zusammenarbeit. Ich möchte mich herzlich bei allen bedanken, da diese Arbeit wäre ohne ihre Hilfe nicht möglich gewesen wäre.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglichen haben und mir immer leibevoll und unterstützend zur Seite standen. Ganz herzlich möchte ich auch meinen Brüdern Henning und Gabriel danken, die mich immer wieder aufgemuntert, angespornt und unterstützt haben.

Meiner Schwester Nesrin und meiner Freundin Manu möchte ich aus ganzem Herzen für ihre Freundschaft und Unterstützung in allen Lebenslagen danken.

Für seine Unterstützung, seine Geduld und sein Vertrauen danke ich meinem Freund Tilman.

Meinen Freunden möchte ich herzlich für ihre Geduld und ihre immer wieder aufmunternden Worte danken.

Dem RESET-(ESBL and fluoroquinolone resistance in Enterobacteriaceae)-Verbund und dem Deutschen Zentrum für Infektionsforschung (DZIF) danke ich mich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit

.

## 12 Anhang

Tabelle 32 Übersicht über die DDST-positiven in dieser Studie untersuchten Humanisolate (n = 183)

Nr.	Tageb. Nr.	Datum Probenahme	Herkunft/Klinik	Alter	Probenmaterial	Genus	Art	β-Laktamasen	AmpC	PMQR	Phyl. Gruppe <i>E. coli</i>
H1	MY021491	28.12.2009	Ambulanter Patient	23 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-1			B1
H2	MY021492	28.12.2009	Ambulanter Patient	44 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-15			B1
H3	UR011662	29.12.2009	Stationärer Patient	71 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-15, OXA-1		AAC(6)-1b-cr	B2
H4	UR011699	30.12.2009	Stationärer Patient	67 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-15		n.t.	B1
H5	VA008055	02.01.2010	Stationärer Patient	51 Jahre	Leistenabstrich	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	CTX-M-79, OXA-1			
H6	VA008068	02.01.2010	Stationärer Patient	66 Jahre	Rektalabstrich	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-1		n.t.	B1
H7	UR011795	04.01.2010	Ambulanter Patient	29 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-79, OXA-1		n.t.	B2
H8	UR011838	05.01.2010	Stationärer Patient	59 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-1		n.t.	B1
H9	UR011990	08.01.2010	Stationärer Patient	91 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-1, OXA-1		QnrS, AAC(6)-1b-cr	A
H10	UR012006	09.01.2010	Ambulanter Patient	53 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-1			B1
H11	VA008813	07.01.2010	Stationärer Patient	47 Jahre	Rektalabstrich	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-79, OXA-1		AAC(6)-1b-cr	B2
H12	VA008906	07.01.2010	Stationärer Patient	75 Jahre	Rektalabstrich	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-15, OXA-1		AAC(6)-1b-cr	B1
H13	UR011986	08.01.2010	Stationärer Patient	59 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-15, OXA-1			A
H14	VA009245	11.01.2010	Stationärer Patient	19 Jahre	Abstrich ZVK	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>				B1
H15	VA009295	11.01.2010	Ambulanter Patient	6 Jahre	Rektalabstrich	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-15, OXA-1		AAC(6)-1b-cr	B2
H16	VA009635	13.01.2010	Stationärer Patient	91 Jahre	Rektalabstrich	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-1	AmpC + Porinverlust		A
H17	UR012125	13.01.2010	Stationärer Patient	17 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-1			B1
H18	UR012163	13.01.2010	Ambulanter Patient	66 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-97			A
H19	UR012186	14.01.2010	Stationärer Patient	60 Jahre	Urin	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	SHV-11, CTX-M-15, OXA-1	AmpC + Porinverlust	AAC(6)-1b-cr	
H20	SP032562	17.01.2010	Stationärer Patient	76 Jahre	Bronchialsekret	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-15, OXA-1		AAC(6)-1b-cr	D
H22	UR012294	18.01.2010	Stationärer Patient	83 Jahre	Urin	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	CTX-M-1, OXA-1			
H23	UR012285	18.01.2010	Stationärer Patient	80 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-1, OXA-1			A
H24a	UR012524a	23.01.2010	Ambulanter Patient	72 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-15, OXA-1			A
H24b	UR012524b	23.01.2010	Ambulanter Patient	72 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-1, OXA-1		AAC(6)-1b-cr	A
H25	UR012408	20.01.2010	Stationärer Patient	72 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>				D
H26	VA010492	19.01.2010	Stationärer Patient	62 Jahre	Unbekannt	<i>Klebsiella</i>	<i>oxytoca</i>	TEM-1		n.t.	
H27	UR012563	25.01.2010	Ambulanter Patient	68 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1	AmpC + Porinverlust	AAC(6)-1b-cr	A

Nr.	Tageb. Nr.	Datum Probenahme	Herkunft/Klinik	Alter	Probenmaterial	Genus	Art	β-Laktamasen	AmpC	PMQR	Phyl. Gruppe <i>E. coli</i>
H28	VA011237	25.01.2010	Ambulanter Patient	61 Jahre	Rektalabstrich	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-1		n.t.	B1
H29	VA011261	25.01.2010	Stationärer Patient	60 Jahre	Cervicalabstrich	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-15		n.t.	B1
H30	VA011587	26.01.2010	Stationärer Patient	65 Jahre	Unbekannt	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-15		n.t.	D
H32	UR012679	27.01.2010	Stationärer Patient	37 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-15	AmpC + Porinverlust	AAC(6)-1b-cr	B2
H33	UR012780	29.01.2010	Ambulanter Patient	88 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-1, OXA-1	AmpC + Porinverlust	AAC(6)-1b-cr	A
H36	SP032845	01.02.2010	Stationärer Patient	58 Jahre	Sputum	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-79, OXA-1			B2
H37	VA012624	03.02.2010	Ambulanter Patient	25 Jahre	Achselabstrich	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-15			B1
H38	VA012778	04.02.2010	Stationärer Patient	68 Jahre	Rektalabstrich	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-15		AAC(6)-1b-cr	A
H40	VA013496	09.02.2010	Stationärer Patient	66 Jahre	Rektalabstrich	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-52, OXA-1			B1
H42	SP033032	11.02.2010	Stationärer Patient	1 Jahr	Bronchialsekret	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	TEM-1, SHV-11, CTX-M-1		n.t.	D
H43	VA014049	12.02.2010	Stationärer Patient	54 Jahre	Unbekannt	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-15, OXA-1		n.t.	D
H44	UR013299	11.02.2010	Stationärer Patient	81 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-1		n.t.	B1
H45	UR013443	16.02.2010	Ambulanter Patient	32 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-15		n.t.	D
H46	UR013505	17.02.2010	Ambulanter Patient	59 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-1		n.t.	B1
H49a	UR013613a	19.02.2010	Ambulanter Patient	14 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-1		n.t.	B2
H49b	UR013613b	19.02.2010	Ambulanter Patient	14 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-1		n.t.	D
H50	UR013707	23.02.2010	Stationärer Patient	54 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-15		n.t.	D
H51	UR013606	19.02.2010	Stationärer Patient	82 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-1		n.t.	B2
H52	UR013774	24.02.2010	Stationärer Patient	71 Jahre	Urin	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	CTX-M-15			D
H53	UR013982	02.03.2010	Ambulanter Patient	83 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-15, OXA-1			B2
H57	UR014064	04.03.2010	Stationärer Patient	76 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1			D
H59	BK006534	06.03.2010	Stationärer Patient	78 Jahre	Blutkultur	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	TEM-1, SHV-1, CTX-M-15, OXA-1	AmpC + Porinverlust	AAC(6)-1b-cr	D
H61	UR014149	05.03.2010	Stationärer Patient	88 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1			B2
H62	UR014502	15.03.2010	Stationärer Patient	86 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-15			B2
H63	UR014429	12.03.2010	Ambulanter Patient	90 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-15			B2
H64	UR014570	16.03.2010	Ambulanter Patient	80 Jahre	Urin	<i>Klebsiella</i>	<i>oxytoca</i>	CTX-M-1			
H65	SP033591	15.03.2010	Stationärer Patient	43 Jahre	Sputum	<i>Klebsiella</i>	<i>oxytoca</i>	CTX-M-15		n.t.	
H66	UR014545	16.03.2010	Stationärer Patient	58 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-15, OXA-1	AmpC + Porinverlust	AAC(6)-1b-cr	B2
H67	UR014543	16.03.2010	Ambulanter Patient	59 Jahre	Urin	<i>Klebsiella</i>	<i>oxytoca</i>	TEM-1, CTX-M-1, OXA-1	AmpC + Porinverlust		
H68	VA017827	10.03.2010	Ambulanter Patient	47 Jahre	Ohrabstrich	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-1		n.t.	B2
H69	UR014751	20.03.2010	Stationärer Patient	73 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-1			B2
H70	UR014926	24.03.2010	Stationärer Patient	64 Jahre	Urin	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	TEM-1, CTX-M-15, OXA-1		AAC(6)-1b-cr	
H71	UR014916	24.03.2010	Ambulanter Patient	69 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-15			B2

