

Technische Universität München  
Wissenschaftszentrum Weihenstephan  
Lehrstuhl für Tierhygiene  
Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. (Universitatis Kaposvárensis/Ungarn) Johann Bauer

## **Zum Vorkommen von antibiotikaresistenten Bakterien und Resistenzgenen in Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft**

Katharina Helmke

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Agrarwissenschaften (Dr. agr.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Gerhard Wenzel

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. (Universitatis Kaposvárensis/Ungarn) Johann Bauer
2. Univ.-Prof. Dr. Siegfried Scherer

Die Dissertation wurde am 05.03.2007 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 03.07.2007 angenommen.

Meinen Eltern

## Inhaltsverzeichnis

A	Einleitung.....	11
B	Literatur.....	12
1	Antibiotikaeinsatz in Europa.....	12
1.1	Antibiotikaeinsatz in der Humanmedizin.....	13
1.2	Antibiotikaeinsatz in der landwirtschaftlichen Nutztierhaltung und in der Veterinärmedizin.....	15
1.3	Antibiotikaeinsatz im Obst- und Gemüsebau.....	18
2	Bakterielle Antibiotikaresistenz.....	21
2.1	Resistenztypen.....	21
2.1.1	Natürliche und erworbene Resistenzen.....	21
2.1.2	Kreuz- und Coresistenz.....	23
2.2	Epidemiologische Grundlagen der Resistenzentstehung.....	23
2.2.1	Resistenzentstehung.....	23
2.2.2	Antibiotikaabhängige Resistenzselektion.....	25
2.2.3	Co-Selektion.....	25
2.2.4	Verbleib der Antibiotikaresistenz in Abwesenheit des Selektions- drucks.....	26
2.3	Molekulare Grundlagen der Resistenzentstehung.....	27
2.3.1	Mutationen.....	28
2.3.2	Horizontaler Gentransfer.....	28
2.4	Resistenzmechanismen unter besonderer Berücksichtigung der Tetra- zyklinresistenz.....	32
2.4.1	Verringerte intrazelluläre Akkumulation des Antibiotikums.....	33
2.4.2	Veränderung der Targetstruktur.....	36
2.4.3	Modifikation oder Hydrolyse des Antibiotikums durch Enzyme.....	36
3	Bedeutung ausgewählter Bakteriengattungen im Resistenztransfer.....	38
3.1	<i>E. coli</i> .....	39
3.2	Coliforme Bakterien.....	40
3.3	<i>Salmonella</i> spp.....	42
3.4	<i>Pseudomonas</i> spp.....	43
3.5	<i>Enterococcus</i> spp.....	45
3.6	<i>Listeria</i> spp.....	46
C	Material und Methoden.....	49
1	Material.....	49
1.1	Untersuchungsmaterial für den kulturellen Nachweis und die Empfind- lichkeitsprüfung von Bakterien.....	49

1.2	Labormaterial für den kulturellen Nachweis und die Empfindlichkeitsprüfung von Bakterien .....	50
1.3	Untersuchungsmaterial für die molekularbiologischen Untersuchungen.....	53
1.4	Labormaterial für die molekularbiologischen Untersuchungen.....	53
2	Untersuchungsmethoden .....	55
2.1	Auswahl der Einzelhandelsbetriebe und der landwirtschaftlichen Betriebe .....	55
2.2	Auswahl des Bakterienspektrums .....	55
2.3	Keimisolierung, Keimidentifizierung sowie Kryokonservierung .....	56
2.4	Empfindlichkeitsprüfung von Bakterien gegen Antibiotika.....	59
2.5	Methoden der molekularbiologischen Untersuchungen .....	65
2.5.1	Auswahl der Testparameter.....	65
2.5.2	Extraktionsprotokoll .....	65
2.5.3	Real-time-PCR zum Nachweis von <i>tet(B)</i> , <i>tet(M)</i> und <i>tet(O)</i> .....	66
2.5.4	Methodenvalidierung .....	68
2.6	Auswertung der Daten.....	69
2.6.1	Kultureller Keimnachweis und Keimisolierung.....	69
2.6.2	Phänotypische Resistenzuntersuchungen .....	70
2.6.3	Molekularbiologische Untersuchungen .....	70
2.6.4	Statistik.....	70
D	Ergebnisse .....	72
1	Vorkommen resistenzrelevanter Keime in pflanzlichen Lebensmitteln.....	72
1.1	Differenzierung der coliformen Keime .....	74
1.2	Differenzierung von <i>Pseudomonas</i> spp.....	76
1.3	Differenzierung von <i>Enterococcus</i> spp.....	76
1.4	Differenzierung von <i>Listeria</i> spp.....	77
2	Phänotypische Resistenz von Bakterien pflanzlichen Ursprungs.....	78
2.1	<i>E. coli</i> .....	78
2.2	Coliforme Keime.....	82
2.2.1	<i>Enterobacter aerogenes</i> .....	82
2.2.2	<i>Enterobacter cloacae</i> .....	85
2.2.3	<i>Enterobacter sakazakii</i> .....	90
2.2.4	<i>Enterobacter gergoviae</i> .....	94
2.2.5	<i>Enterobacter cancerogenus</i> .....	99
2.2.6	<i>Pantoea agglomerans</i> .....	102
2.2.7	<i>Klebsiella pneumoniae</i> spp. <i>pneumoniae</i> .....	107
2.2.8	<i>Rahnella aquatilis</i> .....	109

2.2.9	<i>Serratia marcescens</i> .....	112
2.2.10	Zusammenfassende Betrachtung der Resistenzeigenschaften coli- former Bakterien .....	114
2.3	<i>Pseudomonas</i> spp. ....	116
2.3.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	116
2.3.2	<i>Pseudomonas putida</i> .....	121
2.3.3	<i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	125
2.3.4	Zusammenfassende Betrachtung der Resistenzeigenschaften von <i>Pseudomonas</i> spp. ....	127
2.4	<i>Enterococcus</i> spp.....	128
2.4.1	<i>E. faecalis</i> .....	128
2.4.2	<i>E. faecium</i> .....	132
2.4.3	„ <i>E. nonfaecium/nonfaecalis</i> “ ( <i>E. nonfc.</i> ).....	136
2.4.4	Zusammenfassende Betrachtung der Resistenzeigenschaften von <i>Enterococcus</i> spp. ....	140
2.4.5	Abschließende zusammenfassende Betrachtung der phänotypischen Resistenzergebnisse .....	142
3	Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen .....	145
3.1	Methodenvalidierung .....	145
3.1.1	Qualitativer Nachweis von Tetrazyklin-Resistenzgenen aus Bakterien- isolaten .....	145
3.1.2	Validierung des Nachweises von <i>tet</i> (M)-Genen in pflanzlichem Probenmaterial .....	145
3.2	Resultate der Feldproben.....	148
3.2.1	<i>tet</i> (B) .....	148
3.2.2	<i>tet</i> (M) .....	149
3.2.3	<i>tet</i> (O) .....	149
E	Diskussion .....	151
1	Resistenzrelevante Bakterien in pflanzlichen Lebensmitteln .....	151
2	Einordnung der phänotypischen Resistenzbefunde.....	154
2.1	<i>E. coli</i> .....	154
2.2	Coliforme Bakterien.....	158
2.3	<i>Pseudomonas</i> spp. ....	163
2.4	<i>Enterococcus</i> spp.....	170
3	Einordnung der molekularbiologischen Untersuchungen.....	179
3.1	Methodische Aspekte .....	179
3.2	Gehalte der Feldproben .....	181

---

4	Einordnung der Befunde hinsichtlich einer Übertragung resistenter Keime auf den Verbraucher .....	183
F	Zusammenfassung .....	186
G	Summary .....	188
H	Literaturverzeichnis.....	190
I	Tabellenverzeichnis .....	220
J	Anhang .....	225

## Abkürzungsverzeichnis

<i>B.</i>	<i><u>Burkholderia</u></i>
bzw.	<u>b</u> ezie <u>h</u> ungs <u>w</u> eise
ca.	<u>c</u> ir <u>a</u>
CAMHB	<u>c</u> ation- <u>a</u> djustierte <u>M</u> üller- <u>H</u> inton- <u>B</u> ouillon
DANMAP	<u>D</u> anish Integrated Antimicrobial Resistance <u>M</u> onitoring and Research <u>P</u> rogramme
DDD	<u>d</u> efined <u>d</u> aily <u>d</u> oses
DNA	<u>D</u> esoxyribo <u>n</u> ucleic <u>A</u> cid
<i>E.</i>	<i><u>E</u>scherichia</i>
EARSS	<u>E</u> uropean <u>A</u> ntibiotic <u>R</u> esistance <u>S</u> urveillance <u>S</u> ystem
EDTA	<u>E</u> thylendi <u>a</u> min <u>t</u> etra <u>e</u> ssig <u>a</u> cid
<i>Ent.</i>	<i><u>E</u>nterobacter</i>
EPPO	<u>E</u> uropean and Mediterranean <u>P</u> lant <u>P</u> rotection <u>O</u> rganization
ESBL	<u>e</u> xtended <u>s</u> pectrum <u>β</u> -lactamase
FG	<u>F</u> ru <u>c</u> ht <u>g</u> emü <u>s</u> e
GENARS	<u>G</u> erman <u>N</u> etwork for <u>A</u> ntimicrobial <u>R</u> esistance <u>S</u> urveillance
G	<u>G</u> etreide
g	Erdbeschleunigung
ha	<u>H</u> ekt <u>a</u> r
HL	<u>H</u> igh <u>L</u> evel
i	<u>i</u> ntermediär
<i>K.</i>	<i><u>K</u>lebsiella</i>
<i>L.</i>	<i><u>L</u>isteria</i>
LMBG	<u>L</u> ebens <u>m</u> ittel- und <u>B</u> edarfsge <u>g</u> en <u>s</u> t <u>a</u> nde <u>g</u> esetz
log <sub>10</sub>	<u>L</u> ogarithmus zur Basis <u>10</u>
LW	<u>L</u> andwirtschaftlicher <u>B</u> etrieb
MHK	<u>M</u> inimale <u>H</u> emm <u>k</u> onzentration
mM	<u>m</u> illi <u>M</u> ol
n.s.	<u>n</u> icht <u>s</u> ignifikant
o.	<u>o</u> der
OIE	<u>O</u> ffice <u>I</u> nternational des <u>E</u> pizooties
PBP	<u>P</u> enicillin <u>b</u> inde <u>p</u> rotein
PCR	<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction
<i>P.</i>	<i><u>P</u>seudomonas</i>
<i>R.</i>	<i><u>R</u>ahnella</i>

---

r	<u>r</u> esistent
S.	<u>S</u> almonella
S	<u>S</u> upermarkt
s	<u>s</u> ensibel
Ser.	<u>S</u> erratia
SG	<u>S</u> alatgemüse
spp.	<u>S</u> pezies (Plural)
SD	Standardabweichung
Tn	<u>T</u> ransposon
vs.	<u>v</u> ersus
WG	<u>W</u> urzelgemüse
WHO	<u>W</u> orld <u>H</u> ealth <u>O</u> rganisation
z. B.	<u>z</u> um <u>B</u> eispiel
ZG	<u>Z</u> wiebelgemüse



## Abkürzungen der Antibiotika

AMC	Amoxicillin/Clavulansäure
AMK	Amikacin
AMP	Ampicillin
APR	Apramycin
C/C	Cefotaxim/Clavulansäure
CAZ	Ceftazidim
CEC	Cefaclor
CEP	Cefepim
CET	Ceftiofur
CEZ	Cefazolin
CIP	Ciprofloxacin
CLI	Clindamycin
CMP	Chloramphenicol
COL	Colistin
COX	Cefoxitin
CTX	Cefotaxim
CXM	Cefuroxim
CZC	Ceftazidim/Clavulansäure
DOX	Doxyzyklin
ENR	Enrofloxacin
ERY	Erythromycin
FLL	Florfenicol
FOS	Fosfomycin
GEN	Gentamicin
GNH	Gentamicin "high level"
IMP	Imipenem
KAN	Kanamycin
LIZ	Linezolid
MER	Meropenem
MOX	Moxifloxacin
MTR	Metronidazol
MZL	Mezlocillin
NEO	Neomycin
NET	Netilmicin
NFT	Nitrofurantoin

---

OXA	Oxacillin
PEN	Penicillin
PIP	Piperacillin
PIT	Piperacillin/Tazobactam
Q-D	Synercid® (Quinupristin/Dalfopristin)
RAM	Rifampicin
SNH	Streptomycin "high level"
SPT	Spectinomycin
STR	Streptomycin
SXT	Co-Trimoxazol
TLS	Tylosin
TOB	Tobramycin
TPL	Teicoplanin
VAN	Vancomycin

## A Einleitung

Das Auftreten und die Verbreitung antibiotikaresistenter, humanpathogener Keime ist ein weltweites Problem, das zunehmend eine erfolgreiche Behandlung von Infektionskrankheiten in Frage stellt (VOGEL ET AL., 1999). Schlüsselfaktoren für die Verbreitung antibiotikaresistenter Bakterien in der Umwelt sind eine nicht indizierte Verschreibung und Fehler in der Anwendung von Antibiotika im Bereich der Human- und Veterinärmedizin sowie deren pro- und metaphylaktischer Einsatz in der Nutztierhaltung (WITTE, 1998; ELLERBROEK ET AL., 2004).

In das Lebensmittel Fleisch können resistente Keime vor allem durch Kontamination im Rahmen der Schlachtung, der Zerlegung und im weiteren Verlauf der Verarbeitung in das Lebensmittel gelangen. Als Kontaminanten sind insbesondere fäkale Keime tierischen Ursprungs, Keime des Personals sowie bakteriell kontaminiertes Trinkwasser zu nennen. Werden antibiotikaresistente Bakterien mit der Gülle auf Anbauflächen ausgebracht, können resistente Keime auch auf das pflanzliche Lebensmittel gelangen und auf diesem Wege den Verbraucher erreichen (CORPET, 1988; WEGENER, 2003).

Dass multiresistente, obligat oder fakultativ pathogene Bakterien in der Nahrungskette vorkommen, ist nachgewiesen. Nicht abgeklärt ist, in welchem Umfang der Mensch über Lebensmittel mit antibiotikaresistenten Bakterien bzw. Resistenzgenen konfrontiert wird und inwieweit daraus ein gesundheitliches bzw. therapeutisches Risiko resultiert. Zur Klärung dieser Frage ist es Ziel dieser Arbeit, fakultativ pathogene, ubiquitär vorhandene Keime aus Lebensmitteln pflanzlichen Ursprungs zu isolieren und ihre Resistenzeigenschaften gegenüber den wichtigsten in der Humanmedizin eingesetzten Antibiotika, insbesondere auch so genannten „Reserveantibiotika“, zu testen. Um den Anteil des „lebensmittelbedingten“ Resistenztransfers besser einordnen zu können, sollen die erhaltenen Ergebnisse mit denen des GENARS-Projektes (2004) (German Network for Antimicrobial Resistance Surveillance) verglichen werden.

Da je Probe nur einige Isolate einer Minimalen Hemmstoff-Konzentrations (MHK) - Untersuchung unterzogen werden können, soll mittels Real-Time-PCR das Vorkommen bestimmter Resistenzgene quantitativ erfasst werden. Damit könnte aufgezeigt werden, ob pflanzliche Lebensmittel an der Verbreitung von Resistenzgenen besonders beteiligt sind.

## **B Literatur**

### **1 Antibiotikaeinsatz in Europa**

Antibiotika sind von Mikroorganismen gebildete Stoffe, die schon in geringer Menge das Wachstum von anderen Mikroorganismen hemmen oder diese abtöten. Durch chemische Modifikation der biologischen Grundsubstanzen sind zahlreiche Derivate entwickelt worden, die hinsichtlich ihrer antibakteriellen und pharmakokinetischen Eigenschaften gezielt verbessert wurden. Einige Antibiotika werden inzwischen völlig synthetisch hergestellt, so dass die traditionelle Abgrenzung zwischen Antibiotika und Chemotherapeutika zunehmend schwierig wird. Als „Antibiotikum“ werden somit alle Chemotherapeutika mit antimikrobieller Wirkung bezeichnet. Bakterielle Zielstrukturen der Antibiotika sind die Zellmembran, die DNA-Replikation, die Proteinbiosynthese, Enzyme der Zellwandsynthese und die Folsäuresynthese (SIMON UND STILLE, 2000; STAHLMANN UND LODE, 2005).

Antibiotika werden weltweit zu therapeutischen und prophylaktischen Zwecken in der Human- und Veterinärmedizin (u. a. landwirtschaftliche Nutztierhaltung) sowie im Pflanzenbau angewendet. Aktuelle Daten über den Einsatz von Antibiotika sind derzeit nur für den Humanbereich zugänglich. Für die Veterinärmedizin existieren Daten aus den Jahren 1997 und 1999, die hier zu vergleichenden Zwecken herangezogen werden (vgl. Tabelle 1).

Europaweit wurden im Jahr 1999 13.200 Tonnen Antibiotika verbraucht, davon 8.500 Tonnen für humanmedizinische und 3.900 Tonnen für veterinärmedizinische Zwecke, hier wiederum 80 % in der Nutztierhaltung (ANONYMUS, 2000). In der Veterinärmedizin werden die gleichen Wirkstoffgruppen wie in der Humanmedizin verwendet, jedoch sind einige Antibiotika der Humanmedizin vorbehalten, so z. B. Amikacin, Ciprofloxacin und Vancomycin (UNGEMACH, 1999). Darüber hinaus werden aus ökonomischen Gründen in der Veterinärmedizin ältere und kostengünstigere Wirkstoffe angewendet als in der Humanmedizin. So gehören die Tetracykline und die Penicilline zu den am häufigsten in der Veterinärmedizin angewendeten Antibiotika (ANONYMUS, 2000; UNGEMACH, 2000; SCHWARZ ET AL., 2001).

Für den mengenmäßigen Vergleich von in der Human- und Veterinärmedizin eingesetzten Antibiotika werden diese in mg in Bezug zur Körpermasse in kg gesetzt. Im Vergleichszeitraum 1997 ergibt sich somit eine sechsfach höhere Anwendung von Antibiotika pro kg Körpermasse in der Humanmedizin als in der Veterinärmedizin (UNGEMACH, 1999).

**Tabelle 1: Antibiotika-Einsatz in der Human- und Veterinärmedizin in Europa (EU und Schweiz) in den Jahren 1997 und 1999 (ANONYMUS, 2000)**

Einsatzgebiet	1997		1999		Veränderungen 1997-1999
	t	%	t	%	%
Humanmedizin	7.659	60,1	8.528	65,0	+ 11,3 %
Veterinärmedizin	3.494	27,4	3.902	29,0	+ 11,0 %
Leistungsförderer	1.599	12,5	786	6,0	- 50,0 %
Gesamt	12.752	100	13.216	100	+ 3,6 %

### 1.1 Antibiotikaeinsatz in der Humanmedizin

Seit dem Jahr 2000 werden die in der Humanmedizin verordneten Mengen an Antibiotika in DDD (defined daily doses) und nicht, wie bisher, in mg/kg Körpermasse angegeben. Dies soll einen besseren Vergleich der Mengen verordneter Pharmazeutika ermöglichen (GOOSSENS ET AL., 2005).

In der Humanmedizin wurden in Deutschland im Jahr 2004 insgesamt mehr als 400 unterschiedliche Antibiotikapräparate verordnet, dabei lag die antibiotische Tagesdosis (DDD) im ambulanten Sektor je 1.000 Versicherte und Tag bei 13,5 DDD, im stationären Sektor bei 1-2 DDD, während sie 1994 im ambulanten Sektor noch 16,8 DDD betrug. Die Menge verordneter Antibiotika ist somit seit 1994 zurückgegangen (DE WITH ET AL., 2004; GOOSSENS ET AL., 2005). Am häufigsten wurden im Jahr 2004 Penicilline verordnet (31 % der verordneten Antibiotika), wobei der größte Teil der Verordnungen auf Amoxicillin bzw. auf Amoxicillin/Clavulansäure entfiel, während orales Ampicillin ohne  $\beta$ -Lactamaseinhibitor aufgrund steigender Resistenzproblematik kaum noch verordnet wurde. Zweithäufigste Wirkstoffgruppe war die der Tetrazykline (25 %), die durch ein breites Wirkspektrum gegen grampositive und gramnegative Bakterien sowie durch gute pharmakokinetische Eigenschaften bei der Resorption und der Wirkdauer und vergleichsweise geringe Kosten gekennzeichnet sind (KERN, 2004). Aufgrund der häufigen Anwendung, insbesondere von Minocyclin und Doxycyclin wurden in den vergangenen Jahren jedoch zunehmende Resistenzen bei grampositiven wie gramnegativen Bakterien gegen diese Wirkstoffe festgestellt. So zeigen sich beispielsweise in den Daten des GENARS-Projekts nur rund 50 % der *E. coli* empfindlich gegenüber Tetrazyklinen (GENARS, 2004).

Etwa zu gleichen Teilen (13 bzw. 11 %) wurden neuere Makrolide und Oralcephalosporine verordnet. Makrolide haben eine gute antibakterielle Aktivität gegenüber grampositiven Bakterien. Insbesondere Clarithromycin und Azithromycin zeigen eine bessere und längere Verfügbarkeit als das ältere Erythromycin (KERN, 2004).

Eine Zunahme der Verordnungen zeigte sich in den vergangenen Jahren bei den Fluorchinolonen, wobei insbesondere dem Moxifloxacin, das als Reserveantibiotikum bei Staphylokokken- und Pneumokokkeninfektionen Bedeutung erlangt hat, eine breite und langanhaltende Wirkungsweise bestätigt wird. Dennoch hat die häufige Anwendung dieser Antibiotikagruppe in den vergangenen Jahren teilweise zu steigenden Resistenzraten bei grampositiven und gramnegativen Bakterien geführt. So kann z. B. bei *E. coli* auf Basis der Daten des GENARS-Projekts eine Zunahme der Resistenz gegen Ciprofloxacin von 9 auf 14 % in den vergangenen vier Jahren festgestellt werden (GENARS, 2004).

In Tabelle 2 ist der prozentuale Anteil einzelner Antibiotikaklassen an den gesamten Antibiotikaverordnungen im Bereich der Humanmedizin dargestellt.

**Tabelle 2: Prozentualer Anteil einzelner Antibiotikaklassen an den gesamten Antibiotikaverordnungen im Jahr 2004 in Deutschland im Bereich Humanmedizin (gemessen in DDD, nach DE WITH ET AL., 2004; GOOSSENS ET AL., 2005)**

Wirkstoffklasse	Anteil (%)
Penicilline	31 %
Oralcephalosporine	11 %
Tetrazykline	25 %
Neuere Makrolide, Ketolide, Azalide	13 %
Chinolone	9 %
Folatantagonisten	7 %
Erythromycin und ältere Makrolide	2 %
Lincosamide, Streptogramine, Fusidinsäure	2 %

Innerhalb Deutschlands variieren die Mengen verordneter Antibiotika stark, so reichen die Tagesdosen von 9,6 DDD in Brandenburg und Sachsen bis 17,3 DDD in Rheinland-Pfalz und Saarland. In Bayern wurden im Jahr 2004 durchschnittlich 12,5 DDD verordnet.

Im europäischen Vergleich liegt Deutschland beim Antibiotikaverbrauch mit 13,5 DDD je 1000 Einwohner im unteren Bereich. Frankreich hat hier mit 32,1 DDD je 1000 Einwohner den höchsten Antibiotikaverbrauch, gefolgt von Griechenland (30,5 DDD) und Luxemburg (26,4 DDD). In Österreich (12,2 DDD) und den Niederlanden (9,8 DDD) ist der Antibiotikaverbrauch am geringsten (DE WITH ET AL., 2004; GOOSSENS ET AL., 2005). Hinsichtlich der eingesetzten Wirkstoffgruppen dominieren auch in anderen europäischen Staaten die  $\beta$ -Lactamantibiotika, wobei hier vor allem  $\beta$ -Lactame mit erweitertem Wirkspektrum verordnet werden, gefolgt von den Makroliden und den Chinolonen. Im Krankenhausbereich spielen sowohl in Deutschland als auch in anderen europäischen Staaten Fluorchinolone und zunehmend auch Glykopeptide eine bedeutende Rolle (DE WITH ET AL., 2004; GOOSSENS ET AL., 2005).

Die Konsequenzen des Antibiotikaeinsatzes in Form einer zunehmenden Resistenzproblematik stellen sich in allen europäischen Ländern ähnlich dar, obwohl die verordneten Tagesdosen, wie oben beschrieben, in der EU variieren. Hierbei hängt die Resistenzhäufigkeit jedoch von den verabreichten Wirkstoffen und den Bakteriengattungen ab. So zeigten beispielsweise 46 bis 53 % der *E. coli*-Stämme in den mittel-, west- und südeuropäischen Ländern gegenüber den Aminopenicillinen Resistenzen. Es fällt jedoch auf, dass in den nordeuropäischen Ländern Norwegen, Finnland, Schweden und Dänemark (mit geringeren Mengen verordneter Antibiotika) die Resistenzraten von *E. coli* gegenüber den Aminopenicillinen deutlich geringer sind (23 bis 33 %) (EARSS, 2004). GOOSSENS ET AL. (2005) stellten hier eine deutlich positive Korrelation zwischen der regionalen Verschreibungspraxis und den Resistenzraten in 26 europäischen Ländern fest. Zudem beschreiben die Autoren ein nachweislich verändertes Spektrum der in Krankenhäusern vorkommenden Erreger und eine steigende Zahl nosokomialer Infektionen.

Gegenüber den so genannten Reserveantibiotika, wie z. B. den Glykopeptiden Vancomycin und Teicoplanin oder dem Amikacin, scheint die Resistenzproblematik europaweit noch vergleichsweise günstig zu sein, wenngleich sich zeigt, dass rund 30 % der verordneten Antibiotika der Gruppe der Reserveantibiotika zuzuordnen sind (DE WITH ET AL., 2004).

## **1.2 Antibiotikaeinsatz in der landwirtschaftlichen Nutztierhaltung und in der Veterinärmedizin**

Antibiotika werden in der landwirtschaftlichen Tierhaltung zu therapeutischen Zwecken und in der Pro- und Metaphylaxe verwendet. Der prophylaktische Antibiotikaeinsatz in der landwirtschaftlichen Nutztierhaltung wird insbesondere durch den Krankheitsdruck in schweine- und geflügelhaltenden Betrieben mit hohen Tierzahlen, bei der Einstallung (vor allem bei uneinheitlichen Partien aus mehreren Herkünften) oder zum Zeitpunkt des Absetzens gerechtfertigt (SCHWARZ ET AL., 2001). Von einem metaphylaktischen Antibiotikaeinsatz spricht man, wenn in einer Herde einzelne Tiere erkrankt sind, allen jedoch ohne Berücksichtigung der Behandlungswürdigkeit das Arzneimittel verabreicht wird. Ziel ist es, eine Ausbreitung des Erregers innerhalb der Herde zu verhindern. Beim therapeutischen Einsatz werden nur infektiös erkrankte Tiere behandelt. Derartige Einzeltierbehandlungen werden in der Regel nur bei Milchkühen oder Pferden bzw. in sehr kleinen Nutztierbeständen durchgeführt. Sie sind in großen Beständen, z. B. bei 30.000 Broilern je Stallabteil, nicht praktikabel (UNGEMACH, 1999; SCHWARZ ET AL., 2001). Alle drei Applikationsformen haben zum Ziel, Infektionserkrankungen – und damit Leiden - der Tiere zu vermeiden, der Ausbreitung von Infektionserregern entgegenzuwirken und den Menschen durch sichere Lebensmittel tierischen Ursprungs vor Zoonosen zu schützen.

Der Sachverhalt, dass bestimmte Antibiotika die Nährstoffverwertung verbessern, führte zur Anwendung sogenannter antibiotischer Leistungsförderer in der Nutztierernährung. Die Wirkungsweisen sind weitestgehend unklar; diskutiert wird eine Beeinflussung der Zusammensetzung der Intestinalflora und eine damit verbundene Stabilisierung des intestinalen Milieus, was sich qualitativ insbesondere in einer Steigerung der Mastleistungsparameter „tägliche Zunahme“ und „Futteraufwand/kg Lebendmasse“ auswirkt (GRAFE, 2001). Allerdings beschreibt GROPP (1986) eine negative Korrelation zwischen dem Leistungsniveau eines Tierbestandes und der Wirkung von Leistungsförderern. So reduziert sich die nutritive Wirksamkeit der Leistungsförderer, wenn dem genetischen Leistungspotential eines Tierbestandes durch die Optimierung der Haltungsbedingungen Rechnung getragen wird.

Als Leistungsförderer in der Tierhaltung durften zwar keine in der Humanmedizin angewendeten Antibiotika eingesetzt werden, dennoch wurden steigende Resistenzraten bei verschiedenen Bakterienarten auf den Einsatz von antibiotischen Leistungsförderern zurückgeführt. Der Einsatz von Avoparcin beispielsweise, das als Leistungsförderer für landwirtschaftliche Nutztiere seit April 1997 verboten ist, führte zu einem Anstieg vancomycinresistenter Enterokokken nicht nur bei landwirtschaftlichen Nutztieren, sondern auch beim Menschen. Der Anteil vancomycinresistenter Bakterien lag bei Betrieben, die Avoparcin als Fütterungsantibiotikum einsetzten bei 60 %, in Betrieben, die kein Avoparcin einsetzten, lag der Anteil resistenter Enterokokken nur bei 8 % (VAN DEN BOGAARD UND STOBBERINGH, 2000). Das Verbot von Avoparcin als Leistungsförderer führte entsprechend zu einem signifikant geringeren Prozentsatz vancomycinresistenter Enterokokken bei landwirtschaftlichen Nutztieren (VAN DEN BOGAARD ET AL., 2002).

Das Auftreten vancomycinresistenter Bakterien war der Auslöser für das Verbot von antibiotischen Leistungsförderern. Seit dem 1. Januar 2006 sind auch die letzten vier antimikrobiellen Substanzen (Monensin-Natrium, Salinomycin-Natrium, Flavophospholipol und Avilamycin) als Leistungsförderer verboten.

Das schrittweise eingeführte Verbot antibiotisch wirksamer Leistungsförderer in der landwirtschaftlichen Nutztierhaltung führte erwartungsgemäß zu einem Absatzrückgang dieser Futtermittelzusatzstoffe. Allerdings stieg in einigen Ländern (z. B. in Schweden und Dänemark) jedoch der Verbrauch therapeutisch eingesetzter Antibiotika deutlich an. Der Grund hierfür dürfte in Mängeln bezüglich der Tierhaltung liegen, die vorher durch den Einsatz antibiotisch wirksamer Leistungsförderer teilweise relativiert werden konnten. Längerfristig hat mittlerweile aber auch der therapeutische Antibiotikaeinsatz in diesen Ländern wieder abgenommen (DANMAP, 2002).



### Antibiotikaverbrauch

Wie bereits eingangs erwähnt, sind aktuelle Daten über den Verbrauch von Antibiotika in der landwirtschaftlichen Nutztierhaltung nicht zugänglich. Im Jahr 1999 wurden europaweit (inkl. Schweiz) ca. 3.900 t Antibiotika im Bereich Veterinärmedizin zur Bekämpfung von Infektionskrankheiten und ca. 800 t in der Nutztierhaltung zur Leistungsförderung eingesetzt. Gegenüber 1997 bedeutet dies eine Zunahme von 11 % im therapeutischen Bereich, während der Sektor „Leistungsförderer“ einen Rückgang um 50 % hinnehmen musste. Daten von 1995 zeigen, dass Deutschland am europäischen Gesamtverbrauch einen Anteil von 14 % einnahm (ANONYMUS, 2000).

Die quantitative Bedeutung der einzelnen Wirkstoffklassen am Gesamtverbrauch der in der Tierhaltung und Veterinärmedizin angewendeten Antibiotika in der EU und der Schweiz zeigt Tabelle 3. Es wird ersichtlich, dass die kostengünstigeren Tetracykline den größten Anteil der verordneten Antibiotika einnehmen, während die Sulfonamide in der Veterinärmedizin insgesamt nur 2 % ausmachen. Ähnliche Verbrauchsmuster wurden auch für bestimmte Regionen Deutschlands erstellt; allerdings nehmen die Sulfonamide mit einem Anteil von 21 bis 24 % Platz zwei und die Aminoglykoside (10 %) Platz drei ein (ABBAS ET AL., 2000; WINCKLER UND GRAFE, 2000).

**Tabelle 3: Übersicht über die anhand von tierärztlichen Herstellungsaufträgen ermittelten Mengen an Antibiotika in der EU (mit Schweiz) im Jahr 1997 (ANONYMUS, 2000)**

Wirkstoffgruppe	Menge an Antibiotika	
	t	%
Tetracykline	2.294	65,7
Makrolide	424	12,2
Penicilline	322	9,2
Aminoglykoside	154	4,4
Sulfonamide/Trimethoprim	75	2,1
Fluorquinolone	43	1,2
Andere	182	5,2

### Auswirkungen

Die Auswirkungen des Antibiotikaeinsatzes in der landwirtschaftlichen Tierhaltung auf die Resistenzentwicklung verschiedener Bakterienarten und auf den Resistenztransfer wurden in den vergangenen Jahren immer wieder untersucht. So führte der prophylaktische Einsatz per os verabreichter Antibiotika bei landwirtschaftlichen Nutztieren zum Teil zu einer erheblichen Zunahme antibiotikaresistenter Bakterien auch gegenüber in der Humanmedizin verordneten Antibiotika. Dies zeigen auch Ergebnisse der Resistenzuntersuchungen von HÖLZEL (2006): Aufgrund des häufigeren Einsatzes von Tetracyklinen bei der Behandlung landwirtschaftli-

cher Nutztiere im Vergleich zur Humanmedizin sind die Resistenzraten von *E. coli*, *E. faecalis* und *E. faecium* aus Schweinegülle gegenüber Tetrazyklin signifikant höher als die aus humanklinischem Probenmaterial.

Antibiotikaresistente Bakterien werden von landwirtschaftlichen Nutztieren entweder über den direkten Kontakt oder durch die Kontamination des Fleisches mit resistenten Bakterien während der Schlachtung und den Verzehr der rohen Fleischprodukte auf den Menschen übertragen (VAN DEN BOGAARD UND STOBBERINGH, 2000; VAN DEN BOGAARD ET AL., 2002). Während TEUBER ET AL. (1996) nach molekularbiologischen Untersuchungen eine genetische Übereinstimmung von vancomycinresistenten Enterokokken in Fleisch- und Käseprodukten mit klinischen Isolaten feststellten und damit den Resistenztransfer über das Lebensmittel nachwiesen, konnten KLEIN ET AL. (1998) dies nicht beobachten.

Für die Entwicklung von antibiotikaresistenten Bakterien auf pflanzlichen Lebensmitteln stellt der Antibiotikaeinsatz in der Nutztierhaltung einen entscheidenden Faktor dar. Nach Verabreichung von Tetrazyklinen oder Sulfonamiden wurden bis zu 80 % bzw. 46 % des Wirkstoffs in Schweinefaeces wiedergefunden (GRAFE, 2001). In einer Untersuchung von HARMS (2006) wurden in 70 % der Schweinegülleproben Tetrazykline (bis zu 50 mg/kg) und/oder Sulfonamide nachgewiesen. Auch KROKER (1983) konnte Tetrazykline in aktiver Form und wenig metabolisiert in Faeces behandelter Tiere in Konzentrationen bis zu 1 mg/g nachweisen. Eine Selektion antibiotikaresistenter Mikroorganismen kann somit nicht nur im behandelten Tier, sondern auch nach der Ausbringung des Wirtschaftsdüngers auf Anbauflächen im Boden, im Oberflächenwasser und auf Pflanzen stattfinden (SENGELOV ET AL., 2003; KUMAR ET AL., 2005; BRANDL, 2006). Zu den Übertragungswegen siehe auch Abbildung 5.

### 1.3 Antibiotikaeinsatz im Obst- und Gemüsebau

Phytopathogene Bakterien stellen in erster Linie eine Bedrohung für Obst- und Gemüsekulturen dar, der unter bestimmten Umständen durch Anwendung geeigneter Antibiotika entgegen gewirkt werden kann (BELL ET AL., 2004; GRENIER ET AL., 2006); eine unmittelbare Gefährdung der Gesundheit des Menschen im Sinne von Infektionserregern ist von diesen Keimen kaum zu erwarten. Allerdings gelten auch sie als mögliche Donatoren von Resistenzgenen für humanpathogene Keime (FALKINER, 1998; SCHNABEL UND JONES, 1999; MCMANUS ET AL., 2002).

Im Obst- und Gemüsebau werden weltweit betrachtet vor allem Streptomycin, Oxytetrazyklin und Gentamicin eingesetzt, also Antibiotika, die auch in der Human- und Veterinärmedizin zur Behandlung von Infektionskrankheiten Anwendung finden (MCMANUS ET AL., 2002). In der EU reguliert die European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) den Einsatz von Pflanzenschutzmitteln und spricht Empfehlungen und Standards aus. Die An-

wendung von Antibiotika im Pflanzenschutz ist in der EU verboten. Nur in Ausnahmefällen ist der Einsatz von Streptomycin zur Bekämpfung des Feuerbranderreger *Erwinia amylovora* im Obstbau möglich. So wurde beispielsweise im Jahr 1999 eine Ausnahmegenehmigung für wenige Obstbau-Betriebe in Süddeutschland und Österreich erteilt (ANONYMUS, 2001; ALLERBERGER, 2003; ZORNACH, 2005). Auch in den Jahren 2004 und 2005 war der Einsatz von Streptomycin wegen einer drohenden Feuerbrandepidemie notwendig. So wurden in den Jahren 2004 und 2005 470 kg bzw. 720 kg Streptomycin auf rund 3000 ha einmalig ausgebracht. Baden-Württemberg verzeichnete mit 2460 ha die größte behandelte Obstbaufläche in Deutschland (ANONYMUS, 2005 A).

In Ländern, die bis zum 1. Mai 2004 nicht Mitglied der EU waren, wurde ebenfalls Streptomycin gegen *Erwinia* spp., *Pseudomonas cichorii* und *P. syringae*, *Xanthomonas campestris* und *Agrobacterium tumefaciens* eingesetzt. Die genannten Bakterienarten verursachen verschiedene Krankheiten – z. B. Feuerbrand, Schwarzbeinigkeit und Wurzelkropf - bei landwirtschaftlichen Nutzpflanzen, wie Sellerie, Tomaten, Pfeffer und Äpfeln, mit denen der Einsatz eines Antibiotikums gerechtfertigt wird (MCMANUS ET AL., 2002).

In den USA und in Lateinamerika wird überwiegend Oxytetracyclin gegen *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas* spp. und *Xanthomonas* spp. angewandt. Gentamicin wird ebenfalls in den USA und Lateinamerika zur Bekämpfung von *Erwinia* spp, *Pectobacterium* spp., *Pseudomonas* spp., *Ralstonia* spp. und *Xanthomonas* spp. im Obstbau (Pflirsiche, Nektarinen) eingesetzt (MCMANUS ET AL., 2002). Oxolinsäure, ein Quinolon, wird hauptsächlich in Israel zur Bekämpfung von streptomycinresistenten *Erwinia amylovora* im Obstbau verwendet (SHTIENBERG ET AL., 2001).

In den USA wird die jährlich eingesetzte Menge an Antibiotika im Pflanzenbau auf 113 Tonnen geschätzt, wobei dies jedoch nur 0,5 % des gesamten Antibiotikaverbrauchs der USA und damit vergleichsweise geringe Mengen darstellt. Dennoch führen FALKNER (1998) und MCMANUS ET AL. (2002) zunehmende Resistenzproblematiken in den USA, Lateinamerika und Nordafrika bei phytopathogenen Bakterien vor allem gegenüber Streptomycin auf den Einsatz dieses Antibiotikums in der pflanzlichen Produktion zurück. In Folge des Antibiotikaeinsatzes konnte in den vergangenen Jahren vor allem in den USA eine starke Zunahme streptomycinresistenter *Xanthomonas* spp. festgestellt werden. Aber auch aus phytopathogenen *Pseudomonas* spp., *Xanthomonas dieffenbachiae* und *Erwinia carotovora* wurde das Streptomycinresistenzgen *strA-strB* in zunehmendem Maße isoliert (MCMANUS ET AL., 2002). In der EU werden regelmäßige Resistenztests bei *E. amylovora* aus Obstbeständen durchgeführt. Trotz des Einsatzes von Streptomycin im Jahr 2004 konnten keine streptomycinresistenten *E. amylovora*-Stämme festgestellt werden (ANONYMUS, 2005 A).

Die Annahme, dass Antibiotikaresistenzen von phytopathogenen Bakterien auf Kommensalen und human- und tierpathogene Bakterien übertragen werden, unterstützen die Arbeiten von NORELLI ET AL. (1991), SUNDIN UND BENDER (1996) und SUNDIN (2000): Sie demonstrieren homologe Sequenzen von Streptomycin-Resistenzgenen bei gramnegativen Bakterien aus pflanzlichem und klinischem Untersuchungsmaterial.

Hingegen gelang SCHNABEL UND JONES (1999) der Nachweis eines konjugativen Plasmidtransfers – mit Streptomycin- und Tetrazyklinresistenzgenen - von pflanzenassoziiertem *P. agglomerans* in *E. coli* nicht. Bei dem dann künstlichen Transfer durch Elektroporation wurde zwar eine Expression des Tetrazyklings, nicht aber des Streptomycingens beobachtet. Die Autoren schließen daraus, dass pflanzenassoziierte Bakterien an der Ausbreitung von Resistenzgenen nicht in besonderem Maße beteiligt sind.

Ein weiterer Aspekt bezüglich der Verbreitung von Resistenzen, der bisher wenig berücksichtigt wurde, ist das Ausbringen von Bakterien als biologischer Pflanzenschutz. So wird beispielsweise *Bacillus thuringiensis* gegen Insekten (z. B. Maiszünsler) eingesetzt. *Burkholderia cepacia* und *Pseudomonas fluorescens* dienen als Wachstumsförderer (HOLMES ET AL., 1998; PARKE UND GURIAN-SHERMAN, 2001; FERRE UND VAN RIE, 2002). Die Beteiligung dieser Bakterien an der Resistenzverbreitung wurde von HOLMES ET AL. (1998) untersucht. Die Autoren beschreiben identische DNA-Sequenzen der Resistenzgene bei Stämmen, die in der Landwirtschaft eingesetzt wurden und bei klinischen Isolaten. Auch ALONSO ET AL. (2001) halten eine Ausbreitung von Resistenzgenen durch den Einsatz von Bakterien als „biologische Pestizide“ für möglich.

Die sich durch den Antibiotikaeinsatz im Pflanzenbau ergebende Resistenzproblematik betrifft hauptsächlich Drittländer, die den Antibiotikaeinsatz praktizieren. Da jedoch durch die Öffnung der Märkte der internationale Handel mit pflanzlichen Lebensmitteln verstärkt zunimmt, ist ein Transfer antibiotikaresistenter Bakterien aus diesen Ländern in die europäischen Staaten und so auch nach Deutschland durchaus möglich (BARBOSA UND LEVY, 2000).