Nr.	Tageb. Nr.	Datum Probenahme	Herkunft/Klinik	Alter	Probenmaterial	Genus	Art	$\beta$ -Laktamasen	AmpC	PMQR	Phyl. Gruppe <i>E. coli</i>
H72	UR014792	22.03.2010	Stationärer Patient	58 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-15, OXA-1			A
H73	UR015018	26.03.2010	Stationärer Patient	81 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-1		n.t.	A
H75	UR015054	29.03.2010	Stationärer Patient	61 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-15, OXA-1		AAC(6)-1b-cr	B2
H76	VA020485	29.03.2010	Stationärer Patient	77 Jahre	Rektalabstrich	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-15	AmpC + Porinverlust		B2
H77	UR015137	30.03.2010	Stationärer Patient	85 Jahre	Urin	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	TEM-1, CTX-M-15	AmpC + Porinverlust		
H78	UR015187	31.03.2010	Stationärer Patient	86 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-52		n.t.	D
H79	SP033893	29.03.2010	Stationärer Patient	76 Jahre	Bronchialsekret	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	TEM-1, SHV-1, OXA-1		AAC(6)-1b-cr	
H80	VA020524	29.03.2010	Stationärer Patient	78 Jahre	Leistenabstrich	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-1		n.t.	B1
H81	VA019933	25.03.2010	Stationärer Patient	60 Jahre	Leistenabstrich	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	OXA-1			B1
H82	VA021197	03.04.2010	Stationärer Patient	62 Jahre	Rachenabstrich	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	SHV-1, CTX-M-15			
H83	VA020988	01.04.2010	Stationärer Patient	13 Jahre	Rektalabstrich	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-1		n.t.	B1
H84	VA021438	06.04.2010	Stationärer Patient	73 Jahre	Gewebe	<i>Klebsiella</i>	<i>oxytoca</i>	CTX-M-15			
H85	VA022375	12.04.2010	Stationärer Patient	37 Jahre	Rektalabstrich	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-15, OXA-1		QnrS	D
H86	UR015510	09.04.2010	Ambulanter Patient	76 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-1		n.t.	B2
H87	UR015684	14.04.2010	Ambulanter Patient	75 Jahre	Urin	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	TEM-1, CTX-M-15, OXA-1		AAC(6)-1b-cr	
H88	UR015638	13.04.2010	Stationärer Patient	45 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-1			B1
H89	VA023352	17.04.2010	Stationärer Patient	75 Jahre	Wundabstrich	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-15		n.t.	D
H90	VA023094	15.04.2010	Stationärer Patient	39 Jahre	Punktat	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-15, OXA-1		AAC(6)-1b-cr	B2
H91	VA023148	16.04.2010	Stationärer Patient	71 Jahre	Rektalabstrich	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1			D
H92	VA023236	16.04.2010	Stationärer Patient	74 Jahre	Penisabstrich	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-15, OXA-1		AAC(6)-1b-cr	A
H93	UR015917	20.04.2010	Ambulanter Patient	66 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-15, OXA-1			B1
H94	UR016074	25.04.2010	Stationärer Patient	72 Jahre	Urin	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	SHV-5			
H95	VA026062	06.05.2010	Stationärer Patient	62 Jahre	Rektalabstrich	<i>Enterobacter</i>	<i>cloacae</i>	TEM-1, CTX-M-15		QnrB	
H96	BK008977	04.05.2010	Stationärer Patient	87 Jahre	Blutkultur	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-1		n.t.	B1
H97	VA026104	06.05.2010	Stationärer Patient	69 Jahre	Rachenabstrich	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>		AmpC + Porinverlust	n.t.	
H98	VA027055	12.05.2010	Stationärer Patient	64 Jahre	Rektalabstrich	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-1		n.t.	B2
H99	VA026808	11.05.2010	Ambulanter Patient	32 Jahre	Wundabstrich	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-1		n.t.	A
H100	VA026493	10.05.2010	Ambulanter Patient	72 Jahre	Rektalabstrich	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-1		n.t.	B2
H101	UR016584	08.05.2010	Ambulanter Patient	83 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-15			B2
H104	VA027751	17.05.2010	Stationärer Patient	46 Jahre	Unbekannt	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1		QnrS	B1
H105	VA027854	18.05.2010	Ambulanter Patient	55 Jahre	Vaginalabstrich	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-15			D
H107	UR017006	20.05.2010	Ambulanter Patient	63 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-1			B1
H108	UR017080	22.05.2010	Stationärer Patient	68 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-1		n.t.	B1

Nr.	Tageb. Nr.	Datum Probenahme	Herkunft/Klinik	Alter	Probenmaterial	Genus	Art	$\beta$ -Laktamasen	Amp <sup>c</sup>	PMQR	Phyl. Gruppe <i>E. coli</i>
H109	UR016983	19.05.2010	Stationärer Patient	14 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-1		n.t.	A
H110	UR016925	18.05.2010	Stationärer Patient	65 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1			B2
H111	UR017143	25.05.2010	Ambulanter Patient	68 Jahre	Urin	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	TEM-1		QnrS	
H112	VA029065	27.05.2010	Stationärer Patient	50 Jahre	Rektalabstrich	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-15			D
H113	UR017255	28.05.2010	Ambulanter Patient	63 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-15			D
H114	VA029729	31.05.2010	Stationärer Patient	78 Jahre	Unbekannt	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-15			D
H115	UR017321	31.05.2010	Stationärer Patient	80 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-1			A
H116	VA029932	01.06.2010	Stationärer Patient	81 Jahre	Rektalabstrich	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-15, OXA-1			A
H117	UR0171414	02.06.2010	Stationärer Patient	73 Jahre	Urin	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	CTX-M-38			
H119	ST029897	04.06.2010	Ambulanter Patient	48 Jahre	Stuhl	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-15, OXA-1		AAC(6)-1b-cr	A
H120	UR017594	07.06.2010	Ambulanter Patient	54 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-15			B1
H121	UR017601	08.06.2010	Stationärer Patient	73 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-15			B2
H122	VA031025	09.06.2010	Stationärer Patient	84 Jahre	Cervicalabstrich	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-15, OXA-1		AAC(6)-1b-cr	A
H123	VA031244	10.06.2010	Stationärer Patient	66 Jahre	Unbekannt	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-15, OXA-1		AAC(6)-1b-cr	D
H124	VA031317	11.06.2010	Ambulanter Patient	76 Jahre	Rektalabstrich	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-15			B2
H125	VA031300	11.06.2010	Stationärer Patient	68 Jahre	Rektalabstrich	<i>Enterobacter</i>	<i>cloacae</i>	TEM-1		n.t.	
H126	UR017746	11.06.2010	Stationärer Patient	78 Jahre	Urin	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	CTX-M-15			
H127	UR018026	20.06.2010	Stationärer Patient	12 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-15, OXA-1		AAC(6)-1b-cr	A
H128	VA032469	18.06.2010	Ambulanter Patient	20 Jahre	Achselabstrich	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-15			B2
H129	UR018108	22.06.2010	Stationärer Patient	78 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-15, OXA-1		AAC(6)-1b-cr	B2
H130	VA033068	23.06.2010	Ambulanter Patient	33 Jahre	Cervicalabstrich	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-15		n.t.	A
H131	UR018252	26.06.2010	Stationärer Patient	78 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-1			B2
H132	VA033454	25.06.2010	Ambulanter Patient	59 Jahre	Unbekannt	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-15		n.t.	B2
H133	UR018175	24.06.2010	Stationärer Patient	88 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-15			B2
H134	UR018320	29.06.2010	Stationärer Patient	81 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-15		n.t.	B1
H135	UR018236	25.06.2010	Stationärer Patient	1 Jahr	Urin	<i>Klebsiella</i>	<i>oxytoca</i>	CTX-M-15		n.t.	D
H136	UR018393	30.06.2010	Ambulanter Patient	65 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-1			
H137	UR018413	01.07.2010	Stationärer Patient	40 Jahre	Urin	<i>Klebsiella</i>	<i>oxytoca</i>	CTX-M-15		QnrB	A
H138	UR018408	01.07.2010	Ambulanter Patient	69 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-15		n.t.	A
H139	UR018570	06.07.2010	Stationärer Patient	54 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-1		n.t.	A
H140	UR018577	06.07.2010	Ambulanter Patient	72 Jahre	Urin	<i>Klebsiella</i>	<i>oxytoca</i>	CTX-M-15		n.t.	
H141	UR018588	06.07.2010	Ambulanter Patient	0,5 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-15		n.t.	D
H142	UR018756	10.07.2010	Stationärer Patient	51 Jahre	Urin	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	TEM-1, CTX-M-15, OXA-1		QnrB, AAC(6)-1b-cr	

Nr.	Tageb. Nr.	Datum Probenahme	Herkunft/Klinik	Alter	Probenmaterial	Genus	Art	$\beta$ -Laktamasen	Amp <sup>c</sup>	PMQR	Phyl. Gruppe <i>E. coli</i>
H143	VA036217	12.07.2010	Stationärer Patient	88 Jahre	Unbekannt	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-15, OXA-1		AAC(6)-1b-cr	B1
H144	VA035830	09.07.2010	Stationärer Patient	61 Jahre	Nasenabstrich	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	CTX-M-15, OXA-1		AAC(6)-1b-cr	
H145	VA036299	13.07.2010	Stationärer Patient	40 Jahre	Leistenabstrich	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	TEM-1, CTX-M-15		n.t.	
H146	UR018618	07.07.2010	Stationärer Patient	79 Jahre	Urin	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	TEM-1, CTX-M-15			B1
H147	UR018611	07.07.2010	Stationärer Patient	55 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-52, CTX-M-15			B2
H148	UR018601	07.07.2010	Stationärer Patient	46 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-15, OXA-1		AAC(6)-1b-cr	
H149	UR018890	14.07.2010	Stationärer Patient	81 Jahre	Urin	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	CTX-M-1			
H150	UR018928	15.07.2010	Ambulanter Patient	72 Jahre	Urin	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	CTX-M-15			
H151	VA036752	15.07.2010	Ambulanter Patient	81 Jahre	Rektalabstrich	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-32, OXA-1		AAC(6)-1b-cr	B1
H152	VA036917	16.07.2010	Ambulanter Patient	71 Jahre	Leistenabstrich	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-15, OXA-1		AAC(6)-1b-cr	B1
H153	VA036763	15.07.2010	Stationärer Patient	60 Jahre	Unbekannt	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-15, OXA-1		AAC(6)-1b-cr	B1
H154	VA036819	15.07.2010	Stationärer Patient	85 Jahre	Rektalabstrich	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-15, OXA-1		AAC(6)-1b-cr	B1
H155	VA036864	15.07.2010	Stationärer Patient	48 Jahre	Abstrich Abzess	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	CTX-M-15			
H156	SP035838	19.07.2010	Stationärer Patient	51 Jahre	Bronchialsekret	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-15		n.t.	D
H157	UR019059	19.07.2010	Ambulanter Patient	57 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-1			A
H158	UR019175	21.07.2010	Stationärer Patient	76 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-15, OXA-1			B2
H159	VA037512	20.07.2010	Stationärer Patient	71 Jahre	Unbekannt	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-15			B2
H160	UR019097	20.07.2010	Stationärer Patient	68 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-15, OXA-1		AAC(6)-1b-cr	B1
H161	UR019047	19.07.2010	Ambulanter Patient	32 Jahre	Urin	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	TEM-1, CTX-M-15		qnrS	
H162	UR018979	16.07.2010	Ambulanter Patient	80 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-1		n.t.	A
H163	UR019021	18.07.2010	Stationärer Patient	22 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-32			B1
H164	VA038146	22.07.2010	Ambulanter Patient	51 Jahre	Cervicalabstrich	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-15, OXA-1			B1
H165	VA037951	22.07.2010	Stationärer Patient	19 Jahre	Rachenabstrich	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	CTX-M-15			
H166	VA038248	23.07.2010	Stationärer Patient	71 Jahre	Leistenabstrich	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	CTX-M-15, OXA-1		AAC(6)-1b-cr	
H167	VA038144	22.07.2010	Stationärer Patient	75 Jahre	Rektalabstrich	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	OXA-1		n.t.	B1
H168	VA038093	22.07.2010	Stationärer Patient	73 Jahre	Rektalabstrich	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-15		AmpC + Porinverlust	A
H169	VA039341	29.07.2010	Stationärer Patient	60 Jahre	Stuhl	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-15			A
H170	VA039304	29.07.2010	Ambulanter Patient	74 Jahre	Rektalabstrich	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-15		n.t.	B1
H171	UR019513	30.07.2010	Stationärer Patient	69 Jahre	Urin	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	CTX-M-15, OXA-1		AAC(6)-1b-cr	
H173	UR019665	03.08.2010	Ambulanter Patient	84 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-15			A
H174	UR019650	03.08.2010	Ambulanter Patient	77 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-15			A
H175	VA038718	27.07.2010	Stationärer Patient	37 Jahre	Cervicalabstrich	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-117		n.t.	B1
H176	VA038924	28.07.2010	Stationärer Patient	80 Jahre	Rektalabstrich	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-1			B1