## 2 Bakterielle Antibiotikaresistenz

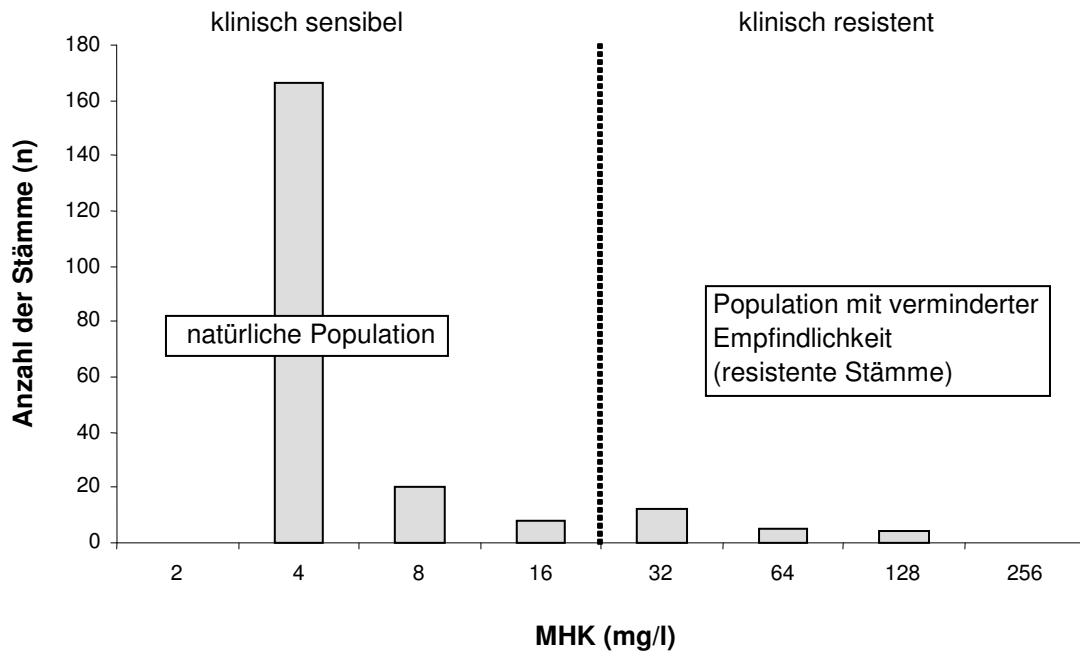
### 2.1 Resistenztypen

#### 2.1.1 Natürliche und erworbene Resistenzen

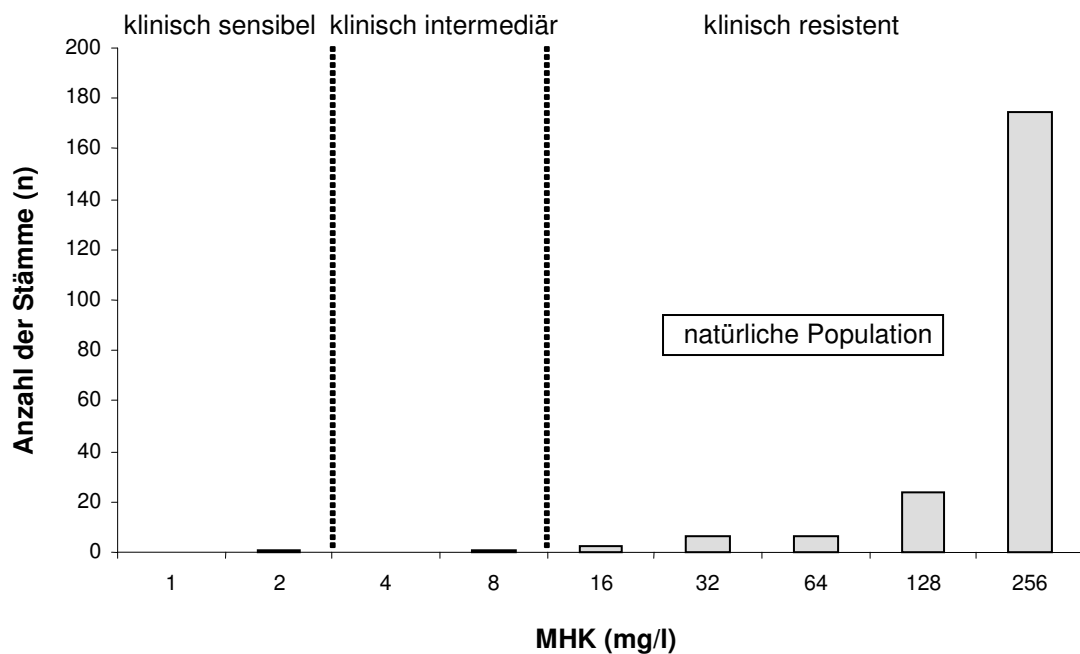
Bei natürlichen Resistenzen (syn. intrinsische Resistenzen) ist die native Population einer Spezies unempfindlich gegenüber einem oder mehreren Antibiotika. Die Spezies liegen also außerhalb des Wirkungsspektrums eines Antibiotikums (STOCK UND WIEDEMANN, 1998). Seit einiger Zeit finden sich Zusammenstellungen zu den natürlichen Resistenzen klinisch wichtiger Bakterienstämme, z. B. bei DUTTA UND DEVRIESE, 1984, KLARE UND WITTE, 1997, DINA ET AL., 2003 und STOCK ET AL., 2005 (vgl. auch Tabelle A 1 im Anhang).

Die natürliche Antibiotikaempfindlichkeit einer Spezies lässt sich anhand von Häufigkeitsverteilungen der minimalen Hemmkonzentrationen (MHKs) bestimmen. Beim Auftrag der MHK eines bestimmten Antibiotikums gegen die Anzahl der Stämme mit entsprechenden MHK-Werten ergibt sich eine bimodale Häufigkeitsverteilung. Stämme, die zum linken Peak gehören (niedrige MHK-Werte), repräsentieren die native Population, die den rechten Peak beschreibenden Stämme (hohe MHK-Werte) repräsentieren die Population mit einer verminderten Empfindlichkeit (sekundär resistente Stämme). Daten über die natürliche Resistenz bzw. Empfindlichkeit werden durch die Untersuchung der MHK-Werte der nativen Population mit Hilfe der klinischen Standards erhalten. Dabei wird festgestellt, ob die MHK-Werte der natürlichen Population oberhalb oder unterhalb der von den Standards – z. B. DIN oder NCCLS - festgelegten Grenzwerte liegen. Ist die native Population nach dem entsprechenden Standard resistent, wird sie als „natürlich (auch: intrinsisch) resistent“ beschrieben (STOCK UND WIEDEMANN, 1998). Abbildung 1 zeigt die Einstufung einer Population als „natürlich sensibel“, Abbildung 2 die Einstufung einer Population als „natürlich resistent“.

Bei erworbenen Resistenzen wird zwischen primären und sekundären Resistenzen unterschieden. Handelt es sich um primäre Resistenzen, sind einzelne Stämme einer gegenüber einem oder mehreren Antibiotika empfindlichen Spezies spontan, ohne Kontakt zum Antibiotikum auftretend, unempfindlich. Die sekundäre Resistenz entsteht während der Behandlung mit einem Antibiotikum durch spontane Mutationen oder wird durch horizontalen Gentransfer erworben (STOCK UND WIEDEMANN, 1998). Zu den Mechanismen des horizontalen Resistenztransfers und der Resistenzentstehung durch Mutationen siehe Abschnitt 2.3.2.



**Abbildung 1:** Einstufung von *P. aeruginosa* (n = 215) gegenüber Streptomycin als „natürlich sensibel“ (in Anlehnung an STOCK UND WIEDEMANN, 1998; die gestrichelten Linien symbolisieren den Breakpoint nach „resistent“ nach NCCLS, 2004)



**Abbildung 2:** Einstufung von *P. aeruginosa* (n = 215) gegenüber Amoxicillin/Clavulansäure als „natürlich resistent“ (in Anlehnung an STOCK UND WIEDEMANN, 1998; die gestrichelten Linien symbolisieren den Breakpoint nach „intermediär“ bzw. „resistent“ nach DIN, 2004)

## 2.1.2 Kreuz- und Coresistenz

Kreuzresistenzen bedeuten das gleichzeitige Auftreten einer Bakterienresistenz gegen Antibiotika der gleichen Gruppe, also gegen strukturell eng verwandte Substanzen. Es werden die einseitige (resistent gegenüber Antibiotikum A => resistent gegenüber Antibiotikum B; aber: resistent gegenüber Antibiotikum B => nicht resistent gegenüber Antibiotikum A) und die mehrseitige (resistent gegenüber Antibiotikum A => resistent gegenüber Antibiotikum B; resistent gegenüber Antibiotikum B => resistent gegenüber Antibiotikum A) Kreuzresistenz unterschieden. So führt beispielsweise die Resistenz gegenüber Ampicillin immer zur Resistenz gegenüber Amoxycillin und umgekehrt, während die Resistenz gegenüber Florfenicol zur Resistenz gegenüber Chloramphenicol, jedoch nicht umgekehrt führt (SIMON UND STILLE, 2000).

Ein weiteres typisches Beispiel für eine Kreuzresistenz ist die durch den Einsatz des Glykopeptid-Leistungsförderers Avoparcin induzierte Vancomycinresistenz bei Enterokokken (WITTE, 1998; FRANZ ET AL., 1999).

Einige Autoren, z. B. STRATTON UND TAUSK (1989), sprechen jedoch auch bei simultan vermittelten Resistenzen gegen nicht-verwandte Substanzen von „Kreuzresistenz“. Hierbei handelt es sich jedoch um so genannte Co-Resistenzen.

Als „Co-Resistenzen“ werden gleichzeitig auftretende Resistenzen gegenüber Antibiotika verschiedener Gruppen bezeichnet. Co-Resistenzen werden vor allem durch transportable genetische Elemente (Transposons, Plasmide) begünstigt, die zu einer Anhäufung von Resistenzgenen gegenüber verschiedenen Antibiotika führen. So isolierten beispielsweise SAENZ ET AL. (2004) aus *E. coli* die Resistenzgene für Ampicillin, Rifampicin, Chloramphenicol, Sulfamethoxazol, Streptomycin und Tetrazyklin. Auch DEFLAUN UND LEVY (1989) beschreiben ein Plasmid, das die genetischen Informationen für drei unterschiedliche Antibiotika (Spectinomycin, Tetrazyklin, Chloramphenicol) bei *Pseudomonas* spp. trägt. Zur Selektion von Co-Resistenzen siehe auch Abschnitt „Coselektion“.

## 2.2 Epidemiologische Grundlagen der Resistenzentstehung

### 2.2.1 Resistenzentstehung

Für die weite Verbreitung antibiotikaresistenter Bakterien und der daraus resultierenden Problematik wird der seit rund 50 Jahren bestehende Einsatz von Antibiotika zu therapeutischen und prophylaktischen Zwecken verantwortlich gemacht (MARTINEZ UND BAQUERO, 2002).

Die Entstehung der Resistenz gegen Antibiotika hat einen evolutionären Hintergrund, der sich aus dem Selektionsvorteil eines resistenten Bakteriums gegenüber einem sensiblen

Bakterium unter Selektionsdruck, z. B. in Anwesenheit von antibiotikaproduzierenden Bakterien ergibt.

Als Ursprung der Resistenzgene werden einerseits antibiotikaproduzierende Mikroorganismen diskutiert, die sich mit Hilfe gencodierter Mechanismen vor einer Schädigung durch selbstproduzierter Antibiotika schützen. Andererseits gelten auch Bakterien, die sich den Lebensraum mit antibiotikaproduzierenden Mikroorganismen, z. B. *Streptomyces* spp. teilen, als mögliche „Genquellen“ (BENVENISTE ET AL., 1973; WEBB UND DAVIES, 1994). So isolierten PANG ET AL. (1994) aus tetrazyklinproduzierenden *Streptomyces rimosus* die Tetrazyklinresistenzgene *otr(A)* und *otr(B)*. MARSHALL ET AL. (1997) gelang der Nachweis von D-Ala-D-Ala-Ligasen – involviert in die Peptidoglykansynthese der Zellwand als Resistenzmechanismus gegen Glykopeptide - in glykopeptidproduzierenden *Amycolatopsis orientalis* und *Streptomyces toyocaensis*, die große Homologie zu den Ligasen VanA und VanB aus vancomycinresistenten Enterokokken zeigten. THOMAS ET AL. (1981) berichten von aminoglykosidproduzierenden Bakterien im Boden, die Streptomycinresistenz bei *Pseudomonas* spp. induzieren.

Die bereits erwähnten „Genquellen“ werden in Arbeiten von SUNDIN ET AL. (1995), HUANG UND BURR (1999) und SCHNABEL UND JONES (1999) beschrieben. Die Autoren isolierten aus boden- und pflanzenassoziierten Bakterien von Flächen, die nicht mit Streptomycin behandelt worden waren, das transferierbare Plasmid pEa34 mit dem Transposon Tn5393, das die Streptomycin-Resistenzgene *str(A)*-*str(B)* trägt. SCHNABEL UND JONES (1999) lokalisierten Tn5393 auch auf Chromosomen. Insbesondere *Pantoea agglomerans* wird von den Autoren als „natürlicher Donor“ des Tn5393 bezeichnet. So beobachteten die Autoren einen häufigen Transfer des Transposons Tn5393 von *Pantoea agglomerans* in *E. amylovora*.

DAVIES (1997) UND ALONSO ET AL. (2001) vermuten dagegen, dass die phänotypische Antibiotikaresistenz lediglich eine Co-Funktion primärer (physiologischer) Funktionen des jeweiligen Gens eines antibiotikumproduzierenden Mikroorganismus darstellt (siehe auch Abschnitt „Co-Selektion“). So entwickelten sich beispielsweise die  $\beta$ -Lactamasen der *Enterobacteriaceae* aus Transpeptidasen, die an der Zellwandsynthese beteiligt sind (ADACHI ET AL., 1992; KNOX ET AL., 1996). Die Multidrug-Efflux-Pumpen AcrAB von an den Intestinaltrakt adaptierten *E. coli* dienen in ihrer ursprünglichen Funktion dem Ausschleusen von Gallensalzen aus der Bakterienzelle, die Effluxsysteme von *P. aeruginosa* vermutlich dem Ausschleusen von in der Zelle synthetisierten Molekülen (ALONSO ET AL., 2001).



## 2.2.2 Antibiotikaabhängige Resistenzselektion

Ein wichtiger Aspekt für die Selektion klinisch resistenter Bakterien ist der des antibiotischen Levels *in vivo*, ab dem eine Selektion resistenter Bakterien zu erwarten ist. Dabei wird die Selektion resistenter Bakterien auch durch die Dauer der Behandlung bestimmt. So berichten BARAKAT UND TRANCEDE (1988), dass die kurzzeitige tägliche Gabe von Oxytetracyclin (1 µg/ml Trinkwasser) keine Resistenz bei *E. coli*-Isolaten aus humaner Intestinalflora bewirkte, während jedoch höhere tägliche Gaben (10 µg/ml) über einen längeren Zeitraum zur Resistenzentwicklung führten. Zu ähnlichen Ergebnissen kam schon einige Jahre zuvor ROLLINS ET AL. (1975) in einem Fütterungsversuch an Hunden, deren Intestinalflora bei Gaben von 10 µg Oxytetracyclin pro Gramm Futter Resistenzen entwickelte, nicht aber bei Gaben von 2 µg/g.

Insbesondere Tetracyclin gilt als Induktor des Transfers resistenzvermittelnder genetischer Elemente. CORPET ET AL. (1989) stellten an gnotobiotischen Mäusen fest, dass eine Tetracyclin-Konzentration von 6,5 mg/l Trinkwasser als minimale selektive Dosis ausreichte, um eine Verzehnfachung der intestinalen *E. coli* mit R-Plasmiden am Tag fünf nach der Inokulation der Donorbakterien in den Intestinaltrakt der Versuchstiere zu bewirken.

BAQUERO ET AL. (1997) definieren als Selektor eine Antibiotikum-Konzentration, die den MHK-Wert der nativen Population überschreitet, aber unter demjenigen der genetisch abweichenden Population liegt. Eine selektive Konzentration muss dabei nicht oberhalb des Breakpoints zur Resistenz liegen, sondern wird ebenfalls häufig im sensiblen Bereich gesehen. Diese Selektion wird jedoch als Ursprung einer Selektion resistenter Populationen betrachtet. So führen aufeinanderfolgende Punktmutationen von *bla*<sub>TEM-1</sub> zu einem Anstieg der MHK-Werte bei *E. coli* gegenüber Cefotaxim von 0,03 µg/ml auf 1 µg/ml. Auch die Fluorchinolonresistenz z. B. bei *Pseudomonas* spp. oder *Enterococcus* spp. entsteht schrittweise durch die Akkumulation mehrerer Mutationen der Gene *gyr(A)* / *gyr(B)* bzw. *par(C)* / *par(E)* (FLUIT ET AL., 2001; NORMARK UND NORMARK, 2002).

## 2.2.3 Co-Selektion

Co-Selektion findet im Allgemeinen statt, wenn sich zwei oder mehr Resistenzgene auf einem mobilen genetischen Element befinden. Als Beispiel ist die häufig gemeinsam vermittelte Resistenz gegenüber Streptomycin und Oxytetracyclin bei *E. amylovora* auf dem Transposon Tn1404 zu nennen (SCHNABEL UND JONES, 1999). Beide Antibiotika wirken dann auch unabhängig voneinander als Selektoren.

Co-Selektion kann auch dann stattfinden, wenn mit den Resistenzgenen strukturell andere Eigenschaften (Virulenzfaktoren) verbunden sind, die Selektionsvorteile für das Bakterium darstellen (ALONSO ET AL., 2001; MARTINEZ UND BAQUERO, 2002). So beschreiben z. B.

PETRIDIS ET AL. (2006) das Shiga-Toxin-Gen *stx(1)*, das gemeinsam mit dem Resistenzgen für Chloramphenicol (*cat*) bei *E. coli* plasmidisch vermittelt wird. Sogenannte Multi-Drug-Efflux-Systeme, die vor allem bei *Enterobacteriaceae* und *Pseudomonas* spp. beschrieben werden, können ebenfalls Co-Selektion bewirken, da sie neben den Antibiotika auch kationische Farbstoffe, Detergentien, Schwermetalle und Desinfektionsstoffe aus der Bakterienzelle ausschleusen (ALONSO ET AL., 2001; RUSSELL, 2003). Aber auch Pflanzenmetaboliten, wie potentiell toxische aromatische Substanzen, z. B. Phytoalexine, können bei pflanzen- und bodenassoziierten Bakterien (z. B. *Pseudomonas* spp.) die Ausbildung von Multi-Drug-Efflux-Systemen und damit auch eine Co-Selektion von antibiotikaresistenten Bakterien bewirken (LI ET AL., 1998; SEGURA ET AL., 1999). Ein weiteres typisches Beispiel für Co-Selektion liefert LIVERMORE (2000) bei *P. aeruginosa*. Dort führt die Mutation des *nal(B)*-Gens im *mexR*-Locus – durch die Anwesenheit von Fluorochinolonen - zur Expression des Multi-Drug-Effluxsystems MexAB-OprM. Dies bewirkt wiederum den Efflux von Ureidopenicillinen, Cef-tazidim und Meropenem.

Multi-Drug-Transporter können sowohl plasmidisch vermittelt werden als auch chromosomal verankert sein. Insbesondere bei *Pseudomonas* spp. stellen chromosomal codierte Multi-Drug-Transporter die molekulare Grundlage für eine Vielzahl intrinsischer Resistenzen dar (HANCOCK, 1998; SCHWEIZER, 2003).

#### **2.2.4 Verbleib der Antibiotikaresistenz in Abwesenheit des Selektionsdrucks**

Von einer Abnahme der Antibiotikaresistenz in Folge eines geringeren Einsatzes eines Wirkstoffs berichten beispielsweise VAN DEN BOGAARD UND STOBBERINGH (2000) bei vancomycin-resistenten Enterokokken. Auf der anderen Seite wird von Bakterien berichtet, die auch nach der Entfernung eines Wirkstoffs, z. B. Streptomycin, Resistenz zeigen (CHIEW ET AL., 1998; GILLESPIE, 2001). Begründet wird die Reversion der Resistenz durch potentielle Einschränkungen der natürlichen Fitness eines Bakteriums aufgrund des Resistenzenerwerbs. Mutationen im Bakteriengenom sowie der Erwerb von Plasmiden zur Ausbildung von Antibiotikaresistenzen verschaffen dem Bakterium unter der Anwendung von Antibiotika Selektionsvorteile, gehen jedoch zu Lasten physiologischer Prozesse im Bakterium, denn die Zielmoleküle der Antibiotika (z. B. DNA-Gyrase, RNA Polymerase, Ribosomen) sind für den Stoffwechsel und damit das Bakterienwachstum essentiell (GILLESPIE, 2001; NORMARK UND NORMARK, 2004). Veränderungen im Bakteriengenom können also in der Abwesenheit des Antibiotikums bzw. dessen Selektionsdrucks einen Verlust der natürlichen Fitness eines resistenten Bakteriums bewirken. So kann z. B. durch den Erwerb neuer genetischer Bausteine bzw. für die Aufrechterhaltung dadurch bedingter physiologischer Prozesse zusätzliche Energie benötigt werden (ANDERSSON UND LEVIN, 1999; BJÖRKMAN UND ANDERSSON, 2000; ANDERSSON,

2003). Die Wachstumsrate resistenter Bakterien ist damit häufig geringer als die der sensiblen Bakterien (LENSKI, 1998; LEVIN ET AL., 2000).

Die Reversion der Antibiotikaresistenz ist möglich durch den Selektionsvorteil sensibler Bakterien gegenüber den nun in antibiotikafreiem Medium „benachteiligten“ resistenten Bakterien (LEVIN ET AL., 1997). Auf der anderen Seite kann der Verlust der relativen Fitness eines (nun resistenten) Bakteriums gegenüber der Ursprungspopulation durch weitere Mutationen derart kompensiert werden, dass diese (resistenten) Bakterien sogar einen evolutionären Vorteil gegenüber der ursprünglichen (sensiblen) Population erlangen und daher zum Teil über viele Generationen die Resistenz aufrechterhalten können (SCHRAG ET AL., 1997; BJÖRKMAN UND ANDERSSON, 2000; LIPSITCH, 2001; MARTINEZ UND BAQUERO, 2002).

So berichteten BOUMA UND LENSKI (1988) von einem *E. coli*-Stamm, bei dem der Erwerb eines Tetrazyklinresistenzgen-tragenden Plasmids zunächst die natürliche Fitness dieses Bakteriums reduzierte, jedoch nach 500 Generationen durch kompensatorische Mutationen eine Steigerung der Fitness festzustellen war. SCHRAG ET AL. (1997) stellten fest, dass streptomycinresistente *E. coli*-Stämme nach kompensatorischen Mutationen auch nach 10.000 Generationen noch resistent waren, obwohl diese Stämme keinem Selektionsdruck durch das Antibiotikum ausgesetzt waren. Auch SUNDIN UND BENDER (1996) stellten eine hohe Persistenz der Streptomycinresistenz in Verbindung mit dem Transposon Tn5393 fest und vermuteten, dass der Erwerb von Plasmiden mit dem Transposon Tn5393 keine Beeinträchtigung der natürlichen Fitness bewirkte.

Die Reversibilität von Antibiotikaresistenzen hängt demnach von den Nachteilen einer Bakterienpopulation ab, die sie aufgrund des Resistenzerwerbs erlangen bzw. von der Fähigkeit der Bakterienpopulation die erworbenen Nachteile durch Mutationen zu kompensieren (NORMARK UND NORMARK, 2002). AUSTIN ET AL. (1999) zeigten in einem mathematischen Modell, dass der Prozess des Resistenzverlusts durch Verzicht auf das entsprechende Antibiotikum (in Abhängigkeit der Generationszeit der Bakterien) jedoch um ein Vielfaches länger andauert als der Erwerb der Resistenz. Die resensible Population wird sich jedoch auch nur dann gegenüber der resistenten Population durchsetzen, wenn der Resistenzverlust einen Vorteil in der natürlichen Fitness des resensiblen Bakteriums gegenüber dem resistenten Bakterium darstellt.

### **2.3 Molekulare Grundlagen der Resistenzentstehung**

Resistenzen entstehen de novo durch Mutationen im Bakteriengenom oder werden durch horizontalen Gentransfer erworben, der die für das Bakterium effektivere und damit häufigere Variante der Resistenzentstehung insbesondere bei den  $\beta$ -Lactamantibiotika und den

Aminoglykosiden darstellt (DAVIES, 1994; WATERS, 1999; MARTINEZ UND BAQUERO, 2000; NORMARK UND NORMARK, 2002).

### 2.3.1 Mutationen

Mutationen, die zur Antibiotikaresistenz führen, können sowohl struktureller als auch regulatorischer Art sein. Die strukturellen Veränderungen werden dabei durch den Austausch, die Addition oder Deletion einzelner Nukleotide verursacht und können eine Veränderung der Zielmoleküle („target alteration“) für das Antibiotikum bewirken (MURRAY, 1998). Beispiel für eine strukturelle Mutation ist das der Gene *gyr(A) / gyr(B)* bzw. *par(C) / par(E)*, die die Resistenz gegenüber Fluorchinolonen bewirkt. Die genannten Gene codieren gewöhnlich für DNA-Gyrase (v. a. bei gramnegativen Bakterien) bzw. für Topoisomerase (v. a. bei grampositiven Bakterien) – den Angriffsorten der Fluorquinolone. Mutationen in der so genannten Quinolone Resistance Determining Region (QRDR) des Bakteriengenoms bewirken eine Modifikation der Bindungsstelle der DNA-Gyrase bzw. der Topoisomerase, so dass Fluorquinolone nicht mehr binden können, was letztlich zur Resistenz führt (FLUIT ET AL., 2001).

Resistenzgene werden durch regulatorische Gene (Repressorgene) kontrolliert. Auch Mutationen dieser „Kontrollgene“ können eine Überexpression des Resistenzgens bewirken. Die Mutation der Repressorgene *mexR* und *nfxB* in *P. aeruginosa* führen zum Beispiel zu einer Überexpression der Effluxgene *mexAB-oprM* und *mexCD-oprM* mit der Folge einer Vielzahl an Effluxpumpen, die die Ausschleusung des Antibiotikums aus der Bakterienzelle bewirken (POOLE ET AL., 1996; EVANS ET AL., 2001). Bei *Enterobacter cloacae* und *Citrobacter freundii* bewirken Mutationen von *ampD* eine dauerhafte Aktivierung von AmpR durch Akkumulation von Muropeptiden im Cytosol, die wiederum eine konstitutive Überproduktion von AmpC- $\beta$ -Lactamase auch in Abwesenheit von  $\beta$ -Lactamen bewirkt (HANSON UND SANDERS, 1999). LECLERC ET AL. (1996) beobachteten außerdem, dass Mutationen in obligat humanpathogenen Bakterien - als Folge des dort herrschenden Selektionsdrucks - häufiger stattfinden als in fakultativ pathogenen, ubiquitär vorkommenden Bakterien.

### 2.3.2 Horizontaler Gentransfer

Die Mobilisation genetischen Materials zwischen Bakterienzellen wird durch externe Stressoren, z. B. die Anwesenheit von Antibiotika, Schwermetallen oder auch Pflanzenmetaboliten, induziert und/oder beschleunigt (TORRES ET AL., 1991; SALYERS ET AL., 1995; ALONSO ET AL., 2001). So beobachteten z. B. TROXLER ET AL. (1997) und ESPINOSA-URGEL (2004), dass der konjugative Transfer des Transposons Tn5 zwischen *P. fluorescens* und *P. aeruginosa* in Pflanzenwurzelnähe beschleunigt wurde, während er gar nicht stattfand oder verringert wurde, wenn sich diese Bakterien im wurzelfreien Boden befanden.

Insbesondere Tetrazyklin gilt als Induktor des Resistenzgen-Transfers zwischen Bakterien (SALYERS ET AL., 1995; WATERS, 1999). Dies beobachteten beispielsweise auch CORPET ET AL. (1989), wie bereits unter „Antibiotikaabhängige Selektion“ beschrieben.

Die Übertragung von Antibiotikaresistenzgenen von einer Bakterienzelle auf eine andere kann durch verschiedene Resistenztransfermechanismen erfolgen. Genetische Elemente, die durch horizontalen Gentransfer übertragen werden, sind Plasmide und Transposons mit den darauf befindlichen Integrons bzw. Gencassetten.

Plasmide sind zirkuläre, extrachromosomal gelegene genetische Elemente (DNA), die in einer Bakterienzelle auch in mehrfacher Kopienzahl auftreten können. Jedoch sind nicht alle Plasmide konjugativ transferierbar. Nichtkonjugative Plasmide können allerdings auch in Verbindung mit einem konjugativen Plasmid co-transferiert werden. Weiterhin wird zwischen sogenannten „narrow-host-range“-Plasmiden und „broad-host-range“-Plasmiden unterschieden. Während „narrow-host-range“-Plasmide nur zwischen beispielsweise *Enterobacteriaceae* transferiert werden, können „broad-host-range“-Plasmide auch zwischen *Enterobacteriaceae* und anderen, nicht-enterischen Bakterien transferiert werden. Typisches Beispiel für ein „broad-host-range“ Plasmid ist das des Plasmids RK2 mit dem  $\beta$ -Lactamase-Gen *bla*<sub>TEM</sub>, das sowohl aus *E. coli* und *K. pneumoniae* als auch aus *Pseudomonas* spp., *Neisseria* spp. und *Haemophilus* spp. isoliert wurde (WATERS, 1999). Einige Bakterien, wie *E. coli*, können außerdem mehrere Plasmide unterschiedlicher Herkunft aufnehmen und gelten damit als Reservoir für übertragbare Antibiotika-Resistenzgene (KRUSE UND SØRUM, 1994; SZCZEPANOWSKI ET AL., 2002; SAENZ ET AL., 2004).

Transposons sind bewegliche genetische Elemente, die sowohl auf Plasmiden als auch auf chromosomaler DNA lokalisiert sein können. So ist beispielsweise das Transposon Tn5393, das das Resistenzgen für Streptomycinresistenz (*str*(A)-*str*(B)) trägt, bei *E. amylovora* gewöhnlich auf dem Plasmid pEa34 lokalisiert (MCMANUS UND JONES, 1994). Darüber hinaus können Transposons auch ohne Lokalisierung auf einem Plasmid von einer Bakterienzelle in eine andere konjugativ transferiert werden (NORMARK UND NORMARK, 2002). Transposons besitzen die Fähigkeit sich innerhalb des Chromosoms und von chromosomaler auf plasmidische DNA zu bewegen (RICE UND BONOMO, 1996; WATERS, 1999). So sahen CARIAS ET AL. (1998) das *van*(B)-Gen bei *E. faecium* auf dem konjugativen Transposon der Tn961-Familie lokalisiert, das gemeinsam mit dem mutierten Gen *pbp5* in die chromosomale DNA integriert war.

Integrons und die darauf befindlichen Gencassetten sind ebenfalls bewegliche genetische Elemente, die auf Plasmiden oder Chromosomen lokalisiert sein können. Gencassetten bestehen aus Genen, die zirkulär frei im Bakterium vorliegen können. Da jedoch nicht alle Gencassetten einen Promotor besitzen, werden sie nicht transkribiert und müssen zunächst

durch die Integrase der Integrons (mit Promotor) in diese eingebaut werden. Ein Integron kann mehrere Genkassetten integrieren und damit Resistenzen gegen mehrere Antibiotika tragen (FLUIT UND SCHMITZ, 1999; WHITE ET AL., 2001). Zudem kann das Arrangement der eingebauten Gene durch die Integrase (IntI1) jederzeit verändert werden, so dass promotorferne Gene in den promotornahen Bereich gelangen und dann stärker exprimiert werden können (FLUIT UND SCHMITZ, 1999).

Integrons können mit den mobilen Plasmiden und Transposons transferiert werden, so wurden beispielsweise Integrons der Klasse 1 auf Transposons der Tn21-Familie festgestellt (FLUIT ET AL., 2001; PARTRIDGE ET AL., 2001; GRAPE ET AL., 2005). Integrons stellen also ein bedeutendes System für die Verbreitung von Resistenzgenen vor allem bei gramnegativen Bakterien dar, wurden aber auch bei grampositiven Bakterien beschrieben (SUNDSTROM, 1998; ROWE-MAGNUS UND MAZEL, 1999). In Verbindung mit Integrons und den darauf befindlichen Gencassetten werden häufig die Resistenzgene für  $\beta$ -Lactame und Aminoglykoside beschrieben, was die weite Verbreitung dieser Resistenzen bei *Enterobacteriaceae* erklärt. Darüber hinaus wurden in der Vergangenheit zunehmend auch die Resistenzen gegen Sulfonamide, Chloramphenicol, Erythromycin, Rifampicin und Carbapeneme sowie gegen einzelne Desinfektionsmittel auf Gencassetten beobachtet (FLUIT UND SCHMITZ, 1999; WELDHA-GEN, 2004).

Für den Transfer von genetischem Material von Bakterienzelle zu Bakterienzelle sind prinzipiell drei Mechanismen bekannt (vgl. auch Abbildung 3).

### Konjugation

Die Konjugation (vermittelt durch Cytoplasmabrücken und bakterielle Pheromone) ermöglicht den Bakterienzellen den direkten Austausch des genetischen Materials über Zell-zu-Zell-Kontakt. Dabei werden häufig Plasmide oder Transposons ausgetauscht, die neben dem Gen für die jeweilige Antibiotikaresistenz auch weitere genetische Informationen tragen, beispielsweise die Toleranz gegenüber Quecksilber (NORMARK UND NORMARK, 2002). Die Fähigkeit zur Konjugation ist in der *tra* Region eines Plasmids in Form der sogenannten *traT* Gene lokalisiert, kann aber auch chromosomal codiert sein (MARTINEZ UND BAQUERO, 2002). Darüber hinaus induzieren bakterielle Pheromone die Konjugation von Bakterien (CLEWELL, 1993).

Eine Konjugation ist auch zwischen unterschiedlichen Genera möglich. So beschreiben SALYERS ET AL. (1995) beispielsweise das Transposon Tn916, das das *tet(M)*-Gen in grampositiven Bakterien trägt, auch in gramnegativen Bakterien. Auch ein Plasmid-Transfer von *E. coli* in grampositive Bakterien ist möglich (TRIEU-CUOT ET AL., 1987); allerdings wird der Transfer von gramnegativen Bakterien in grampositive Bakterien seltener als umgekehrt beobachtet (COURVALIN, 1994). Konjugation wurde außerdem beobachtet zwischen Bakterien-

zellen und Hefezellen (HEINEMANN UND SPRAGUE, 1989), zwischen Bakterienzellen und Zellen von Säugetieren (WATERS, 2001) sowie zwischen Bakterienzellen und Pflanzenzellen (ZAMBRYSKI, 1992). Das Vorkommen und die Häufigkeit solcher Konjugationen hängen jedoch stark von der Stabilität einer solchen Bindung sowie den Umweltbedingungen ab (WATERS, 1999).

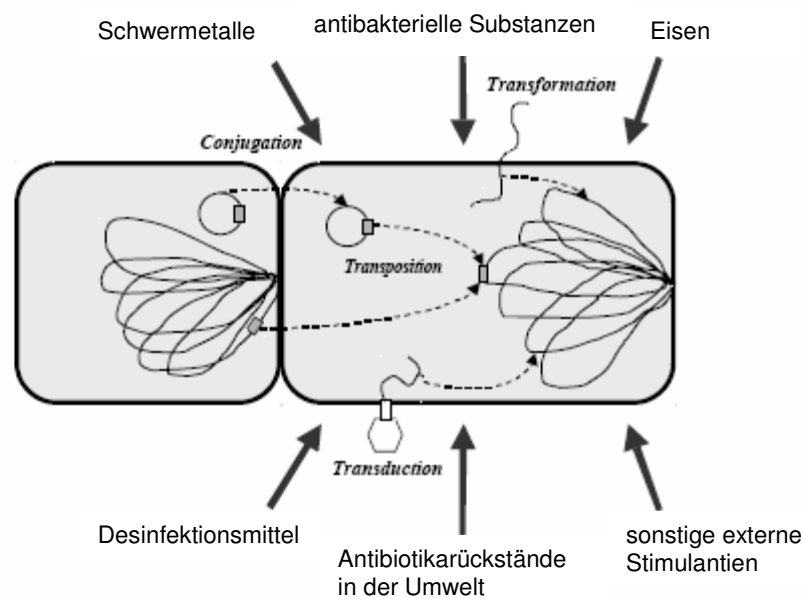
### Transduktion

Bei der Transduktion schleusen Bakteriophagen ihr Genom in das der Bakterienzelle, die ihnen als Wirtszelle dient, ein und nutzen den Replikationsapparat der Bakterienzelle zur Vermehrung. Dieser Mechanismus ermöglicht die Übertragung von genetischem Material von einer Wirtszelle auf eine andere (SALYERS ET AL., 1995; WATERS, 1999). So wird beispielsweise das *bla*-Gen, das oftmals auf Plasmiden lokalisiert ist und die Produktion von  $\beta$ -Lactamasen und somit die Resistenz gegenüber Benzylpenicillin und Ampicillin codiert, häufig durch Transduktion von resistenten auf sensible Stämme übertragen (NORMARK UND NORMARK, 2002). Transduktion wurde bei *Salmonella* spp. als häufiger Transfermechanismus für Antibiotikaresistenzen beobachtet (SCHMIEGER UND SCHICKLMAIER, 1999), PETRIDIS ET AL. (2006) beschreiben Transduktion auch bei *E. coli*, während sie von TENOVER (2006) als seltener Transfermechanismus für Antibiotikaresistenzen eingeschätzt wird. Neben der Häufigkeit dieses Ereignisses ist jedoch die Transferrate je Organismus entscheidend für den Austausch genetischen Materials. So wurden bei der Transduktion Transferraten von  $10^{-10}$  bis  $10^{-6}$  je Mikroorganismus beobachtet (PETRIDIS ET AL., 2006), womit die Konjugation mit Raten von  $10^{-2}$  bis  $10^{-1}$  der Transduktion hinsichtlich ihrer Effektivität deutlich überlegen ist (WATERS, 1999).

### Transformation

Bei der Transformation wird freie, außerhalb der Bakterienzelle vorliegende DNA in die Zelle aufgenommen. Diese Fähigkeit wurde bei verschiedenen Bakterienarten, wie *E. coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus* spp. oder *Pneumococcus* spp. beobachtet (DAVIS, 1990; WATERS, 1999; NORMARK UND NORMARK, 2002), während andere Bakterienarten, wie *Erwinia amylovora* nicht zur Transformation befähigt sind (SCHNABEL UND JONES, 1999). Die Transformation ist dabei im Wesentlichen von der Stabilität der DNA in der Umwelt abhängig. Sie wird außerdem von WATERS (1999) als weniger effizient beschrieben als die Konjugation, weil bei der Konjugation größere DNA-Segmente transferiert werden als bei der Transformation. KRUSE UND SØRUM (1994) beschreiben Transduktion und Transformation vor allem in aquatischer Umgebung.

Abbildung 3 stellt die Mechanismen des horizontalen Gentransfers und die Induktoren für den Gentransfer schematisch dar.



**Abbildung 3: Mechanismen des horizontalen Gentransfers und induzierende Stimulantien (BARBOSA UND LEVY, 2000)**

## 2.4 Resistenzmechanismen unter besonderer Berücksichtigung der Tetracyclinresistenz

Antibiotika müssen in ausreichenden Mengen bis zum Ort der molekularen Wirkung penetrieren, um wirken zu können. Weiterhin müssen sie mit dem Wirksubstrat in Kontakt kommen und dürfen nicht von inaktivierenden Enzymen der Bakterien verändert oder abgebaut werden. Tetracycline zum Beispiel binden an die 30S-Untereinheit des Ribosoms, die als Bindungsstelle für die Aminosäure beladene aa-tRNA (Aminoacyl-tRNA) fungiert. Die Verknüpfung der Aminosäuren zu Ketten und damit die Proteinsynthese wird so verhindert (CHOPRA UND ROBERTS, 2001).

Bakterien können sich durch verschiedene Mechanismen der Wirkung der Antibiotika entziehen. Prinzipiell können diese Resistenzmechanismen auf drei Strategien zurückgeführt werden, diese sind eine verringerte intrazelluläre Akkumulation der Wirkstoffe, eine Modifikation der Wirkstoffe durch Enzyme und eine Veränderung der Targetstrukturen (MURRAY, 1998; CHOPRA UND ROBERTS, 2001; FLUIT ET AL., 2001; POOLE, 2002; SCHWEIZER, 2003). In Tabelle 4 sind die unterschiedlichen Mechanismen der Antibiotikaresistenz bei verschiedenen Wirksubstraten zusammengefasst.



**Tabelle 4: Wichtige Mechanismen der Antibiotika-Resistenz (RICE UND BONOMO, 1996; MURRAY, 1998; CHOPRA UND ROBERTS, 2001; FLUIT ET AL., 2001; WRIGHT, 2005)**

Wirkstoffklasse	Verringerte Akkumulation		Veränderung der Targetstruktur	Modifikation durch Enzyme
	Efflux	verringerte Permeabilität		
Aminoglykoside		+	+	+
β-Lactam-Antibiotika	+	+	+	+
Chloramphenicol	+		+	+
Fluorchinolone	+	+	+	
Fosfomycin		+	+	+
Glykopeptide		+*	+	
Lincosamide		+	+	+
Makrolide	+	+	+	+
Nitroimidazole		+		
Oxazolidinone			+	
Quinupristin/Dalfopristin	+		+	+
Rifampicin			+	+
Sulfonamide		+		
Tetrazykline	+		+	+

+: beobachteter Resistenzmechanismus; \* nur bei Vancomycin

Häufige Resistenzmechanismen der Bakterien gegenüber den Tetrazyklinen sind aktiver Efflux und die Ausbildung ribosomaler Schutzproteine, die die Bindung der Tetrazykline an das Ribosom verhindern. Efflux ist vor allem bei gramnegativen Bakterien weit verbreitet, während ribosomale Schutzproteine sich ursprünglich häufig bei grampositiven Bakterien finden, neuerdings auch bei gramnegativen Bakterien isoliert werden (SALYERS ET AL., 1995; CHOPRA UND ROBERTS, 2001; FLUIT ET AL., 2001; ROBERTS, 2005).

#### 2.4.1 Verringerte intrazelluläre Akkumulation des Antibiotikums

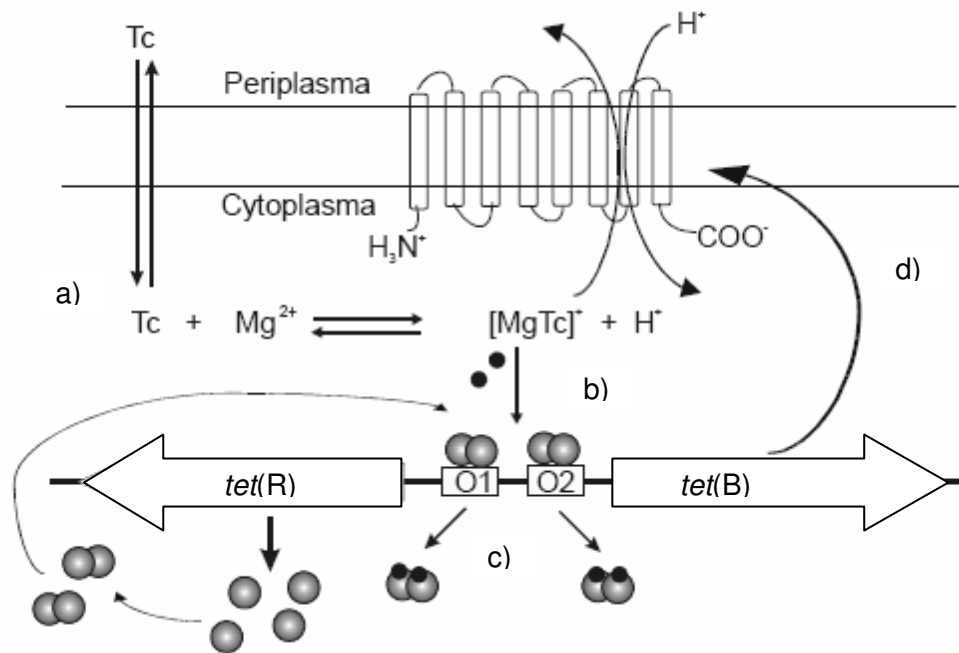
##### Antibiotika-Efflux

Antibiotika-Efflux ist die aktive, also unter Energieverbrauch ablaufende Ausschleusung von Antibiotika aus der Bakterienzelle mit der Folge, dass eine Hemmung der bakteriellen Proteinsynthese durch Tetrazyklin verhindert wird (ROBERTS, 1996). Der Tetrazyklin-Efflux erfolgt durch den Austausch eines Tetrazyklin-Kation-Komplexes gegen ein Proton (CHOPRA UND ROBERTS, 2001). Die Ausschleusung der Antibiotika kann außerdem durch spezifische oder generalisierte („multidrug“) Transportsysteme erfolgen. Insbesondere gramnegative Bakterien, hier vor allem *P. aeruginosa*, besitzen zahlreiche Multidrug-Efflux-Systeme (Mex) (STRATTON UND TAUSK, 1989; SINGH ET AL., 2002; SCHWEIZER, 2003; PALLERONI, 2005).

Multidrug-Efflux-Systeme bestehen aus drei membranassoziierten Proteinen, die strukturell und funktional miteinander verbunden sind und sich aus einer energieabhängigen „Pumpe“ in der zytoplasmatischen Membran (RND: resistance-nodulation-cell division), aus einem Effluxprotein in der äußeren Zellwand (OMF: outer membrane factor) sowie einem beide Proteine verbindenden Protein (MFP: membrane fusion protein) zusammensetzen (POOLE UND SRIKUMAR, 2001; POOLE, 2004).

Beispiele für Tetrazyklinresistenzgene, die Efflux-Proteine codieren, sind *tet(A)* und *tet(B)* vor allem bei gramnegativen und *tet(K)* und *tet(L)* bei grampositiven Bakterien (vgl. auch Tabelle 5). Bei gramnegativen Bakterien werden Tetrazyklin-Effluxgene am häufigsten beschrieben (ROBERTS, 2005).

Die Ausbildung von Efflux-Proteinen für die Tetrazyklinresistenz ist streng reguliert, da eine ständige Aufrechterhaltung des Protonenaustausches entgegen dem Konzentrationsgefälle ein Zusammenbrechen des Membranpotentials zur Folge hätte. Effluxdeterminanten für Tetrazyklin bestehen daher aus zwei Genen (Efflux-Gen und Repressor-Gen), die durch Tetrazykline reguliert werden. Beide Gene befinden sich an einer zentralen Regulatorregion mit überlappenden Promotor und Operator. Befindet sich kein Tetrazyklin in der Zelle, so wird die Transkription beider Gene durch das Repressor-Protein, das an tet-Operatoren gebunden ist, gehemmt. Tetrazyklin besitzt allerdings eine höhere Affinität zum Repressor als zur ribosomalen Bindungsstelle. So bindet der in die Zelle eintretende Tetrazyklin-Mg<sup>2+</sup>-Komplex bevorzugt an den Repressor. Damit wird eine Bindung des Repressors an die Operatoren nicht mehr möglich, was aber zur Transkription des tet-Gens und des Repressorgens führt. Das entstandene Effluxprotein bewirkt dann den Efflux von Tetrazyklin. Bei einem sinkenden Gehalt an Tetrazyklin in der Bakterienzelle kommt es jedoch wieder zu einer Konformitätsänderung des Repressors und einer Bindung des Repressors an den Operator (CHOPRA UND ROBERTS, 2001). Abbildung 4 zeigt den Tetrazyklin-Efflux und seine Regulation am Beispiel von *tet(B)*.