Nr.	Tageb. Nr.	Datum Probenahme	Herkunft/Klinik	Alter	Probenmaterial	Genus	Art	$\beta$ -Laktamasen	AmpC	PMQR	Phyl. Gruppe <i>E. coli</i>
H177	VA038712	27.07.2010	Stationärer Patient	1 Jahr	Unbekannt	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-15			B2
H178	VA039972	03.08.2010	Stationärer Patient	50 Jahre	Rektalabstrich	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1			A
H179	UR019750	05.08.2010	Stationärer Patient	85 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>		AmpC + Porinverlust	n.t.	A
H180	VA040576	06.08.2010	Stationärer Patient	75 Jahre	Rektalabstrich	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>				B2
H181	VA040337	04.08.2010	Stationärer Patient	60 Jahre	Rektalabstrich	<i>Morganella</i>	<i>morganii</i>	CTX-M-1		n.t.	
H182	VA040300	04.08.2010	Stationärer Patient	74 Jahre	Rektalabstrich	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>		AmpC + Porinverlust	n.t.	A
H183	SPO36170	05.08.2010	Stationärer Patient	60 Jahre	Bronchialsekret	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>				A
H184	UR019895	10.08.2010	Ambulanter Patient	18 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>		AmpC + Porinverlust	n.t.	A
H185	UR019886	10.08.2010	Ambulanter Patient	72 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>		AmpC + Porinverlust	n.t.	A
H186	UR019940	11.08.2010	Stationärer Patient	53 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>		AmpC + Porinverlust	n.t.	A
H187	VA040976	09.08.2010	Stationärer Patient	90 Jahre	Rektalabstrich	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-15		n.t.	A
H188	BK013001	05.08.2010	Stationärer Patient	14 Jahre	Blutkultur	<i>Enterobacter</i>	<i>cloacae</i>			n.t.	
H189	VA040380	05.08.2010	Stationärer Patient	41 Jahre	Rektalabstrich	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-15, OXA-1		n.t.	D
H190	VA040350	04.08.2010	Stationärer Patient	75 Jahre	Rektalabstrich	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-15, OXA-1		AAC(6)-1b-cr	B2
H191	UR019742	05.08.2010	Stationärer Patient	14 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-15, OXA-1		AAC(6)-1b-cr	A
H192	VA041849	13.08.2010	Stationärer Patient	52 Jahre	Rektalabstrich	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>		AmpC + Porinverlust		A
H193	VA041699	13.08.2010	Stationärer Patient	12 Jahre	Rektalabstrich	<i>Enterobacter</i>	<i>cloacae</i>		AmpC + Porinverlust		A
H194	VA041455	12.08.2010	Stationärer Patient	56 Jahre	Rektalabstrich	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>		AmpC + Porinverlust		A
H195	UR20033	13.08.2010	Stationärer Patient	76 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>		AmpC + Porinverlust	n.t.	A
H196	VA042225	17.08.2010	Stationärer Patient	59 Jahre	Unbekannt	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>		AmpC + Porinverlust		A
H197	UR020081	16.08.2010	Stationärer Patient	93 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-15		n.t.	B2
H198	UR020142	17.08.2010	Stationärer Patient	54 Jahre	Urin	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>		AmpC + Porinverlust		
H199	VA042000	16.08.2010	Stationärer Patient	23 Jahre	Unbekannt	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>		AmpC + Porinverlust		A
H200	UR020006	13.08.2010	Stationärer Patient	74 Jahre	Urin	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>		AmpC + Porinverlust		

Tabelle 33 Übersicht über die DDST-positiven in dieser Studie untersuchten Tierisolate (n = 207)

Nr.	Tageb. Nr.	Datum Probenahme	Herkunft/Klinik	Tierart	Alter	Probenmaterial	Genus	Art	$\beta$ -Laktamasen	AmpC	OXA-48	PMQR	Phyl. Gruppe <i>E. coli</i>
V1	P2927/09	12.05.2009	Zystitis	Hund	2 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-1	+			D
V3	1647/09	04.05.2009	Diarrhoe, Vomitus	Hund	4 Jahre	Wunde	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-15, OXA-1			AAC(6)-1b-cr	A
V8	8645	03.06.2009	Diarrhoe	Pferd	9 Tage	Kot	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-1, OXA-1	+		n.t.	D
V9	8646	03.06.2009	Diarrhoe	Pferd	9 Tage	Kot	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-15, OXA-1	+			A

Nr.	Tageb. Nr.	Datum Probenahme	Herkunft/Klinik	Tierart	Alter	Probenmaterial	Genus	Art	β-Laktamasen	AmpC	OXA-48	PMQR	Phyl. Gruppe
V11	1943/09	01.05.2009	Rhinitis	Hund	6 Monate	Nase	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	TEM-1, SHV-1, CTX-M-15, OXA-1			AAc(6)-1b-cr	
V18	2105/09	10.06.2009	Encephalitis	Löwe	2 Jahre	Niere	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1, CTX-M-15, OXA-1	+		n.t.	B1
V22	2104/09	10.06.2009	Enteritis	Kalb	6 Wochen	Lunge	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1, CTX-M-1				B2
V23	2271/09	22.06.2009	Urolithiasis	Hund	4 Jahre	Urin	<i>Escherichia coli</i>			+			D
V40	2638/09	10.07.2009	Diarrhoe	Kalb	2 Wochen	Kot	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1, CTX-M-15, OXA-1	+			A
V41	2668/09	10.07.2009	Fettgewebnekrose	Hund	6 Jahre	Bauchhöhle	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1, CTX-M-1, OXA-1				A
V43	2796/09	24.07.2009	Wundinfektion	Pferd	1 Jahr	Wunde	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		TEM-1, SHV-1, CTX-M-15, OXA-1	+		AAc(6)-1b-cr	
V52	3134/09	24.08.2009	blutiger Urin	Hund	10 Jahre	ZVK	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		TEM-1, CTX-M-15, OXA-1		+	AAc(6)-1b-cr	
V56	3217/09	24.08.2009	Enteritis, geschw. Milz	Hund	Unbekannt	Darm	<i>Providencia stuartii</i>						
V59	511950	27.08.2009	Lebershuntverschl., Fieber	Hund	6 Monate	Blutkultur	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		TEM-1, CTX-M-15, OXA-1		+	AAc(6)-1b-cr	
V60	3301/09-2	01.09.2009	Lebershuntverschl., Fieber	Hund	6 Monate	Blutkultur	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		TEM-1, CTX-M-15, OXA-1		+	QnrD, AAC(6)-1b-cr	
V61	3309/09	27.08.2009	Unbekannt	Hund	Unbekannt	Urin	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		TEM-1, SHV-1, CTX-M-15, OXA-1			Qnr5	
V63	3342/09-1	28.08.2009	Pyometra	Hund	9 Jahre	Uterusinhalt	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1, CTX-M-1				B1
V64	3342/09-2	28.08.2009	Pyometra	Hund	9 Jahre	Uterusinhalt	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1, CTX-M-1				B1
V70	3463/09-1	01.09.2009	Unbekannt	Hund	10 Jahre	Urinkatheter	<i>Escherichia coli</i>		TEM-190, CTX-M-15, OXA-1				A
V71	3459/09	01.09.2009	Hautwunde	Hund	6 Jahre	Hautwunde	<i>Escherichia coli</i>		CTX-M-15, OXA-1				A
V73	3346/09	16.09.2009	Diarrhoe, Fieber, Apathie	Pferd	16 Jahre	Kot	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1, CTX-M-15, OXA-1				D
V74	3591/09	21.09.2009	Androlog. US	Hund	Unbekannt	Sperma	<i>Escherichia coli</i>		CTX-M-15, OXA-1			AAc(6)-1b-cr	B1
V76	P5314/09	01.10.2009	Bronchopneumonie	Hund	10 Jahre	Rachen	<i>Escherichia coli</i>		CTX-M-1			n.t.	B1
V78	3753/09	05.10.2009	Diarrhoe, Apathie	Pferd	1 Jahr	Kot	<i>Enterobacter intermedius</i>		CTX-M-1				
V79	3798/09	05.10.2009	Diarrhoe, Kolik	Pferd	10 Jahre	Organ	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1, CTX-M-1				B1
V80	3821/09	05.10.2009	Diarrhoe, Apathie	Pferd	1 Jahr	Kot	<i>Escherichia coli</i>		CTX-M-15, OXA-1	+		n.t.	A
V81	3825/09	07.10.2009	blutiger Nasenausfluss	Pferd	22 Jahre	Lungentupfer	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1, CTX-M-1			n.t.	B1
V82	3828/09	07.10.2009	Unbekannt	Meerschweinchen	2 Jahre	Organ	<i>Escherichia coli</i>		CTX-M-15, OXA-1				D
V83	P5471/09-1	07.10.2009	Unbekannt	Kalb	7 Tage	Kot	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1, CTX-M-1				D
V84	P5471/09-2	07.10.2009	Unbekannt	Kalb	7 Tage	Kot	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1, CTX-M-1				D
V86	3978/09-2	16.10.2009	Kolik, Cystitis/Nephritis	Pferd	12 Jahre	Kot	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1, CTX-M-15				D
V87	3978/09-3	16.10.2009	Kolik, Cystitis/Nephritis	Pferd	12 Jahre	Kot	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1, CTX-M-15				D
V88	3984/09-1	19.10.2009	Schidverstopfg., Diarrhoe	Pferd	Unbekannt	Kot	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		TEM-1, CTX-M-15, OXA-1			AAc(6)-1b-cr	B1
V89	3984/09-2	19.10.2009	Schidverstopfg., Diarrhoe	Pferd	Unbekannt	Kot	<i>Escherichia coli</i>		CTX-M-1, OXA-1			n.t.	A
V91	3503/09	14.09.2009	Kolik, Diarrhoe, Fieber	Pferd	2 Jahre	Kot	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1, CTX-M-15				D
V93	4003/09-1	28.10.2009	Diarrhoe, Kolik	Pferd	12 Jahre	Kot	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1, CTX-M-1			n.t.	B1
V94	768351	28.10.2009	Diarrhoe, Kolik	Pferd	12 Jahre	Kot	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1, CTX-M-1				A