**Abbildung 4: Genetische Organisation und Mechanismus der Regulation des Tetrazyklin-Efflux durch *tet(B)* (modifiziert nach HILLEN UND BERENS, 1994)**

- a) Tetrazyklin (Tc) gelangt in neutraler Form in die Zelle, in der der  $TcMg^{2+}$ -Komplex entsteht.  
 b) Dieser Komplex inaktiviert den *tet*-Repressor, der von *tet(R)* codiert wird und als Dimer an die *tet* Operatoren *O1* und *O2* gebunden ist.  
 c) Die Bindung des  $TcMg^{2+}$  an den *tetR*-Operator-Komplex bewirkt eine Konformitätsänderung und in Folge dessen eine Lösung des Repressors von der DNA. Damit wird der Operator für die Transkription von *tet(B)* frei, was zur Ausbildung der Effluxproteine führt (d).

#### Veränderung der Zellwandpermeabilität

Einige Bakterienarten, vor allem gramnegative Bakterien, wie *Pseudomonas* spp., besitzen eine relativ geringe Permeabilität der Zellwand für Antibiotika, so dass die Aufnahme der Antibiotika in das Zellinnere und damit ihre Wirkung, z. B. Bindung an Ribosomen, verhindert wird (HANCOCK, 1998; SCHWEIZER, 2003). Obwohl die Permeabilität der Zellwand in erster Linie durch den natürlichen Aufbau der Zellwand bedingt ist, wurden in den vergangenen Jahren zunehmende Veränderungen der Zellwandpermeabilität unter Antibiotikaeinfluss beobachtet. Insbesondere *P. aeruginosa* besitzt die Fähigkeit sogenannte „porin proteins“ (Porinkanäle) zu verändern und damit die Aufnahme einzelner Antibiotika zu verhindern (POOLE UND SRIKUMAR, 2001; SCHWEIZER, 2003). So beschreiben z. B. BÜSCHER ET AL. (1987) und TRIAS UND NIKAIDO (1990) bei Imipenem-resistenten *P. aeruginosa* eine signifikante Reduktion des porin proteins Opr D2 in der äußeren Membran.

### 2.4.2 Veränderung der Targetstruktur

Ein weiterer Resistenzmechanismus besteht in der Veränderung der Zielmoleküle (sog. „target alteration“). Dabei werden die Zielmoleküle des Antibiotikums so verändert, dass das Antibiotikum nicht mehr an das Molekül binden kann und damit unwirksam wird. Dies kann entweder durch eine Modifikation der Zielmoleküle oder, im Falle der Penicillin-Bindeproteine, durch deren Überproduktion erfolgen (MURRAY, 1998; HERSHBERGER ET AL., 2004). Eine Überproduktion der Zielmoleküle ist für die Bakterienzelle insofern ein Vorteil, als der Stoffwechsel weitergeführt werden kann, während eine Modifikation eine Einschränkung der Fitness eines Bakteriums zur Folge haben kann (ANDERSSON, 2003).

Häufig isolierte Gene, die Ribosomenschutzproteine codieren, sind z. B. die Tetrazyklinresistenzgene *tet(M)* und *tet(O)* (vgl. auch Tabelle 5) (CHOPRA UND ROBERTS, 2001; ROBERTS, 2005). Der Ribosomenschutz erfolgt durch die Freisetzung der Tetrazykline von den Ribosomen in Anwesenheit von GTP, so dass die Aminoacyl-tRNA wieder an die A-Site des Ribosoms binden kann und die Proteinsynthese fortgesetzt wird, was normal durch Tetrazyklin gehemmt wird (CONNELL ET AL., 2003). Untersuchungen von DANTLEY ET AL. (1998) zeigen, dass das Protein Tet(M) und der Elongationsfaktor EF-G um die gleiche Bindungsstelle (A-Site) am Ribosom konkurrieren, die auch die Bindungsstelle für Tetrazykline darstellt. Die Bindung des ribosomalen Schutzproteins Tet(M) an die A-Site des Ribosoms bewirkt Konformitätsveränderungen, so dass Tetrazyklin nicht mehr binden kann und die Proteinbiosynthese fortgesetzt wird (CONNELL ET AL., 2003).

### 2.4.3 Modifikation oder Hydrolyse des Antibiotikums durch Enzyme

Bakterien können durch die Produktion von Enzymen die Wirksamkeit der Antibiotika verändern. Die Enzyme spalten oder modifizieren die antibiotischen Wirkstoffe. Als Beispiel seien hier die  $\beta$ -Lactamasen, wie AmpC, TEM-1 oder SHV-1, zahlreicher Organismen genannt, die  $\beta$ -Lactamantibiotika hydrolysieren und sie damit unwirksam machen (STRATTON UND TAUSK, 1989; MURRAY, 1998; BLACK ET AL., 2005).  $\beta$ -Lactamasen hydrolysieren dabei den  $\beta$ -Lactamring von Penicillinen und Cephalosporinen. Vor allem die so genannten Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamasen (ESBLs) der gramnegativen Bakterien, stellen mittlerweile einen klinisch sehr bedeutenden Resistenzmechanismus dar, weil sie insbesondere bei den *Enterobacteriaceae* weit verbreitet sind und zu teils hohen Resistenzraten gegenüber verschiedenen  $\beta$ -Lactamen führen (THEURETZBACHER, 1998; WRIGHT, 2005).

Als weitere Beispiele sind zu nennen die Aminoglykosid-Acetyltransferasen (AACs) oder die Chloramphenicol-Acetyltransferasen (CATs), die die Aminoglykoside bzw. Chloramphenicol acetylieren. Aminoglykosidkinasen (APHs) phosphorylieren Aminoglykoside, so dass diese nicht mehr an die Ribosomen binden können (WRIGHT, 2005).

Bei den Tetrazyklinen sind bisher nur drei Determinanten für die enzymatische Modifikation bekannt. *Tet(X)* und *tet(37)* codieren Oxidoreduktase, die Tetrazyklin in Anwesenheit von Sauerstoff und NADPH inaktiviert, während *tet(34)* eine Xanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase codiert. Tetrazyklinmodifizierende Enzyme werden jedoch selten beobachtet (ROBERTS, 2005).

**Tabelle 5: Mechanismen der Tetrazyklinresistenz und ihre Determinanten bei verschiedenen Bakterienarten (ROBERTS ET AL., 1993; PANG ET AL., 1994 A; ROBERTS ET AL., 1996; LEVY ET AL., 1999; ROBERTS, 2005)**

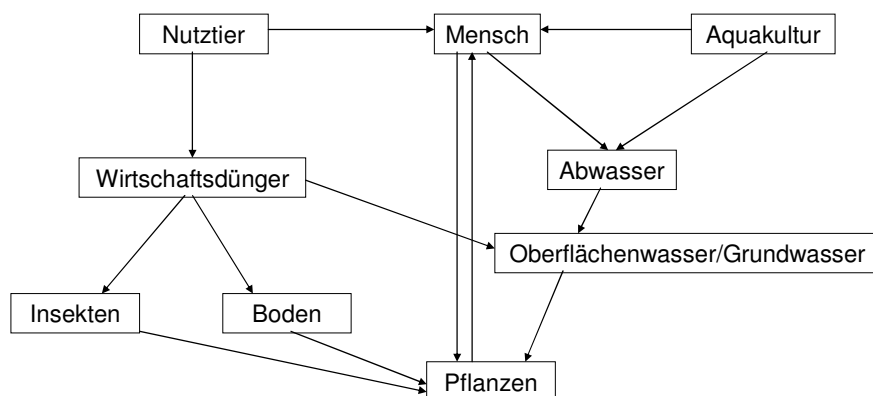
Protein/Mechanismus	Tet-Gene	Bakterienarten
Efflux	<i>tet(A)</i> , <i>tet(B)</i> , <i>tet(C)</i> , <i>tet(D)</i> , <i>tet(E)</i> , <i>tet(G)</i> , <i>tet(H)</i> , <i>tet(I)</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>tetA(P)</i> , <i>tet(30-33)</i> , <i>tet(35)</i> , <i>tet(38,39)</i> , <i>otr(B)</i> , <i>otr(C)</i> , <i>tcr(3)</i>	<i>Escherichia</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Providencia</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Stenotrophomonas</i> , <i>Staphylococcus</i>
Ribosomenschutz	<i>tet(M)</i> , <i>tet(O)</i> , <i>tetB(P)</i> , <i>tet(Q)</i> , <i>tet(S)</i> , <i>tet(T)</i> , <i>tet(W)</i> , <i>tet(32)</i> , <i>tet(36)</i> , <i>otr(A)</i>	<i>Enterobacter</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Listeria</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Bacteroides</i>
inaktivierende Enzyme	<i>tet(X)</i> , <i>tet(34)</i> , <i>tet(37)</i>	<i>Pseudomonas</i> , <i>Serratia</i> , <i>Bacteroides</i>
unbekannt	<i>tet(U)</i>	

### 3 Bedeutung ausgewählter Bakteriengattungen im Resistenztransfer

#### Zur Bakterienflora in pflanzlichen Lebensmitteln

Ein Großteil der Bakterien in pflanzlichen Lebensmitteln besteht aus ubiquitär vorkommenden Keimen, die zur Mikroflora von Boden und Pflanzen zählen (MÜLLER ET AL., 2001; OTT ET AL., 2001). So gehören beispielsweise lactosenegative *Enterobacteriaceae* (v. a. *Erwinia* spp.) und aerobe Bakterien, wie *Pseudomonas* spp., *Xanthomonas* spp. und *Flavobacterium* zur natürlichen äußeren Flora des Getreidekorns (KRÄMER, 2002). *Enterococcus raffinosus*, *E. casseliflavus* und *E. mundtii* wurden als Bestandteile der natürlichen Mikroflora von verschiedenen Gräsern isoliert (MÜLLER ET AL., 2001; OTT ET AL., 2001). Enterobakterien, wie *E. coli*, *E. faecalis* und *E. faecium* gehören dagegen zur Normalflora des Gastrointestinaltraktes und können mit den *Faeces* in die Umwelt gelangen, z. B. über Klärschlamm, Abwasser und Wirtschaftsdünger. Aber auch pathogene Bakterien (z. B. Salmonellen), die von infizierten Tieren oder Menschen ausgeschieden werden, gelangen auf diesem Wege in die Umwelt. Werden Wirtschaftsdünger auf Anbauflächen für Gemüse oder Getreide ausgebracht, so gelangen Bakterien auf diesem Wege auf das pflanzliche Lebensmittel (WEGENER, 2003; BRANDL, 2006). Die Beregnung der Pflanzen mit kontaminiertem Trink- oder Flusswasser und die Verarbeitung und der Transport der Produkte können weitere Kontaminationsquellen darstellen (vgl. Abbildung 5).

Pflanzliche Lebensmittel spielen als Überträger antibiotikaresistenter Bakterien vor allem insofern eine Rolle, als Gemüse, Obst und Salat überwiegend roh verzehrt werden. Letzteres ist auch der Grund, weshalb unbehandelte Lebensmittel pflanzlicher Herkunft als Quelle für Infektionskrankheiten in Betracht kommen (LEVY, 1984; HAMILTON-MILLER UND SHAH, 2001; BRANDL, 2006).



**Abbildung 5: Mögliche Übertragungswege von antibiotikaresistenten Bakterien auf pflanzliche Lebensmittel und zum Menschen (modifiziert nach BRANDL, 2006)**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Vorkommen und Resistenzverhalten von *E. coli* und coliformen Bakterien, *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp., *Enterococcus* spp. und *Listeria* spp. gegenüber ausgewählten Antibiotika untersucht. Die Auswahl dieser Bakterienarten für ein Resistenzmonitoring richtet sich nach den Empfehlungen von OIE (FRANKLIN ET AL., 2001) und WHO (1997), da sie sowohl für die Humanmedizin als auch für die Veterinärmedizin insbesondere im Hinblick ihres Resistenzverhaltens Aufmerksamkeit erlangt haben. Im folgenden Abschnitt soll deshalb diese Problematik näher dargestellt werden.

### 3.1 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* gehört zur Familie der *Enterobacteriaceae* und ist ein gramnegatives, fakultativ anaerobes Stäbchenbakterium mit einer Größe von 1,1 - 1,5 x 2,0 - 6,0 µm, das bei Temperaturen von 15 bis 45 °C wächst. Lactose, D-Mannitol und D-Sorbitol werden durch das Bakterium unter Säure- und Gasbildung fermentiert, die Indol- und Lysin-Decarboxylase-Reaktion verlaufen positiv. H<sub>2</sub>S wird gewöhnlich nicht produziert (SCHEUTZ UND STROCKBINE, 2005). Innerhalb der Gattung *Escherichia* ist nur die Spezies *E. coli* von medizinischer Bedeutung. *E. coli* gehört einerseits zur Normalflora des tierischen und menschlichen Darms (Anteil ca. 1 %), andererseits wird es bei immungeschwächten Menschen immer wieder als Krankheitserreger, z. B. von Harnwegsinfektionen, Septikämien, Wundinfektionen, Pneumonien und Abszessen isoliert (HEESEMAN, 2001; KARLOWSKY ET AL., 2002; LANDGREN ET AL., 2005).

Für die Pathogenität von *E. coli* sind vor allem Endo-, Entero- und Cytotoxine sowie Adhäsionsfaktoren verantwortlich. Darm-pathogene *E. coli* werden nach ihren Virulenzfaktoren in Gruppen eingeteilt: Enterotoxische *E. coli* (ETEC), Shiga-Toxin-bildende bzw. enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC), enteropathogene *E. coli* (EPEC), nekrotoxische *E. coli*, enteroaggregative *E. coli*, enteroinvasive *E. coli* (EIEC) und diffus adhärente *E. coli* (DAEC) (HEESEMAN, 2001; SELBITZ, 2002; SCHEUTZ UND STROCKBINE, 2005). Insbesondere der Stamm EHEC Serotyp O157:H7, ein meldepflichtiger Zoonoseerreger, ist in Lebensmitteln – meist tierischer Herkunft – ein gefürchteter Keim, der zu schweren Erkrankungen führt (MENG ET AL., 2001). In Einzelfällen werden jedoch Infektionen mit diesem Serotyp auch in Zusammenhang mit pflanzlichen Lebensmitteln diskutiert (ACKERS ET AL., 1998; DE ROEVER, 1998; FAHEY ET AL., 2006).

Außerhalb des Darmtraktes gilt *E. coli* als Indikator für Fäkalverunreinigungen von Trinkwasser und Lebensmitteln (KRÄMER, 2002). Berichte über dessen Vorkommenshäufigkeit in pflanzlichen Lebensmitteln fallen recht unterschiedlich aus. So reichen die Werte von 50-70 % (Türkei) bis 0 % (USA) (AYCICEK ET AL., 2006; JOHNSON ET AL. (2005). DALLAIRE ET AL.

(2006) beschreiben in Kanada einen Wert von 18 %, während in einer deutschen Erhebung 8 % der pflanzlichen Lebensmittelproben kontaminiert waren (BOEHME ET AL., 2004).

Bezüglich der Antibiotikaempfindlichkeit wurden in den vergangenen Jahren steigende Resistenzraten bei *E. coli*-Stämmen festgestellt. So beschreiben KRESKEN ET AL. (2000), KARLOWSKY ET AL. (2002) und LANDGREBE ET AL. (2005) bei Isolaten aus klinischem Untersuchungsmaterial vor allem gegenüber Aminopenicillinen, Schmalspektrum-Cephalosporinen, Tetrazyklinen und Co-Trimoxazol hohe Resistenzraten (30 bis 50 % der Isolate). Auch bei Isolaten aus Schweinefaeces wurden gegenüber Ampicillin Resistenzraten von bis zu 88 % festgestellt (PENA ET AL., 2004). Studien zu Resistenzen bei *E. coli* in pflanzlichen Lebensmitteln liegen in geringem Umfang vor. Bei ÖSTERBLAD ET AL. (1999) und BOEHME ET AL. (2004) finden sich lediglich Resistenzraten für coliforme Bakterien, jedoch nicht explizit für *E. coli*, vor allem gegenüber Ampicillin (30 %) und Tetrazyklin (43 %).

Die Ursache für die Ausprägung von Mehrfachresistenzen bei *E. coli* liegt in dessen Fähigkeit Plasmide mit Resistenzgenen unterschiedlicher Herkunft insbesondere durch Konjugation aufzunehmen und zu verbreiten, so dass diese Spezies zu Recht als Reservoir für eine Vielzahl an Antibiotikaresistenzen gilt (SZCZEPANOWSKI ET AL., 2002; RUPP UND FEY, 2003; SAENZ ET AL., 2004). Insbesondere die Resistenzen gegenüber  $\beta$ -Lactamantibiotika in Form der  $\beta$ -Lactamasen (z. B. TEM-1, TEM-2 oder SHV-1) sind bei *E. coli* plasmidvermittelt, womit die weite Verbreitung dieser Resistenzen bei *E. coli* aber auch bei anderen Spezies der *Enterobacteriaceae* zu erklären ist.

### 3.2 Coliforme Bakterien

Die coliformen Bakterien sind eine heterogene Gruppe, die zur Familie der *Enterobacteriaceae* gehört und somit ebenfalls gram-negative, fakultativ anaerobe, nicht-sporenbildende Stäbchenbakterien sind. Die Gruppe der coliformen Bakterien umfasst verschiedene Genera, die in Tabelle 6 aufgeführt sind.

**Tabelle 6: Ausgewählte Bakterienarten der Gruppe coliformer Bakterien (LECLERC ET AL., 2001)**

Coliforme aus Umwelt und Faecesproben	Coliforme überwiegend aus Umweltproben
<i>Escherichia</i> spp.	<i>Pantoea</i> spp.
<i>Klebsiella</i> spp.	<i>Kluyvera</i> spp.
<i>Enterobacter</i> spp.	<i>Cedecea</i> spp.
<i>Citrobacter</i> spp.	<i>Edwardsiella</i> spp.
<i>Yersinia</i> spp.	<i>Ewingella</i> spp.
<i>Serratia</i> spp.	<i>Leclercia</i> spp.
<i>Hafnia</i> spp.	<i>Rahnella</i> spp.
<i>Moellerella</i> spp.	<i>Yokenella</i> spp.



Nach LECLERC ET AL. (2001) und der WHO (1996) werden coliforme Bakterien folgendermaßen definiert: Gramnegative, stäbchenförmige Bakterien, die in Anwesenheit von Galle oder anderen oberflächenaktiven Substanzen mit ähnlichen wachstumsinhibitorischen Eigenschaften Wachstum zeigen. Des Weiteren fermentieren coliforme Bakterien Lactose unter Produktion von Säure, Gas und Aldehyden bei 35 bis 37 °C innerhalb von 24 bis 48 h. Coliforme Bakterien sind außerdem oxidasenegativ, nicht-sporenbildend und zeigen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität. Neuerdings werden alle o-Nitrophenyl- $\beta$ -Galactopyranosid-positiven *Enterobacteriaceae* zu den coliformen Bakterien gezählt (LECLERC ET AL., 2001). Die Zusammenfassung verschiedener Genera der *Enterobacteriaceae* als „coliforme Bakterien“ erfolgte ursprünglich jedoch nicht anhand taxonomischer Eigenschaften der Bakterien, sondern nach ihrer Verwendung als Indikatorkeime für faekale Verunreinigungen, da einige der Gattungen zur Normalflora des menschlichen und tierischen Darms gehören. Zahlreiche Vertreter dieser fakultativ pathogenen Bakterien werden darüber hinaus regelmäßig auch im Erdboden, im Wasser und auf Pflanzen, z. T. auch als phytopathogene Bakterien nachgewiesen (LIAO UND FETT, 2001; BELL ET AL., 2004; FARMER, 2005; GRENIER ET AL., 2006).

An Infektionen beim Menschen sind u. a. *Enterobacter* spp., *Yersinia* spp., *Serratia* spp., *Citrobacter* spp. und *Klebsiella* spp. beteiligt. Medizinisch bedeutsam sind *Enterobacter aerogenes* und *Ent. cloacae*. Diese werden regelmäßig aus Trachealinfektionen, Wundabstrichen sowie Urin- und Blutproben isoliert. *Citrobacter freundii* ist als Erreger an intestinalen und Harnwegsinfektionen beteiligt. *Yersinia enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* kommen als Erreger von schweren Darminfektionen vor, *K. pneumoniae* gilt als Verursacher schwerer Pneumonien und ist an Infektionen der Harnwege, bei Otitis media, Meningitis, Septikämien und Wundinfektionen beteiligt (HEESEMANN, 2001; SELBITZ, 2002). Eine große Bedeutung hat *Klebsiella pneumoniae* als Erreger nosokomialer Infektionen. *Serratia* spp., v. a. *Ser. liquefaciens* und *Ser. marcescens*, werden in der Humanmedizin ebenfalls bei nosokomialen Infektionen nachgewiesen und zeigen, wie *Klebsiella* spp. und *Enterobacter* spp., oftmals ausgeprägte Resistenzen gegenüber Aminoglykosiden und  $\beta$ -Lactamantibiotika und zunehmend auch gegenüber Fluorchinolonen (LEVISON ET AL., 2002; PATERSON, 2004; HABSAH ET AL., 2005; JIANG ET AL., 2005; KIM UND LIM, 2005; TASH, 2005; ROSSI ET AL., 2006; WU ET AL., 2006).

Resistente coliforme Bakterien sind jedoch nicht nur im Krankenhausbereich, sondern auch in der Umwelt weit verbreitet. Bereits NIEMI ET AL. (1983) und WALTER UND VENNES (1985) beschrieben multiresistente coliforme Bakterien in Trink- und Abwasserproben. Einige Jahre später beobachteten GOMEZ ET AL. (2000) auch in Naturschutzgebieten Resistenzraten bei coliformen Bakterien von bis zu 50 % z. B. gegenüber Tetrazyklin und Colistin.

Auch bei Isolaten aus pflanzlichen Lebensmitteln wurden Resistenzen gegenüber verschiedenen Antibiotika festgestellt. ÖSTERBLAD ET AL. (1999), HAMILTON-MILLER UND SHAH (2001)

und BOEHME ET AL. (2004) beschreiben hier Resistenzraten von bis zu 45 % gegenüber Penicillinen und Cephalosporinen, darüber hinaus beobachteten die Autoren bei 30 % der Isolate Tetrazyklinresistenz. Einige Autoren sprechen coliformen Keimen in pflanzlichen Lebensmitteln eine bedeutsame Rolle im Resistenztransfer zu, da verschiedene Gattungen - ähnlich *E. coli* - am Plasmidtransfer als Donor oder Recipient in hohem Maße beteiligt sind (SCHNABEL UND JONES, 1999; MCMANUS ET AL., 2002).

### 3.3 *Salmonella* spp.

Salmonellen sind gram-negative, fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien. Sie gehören zur Familie der *Enterobacteriaceae* und bestehen hinsichtlich ihres Genoms aus zwei Spezies (*S. enterica* und *S. bongori*) und sechs Subspezies. Nach dem Kauffmann-White-Schema sind derzeit 2449 Serovaren definiert (POPOFF ET AL., 2000).

Salmonellen wachsen in einem Temperaturbereich von 5 °C bis 47 °C (Optimum: 37 °C), reduzieren Nitrat zu Nitrit, bilden H<sub>2</sub>S, besitzen die Fähigkeit zur Nutzung von Citrat als alleiniger Kohlenstoffquelle, bauen Propylenglykol ab und sind lactosenegativ, mit Ausnahme der Subspezies *arizonae* und *diarizonae* (POPOFF UND MINOR, 2005). Salmonellen zählen weltweit zu den wichtigsten bakteriellen Infektionserregern bei Menschen und Tieren. Ihr Habitat ist der Darm, wobei ihnen eine hohe Tenazität auch das wochen- und monatelange Überleben in der Umwelt, so auch auf Pflanzen ermöglicht (SELBITZ, 2002; BRANDL, 2006).

Salmonellosen werden in enteritische und typhöse Salmonellosen unterteilt. Während enteritische Salmonellosen durch die Aufnahme der Erreger mit Nahrungsmitteln entstehen, kommt bei der typhösen Salmonellose (ausgelöst durch *S. typhi* und *S. paratyphi*) immer der Mensch als primäre Infektionsquelle entweder als akut Erkrankter oder als Dauerausscheider in Frage. Gelangen die Keime über den Verdauungstrakt in das Lymphsystem, breiten sie sich im Organismus aus und verursachen Symptome wie Fieber und Darmblutungen (KAYSER ET AL., 1993; SELBITZ, 2002). Im Jahr 2003 wurden in Deutschland rund 63.000 Fälle von Salmonellosen gemeldet, das waren fast 10.000 Fälle weniger als im Jahr 2002 (ALPERS ET AL., 2004).

Die primäre Infektionsquelle bei der enteritischen Salmonellose sind zumeist Nutztiere, vor allem Schweine und Geflügel. Salmonellen wurden in rohem Fleisch, Hühnereiern, Milchprodukten, tierischen *Faeces*, in Wasser und im Boden nachgewiesen (STEINBACH UND KROELL, 1999; URFER, 2000; KRÄMER, 2002). Auch aus pflanzlichen Lebensmitteln werden immer wieder Salmonellen isoliert (DE ROEVER, 1998; MEAD ET AL., 1999; CUMMINGS ET AL., 2001; VISWANATHAN UND KAUR, 2001; LONG ET AL., 2002; SAGOO ET AL., 2003; JOHNSTON ET AL., 2005; FAHEY ET AL., 2006).

Mit Ausnahme von *S. Typhimurium* DT 104 sind Salmonellen gegenüber den meisten Antibiotika empfindlich. *S. Typhimurium* DT 104 besitzt eine natürliche Fünffach-Resistenz gegen-

über Ampicillin, Chloramphenicol, Streptomycin/Spectinomycin, Sulfonamiden und Tetrazyklin (SCHROETER ET AL., 2004).

Die Resistenzproblematik bei Salmonellen wird je nach Herkunft und Serovar unterschiedlich diskutiert. Aus einer Veröffentlichung von SCHROETER ET AL. (2004) geht hervor, dass im Jahr 2002 durchschnittlich 45 % aller durch das Nationale Veterinärmedizinische Referenzlabor für Salmonellen in Deutschland getesteten *Salmonella*-Isolate aus tierischen Lebensmitteln, von Tieren, aus Futtermitteln und aus der Umwelt von tierhaltenden landwirtschaftlichen Betrieben Resistenzen gegenüber mindestens einem Antibiotikum zeigten. Im Vergleich zu den Jahren 2001 (66 %) und 2000 (79 %) bedeutete dies eine stetige Abnahme der Resistenzraten. Die Auswertung der Daten von mehrfachresistenten Salmonellen über den gleichen Zeitraum zeigte ebenfalls eine geringere Prävalenz im Jahr 2002 (36 %) als im Jahr 2000 (43 %). Ähnliche Ergebnisse erzielten auch andere Autoren, die Salmonellen aus Geflügel- und Schweinefleisch isolierten (SZYCH ET AL., 2001; LOGUE ET AL., 2003; CARRAMINANA ET AL., 2004; MAYERHOFER ET AL., 2004; DE OLIVEIRA ET AL., 2005).

Zum Resistenzverhalten von Salmonellen aus pflanzlichen Lebensmitteln sind in Deutschland bisher keine Daten bekannt. Autoren in anderen Ländern beschreiben jedoch durchaus resistente Isolate in pflanzlichen Lebensmitteln. So zeigten sich bei Viswanathan und Kaur (2001) 41 % der Salmonellenisolate gegenüber Tobramycin, 31 % gegen Streptomycin und 22 % gegen Nalidixinsäure resistent, während gegenüber Amikacin, Chloramphenicol, Ciprofloxacin, Cefotaxim und Gentamicin die Isolate vollständig sensibel waren. Bei THONG ET AL. (2002) waren alle 40 Isolate aus pflanzlichen Lebensmitteln resistent gegen Sulfamethoxazol, je vier Isolate zeigten zusätzlich Resistenzen gegen Tetrazyklin bzw. Streptomycin.

### **3.4 *Pseudomonas* spp.**

Pseudomonaden sind gram-negative, durch eine oder mehrere polare Flagellen bewegliche, obligat aerobe Stäbchenbakterien mit einer Größe von 0,5 - 1,0 x 1,5 - 5,0 µm. Die optimale Vermehrungstemperatur beträgt 37 °C. Einige Stämme vermehren sich bei Temperaturen von 4 °C bis zu 42 °C. *P. aeruginosa* zeigt außerdem Hämolyse. Die Katalase-Reaktion fällt positiv, die Oxidase-Reaktion positiv oder negativ aus. Die meisten Spezies können in saurem Milieu (pH 4,5 oder niedriger) nicht wachsen (SELBITZ, 2002; PALLERONI, 2005).

*Pseudomonas* spp. leben überwiegend im Boden als Saprophyten (JENSEN ET AL., 2001) sowie in Süß- und Salzwasser. Eine wichtige Rolle spielen sie bei der Mineralisierung organischer Substanz. Einige Arten sind auch aufgrund ihrer proteolytischen und lipolytischen Eigenschaften als Verursacher von Lebensmittelverderb insbesondere bei pflanzlichen Lebensmitteln zu betrachten (KRÄMER, 2002). Darüber hinaus sind einige Spezies phytopathogen, so z. B. *P. syringae* (MCMANUS ET AL., 2002; HWANG ET AL., 2005), oder gehören zur na-

türlichen Mikroflora von Pflanzen, z. B. *P. putida* und *P. fluorescens* (TROXLER ET AL., 1997; SELBITZ, 2002; PALLERONI, 2005).

Eine besondere Rolle im Resistenzgeschehen nehmen Pseudomonaden durch die Produktion „natürlicher“ Antibiotika ein. So wiesen z. B. LACEY ET AL. (1995) 2-alkyl-Quinolone der Spezies *P. aeruginosa* mit Aktivität gegen *Helicobacter pylori* nach, SHOJI ET AL. (1986) beschreiben *P. syringae* als Fosfomycin-Produzenten. LAMPIS ET AL. (1996) die antivirale Aktivität des Karalicin von *P. putida* und *P. fluorescens* gegen Herpes simplex-Viren, und GAFFNEY ET AL. (1994) beschreiben bei *P. fluorescens* Fungizide gegen *Rhizoctonia solani*.

Von medizinischem Interesse ist fast ausschließlich *P. aeruginosa*. Diese Spezies kommt häufig im Boden, in Oberflächenwasser, auf Pflanzen und Obst, auf Gemüse und daraus hergestellten Lebensmitteln vor (KRÄMER, 2002; PALLERONI, 2005). Insbesondere als Eitererreger ist dieser Keim gefürchtet. Krankheitsprozesse, aus denen *P. aeruginosa* häufig isoliert wird, sind Enteritiden, Eiterungen und Abszesse im Bereich der Haut und Unterhaut sowie Pneumonien. Mit ausgeprägten Resistenzen gegenüber einer Vielzahl von Antiinfektiva und Desinfektionsmittel gehört *P. aeruginosa* zu einer der gefährlichsten Ursachen von nosokomialen Infektionen (VON GRAEVENITZ, 2001; KRÄMER, 2002; SELBITZ, 2002).

Das Resistenzverhalten von Pseudomonaden beruht vor allem auf natürlichen Resistenzen (vgl. auch Tabelle A 2 im Anhang), die primär durch die geringe Permeabilität der Antibiotika durch die äußere Zellmembran bedingt sind (LECLERCQ UND COURVALIN, 1991; HANCOCK, 1998; SCHWEIZER, 2003; PALLERONI, 2005). Auch andere gram-negative Bakterien haben eine verringerte Durchlässigkeit der Membran, doch ist die Permeabilität der äußeren Zellmembran bei *P. aeruginosa* um 10-100 fach geringer als bei anderen gramnegativen Bakterien, wie beispielsweise bei *E. coli* (HANCOCK, 1998). Darüber hinaus besitzt *P. aeruginosa* zahlreiche weitere Resistenzmechanismen, wie Efflux-Systeme,  $\beta$ -Lactamasen und antibiotikamodifizierende Enzyme (PALLERONI, 2005). Die Multidrug-Efflux-Systeme von *P. aeruginosa* spielen im Resistenzgeschehen eine bedeutende Rolle. Die vier wichtigsten Efflux-Systeme von *P. aeruginosa* sind MexAB-OprM, MexXY-OprM, MexCD-OprJ und MexEF-OprN, wobei MexAB-OprM und MexXY-OprM die intrinsischen Resistenzen bewirken, während eine Überexpression von MexCD-OprJ und MexEF-OprN durch Mutation entsteht (POOLE UND SRIKUMAR, 2001; SCHWEIZER, 2003).

Die Vielzahl intrinsischer Resistenzen reduzieren die Auswahl zu verwendender Antibiotika erheblich. Dementsprechend sind steigende Resistenzraten gegenüber den verbleibenden Antibiotika als äußerst kritisch zu betrachten. Insbesondere bei *P. aeruginosa* werden steigende Resistenzraten verzeichnet. So beschreiben beispielsweise FRIEDLAND ET AL. (2003) eine stetige Resistenzzunahme bei klinischen Isolaten von 10 % im Jahr 1995 auf 16 % im Jahr 2000 gegenüber Piperacillin und von 11 % auf 23 % gegenüber Ciprofloxacin, sowie weitere Zunahmen um 2 bis 4 % bei Amikacin, Tobramycin, Imipenem und Ceftazidim. Ähn-

liche Resistenzraten beschreiben FLUIT ET AL. (2000) in einer europaweiten Auswertung klinischer *P. aeruginosa*-Isolate. Bei SADER UND JONES (2005) zeigten klinische *P. fluorescens* und *P. putida*-Isolate Resistenzraten gegenüber Ciprofloxacin von 21 %, während *P. fluorescens*- und *P. putida*-Isolate aus Bodenproben bei JENSEN ET AL. (2001) sich gegenüber Ciprofloxacin vollständig sensibel zeigten.

### 3.5 *Enterococcus* spp.

Enterokokken sind grampositive, kugelförmige Bakterien mit einer Größe von 0,6 - 2,0 x 0,6 - 2,5 µm, die sich paarweise oder in kurzen Ketten lagern. Sie sind bis auf drei Spezies – *E. casseliflavus*, *E. flavescens* und *E. gallinarum* – unbeweglich. Enterokokken sind fakultativ anaerob und wachsen bei Temperaturen im Bereich von 10 – 45 °C und bei einem pH-Wert von bis zu 9,6 in Anwesenheit von 6,5 % NaCl und 40 % Galle. Die Katalasereaktion fällt negativ aus (MUNDT, 1986; DEVRIESE UND POT, 1995).

Enterokokken gehören zur Normalflora des Intestinaltrakts von Säugetieren und Vögeln und bilden den überwiegenden Anteil der aeroben grampositiven Flora. Die Spezies *E. faecalis* und *E. faecium* werden in klinischem Untersuchungsmaterial am häufigsten nachgewiesen, aber auch *E. casseliflavus* – ursprünglich als pflanzenassoziiert beschrieben - konnte aus dem menschlichen Stuhl und den Faeces von Rindern isoliert werden (DUTKA-MALEN ET AL., 1994; KLEIN, 2003). Die Zusammensetzung der Flora ist jedoch von dem Alter des Wirts und von der Art der Nahrung abhängig. So stellte *E. faecalis* bei Eintagsküken 64 % der Isolate aus dem Blinddarm dar, nach zwölf Wochen machte diese Spezies nur noch 4 % der Flora aus (DEVRIESE ET AL., 1991). Bei präruminierenden Kälbern war *E. faecalis* die häufigste Spezies, während sie bei Milchkühen nur noch zu 2 % nachgewiesen werden konnte (DEVRIESE ET AL., 1992).

Darüber hinaus werden Enterokokken beim Menschen auch im Urogenitaltrakt, in den Gallengängen, in der Mundhöhle und beim Tier auf den Tonsillen beschrieben (MURRAY, 1990; DEVRIESE ET AL., 1994; KÜHN ET AL., 2003). Einige Enterokokkenspezies (*E. mundtii*, *E. casseliflavus*, *E. sulfureus*) wurden auch als Bestandteil der Mikroflora von Pflanzen isoliert (OTT ET AL., 2001), während *E. faecalis* und *E. faecium* in pflanzlichem Material seltener, in tierischen Lebensmitteln dagegen häufiger festgestellt wurden (MÜLLER ET AL., 2001).

Enterokokken können als Erreger von Mastitiden, Pneumonien, Urogenitalinfektionen, Endokarditiden und Septikämien eine Rolle spielen. Bei diesen Erkrankungen wurden vor allem die Spezies *E. faecalis*, *E. faecium* und *E. durans* isoliert. Ihre Pathogenität ist jedoch gering, Infektionen kommen daher überwiegend bei immunsuprimierten Menschen vor. So werden Enterokokken häufig auch bei nosokomialen Infektionen isoliert (KLARE UND WITTE, 1997; SELBITZ, 2002).

Enterokokken gelten als Reservoir und Überträger vieler Antibiotikaresistenzen (KLARE UND WITTE, 1997; KLARE ET AL., 2003). Von ihrer Funktion als Resistenzgen-Reservoir berichten beispielsweise auch NOBLE ET AL. (1992), die den Transfer von *van(A)*, das die high level-Resistenz gegenüber Vancomycin codiert, aus *E. faecalis* in *Staphylococcus aureus* nachwiesen. WEIGEL ET AL. (2003) isolierten aus *S. aureus* ebenfalls *vanA* auf dem Transposon Tn1546, das nachweislich aus *E. faecalis* stammte.

Untersuchungen aus Deutschland zum Resistenzverhalten von Enterokokken aus klinischem Untersuchungsmaterial sehen vor allem Resistenzen gegenüber Makroliden (50–64 %), Ciprofloxacin (40 %) und HL-Aminoglykosiden (15–28 %), Tetrazyklinen (13 %) und Penicillinen (8 %), während die in anderen Ländern beschriebene ausgeprägte Resistenz gegenüber Glykopeptiden immer noch relativ gering ist (REINERT ET AL., 1999; SCHMITZ ET AL., 1999; KRESKEN ET AL., 2000; KLARE ET AL., 2003; LITZAU ET AL., 2006).

Bei Isolaten aus Lebensmitteln tierischer Herkunft oder aus Faeces landwirtschaftlicher Nutztiere werden in Deutschland vor allem Resistenzen gegenüber Tetrazyklin (18-45 %), Erythromycin (7–32 %), Ciprofloxacin (28–56 %), Chloramphenicol (64 %) sowie HL-Streptomycin (47 %) und HL-Gentamicin (26 %) beschrieben (KLEIN ET AL., 1998; FRANZ ET AL., 2001; PETERS ET AL., 2003).

Untersuchungen zu Resistenzen bei Enterokokken aus pflanzlichen Lebensmitteln sind in Deutschland selten. Lediglich BOEHME ET AL. (2004) beschreiben HL-Streptomycinresistenz bei vier Isolaten, Rifampicin- und Chloramphenicolresistenz bei je zwei Isolaten. Dagegen existieren umfangreichere Daten in den USA bei JOHNSTON UND JAYKUS (2004). Die Autoren beschreiben Resistenzen gegenüber Tetrazyklin (29 %), Ciprofloxacin (21–28 %), Nitrofurantoin (24 %), Quinupristin-Dalfopristin (16 %) und Erythromycin (10 %).

Enterokokken besitzen zahlreiche natürliche Resistenzen, so z. B. gegenüber einigen Penicillinen, Cephalosporinen, Aminoglykosiden („low-level“) und Clindamycin, sowie spezies-spezifische natürliche Resistenzen gegenüber Vancomycin und Quinupristin/Dalfopristin; Details siehe Tabelle A 3 im Anhang (DUTTA UND DEVRIESE, 1984; MURRAY, 1990; LECLERCQ ET AL., 1992; KLARE UND WITTE, 1997; MURRAY, 1998; SHEPARD UND GILMORE, 2002; SINGH ET AL., 2002; DINA ET AL., 2003; HERSHBERGER ET AL., 2004).

### 3.6 *Listeria* spp.

Listerien sind grampositive, bewegliche, fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien, die sich einzeln oder in kurzen Ketten lagern. Die Katalase-Reaktion fällt positiv, die Oxidase-Reaktion negativ aus. Ihr Temperaturoptimum liegt bei 30 bis 37 °C, sie können jedoch auch bei Temperaturen von unter 1 °C (insbesondere *L. monocytogenes*) noch wachsen. Mit peritrichen Geißeln sind Listerien bei Temperaturen von 20 bis 25 °C beweglich (SEELIGER UND JONES, 1986; JUNTILA ET AL., 1988; WALKER ET AL., 1990; SELBITZ, 2002). Auf Blutagar zeigen

*L. monocytogenes*, *L. seeligeri* und *L. ivanovii*  $\beta$ -Hämolyse. *L. monocytogenes* zeigt außerdem eine positive Reaktion beim CAMP-Test nach CHRISTIE ET AL. (1944).

Innerhalb der Gattung spielen die Spezies *Listeria monocytogenes* und *Listeria ivanovii* eine Rolle als pathogene Keime. Listerien werden als typische Opportunisten bezeichnet. Bei immunkompetenten Menschen und Tieren verläuft eine Infektion schwach, ähnlich einem gripalen Infekt bzw. wird oft gar nicht diagnostiziert. Bei Menschen mit einem geschwächten Immunsystem kann sich eine Infektion als primäre Septikämie oder Meningoenzephalitis manifestieren, oder es treten nekrotisierende und granulomatöse Entzündungsercheinungen an verschiedenen Organen auf. Gefährlich ist eine Infektion mit Listerien vor allem für Schwangere und Säuglinge, da sie zu Aborten, Früh- und Totgeburten oder zu Schädigungen des ungeborenen Kindes sowie zu Meningitis des Säuglings führen kann (KAYSER ET AL., 1993; SELBITZ, 2002; DOGANAY, 2003; HOF, 2003). So führten beispielsweise im Jahr 2003 bei zehn in Deutschland gemeldeten Listeriosen von Schwangeren die Infektion in zwei Fällen zu Frühgeburten und in sechs Fällen zu Fehl- oder Totgeburten. Die Zahl der Infektionsfälle lag in Deutschland im Jahr 2003 bei 255, so dass Listeriosen im Vergleich zu Salmonellosen selten auftreten (ALPERS ET AL., 2004).

Listerien werden primär im Erdboden, in Oberflächengewässern, auf Pflanzen, Tieren und Lebensmitteln sowie im Darm gesunder Menschen nachgewiesen. Vor allem Lebensmittel tierischer Herkunft (z. B. Fleisch und Rohmilch) stellen eine ständige Kontaminations- und Infektionsquelle, insbesondere mit *L. monocytogenes* dar (FARBER UND PETERKIN, 1991; DE SIMON ET AL., 1992; SELBITZ, 2002; VITAS ET AL., 2004; DALLAIRE ET AL., 2006). Eine höhere Listerienbelastung von Gemüse besteht, wenn Anbauflächen mit tierischen Fäkalien gedüngt werden, denn vor allem die temperaturtolerante Spezies *L. monocytogenes* besitzt eine hohe Tenazität und kann daher im Boden und auf pflanzlichem Material über Wochen persistieren (BRANDL, 2006). Eine Vermehrung der Bakterien kann auch während der Verarbeitungsschritte des (pflanzlichen) Lebensmittels stattfinden (KRÄMER, 2002). Von Infektionen mit *L. monocytogenes* im Zusammenhang mit Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft berichten z. B. DAVIES ET AL. (1984) und MEAD ET AL. (1999).

Listerien erwerben ihre Resistenzen gegenüber Antibiotika meistens durch Konjugation (CHARPENTIER UND COURVALIN, 1999; POROS-GLUCHOWSKA UND MARKIEWICZ, 2003). Dabei stammen die Resistenzgen-tragenden Plasmide und Transposons ursprünglich häufig von *Streptococcus* spp. und *Enterococcus* spp.. So beschreiben beispielsweise EVANS UND MACRINA (1983) den konjugativen Transfer des Plasmids pIP501 - mit den Resistenzgenen für Chloramphenicol, Makrolide, Lincosamide und Streptogramine - von *Streptococcus agalactiae* in *L. monocytogenes*, *L. murrayi* und *L. grayii*. BIAVASCO ET AL. (1996) beobachteten den Transfer von *Van(A)* zwischen Enterokokken und Listerien.

Obwohl ein ausgeprägter Resistenztransfer möglich ist, gelten Listerien allgemein noch immer als sensibel gegenüber den meisten Antibiotika. Bei CHARPENTIER UND COURVALIN (1999) und POROS-GLUCHOWSKA UND MARKIEWICZ (2003) finden sich Zusammenstellungen über Untersuchungen zum Resistenzverhalten von *Listeria* spp.. Antibiotikaresistenzen wurden demnach bei *L. monocytogenes* erstmals von POYART-SALMERON ET AL. (1990) – gegenüber Tetrazyklinen - beschrieben. Auch in Untersuchungen von ABUIN ET AL. (1994) zeigten 29 von 32 *L. innocua*-Isolaten aus Lebensmitteln tierischer Herkunft fast ausschließlich Resistenzen gegenüber Tetrazyklin. Bei WALSH ET AL. (2001) zeigten dagegen nur 6 % der *L. innocua*-Isolate aus verschiedenen Lebensmitteln Tetrazyklinresistenz, 4 % der Isolate waren gegenüber Penicillin G, 2 % gegenüber Ampicillin resistent. Lediglich zwei *L. monocytogenes*-Isolate zeigten Resistenzen gegenüber Tetrazyklin. Bei MAYERHOFER ET AL. (2004) erwiesen sich *L. monocytogenes* gegenüber keinem der Antibiotika resistent.



## C Material und Methoden

### 1 Material

#### 1.1 Untersuchungsmaterial für den kulturellen Nachweis und die Empfindlichkeitsprüfung von Bakterien

Als Untersuchungsmaterial dienten pflanzliche Lebensmittel (Getreide, Gemüse) aus bayerischen Supermärkten und von landwirtschaftlichen Betrieben. Die Gemüsearten wurden nach Art des Verzehrs (vorwiegend roh) und nach Höhe des Pro Kopf-Verbrauchs in Bayern anhand der ZMP-Daten (ZMP, 2003) ausgewählt. Die Proben wurden - ebenfalls in Anlehnung an die Einteilung der ZMP (2003) - in Gruppen zusammengefasst. So besteht die Gruppe „Fruchtgemüse“ beispielsweise aus Tomaten, Paprika, Gurken und Auberginen. Die Gruppe „Wurzelgemüse“ beinhaltet solche Gemüsearten, die im Boden reifen und aus dem Boden geerntet werden, z. B. Möhren, Sellerie und Radieschen. Gemüsesorten der Gruppe „Zwiebelgemüse“ umfassen Lauchgewächse, deren gemeinsames Merkmal die – antibakteriell wirksamen - Alliine (Derivate des Cysteins) darstellen (FROHNE UND JENSEN, 1998), wie Zwiebeln, Knoblauch und Lauch. Die Gruppe „Salat-/Blattgemüse“ umfasst nach ZMP (2003) Blattsalat und Spinat. Die Auswahl und Menge der Proben sind in Abbildung 6 dargestellt.

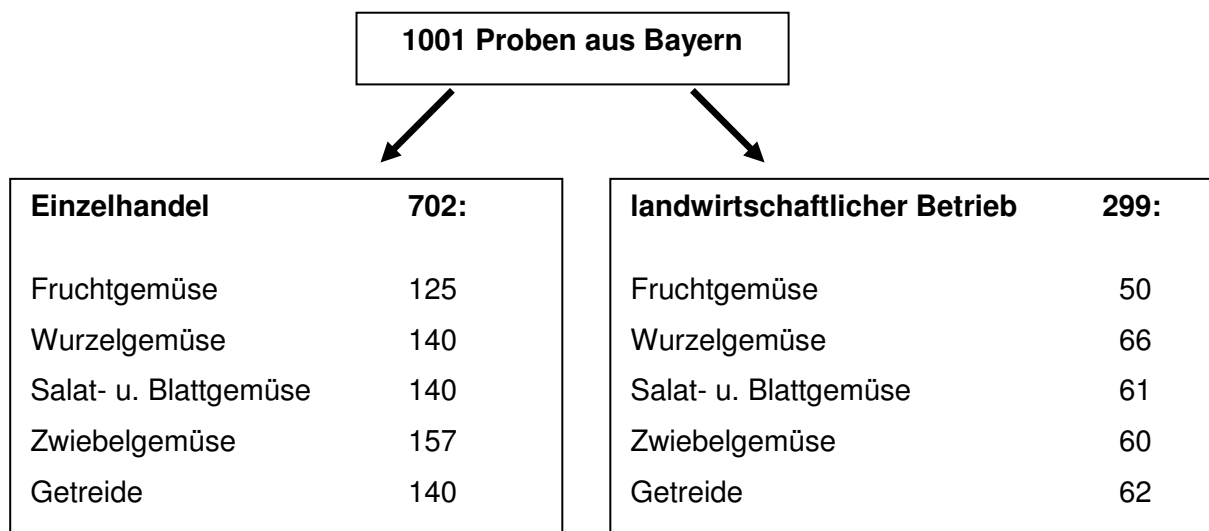


Abbildung 6: Zusammensetzung des Probenmaterials

## 1.2 Labormaterial für den kulturellen Nachweis und die Empfindlichkeitsprüfung von Bakterien

### Material für die Vorbereitung der Proben

Pepton aus Casein tryptisch, pankreatisch verdaut (1.07213), Fa. Merck, Darmstadt

Natriumchlorid (1.06400.1000), Fa. Merck, Darmstadt

destilliertes Wasser

### Material für die Verdünnungsreihe und die Keimzahlbestimmung der coliformen Bakterien

Physiologische Kochsalzlösung (NaCl) – gepuffert, bestehend aus:

Natriumchlorid „reinst“ (1.06400.1000), Fa. Merck, Darmstadt, di-Natriumhydrogenphosphat (1.06586.0500) und Kaliumdihydrogenphosphat (4873), Fa. Merck, Darmstadt

Nährboden: Rapid *E. coli* 2-Agar (356-4024), Fa. Biorad Laboratories GmbH, München

### Material zur Isolierung der Bakterien

#### *E. coli* und coliforme Keime:

Rapid *E. coli* 2-Agar (356-4024), Fa. Biorad Laboratories GmbH, München

Chlortetrazyklin (purity: 80 %) (C-4881), Fa. Sigma; 10 µg/ml

#### *Salmonella* spp.:

Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut (1.07213), Fa. Merck, Darmstadt

Natriumchlorid (1.06400.1000), Fa. Merck, Darmstadt

Dinatriumhydrogenphosphat (1.06586.0500), Fa. Merck, Darmstadt

Kaliumdihydrogenphosphat (4873), Fa. Merck, Darmstadt,

destilliertes Wasser

*Salmonella*-Anreicherungsbouillon nach Rappaport und Vassiliadis (1.07700.0500), Fa. Merck, Darmstadt

Rambach-Agar (1.07500.0001), Fa. Merck, Darmstadt

Rambach-Agar-Supplement (1.07500./0002), Fa. Merck, Darmstadt

XLT4-Agar (1.13919.0500), Fa. Merck, Darmstadt

#### *Pseudomonas* spp.:

Cetrimid-Agar (1.05248.0500), Fa. Merck, Darmstadt

Glycerin (1.04092), Fa. Merck, Darmstadt

#### *Enterococcus* spp.:

CATC-Agar (1.10279.0500), Fa. Merck, Darmstadt

#### *Listeria* spp.:

Fraser-*Listeria*-Selektivanreicherungsbouillon -Basis (1.10398), Fa. Merck, Darmstadt

Ammonium Eisen (III)-citrat (1.10399), Fa. Merck, Darmstadt

Fraser-Supplement (1.10399), Fa. Merck, Darmstadt  
Oxford-*Listeria*-Selektivagar-Basis (1.07004.0500), Fa. Merck, Darmstadt  
Oxford-*Listeria*-Selektivsupplement (1.07006), Fa. Merck, Darmstadt  
Palcam-*Listeria*-Selektivagar-Basis (1.11755.0500), Fa. Merck, Darmstadt  
Palcam-*Listeria*-Selektivsupplement (1.12122), Fa. Merck, Darmstadt

#### Material zur biochemischen Differenzierung der Isolate

Normalagar, bestehend aus Blutagar-Basis Nr. 2 (CM271), Fa. Oxoid  
Blutagar, bestehend aus Blutagar-Basis Nr. 2 (CM271), Fa. Oxoid und Schafblut, Fa. Fiebig  
Katalase: 3%ige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung  
Oxidase (T-3134), Fa. Sigma  
Indol (1.09293.0100), Fa. Merck, Darmstadt  
Physiologische Kochsalzlösung (NaCl) – gepuffert, bestehend aus:  
Natriumchlorid „reinst“ (1.06400.1000), Fa. Merck, Darmstadt,  
di-Natriumhydrogenphosphat (1.06586.0500), Fa. Merck, Darmstadt und Kaliumdihydrogenphosphat (4873), Fa. Merck, Darmstadt  
Dreizucker-Eisen-Agar (CM277), Fa. Oxoid  
Lysin-Eisen-Agar (CM381), Fa. Oxoid  
Phenolrot-Bouillon (1.10987.0500), Fa. Merck, Darmstadt  
L(+)-Arabinose (1.01492.0100), Fa. Merck, Darmstadt  
D(-)-Mannitol (1.05982.0500), Fa. Merck, Darmstadt  
D(+)-Xylose (1.08689.0025), Fa. Merck, Darmstadt  
Natrium-Pyruvat (15990), Fa. Fluka  
Polyvalent I (ORMT 11), Fa. Diagonal  
Polyvalent II (ORMU 11), Fa. Diagonal  
BBL-Crystal-ENF-System (245000), Fa. Beckton Dickinson  
API-*Listeria* (10300), Fa. Bio-Merieux  
Objekträger (380-385), Fa. Heiland

#### Material zur Resistenztestung

Für gramnegative Bakterien und *Enterococcus faecium* und *faecalis*:  
Kation adjustierte Müller-Hinton-II-Bouillon, Fa. Beckton-Dickinson (GENARS-Charge: 212322)  
Für „*Enterococcus nonfaecalis/nonfaecium*“:  
Haemophilus Test medium (HTM-Bouillon), bestehend aus:  
Müller-Hinton-II-Bouillon (212322), Fa. Beckton Dickinson,  
Hefeextrakt, Fa. Beckton Dickinson und *Haemophilus*-Supplement  
Pipettenspitzen 1000 µl (L3-487-500), Fa. Merlin  
Pipettenspitzen 1000 µl (707629), Fa. Sarstedt

1-Kanal-Reservoirs (R-4-510), Fa. Merlin

Resistenztest-Panels GP I und GP II (M/ES 182-100 und 183-100), Fa. Merlin/Virotech

Resistenztest-Panels GN I und GN II (M/ES 184-100 und 185-100), Fa. Merlin/Virotech

#### Material zur Kryokonservierung

Nutrient-Broth (CM67), Fa. Oxoid

Glycerin zur Analyse (1.040.92.2500), Fa. Merck

Kryoröhrchen (114832), Fa. Brand

Kryoröhrchen (121279), Fa. Greiner

Kunststoffperlen, Bastelbedarf

#### Geräte:

Brutschrank 37 °C (781704), Fa. Memmert

Brutschrank 30 °C (850750), Fa. Memmert

Brutschrank 42 °C (485031), Fa. Memmert

Sterilbank (BSK/6), Fa. Antair BSK

Merlin® Micronaut (ST-6-001-001), Fa. Merlin

Micronaut® Scan (Modell 352), Fa. Merlin

Pipettus accu-jet® (26300), Fa. Brand

Vortex Reax 2000 (54119), Fa. Heidolph

Photometer (Typ UV 1202), Fa. Shimadzu Corporation

### 1.3 Untersuchungsmaterial für die molekularbiologischen Untersuchungen

Von den 1001 kulturell untersuchten Proben wurden 301 Proben (200 Proben aus Supermärkten, 101 Proben von landwirtschaftlichen Betrieben) für zusätzliche molekularbiologische Untersuchungen ausgewählt. Als Auswahlkriterium diente die Probenherkunft (Supermarkt versus landwirtschaftlicher Betrieb). Dies sollte Auskunft geben, inwieweit Resultate des Nachweises bestimmter Resistenzgene (*tet(B)*, *tet(M)* und *tet(O)*) mit dem Nachweis auf phänotypischer Ebene korrelieren.

### 1.4 Labormaterial für die molekularbiologischen Untersuchungen

#### Standardstämme für den Nachweis von Tetrazyklinresistenzgenen

*Bacillus* R89 *tet(M)* (AGERSØ ET AL., 2004)

*Staphylococcus epidermis* "Stamm8" *tet(M)* (SCHWARZ ET AL., 1998)

*E. faecalis* efa3952 *tet(O)* (HÖLZEL, 2006)

*E. coli* eco2628 *tet(B)* (HÖLZEL, 2006)

#### Reagenzien und Verbrauchsmaterial für die DNA-Extraktion

PBS zum Abspülen der Proben

E.Z.N.A.<sup>®</sup> Bacterial DNA Kit (12-3450-02), Fa. Peqlab, Erlangen

#### Reagenzien für die PCR

Lightcycler<sup>®</sup> Faststart DNA Master Hybprobe (03 003 248 001), Fa. Roche

Lightcycler<sup>®</sup> Primer und Hybridisierungssonden (DNA 922648), Fa. Molbiol; vgl. Tabellen 7 und 8

**Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Primer (AMINOV ET AL., 2001)**

Primer	Sequenz	Amplicongröße (bp)	T <sub>m</sub>
<i>tet(B)</i> -206 fw	5'- TACg TgAA TTTA TTgC TTCg g	206	53,7 °C
<i>tet(B)</i> -206 rv	5'- ATAC AgCA TCCA AAgC gCAC		57,5 °C
<i>tet(M)</i> -171 fw	5'- ACAg AAA gCTT ATT ATA TAAC	171	40,0 °C
<i>tet(M)</i> -171 rv	5'- Tgg CgT gTC TAT gAT gTT CAC		54,8 °C
<i>tet(O)</i> -171 fw	5'- ACgg ARAg TTTA TTgT ATACC	171	44,7 °C
<i>tet(O)</i> -171 rv	5'- Tgg CgT ATC TAT AAT gTT gAC		48,4 °C

**Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten Hybridisierungssonden (Fa. MOLBIOL)**

Sonden	Sequenz	Basen	Tm
<i>tet</i> (B)-FL	5' AgTgCTgTTgTTgTCATTAATAggCgC—FL	216-242	63,7 °C
<i>tet</i> (B)-LC	5'- LC Red 640-TCgCTggATTACTTATTgCTggCTTT--PH	244-269	63,2 °C
<i>tet</i> (M)-FL	5'- ATCCgTCCTCgTTgTACCTTTgTCC—FL	144-120	63,8 °C
<i>tet</i> (M)-LC	5'- LC Red640-CgCTTCCTAATTCTgTAATCgCTCCA--PH	118-93	63,1 °C
<i>tet</i> (O)-FL	5'- gCgTCAAAGgggAATCACTATCCAgAC—FL	160-186	65,1 °C
<i>tet</i> (O)-LC	5'- LC Red 640-gCAgTgACATCTTTTCAgTgggAggAT--PH	188-214	64,1 °C

Verbrauchsmaterialien für die DNA-Extraktion und die PCR

Pipettenspitzen 10 µl (70.1115.410), Fa. Sarstedt

Pipettenspitzen 100 µl (70.760.412), Fa. Sarstedt

Pipettenspitzen 1000 µl (70.762.411), Fa. Sarstedt

LightCycler® Capillaries (1909339), Fa. Roche

Geräte für die DNA-Extraktion und die PCR

Schüttler (3005), Fa. GFL

Ultrazentrifuge (EBA 12 R), Fa. Hettich

Thermomixer „Comfort“, 1,5 ml, Fa. Eppendorf

Transferpette 0,5-10 µl, Fa. Brand

Transferpette, 10-100 µl, Fa. Brand

Transferpette, 100-1000 µl, Fa. Brand

LightCycler® (Softwareversion 3.01) (2011468), Fa. Roche

LightCycler® Centrifuge Adapters (1909312), Fa. Roche

Ultrazentrifuge “Mini spin”, Fa. Eppendorf

## 2 Untersuchungsmethoden

### 2.1 Auswahl der Einzelhandelsbetriebe und der landwirtschaftlichen Betriebe

#### Einzelhandel

Die Auswahl der Einzelhandelsbetriebe erfolgte anhand der Daten der ZMP Bonn. Danach wurden Märkte ausgewählt, die von den Verbrauchern am häufigsten frequentiert werden. Dies sind zu rund 70 % Discounter und Supermärkte (ZMP, 2003). In die Auswahl kamen elf Supermärkte und Discounter in Freising und München.

#### Landwirtschaftliche Betriebe

Die Auswahl der Betriebe erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Landwirtschaftsamt Oberbayern und orientierte sich an der Betriebsform. Hierbei wurden vor allem Betriebe berücksichtigt, die sowohl Viehhaltung, insbesondere Schweinemast, als auch Marktfrucht- und Gemüsebau betreiben. Weiterhin kamen reine Gemüsebaubetriebe in die Auswahl. Insgesamt wurden 13 Betriebe in die Untersuchungen einbezogen.

### 2.2 Auswahl des Bakterienspektrums

Für die Bestimmung der phänotypischen Resistenzprofile wurden sechs Bakteriengattungen bzw. –gruppen ausgewählt, die entweder obligat oder fakultativ pathogen auf die menschliche Gesundheit Einfluss nehmen oder als Kommensale im menschlichen und tierischen Darmtrakt als Überträger von Resistenzeigenschaften eine Rolle spielen. Insbesondere *E. coli* und *Enterococcus* spp. gelten als Reservoir vieler Resistenzen und sind nach den Empfehlungen der OIE (FRANKLIN ET AL., 2001) und der WHO (1997) regelmäßig auf Resistenzen zu testen. Coliforme Bakterien werden zunehmend mit Antibiotikaresistenzen, insbesondere gegenüber Penicillinen und Cephalosporinen in Verbindung gebracht. Da sie teilweise die Intestinalflora der Säugetiere, teilweise auch die natürliche Mikroflora von Pflanzen darstellen, aber auch als fakultativ pathogene Bakterien in Erscheinung treten, werden sie in die vorliegenden Untersuchungen einbezogen. Auch *P. aeruginosa* wird immer wieder mit einer Vielzahl an Resistenzen in Verbindung gebracht und ist daher im Krankenhausbereich als Erreger von Sekundärinfektionen gefürchtet. Die regelmäßige Überprüfung der Empfindlichkeit dieser Spezies gegen Antibiotika wird daher ebenfalls empfohlen. Da Pseudomonaden darüber hinaus häufig von pflanzlichen Lebensmitteln isoliert werden, wird diese Gattung in der vorliegenden Untersuchung berücksichtigt.

Neben der Überwachung der Kommensalen empfiehlt die OIE auch die Resistenztestung von Zoonoseerregern und tierpathogenen Bakterien, wie *Salmonella* spp., die auch aus pflanzlichen Lebensmitteln gelegentlich isoliert werden.

## 2.3 Keimisolierung, Keimidentifizierung sowie Kryokonservierung

### Vorbereitung der Proben

Zunächst wurden je 40 g einer Probe in einen Erlenmeyerkolben eingewogen. Zum Abspülen der Probe wurden anschließend 360 ml 1%iges Peptonwasser zugegeben und der Probenansatz 30 min bei 200 U/min geschüttelt.

### Verdünnungsreihe und Isolierung von coliformen Keimen und *E. coli*

Um die Gesamtkeimzahl der coliformen Bakterien und den Keimgehalt der tetrazyklinresistenten coliformen Keime zu bestimmen, wurde das Oberflächen-Spatel-Verfahren in Anlehnung an GEDEK (1974) angewendet. Hierbei wurde zunächst eine Verdünnungsreihe mit dem Faktor 1 : 10 von  $10^0$  bis  $10^{-7}$  hergestellt, anschließend wurden je 0,1 ml aus den jeweiligen Verdünnungsstufen auf jeweils einen Selektivagar (Rapid *E. coli* 2, Fa. Biorad) mit Tetrazyklin (10 µg/ml) und einen Selektivagar ohne Tetrazyklin im Oberflächenspatelverfahren ausgebracht und für 18 bis 24 h bei 37 °C bebrütet. Es erfolgte dann die Keimzahlbestimmung nach dem bei BAUMGART (1999) beschriebenen, allgemeingültigen Verfahren.

Aufgrund der chromogenen Eigenschaften des Selektivagars können *E. coli* (dunkelviolette bis rotviolette Kolonien) und coliforme Keime (türkis bis blaue Kolonien) differenziert werden. Nach der Anzüchtung von Reinkulturen auf Nähragar erfolgte eine orientierende Einordnung der Keime gemäß Tabelle 9. Die Differenzierung wurde mit Hilfe des BBL-Crystal-ENF-Systems (Fa. Beckton Dickinson) durchgeführt.

**Tabelle 9: Orientierende biochemische Differenzierungsreaktionen (BRENNER UND FARMER, 2005; PALLERONI, 2005)**

Keim	Morphologie		Biochemische Reaktionen		
	Gram	Katalase	Indol	Oxidase	
<i>E. coli</i>	-	+	+/-	-	
Coliforme	-	+	+/-	-	
<i>Pseudomonas</i> spp.	-	+	-	+	
<i>Salmonella</i> spp.	-	+	-	-	
<i>Enterococcus</i> spp.	+	-	-	-	
<i>Listeria</i> spp.	+	+	n.d.	n.d.	

n.d. = nicht durchgeführt



### Listeria spp. (nach § 35 LMBG)

Für die Isolierung von *Listeria* spp. nach DIN EN 11290-1 wurden 25 g des Probenmaterials in 225 ml halb-konzentrierte Fraser-*Listeria*-Selektivanreicherung (Merck) eingewogen und 24 h bei 30 °C bebrütet. Anschließend wurden mit 1 ml des Probenansatzes 10 ml Fraser-*Listeria*-Selektivanreicherung sowie Oxford- und Palcam-Agar beimpft und für 48 h bei 37 °C bebrütet. Nach 48 h wurden gem. § 35 LMBG aus der Fraser-*Listeria*-Selektivanreicherung nochmals Oxford- und Palcam-Agar beimpft. Die Auswertung erfolgte nach 48 h.

Listerien sind auf Palcam- bzw. Oxfordagar als stecknadelkopfgroße Kolonien einhergehend mit einer deutlichen Schwärzung des Nährbodens zu erkennen. Nach Reinzüchtung auf Blutagar erfolgte eine orientierende Untersuchung nach den in Tabelle 9 angegebenen Kriterien; zur Differenzierung wurde das API *Listeria*-Identifizierungssystem (Fa. Biomerieux) verwendet.

### Salmonella spp. (nach § 35 LMBG)

Für die Isolierung von *Salmonella* spp. wurden 25 ml des Probenmaterials in 225 ml 1 %iges gepuffertes Peptonwasser für Salmonellen zur Voranreicherung gegeben und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Anschließend wurden je 0,1 ml der Voranreicherung in 10 ml Selektivanreicherung nach Rappaport-Vassiliadis (RVS) pipettiert und diese für 24 h bei 42 °C bebrütet. Nach 24 h wurden die beiden Selektivmedien Rambach und XLT4 beimpft und diese nach jeweils 24 h und 48 h bei 37 °C ausgewertet.

Salmonellen bilden auf XLT4-Agar schwarze Kolonien, wobei der Nährboden eine violette Farbe annimmt. Auf Rambach-Agar stellen sie sich als kräftig rosa bis rote Kolonien dar.

Nach der Reinzüchtung auf Normalagar erfolgte eine erste Einordnung nach Tabelle 9. Die weitere Differenzierung wurde mit Hilfe des BBL-Crystal-ENF-Systems (Fa. Beckton Dickinson) durchgeführt. Eine Bestätigung der Ergebnisse sowie eine Sero- und Phagentypisierung erfolgte am Nationalen Salmonellen Referenzlabor.

### Pseudomonas spp. (nach § 35 LMBG)

Zur Isolierung von *Pseudomonas* spp. wurde Cetrimid-Agar (Merck) direkt aus dem Probenansatz beimpft und für 24 h bei 37 °C, anschließend für weitere 24 h bei Raumtemperatur bebrütet. Pseudomonaden zeigen sich auf Cetrimid-Agar nach 48 h als grün-gelbliche, teils fluoreszierende und mindestens 3 mm große Kolonien.

Zur weiteren biochemischen Vorselektion wurden typische Kolonien auf Normalagar subkultiviert und gemäß Tabelle 9 vordifferenziert. Die anhand des BBL-Crystal-ENF-Systems (Fa. Beckton Dickinson) durchgeführte Differenzierung lieferte ein endgültiges Ergebnis.

### Enterococcus spp. (nach § 35 LMBG)

Zur Anreicherung von *Enterococcus* spp. wurde der Probenansatz über Nacht bei 37 °C bebrütet und anschließend CATC-Agar (Fa. Merck) beimpft. Dieser wurde dann für 24 - 48 h bei 37 °C bebrütet. Enterokokken wachsen auf CATC-Agar als kleine weinrote bis himbeer-

farbene Kolonien. Zur ersten biochemischen Differenzierung anhand Tabelle 9 wurden für Enterokokken typische Kolonien auf einem Nähragar subkultiviert. Zur endgültigen Differenzierung der Enterokokkenisolate wurden deren Stoffwechselleistungen anhand der in Tabelle 10 aufgelisteten Kriterien geprüft. Isolate, die darüber hinaus im Resistenztest Vancomycin-MHK-Werte  $\geq 4 \mu\text{g/ml}$  zeigten, wurden im BBL-Crystal-GP weiter differenziert, um die gegenüber Vancomycin intrinsisch low-level-resistenten Spezies *E. casseliflavus* und *E. gallinarum* von Isolaten mit sekundär erhöhten MHK-Werten abzugrenzen.

**Tabelle 10: Metabolismus ausgewählter Stoffe durch *Enterococcus* spp.** (BEJUK ET AL., 2000; DEVRIESE ET AL., 2002)

Spezies	D(-)Xylose	D(-)Mannitol	L(+)-Arabinose	Na-Pyruvat
<i>E. faecium</i>	-	+	+	-
<i>E. faecalis</i>	-	+	-	+
„ <i>E. nonfaecalis/nonfaecium</i> “				
<i>E. avium</i>	-	+	+	+
<i>E. faecalis</i> (var)	()	-	-	+
<i>E. dispar</i>				
<i>E. durans</i>	-	-	-	-
<i>E. hirae</i>				
<i>E. raffinosus</i>	()	+	+	+
<i>E. casseliflavus</i>				
<i>E. gallinarum</i>				
<i>E. flavescens</i>	+	+	+	-
<i>E. mundtii</i>				

„()“ = variabel; „+“ = positive Reaktion; „-“, = negative Reaktion

### Kryokonservierung

Alle differenzierten Keime wurden bei  $-70 \text{ }^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Zu diesem Zweck wurden zunächst Reinkulturen und daraus eine Kryokultur auf Blutagar (grampositive Bakterien) bzw. Normalagar (gramnegative Bakterien) gezüchtet. Als Medium für die Kryokonservierung wurde für alle Keime Nutrient Broth mit kryoprotektivem Glycerinzusatz gewählt und 2 ml auf den Nährboden gegeben. Die so gewonnene Keimsuspension wurde in Kryoröhrchen pipettiert und zunächst für 24 h bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  eingefroren. Anschließend erfolgte die Aufbewahrung der Isolate bei  $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### Probenaufbewahrung

Von jeder Probe wurden 6 g in sterile PP-Röhrchen (Fa. Greiner) abgewogen und diese Proben bis zur weiteren Verwendung in der DNA-Extraktion bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  konserviert.

## 2.4 Empfindlichkeitsprüfung von Bakterien gegen Antibiotika

Zur Prüfung der Empfindlichkeit der Bakterienisolate gegenüber Antibiotika wurde die Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) mittels Mikrodilutionsverfahren gemäß DIN 58940 (2004) herangezogen. Der Vergleich dieser MHK mit den empirisch ermittelten Breakpoints der Keime gegenüber dem jeweiligen Antibiotikum ermöglicht die Einstufung des Bakteriums als „sensibel“, „intermediär“ oder „resistent“ (STOCK UND WIEDEMANN, 1998).

Zur besseren Standardisierung der Methode und um eine Vergleichbarkeit der Resultate mit Daten aus der Humanmedizin (German Network for Antimicrobial Resistance Surveillance, GENARS) zu gewähren, wurde auf das Micronaut<sup>®</sup>-Testsystem unter Anwendung eines Pipettier-Roboters zurückgegriffen. Zudem wurde als Nährmedium die zum GENARS-Projekt identische Charge kation-adjustierter Müller-Hinton-Bouillon verwendet. Die Testung beruht auf der Rehydratisierung der Antibiotika durch die Zugabe einer standardisierten Bakterien-suspension. Das Ergebnis wurde nach 18-24 stündiger Inkubation bei 37 °C photometrisch gemessen bzw. visuell ausgewertet und interpretiert. Für *E. coli*, coliforme Bakterien, *Pseudomonas* spp., *E. faecalis* und *E. faecium* erfolgte die Testung entsprechend DIN 58940-81. Für die übrigen *Enterococcus*-Spezies (in der vorliegenden Untersuchung als „*E. nonfaecalis/nonfaecium*“ (*E. nonfc.*) zusammengefassten Arten waren Modifikationen vom Standardtestverfahren notwendig.

### Auswahl der Antibiotika

In der vorliegenden Untersuchung wurden insbesondere Antibiotika, die humanmedizinisch relevant sind, ausgewählt. Die Auswahl einiger veterinärmedizinisch angewandeter Antibiotika, die überwiegend oral zur Bestandsbehandlung eingesetzt werden, orientierte sich ebenso wie die Auswahl der humanmedizinisch bedeutsamen Antibiotika an den bestehenden Resistenzmonitoringprogrammen GENARS (2004) und DANMAP (2004).

Die Testpanels wurden für die vorliegende Untersuchung in Abstimmung mit wissenschaftlichen Beratern der Firma Merlin gemäß den spezifischen Anforderungen des Projekts belegt. Tabelle 11 zeigt die in der Untersuchung verwendeten Antibiotika inkl. Ihrer Anwendungsgebiete, der untersuchten Konzentrationsbereiche und der angewandten Breakpoints.

Tabelle 11: Übersicht über die verwendeten Antibiotika

Wirkstoffgruppe	Wirkstoff	Kürzel	Anwendung	Beschränkung empfohlen (Reserve-AB) <sup>(a)</sup>	Untersuchter Konzentrationsbereich (µg/ml)	Panel <sup>(b)</sup>	S (≤)	R (>)	Referenz
β-Lactame a) Penicilline (PEN)	Amoxicillin/Clavulansäure	AMC	hum + vet	nein	0,125/2-8/2 1/2-128/2	GP GN	2/2	8/2	DIN (2004)
	Ampicillin	AMP	hum + vet	nein	0,125-16 1-128	GP GN	2	8	DIN (2004)
	Mezlocillin	MZL	hum	ja	2-256 4-16	GP GN	4	16	DIN (2004)
	Oxacillin	OXA	hum + vet	nein	0,25-32	GP	1	1	DIN (2004)
	Penicillin G	PEN	hum + vet	nein	0,03125-4	GP	0,125	1	DIN (2004)
	Piperacillin	PIP	hum	ja	1-128	GN	4	32	DIN (2004)
	Piperacillin/Tazobactam	PIT	hum	ja	1/4-128/4	GN	4	32	DIN (2004)
b) Cephalosporine (CEP)	Cefaclor	CEC	hum	nein	1-8	GN	1	4	DIN (2004)
	Cefazolin	CEZ	hum + vet	nein	0,125-16	GP	4	8	DIN (2004)
	Cefepim	CEP	hum	nein	2-16	GN	4	16	DIN (2004)
	Cefotaxim	CTX	hum	nein	0,25-32	GN	2	8	DIN (2004)
	Cefotaxim/Clavulansäure	C/C	hum	nein	0,25/4-2/4	GN	- <sup>(c)</sup>	- <sup>(c)</sup>	
	Cefoxitin	COX	hum	nein	2-16	GN	4	8	DIN (2004)
	Ceftazidim	CAZ	hum	nein	0,25-32	GN	4	16	DIN (2004)
	Ceftazidim/Clavulansäure	CZC	hum	nein	0,25/4-2/4	GN	- <sup>(c)</sup>	- <sup>(c)</sup>	
	Ceftiofur	CET	vet	nein	0,5-8	GN	4	4	DANMAP (2004)
	Cefuroxim	CXM	hum	nein	0,5-64 1-8	GN GP	4	8	DIN

(a): Quelle: Klinikleitfaden Intensivmedizin. Die Einstufung als Reserveantibiotikum ist uneinheitlich. So werden Substanzen, die therapeutisch wirken, wenn andere Substanzen nicht mehr wirksam sind, als Reserveantibiotikum bezeichnet, teils sind es auch solche Substanzen, die routinemäßig nicht mehr angewendet werden.

(b): GP: Panel für gram-positive Keime; GN: für gram-negative Keime;

(c): Die Kombination der Wirkstoffe Ceftazidim und Cefotaxim mit Clavulansäure dient der Detektion *ESBL*-produzierender Bakterien (Extended Spectrum β-Lactamases). Breakpoints für beide Kombinationsantibiotika sind nicht bestimmt.

Fortsetzung Tab. 11: Übersicht über die verwendeten Antibiotika

Wirkstoffgruppe (Kürzel)	Wirkstoff	Kürzel	Anwendung	Beschränkung empfohlen (Reserve-AB)	Untersuchter Konzentrationsbereich	Panel	S ( $\leq$ )	R ( $>$ )	Referenz
c) Carbapeneme (CBP)	Imipenem	IMP	hum	ja	0,125-16	GP GN	2	4	DIN (2004)
	Meropenem	MER	hum	ja	0,125-16	GN	2	8	DIN (2004)
Aminoglykoside (AGL)	Amikacin	AMK	hum	ja	2-16	GN	4	16	DIN (2004)
	Apramycin	APR	vet	nein	4-64	GN	16	16	DANMAP (2004)
	Gentamicin	GEN	hum + vet	nein	0,25-16 0,25-32	GP GN	1	4	DIN (2004)
	Gentamicin „high level“	GNH	hum + vet	nein	512	GP	512	512	DANMAP (2004)
	Kanamycin	KAN	hum + vet	nein	8-64	GP	32	32	DANMAP (2004)
	Neomycin	NEO	hum + vet	nein	2-16	GN	8	8	DANMAP (2004)
	Netilmicin	NET	hum	nein	1-4	GN	1	4	DIN (2004)
	Spectinomycin	SPT	vet	nein	1-128	GN	64	64	DANMAP (2004)
	Streptomycin	STR	hum + vet	nein	4-64	GN	16	16	DANMAP (2004)
	Streptomycin „high level“	SNH	hum + vet	nein	256-2048	GP	1024	1024	DANMAP (2004)
	Tobramycin	TOB	hum	nein	0,25-32	GN	1	4	DIN (2004)
Fenicole (FEN)	Chloramphenicol	CMP	hum	nein	2-64	GP GN	16	16	DANMAP (2004)
	Fenicol	FLL	vet	nein	2-32 2-64	GP GN	16	16	DANMAP (2004)
Fluorquinolone (FQL)	Ciprofloxacin	CIP	hum	ja	0,25-32 0,0625-8	GP GN	1	2	DIN (2004)
	Enrofloxacin	ENR	vet	(ja)	0,0625-8	GP GN	0,25	2	NCCLS (2004)
	Moxifloxacin	MOX	hum	ja	0,0625-8	GP	1	2	DIN (2004)

Fortsetzung Tab. 11: Übersicht über die verwendeten Antibiotika

Wirkstoffgruppe (Kürzel)	Wirkstoff	Kürzel	Anwendung	Beschränkung empfohlen (Reserve-AB)	Untersuchter Konzentrationsbereich	Panel	S (≤)	R (>)	Referenz
Glykopeptide (GPT)	Teicoplanin	TPL	hum	ja	0,25-32	GP	8	16	NCCLS (2004)
	Vancomycin	VAN	hum	ja	0,5-64	GP	4	8	DIN (2004)
Makrolide	Erythromycin	ERY	hum + vet	nein	0,0625-8	GP	1	4	DIN (2004)
	Tylosin	TLS	vet	nein	0,5-4	GP	4	4	Aarestrup (2000)
Lincosamide (LCA)	Clindamycin	CLI	hum	nein	0,0625-8	GP	1	4	DIN (2004)
Oxazolidinone (OZD)	Linezolid	LIZ	hum	ja	0,125-16	GP	1	4	GENARS (2004)
Potenzierte Sulfonamide (SUL/TRI)	Sulfamethoxazol/Trimethoprim (Co-Trimoxazol)	SXT	hum + vet	nein	8-64 1-128	GP GN	16	64	DIN (2004)
Streptogramine (STG)	Quinupristin/Dalfopristin	SYN	hum	ja	0,125-16	GP	1	2	NCCLS (2004)
Tetrazykline (TET)	Doxyzyklin	DOX	hum + vet	nein	0,125-16 0,5-4	GP GN	1	4	DIN (2004)
Andere	Colistin	COL	hum + vet	nein	2-64	GN	8	8	DANMAP (2004)
Andere	Fosfomycin	FOS	hum	ja	8-64	GP	32	32	SFM
Andere	Metronidazol	MTR	hum	nein	4-32	GP	4	4	DIN (2004)
Andere	Nitrofurantoin	NFT	hum	ja	32-256	GP	64	256	DIN (2004)
Andere	Rifampicin	RAM	hum	ja	0,5-4	GP	1	2	NCCLS (2004)

### Durchführung der Sensitivitätsprüfung nach Standardtestverfahren

Von Übernachtskulturen auf Blutagar wurden ein bis fünf Kolonien abgenommen und in physiologische NaCl-Lösung mit einem pH-Wert von 5,9 bis 6,4 überimpft. Die Suspension wurde auf einen Trübungsgrad nach McFarland von 0,5 eingestellt. Aus dieser Suspension wurden bei gramnegativen Keimen 50 µl und bei grampositiven Keimen 100 µl in 13 ml kation-adjustierter Müller-Hinton-Bouillon (CAMHB) (Fa. Beckton Dickinson) aus der GENARS-Charge gegeben. Der Trübungsgrad von 0,5 nach McFarland entspricht annähernd einer Keimkonzentration von  $4 \times 10^5$  KBE/ml (*E. coli*) bzw.  $8 \times 10^5$  KBE/ml (*Enterococcus* spp.). Die visuelle Einschätzung der Trübung wurde in regelmäßigen Abständen photometrisch überprüft. Die Suspension wurde mit Hilfe des Pipettier-Roboters in die Kavitäten der vorbezeichneten Mikrotitrationsplatten überführt und 18 – 24 h bei 37 °C in aerober Atmosphäre bebrütet.

### Durchführung der Resistenztests nach adaptiertem Verfahren für *Enterococcus* spp.

Das Trailing-Phänomen (Wachstum mit einer Intensität von bis zu 20 % der Positivkontrolle in allen Kavitäten) stellte sich insbesondere bei der Beurteilung der in dieser Arbeit als „*E. nonfaecalis/nonfaecium*“ zusammengefassten Enterokokken dar. Das Wachstum dieser Spezies wird durch CAMHB teilweise nur mangelhaft unterstützt, weshalb eine Abgrenzung zwischen tatsächlichem Wachstum und Trailing-Phänomen nur schwer abzuschätzen ist. Hier wurde daher ein *Hämophilus*-Test-Medium (HTM) als Nährmedium verwendet, das von HÖLZEL (2006) in Mehrfachreproduktionen mit dem oben aufgeführten *E. faecalis*-Stamm validiert und anschließend mit den entsprechenden *E. nonfc.*-DSM-Stämmen auf seine Eignung für die verschiedenen Spezies der *E. nonfc.*-Gruppe überprüft wurde.

Alle auf McFarland 0,5 eingestellten Suspensionen wurden zur Vermeidung von Inokulumseffekten nach der bei HÖLZEL (2006) beschriebenen Methode photometrisch auf ihre Konzentrationen innerhalb der DIN-Grenzen überprüft.

Die Auswertung der Panels erfolgte mit dem Micronaut<sup>®</sup>-Scan bzw. bei Bedarf visuell. So wurde beispielsweise stets visuell überprüft, wenn bei Streptomycin „high level“ der gemessene Wert > 256 µg/ml betrug, da der Wirkstoff Streptomycin in High-Level-Konzentrationen im verwendeten Medium häufig Luftblasen bildete, die bei der Scan-Auswertung zu falsch-positiven Ergebnissen führen.

Für *Pseudomonas* spp. besteht nach DIN (58940-81) eine Bebrütungszeit von 24 h. Für einige Isolate war jedoch eine Inkubationszeit bis zu 48 h notwendig, da nach 24 h kein oder nur sehr geringes Wachstum auf der Wachstumskontrolle der Testpanels festzustellen war. Eine Verlängerung der Inkubationszeit von 24 h auf 48 h erbrachte keine substantiellen Veränderungen der MHK-Werte (im Einzelfall + 1 MHK-Stufe).

### Qualitätskontrolle

Zur Vermeidung von Fehlinterpretationen und zur Gewährleistung replizierbarer Ergebnisse erfolgte in regelmäßigen Abschnitten eine Überprüfung des Empfindlichkeitstestverfahrens mittels Kontrollstämmen, deren MHK-Werte gegen die zu testenden Substanzen bekannt sind. Als Referenzkeime wurden *E. coli* DSM 1103, *P. aeruginosa* DSM 1117 und ATCC 27853, *L. monocytogenes* DSM 20600 und ATCC 2482, *L. innocua* ATCC 14298, *L. welshimeri* SL 5324, *E. faecalis* DSM 2570 und *E. casseliflavus* DSM 20680 verwendet.

Zudem befand sich auf jeder Mikrodilutionsplatte eine Kavität ohne Antibiotika als Wachstumskontrolle, mittels derer das Keimwachstum unbeeinflusst von antimikrobiellen Wirkstoffen überprüft werden konnte.

Als Kontrolle für die Reinheit der Bakterienkultur und für die Bakterienkonzentration wurde die beimpfte CAMHB bzw. das HTM-Medium nach dem Pipettiervorgang auf Blutagar ausgestrichen. Wachstum im jeweiligen Konzentrationsbereich eines Antibiotikums zeigte sich durch Trübung, die photometrisch bzw. visuell erkennbar war. Bei den Enterokokken musste das Wachstum im jeweiligen Konzentrationsbereich aufgrund des zuvor beschriebenen Trailing-Phänomens bei Bedarf visuell überprüft werden.



## 2.5 Methoden der molekularbiologischen Untersuchungen

### 2.5.1 Auswahl der Testparameter

Die Auswahl bestimmter Resistenzgene in molekularbiologischen Untersuchungen kann zum Einen durch die Lage der Gene auf beispielsweise beweglichen Elementen, zum Anderen durch ihre Vorkommenshäufigkeit aufgrund eines gewissen Selektionsdrucks erfolgen. Tetrazykline gehören zu den sowohl in der Veterinärmedizin als auch in der Humanmedizin am häufigsten eingesetzten Antibiotika. Ausgewählt wurden für die vorliegende Untersuchung die Tetrazyklin-Resistenzgene *tet(M)* und *tet(O)* als häufigste Vertreter der ribosom-modifizierenden Gene und *tet(B)* als der bei Bakterien am weitesten verbreitete Vertreter für die Codierung von Efflux-Proteinen (ROBERTS, 2005).

### 2.5.2 Extraktionsprotokoll

#### Vorbereitung der Proben und Herstellung eines Bakterienpellets

Für die DNA-Extraktion wurden 1 cm<sup>2</sup> Gemüseoberfläche ausgestanzt bzw. 1 g Getreide in ein PP-Röhrchen eingewogen. Anschließend wurde 1 ml PBS zugegeben, der Probenansatz für 30 min geschüttelt und der Ansatz 5 min bei 18.000 x g zentrifugiert. Der Überstand über dem Pellet wurde abpipettiert.

#### Lyse der Zellen

Das Pellet wurde in 100 µl TE Puffer resuspendiert. Anschließend wurden je Probe 100 µl einer 10 mg/ml Lysozymlösung beigegeben und für mindestens 10 min bei 30 °C inkubiert. Die Lysozymlösung wurde mit TE Puffer angesetzt und bei -20 °C in Aliquots gelagert. Da die in den Bakterienzellen enthaltene RNA bei der DNA-Isolierungsmethode mitextrahiert wird und teilweise die PCR stören kann, wurde ein RNase-Verdau eingebaut. Hierzu wurden 10 µl RNase A (25 mg/ml) zugegeben und für 2 min bei Raumtemperatur verdauen lassen.

Durch Zentrifugieren für 5 min bei 4.000 x g wurden die festen Bestandteile pelletiert, der Überstand danach abpipettiert und das Pellet anschließend in 200 µl BTL Puffer resuspendiert. Für die vollständige Lyse der Bakterien wurden dann 25 µl OB<sup>TM</sup>Protease (15 mg/ml) zugegeben und die Mischung bis zur vollständigen Lyse der Bakterienzellen bei 55 °C inkubiert.

#### Laden und Binden

Nach der Lyse der Bakterien wurden 220 µl BDL Puffer zugegeben, der Ansatz gemischt und für 10 min bei 70 °C inkubiert. Anschließend wurden 220 µl absoluter Ethanol zugegeben und der Ansatz wieder sorgfältig gemischt.

Eine HiBind<sup>®</sup>-Zentrifugensäule wurde in ein 2 ml Sammel-Tube gesteckt und der gesamte Ansatz einschließlich aller Präzipitate auf die Säule gegeben. Die Säule im Tube wurde für

1 min bei 8.000 x g zentrifugiert, der Säulendurchfluss und das Sammel-Tube wurden anschließend verworfen.

#### Waschen I und II

Die Säule wurde in ein frisches 2 ml Sammel-Tube gesteckt, und 750 µl des mit absolutem Alkohol kompletierten DNA-Waschpuffers wurden auf die Säule pipettiert. Die Säule im Tube wurde für 1 min bei 8.000 x g zentrifugiert, der Säulendurchfluss wurde anschließend verworfen und das benutzte Sammel-Tube im nächsten Schritt weiterverwendet.

#### Trocknen

Die Zentrifugensäule wurde in das geleerte Sammel-Tube gesteckt und 2 min bei 10.000 x g vollständig getrocknet.

#### Elution

Die Zentrifugensäule wurde dann in ein sauberes 1,5 ml Zentrifugenröhrchen gesteckt und die DNA mit 100 µl auf 70 °C vorgewärmtem Elutionspuffer eluiert. Hierzu wurde direkt auf die Matrix pipettiert und der Ansatz für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde der Ansatz für 1 min bei 8.000 x g zentrifugiert und die Elution mit weiteren 100 µl Elutionslösung wiederholt.