Nr.	Tageb. Nr.	Datum Probenahme	Herkunft/Klinik	Tierart	Alter	Probenmaterial	Genus	Art	β-Laktamasen	AmpC	OXA-48	PMQR	Phyl. Gruppe
V95	788074	28.10.2009	Schlidverstopfg., Diarrhoe	Pferd	Unbekannt	Kot	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	TEM-1, CTX-M-15, OXA-1			AAAC(6)-1b-cr	
V96	788075	28.10.2009	Schlidverstopfg., Diarrhoe	Pferd	Unbekannt	Kot	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1, CTX-M-15, OXA-1				A
V98	845051	03.11.2009	Schlidverstopfg., Diarrhoe	Pferd	Unbekannt	Kot	<i>Escherichia coli</i>		CTX-M-15, OXA-1			AAAC(6)-1b-cr	B1
V99	845052	03.11.2009	Schlidverstopfg., Diarrhoe	Pferd	Unbekannt	Kot	<i>Escherichia coli</i>		CTX-M-15, OXA-1				B1
V100	844686	03.11.2009	Schlidverstopfg., Diarrhoe	Pferd	Unbekannt	Kot	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1, CTX-M-1				B1
V101	844687	03.11.2009	Schlidverstopfg., Diarrhoe	Pferd	Unbekannt	Kot	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1, CTX-M-15			QnrS	B1
V102	4249/09	03.11.2009	Pyodermie	Hund	Unbekannt	Pfotenabstrich	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		TEM-1, CTX-M-15, OXA-1			AAAC(6)-1b-cr	
V103	4279/09	04.11.2009	EAE Läsionen	Rind	Unbekannt	Kot	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1, CTX-M-15	+		n.t.	B1
V105	4370/09	09.11.2009	Unbekannt	Hund	5 Jahre	Urin	<i>Escherichia coli</i>		CTX-M-1				A
V107	942208	09.11.2009	Colitis	Pferd	10 Jahre	Kot	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1, CTX-M-1			n.t.	A
V108	4480/09	09.11.2009	Caecumobstipation	Pferd	10 Jahre	Kot	<i>Escherichia coli</i>		CTX-M-1			n.t.	D
V109	943302	09.11.2009	Unterbauchödem	Pferd	1 Jahr	Kot	<i>Enterobacter intermedius</i>		CTX-M-1				
V110	943303	09.11.2009	Unterbauchödem	Pferd	1 Jahr	Kot	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1, CTX-M-97			n.t.	A
V111	4483/09	09.11.2009	Chron. Caecumobstipation	Pferd	Unbekannt	Kot	<i>Escherichia coli</i>		CTX-M-15, OXA-1			n.t.	A
V113	942207	19.11.2009	Colonobstipation, Colitis	Pferd	10 Jahre	Kot	<i>Escherichia coli</i>		CTX-M-15			n.t.	D
V114	970330	19.11.2009	Schlidverstopfg., Diarrhoe	Pferd	24 Jahre	Kot	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1, CTX-M-15				B1
V115	970331	19.11.2009	Schlidverstopfg., Diarrhoe	Pferd	24 Jahre	Kot	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1 CTX-M-2, OXA-1			n.t.	B1
V116	4589/09	20.11.2009	Mundhöhlenverletzung	Hund	9 Jahre	Wunde	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1, CTX-M-1, OXA-1				A
V117	4649/09a	20.11.2009	Schlidverstopfg., Diarrhoe	Pferd	24 Jahre	Kot	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1, CTX-M-2, OXA-1			n.t.	B1
V118	1013428	25.11.2009	Präputialödem	Pferd	19 Jahre	Kot	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1, CTX-M-2, OXA-1				B1
V119	1013429	25.11.2009	Präputialödem	Pferd	19 Jahre	Kot	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1, CTX-M-1, OXA-1				A
V120	1013793	25.11.2009	Abflussföhrig v. jugularis	Pferd	Unbekannt	Kot	<i>Escherichia coli</i>		CTX-M-1, OXA-1				A
V121	1013794	25.11.2009	Abflussföhrig v. jugularis	Pferd	Unbekannt	Kot	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1, CTX-M-2				D
V122	4677/09	25.11.2009	Fieber	Pferd	10 Jahre	Kot	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1, CTX-M-2, OXA-1			n.t.	B1
V123	1141628	01.12.2009	Unbekannt	Hund	2 Monate	Tubustupfer	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1, CTX-M-1, OXA-1				B1
V124	1141629	01.12.2009	Unbekannt	Hund	2 Monate	Tubustupfer	<i>Klebsiella oxytoca</i>		TEM-1, CTX-M-15, OXA-1			AAAC(6)-1b-cr	
V125	1140532	24.11.2009	Schlundverstopfung	Pferd	Unbekannt	Kot	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1 CTX-M-2, OXA-1	+		n.t.	B1
V126	1140533	24.11.2009	Schlundverstopfung	Pferd	Unbekannt	Kot	<i>Escherichia coli</i>		CTX-M-2, OXA-1				D
V127	1147107	26.11.2009	Schlundverstopfung	Pferd	Unbekannt	Kot	<i>Escherichia coli</i>		CTX-M-2			n.t.	B1
V128	1147108	26.11.2009	Schlundverstopfung	Pferd	Unbekannt	Kot	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		TEM-1, CTX-M-15, OXA-1			AAAC(6)-1b-cr	
V129	5044/09	27.11.2009	Schlundverstopfung	Pferd	Unbekannt	Kot	<i>Escherichia coli</i>		CTX-M-2			n.t.	A
V130	P6391/09	10.12.2009	Fistel	Hund	Unbekannt	Fistel	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1, CTX-M-15, OXA-1			AAAC(6)-1b-cr	A
V131	x-849/09	17.12.2009	Mycoplasma	Huhn	Unbekannt	Unbekannt	<i>Escherichia coli</i>		CTX-M-15, OXA-1			AAAC(6)-1b-cr	A