### **2.5.3 Real-time-PCR zum Nachweis von *tet(B)*, *tet(M)* und *tet(O)***

Im Folgenden sind die PCR-Protokolle für die einzelnen Anwendungen aufgeführt. Die PCR wurde in 20-µl-Ansätzen in dem LightCycler® (Nr. 1401018) der Fa. Roche durchgeführt. Die PCR-Ansätze erfolgten in Anlehnung an die Empfehlungen des Herstellers, wurden aber der Anwendung entsprechend optimiert. In Tabelle 12 ist zunächst der optimierte Mix für die Real-time-PCR mit LightCycler®-Hybridisierungssonden dargestellt. Wie bereits unter 1.4 „Material für die molekularbiologischen Untersuchungen“ beschrieben, erfolgte der Nachweis der *tet*-Gene unter Verwendung der Primer nach AMINOV ET AL. (2001). Diese wurden mit TE-Puffer (10mM Tris-HCl und 1 mM EDTA) zu 10 µM Stocklösungen vermischt und in Aliquots von je 50 µl bei -20° C gelagert.

**Tabelle 12: Optimierter Mix für die Real-time-PCR mit LightCycler®-Hybridisierungssonden**

Reagenz	eingesetztes Volumen (µl)	Endkonzentration
DNA-Extrakt	5,0	-
PCR-H <sub>2</sub> O	6,6	-
MgCl <sub>2</sub>	2,4	4,0 mM
Fast Start DNA Master®	2,0	0,3 mM
Primer forward	1,0	0,3 mM
Primer reverse	1,0	0,3 mM
Hybridisierungssonde LC 640	1,0	0,2 mM
Hybridisierungssonde FL	1,0	0,2 mM

Der optimierte Mix wurde für alle PCR-Ansätze (*tet(B)*, *tet(M)*, *tet(O)*) angewendet. Vor dem Pipettieren wurden die Lösungen sorgfältig durchmischt. Der gesamte Master-Mix von 20 µl wurde in LightCycler®-Kapillaren pipettiert und so in den LightCycler® eingebracht.

Die Real-time-PCR durchlief nach ausgewählten PCR-Programmen, die für das jeweils zu detektierende Gen optimiert wurden, 50 Zyklen in der Amplifizierung. Die Tabellen 13 bis 15 zeigen die für die zu detektierenden Gene optimierten Programme.

**Tabelle 13: PCR-Programm für *tet(B)***

Programm	Temperatur	Zeit	Slope	Acquisition Mode
Preinkubation	95 °C	600 s	20 °C/s	None
	95 °C	0 s	20 °C/s	None
Amplifizierung	60 °C	6 s	20 °C/s	Single
	72 °C	5 s	20 °C/s	None
	95 °C	0 s	20 °C/s	None
Schmelzkurvenanalyse	50 °C	30 s	20 °C/s	None
	95 °C	0 s	0,1 °C/s	Continuous
Kühlen	40 °C	30 s	20 °C/s	None

**Tabelle 14: PCR-Programm für *tet(M)***

Programm	Temperatur	Zeit	Slope	Acquisition Mode
Preinkubation	95 °C	600 s	20 °C/s	None
	95 °C	0 s	20 °C/s	None
Amplifizierung	50 °C	8 s	5 °C/s	Single
	72 °C	4 s	20 °C/s	None
	95 °C	0 s	20 °C/s	None
Schmelzkurvenanalyse	50 °C	30 s	20 °C/s	None
	95 °C	0 s	0,1 °C/s	Continuous
Kühlen	40 °C	30 s	20 °C/s	None

**Tabelle 15: PCR-Programm für *tet(O)***

Programm	Temperatur	Zeit	Slope	Acquisition Mode
Preinkubation	95 °C	600 s	20 °C/s	None
	95 °C	0 s	20 °C/s	None
Amplifizierung	56 °C	8 s	20 °C/s	Single
	72 °C	4 s	20 °C/s	None
	95 °C	0 s	20 °C/s	None
Schmelzkurvenanalyse	50 °C	30 s	20 °C/s	None
	95 °C	0 s	0,1 °C/s	Continuous
Kühlen	40 °C	30 s	20 °C/s	None

Bei jedem PCR-Durchgang wurden eine Standardreihe als Positivkontrolle und eine Negativkontrolle mitgeführt. Als Positivkontrolle diente aus einer Reinkultur extrahierte DNA, die das jeweilige Tetrazyklin-Resistenzgen besaß. Als Negativkontrolle wurde PCR-H<sub>2</sub>O der Firma Roche eingesetzt. Als *tet(M)*-Standard diente der *Bacillus cereus*-Stamm R89 (AGERSØ ET AL., 2004). Die Gene für den Standard von *tet(B)* stammten aus dem *E. coli*-Stamm eco2628, für den Standard *tet(O)* aus dem *E. faecalis*-Stamm efa3952 (beide von HÖLZEL, 2006), deren Bestätigung durch Sequenzierung durch die Fa. Sequiserve erfolgte. Da *Bacillus* R89 *tet(M)* genau in einer Kopie verankert trägt, wurde R 89 auch zur Methodvalidierung genutzt.

#### 2.5.4 Methodvalidierung

Zur Methodvalidierung musste zunächst *tet(M)*-freies Probenmaterial erzeugt werden. Die Herstellung von „DNA-freien“ Gemüseproben erfolgte durch Cobalt<sub>60</sub>-Bestrahlung mit 409 kGy für 72 h im Institut für Radiochemie der TU München in Garching in Anlehnung an AGERSØ ET AL. (2004) und HÖLZEL (2006).

Der qualitative Nachweis von *tet*-Genen aus Bakterienisolaten erfolgte, wie bei HÖLZEL (2006) beschrieben, zunächst aus bakteriellem Kulturmaterial, um potentiell inhibitorische Effekte des Probenmaterials zu vermeiden. Als Probenmaterial dienten folgende, von HÖLZEL (2006) aus Gülle isolierte, tetrazyklinresistente, unter C 1.4 „Labormaterial für die molekularebiologischen Untersuchungen“ bereits beschriebene Bakterienstämme: *E. faecalis* und *E. faecium* für *tet*(M) und *tet*(O), *E. coli* und *Salmonella* für *tet*(B). Als Standard für die Amplifizierung von *tet*(M) wurde *Bacillus* R89 nach AGERSØ ET AL. (2004) eingesetzt, der *tet*(M) in genau einer Kopie chromosomal verankert trägt. Amplifikate der Zielgenabschnitte wurden durch externe Sequenzierung durch die Fa. Sequiserve bestätigt.

Als *tet*(M)-Dotierungsmaterial und als Standard diente *Bacillus* R89. Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurden *tet*-freie Pflanzenproben mit *Bacillus* R89-Suspensionen mit Keimkonzentrationen von  $10^0$  bis  $10^6$  KBE/ml beimpft. Das Verhältnis der Probe zur Keimsuspension betrug 10 : 1, wie auch Tabelle 79 im Ergebnisteil zu entnehmen ist. Zur Reproduktion der Keimkonzentration wurde die Ausgangslösung der *Bacillus* R89-Suspension auf einen Trübungsgrad von McFarland 1 ( $3 \times 10^8$  KBE/ml) eingestellt und in 1:10 Stufen verdünnt. Die *Bacillus* R89-Konzentrationen in den dotierten Pflanzenproben betragen ca.  $1 \times 10^1$  bis  $1 \times 10^6$  KBE/ml. Bestätigt wurde der Keimgehalt der Suspension durch Keimzahlbestimmung. Die anschließende Real-time-PCR zur Amplifizierung und Quantifizierung wurde dann wie unter C2.5.3 „Real-time-PCR“ beschrieben nach der Extraktion der mit *tet*(M) dotierten Proben durchgeführt. Die Extrakte aus diesem Versuch wurden in den weiteren Untersuchungen als probennaher Standard mitgeführt.

## 2.6 Auswertung der Daten

### 2.6.1 Kultureller Keimnachweis und Keimisolierung

Proben wurden hinsichtlich der ausgewählten Bakterienarten als „negativ“ eingestuft, wenn aus ihnen mittels der genannten Kultivierungsverfahren keine Kolonien angezüchtet werden konnten. Als „positiv“ wurden Proben bezeichnet, wenn nach der Kultivierung mindestens eine Kolonie entsprechend den genannten Verfahren isoliert und bestätigt werden konnte. Je positiver Probe wurden zwei Kolonien der entsprechenden Bakterienart abgenommen und identifiziert. Der Empfindlichkeitsprüfung wurde jedoch lediglich ein Isolat zugeführt. Beide Isolate wurden kryokonserviert. Isolate, die nach der Kryokonservierung oder auf der Mikrotiterplatte kein Wachstum zeigten, gingen nicht in die Auswertung ein.

## 2.6.2 Phänotypische Resistenzuntersuchungen

Bei der Auswertung der phänotypischen Resistenzuntersuchungen wurden die MHK-Werte, die kleiner als die niedrigste gemessene Konzentration waren, der niedrigsten Konzentration gleichgesetzt. Werte, die über dem höchsten gemessenen Konzentrationsbereich lagen, wurden dem nächst höheren Konzentrationsbereich zugeordnet. Die so gewonnenen Daten von Bakterien aus landwirtschaftlichem Probenmaterial und solchen aus Supermarktpuben sowie aus unterschiedlichen Matrices wurden zum Einen hinsichtlich der Vorkommenshäufigkeit resistenter Bakterien, zum Anderen hinsichtlich der MHK-Werte verglichen. Als Tests für mögliche signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (landwirtschaftlicher Betrieb vs. Supermarkt) wurden der Chi-Quadrat-Test bzw. t-Test herangezogen, wie unter C 2.6.4 „Statistik“ beschrieben. Die Einstufung als „hochmehrfachresistent“ erfolgte in Abhängigkeit von der bei der betreffenden Spezies häufig beobachteten Anzahl der Resistenzen.

### Vergleich der erhobenen Resistenzdaten mit Daten des GENARS-Projekts (2004)

Die erhobenen Resistenzdaten der vorliegenden Untersuchung wurden mit den Resistenzdaten des GENARS-Projekts aus dem Jahr 2004 verglichen. Hierbei erfolgte eine Gegenüberstellung der Resistenzraten aus beiden Untersuchungen bei folgenden Bakterienarten: *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *E. faecalis*, *E. faecium* und *P. aeruginosa*.

## 2.6.3 Molekularbiologische Untersuchungen

Die ermittelten Rohdaten aus der PCR wurden in logarithmierte ( $\log_{10}$ ) Daten umgewandelt. Der prozentuale Anteil positiver und negativer Proben (als „positiv“ wurden Proben bezeichnet, wenn entsprechend der Nachweisgrenze das entsprechende Gen in der Probe mittels PCR detektiert wurde) aus beiden Vermarktungsstufen (landwirtschaftlicher Betrieb und Supermarkt) sowie aus unterschiedlichen Matrices wurde mit dem Chi-Quadrat-Test verglichen. Die jeweiligen Kopien-Gehalte der Proben wurden mittels t-Test ausgewertet, um mögliche statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Vermarktungsstufen hinsichtlich der Gen-Gehalte zu ermitteln. Weiterhin wurde zwischen den verschiedenen Matrices unterschieden, um potentielle inhibitorische Einflüsse zu beurteilen.

## 2.6.4 Statistik

### Statistische Auswertung der Daten und durchgeführte Tests

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit den PC-Software-Programmen Sigma Stat Version 3.1 und MS Excel.

Die in der Untersuchung gewonnenen Daten wurden zunächst nach KOLMOGOROV-SMIRNOFF auf Normalverteilung geprüft. Da die erhobenen MHK-Werte ordinal skaliert waren und eine Normalverteilung auch bei Daten, die zur Basis 2 logarithmiert ( $\log_2$ ) worden

waren, keine Normalverteilung festgestellt werden konnte, wurden potentielle Unterschiede zwischen den Isolaten unterschiedlicher Herkunft mit dem Rangsummentest nach Mann-Whitney hinsichtlich ihrer Signifikanz getestet.

Nominal skalierte Daten (Einstufung der Isolate in „sensibel“, „intermediär“ und „resistent“) wurden hinsichtlich signifikanter Unterschiede mit dem Chi-Quadrat-Test bzw. mittels der 2 x 3-Felder-Tafel (LOZAN, 1992) ausgewertet. In Tabelle 16 ist die statistische Auswertung mit den dazugehörigen Tests zusammengefasst.

**Tabelle 16: Statistische Tests in der Auswertung der Daten**

Datenskalierung	Normalverteilung	Test
intervallskaliert	ja	t-Test
	nein	Mann-Whitney-Rangsummen-Test
ordinal skaliert	nein	Chi-Quadrat-Test
nominal skaliert	nein	Chi-Quadrat-Test
		Fischer-Exakt-Test

### Signifikanz

Als „signifikant“ wurden Unterschiede und Korrelationen bezeichnet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit geringer als bzw. gleich 5 % war. In diesem Fall wurde die Nullhypothese abgelehnt. Tabelle 17 zeigt die Signifikanzgrenzen.

**Tabelle 17: Signifikanzgrenzen (nach LOZAN, 1992)**

Irrtumswahrscheinlichkeit	Bezeichnung
> 5 %	nicht signifikant (n.s.)
≤ 5 % - > 1 %	signifikant (*)
≤ 1 % - > 0,1 %	signifikant (**)
≤ 0,1 %	signifikant (***)

### Ausreißer

Die Berechnung von Ausreißern erfolgte nach einem allgemeingültigen Schema (LOZAN, 1992). Werte, die außerhalb des Bereiches  $x \pm 4s$  (Mittelwert  $\pm 4$  x Standardabweichung) lagen, gingen nicht in die Berechnung ein, da sie statistisch als „Ausreißer“ bezeichnet werden.

## D Ergebnisse

Im Zeitraum von Februar bis Dezember 2004 wurden 1001 Proben pflanzlicher Herkunft von landwirtschaftlichen Betrieben und Supermärkten in Bayern bakteriologisch untersucht. Die isolierten Bakterien wurden anschließend hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber ausgewählten Antibiotika getestet.

Aus den Rückstellproben wurden mittels einer Realtime-PCR die Tetrazyklin-Resistenzgene *tet(M)*, *tet(O)* und *tet(B)* isoliert und quantifiziert.

### 1 Vorkommen resistenzrelevanter Keime in pflanzlichen Lebensmitteln

Sowohl aus Probenmaterial von landwirtschaftlichen Betrieben als auch aus Probenmaterial von Supermärkten waren ubiquitär vorkommende, fakultativ pathogene Bakterien zu isolieren. Die pathogene Bakterienart *Salmonella* spp. konnte nur aus einer Supermarktprobe (Knoblauch) isoliert werden. Aus 14 % der Proben ( $n = 141$ ) wurden keine der ausgewählten Bakterien angezüchtet (Nachweisgrenze für Methoden ohne Anreicherungsverfahren:  $10^2$  KBE/g).

Coliforme, *Enterococcus* spp. und *Listeria* spp. wurden aus dem Probenmaterial, das direkt von landwirtschaftlichen Betrieben stammte, signifikant häufiger isoliert als aus dem von Supermärkten (Coliforme:  $p < 0,001$ , *Enterococcus* spp.:  $p = 0,005$ , *Listeria* spp.:  $p = 0,013$ ). Dagegen wurden *Pseudomonas* spp. aus Supermarktproben signifikant häufiger isoliert als aus denen von landwirtschaftlichen Betrieben (Chi-Quadrat-Test:  $p < 0,001$ ).

Zwischen den Matrices waren zum Teil hochsignifikante Unterschiede hinsichtlich der Häufigkeit des Nachweises der ausgewählten Bakterien festzustellen. Während aus Wurzelgemüse fast immer mindestens eine der avisierten Bakteriengruppen isoliert werden konnte, war dies bei Getreide nur in ca. 70 % der Proben der Fall (vgl. Tabelle 18).



Tabelle 18: Vorkommen ausgewählter Bakteriengruppen in pflanzlichem Probenmaterial

	Gesamt <sup>1</sup>		Frucht- gemüse		Wurzel- gemüse		Salat- gemüse		Zwiebel- gemüse		Getreide	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>E. coli</i>	34	3,4	6	3,4	8	4,0	10	5,0	5	2,3	5	2,5
Landw. Betrieb	14	4,7	1	2,0	3	4,6	2	3,3	4	6,7	4	6,5
Supermarkt	20	2,9	5	4,0	5	3,6	8	5,7	1	0,6	1	0,7
Coliforme Keime	688	68,7	121	69,1	180	87,4	143	71,1	141	65,0	103	51,0
Landw. Betrieb	238	79,6 *	18	36,0	60	90,9	57	93,4	42	70,0	61	98,4
Supermarkt	450	64,1 *	103	82,4	120	85,7	86	61,4	99	63,1	42	30,0
<i>Pseudomonas</i> spp.	439	43,9	66	37,7	168	81,6	123	61,2	74	34,1	8	4,0
Landw. Betrieb	108	36,1 *	4	8,0	48	72,7	37	60,7	12	20,0	7	11,3
Supermarkt	331	47,2 *	62	49,6	120	85,7	86	61,4	62	39,5	1	0,7
<i>Salmonella</i> spp.	1	0,1	0	0	0	0	0	0	1	0,5	0	0
Landw. Betrieb	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Supermarkt	1	0,1	0	0	0	0	0	0	1	0,6	0	0
<i>Enterococcus</i> spp.	674	68,1	127	72,6	146	70,9	155	77,1	107	49,3	147	72,8
Landw. Betrieb	215	71,9 *	19	38,0	55	83,3	54	88,5	26	43,3	61	98,4
Supermarkt	459	65,4 *	108	86,4	91	65,0	101	72,1	81	51,6	78	55,7
<i>Listeria</i> spp.	11	1,1	3	1,7	5	2,4	1	0,5	1	0,5	1	0,5
Landw. Betrieb	7	2,3 *	2	4,0	2	3,0	1	1,6	1	1,7	1	1,6
Supermarkt	4	0,6 *	1	0,8	3	2,1	0	0	0	0	0	0
Positiv gesamt (%) <sup>1</sup>	-	-	80,0 <sup>a</sup>		99,5 <sup>b</sup>		93,5 <sup>c</sup>		81,1 <sup>a</sup>		69,8 <sup>d</sup>	

<sup>1</sup> positiv bezüglich mindestens einer der avisierten Bakteriengruppen

\* Die Raten der in den unterschiedlichen Vermarktungsstufen isolierten Bakterien unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,05$ ) entsprechend der jeweiligen Bakteriengruppe bzw. -gattung

<sup>a,b,c,d</sup> Die Raten der bezügl. der ausgewählten Bakterien positiven Matrices unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,05$ )

## 1.1 Differenzierung der coliformen Keime

In der Gruppe der „Coliformen“ konnten 688 Isolate von 710 bis auf die Speziesebene differenziert werden. Dabei zeigte sich, dass der überwiegende Teil der Isolate der Gattung *Enterobacter* zuzuordnen ist. Vertreter der Gattungen *Pantoea*, *Serratia* und *Klebsiella* waren deutlich weniger häufig nachzuweisen, während solche der Gattungen *Citrobacter*, *Hafnia* oder *Yersinia* nur vereinzelt zu finden waren (vergleiche Abbildung 7).

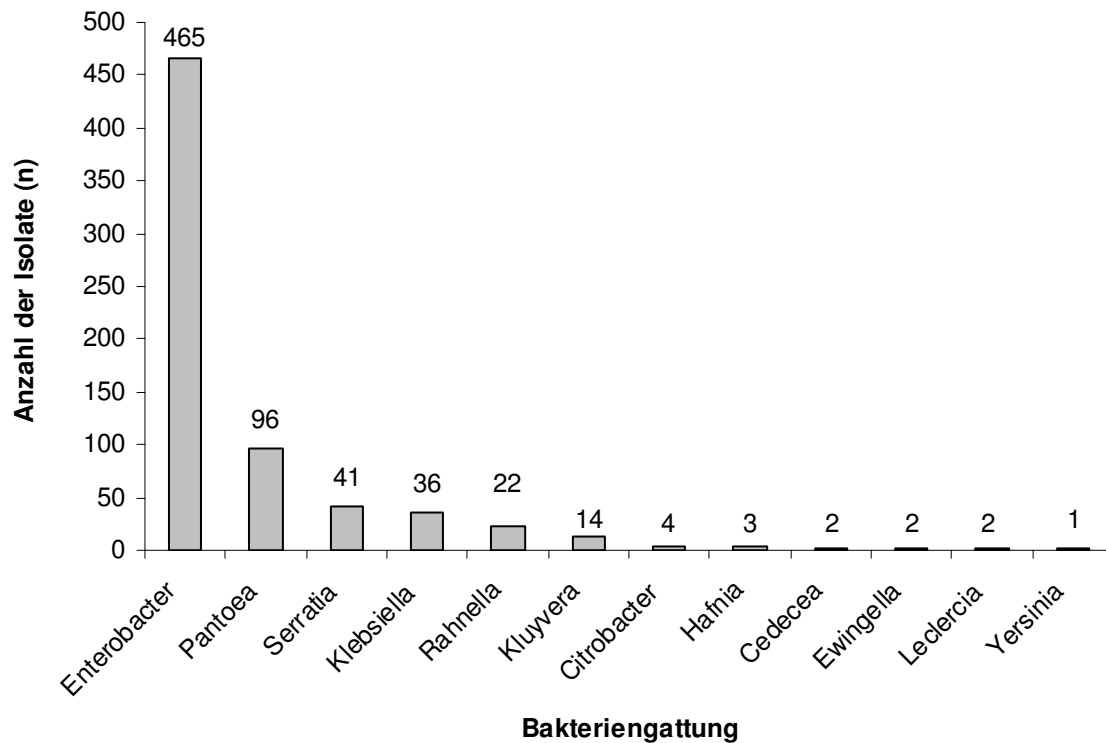


Abbildung 7: Gattungszugehörigkeit von aus pflanzlichen Proben isolierten coliformen Bakterien

Bei der Gattung *Enterobacter* dominierten die Spezies *E. cloacae* und *E. sakazakii* gefolgt von *E. gergoviae*. Die zur Gattung *Pantoea* zugehörigen Isolate waren ausschließlich der Spezies *P. agglomerans* zuzuordnen, während die Gattungen *Klebsiella* und *Serratia* durch zwei bzw. fünf unterschiedliche Arten vertreten waren (vgl. Tabelle 19). Nicht unerwähnt soll bleiben, dass aus einer Probe *Yersinia enterocolitica* isoliert worden ist.

**Tabelle 19: Systematische Zugehörigkeit coliformer Bakterien isoliert aus pflanzlichen Lebensmitteln unterschiedlicher Vermarktungsstufen**

Spezies	Gesamt (n=688)		Landw. Betrieb (n=238)		Supermarkt (n=450)	
	n	%	n	%	n	%
<i>Enterobacter aerogenes</i>	24	3,5	10	4,2	14	3,1
<i>Enterobacter asburiae</i>	2	0,3	0	0	2	0,4
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	46	6,7	16	6,7	30	6,7
<i>Enterobacter cloacae</i>	172	25,0	56	23,5	116	25,8
<i>Enterobacter gergoviae</i>	92	13,4	33	13,9	59	13,1
<i>Enterobacter sakazakii</i>	129	18,8	43	18,1	86	19,1
<i>Pantoea agglomerans</i>	96	14,0	44	<b>18,5<sup>a</sup></b>	52	<b>11,6<sup>b</sup></b>
<i>Cedecea lapagei</i>	2	0,3	2	0,8	0	0
<i>Citrobacter freundii</i>	4	0,6	1	0,4	3	0,7
<i>Ewingella americana</i>	2	0,3	0	0	2	0,4
<i>Hafnia alvei</i>	3	0,4	3	1,3	0	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	15	2,2	6	2,5	9	2,0
<i>Klebsiella pn. spp. pn.</i>	21	3,1	2	0,8	19	4,2
<i>Kluyvera ascorbata</i>	8	1,2	2	0,8	6	1,3
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	6	0,9	3	1,3	3	0,7
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	2	0,3	1	0,4	1	0,2
<i>Rahnella aquatilis</i>	22	3,2	5	2,1	17	3,8
<i>Serratia fonticola</i>	4	0,6	1	0,4	3	0,7
<i>Serratia liquefaciens</i>	10	1,5	4	1,7	6	1,3
<i>Serratia marcescens</i>	25	3,6	5	2,1	20	4,4
<i>Serratia plymuthica</i>	1	0,2	1	0,4	0	0
<i>Serratia rubidea</i>	1	0,2	0	0	1	0,2
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	0,1	0	0	1	0,2

<sup>a,b</sup> Zahlen mit unterschiedlichen Superskripten unterscheiden sich signifikant bezügl. der entsprechenden Spezies

## 1.2 Differenzierung von *Pseudomonas* spp.

Die Bestimmung der systematischen Zugehörigkeit der *Pseudomonas*-Isolate ergab, dass mit Abstand die meisten Isolate der Spezies *P. aeruginosa* angehören. Die Spezies *P. putida* und *P. fluorescens* waren deutlich weniger häufig nachzuweisen (vgl. Tabelle 20).

**Tabelle 20: Systematische Zugehörigkeit von *Pseudomonas* spp. (n = 439) isoliert aus pflanzlichen Lebensmitteln unterschiedlicher Vermarktungsstufen**

Spezies	Gesamt (n = 439)		Landw. Betrieb (n = 108)		Supermarkt (n = 331)	
	n	%	n	%	n	%
<i>P. aeruginosa</i>	295	67,2	80	74,1	215	65,0
<i>P. fluorescens</i>	38	8,7	3	<b>2,8<sup>a</sup></b>	35	<b>10,6<sup>b</sup></b>
<i>P. putida</i>	106	24,2	25	23,1	81	24,5

<sup>a,b</sup> Zahlen mit unterschiedlichen Superskripten unterscheiden sich signifikant bezüglich der entsprechenden Spezies

Beim Vergleich der Vermarktungsstufen fällt auf, dass *P. fluorescens* signifikant ( $p < 0,05$ ) häufiger in Proben aus dem Supermarkt nachzuweisen war, als in denen von landwirtschaftlichen Betrieben. Bezüglich *P. aeruginosa* war tendenziell ein umgekehrtes Verhalten feststellbar, was sich jedoch statistisch nicht absichern ließ ( $p > 0,05$ ). *P. putida* wurde etwa zu gleichen Teilen aus Probenmaterial unterschiedlicher Vermarktungsstufen isoliert.

## 1.3 Differenzierung von *Enterococcus* spp.

Die Prüfung der systematischen Zugehörigkeit der *Enterococcus*-Isolate ergab, dass die Spezies *E. faecalis* und *E. faecium* nur 14,0 bzw 8,3 % der Grundgesamtheit ausmachten. Andererseits fällt auf, dass Xylose-positive *E. raffinosus* die Enterokokkenflora von pflanzlichen Lebensmitteln beider Vermarktungsstufen dominierten.

Was den Einfluss der Vermarktungsstufe auf das Vorkommen bestimmter Spezies betrifft, so war *E. raffinosus* signifikant häufiger aus Produkten von landwirtschaftlichen Betrieben als aus jenen von Supermärkten zu isolieren ( $p < 0,001$ ). Gleiches trifft zu für *E. faecalis* ( $p < 0,05$ ), während *E. faecium* zumindest tendenziell häufiger in Proben aus dem Supermarkt zu finden war ( $p > 0,05$ ), wie aus Tabelle 21 hervorgeht.

**Tabelle 21: Systematische Zugehörigkeit von *Enterococcus* spp. (n = 682) isoliert aus pflanzlichen Lebensmitteln unterschiedlicher Vermarktungsstufen**

Spezies	Gesamt (n = 682)		Landw. Betrieb (n = 223)		Supermarkt (n = 459)	
	n	%	n	%	n	%
<i>E. faecalis</i>	100	14,7	42	<b>18,8<sup>a</sup></b>	58	<b>12,6<sup>b</sup></b>
<i>E. faecium</i>	59	8,7	13	5,8	46	10,0
„ <i>E. nonfaecalis/nonfaecium</i> “ davon:	523	76,7	168	75,3	355	77,3
<i>E. avium</i> / <i>E. raffinosus</i> <sup>(a)</sup>	14	2,1	5	2,2	9	2,0
<i>E. dispar</i>	4	0,6	1	0,5	3	0,7
<i>E. gallinarum</i> -Gruppe <sup>(b)</sup>	96	14,1	14	<b>6,3<sup>a</sup></b>	82	<b>17,9<sup>b</sup></b>
<i>E. hirae</i> / <i>E. durans</i>	8	1,2	0	0	8	1,7
<i>E. raffinosus</i> <sup>(c)</sup>	355	52,1	137	<b>61,4<sup>a</sup></b>	218	<b>47,5<sup>b</sup></b>
nicht differenzierbar	46	6,8	11	4,9	35	7,6

<sup>(a)</sup> D(-)Xylose: negativ, beide Spezies möglich.

<sup>(b)</sup> *E. gallinarum*-Gruppe: *E. casseliflavus*, *E. flavescens*, *E. gallinarum*

<sup>(c)</sup> D(-)Xylose: positiv

<sup>a,b</sup> Zahlen mit unterschiedlichen Superskripten unterscheiden sich signifikant bezügl. der entsprechenden Spezies

#### 1.4 Differenzierung von *Listeria* spp.

Insgesamt wurden aus elf Proben Listerien isoliert, die fünf verschiedenen Spezies angehören. Dabei war *L. monocytogenes* die am häufigsten isolierte Spezies (vgl. Tabelle 22).

**Tabelle 22: Systematische Zugehörigkeit von *Listeria* spp. (n = 11) isoliert aus pflanzlichen Lebensmitteln unterschiedlicher Vermarktungsstufen**

Spezies	Gesamt (n = 11)	Landw. Betrieb (n = 7)	Supermarkt (n = 4)
	n	n	n
<i>L. innocua</i>	2	2	0
<i>L. ivanovii</i>	3	2	1
<i>L. monocytogenes</i>	4	3	1
<i>L. murrayi</i>	1	0	1
<i>L. seeligeri</i>	1	0	1

## 2 Phänotypische Resistenz von Bakterien pflanzlichen Ursprungs

In der Zeit von März bis Dezember 2004 wurden 1854 Bakterienisolate hinsichtlich ihrer Resistenzeigenschaften untersucht. In den folgenden Tabellen sind die prozentualen Verteilungen der Antibiotikaresistenzen sowie im Anhang die Verteilung der MHK-Werte dargestellt. In die Darstellungen sind nur solche Substanzen aufgenommen worden, denen gegenüber eine natürliche Empfindlichkeit der untersuchten Spezies angenommen wurde. Zum Teil waren Vergleiche zwischen den Isolaten aus landwirtschaftlichen Betrieben und aus Supermärkten hinsichtlich des Resistenzverhaltens aufgrund ihrer geringen Anzahl nicht möglich, so dass diese Auswertung nur bei bestimmten Bakterienarten durchgeführt werden konnte.

### 2.1 *E. coli*

Die Ergebnisse der Resistenztests von *E. coli* sind in Tabelle 23 dargestellt. Die Untersuchungen ergaben Resistenzen vor allem gegenüber Amoxicillin/Clavulansäure, Ampicillin, Cefaclor, Cefoxitin, Cefuroxim und Spectinomycin. Bei Cefaclor und Amoxicillin/Clavulansäure waren zudem je 23,5 % der Isolate am Breakpoint zur Resistenz zu beobachten (vgl. Tabelle A 4 im Anhang). Eine verringerte Empfindlichkeit der Isolate wurde darüber hinaus gegenüber Doxzyklin, Mezlocillin, Netilmicin und Piperacillin festgestellt. Entsprechend der Verteilung der MHK-Werte (vgl. Tabelle A 4) befanden sich zudem 44 % der empfindlichen Isolate bei Amikacin, 29,4 % bei Tobramycin, 24 % bei Gentamicin und 26,5 % bei Doxzyklin am Breakpoint von „sensibel“ nach „intermediär“. Als vollständig sensibel erwiesen sich hingegen Isolate gegenüber den Fluorchinolonen, Meropenem und Neomycin.

**Tabelle 23: Verteilung sensibel, intermediär und resistent einzustufender *E. coli*-Isolate (n = 34) aus Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft [n (%)]**

Antibiotikum	Sensibel	Intermediär	Resistent
Amoxicillin/Clavulansäure	9 (26,5)	14 (41,2)	11 (32,3)
Amikacin	29 (85,3)	5 (14,7)	0
Ampicillin	7 (20,6)	10 (29,4)	17 (50,0)
Apramycin	30 (88,2)	-	4 (11,8)
Ceftazidim	32 (94,1)	2 (5,9)	0
Cefaclor	6 (17,7)	9 (26,4)	19 (55,9)
Cefepim	33 (97,1)	1 (2,9)	0
Ceftiofur	30 (88,2)	-	4 (11,7)
Ciprofloxacin	34 (100)	0	0
Chloramphenicol	29 (85,3)	-	5 (14,6)
Colistin	31 (91,1)	0	3 (8,8)
Cefoxitin	14 (41,2)	7 (20,6)	13 (38,3)
Cefotaxim	30 (88,3)	2 (5,8)	2 (5,8)
Cefuroxim	16 (47,1)	10 (29,4)	8 (23,5)
Doxyzyklin	19 (55,9)	10 (29,4)	5 (14,7)
Enrofloxacin	34 (100)	0	0
Florfenicol	28 (82,4)	-	6 (17,7)
Gentamicin	26 (76,5)	7 (20,6)	1 (2,9)
Imipenem	23 (97,1)	1 (2,9)	0
Meropenem	34 (100)	0	0
Mezlocillin	21 (61,8)	6 (17,7)	7 (20,6)
Neomycin	34 (100)	-	0
Netilmicin	22 (64,7)	12 (35,3)	0
Piperacillin	24 (70,6)	6 (17,7)	4 (11,7)
Piperacillin/Tazobactam	32 (94,1)	2 (5,9)	0
Spectinomycin	19 (56,0)	-	15 (44,0)
Streptomycin	31 (91,3)	-	3 (8,8)
Co-Trimoxazol	30 (88,2)	2 (5,9)	2 (5,9)
Tobramycin	29 (85,3)	5 (14,7)	0

„-“ Intermediärbereich ist nicht definiert

#### Einfluss der Vermarktungsstufe auf die Empfindlichkeit und die mittleren MHK-Werte

Aufgrund der geringen Anzahl von Isolaten sind die erhobenen Befunde nur sehr zurückhaltend zu interpretieren. Bei zahlreichen Substanzen (Amoxicillin/Clavulansäure, Mezlocillin, Cefoxitin, Cefotaxim, Apramycin, Streptomycin, Spectinomycin, Doxyzyklin und Co-Trimoxazol) bestand eine Tendenz zu höheren Resistenzraten bei Isolaten aus Proben die vom landwirtschaftlichen Betrieb stammten, als bei Isolaten aus Supermarktproben. Signifikant war der Unterschied zwischen den Resistenzraten für Piperacillin ( $p = 0,026$ ). Hier waren 28,6 % der Isolate aus landwirtschaftlichen Proben als resistent einzustufen, während kein einziges Isolat aus Supermarktproben diese Eigenschaft aufwies. Die MHK-Werte von

Isolaten aus landwirtschaftlichem Probenmaterial (MHK<sub>LW</sub>) und solchen aus Supermarktproben (MHK<sub>S</sub>) unterschieden sich signifikant bei Amikacin (MHK<sub>LW</sub> vs. MHK<sub>S</sub> 0,09 log<sub>2</sub> Konzentrationsstufen) und bei Neomycin (MHK<sub>S</sub> vs. MHK<sub>LW</sub> 0,17 log<sub>2</sub> Konzentrationsstufen). Ein einheitlicher Trend zu höheren MHK-Werten konnte bei keiner der beiden Gruppen festgestellt werden.

#### Einfluss der Matrix auf die Empfindlichkeit

Aufgrund geringer Isolatezahlen konnten bezüglich der Verteilung sensibler, intermediärer und resistenter Isolate keine signifikanten Unterschiede zwischen den Matrices festgestellt werden. 27 Isolate wiesen Resistenz gegenüber mindestens einem Antibiotikum auf. Sie wurden isoliert aus Fruchtgemüse (n = 6), Wurzelgemüse (n = 6), Salatgemüse (n = 7), Zwiebelgemüse (n = 4) und Getreide (n = 4).

#### Mehrfachresistenzen bei *E. coli*

Sieben Isolate waren empfindlich gegenüber allen Antibiotika, bei 22 Isolaten wurden Resistenzen gegenüber zwei und mehr Antibiotika festgestellt (vgl. Tabelle 24). Insgesamt zehn Isolate exprimierten Resistenzen gegenüber sechs und mehr Antibiotika. Hinsichtlich des Vorkommens und der Verteilung der Mehrfachresistenzen lag kein Unterschied zwischen *E. coli*-Isolaten aus landwirtschaftlichen Betrieben und solchen aus Supermärkten vor.

**Tabelle 24: Häufigkeiten nicht-, einfach- und mehrfachresistenter *E. coli*-Isolate (n = 34) aus pflanzlichen Lebensmitteln unterschiedlicher Vermarktungsstufen**

Vermarktungsstufe	Anzahl Isolate (n)	Anzahl der Resistenzen							
		0	1	2	3	4	5	6-7	8-11
Landw. Betrieb	14	4	1	2	0	1	1	2	3
Supermarkt	20	3	4	4	1	0	3	1	4
Gesamt n (%)	34	7 (20,6)	5 (14,7)	6 (17,7)	1 (2,9)	1 (2,9)	4 (11,8)	3 (8,8)	7 (20,6)

#### Resistenzprofile

Alle Isolate mit vier und mehr Resistenzen erwiesen sich gegenüber Cefaclor als unempfindlich. Resistenz gegenüber Ampicillin war am zweithäufigsten zu beobachten. Resistenz gegenüber Piperacillin, Streptomycin und Co-Trimoxazol wurde nur bei Isolaten aus Proben von landwirtschaftlichen Betrieben festgestellt. Solche gegenüber Gentamicin und Colistin traten dagegen nur bei Isolaten aus Supermarktproben auf. Tabelle 25 zeigt die häufigsten Resistenzprofile, in Tabelle 26 sind die Resistenzprofile der hochmehrfachresistenten Isolate dargestellt.



**Tabelle 25: Verteilung der Mehrfachresistenz sowie dominante phänotypische Resistenzprofile von *E. coli*-Isolaten (n = 34) aus pflanzlichen Lebensmitteln**

Anzahl der Resistenzen	Isolate n (%)		Häufigstes Resistenzprofil n (%) der Gesamtsolate	
	Wirkstoff (n = 29)	Wirkstoffklasse* (n = 9)	Wirkstoff	Wirkstoffklasse*
0	7 (20,6)	7 (20,6)	-	-
1	5 (14,7)	3 (8,8)	SPT 3 (8,8)	AGL 3 (8,8)
2	6 (17,7)	5 (14,7)	AMC COX 2 (5,9)	CEP PEN 3 (8,8)
3	1 (2,9)	1 (2,9)	CEC AMC AMP 1 (2,9)	CEP PEN 1 (2,9)
4	1 (2,9)	1 (2,9)	CEC COX APR SPT 1 (2,9)	CEP AGL 1 (2,9)
5	4 (11,8)	4 (11,8)	CEC COX AMC AMP SPT 1 (2,9) oder CEC CXM AMC AMP COL 1 (2,9)	CEP PEN AGL oder CEP PEN POL 3 (8,8)
6	1 (2,9)	1 (2,9)	CEC COX AMP MZL PIP SPT 1 (2,9)	CEP PEN AGL 1 (2,9)
7	2 (5,9)	Vgl. Tabelle 26	Vgl. Tabelle 26	Vgl. Tabelle 26
8	2 (5,9)	Vgl. Tabelle 26	Vgl. Tabelle 26	Vgl. Tabelle 26
9	2 (5,9)	Vgl. Tabelle 26	Vgl. Tabelle 26	Vgl. Tabelle 26
10	2 (5,9)	Vgl. Tabelle 26	Vgl. Tabelle 26	Vgl. Tabelle 26
11	1 (2,9)	Vgl. Tabelle 26	Vgl. Tabelle 26	Vgl. Tabelle 26

\* Resistenz gegen einen oder mehrere Wirkstoffe aus der genannten Wirkstoffklasse; AGL: Aminoglykoside, CEP: Cephalosporine, PEN: Penicilline, POL: Polymyxine

\*\* Kürzel der Antibiotika siehe Abkürzungsverzeichnis

„oder“ Profile traten in gleichem Umfang auf

Alle hochmehrfachresistenten Isolate beider Vermarktungsstufen waren vor allem gegenüber Cephalosporinen und Penicillinen unempfindlich, wobei die Resistenz gegenüber Ampicillin bei allen Isolaten, diejenige gegenüber Mezlocillin überwiegend bei den „landwirtschaftlichen Isolaten“ festzustellen war. Gegenüber Doxzyklin konnte bei drei Isolaten aus landwirtschaftlichem Probenmaterial und bei einem Isolat aus dem Supermarkt resistentes Verhalten festgestellt werden. Alle Isolate aus Supermarktproben erwiesen sich darüber hinaus gegenüber den Fenicolderivaten Florfenicol und Chloramphenicol resistent. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass fast alle Isolate beider Vermarktungsstufen gegenüber Spectinomycin unempfindlich waren, wie Tabelle 26 zeigt. Da in den einzelnen Wirkstoffklassen teilweise mehrere Wirkstoffe getestet wurden, ist die Anzahl der exprimierten Resistenzen gegenüber diesen Einzelwirkstoffen deutlich höher als die Resistenz gegenüber den Wirkstoffklassen. Hierbei handelt es sich jedoch in Einzelfällen um Kreuzresistenzen, so z. B. bei Mezlocillin/Piperacillin, Streptomycin/Spectinomycin oder Florfenicol/Chloramphenicol.

**Tabelle 26: Resistenzprofile hochmehrfachresistenter *E. coli* aus pflanzlichen Lebensmitteln**

Vermarktungs- stufe	n Resistenzen		Resistenzprofil <sup>(b)</sup> (Anzahl der Isolate)
	Wirkstoffe	Wirkstoff- klassen <sup>(a)</sup>	
Landw. Betrieb	7	4	AMC/AMP/MZL/PIP/CEC/APR/DOX (1)
	8	5	AMP/MZL/PIP/CEC/STR/SPT/DOX/SXT (1)
	9	5	AMP/MZL/PIP/CEC/APR/STR/SPT/DOX/SXT (1)
	11	4	AMC/AMP/MZL/CEC/CET/COX/CTX/CXM/SPT/FLL/CMP (1)
Supermarkt	7	5	AMP/CEC/COX/CXM/SPT/COL/FLL (1)
	8	4	AMP/CEC/CET/COX/CXM/SPT/FLL/CMP (1)
	9	4	AMC/AMP/CEC/CET/COX/CXM/SPT/FLL/CMP (1)
	10	3	AMC/AMP/MZL/CEC/CET/COX/CXM/CTX/FLL/CMP (1)
	10	6	AMC/AMP/CEC/COX/CXM/SPT/COL/FLL/CMP/DOX (1)

<sup>(a)</sup> Resistenz gegen einen oder mehrere Wirkstoffe einer Klasse

<sup>(b)</sup> Kürzel der Antibiotika siehe Abkürzungsverzeichnis

## 2.2 Coliforme Keime

### 2.2.1 *Enterobacter aerogenes*

*Ent. aerogenes* verhielt sich vor allem gegenüber Cefuroxim und Colistin intermediär bzw. resistent, wie Tabelle 27 zu entnehmen ist. Weitere Resistenzen bestanden außerdem gegenüber Ceftiofur, Mezlocillin und Doxzyklin. Gegenüber den neueren Aminoglykosiden konnte Unempfindlichkeit nicht festgestellt werden. Hier zeigten sich alle Isolate vollständig sensibel, während vier bzw. zwei Isolate unempfindlich gegenüber Spectinomycin und Streptomycin waren. Aus der MHK-Wertverteilung in Tabelle A 5 im Anhang geht zudem hervor, dass gegenüber Spectinomycin bei 15 Isolaten (62,5 %) eine MHK von 64 µg/ml gemessen wurde. Diese Isolate befanden sich damit bereits am Breakpoint zu „resistent“.

**Tabelle 27: Verteilung sensibel, intermediär und resistent einzustufender *Ent. aerogenes*-Isolate (n = 24) aus Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft [n (%)]**

Antibiotikum	Sensibel	Intermediär	Resistent
Amikacin	24 (100)	0	0
Apramycin	24 (100)	-	0
Ceftazidim	24 (100)	0	0
Cefepim	24 (100)	0	0
Ceftiofur	21 (87,6)	-	3 (12,5)
Ciprofloxacin	24 (100)	0	0
Chloramphenicol	24 (100)	-	0
Colistin	18 (75,0)	0	6 (25,0)
Cefotaxim	22 (91,7)	1 (4,2)	1 (4,2)
Cefuroxim	14 (58,4)	4 (16,7)	6 (25,0)
Doxyzyklin	21 (87,5)	0	3 (12,5)
Enrofloxacin	24 (100)	0	0
Florfenicol	24 (100)	-	0
Gentamicin	24 (100)	0	0
Imipenem	24 (100)	0	0
Meropenem	24 (100)	0	0
Mezlocillin	19 (79,2)	2 (8,3)	3 (12,5)
Neomycin	24 (100)	-	0
Netilmicin	22 (91,7)	2 (8,3)	0
Piperacillin	21 (87,5)	1 (4,2)	2 (8,3)
Piperacillin/Tazobactam	24 (100)	0	0
Spectinomycin	20 (83,4)	-	4 (16,6)
Streptomycin	22 (91,7)	-	2 (8,3)
Co-Trimoxazol	23 (95,8)	1 (4,2)	0
Tobramycin	24 (100)	0	0

„-“, Intermediärbereich ist nicht definiert

### Einfluss der Vermarktungsstufe und der Matrix auf die Empfindlichkeit und die mittleren MHK-Werte

Ein signifikanter Unterschied zwischen Isolaten aus landwirtschaftlichem Probenmaterial und solchen aus Supermarktproben hinsichtlich des Resistenzverhaltens und der MHK-Werte konnte bei *Ent. aerogenes* aufgrund der geringen Isolatezahlen nicht herausgearbeitet werden.