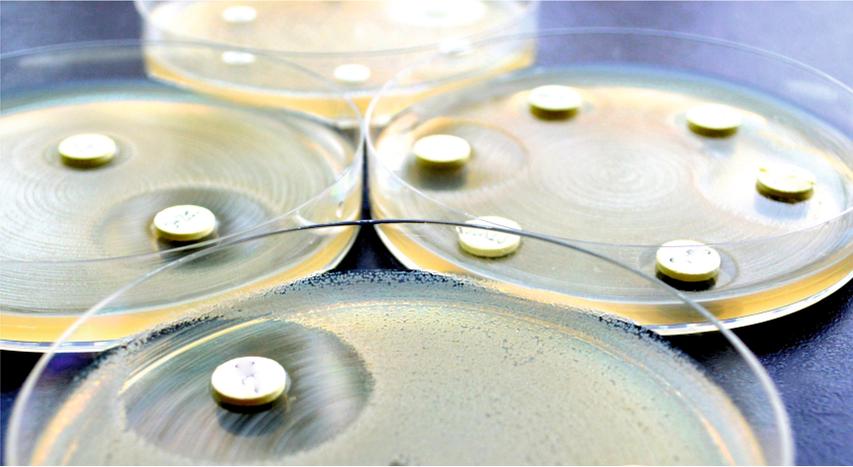
Nr.	Tageb. Nr.	Datum Probenahme	Herkunft/Klinik	Tierart	Alter	Probenmaterial	Genus	Art	β-Laktamasen	AmpC	OXA-48	PMQR	Phyl. Gruppe E. coli
V132	5382/09	06.01.2010	Tiefgefriersperma	Hund	5 Jahre	Sperma	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	TEM-1, CTX-M-15, OXA-1			AAc(6)-1b-cr	
V133	5394/09	06.01.2010	Diarrhoe, leichte Kolik	Pferd	1,5 Jahre	Kot	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1, CTX-M-15			AAc(6)-1b-cr	A
V134	P6815/09	06.01.2010	Unbekannt	Hund	Unbekannt	Nase	<i>Escherichia coli</i>		CTX-M-15, OXA-1			AAc(6)-1b-cr	A
V137	P471/10	03.02.2010	Unbekannt	Hund	10 Jahre	Mageninhalt	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1, CTX-M-14				D
V139	P655/10-1	16.02.2010	Unbekannt	Katze	1 Jahr	Kot	<i>Escherichia coli</i>		CTX-M-15				A
V143	P852/10	24.02.2010	Unbekannt	Katze	6 Monate	Kot	<i>Escherichia coli</i>		CTX-M-1, OXA-1				A
V144	P858/10	24.02.2010	Unbekannt	Hund	5 Jahre	Vagina	<i>Escherichia coli</i>		CTX-M-15, OXA-1			AAc(6)-1b-cr	B1
V148	P876/10	02.03.2010	Unbekannt	Katze	10 Jahre	Zungenabstrich	<i>Enterobacter cloacae</i>		TEM-1, CTX-M-1			QnrA	
V149	998/10	18.03.2010	Unbekannt	Hund	9 Jahre	ZVK	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1, CTX-M-15, OXA-1			AAc(6)-1b-cr	A
V150	P1297/10	19.03.2010	Unbekannt	Kalb	10 Tage	Kot	<i>Escherichia coli</i>		CTX-M-1			n.t.	A
V151	1123/10	23.03.2010	Pneumonie (Dirofilariose)	Hund	1 Jahr	Tubus	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		TEM-1, CTX-M-15, OXA-1		+	AAc(6)-1b-cr	
V152	P1532/10	23.03.2010	Zuchthyg. Untersuchung	Pferd	9 Jahre	Cervixtupfer	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1, CTX-M-1			n.t.	D
V153	1183/10	24.03.2010	Schlundverstopfung	Pferd	Unbekannt	Kot	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1, CTX-M-1			n.t.	B2
V154	1127/10	24.03.2010	Wundheilungsstörg.	Hund	2 Jahre	Abseß	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		TEM-1, CTX-M-15, OXA-1			AAc(6)-1b-cr	
V155	1249/10	29.03.2010	Schidverstopfg., Diarrhoe	Pferd	Unbekannt	Kot	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1, CTX-M-1			n.t.	B2
V156	1250/10	29.03.2010	Schidverstopfg., Diarrhoe	Pferd	Unbekannt	Kot	<i>Escherichia coli</i>		CTX-M-1			n.t.	B1
V157	1460/06	01.04.2010	Diarrhoe	Pferd	6 Tage	Kot	<i>Escherichia coli</i>		CTX-M-1			n.t.	A
V158	1394/10	13.04.2010	Diarrhoe	Pferd	3 Wochen	Kot	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1, CTX-M-15, OXA-1			n.t.	A
V159	1414/10	13.04.2010	Diarrhoe	Hund	6 Monate	Kot	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1			n.t.	B1
V160	1453/10	14.04.2010	katarrhalische Enteritis	Pferd	5 Tage	Organ	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1, CTX-M-15			AAc(6)-1b-cr	D
V161	1418/10	14.04.2010	hämorrhagische Enteritis	Hund	2 Wochen	Organ	<i>Escherichia coli</i>		CTX-M-15			AAc(6)-1b-cr	A
V162	P2061/10	14.04.2010	Diarrhoe	Kalb	1 Woche	Kot	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1, CTX-M-15				B1
V163	P2148/10	15.04.2010	Diarrhoe	Ferkel	5 Wochen	Kot	<i>Escherichia coli</i>		CTX-M-15			n.t.	A
V164	1242/06-3	19.04.2010	Diarrhoe	Pferd	8 Tage	Kot	<i>Escherichia coli</i>		CTX-M-15			n.t.	A
V165	x-860/10	25.03.2010	Infektion	Kanarienvogel	Unbekannt	Unbekannt	<i>Enterobacter cloacae</i>			+		n.t.	
V166	P2318/10	22.04.2010	Diarrhoe	Ferkel	3 Wochen	Kot	<i>Escherichia coli</i>		CTX-M-15				A
V167	1562/10	28.04.2010	Lungensekret nach OP	Katze	3 Jahre	Lunge	<i>Enterobacter cloacae</i>		TEM-1, SHV-2			QnrB	
V168	P2500/10	29.04.2010	Unbekannt	Kalb	1,5 Tage	Kot	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1, CTX-M-15, OXA-1			AAc(6)-1b-cr	A
V169	1875/06-2	30.04.2010	Hypogammaglobulinämie	Pferd	3 Wochen	Darm	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1, CTX-M-1				A
V171	2009/06	10.05.2010	Umfangsvermehrung	Pferd	10 Tage	Nabel	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1, CTX-M-1				A
V172	1911/06-1	10.05.2010	Diarrhoe	Pferd	3 Tage	Kot	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1, CTX-M-1			n.t.	B1
V173	P2916/10	11.05.2010	Diarrhoe	Pferd	11 Tage	Kot	<i>Escherichia coli</i>		CTX-M-1	+		n.t.	B1
V174	1771/10-1	11.05.2010	Fettgewebsnekrose	Katze	12 Jahre	Wunde	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		TEM-1, CTX-M-15, OXA-1		+	AAc(6)-1b-cr	

Nr.	Tageb. Nr.	Datum Probenahme	Herkunft/Klinik	Tierart	Alter	Probenmaterial	Genus	Art	β-Laktamasen	AmpC	OXA-48	PMQR	Phyl. Gruppe E. coli
V175	P2914/10	12.05.2010	Unbekannt	Pferd	8 Jahre	Milch	Escherichia	coli	CTX-M-1			n.t.	B1
V176	P2917/10	12.05.2010	Gesund, Fohlen Diarrhoe	Pferd	8 Jahre	Kot	Escherichia	coli	CTX-M-1	+		n.t.	B1
V177	1781/10	12.05.2010	Enteritis, Aszites	Hund	4 Monate	Leber	Escherichia	coli	CTX-M-15				A
V179	2212/06-2	17.05.2010	Diarrhoe	Pferd	11 Tage	Kot	Escherichia	coli					A
V180	3239/06-1	18.05.2010	Diarrhoe	Pferd	8 Wochen	Kot	Escherichia	coli	TEM-1, CTX-M-1			n.t.	A
V181	5040/06	18.05.2010	Unbekannt	Pferd	Unbekannt	Milz	Escherichia	coli	TEM-1, CTX-M-1			n.t.	B1
V182	5438/06	18.05.2010	Diarrhoe	Pferd	4 Tage	Kot	Escherichia	coli	CTX-M-15, OXA-1			AAc(6)-1b-cr	A
V183	3006/06	20.05.2010	Diarrhoe	Pferd	2 Wochen	Kot	Escherichia	coli	CTX-M-1			n.t.	A
V184	1893/10	20.05.2010	Zystitis, Struvitsteine	Hund	6 Jahre	Urin	Klebsiella	pneumoniae	TEM-1, CTX-M-15, OXA-1		+		
V185	1950/10	21.05.2010	Fieber, Beläge Schleimh.	Pferd	4 Tage	Mauschleimhaut	Klebsiella	pneumoniae	TEM-1, CTX-M-15, OXA-1			AAc(6)-1b-cr	
V186	1903/10	25.05.2010	Katarrhal. Gastroenteritis	Pferd	5 Tage	Tarsalgelenk	Klebsiella	pneumoniae	CTX-M-1				
V187	1878/10	25.05.2010	Katarrhal. Enteritis	Wellensittich	5 Monate	Leber	Klebsiella	pneumoniae	TEM-1, SHV-1, CTX-M-15, OXA-1				
V188	P3062/10	25.05.2010	Unbekannt	Rind	Unbekannt	Kot	Escherichia	coli	TEM-1, CTX-M-15				A
V189	1985/10	28.05.2010	Juckreiz, Krusten	Hund	11 Jahre	Haut	Klebsiella	pneumoniae	TEM-1, SHV-1, CTX-M-15, OXA-1		+	AAc(6)-1b-cr	
V190	2058/10-1	02.06.2010	Schlundverstopfung	Pferd	Unbekannt	Kot	Escherichia	coli	TEM-1, CTX-M-9	+		n.t.	B1
V191	3239/06-2	02.06.2010	Diarrhoe, Fieber, Apathie	Pferd	8 Wochen	Kot	Citrobacter	freundii	TEM-1, CTX-M-1			n.t.	
V192	2091/10	09.06.2010	Bissverletzung	Hund	6 Jahre	Wunde	Enterobacter	cloacae	TEM-1	+		QnrB	
V195	2236/10	22.06.2010	Phlegmone nach Biss	Hund	2 Jahre	Wunde	Escherichia	coli	TEM-1, CTX-M-15				B1
V196	2279/01	23.06.2010	Diarrhoe	Pferd	14 Jahre	Kot	Escherichia	coli	TEM-1, CTX-M-15				D
V197	2339/10-1	25.06.2010	Enteritis	Pferd	20 Jahre	Kot	Escherichia	coli	TEM-1, CTX-M-1			n.t.	A
V198	2339/10-2	25.06.2010	Enteritis	Pferd	20 Jahre	Kot	Klebsiella	pneumoniae	TEM-1, SHV-1, CTX-M-15, OXA-1			AAc(6)-1b-cr	
V199	P3896/10-1	28.06.2010	Unbekannt	Hund	5 Jahre	Pfote	Escherichia	coli		+			B1
V200	P3896/10-2	01.07.2010	Unbekannt	Hund	5 Jahre	Pfote	Enterobacter	cloacae					
V201	2386/10	01.07.2010	Omphaloplebitis	Pferd	5 Tage	Bauchhöhle	Escherichia	coli	CTX-M-15				B1
V202	P3981/10	02.07.2010	Unbekannt	Katze	Unbekannt	Urin	Klebsiella	pneumoniae	OXA-1	+		QnrB, AAC(6)-1b-cr	
V203	2423/10	09.07.2010	Oberschenkelwunde	Hund	10 Jahre	Wunde	Enterobacter	cloacae	CTX-M-9			QnrA	
V204	2607/10	28.07.2010	Endometritis	Pferd	13 Jahre	Uterus	Escherichia	coli	TEM-1, CTX-M-15			n.t.	A
V205	P4369/10	28.07.2010	chron. Zystitis	Katze	Unbekannt	Urin	Escherichia	coli	TEM-1, CTX-M-1				B1
V206	2626/10	29.07.2010	Zystitis	Katze	2 Jahre	Urin	Enterobacter	cloacae	CTX-M-9			QnrA	
V207	P4450/10	30.07.2010	Mastitis	Rind	Unbekannt	Milch	Escherichia	coli	CTX-M-1	+			A
V209	2632/10	02.08.2010	Aspiration	Hund	7 Jahre	Tubusspülung	Enterobacter	cloacae	TEM-1, SHV-1		+	QnrB	
V210	P4434/10-1	02.08.2010	Unbekannt	Katze	15,5 Jahre	Unbekannt	Escherichia	coli	TEM-1, CTX-M-15, OXA-1			AAc(6)-1b-cr	A
V211	2673/10	03.08.2010	Bissverletzung	Hund	6 Monate	Wunde	Klebsiella	pneumoniae	TEM-1, SHV-1, CTX-M-15, OXA-1		+	AAc(6)-1b-cr	

Nr.	Tageb. Nr.	Datum Probenahme	Herkunft/Klinik	Tierart	Alter	Probenmaterial	Genus	Art	β-Laktamasen	AmpC	OXA-48	PMQR	Phyl. Gruppe E. coli
V213	P4434/10-2	04.08.2010	Unbekannt	Katze	15,5 Jahre	Unbekannt	<i>Proteus</i>	<i>mirabilis</i>	CTX-M-2			n.t.	
V214	2717/10	06.08.2010	Fieber, Pankreatitis	Hund	7 Jahre	Urin	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	SHV-2		+	n.t.	
V215	882/07-1	12.08.2010	Septikämie, Prämaturnität	Pferd	5 Tage	Kot	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-1			n.t.	A
V216	882/07-2	12.08.2010	Septikämie, Prämaturnität	Pferd	5 Tage	Kot	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-2			QnrD, QnrS	A
V217	1147/07	12.08.2010	Diarrhoe	Pferd	4 Tage	Kot	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-2			QnrD, QnrS	A
V218	1420/07-1	12.08.2010	Diarrhoe	Pferd	2 Wochen	Kot	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-2			QnrS	A
V219	1420/06-2	12.08.2010	Diarrhoe	Pferd	2 Wochen	Kot	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-2				B1
V220	2793/10	12.08.2010	eitrige Wundinfektion	Hund	7 Jahre	Wunde	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	TEM-1, CTX-M-15, OXA-1	+	+	AAc(6)-Ib-cr	
V221	2772/10	13.08.2010	Pneumonie, Rhinitis	Meerschweinchen	1 Jahr	Leber	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	TEM-1, SHV-1, CTX-M-15, OXA-1		+	AAc(6)-Ib-cr	
V222	2799/10-2	13.08.2010	Lebershunt	Hund	2 Jahre	ZVK	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	TEM-1, SHV-1, CTX-M-15, OXA-1	+	+	AAc(6)-Ib-cr	
V223	P4777/10-2	18.08.2010	Diarrhoe	Kalb	1 Woche	Kot	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, OXA-1				B1
V224	2840/10	18.08.2010	Unbekannt	Hund	7 Jahre	ZVK	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	TEM-1, SHV-1, CTX-M-15, OXA-1		+	AAc(6)-Ib-cr	
V227	3059/10	02.09.2010	Enteritis	Pferd	16 Jahre	Kot	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-1			n.t.	B1
V228	2925/10-1	02.09.2010	Diarrhoe	Pferd	8 Jahre	Kot	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-15			n.t.	A
V229	2925/10-2	02.09.2010	Diarrhoe	Pferd	8 Jahre	Kot	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-15			n.t.	A
V230	2925/10-3	02.09.2010	Diarrhoe	Pferd	8 Jahre	Kot	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-2			n.t.	A
V231	2925/10-4	02.09.2010	Diarrhoe	Pferd	8 Jahre	Kot	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-2			n.t.	A
V232	2868/10-2	02.09.2010	Leptospirose	Hund	2 Monate	Leber	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-1			n.t.	D
V235	2932/10-2	02.09.2010	Unbekannt	Hund	9 Jahre	Tubus	<i>Enterobacter</i>	<i>cloacae</i>	CTX-M-9	+		n.t.	
V236	2697/10-3	02.09.2010	Enteritis, versch. Atmung	Ferkel	3 Wochen	Kot	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-1			n.t.	A
V237	2987/10-1	02.09.2010	Kolik	Pferd	15 Jahre	Kot	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-15				B1
V238	2987/10-2	02.09.2010	Kolik	Pferd	15 Jahre	Kot	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-15				A
V239	2987/10-3	02.09.2010	Kolik	Pferd	15 Jahre	Kot	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	TEM-1, SHV-28, CTX-M-15, OXA-1				
V240	2990/10-2	02.09.2010	Kolik, initial Fieber	Pferd	13 Jahre	Kot	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	TEM-1, CTX-M-1		+	n.t.	
V241	3004/10	02.09.2010	Proctitis	Hund	14 Jahre	Proctistupfer	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	OXA-1				A
V242	P4941/10	02.09.2010	Analdrüsenentzündung	Hund	Unbekannt	Analdrüsenabszess	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	OXA-1				A
V243	P4898/10	02.09.2010	Analdrüsenfistel	Hund	2 Jahre	Analdrüsenfistel	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	OXA-1				A
V244	3030/10-1	02.09.2010	Kolik	Pferd	15 Jahre	Kot	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1				B1
V245	3030/10-2	02.09.2010	Kolik	Pferd	15 Jahre	Kot	<i>Enterobacter</i>	<i>gergoviae</i>	CTX-M-1			n.t.	
V246	3030/10-3	02.09.2010	Kolik	Pferd	15 Jahre	Kot	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	TEM-1, CTX-M-15, OXA-1				B1
V247	3074/10-2	02.09.2010	Enteritis	Pferd	16 Jahre	Kot	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1, CTX-M-79			n.t.	B1
V248	3073/10	02.09.2010	Kolik, initial Fieber	Pferd	13 Jahre	Kot	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	TEM-1			n.t.	B1
V249	3045/10	03.09.2010	Diarrhoe	Ferkel	1 Woche	Kot	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>				n.t.	B1