Aufgrund geringer Isolatezahlen konnten zwischen den Matrices ebenfalls keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Verteilung sensibler, intermediärer und resistenter Isolate festgestellt werden. 13 *Ent. aerogenes*-Isolate (Fruchtgemüse n = 3, Wurzelgemüse n = 4, Salatgemüse n = 4, Zwiebelgemüse n = 2) verhielten sich resistent gegenüber mindestens einem Antibiotikum.

### Mehrfachresistenzen bei *Ent. aerogenes*

Elf *Ent. aerogenes*-Isolate erwiesen sich als empfindlich gegenüber den geprüften Antibiotika. Somit war mehr als die Hälfte dieser Isolate gegenüber mindestens einem Antibiotikum unempfindlich (vgl. Tabelle 28). *Ent. aerogenes*-Isolate mit zwei und mehr Resistenzen waren in landwirtschaftlichem Probenmaterial häufiger vorhanden als in Supermarktproben, aus denen nur ein einziges Isolat mit zwei Resistenzen isoliert worden war. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (landwirtschaftlicher Betrieb vs. Supermarkt) bezüglich des Vorkommens von Mehrfachresistenzen konnte aufgrund der geringen Isolatezahlen jedoch nicht festgestellt werden. Signifikant ( $p < 0,05$ ) – trotz geringer Isolatezahlen - war hingegen der Unterschied zwischen den Vermarktungsstufen hinsichtlich der Verteilung nicht-, einfach- und mehrfachresistenter Isolate.

**Tabelle 28: Häufigkeiten nicht-, einfach- und mehrfachresistenter *Ent. aerogenes*-Isolate (n = 24) aus pflanzlichen Lebensmitteln unterschiedlicher Vermarktungsstufen**

Vermarktungsstufe	Anzahl Isolate (n)	Anzahl der Resistenzen					
		0	1	2	3	4	5
		n	n	n	n	n	n
Landw. Betrieb <sup>a</sup>	10	2	1	2	2	2	1
Supermarkt <sup>b</sup>	14	9	4	1	0	0	0
Gesamt n (%)	34	11 (45,8)	5 (20,8)	3 (12,5)	2 (8,3)	2 (8,3)	1 (4,2)

<sup>a,b</sup> Unterschied zwischen den Vermarktungsstufen ist signifikant ( $p < 0,05$ ) bezügl. der Verteilung nicht-, einfach- und mehrfachresistenter Isolate

### Resistenzprofile

In Tabelle 29 sind dominante Resistenzprofile von *Ent. aerogenes* dargestellt. Von den acht mehrfachresistenten Isolaten waren sechs Isolate unempfindlich gegenüber Colistin und drei gegenüber Doxyzyklin. Die Zahl der Wirkstoffresistenzen reicht von einer bis zu fünf gleichzeitig exprimierten Resistenzen. Es wird deutlich, dass die Resistenz gegenüber den  $\beta$ -Lactamantibiotika am häufigsten vertreten ist. Teilweise handelt es sich bei der Resistenz gegenüber mehrere Wirkstoffe um Kreuzresistenzen. So sind die beiden dreifachresistenten Isolate (bezogen auf die Einzelwirkstoffe) jeweils gegenüber zwei Wirkstoffklassen resistent. Kreuzresistenzen bestehen demnach z. B. gegenüber Streptomycin/Spectinomycin.

**Tabelle 29: Verteilung der Mehrfachresistenz sowie dominante phänotypischer Resistenzprofile von *Ent. aerogenes* (n = 24) aus pflanzlichen Lebensmitteln**

Anzahl der Resistenzen	Isolate n (%)		Häufigstes Resistenzprofil (n Isolate)	
	Wirkstoff (n = 25)	Wirkstoffklasse* (n = 9)	Wirkstoff**	Wirkstoffklasse*
0	11 (45,8)	11 (45,8)	-	-
1	5 (20,8)	2 (8,3)	SPT (2)	AGL (2)
2	3 (12,5)	3 (12,5)	CXM COL (3)	CEP POL (3)
3	2 (8,3)	2 (8,3)	STR SPT DOX (1) oder MZL PIP DOX (1)	AGL TET (1) oder PEN TET (1)
4	2 (8,3)	2 (8,3)	STR SPT COL DOX (1) CET CXM PIP COL (1)	AGL POL TET (1) o. CEP PEN POL (1)
5	1 (4,2)	1 (4,2)	CET CTX CXM MZL COL (1)	CEP PEN POL (1)

\* Resistenz gegen einen oder mehrere Wirkstoffe aus der genannten Wirkstoffklasse; AGL: Aminoglykoside, CEP: Cephalosporine, POL: Polymyxine, TET: Tetracycline

\*\* Kürzel der Antibiotika s. Abkürzungsverzeichnis  
„oder“ Profile traten in gleichem Umfang auf

### 2.2.2 *Enterobacter cloacae*

*Ent. cloacae* exprimierte Resistenzen vor allem gegenüber Ceftiofur, Cefuroxim, Mezlocillin, Piperacillin und Spectinomycin. Intermediäres Verhalten wurde vor allem gegenüber Doxycyclin beobachtet (vgl. Tabelle 30). Bei den neueren Aminoglykosiden wurden dagegen keine Resistenzen festgestellt, hier waren lediglich einige wenige Isolate als „intermediär“ einzustufen. Nur gegenüber Spectinomycin exprimierten 28 % der Isolate Resistenz. Aus den MHK-Wertverteilungen (vgl. Tabelle A 6 im Anhang) geht zudem hervor, dass gegenüber Spectinomycin bei 25 % der Isolate ein Wert von 64 µg/ml gemessen wurde. Diese Isolate sind demnach bereits am Breakpoint zur Resistenz einzuordnen.

**Tabelle 30: Prozentuale Verteilung sensibel, intermediär und resistent einzustufender *Ent. cloacae*-Isolate aus Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft**

Antibiotikum	Gesamt (n = 172)			Landw. Betrieb (n = 56)			Supermarkt (n = 116)		
	s	i	r	s	i	r	s	i	r
Amikacin	95,9	4,1	0	96,4	3,6	0	95,7	4,3	0
Apramycin	100	-	0	100	-	0	100	-	0
Ceftazidim	98,9	0	1,2	98,3	0	1,8	99,2	0	0,9
Cefepim	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Ceftiofur	90,2	-	9,9	<b>78,5**</b>	-	<b>21,4*</b>	<b>95,7**</b>	-	<b>4,3*</b>
Ciprofloxacin	99,4	0,6	0	100	0	0	99,1	0,9	0
Chloramphenicol	98,2	-	1,8	98,2	-	1,8	98,3	-	1,7
Colistin	92,4	-	7,0	96,4	-	5,4	92,3	-	7,9
Cefotaxim	90,8	4,6	4,6	<b>80,2**</b>	<b>10,8</b>	<b>9,0</b>	<b>95,8**</b>	<b>1,8</b>	<b>2,6</b>
Cefuroxim	31,4	23,8	44,6	25,1	21,4	53,6	34,5	25,0	40,5
Doxyzyklin	59,3	40,7	0	58,9	41,1	0	59,5	40,6	0
Enrofloxacin	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Florfenicol	98,9	-	1,2	98,2	-	1,8	99,1	-	0,9
Gentamicin	93,1	7,0	0	91,1	8,9	0	94,0	6,0	0
Imipenem	95,5	3,5	1,2	96,5	3,6	0	94,9	3,5	1,7
Meropenem	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Mezlocillin	66,3	21,5	12,2	<b>42,9**</b>	<b>30,4</b>	<b>26,8*</b>	<b>77,6**</b>	<b>17,2</b>	<b>5,2*</b>
Neomycin	100	-	0	100	-	0	100	-	0
Netilmicin	92,4	7,6	0	96,4	3,6	0	90,5	9,5	0
Piperacillin	73,3	22,0	4,6	<b>51,8**</b>	<b>37,5</b>	<b>10,7*</b>	<b>83,7**</b>	<b>14,7</b>	<b>1,8*</b>
Piperacillin/Tazobactam	96,0	4,1	0	91,1	9,0	0	98,3	1,8	0
Spectinomycin	72,1	-	27,9	76,8	-	23,3	69,9	-	30,2
Streptomycin	98,3	-	1,7	98,3	-	1,8	98,3	-	1,7
Co-Trimoxazol	99,4	0,6	0	98,3	1,8	0	100	0	0
Tobramycin	96,5	3,5	0	96,4	3,6	0	96,5	3,5	0

s: sensibel, i: intermediär, r: resistent; "-": Intermediärbereich ist nicht definiert

**Fett:** Verteilungen sensibler, intermediärer und resistenter Isolate aus landw. Probenmaterial und Supermarktproben unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,05$ ) bezgl. des entsprechenden Antibiotikums

\* Raten für als resistent einzustufende Isolate aus landw. Probenmaterial und Supermarktproben unterscheiden sich signifikant bezgl. des entsprechenden Antibiotikums

\*\* Raten für als sensibel einzustufende Isolate aus landw. Probenmaterial und Supermarktproben unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,05$ ) bezgl. des entsprechenden Antibiotikums

### Einfluss der Vermarktungsstufe auf die Empfindlichkeit und die mittleren MHK-Werte

Wie bei *E. coli* und *Ent. aerogenes* zeichnete sich auch bei *Ent. cloacae* gegenüber einer Vielzahl von Substanzen eine Tendenz zu höheren Resistenzraten bei landwirtschaftlichen Isolaten als bei solchen aus Supermarktproben ab. Bei Ceftiofur (21,4 % vs. 4,3 %;  $p = 0,001$ ), Cefotaxim (9,0 % vs. 6,2 %;  $p = 0,004$ ), Mezlocillin und Piperacillin

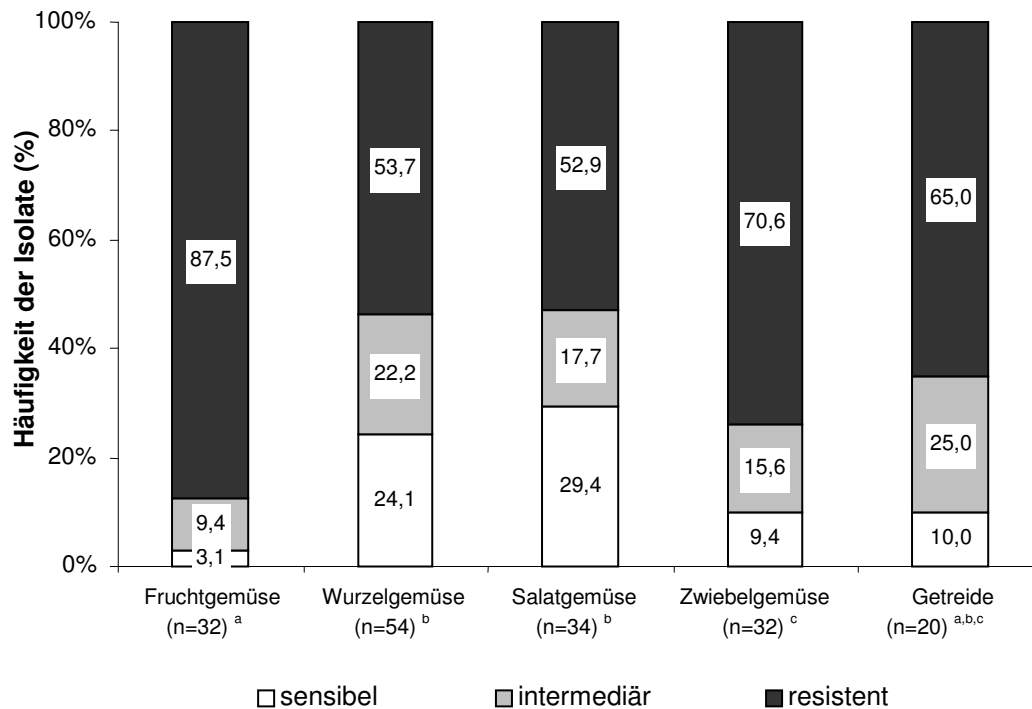
(26,8 % vs. 5,2 % (MZL) bzw. 10,7 % vs. 1,8 % (PIP); beide  $p < 0,001$ ) konnten die Unterschiede zwischen den Vermarktungsstufen bezüglich der Resistenzraten statistisch abgesichert werden. Die MHK-Werte zeigten bei Isolaten aus landwirtschaftlichem Probenmaterial ( $MHK_{LW}$ ) eine Tendenz zu höheren Konzentrationsstufen als bei Isolaten aus Supermarktproben ( $MHK_S$ ). Signifikant waren diese Unterschiede zwischen Isolaten aus landwirtschaftlichem Probenmaterial und solchen aus Supermarktproben jedoch nur bei folgenden Antibiotika: Ampicillin ( $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  0,72  $\log_2$  Konzentrationsstufen), Piperacillin ( $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  0,08  $\log_2$ ), Piperacillin/Tazobactam ( $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  0,15  $\log_2$ ), Cefuroxim ( $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  0,08  $\log_2$ ), Apramycin ( $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  0,11  $\log_2$ ), Sulphamethoxazol-Trimethoprim ( $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  0,05  $\log_2$ ), Chloramphenicol ( $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  0,64  $\log_2$ ), Mezlocillin ( $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  0,21  $\log_2$ ), Spectinomycin ( $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  2,00  $\log_2$ ), Enrofloxacin ( $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  0,02  $\log_2$ ) und Ceftiofur ( $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  0,13  $\log_2$ ). Bei Ciprofloxacin und Amoxicillin/Clavulansäure waren die MHK-Werte von Isolaten aus Supermarktproben signifikant höher als die MHK-Werte von Isolaten aus landwirtschaftlichem Probenmaterial (CIP:  $MHK_S$  vs.  $MHK_{LW}$  0,02  $\log_2$ , AMC:  $MHK_S$  vs.  $MHK_{LW}$  1,93  $\log_2$ ).

#### Einfluss der Matrix auf die Empfindlichkeit

Bezüglich der Resistenzraten konnten signifikante Unterschiede zwischen den Matrices für Colistin, Mezlocillin und Spectinomycin, nicht jedoch für die anderen Antibiotika festgestellt werden. Isolate aus Fruchtgemüse wiesen bei Spectinomycin stets signifikant höhere Resistenzraten auf als Isolate aus den übrigen Matrices<sup>1</sup> (75 %<sub>F</sub>, 31,3 %<sub>Z</sub>, 25 %<sub>G</sub>, 11,8 %<sub>S</sub> und 9,3 %<sub>W</sub>). Bei Mezlocillin hingegen wurden mehr Isolate aus Wurzelgemüse als aus Fruchtgemüse als resistent eingestuft (18,5 %<sub>W</sub> vs. 3,1 %<sub>F</sub>). Bei Colistin waren die Resistenzraten der Isolate aus Getreide und Fruchtgemüse signifikant höher als der Isolate aus den übrigen Matrices (30 %<sub>G</sub> und 12,5 %<sub>F</sub> vs. 3,1 %<sub>Z</sub>, 1,9 %<sub>W</sub> und 0 %<sub>S</sub>). Wie Abbildung 8 zu entnehmen ist, waren darüber hinaus bezüglich der Verteilung sensibler, intermediärer und resistenter Isolate ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen den Matrices festzustellen. So erwiesen sich insbesondere Isolate aus Fruchtgemüse und aus Zwiebelgemüse häufiger als resistent als Isolate aus Wurzelgemüse und Salat/Blattgemüse. Isolate aus Getreide unterschieden sich nicht signifikant von solchen aus anderen Matrices. Es ist zudem zu berücksichtigen, dass die Isolatezahlen je Matrix vergleichsweise gering sind.

---

<sup>1</sup> F: Fruchtgemüse, Z: Zwiebelgemüse, G: Getreide, S: Salatgemüse, W: Wurzelgemüse



**Abbildung 8: Verteilung sensibler, intermediärer und resistenter *Enterobacter cloacae*-Isolate in unterschiedlichen Matrices pflanzlichen Ursprungs**

a,b,c Matrices mit unterschiedlichen Superskripten unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,05$ ) bezügl. der Verteilung sensibler, intermediärer und resistenter Isolate

#### Mehrfachresistenzen bei *Ent. cloacae*

35 % der Isolate waren gegenüber allen Antibiotika empfindlich. Bei durchschnittlich 29 % wurden Resistenzen gegenüber zwei und mehr Antibiotika festgestellt (vgl. Tabelle 31). Bezüglich der Verteilung nicht-, einfach- und mehrfachresistenter Isolate konnte zwischen den Vermarktungsstufen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Hingegen war der Unterschied zwischen Isolaten aus beiden Vermarktungsstufen signifikant ( $p < 0,05$ ) bei der Vierfachresistenz (16 %<sub>oLW</sub> vs. 1,7 %<sub>oS</sub>).

**Tabelle 31: Häufigkeiten nicht-, einfach- und mehrfachresistenter *Ent. cloacae*-Isolate (n = 172) aus pflanzlichen Lebensmitteln unterschiedlicher Vermarktungsstufen**

Vermarktungsstufe	Anzahl Isolate (n)	Anzahl der Resistenzen													
		0		1		2		3		4		5		6-7	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Landw. Betrieb	56	16	28,6	20	35,7	7	12,5	2	3,6	9	16,1*	1	1,8	1	1,8
Supermarkt	116	44	37,9	42	36,2	22	19,0	5	4,3	2	1,7*	0	0	1	0,9
Gesamt	172	60	34,9	62	36,1	29	16,9	7	4,1	11	6,4	1	0,6	2	1,2

\* Unterschied zwischen den Vermarktungsstufen ist signifikant ( $p < 0,05$ ) bezügl. der entsprechenden Anzahl der Resistenzen



### Resistenzprofile

Wie aus Tabelle 32 hervorgeht, waren alle *Ent. cloacae*-Isolate mit Resistenz gegenüber einem oder mehr Antibiotika stets unempfindlich gegenüber Cephalosporinen. Hierbei dominierte die Resistenz gegenüber Cefuroxim. Darüber hinaus verhielten sich mehrfach-resistente Isolate fast immer unempfindlich gegenüber Penicillinen – hier vor allem gegenüber Mezlocillin – und gegenüber dem Aminoglykosid Spectinomycin. Bei jeweils einem Isolat wurde Resistenz gegen sechs bzw. sieben Wirkstoffe beobachtet.

**Tabelle 32: Verteilung der Mehrfachresistenz sowie dominante phänotypische Resistenzprofile von *Ent. cloacae* (n = 172) aus pflanzlichen Lebensmitteln**

Anzahl der Resistenzen	Isolate (%)		Häufigstes Resistenzprofil (% der Gesamtisolate)	
	Wirkstoffe (n = 25)	Wirkstoffklasse* (n = 9)	Wirkstoff**	Wirkstoffklasse*
0	34,9	34,9	-	-
1	36,1	19,8	CXM (19,8)	CEP (19,8)
2	16,9	16,3	CXM SPT (11,1)	CEP AGL (11,1)
3	4,1	4,1	CET CXM MZL (1,2)	CEP PEN (1,2) CEP AGL (1,2)
4	6,4	6,4	CET CXM MZL PIP (2,9) oder CET CXM CTX MZL (2,3)	CEP PEN (5,2)
5	0,6	0,6	CET CXM CTX MZL PIP (0,6)	CEP PEN (0,6)
6	0,6	0,6	CET CXM CTX MZL PIP COL (0,6)	CEP PEN POL (0,6)
7	0,6	0,6	CET CXM CTX MZL FLL CMP SPT (0,6)	CEP PEN FEN AGL (0,6)

\* Resistenz gegen einen oder mehrere Wirkstoffe aus der genannten Wirkstoffklasse; CEP: Cephalosporine, AGL: Aminoglykoside, PEN: Penicilline; POL: Polymyxine, FEN: Chloramphenicol-derivate; \*\* Kürzel der Antibiotika siehe Abkürzungsverzeichnis  
„oder“ Profile traten in gleichem Umfang auf

Jeweils ein Isolat aus einer Supermarktprobe und aus landwirtschaftlichem Probenmaterial war hochmehrfachresistent. Die Profile dieser beiden Isolate sind in Tabelle 33 dargestellt. Hierbei fällt auf, dass es sich bei den exprimierten Resistenzen hauptsächlich um solche gegenüber  $\beta$ -Lactam-Antibiotika handelte. So waren bei beiden Isolaten die Resistenzen gegenüber Ceftiofur, Cefotaxim, Cefuroxim und Mezlocillin in das Profil involviert.

**Tabelle 33: Resistenzprofile hochmehrfach-resistenter *Ent. cloacae*-Isolate aus pflanzlichen Lebensmitteln unterschiedlicher Vermarktungsstufen**

Vermarktungsstufe	n Resistenzen		Resistenzprofil <sup>(b)</sup> (Anzahl der Isolate)
	Wirkstoffe	Wirkstoffklassen <sup>(a)</sup>	
Landw. Betrieb	7	4	CET/CTX/CXM/MZL/FLL/CMP/SPT (1)
Supermarkt	6	3	CET/CTX/CXM/MZL/PIP/COL (1)

<sup>(a)</sup> Resistenz gegen einen oder mehrere Wirkstoffe einer Klasse

<sup>(b)</sup> Kürzel der Antibiotika siehe Abkürzungsverzeichnis

### 2.2.3 *Enterobacter sakazakii*

*Ent. sakazakii* verhielt sich intermediär bzw. resistent vor allem gegenüber Cefaclor und Cefoxitin sowie gegenüber Amoxicillin/Clavulansäure und Ampicillin. Auch gegenüber Colistin und Cefuroxim wurden höhere Resistenzraten bzw. intermediäres Verhalten festgestellt. Gegenüber Mezlocillin und Piperacillin erwiesen sich die Isolate überwiegend als sensibel; ebenso gegenüber Aminoglykosiden, mit Ausnahme des Spectinomycin (vgl. Tabelle 34).

**Tabelle 34: Prozentuale Verteilung sensibel, intermediär und resistent einzustufender *Ent. sakazakii*-Isolate aus pflanzlichen Lebensmitteln**

Antibiotikum	Gesamt (n = 129)			Landw. Betrieb (n = 43)			Supermarkt (n = 86)		
	s	i	r	s	i	r	s	i	r
Amoxicillin/Clavulansäure	31,8	55,8	12,5	32,6	51,1	16,3	31,4	58,2	10,5
Amikacin	97,7	2,3	0	100	0	0	96,5	3,5	0
Ampicillin	40,4	38,7	21,1	34,9	41,9	23,3	43,0	37,2	19,8
Apramycin	100	-	0	100	-	0	100	-	0
Ceftazidim	99,3	0	0,8	100	0	0	98,9	0	1,2
Cefaclor	12,4	31,0	56,6	11,6	30,3	58,2	12,8	31,4	55,8
Cefepim	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Ceftiofur	97,0	-	3,2	97,6	-	2,3	96,6	-	3,5
Ciprofloxacin	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Chloramphenicol	98,5	-	1,6	100	-	0	97,7	-	2,3
Colistin	87,6	-	12,4	81,3	-	18,6	90,7	-	9,3
Cefoxitin	38,8	32,6	28,7	<b>34,9</b>	<b>25,6</b>	<b>39,5</b>	<b>40,7</b>	<b>36,1</b>	<b>23,2</b>
Cefotaxim	99,3	0	0,8	100	0	0	98,9	0	1,2
Cefuroxim	74,4	13,2	12,5	<b>74,4</b>	<b>7,0</b>	<b>18,6*</b>	<b>74,4</b>	<b>16,3</b>	<b>9,3*</b>
Doxyzyklin	94,5	4,7	0,8	93,0	4,7	2,3	95,4	4,7	0
Enrofloxacin	98,5	0	1,6	100	0	0	97,8	0	2,3
Florfenicol	100	-	0	100	-	0	100	-	0
Gentamicin	86,0	6,2	0	95,4	4,7	0	93,0	7,0	0
Imipenem	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Meropenem	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Mezlocillin	93,0	3,9	3,1	90,7	4,7	4,7	94,2	3,5	2,3
Neomycin	100	-	0	100	-	0	100	-	0
Netilmicin	97,7	2,3	0	100	0	0	96,5	3,5	0
Piperacillin	96,1	2,3	1,6	95,4	2,3	2,3	96,5	2,3	1,2
Piperacillin/Tazobactam	99,3	0	0,8	100	0	0	98,8	0	1,2
Spectinomycin	90,0	-	10,1	93,0	-	7,0	88,4	-	11,6
Streptomycin	99,3	-	0,8	97,7	-	2,3	100	-	0
Co-Trimoxazol	99,3	0	0,8	97,7	0	2,3	100	0	0
Tobramycin	96,8	3,1	0	100	0	0	95,4	4,7	0

s: sensibel, i: intermediär, r: resistent; "-" Intermediärbereich ist nicht definiert

**Fett:** Verteilungen sensibler, intermediärer und resistenter Isolate aus landw. Probenmaterial und Supermarktproben unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,05$ ) bezgl. des entsprechenden Antibiotikums

\* Raten für als resistent einzustufende Isolate aus landw. Probenmaterial und aus Supermarktproben unterscheiden sich signifikant bezgl. des entsprechenden Antibiotikums

### Einfluss der Vermarktungsstufe auf die Empfindlichkeit und die mittleren MHK-Werte

Zwischen Isolaten aus landwirtschaftlichem Probenmaterial und Isolaten aus Supermarktproben konnte hinsichtlich des Resistenzverhaltens lediglich bei Cefoxitin und Cefuroxim ein signifikanter Unterschied festgestellt werden ( $p < 0,05$ ): So war bei Isolaten aus landwirtschaftlichem Probenmaterial die Resistenzrate signifikant höher als bei Isolaten aus Supermarktproben (COX: 39,5 % vs. 23,2 %, CXM: 18,6 % vs. 9,3 %). Bei beiden Substanzen verhielten sich zwar signifikant mehr Isolate aus Supermarktproben intermediär, Isolate aus landwirtschaftlichem Probenmaterial wurden bei Cefoxitin jedoch seltener als sensibel eingestuft als Isolate aus Supermarktproben, während bei Cefuroxim sensible Isolate zu gleichen Anteilen vorkamen, wie in Tabelle 34 dargestellt ist.

Insgesamt zeichnete sich auch bei *Ent. sakazakii* eine Tendenz zu höheren MHK-Werten bei Isolaten aus landwirtschaftlichem Probenmaterial ( $MHK_{LW}$ ) als bei Isolaten aus Supermarktproben ( $MHK_S$ ) ab. Die Unterschiede zwischen den MHK-Werten von Isolaten aus den Vermarktungsstufen waren bei Ampicillin ( $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  0,50  $\log_2$ ), Imipenem ( $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  0,47  $\log_2$ ) und Spectinomycin ( $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  0,89  $\log_2$ ) signifikant.

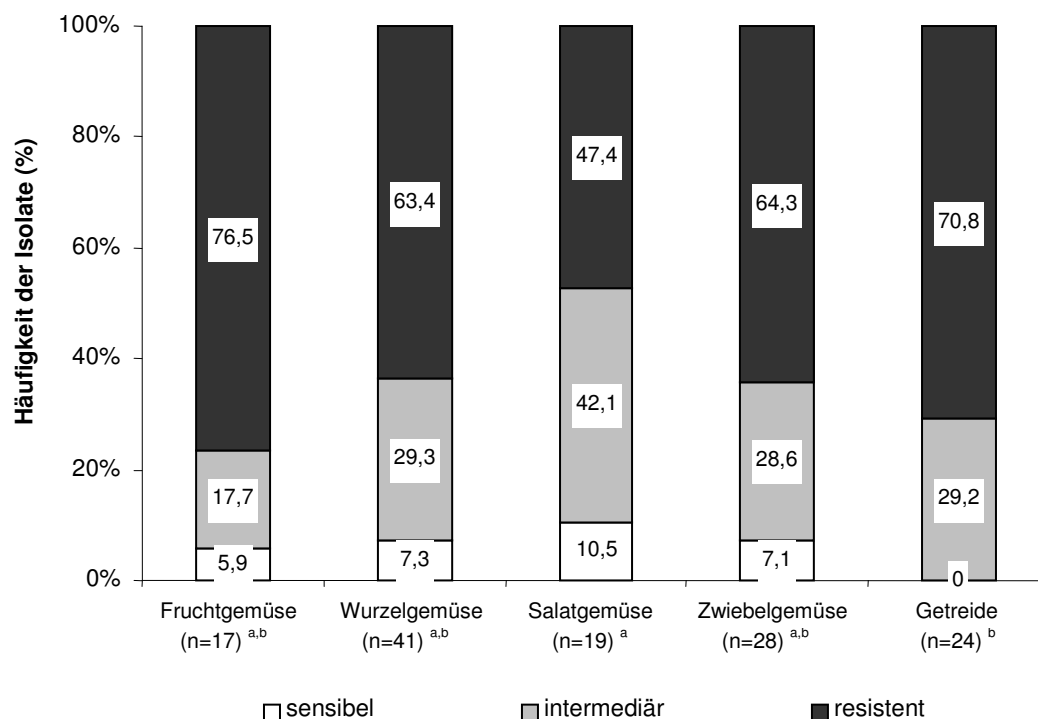
### Einfluss der Matrix auf die Empfindlichkeit

Wenngleich die Resistenzraten gegenüber den einzelnen Substanzen bei Isolaten aus Fruchtgemüse und Getreide meist höher waren als bei Isolaten aus den übrigen Matrices, so unterschieden sie sich signifikant nur bei Ampicillin (35,3 %<sub>F</sub> und 33,3 %<sub>G</sub> vs. 5,3 %<sub>S</sub> bzw. 10,7 %<sub>Z</sub>)<sup>2</sup>, Mezlocillin (11,8 %<sub>F</sub> vs. 0 %<sub>W</sub>), Cefaclor (76,5 %<sub>F</sub> vs. 42,1 %<sub>S</sub>), Ceftiofur (17,7 %<sub>F</sub> vs. 0 %<sub>W/Z</sub>), Cefoxitin (58,8 %<sub>F</sub> vs. 17,1 %<sub>W</sub> bzw. 5,3 %<sub>S</sub>; 41,7 %<sub>G</sub> vs. 32,1 %<sub>Z</sub> bzw. 17,1 %<sub>W</sub>) und Cefuroxim (20,8 %<sub>G</sub> vs. 0 %<sub>S</sub>).

Hinsichtlich der Verteilung sensibler, intermediärer und resistenter *Ent. sakazakii*-Isolate waren signifikante Unterschiede nur zwischen Salatgemüse und Getreide festzustellen. So war die Resistenzrate der Isolate aus Salatgemüse am geringsten. Isolate aus Getreide hingegen waren stets intermediär oder resistent. Sensible Isolate wurden dort nicht beobachtet. Die Resistenzrate der Isolate aus Wurzelgemüse entsprach der der Isolate aus Zwiebelgemüse. Am häufigsten resistent verhielten sich Isolate aus Fruchtgemüse (vgl. Abbildung 9), was der Beobachtung bei den Resistenzraten gegenüber den Einzelsubstanzen entspricht. Statistisch war dieser Unterschied zu Isolaten aus den anderen Matrices jedoch nicht abzusichern.

---

<sup>2</sup> F: Fruchtgemüse, G: Getreide, S: Salatgemüse, Z: Zwiebelgemüse, W: Wurzelgemüse



**Abbildung 9: Verteilung sensibler, intermediärer und resistenter *Enterobacter sakazakii*-Isolate in unterschiedlichen Matrices pflanzlichen Ursprungs**

a,b Matrices mit unterschiedlichen Superskripten unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,05$ ) hinsichtlich der Verteilung sensibler, intermediärer und resistenter Isolate  
 „sensibel“ Isolate sind empfindlich gegenüber allen geprüften Antibiotika  
 „intermediär“ Isolate sind intermediär gegenüber mindestens einem geprüften Antibiotikum, jedoch gegenüber keinem Antibiotikum resistent  
 „resistent“ Isolate sind gegenüber mindestens einem Antibiotikum resistent

#### Mehrfachresistenzen bei *Ent. sakazakii*

Insgesamt 39 % der *Ent. sakazakii*-Isolate waren gegenüber zwei und mehr Antibiotika unempfindlich. Die Anzahl und Häufigkeit von Resistenzen bei *Ent. sakazakii* ist in Tabelle 35 dargestellt. Hinsichtlich der Verteilung nicht-, ein- und mehrfachresistenter waren signifikante Unterschiede zwischen den Vermarktungsstufen festzustellen ( $p < 0,05$ ). Nicht signifikant waren hingegen die Unterschiede zwischen den Vermarktungsstufen bei der jeweiligen Anzahl der Resistenzen, wenngleich sich z. B. mehr als doppelt so viele Isolate aus landwirtschaftlichem Probenmaterial als aus Supermarktproben als resistent gegenüber zwei Antibiotika erwiesen.

**Tabelle 35: Häufigkeiten nicht-, einfach- und mehrfachresistenter *Ent. sakazakii* (n = 129) isoliert aus pflanzlichen Lebensmitteln unterschiedlicher Vermarktungsstufen**

Vermarktungsstufe	Anzahl Isolate (n)	Anzahl der Resistenzen													
		0		1		2		3		4		5		6-10	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Landw. Betrieb <sup>a</sup>	43	12	27,9	9	20,9	10	23,3	4	9,3	4	9,3	0	0	4	9,3
Supermarkt <sup>b</sup>	86	34	39,5	24	27,9	9	10,5	6	7,0	6	7,0	2	2,3	5	5,8
Gesamt	129	46	35,7	33	25,6	19	14,7	10	7,8	10	7,8	2	1,6	9	7,0

<sup>a,b</sup> Unterschied zwischen den Vermarktungsstufen ist signifikant ( $p < 0,05$ ) bezügl. der Verteilung nicht-, einfach- und mehrfachresistenter Isolate

### Resistenzprofile

Bei ein- und mehrfachresistenten Isolaten dominierte die Resistenz gegenüber Cephalosporinen und Penicillinen. Am häufigsten zeigten sich Isolate hierbei unempfindlich gegenüber Cefaclor sowie gegen Ampicillin und Amoxicillin/Clavulansäure. Es fällt auf, dass bei der Fünffachresistenz neben der exprimierten Cephalosporin- und Penicillinunempfindlichkeit keine weitere Resistenz gegenüber Antibiotika aus anderen Wirkstoffklassen bestanden. Sechs Isolate erwiesen sich als hochmehrfachresistent (vgl. Tabelle 37). Die häufigsten Resistenzprofile sind in Tabelle 36 dargestellt.

**Tabelle 36: Verteilung der Mehrfachresistenz sowie dominante phänotypische Resistenzprofile von *Ent. sakazakii* (n = 129) aus pflanzlichen Lebensmitteln**

Anzahl der Resistenzen	Isolate (%)		Häufigstes Resistenzprofil (% der Gesamtisolate)	
	Wirkstoff (n = 29)	Wirkstoffklasse* (n = 10)	Wirkstoff**	Wirkstoffklasse*
0	35,7	35,7	-	-
1	25,6	20,9	CEC (19,4)	CEP (19,4)
2	14,7	7,0	CEC COX (7,8)	CEP (7,8)
3	7,8	7,8	CXM CEC AMP (2,3) oder COX CEC AMC (2,3)	CEP PEN (5,4)
4	7,8	7,8	COX CEC AMC AMP (4,7)	CEP PEN (4,7)
5	1,6	1,6	CEC COX AMC AMP SPT (0,8) o. CEC CET CXM AMP SPT (0,8)	CEP PEN AGL (1,6)
6	2,3	2,3	CEC CXM AMC AMP MZL PIP (0,8) o. CEC CXM CET COX AMP MZL (0,8)	CEP PEN (1,6)
7	3,1	Vgl. Tabelle 37	Vgl. Tabelle 37	Vgl. Tabelle 37
9	0,8	Vgl. Tabelle 37	Vgl. Tabelle 37	Vgl. Tabelle 37
10	0,8	Vgl. Tabelle 37	Vgl. Tabelle 37	Vgl. Tabelle 37

\* Resistenz gegen einen oder mehrere Wirkstoffe aus der genannten Wirkstoffklasse; CEP: Cephalosporine, PEN: Penicilline, AGL: Aminoglykoside, POL: Polymyxine, TET: Tetrazykline

\*\* Kürzel der Antibiotika siehe Abkürzungsverzeichnis

„oder“ Profile traten in gleichem Umfang auf

Tabelle 37 ist zu entnehmen, dass es sich bei den exprimierten Mehrfachresistenzen vor allem um solche gegenüber  $\beta$ -Lactamantibiotika handelt. Darüber hinaus waren diese Isolate fast alle unempfindlich auch gegenüber Colistin. Es soll nicht unerwähnt bleiben, dass ein hochmehrfachresistentes Isolat aus landwirtschaftlichem Probenmaterial u. a. als unempfindlich gegenüber Doxyzyklin eingestuft werden musste. Die Resistenz eines „Supermarktisolats“ gegenüber zehn Einzelwirkstoffen fällt insofern auf, als diese Wirkstoffe lediglich zwei Wirkstoffklassen zuzuordnen sind. Es ist somit in Betracht zu ziehen, dass die exprimierten Resistenzen gegenüber zehn Wirkstoffen überwiegend auf Kreuzresistenzen beruhen.

**Tabelle 37: Resistenzprofile hochmehrfachresistenter *Ent. sakazakii*-Isolate aus pflanzlichen Lebensmitteln unterschiedlicher Vermarktungsstufen**

Vermarktungsstufe	n Resistenzen		Resistenzprofil <sup>(b)</sup> (Anzahl der Isolate)
	Wirkstoffe	Wirkstoffklassen <sup>(a)</sup>	
Landw. Betrieb	7	3	AMC/AMP/MZL/CEC/COX/CXM/COL (1)
	9	5	AMC/AMP/CEC/COX/CXM/COL/DOX/SPT/STR (1)
Supermarkt	7	4	AMC/AMP/CEC/COX/CXM/COL/SPT (2)
	7	3	AMP/MZL/CEC/CET/COX/CXM/COL (1)
	10	2	CEC CET CAZ COX CXM CTX AMP MZL PIP PIT (1)

<sup>(a)</sup>: Resistenz gegen einen oder mehrere Wirkstoffe eine Klasse

<sup>(b)</sup>: Kürzel der Antibiotika siehe Abkürzungsverzeichnis

#### 2.2.4 *Enterobacter gergoviae*

Resistenzen und intermediäres Verhalten traten bei *Ent. gergoviae* vor allem gegenüber Cefuroxim und Cefaclor sowie gegenüber Amoxicillin/Clavulansäure und Ampicillin auf, wie aus Tabelle 38 hervorgeht. Andere  $\beta$ -Lactamantibiotika zeigten eine stärkere Wirkung gegenüber *Ent. gergoviae*. Bei den Aminoglykosiden, mit Ausnahme des Spectinomycin, lagen die Resistenzraten zwischen 0 und 2 %. Gegenüber Doxyzyklin waren fast alle Isolate sensibel. Die MHK-Wertverteilung ist Tabelle A 8 im Anhang zu entnehmen. Daraus wird ersichtlich, dass gegenüber den meisten Antibiotika die Isolate in den niedrigen MHK-Stufen einzuordnen waren. Bei Spectinomycin war – wie bei den bereits genannten *Enterobacter* spp. - hingegen etwa ein Drittel der Isolate am Breakpoint zur Resistenz (MHK 64 $\mu$ g/ml) einzustufen.

**Tabelle 38: Prozentuale Verteilung sensibel, intermediär und resistent einzustufender *Ent. gergoviae*-Isolate aus Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft**

Antibiotikum	Gesamt (n = 92)			Landw. Betrieb (n = 33)			Supermarkt (n = 59)		
	s	i	r	s	i	r	s	i	r
Amoxicillin/Clavulansäure	29,4	62,0	8,8	18,2	72,8	9,1	35,6	56,0	8,5
Amikacin	98,9	1,1	0	97,0	3,0	0	100	0	0
Ampicillin	27,2	51,1	21,7	21,2	51,3	27,3	30,5	50,9	18,7
Apramycin	100	-	0	100	-	0	100	-	0
Ceftazidim	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Cefaclor	20,7	50,0	29,3	<b>6,1**</b>	<b>48,5</b>	<b>45,4*</b>	<b>28,8**</b>	<b>50,9</b>	<b>20,4*</b>
Cefepim	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Ceftiofur	97,9	-	2,2	97,0	-	3,0	98,3	-	1,7
Ciprofloxacin	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Chloramphenicol	98,9	-	1,1	100	-	0	98,3	-	1,7
Colistin	95,7	-	4,4	90,9	-	9,1	98,3	-	1,7
Cefotaxim	97,8	0	2,2	97,0	0	3,0	98,3	0	1,7
Cefuroxim	75,1	16,3	8,8	72,8	18,2	9,1	76,4	15,3	8,5
Doxyzyklin	94,6	4,4	1,0	90,9	6,1	3,0	96,6	6,8	0
Enrofloxacin	98,9	0	1,0	100	0	0	98,3	0	1,7
Florfenicol	98,9	-	1,0	100	-	0	98,3	-	1,7
Gentamicin	96,8	3,3	0	93,9	6,1	0	98,3	1,7	0
Imipenem	98,9	0	1,0	100	0	0	98,3	0	1,7
Meropenem	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Mezlocillin	92,4	2,2	5,4	87,9	6,1	6,1	94,9	0	5,1
Neomycin	100	-	0	100	-	0	100	-	0
Netilmicin	97,8	1,1	1,1	97,0	0	3,0	98,3	1,7	0
Piperacillin	92,5	5,5	2,2	90,9	6,0	3,0	92,7	5,1	1,7
Piperacillin/Tazobactam	96,7	3,3	0	97,0	3,0	0	96,6	3,4	0
Spectinomycin	91,3	-	8,7	84,9	-	15,2	95,0	-	5,1
Streptomycin	98,9	-	1,0	100	-	0	98,3	-	1,7
Co-Trimoxazol	97,8	0	2,2	100	0	0	96,6	0	3,4
Tobramycin	100	0	0	100	0	0	100	0	0

s: sensibel, i: intermediär, r: resistent

“-“ Intermediärbereich ist nicht definiert

**Fett:** Verteilungen sensibler, intermediärer und resistenter Isolate aus landw. Probenmaterial und aus Supermarktproben unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,05$ ) bezgl. des entsprechenden Antibiotikums

\* Raten für als resistent einzustufende Isolate aus landw. Probenmaterial und aus Supermarktproben unterscheiden sich signifikant bezgl. des entsprechenden Antibiotikums

\*\* Raten für als sensibel einzustufende Isolate aus landw. Probenmaterial und Supermarktproben unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,05$ ) bezgl. des entsprechenden Antibiotikums

### Einfluss der Vermarktungsstufe auf die Empfindlichkeit und die mittleren MHK-Werte

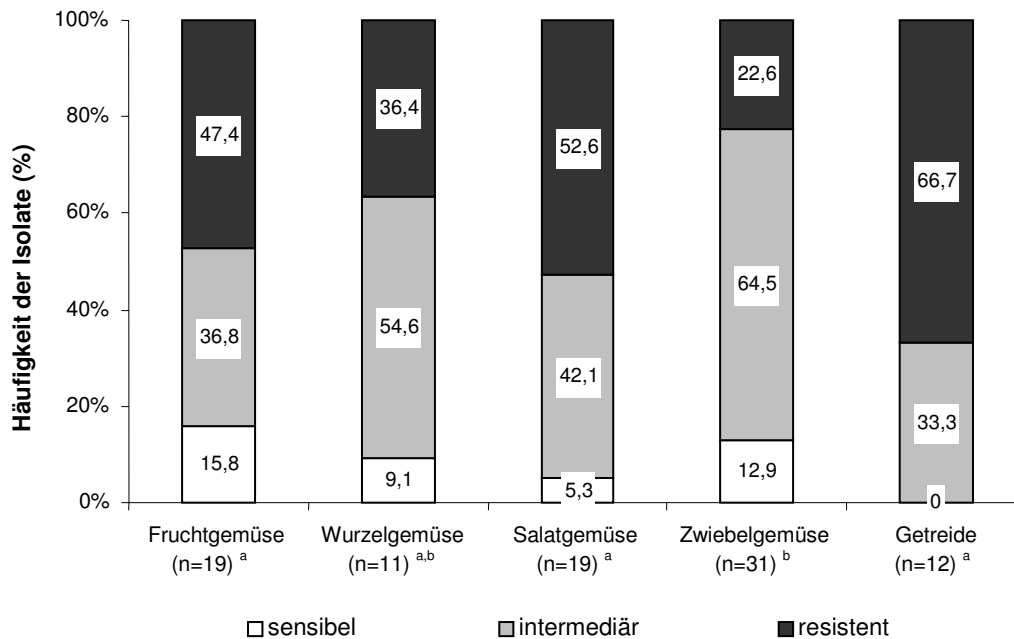
Eine Tendenz zu höheren Resistenzraten bei Isolaten aus landwirtschaftlichem Probenmaterial als bei solchen aus Supermarktproben war auch hier bei dem Großteil der Substanzen zu erkennen, statistisch wurde dies jedoch lediglich gegenüber Cefaclor abgesichert (45,4 % vs. 20,4 %;  $p = 0,009$ ). Die MHK-Mittelwerte von Isolaten aus landwirtschaftlichem Probenmaterial ( $MHK_{LW}$ ) und solchen aus Supermarktproben ( $MHK_S$ ) unterschieden sich bei fünf Antibiotika signifikant. Bei folgenden Antibiotika waren höhere MHK-Werte bei Isolaten aus landwirtschaftlichem Probenmaterial im Vergleich zu Supermarktproben statistisch abzuschließen: Imipenem ( $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  0,34  $\log_2$ ), Spectinomycin ( $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  1,15  $\log_2$ ), Doxyzyklin ( $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  0,14  $\log_2$ ), Tobramycin ( $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  0,22  $\log_2$ ) und Cefaclor ( $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  0,36  $\log_2$ ).

### Einfluss der Matrix auf die Empfindlichkeit

Gegenüber den meisten geprüften Substanzen waren die Resistenzraten der Isolate aus Fruchtgemüse höher als die der Isolate aus anderen Matrices. Statistisch abgesichert werden konnte diese Beobachtung jedoch nur für Amoxicillin/Clavulansäure, Ampicillin, Cefaclor und Cefuroxim. Hier erwiesen sich signifikant mehr Isolate aus Fruchtgemüse als resistent als Isolate aus Zwiebelgemüse (AMC: 26,3 % vs. 6,5 %, AMP: 42,1 % vs. 9,7 %, CEC: 36,8 % vs. 9,7 %, CXM: 21,1 % vs. 3,2 %). Bei Cefaclor waren Isolate aus Getreide signifikant häufiger resistent als Isolate aus Wurzelgemüse (58,3 % vs. 18,2 %), Salatgemüse (42,1 %) und Zwiebelgemüse (9,7 %).

Bezüglich der Verteilung sensibler, intermediärer und resistenter Isolate wird deutlich, dass Isolate aus Zwiebelgemüse sich seltener als resistent gegenüber mindestens einem Antibiotikum erwiesen als Isolate aus Fruchtgemüse, Salatgemüse und Getreide. Im Vergleich zu den bereits genannten Spezies *Ent. cloacae* und *Ent. sakazakii* zeichnete sich ab, dass das Auftreten von Resistenzen bei Isolaten aus Getreide am höchsten war. Weiterhin fällt auf, dass Isolate aus Getreide stets als intermediär oder resistent eingestuft wurden, sensible Isolate wurden aus dieser Matrix nicht isoliert (vgl. Abbildung 10). Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass je Matrix relativ niedrige Isolatezahlen für die Auswertung zur Verfügung standen.





**Abbildung 10: Verteilung sensibler, intermediärer und resistenter *Enterobacter gergoviae*-Isolate in unterschiedlichen Matrices pflanzlichen Ursprungs**

a,b Matrices mit unterschiedlichen Superskripten unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,05$ ) bezüglich der Verteilung sensibler, intermediärer und resistenter Isolate  
 „sensibel“ Isolate sind empfindlich gegenüber allen geprüften Antibiotika  
 „intermediär“ Isolate sind intermediär gegenüber mindestens einem geprüften Antibiotikum, jedoch gegenüber keinem Antibiotikum resistent  
 „resistent“ Isolate sind gegenüber mindestens einem Antibiotikum resistent

#### Mehrfachresistenzen bei *Ent. gergoviae*

Bei rund 59 % der *Ent. gergoviae*-Isolate wurde keine Resistenz beobachtet. 22 % der Isolate waren resistent gegenüber zwei und mehr Antibiotika, wie Tabelle 39 zu entnehmen ist. Ein Isolat aus Supermarktproben erwies sich als hochmehrfachresistent. So war es gegenüber zwölf Antibiotika unempfindlich. Zwischen Isolaten aus landwirtschaftlichem Probenmaterial und solchen aus Supermarktproben wurde bezüglich der Verteilung nicht-, einfach- und mehrfachresistenter Isolate ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) festgestellt. Hier erwiesen sich „landwirtschaftliche Isolate“ signifikant häufiger als resistent gegenüber einer oder mehr der geprüften Substanzen als „Supermarktisolate“. Statistisch abzusichern waren Unterschiede zwischen den Vermarktungsstufen auch bei den nicht- und bei den einfachresistenten Isolaten. Nichtresistente Isolate wurden in Supermarktproben signifikant ( $p < 0,05$ ) häufiger festgestellt als in landwirtschaftlichem Probenmaterial. Hingegen waren dreimal mehr einfachresistente Stämme aus landwirtschaftlichem Probenmaterial als aus Supermarktproben zu isolieren.

**Tabelle 39: Häufigkeiten nicht-, einfach- und mehrfachresistenter *Ent. gergoviae*-Isolate (n = 92) isoliert aus pflanzlichen Lebensmitteln unterschiedlicher Vermarktungsstufen**

Vermarktungsstufe	Anzahl Isolate (n)	Anzahl der Resistenzen															
		0		1		2		3		4		5		6		12	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Landw. Betrieb <sup>a</sup>	33	13	39,4*	11	33,3*	2	6,1	3	9,1	1	3,0	1	3,0	2	6,1	0	0
Supermarkt <sup>b</sup>	59	41	69,5*	7	11,9*	4	6,8	3	5,1	1	1,7	2	3,4	0	0	1	1,7
Gesamt	92	54	58,7	18	19,6	6	6,5	6	6,5	2	2,2	3	3,3	2	2,2	1	1,1

<sup>a,b</sup> Unterschied zwischen den Vermarktungsstufen ist signifikant ( $p < 0,05$ ) bezügl. der Verteilung nicht-, einfach- und mehrfachresistenter Isolate

\* Unterschied zwischen den Vermarktungsstufen ist signifikant ( $p < 0,05$ ) bezügl. der entsprechenden Anzahl der Resistenzen

### Resistenzprofile

Die phänotypischen Resistenzprofile von *Ent. gergoviae* sind Tabelle 40 zu entnehmen. Die Unempfindlichkeit gegenüber einer Vielzahl von Cephalosporinen und Penicillinen war auch bei dieser Spezies am häufigsten in die Resistenzprofile involviert. Besonders oft trat die Resistenz gegenüber Cefaclor und Amoxicillin/Clavulansäure bzw. Ampicillin auf. Bei drei Isolaten wurde zusätzlich die Resistenz gegenüber Spectinomycin beobachtet, während Doxzyklinunempfindlichkeit bei einem sechsfachresistenten Isolat exprimiert wurde.

**Tabelle 40: Prozentuale Verteilung der Mehrfachresistenz sowie dominante phänotypische Resistenzprofile von *Ent. gergoviae* (n = 92) aus pflanzlichen Lebensmitteln**

Anzahl der Resistenzen	Isolate (%)		Häufigstes Resistenzprofil (% der Gesamtisolate)	
	Wirkstoff (n = 28)	Wirkstoffklasse* (n = 9)	Wirkstoff**	Wirkstoffklasse*
0	58,7	58,7	-	-
1	19,6	8,7	CEC (8,7)	CEP (8,7)
2	6,5	6,5	CEC AMP (3,3)	CEP PEN (5,4)
3	6,5	5,4	CEC CXM AMP (2,2)	CEP PEN (3,3)
4	2,2	2,2	CEC CXM AMC AMP (1,1) o. CEC AMC AMP SPT (1,1)	CEP PEN (1,1) o. CEP PEN AGL (1,1)
5	3,3	3,3	CEC CXM AMC AMP SPT (1,1) o. CEC AMC AMP MZL COL (1,1) o. CEC CXM AMC AMP MZL (1,1)	CEP PEN AGL (1,1) o. CEP PEN POL (1,1) o. CEP PEN (1,1)
6	2,2	2,2	CEC CXM CET AMP MZL PIP (1,1) o. CEC CXM AMP SPT DOX COL (1,1)	CEP PEN (1,1) o. CEP PEN AGL TET POL (1,1)
12	1,1	Vgl. Tabelle 41	Vgl. Tabelle 41	Vgl. Tabelle 41

\* Resistenz gegen einen oder mehrere Wirkstoffe aus der genannten Wirkstoffklasse; AGL: Aminoglykoside, CEP: Cephalosporine, POL: Polymyxine, PEN: Penicilline, TET: Tetracykline

\*\* Kürzel der Antibiotika siehe Abkürzungsverzeichnis

„oder“ Profile traten in gleichem Umfang auf

Bei der Betrachtung des hochmehrfachresistenten Isolats wird deutlich, dass zwar eine Resistenz gegenüber zwölf Wirkstoffen besteht, jedoch insgesamt diese Wirkstoffe aus sechs Wirkstoffklassen stammen. Die am häufigsten im Resistenzprofil vertretene Wirkstoffklasse war die der Cephalosporine mit den Antibiotika Cefaclor, Ceftiofur, Cefuroxim und Cefotaxim, gefolgt von den Penicillinen. Darüber hinaus wurde Resistenz gegenüber Enrofloxacin, Co-Trimoxazol und Spectinomycin sowie gegenüber Florfenicol und Chloramphenicol exprimiert.

**Tabelle 41: Resistenzprofil des hochmehrfachresistenten *Ent. gergoviae*-Isolats aus pflanzlichen Lebensmitteln**

Vermarktungsstufe	n Resistenzen		Resistenzprofil <sup>(b)</sup> (Anzahl der Isolate)
	Wirkstoff	Wirkstoff-Klassen <sup>(a)</sup>	
Supermarkt	12	6	CEC CET CXM CTX AMC AMP MZL SPT FLL CMP SXT ENR (1)

<sup>(a)</sup> Resistenz gegen einen oder mehrere Wirkstoffe einer Klasse

<sup>(b)</sup> Abkürzungen der Antibiotika siehe Abkürzungsverzeichnis

### 2.2.5 *Enterobacter cancerogenus*

*Ent. cancerogenus* erwies sich vor allem gegenüber Cefuroxim als resistent (drei Isolate) bzw. intermediär (neun Isolate). Je drei Isolate exprimierten außerdem Unempfindlichkeit gegenüber Colistin und Spectinomycin (vgl. Tabelle 42). Insgesamt verhielten sich jedoch die meisten Isolate gegenüber einer Vielzahl von Substanzen vollständig oder überwiegend sensibel. Aus der MHK-Wert-Verteilung von *Ent. cancerogenus* (siehe Tabelle A 9 im Anhang) wird zudem ersichtlich, dass die Isolate gegenüber den meisten Substanzen mit Ausnahme des Spectinomycin, in niedrige MHK-Bereiche einzustufen waren.

**Tabelle 42: Verteilung sensibel, intermediär und resistent einzustufender *Ent. cancerogenus*-Isolate (n = 46) aus Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft [n (%)]**

Antibiotikum	Sensibel	Intermediär	Resistent
Amikacin	45 (97,8)	1 (2,2)	0
Apramycin	46 (100)	-	0
Ceftazidim	45 (97,8)	1 (2,2)	0
Cefepim	46 (100)	0	0
Ceftiofur	45 (97,8)	-	1 (2,2)
Ciprofloxacin	46 (100)	0	0
Chloramphenicol	46 (100)	-	0
Colistin	43 (93,5)	-	3 (6,5)
Cefotaxim	45 (97,8)	1 (2,2)	0
Cefuroxim	34 (73,9)	9 (19,6)	3 (6,5)
Doxyzyklin	43 (93,5)	3 (6,5)	0
Enrofloxacin	46 (100)	0	0
Florfenicol	46 (100)	-	0
Gentamicin	44 (95,7)	2 (4,4)	0
Imipenem	45 (97,8)	0	1 (2,2)
Meropenem	46 (100)	0	0
Mezlocillin	44 (95,7)	2 (4,4)	0
Neomycin	46 (100)	-	0
Netilmicin	45 (97,8)	1 (2,2)	0
Piperacillin	44 (95,7)	1 (2,2)	1 (2,2)
Piperacillin/Tazobactam	45 (97,8)	0	1 (2,2)
Spectinomycin	43 (93,5)	-	3 (6,5)
Streptomycin	46 (100)	-	0
Co-Trimoxazol	46 (100)	0	0
Tobramycin	46 (100)	0	0

„-“ Intermediärbereich ist nicht definiert

#### Einfluss der Vermarktungsstufe auf die Empfindlichkeit und die mittleren MHK-Werte

Die beobachteten höheren Resistenzraten bei Isolaten aus landwirtschaftlichen Proben als bei solchen aus Supermärkten konnte aufgrund geringer Isolatezahlen bei keiner Substanz statistisch abgesichert werden. Auch die mittleren MHK-Werte der *Ent. cancerogenus*-Isolate aus Probenmaterial von landwirtschaftlichen Betrieben zeigten insgesamt eine Tendenz zu höheren Konzentrationsbereichen als die MHK-Werte der Isolate aus Supermarktproben. Statistisch abgesichert wurde dies für die Substanzen Imipenem (MHK<sub>LW</sub> vs. MHK<sub>S</sub> 0,5 log<sub>2</sub>), Chloramphenicol (MHK<sub>LW</sub> vs. MHK<sub>S</sub> 0,17 log<sub>2</sub>), Spectinomycin (MHK<sub>LW</sub> vs. MHK<sub>S</sub> 1,43 log<sub>2</sub>) und Doxyzyklin (MHK<sub>LW</sub> vs. MHK<sub>S</sub> 0,33 log<sub>2</sub>).

### Einfluss der Matrix auf die Empfindlichkeit

Aufgrund geringer Isolatezahlen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Matrices bezüglich der Verteilung sensibler, intermediärer und resistenter Isolate festgestellt werden. Neun Isolate verhielten sich resistent gegenüber einem oder mehr Wirkstoffen. Je zwei Isolate stammten aus Fruchtgemüse, Wurzelgemüse, Salatgemüse und Zwiebelgemüse. Ein resistentes Isolat wurde in Getreide beobachtet.

### Mehrfachresistenzen bei *Ent. cancerogenus*

Nur zwei Isolate waren resistent gegenüber zwei oder mehr Substanzen, während 80 % der Isolate sich als nichtresistent erwiesen (vgl. Tabelle 43). Das zweifachresistente Isolat stammte aus Fruchtgemüse, das vierfachresistente Isolat aus Wurzelgemüse. Zwischen Isolaten aus landwirtschaftlichem Probenmaterial und solchen aus Supermarktproben bestand kein signifikanter Unterschied sowohl hinsichtlich der Anzahl der Resistenzen als auch hinsichtlich der Verteilung nicht-, einfach- und mehrfachresistenter Isolate.

**Tabelle 43: Häufigkeiten nicht-, einfach- und mehrfachresistenter *Ent. cancerogenus*-Isolate (n = 46) aus pflanzlichen Lebensmitteln unterschiedlicher Vermarktungsstufen**

Vermarktungsstufe	Anzahl Isolate (n)	Anzahl der Resistenzen				
		0	1	2	3	4
		n	n	n	n	n
Landw. Betrieb	16	11	4	0	0	1
Supermarkt	30	26	3	1	0	0
Gesamt n (%)	46	37 (80,4)	7 (15,2)	1 (2,2)	0	1 (2,2)

### Resistenzprofile

Aufgrund der geringen Anzahl resistenter Isolate konnte kein besonders dominantes Profil herausgearbeitet werden, das am häufigsten nachgewiesen wurde (vgl. Tabelle 44). Lediglich bei den einfachresistenten Isolaten wurde Resistenz gegen Spectinomycin am häufigsten nachgewiesen, was jedoch aufgrund der geringen Isolatezahlen nicht überbewertet werden sollte. Das vierfachresistente Isolat exprimierte ausschließlich Resistenz gegenüber  $\beta$ -Lactamantibiotika aus der Gruppe der Cephalosporine und der Penicilline.

**Tabelle 44: Verteilung der Mehrfachresistenz sowie dominante phänotypische Resistenzprofile von *Ent. cancerogenus* (n = 46) aus pflanzlichen Lebensmitteln**

Anzahl der Resistenzen	Isolate n (%)		Häufigstes Resistenzprofil (n (%) der Gesamtisolate)	
	Wirkstoff (n = 25)	Wirkstoffklasse* (n = 10)	Wirkstoff**	Wirkstoffklasse*
0	37 (80,4)	37 (80,4)	-	-
1	7 (15,2)	3 (6,5)	SPT 3 (6,5)	AGL 3 (6,5)
2	1 (2,2)	1 (2,2)	CXM COL 1 (2,2)	CEP POL 1 (2,2)
4	1 (2,2)	1 (2,2)	CET CXM PIP PIT 1 (2,2)	CEP PEN 1 (2,2)

\* Resistenz gegen einen oder mehrere Wirkstoffe aus der genannten Wirkstoffklasse; AGL: Aminoglykoside, CEP: Cephalosporine, POL: Polymyxine, PEN: Penicilline

\*\* Kürzel der Antibiotika siehe Abkürzungsverzeichnis

### 2.2.6 *Pantoea agglomerans*

*Pantoea agglomerans* wies intermediäres Verhalten bzw. Resistenzen vor allem gegenüber Amoxicillin/Clavulansäure, Cefaclor, Cefoxitin und Cefuroxim auf (vgl. Tabelle 45). Gegenüber Aminoglykosiden (mit Ausnahme des Spectinomycin) und gegenüber Doxzyklin wurden keine Resistenzen festgestellt, allerdings erwiesen sich einige wenige Isolate gegenüber Amikacin, Netilmicin und vor allem Gentamicin als intermediär. Die MHK-Wertverteilung gibt weiteren Aufschluss darüber, dass die Isolate gegenüber den meisten Substanzen in niedrige Konzentrationsbereiche einzustufen waren (vgl. Tabelle A 10). Gegenüber Spectinomycin hingegen wurde bei 48 % der Isolate eine MHK von 48 µg/ml gemessen. Diese Isolate befanden sich damit gerade noch im sensiblen Bereich. Eine Anhebung der MHK um eine Stufe würde bereits resistentes Verhalten bewirken.

**Tabelle 45: Prozentuale Verteilung sensibel, intermediär und resistent einzustufender *Pantoea agglomerans*-Isolate aus Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft**

Antibiotikum	Gesamt (n = 96)			Landw. Betrieb (n = 44)			Supermarkt (n = 52)		
	s	i	r	s	i	r	s	i	r
Amoxicillin/Clavulansäure	47,9	40,6	11,5	<b>34,1**</b>	<b>47,7</b>	<b>18,2</b>	<b>59,6**</b>	<b>34,6</b>	<b>5,7</b>
Amikacin	99,0	1,0	0	100	0	0	98,1	1,9	0
Apramycin	100	-	0	100	-	0	100	-	0
Ceftazidim	99,1	1,0	0	100	0	0	98,2	1,9	0
Cefaclor	19,8	39,5	40,7	<b>6,8**</b>	<b>36,4</b>	<b>56,9*</b>	<b>30,8**</b>	<b>42,3</b>	<b>27,0*</b>
Cefepim	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Ceftiofur	96,9	-	3,1	100	-	0	94,3	-	5,8
Ciprofloxacin	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Chloramphenicol	100	-	0	100	-	0	100	-	0
Colistin	96,9	0	3,1	95,5	0	4,6	98,1	0	1,9
Cefoxitin	55,3	25,0	19,8	<b>36,4**</b>	<b>31,8</b>	<b>31,8*</b>	<b>71,2**</b>	<b>19,2</b>	<b>9,6*</b>
Cefotaxim	98,0	1,0	1,0	95,5	2,3	2,3	100	0	0
Cefuroxim	68,8	19,8	11,5	<b>56,9**</b>	<b>25,0</b>	<b>18,3</b>	<b>78,9**</b>	<b>15,4</b>	<b>5,8</b>
Doxyzyklin	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Enrofloxacin	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Florfenicol	100	-	0	100	-	0	100	-	0
Gentamicin	91,6	8,3	0	88,7	11,4	0	94,3	5,8	0
Imipenem	98,0	0	2,0	97,8	0	2,3	98,2	0	1,9
Meropenem	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Mezlocillin	87,5	6,3	6,3	86,4	4,6	9,1	88,5	7,7	3,9
Neomycin	100	-	0	100	-	0	100	-	0
Netilmicin	97,9	2,1	0	100	0	0	96,2	3,9	0
Piperacillin	86,5	7,3	6,2	86,4	6,9	6,9	86,5	7,7	5,8
Piperacillin/Tazobactam	96,8	2,0	1,0	95,4	2,3	2,3	98,1	1,9	0
Spectinomycin	93,7	-	6,3	95,4	-	4,6	92,3	-	7,7
Streptomycin	100	-	0	100	-	0	100	-	0
Co-Trimoxazol	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Tobramycin	100	0	0	100	0	0	100	0	0

s: sensibel, i: intermediär, r: resistent

“-“ Intermediärbereich ist nicht definiert

**Fett:** Verteilungen sensibler, intermediärer und resistenter Isolate aus landw. Probenmaterial und aus Supermarktproben unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,05$ ) bezgl. des entsprechenden Antibiotikums

\* Raten für als resistent einzustufende Isolate aus landw. Probenmaterial und aus Supermarktproben unterscheiden sich signifikant bezgl. des entsprechenden Antibiotikums

\*\* Raten für als sensibel einzustufende Isolate aus landw. Probenmaterial und Supermarktproben unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,05$ ) bezgl. des entsprechenden Antibiotikums

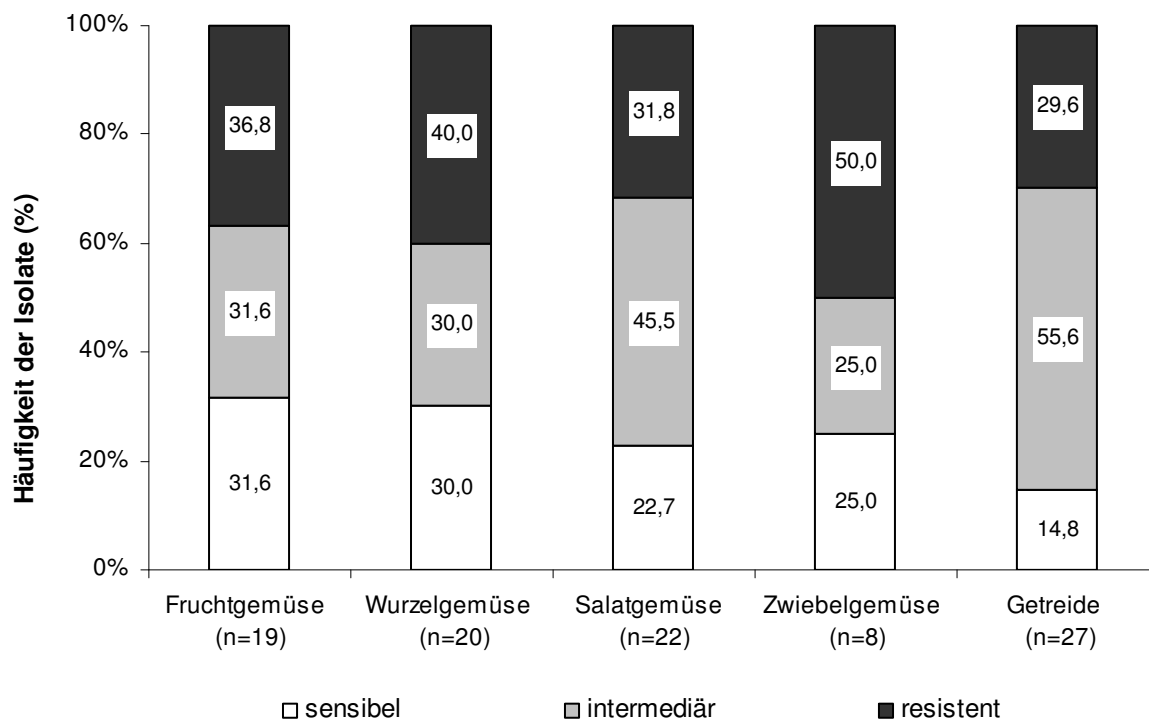
### Einfluss der Vermarktungsstufe auf die Empfindlichkeit und die mittleren MHK-Werte

Isolate aus landwirtschaftlichem Probenmaterial wiesen stets höhere Resistenzraten auf als solche aus Supermarktproben). Im Einzelnen bestätigte sich dies statistisch gegenüber Amoxicillin/Clavulansäure (18,2 % vs. 5,7 %;  $p = 0,024$ ), Cefaclor (56,9 % vs. 27,0 %;  $p = 0,002$ ), Cefoxitin (31,8 % vs. 9,6 %;  $p = 0,002$ ) und Cefuroxim (18,3 % vs. 5,8 %;  $p = 0,050$ ) (vgl. Tabelle 45). Auch hinsichtlich der mittleren MHK-Werte war die zuvor beschriebene Tendenz (höhere MHK-Werte bei Isolaten aus landwirtschaftlichem Probenmaterial als bei Isolaten aus Supermarktproben) erkennbar. Signifikant waren die Unterschiede bei Amoxicillin/Clavulansäure ( $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  0,13  $\log_2$ ), Piperacillin ( $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  0,08  $\log_2$ ), Imipenem ( $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  0,17  $\log_2$ ), Cefuroxim ( $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  0,02  $\log_2$ ), Spectinomycin ( $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  0,64  $\log_2$ ), Gentamicin ( $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  0,061  $\log_2$ ), Cefoxitin ( $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  0,12  $\log_2$ ), Tobramycin ( $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  0,07  $\log_2$ ) und Cefaclor ( $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  0,09  $\log_2$ ).

### Einfluss der Matrix auf die Empfindlichkeit

Aufgrund der geringen Isolatezahlen bei den einzelnen Matrices konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Verteilung sensibler, intermediärer und resistenter Isolate festgestellt werden (vgl. Abbildung 11). So wurden resistente *Pantoea agglomerans* aus Fruchtgemüse und aus Salatgemüse jeweils siebenmal, aus Getreide und aus Wurzelgemüse jeweils achtmal, aus Zwiebelgemüse viermal isoliert. Bezüglich der Isolatezahlen in den einzelnen Matrices ist außerdem interessant, dass aus Zwiebelgemüse seltener *Pantoea agglomerans* isoliert wurde als aus den anderen Matrices.





**Abbildung 11: Verteilung sensibler, intermediärer und resistenter *Pantoea agglomerans*-Isolate in unterschiedlichen Matrices pflanzlichen Ursprungs**

„sensibel“ Isolate sind empfindlich gegenüber allen geprüften Antibiotika

„intermediär“ Isolate sind intermediär gegenüber mindestens einem geprüften Antibiotikum, jedoch gegenüber keinem Antibiotikum resistent

„resistent“ Isolate sind gegenüber mindestens einem Antibiotikum resistent

#### Mehrfachresistenzen bei *Pantoea agglomerans*

Bei 17 % der Isolate wurden Resistenzen gegenüber zwei und mehr Antibiotika festgestellt. 65 % der Isolate zeigten sich empfindlich gegenüber allen geprüften Antibiotika, wie Tabelle 46 zu entnehmen ist. Hinsichtlich der Verteilung nicht-, einfach- und mehrfachresistenter Isolate bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Vermarktungsstufen ( $p < 0,05$ ). So exprimierten Supermarktisolate seltener Resistenzen als solche aus landwirtschaftlichem Probenmaterial. Die höhere Rate mehrfachresistenter Isolate aus landwirtschaftlichem Probenmaterial als aus Supermarktproben war vor allem bei den Zweifachresistenzen statistisch abzusichern.

**Tabelle 46: Häufigkeiten nicht-, einfach- und mehrfachresistenter *Pantoea agglomerans*-Isolate (n = 96) aus pflanzlichen Lebensmitteln unterschiedlicher Vermarktungsstufen**

Vermarktungsstufe	Anzahl Isolate (n)	Anzahl der Resistenzen											
		0		1		2		3		4		5	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Landw. Betrieb <sup>a</sup>	44	23	52,3*	9	20,5	5	11,4*	4	9,1	2	4,6	1	2,3
Supermarkt <sup>b</sup>	52	39	75,0*	9	17,3	0	0*	2	3,9	0	0	2	3,9
Gesamt n (%)	96	62	64,5	18	18,8	5	5,2	6	6,3	2	2,1	3	3,1

<sup>a,b</sup> Unterschied zwischen den Vermarktungsstufen ist signifikant ( $p < 0,05$ ) bezügl. der Verteilung nicht-, ein- und mehrfachresistenter Isolate

\* Unterschied zwischen den Vermarktungsstufen ist signifikant ( $p < 0,05$ ) bezügl. der entsprechenden Anzahl der Resistenzen

### Resistenzprofile

Aus Tabelle 47 geht hervor, dass bei mehrfachresistenten *Pantoea agglomerans*-Isolaten Resistenzen ausschließlich gegenüber Cephalosporinen und Penicillinen bestanden. Bezogen auf einzelne Wirkstoffe waren vor allem Resistenzen gegenüber Cefoxitin und Cefuroxim bei den Cephalosporinen und gegenüber Amoxycillin/Clavulansäure, Mezlocillin und Piperacillin bei den Penicillinen zu beobachten. Bei den Aminoglykosiden war Spectinomycin der Wirkstoff, gegenüber dem sich einfachresistente Isolate am häufigsten als unempfindlich erwiesen.

**Tabelle 47: Prozentuale Verteilung der Mehrfachresistenz sowie dominante phänotypische Resistenzprofile von *Pantoea agglomerans*-Isolaten (n = 96) aus pflanzlichen Lebensmitteln**

Anzahl der Resistenzen	Isolate (%)		Häufigstes Resistenzprofil (% der Gesamtisolate)	
	Wirkstoff (n = 28)	Wirkstoffklasse* (n = 9)	Wirkstoff**	Wirkstoffklasse*
0	64,6	64,6	-	-
1	18,8	11,5	COX (5,2) SPT (4,2)	CEP (7,3), AGL (4,2)
2	5,2	5,2	COX AMC (2,1) oder CXM COX (2,1)	CEP PEN (3,1)
3	6,3	6,3	COX CXM AMC (3,1)	CEP PEN (3,1)
4	2,1	2,1	COX AMC MZL PIP (1,0) oder CXM AMC MZL PIP (1,0)	CEP PEN (2,1)
5	3,1	3,1	CET COX CXM AMC MZL (1,0) o. CET COX CXM MZL PIP (1,0)	CEP PEN (2,1)

\* Resistenz gegen einen oder mehrere Wirkstoffe aus der genannten Wirkstoffklasse; CEP: Cephalosporine, PEN: Penicilline, AGL: Aminoglykoside

\*\* Kürzel der Antibiotika siehe auch Abkürzungsverzeichnis  
„oder“ Profile traten in gleichem Umfang auf

### 2.2.7 *Klebsiella pneumoniae* spp. *pneumoniae*

*K. pneumoniae* spp. *pneumoniae* verhielt sich resistent bzw. intermediär vor allem gegenüber Cefaclor, Cefoxitin, Cefuroxim, Colistin, Mezlocillin, Piperacillin und Spectinomycin (vgl. Tabelle 48, Verteilung der MHK-Werte vgl. Tabelle A 11 im Anhang). Die Resistenzraten in der vorliegenden Tabelle erscheinen vergleichsweise hoch. Diese Werte sollten jedoch nicht überbewertet werden, da es sich beispielsweise bei einer Resistenzrate von 9,5 % (wie bei Cefuroxim) lediglich um zwei Isolate handelt.

**Tabelle 48: Verteilung sensibel, intermediär und resistent einzustufender *K. pneumoniae* spp. *pneumoniae*-Isolate (n = 21) aus Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft [n (%)]**

Antibiotikum	Sensibel	Intermediär	Resistent
Amoxicillin/Clavulansäure	18 (85,7)	1 (4,8)	2 (9,6)
Amikacin	19 (90,5)	2 (9,5)	0
Apramycin	21 (100)	-	0
Ceftazidim	21 (100)	0	0
Cefaclor	14 (66,7)	6 (28,6)	1 (4,8)
Cefepim	21 (100)	0	0
Ceftiofur	21 (100)	-	0
Ciprofloxacin	21 (100)	0	0
Chloramphenicol	21 (100)	-	0
Colistin	17 (81,0)	0	4 (19,1)
Cefoxitin	11 (52,4)	5 (23,8)	5 (23,9)
Cefotaxim	21 (100)	0	0
Cefuroxim	17 (81,0)	2 (9,5)	2 (9,5)
Doxyzyklin	17 (81,0)	2 (9,5)	2 (9,5)
Enrofloxacin	21 (100)	0	0
Florfenicol	21 (100)	-	0
Gentamicin	19 (90,5)	2 (9,5)	0
Imipenem	21 (100)	0	0
Meropenem	21 (100)	0	0
Mezlocillin	10 (47,6)	3 (14,3)	8 (38,1)
Neomycin	21 (100)	-	0
Netilmicin	20 (95,2)	1 (4,8)	0
Piperacillin	16 (76,2)	3 (14,3)	2 (9,5)
Piperacillin/Tazobactam	21 (100)	0	0
Spectinomycin	18 (85,7)	-	3 (14,3)
Streptomycin	19 (90,5)	-	2 (9,5)
Co-Trimoxazol	21 (100)	0	0
Tobramycin	21 (100)	0	0

„-“ Intermediärbereich ist nicht definiert

### Einfluss der Vermarktungsstufe und der Matrix auf die Empfindlichkeit und die mittleren MHK-Werte

Obwohl auch hier eine Tendenz zu höheren Resistenzen bei Isolaten aus landwirtschaftlichen Proben als aus Supermarktproben erkennbar war, konnte diese Beobachtung aufgrund der geringen Isolatezahlen statistisch nicht abgesichert werden. Vergleichbares gilt für die Auswertung der MHK-Werte. Geringe Isolatezahlen ließen darüber hinaus auch Unterschiede zwischen den Matrices bezüglich des Auftretens von Resistenzen statistisch nicht absichern. Von den 13 Isolaten mit mindestens einer Resistenz stammten je vier aus Fruchtgemüse und Getreide, drei aus Zwiebelgemüse und je eines aus Wurzel- und Salatgemüse.

### Mehrfachresistenzen bei *K. pneumoniae* spp. *pneumoniae*

Acht *K. pneumoniae* spp. *pneumoniae*-Isolate verhielten sich empfindlich gegenüber allen geprüften Antibiotika. Resistenzen gegenüber zwei und mehr Antibiotika wurden bei neun Isolaten festgestellt, wie aus Tabelle 49 hervorgeht. Dabei fällt auf, dass alle mehrfachresistenten Isolate aus Supermarktproben stammten.

**Tabelle 49: Häufigkeiten nicht-, einfach- und mehrfachresistenter *K. pneumoniae* spp. *pneumoniae* (n = 21) isoliert aus pflanzlichen Lebensmitteln unterschiedlicher Vermarktungsstufen**

Vermarktungsstufe	Anzahl Isolate (n)	Anzahl der Resistenzen				
		0	1	2	3	4
		n	n	n	n	n
Landw. Betrieb	2	1	1	0	0	0
Supermarkt	19	7	3	3	3	3
Gesamt n (%)	21	8 (38,1)	4 (19,1)	3 (14,3)	3 (14,3)	3 (14,3)

### Resistenzprofile

Aufgrund der geringen Anzahl isolierter *K. pneumoniae* spp. *pneumoniae* konnte kein „dominantes Resistenzprofil“ beobachtet werden. Dennoch sind in Tabelle 50 die einzelnen Resistenzprofile der *K. pneumoniae* spp. *pneumoniae*-Isolate aufgeführt. Auch hier wird deutlich, dass Resistenzen gegen Wirkstoffe aus der Gruppe der Cephalosporine und/oder der Penicilline (insbesondere gegenüber Mezlocillin) in jedes Resistenzprofil involviert sind, während Doxzyklinresistenz nur bei zwei Isolaten beobachtet wurde. Drei Isolate waren außerdem zusätzlich unempfindlich gegenüber Colistin.

**Tabelle 50: Verteilung der Mehrfachresistenz sowie dominante phänotypische Resistenzprofile von *K. pneumoniae* spp. *pneumoniae* (n = 21) aus pflanzlichen Lebensmitteln**

Anzahl der Resistenzen	Isolate n (%)		Resistenzprofile (n der Gesamtisolate)	
	Wirkstoff (n = 28)	Wirkstoffklasse* (n = 9)	Wirkstoff**	Wirkstoffklasse*
0	8 (38,1)	8 (38,1)	-	-
1	4 (19,1)	2 (9,5)	MZL (2)	PEN (2)
2	3 (14,3)	2 (9,5)	COX SPT (2) MZL COL (1)	CEP AGL (2) o. PEN POL (1)
3	3 (14,3)	3 (14,3)	MZL PIP DOX (1) o. CEC COX AMC (1) o. MZL SPT COL (1)	PEN TET (1) o. CEP PEN (1) o. PEN AGL POL (1)
4	3 (14,3)	3 (14,3)	COX CXM MZL STR (1) o. COX CXM MZL COL (1) o. AMC MZL PIP DOX (1)	CEP PEN AGL (1) o. CEP PEN POL (1) o. PEN TET (1)

\* Resistenz gegen einen oder mehrere Wirkstoffe aus der genannten Wirkstoffklasse; CEP: Cephalosporine, PEN: Penicilline, AGL: Aminoglykoside, TET: Tetrazykline, POL: Polymyxine

\*\* Kürzel der Antibiotika siehe auch Abkürzungsverzeichnis

„oder“ Profile traten in gleichem Umfang auf

## 2.2.8 *Rahnella aquatilis*

*R. aquatilis*-Isolate erwiesen sich gegenüber einer Vielzahl an Substanzen als sensibel, wie aus Tabelle 51 hervorgeht. So waren z. B. alle Isolate gegenüber den Aminoglykosiden – mit Ausnahme des Netilmicin - als empfindlich einzustufen. Auch gegenüber einigen Cephalosporinen und Penicillinen (z. B. Ceftazidim, Cefepim, Amoxicillin/Clavulansäure und Piperacillin/Tazobactam) sowie gegenüber den beiden Carbapenemen Imipenem und Meropenem verhielten sich die Isolate vollständig sensibel. Resistenzen wurden gegenüber Ceftiofur und Chloramphenicol sowie Colistin, Cefoxitin und Florfenicol exprimiert. Intermediäres Verhalten war vor allem gegenüber Mezlocillin, Piperacillin und Doxyzyklin zu beobachten. Auch bei *Rahnella aquatilis* sind jedoch die relativ geringen Isolatezahlen (n = 22) zu berücksichtigen. So ist beispielsweise ein einziges Isolat gegen Colistin unempfindlich, stellt aber 4,6 % der Isolate dar. Zur Verteilung der MHK-Werte siehe Tabelle A 12 im Anhang.

**Tabelle 51: Verteilung sensibel, intermediär und resistent einzustufender *R. aquatilis*-Isolate (n = 22) aus Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft [n (%)]**

Antibiotikum	Sensibel	Intermediär	Resistent
Amoxicillin/Clavulansäure	22 (100)	0	0
Amikacin	22 (100)	0	0
Apramycin	22 (100)	-	0
Ceftazidim	22 (100)	0	0
Cefepim	22 (100)	0	0
Ceftiofur	19 (86,4)	-	3 (13,6)
Ciprofloxacin	22 (100)	0	0
Chloramphenicol	20 (91,0)	-	2 (9,1)
Colistin	21 (95,5)	0	1 (4,6)
Cefoxitin	20 (90,9)	1 (4,6)	1 (4,6)
Cefotaxim	20 (90,9)	2 (9,1)	0
Doxyzyklin	19 (86,4)	3 (13,6)	0
Enrofloxacin	20 (90,9)	2 (9,1)	0
Florfenicol	21 (95,5)	-	1 (4,6)
Gentamicin	22 (100)	0	0
Imipenem	22 (100)	0	0
Meropenem	22 (100)	0	0
Mezlocillin	5 (22,7)	17 (77,3)	0
Neomycin	22 (100)	-	0
Netilmicin	21 (95,5)	1 (4,6)	0
Piperacillin	12 (54,6)	10 (45,5)	0
Piperacillin/Tazobactam	22 (100)	0	0
Spectinomycin	22 (100)	-	0
Streptomycin	22 (100)	-	0
Co-Trimoxazol	22 (100)	0	0
Tobramycin	22 (100)	0	0

„-“ Intermediärbereich ist nicht definiert

### Einfluss der Vermarktungsstufe und der Matrix auf die Empfindlichkeit und die mittleren MHK-Werte

Vereinzelt waren höhere Resistenzraten bei Isolaten aus landwirtschaftlichen Proben gegenüber Isolaten aus Supermarktproben zu beobachten, was jedoch durch die geringen Isolatezahlen nicht statistisch abgesichert werden konnte. Auch bezüglich der mittleren MHK-Werte wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt.

Ein Einfluss der Matrix auf die phänotypische Unempfindlichkeit konnte auch hier wegen geringer Isolatezahlen nicht beobachtet werden. Die vier unempfindlichen Isolate waren folgenden Matrices zuzuordnen: Wurzelgemüse (n = 2), Zwiebelgemüse (n = 1) und Salatgemüse (n = 1).

### Mehrfachresistenzen bei *R. aquatilis*

Resistenzen gegenüber zwei und mehr Antibiotika traten bei drei Isolaten aus Supermarktproben auf, wie aus Tabelle 52 hervorgeht. 18 von 22 Isolaten erwiesen sich jedoch als empfindlich gegenüber den untersuchten Wirkstoffen. Unterschiede zwischen Isolaten aus landwirtschaftlichem Probenmaterial und solchen aus Supermarktproben hinsichtlich der Verteilung nicht-, einfach- und mehrfachresistenter Isolate konnten aufgrund der geringen Anzahl isolierter *R. aquatilis* nicht festgestellt werden.

**Tabelle 52: Häufigkeiten nicht-, einfach- und mehrfachresistenter *R. aquatilis*-Isolate (n = 22) aus pflanzlichen Lebensmitteln unterschiedlicher Vermarktungsstufen**

Vermarktungsstufe	Anzahl der Isolate (n)	Anzahl der Resistenzen			
		0	1	2	3
		n	n	n	n
Landw. Betrieb	5	4	1	0	0
Supermarkt	17	14	0	2	1
Gesamt n (%)	22	18 (81,8)	1 (4,6)	2 (9,1)	1 (4,6)

### Resistenzprofile

Aufgrund der geringen Anzahl isolierter *R. aquatilis* konnte kein „dominantes Resistenzprofil“ festgestellt werden. Die Resistenzprofile der Isolate sind der Vollständigkeit halber in Tabelle 53 dargestellt. Hierbei fällt auf, dass alle drei mehrfachresistenten Isolate Resistenz gegenüber Ceftiofur exprimierten. Zudem waren drei der vier resistenten Isolate unempfindlich gegenüber der Wirkstoffklasse der Fenicole.

**Tabelle 53: Verteilung der Mehrfachresistenz sowie dominante phänotypische Resistenzprofile von *R. aquatilis* (n = 22) aus pflanzlichen Lebensmitteln**

Anzahl der Resistenzen	Isolate n (%)		Resistenzprofile (n der Gesamtisolate)	
	Wirkstoff (n = 26)	Wirkstoffklasse* (n = 9)	Wirkstoff**	Wirkstoffklasse*
0	18 (81,8)	18 (81,8)	-	-
1	1 (4,6)	1 (4,6)	CMP (1)	FEN (1)
2	2 (9,1)	2 (9,1)	CET CMP (1) o. CET COX (1)	CEP FEN (1) o. CEP (1)
3	1 (4,6)	1 (4,6)	CET FLL COL (1)	CEP FEN POL (1)

\* Resistenz gegen einen oder mehrere Wirkstoffe aus der genannten Wirkstoffklasse; FEN: Fenicole, CEP: Cephalosporine, POL: Polymyxine

\*\* Kürzel der Antibiotika s. Abkürzungsverzeichnis  
„oder“ Profile traten in gleichem Umfang auf

### 2.2.9 *Serratia marcescens*

*Ser. marcescens*-Isolate verhielten sich insbesondere gegenüber Antibiotika der Aminoglykosidgruppe, hier vor allem gegenüber Spectinomycin, resistent. Gegenüber Amikacin, Gentamicin, Netilmicin und Tobramycin waren zudem vergleichsweise viele Isolate intermediär (vgl. Tabelle 54). Weitere Resistenzen bestanden gegenüber Ceftazidim, Ceftiofur, Mezlocillin, Piperacillin, Imipenem und Florfenicol. Als vollständig empfindlich erwiesen sich die Isolate gegenüber Cefepim, Ciprofloxacin, Chloramphenicol, Meropenem und Co-Trimoxazol. Die MHK-Wertverteilung ist Tabelle A 13 im Anhang zu entnehmen. Daraus wird ersichtlich, dass bei Florfenicol bereits zehn Isolate und bei Chloramphenicol elf Isolate eine MHK von 16 µg/ml aufwiesen. Ein Anstieg der MHK um nur eine Stufe würde dazu führen, dass diese Isolate bereits als „resistent“ eingestuft werden. Am Breakpoint zur Resistenz befanden sich Isolate darüber hinaus bei Spectinomycin (n = 7) und bei Doxyzyklin (n = 8). Die Resultate sind jedoch aufgrund geringer Isolatezahlen vorsichtig zu interpretieren.

**Tabelle 54: Verteilung sensibel, intermediär und resistent einzustufender *Ser. marcescens*-Isolate (n = 25) aus Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft [n (%)]**

Antibiotikum	Sensibel	Intermediär	Resistent
Amikacin	20 (80,0)	5 (20,0)	0
Apramycin	24 (96,0)	-	1 (4,0)
Ceftazidim	23 (92,0)	1 (4,0)	1 (4,0)
Cefepim	25 (100)	0	0
Ceftiofur	23 (92,0)	-	2 (8,0)
Ciprofloxacin	25 (100)	0	0
Chloramphenicol	25 (100)	-	0
Cefotaxim	24 (96,0)	1 (4,0)	0
Enrofloxacin	24 (96,0)	1 (4,0)	0
Florfenicol	23 (92,0)	-	2 (8,0)
Gentamicin	19 (76,0)	4 (16,0)	2 (8,0)
Imipenem	20 (80,0)	2 (8,0)	3 (12,0)
Meropenem	25 (100)	0	0
Mezlocillin	23 (92,0)	0	2 (8,0)
Neomycin	25 (100)	-	0
Netilmicin	13 (52,0)	10 (40,0)	2 (8,0)
Piperacillin	22 (88,0)	0	3 (12,0)
Piperacillin/Tazobactam	24 (96,0)	1 (4,0)	0
Spectinomycin	11 (44,0)	-	14 (56,0)
Streptomycin	22 (88,0)	-	3 (12,0)
Co-Trimoxazol	25 (100)	0	0
Tobramycin	17 (68,0)	8 (32,0)	0

„-“, Intermediärbereich ist nicht definiert



### Einfluss der Vermarktungsstufe und der Matrix auf die Empfindlichkeit und die mittleren MHK-Werte

Statistisch abgesicherte Unterschiede zwischen Isolaten aus den beiden Vermarktungsstufen (landwirtschaftlicher Betrieb und Supermarkt) hinsichtlich des Resistenzverhaltens konnten aufgrund geringer Isolatezahlen nicht herausgearbeitet werden. Auch hinsichtlich möglicher Unterschiede der MHK-Werte zwischen den beiden Gruppen konnten keine absicherbaren Aussagen getroffen werden.