Nr.	Tageb. Nr.	Datum Probenahme	Herkunft/Klinik	Tierart	Alter	Probenmaterial	Genus	Art	β-Laktamasen	AmpC	OXA-48	PMQR	Phyl. Gruppe E. coli
V250	3049/10	03.09.2010	Diarrhoe	Ferkel	1 Woche	Kot	<i>Escherichia coli</i>					n.t.	B1
V252	3098/10	13.09.2010	chronische eitrige Rhinitis	Ratte	Unbekannt	Nase	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		TEM-1, SHV-28, CTX-M-15, OXA-1	+			
V253	3158/10	13.09.2010	Lungenkontusion, ARDS	Hund	2 Jahre	Bronchialtupfer	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		TEM-1, SHV-28, CTX-M-15, OXA-1	+			
V254	P5113/10-2	13.09.2010	Enterotoxämie	Ferkel	4 Wochen	Kot	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1, CTX-M-79			n.t.	A
V255	3115/10	13.09.2010	Enteritis	Kaninchen	Unbekannt	Organ	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		SHV-2		+		
V256	P5291/10	21.09.2010	Diarrhoe	Ferkel	1 Woche	Kot	<i>Escherichia coli</i>		OXA-1			AAc(6)-Ib-cr	A
V257	3256/10-1	21.09.2010	Unbekannt	Hund	11 Jahre	ZVK	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		TEM-1, SHV-28, CTX-M-15, OXA-1	+			
V258	3233/10	22.09.2010	Lungenlappentorsion	Hund	8 Jahre	Blut	<i>Enterobacter cloacae</i>		TEM-1, SHV-1		+	QnrB	
V259	P5297/10	22.09.2010	Unbekannt	Pferd	21 Tage	Kot	<i>Escherichia coli</i>					n.t.	B1
V260	3311/10	23.09.2010	Zystitis	Hund	12 Jahre	Urin	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1, CTX-M-15			QnrD, AAC(6)-Ib-cr	B2
V261	3298/10	24.09.2010	eitrige Prostatitis, Sepsis	Hund	4 Monate	Leber	<i>Enterobacter cloacae</i>		TEM-1, CTX-M-15, OXA-1	+		QnrB, AAC(6)-Ib-cr	
V262	3313/10	27.09.2010	mukoider Enteritis	Kaninchen	4 Monate	Leber	<i>Enterobacter cloacae</i>		TEM-1, CTX-M-15, OXA-1	+		QnrB, AAC(6)-Ib-cr	
V263	3286/10	27.09.2010	Kolik, Diarrhoe	Pferd	18 Jahre	Kot	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1, CTX-M-15				B1
V264	3351/10	28.09.2010	Lebershunt	Hund	1 Jahr	ZVK	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		TEM-1, CTX-M-15, OXA-1			AAc(6)-Ib-cr	
V265	2557/07-1	30.09.2010	Diarrhoe	Pferd	4 Monate	Kot	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1, CTX-M-97			QnrD	B1
V266	2557/07-2	30.09.2010	Diarrhoe	Pferd	4 Monate	Kot	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1, CTX-M-97			QnrD	B1
V267	2644/07-1	30.09.2010	Diarrhoe	Pferd	2 Wochen	Kot	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1				B1
V268	2644/07-2	30.09.2010	Diarrhoe	Pferd	2 Wochen	Kot	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1, CTX-M-15, OXA-1			AAc(6)-Ib-cr	A
V269	P5468/10	04.10.2010	purulentes Nasensekret	Hund	9 Jahre	Nase	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		TEM-1, CTX-M-15, OXA-1		+	AAc(6)-Ib-cr	
V270	1634/08-1	07.10.2010	Diarrhoe	Pferd	2 Wochen	Kot	<i>Escherichia coli</i>		CTX-M-1			n.t.	B1
V271	1634/08-2	07.10.2010	Diarrhoe	Pferd	2 Wochen	Kot	<i>Escherichia coli</i>		CTX-M-15, OXA-1			AAc(6)-Ib-cr	A
V272	1675/08-1	07.10.2010	Peristaltikstörung	Pferd	5 Tage	Kot	<i>Escherichia coli</i>		CTX-M-1		+		B1
V273	1761/08-1	07.10.2010	Diarrhoe	Pferd	11 Tage	Kot	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1, CTX-M-15			QnrD	A
V274	1761/08-2	07.10.2010	Diarrhoe	Pferd	11 Tage	Kot	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1, CTX-M-15				D
V276	2013/08	07.10.2010	Diarrhoe	Pferd	7 Tage	Kot	<i>Escherichia coli</i>		CTX-M-1, OXA-1				B1
V279	P5691/10	14.10.2010	Zystitis, Nephritis	Hund	15 Jahre	Urin	<i>Escherichia coli</i>		CTX-M-15, OXA-1			QnrD, AAC(6)-Ib-cr	A
V280	3522/10	14.10.2010	hämorrhagische Enteritis	Maus	unbekannt	Leber	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		TEM-1, CTX-M-15		+		
V281	3524/10	14.10.2010	Enteritis, Nephritis	Kaninchen	5 Jahre	Lunge	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		CTX-M-15, OXA-1				D
V282	3541/10	14.10.2010	Zystitis	Hund	12 Jahre	Urin	<i>Escherichia coli</i>		CTX-M-15			AAc(6)-Ib-cr	A
V283	P5693/10	15.10.2010	Zystitis, Nephritis	Hund	15 Jahre	Urin	<i>Escherichia coli</i>		CTX-M-15			AAc(6)-Ib-cr	A
V285	3788/10	09.11.2010	Osteomyelitis	Hund	6 Jahre	Knochentupfer	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		TEM-1, SHV-1, CTX-M-15, OXA-1				D
V288	3793/10-2	11.11.2010	Pneumonie	Hund	6 Monate	BAL	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1, CTX-M-1				D
V289	3793/10-5	11.11.2010	Tumor	Hund	6 Monate	Darmtupfer	<i>Escherichia coli</i>		TEM-1, CTX-M-1, OXA-1				D

Nr.	Tageb. Nr.	Datum Probenahme	Herkunft/Klinik	Tierart	Alter	Probenmaterial	Genus	Art	$\beta$ -Laktamasen	AmpC	OXA-48	PMQR	Phyl. Gruppe E. coli
V290	3789/10	11.11.2010	Pneumonie	Hund	8 Jahre	BAL	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	TEM-1, SHV-1, CTX-M-15, OXA-1		+	AAc(6)-1b-cr	
V291	P6100/10	11.11.2010	Vaginitis	Katze	Unbekannt	Vagina	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-15, OXA-1			AAc(6)-1b-cr	D
V292	3842/10-1	16.11.2010	Harnwegsinfekt	Hund	6 Monate	Katheterurin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-15				D
V293	3829/10	17.11.2010	Lebershunt	Hund	2 Jahre	ZVK	<i>Enterobacter</i>	<i>cloacae</i>	TEM-1, SHV-1	+	+	QnrB	
V295	3880/10	18.11.2010	Zystitis	Hund	12 Jahre	Urin	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CTX-M-15, OXA-1			AAc(6)-1b-cr	B2



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6359-7