16 von 25 Isolaten erwiesen sich als unempfindlich gegenüber mindestens einem geprüften Antibiotikum. Die meisten der resistenten Isolate stammten aus der Gruppe „Fruchtgemüse“ (n = 10), während sich aus Salatgemüse vier Isolate und aus Wurzelgemüse und Getreide jeweils ein *Serratia marcescens*-Isolat als unempfindlich erwiesen. Bei den zwei Isolaten aus Zwiebelgemüse konnte hingegen kein resistentes Verhalten beobachtet werden. Die genannten Unterschiede waren aufgrund geringer Isolatezahlen allerdings nicht signifikant.

### Mehrfachresistenzen

Neun *Ser. marcescens*-Isolate waren gegenüber allen Antibiotika als vollständig sensibel einzustufen. Zehn Isolate verhielten sich gegenüber zwei und mehr Substanzen unempfindlich, wie aus Tabelle 55 hervorgeht. Ein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Vorkommens von Mehrfachresistenzen konnte aufgrund der geringen Anzahl der Isolate aus landwirtschaftlichem Probenmaterial nicht festgestellt werden.

**Tabelle 55: Häufigkeiten nicht-, einfach- und mehrfachresistenter *Ser. marcescens*-Isolate (n = 25) aus pflanzlichen Lebensmitteln unterschiedlicher Vermarktungsstufen**

Vermarktungsstufe	Anzahl der Isolate (n)	Anzahl der Resistenzen					
		0	1	2	3	4	5
		n	n	n	n	n	n
Landw. Betrieb	5	1	2	1	1	0	0
Supermarkt	20	8	4	3	3	1	1
Gesamt n (%)	25	9 (36,0)	6 (24,0)	4 (16,0)	4 (16,0)	1 (4,0)	1 (4,0)

### Resistenzprofile

Resistente *Ser. marcescens*-Isolate waren stets unempfindlich gegenüber Wirkstoffen der Gruppe der Aminoglykoside, hier insbesondere gegenüber Spectinomycin und Streptomycin, aber auch gegenüber Gentamicin und Netilmicin (vgl. Tabelle 56). Darüber hinaus wurde bei vier Isolaten zusätzlich Resistenz gegenüber  $\beta$ -Lactamantibiotika beobachtet. Im Vergleich zu den vorher genannten Gattungen und Spezies fällt dabei auf, dass Resistenzen gegenüber Wirkstoffen der Cephalosporine und Penicilline seltener auftraten. Vielmehr wurde hier die Resistenz gegenüber dem Carbapenem Imipenem beobachtet.

**Tabelle 56: Verteilung der Mehrfachresistenz sowie dominante phänotypische Resistenzprofile von *Ser. marcescens* (n = 25) aus pflanzlichen Lebensmitteln**

Anzahl der Resistenzen	Isolate n (%)		Häufigstes Resistenzprofil (n (%) der Gesamtisolate)	
	Wirkstoff (n = 22)	Wirkstoffklasse* (n = 7)	Wirkstoff**	Wirkstoffklasse*
0	9 (36,0)	9 (36,0)	-	-
1	6 (24,0)	5 (20,0)	SPT 5 (20,0)	AGL 5 (20,0)
2	4 (16,0)	4 (16,0)	SPT STR 2 (8,0)	AGL 2 (8,0)
3	4 (16,0)	4 (16,0)	APR SPT IMP 1 (4,0) o. SPT MZL PIP 1 (4,0) o. NET SPT STR 1 (4,0)	AGL CARB 1 (4,0) o. AGL PEN 1 (4,0) o. AGL 1 (4,0)
4	1 (4,0)	1 (4,0)	GEN NET SPT IMP 1 (4,0)	AGL CARB 1 (4,0)
5	1 (4,0)	1 (4,0)	GEN SPT CAZ CET PIP 1 (4,0)	AGL CEP PEN 1 (4,0)

\* Resistenz gegen einen oder mehrere Wirkstoffe aus der genannten Wirkstoffklasse; AGL: Aminoglykoside, CARB: Carbapeneme, PEN: Penicilline, CEP: Cephalosporine

\*\* Kürzel der Antibiotika siehe Abkürzungsverzeichnis

„oder“ Profile traten in gleichem Umfang auf

## 2.2.10 Zusammenfassende Betrachtung der Resistenzeigenschaften coliformer Bakterien

Aufgrund der geringen Anzahl weiterer isolierter coliformer Bakterien war eine prozentuale Darstellung der Resistenzergebnisse nicht möglich. Der Anteil der resistenten Isolate dieser Bakterienarten geht jedoch in Tabelle 57 ein, die die Resistenzergebnisse der coliformen Bakterienarten nochmals zusammenfasst. Insgesamt erwiesen sich coliforme Bakterien vor allem als unempfindlich gegenüber  $\beta$ -Laktamantibiotika, hier insbesondere gegenüber den Cephalosporinen und einigen Penicillinen. Gegenüber Cefaclor (40,9 %), Cefoxitin (22,7 %), Cefuroxim (20,9 %) und Ampicillin (21,8 %) sowie gegenüber Spectinomycin (15,8 %) waren die meisten Isolate als resistent einzuordnen. Gegenüber Doxzyklin wurden dagegen lediglich 4 % der Isolate als unempfindlich eingestuft. Resistenzen gegenüber Aminoglykosiden (mit Ausnahme des Spectinomycin) bewegten sich in einer Größenordnung von 0 bis 2,2 %. Die Zusammenfassung der phänotypischen Resistenzergebnisse lässt erkennen, dass die Resistenzraten von Isolaten aus landwirtschaftlichem Probenmaterial tendenziell höher waren als solche von Isolaten aus Supermarktproben. Insbesondere bei den  $\beta$ -Lactamantibiotika konnte der Unterschied zwischen den Vermarktungsstufen häufig statistisch abgesichert werden. Bei Spectinomycin waren zwar mehr Isolate aus Supermarktproben resistent, jedoch war dieser Unterschied zwischen den Vermarktungsstufen nicht signifikant (vgl. Tabelle 57). Darüber hinaus traten Resistenzen gegenüber zwei und mehr Antibiotika bei Isolaten aus landwirtschaftlichem Probenmaterial signifikant häufiger auf als bei Isolaten aus Supermarktproben (36 % vs. 26 %,  $p = 0,006$ ). Der Vergleich der mittleren MHK-Werte ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Vermarktungsstufen.

**Tabelle 57: Prozentuale Verteilung sensibel, intermediär und resistent einzustufender coliformer Bakterienisolate aus pflanzlichen Lebensmitteln**

Antibiotikum	Gesamt (n = 688)			Landw. Betrieb (n = 238)			Supermarkt (n = 450)		
	s	i	r	s	i	r	s	i	r
Amoxicillin/Clavulansäure	45,4	43,7	10,4	<b>37,8**</b>	<b>48,3</b>	<b>14,0*</b>	<b>49,8**</b>	<b>41,3</b>	<b>8,5*</b>
Amikacin	96,5	3,5	0	97,5	2,5	0	96,0	4,0	0
Ampicillin	34,9	43,2	21,8	30,0	45,0	25,0	37,6	42,3	20,1
Apramycin	99,9	-	0,2	100	-	0	99,8	-	0,2
Ceftazidim	98,8	0,4	0,7	98,7	0,8	0,4	98,9	0,2	0,9
Cefaclor	18,8	26,9	40,9	<b>12,5**</b>	<b>23,5</b>	<b>50,0*</b>	<b>22,5**</b>	<b>28,8</b>	<b>35,6*</b>
Cefepim	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Ceftiofur	94,5	-	5,5	<b>91,6**</b>	-	<b>8,4*</b>	<b>96,0**</b>	-	<b>4,0*</b>
Ciprofloxacin	99,9	0,2	0	100	0	0	99,8	0,2	0
Chloramphenicol	98,7	-	1,3	99,2	-	0,8	98,4	-	1,6
Colistin	90,9	0	9,1	<b>87,3**</b>	<b>0</b>	<b>12,8*</b>	<b>92,8**</b>	<b>0</b>	<b>7,1*</b>
Cefoxitin	51,8	25,6	22,7	<b>41,1**</b>	<b>25,9</b>	<b>33,0*</b>	<b>57,9**</b>	<b>25,4</b>	<b>16,8*</b>
Cefotaxim	95,9	2,2	2,2	<b>92,4**</b>	<b>4,2</b>	<b>3,4*</b>	<b>97,8**</b>	<b>1,1</b>	<b>1,1*</b>
Cefuroxim	60,6	18,4	20,9	<b>55,3**</b>	<b>18,4</b>	<b>26,3*</b>	<b>63,5**</b>	<b>18,4</b>	<b>17,9*</b>
Doxyzyklin	84,7	14,4	2,0	83,5	13,5	3,0	85,3	14,9	1,4
Enrofloxacin	99,4	0,4	0,2	100	0	0	99,1	0,7	0,2
Florfenicol	99,0	-	1,0	99,2	-	0,8	98,9	-	1,1
Gentamicin	93,3	6,4	0,3	92,9	7,1	0	93,6	6,0	0,4
Imipenem	96,8	1,6	1,6	97,9	1,3	0,8	96,2	1,8	2,0
Meropenem	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Mezlocillin	80,1	12,1	7,9	<b>74,4**</b>	<b>14,3</b>	<b>11,8*</b>	<b>83,1**</b>	<b>10,9</b>	<b>5,8*</b>
Neomycin	100	-	0	100	-	0	100	-	0
Netilmicin	93,9	5,7	0,4	<b>97,5**</b>	<b>2,1</b>	<b>0,4</b>	<b>92,0**</b>	<b>7,6</b>	<b>0,4</b>
Piperacillin	85,0	10,9	4,1	<b>80,3**</b>	<b>12,6</b>	<b>7,1*</b>	<b>87,6**</b>	<b>10,0</b>	<b>2,4*</b>
Piperacillin/Tazobactam	98,6	1,9	0,4	<b>95,8**</b>	<b>3,4</b>	<b>0,8</b>	<b>98,7**</b>	<b>1,1</b>	<b>0,2</b>
Spectinomycin	84,2	-	15,8	86,6	-	13,5	82,9	-	17,1
Streptomycin	98,1	-	1,9	97,9	-	2,1	98,2	-	1,8
Co-Trimoxazol	99,1	0,3	0,6	<b>98,7</b>	<b>0,8</b>	<b>0,4</b>	<b>99,3</b>	<b>0</b>	<b>0,7</b>
Tobramycin	97,1	2,8	0,2	97,9	1,7	0,4	96,7	3,3	0

s: sensibel, i: intermediär, r: resistent, "-" Intermediärbereich ist nicht definiert

**Fett:** Verteilungen sensibler, intermediärer und resistenter Isolate aus landw. Proben und aus Supermarktproben unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,05$ ) bezgl. des entsprechenden Antibiotikums

\* Raten für als resistent einzustufende Isolate aus landw. Proben und aus Supermarktproben unterscheiden sich signifikant bezgl. des entsprechenden Antibiotikums

\*\* Raten für als sensibel einzustufende Isolate aus landw. Proben und Supermarktproben unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,05$ ) bezgl. des entsprechenden Antibiotikums

### Einfluss der Matrix auf die Empfindlichkeit

Die Auswertungen der einzelnen Spezies in der Gruppe der coliformen Keime verdeutlichen, dass in vielen Fällen signifikante Unterschiede bezüglich der Verteilung sensibler, intermediärer und resistenter Keime zwischen den Matrices festzustellen waren. Auch bei der Betrachtung einzelner Substanzen waren Unterschiede zwischen den Matrices signifikant bezüglich des Auftretens resistenter Isolate. Insbesondere gegenüber einigen Cephalosporinen waren Isolate aus Fruchtgemüse signifikant häufiger als unempfindlich einzustufen als Isolate aus den anderen Matrices.

Darüber hinaus wurden bei der gemeinsamen Auswertung aller in dieser Arbeit isolierten coliformen Bakterien durchschnittlich 69 % der Isolate aus Fruchtgemüse und 59 % der Isolate aus Getreide als resistent gegenüber mindestens einem der geprüften Antibiotika eingestuft. Demgegenüber waren es in Salat, Wurzelgemüse und Zwiebelgemüse jeweils 47, 48 bzw. 49 % der Isolate. Somit waren die Resistenzraten bei Isolaten aus Fruchtgemüse bzw. Getreide signifikant höher als bei Isolaten aus den anderen untersuchten Matrices ( $p < 0,001$ ). Auch mehrfachresistente Isolate waren aus Fruchtgemüse und Getreide signifikant am häufigsten zu isolieren (46 % bzw. 38 % bei Fruchtgemüse und Getreide vs. 22 – 24 % bei Salat, Wurzelgemüse und Zwiebelgemüse).

## **2.3 *Pseudomonas* spp.**

### **2.3.1 *Pseudomonas aeruginosa***

*P. aeruginosa* erwies sich vor allem gegenüber Streptomycin und Spectinomycin als unempfindlich, wie Tabelle 58 zu entnehmen ist, während sich die Isolate gegenüber den übrigen Aminoglykosiden fast vollständig sensibel verhielten. Es fällt weiterhin auf, dass fast alle Isolate gegenüber Enrofloxacin und mehr als dreiviertel aller Isolate gegenüber Piperacillin und Piperacillin/Tazobactam als intermediär einzustufen waren. 56 % bzw. 57 % der gegenüber Piperacillin und Piperacillin/Tazobactam als intermediär eingestufteten Isolate wiesen dabei eine MHK von 8 µg/ml auf (vgl. Tabelle A 14 im Anhang) und befanden sich damit im unteren Konzentrationsbereich des Intermediärbereichs. Intermediäres Verhalten war darüber hinaus auch bei Ceftazidim (25 %) und Imipenem (22 %) festzustellen.

**Tabelle 58: Prozentuale Verteilung sensibel, intermediär und resistent einzustufender *P. aeruginosa*-Isolate aus pflanzlichen Lebensmitteln**

Antibiotikum	Gesamt (n = 295)			Landw. Betrieb (n = 80)			Supermarkt (n = 215)		
	s	i	r	s	i	r	s	i	r
Amikacin	97,0	3,0	0	97,5	2,5	0	96,7	3,3	0
Apramycin	99,4	-	0,6	100	-	0	99,0	-	1,0
Ceftazidim	72,9	24,8	2,4	65,0	32,6	2,6	75,8	21,9	2,4
Cefepim	86,1	13,3	0,7	<b>77,8**</b>	<b>21,3</b>	<b>1,3</b>	<b>89,3**</b>	<b>10,2</b>	<b>0,5</b>
Ciprofloxacin	98,7	1,0	0,3	98,9	1,3	0	98,6	0,9	0,5
Colistin	98,6	-	1,4	98,8	-	1,3	98,6	-	1,4
Enrofloxacin	7,1	92,1	0,7	<b>2,5</b>	<b>97,5</b>	<b>0</b>	<b>8,8</b>	<b>90,2</b>	<b>0,9</b>
Gentamicin	89,8	9,5	0,6	<b>83,8**</b>	<b>16,3</b>	<b>0</b>	<b>92,1**</b>	<b>7,0</b>	<b>1,0</b>
Imipenem	72,8	22,4	4,8	67,6	28,8	3,8	74,9	20,0	5,1
Meropenem	97,6	2,4	0	97,6	2,5	0	97,8	2,3	0
Neomycin	99,0	-	1,0	100	-	0	98,6	-	1,4
Netilmicin	90,9	6,8	2,4	88,8	7,5	3,8	91,6	6,5	1,9
Piperacillin	21,0	79,0	0	13,8	86,3	0	23,7	76,2	0
Piperacillin/Tazobactam	21,7	78,4	0	15,1	85,1	0	24,2	75,8	0
Spectinomycin	22,3	-	77,7	<b>2,5**</b>	-	<b>97,6*</b>	<b>29,8**</b>	-	<b>70,2*</b>
Streptomycin	89,1	-	10,8	86,3	-	13,9	90,2	-	9,8
Tobramycin	97,0	3,0	0	97,5	2,5	0	96,8	3,3	0

s: sensibel, i: intermediär, r: resistent

“-“ Intermediärbereich ist nicht definiert

**Fett:** Verteilungen sensibler, intermediärer und resistenter Isolate aus landw. Probenmaterial und aus Supermarktproben unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,05$ ) bezgl. des entsprechenden Antibiotikums

\* Raten für als resistent einzustufende Isolate aus landw. Probenmaterial und aus Supermarktproben unterscheiden sich signifikant bezgl. des entsprechenden Antibiotikums

\*\* Raten für als sensibel einzustufende Isolate aus landw. Probenmaterial und Supermarktproben unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,05$ ) bezgl. des entsprechenden Antibiotikums

### Einfluss der Vermarktungsstufe auf die Empfindlichkeit und die mittleren MHK-Werte

Die höheren Resistenz- bzw. Intermediärraten bei Isolaten, die aus landwirtschaftlichem Probenmaterial stammten und solchen aus Supermarktproben konnten auch statistisch abgesichert werden. Im Einzelnen bestanden signifikante Unterschiede zwischen den Isolaten bei Gentamicin (intermediär: 16,3 % vs. 7,0 %;  $p = 0,04$ ), Enrofloxacin (intermediär: 16,3 % vs. 7,4 %;  $p = 0,03$ ), Cefepim (intermediär: 21,3 % vs. 10,2 %;  $p = 0,03$ ) und Spectinomycin (97,6 % vs. 70,2 %;  $p < 0,001$ ). Hinsichtlich der mittleren MHK-Werte zeigten Isolate aus landwirtschaftlichem Probenmaterial tendenziell höhere Werte als Isolate aus Supermarktproben. Bei folgenden zwölf Antibiotika waren diese Unterschiede signifikant: Piperacillin ( $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  0,24  $\log_2$  Konzentrationsstufen), Cefepim ( $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  0,08  $\log_2$ ), Imipenem ( $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  0,35  $\log_2$ ), Meropenem ( $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  0,45  $\log_2$ ), Ciprofloxacin ( $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  0,44  $\log_2$ ), Enrofloxacin ( $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  0,33  $\log_2$ ),

Gentamicin ( $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  0,56  $\log_2$ ), Amikacin ( $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  0,23  $\log_2$ ), Neomycin ( $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  0,20  $\log_2$ ), Tobramycin ( $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  0,46  $\log_2$ ), Streptomycin ( $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  0,39  $\log_2$ ) und Spectinomycin ( $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  1,01  $\log_2$ ).

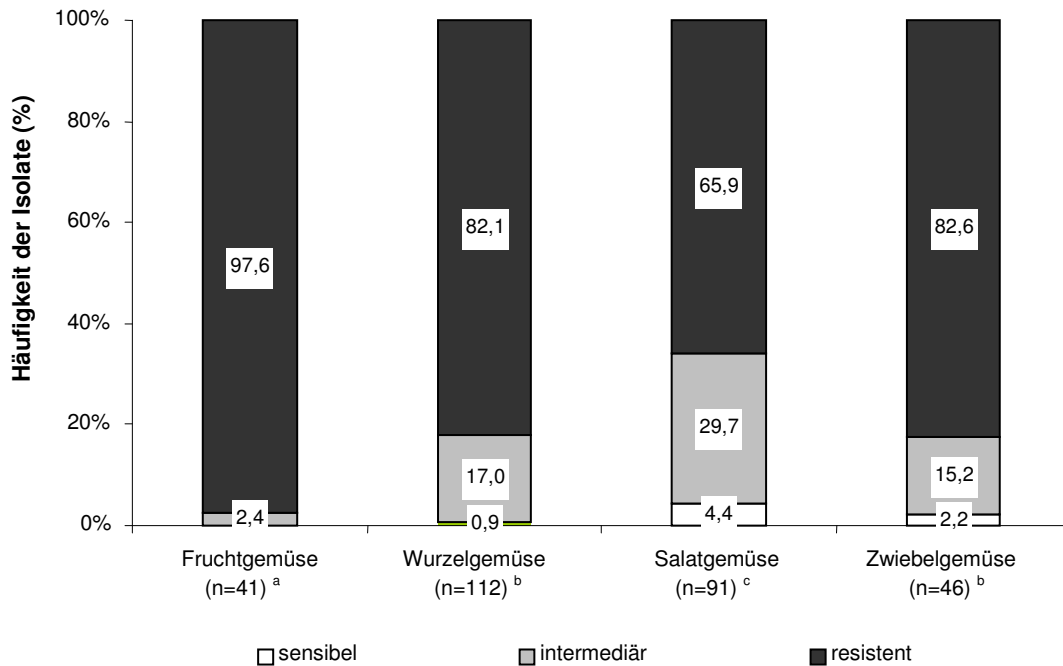
#### Einfluss der Matrix auf die Empfindlichkeit

Bei fünf Substanzen aus der Gruppe der Aminoglykoside und bei Ceftazidim waren signifikante Unterschiede zwischen den Matrices bezüglich der Resistenzraten von *P. aeruginosa* festzustellen: Gegenüber Neomycin, Netilmicin und Streptomycin exprimierten Isolate aus Fruchtgemüse signifikant häufiger Resistenzen als Isolate aus Wurzelgemüse und aus Salatgemüse (NEO: 4,9 %<sub>F</sub> vs. 0 %<sub>W,S</sub>; NET: 4,9 %<sub>F</sub> vs. 0,9 %<sub>W</sub> bzw. 0 %<sub>S</sub>; STR: 24,4 %<sub>F</sub> vs. 8,9 %<sub>W</sub> bzw. 5,5 %<sub>S</sub>)<sup>3</sup>. Fast alle Isolate (97,6 %) aus Fruchtgemüse erwiesen sich darüber hinaus gegenüber Spectinomycin als unempfindlich, während die Raten resistenter Isolate aus Wurzelgemüse (81,3 %), aus Salatgemüse (62,2 %) und aus Zwiebelgemüse (78,3 %) signifikant niedriger waren. Gegenüber Apramycin waren hingegen ausschließlich Isolate aus Zwiebelgemüse als unempfindlich einzustufen (4,4 %). Zudem erwiesen sich gegenüber Ceftazidim signifikant mehr Isolate aus Zwiebelgemüse (8,7 %) als resistent als Isolate aus Wurzelgemüse (1,8 %) und aus Salatgemüse (0 %). Alle fünf Isolate aus Getreide verhielten sich ausschließlich gegenüber Spectinomycin resistent, eines zusätzlich gegenüber Streptomycin. Die geringe Anzahl dieser Isolate erlaubte jedoch keine statistisch absicherbare Aussage bezüglich des Resistenzverhaltens.

Bei *P. aeruginosa* erwiesen sich fast alle Isolate als intermediär oder resistent gegenüber mindestens einem Antibiotikum (vgl. Abbildung 12). Dies gilt insbesondere für Isolate aus Fruchtgemüse. Hier wurden 97,6 % der Isolate als resistent eingestuft. Aus Getreideproben wurden fünf *P. aeruginosa*-Isolate gewonnen, die sich ausschließlich resistent verhielten. Zwischen Isolaten aus Wurzelgemüse und Zwiebelgemüse wurden hinsichtlich der Verteilung sensibler, intermediärer und resistenter Isolate keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Bei Isolaten aus Salatgemüse wurden die geringsten Resistenzraten (65,9 %) ermittelt. Jedoch war der Anteil der als intermediär eingestuften Isolate signifikant höher als bei den Isolaten aus den anderen Matrices (vgl. Abbildung 12). Bei der Betrachtung der prozentualen Verteilung muss jedoch berücksichtigt werden, dass je Matrix vergleichsweise geringe Isolatezahlen für die Auswertung zur Verfügung standen.

---

<sup>3</sup> F=Fruchtgemüse, W=Wurzelgemüse, S=Salatgemüse



**Abbildung 12: Verteilung sensibler, intermediärer und resistenter *P. aeruginosa*-Isolate in unterschiedlichen Matrices pflanzlichen Ursprungs**

a,b,c Matrices mit unterschiedlichen Superskripten unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,05$ ) bezügl. der Verteilung sensibler, intermediärer und resistenter Isolate  
 „sensibel“ Isolate sind empfindlich gegenüber allen geprüften Antibiotika  
 „intermediär“ Isolate sind intermediär gegenüber mindestens einem geprüften Antibiotikum, jedoch gegenüber keinem Antibiotikum resistent  
 „resistent“ Isolate sind gegenüber mindestens einem Antibiotikum resistent

### Mehrfachresistenzen bei *P. aeruginosa*

20,3 % der Isolate waren gegenüber allen Antibiotika sensibel, 15 % der Isolate zeigten dagegen Resistenzen gegenüber zwei und mehr Antibiotika, wie aus Tabelle 59 hervorgeht. Hinsichtlich des Vorkommens von Mehrfachresistenzen wurde kein Unterschied zwischen Isolaten aus landwirtschaftlichem Probenmaterial und solchen aus Supermarktproben festgestellt. Signifikant war jedoch der Unterschied zwischen den Vermarktungsstufen hinsichtlich der Prävalenz empfindlicher Isolate und solchen Isolaten mit mindestens einer Resistenz ( $p < 0,001$ ). So waren nur zwei Isolate (2,5 %) aus landwirtschaftlichem Probenmaterial empfindlich gegenüber allen geprüften Antibiotika, während bei 58 Isolaten (27 %) aus Supermarktproben keine Resistenz beobachtet werden konnte. 80 % der Isolate aus landwirtschaftlichen Proben waren gegenüber einer Substanz als unempfindlich einzustufen, während dies bei Supermarktproben 59 % der Isolate waren.

**Tabelle 59: Häufigkeiten nicht-, einfach- und mehrfachresistenter *P. aeruginosa* (n = 295) isoliert aus pflanzlichen Lebensmitteln unterschiedlicher Vermarktungsstufen**

Vermarktungsstufe	Anzahl Isolate (n)	Anzahl der Resistenzen													
		0		1		2		3		4		5		6-7	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Landw. Betrieb <sup>a</sup>	80	2	2,5*	64	80,0*	9	11,3	3	3,8	2	2,5*	0	0	0	0
Supermarkt <sup>b</sup>	215	58	27,0*	127	59,1*	22	10,2	4	1,9	0	0*	2	0,9	2	0,9
Gesamt	295	60	20,3	191	64,8	31	10,5	7	2,4	2	0,7	2	0,7	2	0,7

<sup>a,b</sup> Unterschied zwischen den Vermarktungsstufen ist signifikant ( $p < 0,05$ ) bezügl. der Verteilung nicht-, einfach- und mehrfachresistenter Isolate

\* Unterschied zwischen den Vermarktungsstufen ist signifikant ( $p < 0,05$ ) bezügl. der entsprechenden Anzahl der Resistenzen in der jeweiligen Spalte

### Resistenzprofile

Bei Isolaten mit einer oder mehr Resistenzen fällt auf, dass sie vor allem gegenüber den Aminoglykosiden und hier vor allem gegenüber Spectinomycin und Streptomycin unempfindlich waren. Zwei Isolate mit Resistenzen gegenüber vier Wirkstoffen bzw. ein Isolat mit Resistenzen gegenüber sieben Wirkstoffen exprimierten zusätzlich Resistenz gegenüber  $\beta$ -Lactamantibiotika (Ceftazidim, Cefepim und Imipenem). Desweiteren wurde bei zwei fünf-fachresistenten Isolaten Fluorchinolonresistenz festgestellt. In Tabelle 60 sind die häufigsten Resistenzprofile ein- und mehrfachresistenter Isolate aufgeführt.

**Tabelle 60: Verteilung der Mehrfachresistenz sowie dominante phänotypische Resistenzprofile von *P. aeruginosa* (n = 295) aus pflanzlichen Lebensmitteln**

Anzahl der Resistenzen	Isolate (%)		Häufigstes Resistenzprofil (% der Gesamtisolate)	
	Wirkstoff (n = 17)	Wirkstoffklasse* (n = 6)	Wirkstoff**	Wirkstoffklasse*
0	20,3	20,3	-	-
1	64,8	63,7	SPT (63,1)	AGL (63,7)
2	10,5	8,8	STR SPT (5,8) o. SPT IMP (2,7)	AGL (6,1) o. AGL CARB (2,7)
3	2,4	2,4	STR SPT COL (0,7)	AGL POL (0,7)
4	0,7	0,7	CAZ NET STR SPT (0,3) o. IMP NET STR SPT (0,3)	CEP AGL (0,3) o. CARB AGL (0,3)
5	0,7	0,7	APR NET STR SPT ENR (0,7) o. GEN NEO STR SPT CIP (0,7)	AGL FQL (0,7)
6	0,3	0,3	APR GEN NET NEO STR SPT (0,3)	AGL (0,3)
7	0,3	0,3	CAZ CEP IMP NET STR SPT COL (0,3)	CEP CBP AGL POL (0,3)

\* Resistenz gegen einen oder mehrere Wirkstoffe aus der genannten Wirkstoffklasse; AGL: Aminoglykoside, CBP: Carbapeneme, POL: Polymyxine, CEP: Cephalosporine, FQL: Fluorquinolone

\*\* Kürzel der Antibiotika siehe Abkürzungsverzeichnis; „oder“ Profile traten in gleichem Umfang auf



### 2.3.2 *Pseudomonas putida*

*P. putida* verhielt sich gegenüber vielen Antibiotika vor allem intermediär. Dies trifft insbesondere gegenüber Doxyzyklin, Enrofloxacin, Piperacillin, Piperacillin/Tazobactam und einigen neueren Aminoglykosiden zu. Vor allem bei Doxyzyklin, Piperacillin und Piperacillin/Tazobactam waren mehr als die Hälfte aller Isolate als „intermediär“ eingestuft worden, während dies bei Ceftazidim und Imipenem ein Viertel aller Isolate betrifft. Gegenüber Spectinomycin wurden hingegen häufiger, gegenüber Streptomycin seltener Resistenzen exprimiert, wie in Tabelle 61 dargestellt ist. Gegenüber Imipenem waren immerhin 12 % der Isolate resistent. Die Verteilung der MHK-Werte ist Tabelle A 15 im Anhang zu entnehmen.

**Tabelle 61: Prozentuale Verteilung sensibel, intermediär und resistent einzustufender *P. putida*-Isolate aus pflanzlichen Lebensmitteln**

Antibiotikum	Gesamt (n = 106)			Landw. Betrieb (n = 25)			Supermarkt (n = 81)		
	s	i	r	s	i	r	s	i	r
Amikacin	94,4	4,7	0,9	<b>88,0**</b>	<b>12,0</b>	<b>0</b>	<b>96,3**</b>	<b>2,5</b>	<b>1,2</b>
Apramycin	91,5	-	8,4	84,0	-	16,0	97,6	-	2,4
Ceftazidim	69,7	27,4	2,8	72,0	24,0	4,0	69,1	28,4	2,4
Cefepim	84,0	15,1	0,9	84,0	16,0	0	83,4	14,9	1,2
Ciprofloxacin	97,1	0,9	1,8	100	0	0	96,3	1,2	2,4
Colistin	96,2	-	3,8	100	-	0	95,1	-	4,9
Doxyzyklin	36,7	59,4	3,8	32,0	68,0	0	38,3	56,8	4,9
Enrofloxacin	17,9	79,3	2,8	<b>0**</b>	<b>96,0</b>	<b>4,0</b>	<b>23,5**</b>	<b>74,1</b>	<b>2,5</b>
Gentamicin	78,3	18,9	2,8	<b>60,0**</b>	<b>32,0</b>	<b>8,0</b>	<b>84,0**</b>	<b>14,8</b>	<b>1,2</b>
Imipenem	62,3	26,4	11,3	56,0	28,0	16,0	64,2	25,9	9,8
Meropenem	90,6	8,5	0,9	88,0	12,0	0	91,4	7,4	1,2
Neomycin	96,3	-	3,7	<b>88,0**</b>	-	<b>12,0*</b>	<b>98,7**</b>	-	<b>1,2*</b>
Netilmicin	77,4	21,7	0,9	76,0	24,0	0	77,8	21,0	1,2
Piperacillin	30,2	68,0	1,8	16,0	80,0	4,0	34,6	64,2	1,2
Piperacillin/Tazobactam	34,9	64,2	0,9	28,0	72,0	0	37,1	61,7	1,2
Spectinomycin	29,1	-	70,8	<b>0**</b>	-	<b>100*</b>	<b>38,2**</b>	-	<b>61,7*</b>
Streptomycin	81,2	-	18,9	76,0	-	24,0	82,7	-	17,3
Tobramycin	93,4	5,7	0,9	88,0	12,0	0	95,1	3,7	1,2

s: sensibel, i: intermediär, r: resistent

“-“ Intermediärbereich ist nicht definiert

**Fett:** Verteilungen sensibler, intermediärer und resistenter Isolate aus landw. Probenmaterial und aus Supermarktproben unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,05$ ) bezgl. des entsprechenden Antibiotikums

\* Raten für als resistent einzustufende Isolate aus landw. Probenmaterial und aus Supermarktproben unterscheiden sich signifikant bezgl. des entsprechenden Antibiotikums

\*\* Raten für als sensibel einzustufende Isolate aus landw. Probenmaterial und Supermarktproben unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,05$ ) bezgl. des entsprechenden Antibiotikums

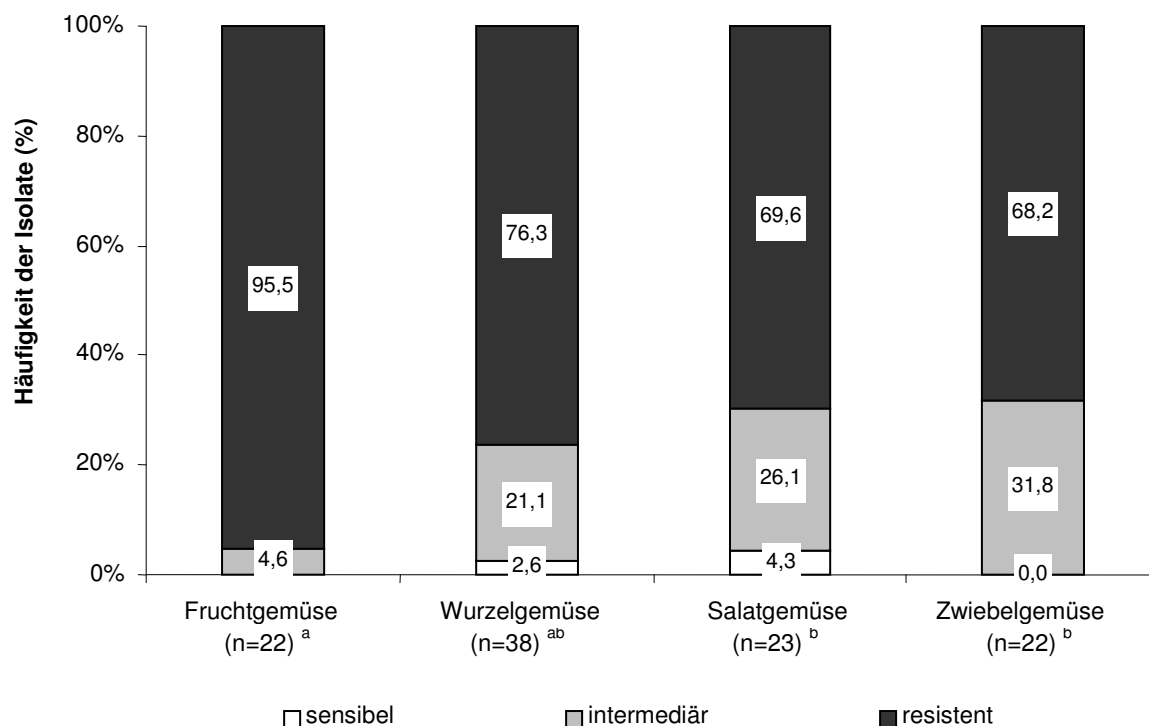
### Einfluss der Vermarktungsstufe auf die Empfindlichkeit und die mittleren MHK-Werte

Generell bestand eine Tendenz zu höheren Resistenz- bzw. Intermediärraten bei Isolaten aus landwirtschaftlichem Probenmaterial als bei solchen aus Supermärkten. Im Einzelnen war dies gegenüber Enrofloxacin ( $p = 0,028$ ), Amikacin ( $p < 0,05$ ), Neomycin ( $p < 0,05$ ), Gentamicin ( $p = 0,024$ ) und Spectinomycin ( $p < 0,001$ ) statistisch abzusichern. Die Beobachtung höherer Resistenzraten bei Isolaten aus landwirtschaftlichem Probenmaterial als bei Isolaten aus Supermarktproben zeichnete sich auch bei den durchschnittlichen MHK-Werten ab. Gegenüber zehn Substanzen wurden bei Isolaten aus landwirtschaftlichem Probenmaterial ( $MHK_{LW}$ ) signifikant höhere MHK-Werte ermittelt als bei Isolaten aus Supermarktproben ( $MHK_S$ ): Piperacillin ( $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  0,51  $\log_2$  Konzentrationsstufen), Meropenem ( $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  0,41  $\log_2$ ), Ciprofloxacin ( $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  0,81  $\log_2$ ), Enrofloxacin ( $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  0,86  $\log_2$ ), Amikacin ( $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  0,51  $\log_2$ ), Gentamicin ( $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  1,03  $\log_2$ ), Neomycin ( $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  0,29  $\log_2$ ), Tobramycin ( $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  0,76  $\log_2$ ), Streptomycin ( $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  0,49  $\log_2$ ) und Spectinomycin ( $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  1,45  $\log_2$ ).

### Einfluss der Matrix auf die Empfindlichkeit

Auch bei *P. putida* waren mehr Isolate aus Fruchtgemüse unempfindlich als Isolate aus den übrigen Matrices. Statistisch abgesichert werden konnte dies gegenüber Doxyzyklin, Spectinomycin und Streptomycin. Vier Isolate aus Fruchtgemüse erwiesen sich als resistent gegenüber Doxyzyklin, während bei Isolaten aus den anderen Matrices keine Doxyzyklinresistenz festgestellt wurde. Gegenüber Spectinomycin waren 21 von 22 Isolaten (95,5 %) aus Fruchtgemüse und damit signifikant mehr Isolate als unempfindlich einzustufen als Isolate aus Wurzelgemüse (68,4 %), aus Zwiebelgemüse (63,3 %) und Salatgemüse (56,5 %). Ein einziges aus Getreide stammendes Isolat verhielt sich hier ebenfalls resistent. Signifikant unterschied sich auch die Resistenzrate der Isolate aus Fruchtgemüse (45,5 %), Wurzelgemüse (7,9 %) und Salatgemüse (8,7 %) bei Streptomycin.

Auch bezüglich der Verteilung sensibler, intermediärer und resistenter Isolate wurden zwischen den Matrices Unterschiede beobachtet. So waren Isolate aus Fruchtgemüse (95,5 %) signifikant häufiger als resistent einzustufen als Isolate aus Salatgemüse (69,6 %) und Zwiebelgemüse (68,2 %), während sich die übrigen Matrices nicht signifikant voneinander unterschieden. Aus Abbildung 13 geht insbesondere hervor, dass vollständig sensible Isolate in geringem Umfang nur bei Wurzel- und Salatgemüse, nicht aber bei Frucht- und Zwiebelgemüse zu beobachten waren.



**Abbildung 13: Verteilung sensibler, intermediärer und resistenter *P. putida*-Isolate in unterschiedlichen Matrices pflanzlichen Ursprungs**

a,b Matrices mit unterschiedlichen Superskripten unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,05$ ) bezügl. der Verteilung sensibler, intermediärer und resistenter Isolate

„sensibel“ Isolate sind empfindlich gegenüber allen geprüften Antibiotika

„intermediär“ Isolate sind intermediär gegenüber mindestens einem geprüften Antibiotikum, jedoch gegenüber keinem Antibiotikum resistent

„resistent“ Isolate sind gegenüber mindestens einem Antibiotikum resistent

#### Mehrfachresistenzen bei *P. putida*

Bei 25 % der Isolate wurden zwei und mehr Resistenzen festgestellt. Ca. 23 % verhielten sich empfindlich gegenüber allen geprüften Substanzen, wie Tabelle 62 zu entnehmen ist. Hinsichtlich der Verteilung nicht-, einfach- und mehrfachresistenter Isolate bestanden zwischen den Vermarktungsstufen signifikante Unterschiede ( $p < 0,01$ ). So exprimierten „landwirtschaftliche Isolate“ häufiger eine oder mehr Resistenzen als „Supermarktisolate“. Insgesamt konnten die bei *Pseudomonas* spp. erwarteten ausgeprägten Mehrfachresistenzen in der vorliegenden Untersuchung jedoch nicht beobachtet werden. So zeigte ein Isolat eine Fünffachresistenz, drei Isolate verhielten sich gegenüber vier Wirkstoffen unempfindlich. Es ist zu beobachten, dass bei mehr als der Hälfte aller Isolate zumindest Resistenz gegenüber einem Wirkstoff auftrat.

**Tabelle 62: Häufigkeiten nicht-, einfach- und mehrfachresistenter *P. putida*-Isolate (n = 106) aus pflanzlichen Lebensmitteln unterschiedlicher Vermarktungsstufen**

Vermarktungsstufe	Anzahl Isolate (n)	Anzahl der Resistenzen											
		0		1		2		3		4		5	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Landw. Betrieb <sup>a</sup>	25	0	0*	15	60,0	6	24,0	1	4,0	2	8,0	1	4,0
Supermarkt <sup>b</sup>	81	25	30,9*	40	49,4	8	9,9	7	8,6	1	1,2	0	0
Gesamt	106	25	23,6	55	51,9	14	13,2	8	7,6	3	2,8	1	0,9

<sup>a,b</sup> Unterschied zwischen den Vermarktungsstufen ist signifikant ( $p < 0,05$ ) bezügl. der Verteilung nicht-, einfach- und mehrfachresistenter Isolate

\* Unterschied zwischen den Vermarktungsstufen ist signifikant ( $p < 0,05$ ) bezügl. der entsprechenden Anzahl der Resistenzen

### Resistenzprofile

Wie bei *P. aeruginosa*, trat auch bei *P. putida* die Resistenz gegenüber Aminoglykosiden, und hier insbesondere gegen Spectinomycin, als dominantes Resistenzprofil auf. Darüber hinaus wurde bei sieben Isolaten eine Aminoglykosid- $\beta$ -Lactamresistenz (SPT u./o. STR und IMP) festgestellt. Bei einem vierfachresistenten Isolat war die Unempfindlichkeit gegenüber Fluorchinolonen involviert. Tabelle 63 zeigt die häufigsten Profile ein- und mehrfachresistenter *P. putida*-Isolate.

**Tabelle 63: Verteilung der Mehrfachresistenz sowie dominante phänotypische Resistenzprofile von *P. putida* (n = 106) aus pflanzlichen Lebensmitteln**

Anzahl der Resistenzen	Isolate (%)		Häufigstes Resistenzprofil (% der Gesamtisolate)	
	Wirkstoff (n = 18)	Wirkstoffklasse* (n = 7)	Wirkstoff	Wirkstoffklasse*
0	22,6	22,6	-	-
1	51,9	47,2	SPT (46,2)	AGL (47,2)
2	13,2	12,3	STR SPT (7,6)	AGL (7,6)
3	7,6	7,6	STR SPT IMP (3,8)	AGL CARB (3,8)
4	2,8	2,8	NEO STR SPT IMP (0,9) oder GEN NEO STR SPT (0,9) oder STR SPT CIP ENR (0,9)	AGL CARB (0,9) AGL (0,9) AGL FQL (0,9)
5	0,9	0,9	GEN NEO STR SPT IMP (0,9)	AGL CARB (0,9)

\* Resistenz gegen einen oder mehrere Wirkstoffe aus der genannten Wirkstoffklasse; AGL: Aminoglykoside, CARB: Carbapeneme, FQL: Fluorquinolone

\*\* Kürzel der Antibiotika siehe Abkürzungsverzeichnis

„oder“ Profile traten in gleichem Umfang auf

### 2.3.3 *Pseudomonas fluorescens*

*P. fluorescens* exprimierte gegenüber Spectinomycin ausgeprägte Resistenzen (55 %), während gegenüber Streptomycin 13 % unempfindlich waren. Gegenüber Doxyzyklin erwiesen sich mehr als die Hälfte aller Isolate intermediär bzw. resistent, gegenüber Piperacillin, Piperacillin/Tazobactam war annähernd die Hälfte aller Isolate und gegenüber Enrofloxacin zwei Drittel der Isolate als intermediär einzustufen (vgl. Tabelle 64, MHK-Wertverteilung vgl. Tabelle A 16). Vier Isolate waren darüber hinaus unempfindlich gegenüber Colistin. Die Ergebnisse sollten jedoch aufgrund geringer Isolatezahlen ( $n = 38$ ) nicht überbewertet werden. Wegen geringer Isolatezahlen insbesondere aus landwirtschaftlichen Proben ( $n = 3$ ) konnten auch Unterschiede zwischen den Betriebsformen hinsichtlich der Empfindlichkeit und hinsichtlich der durchschnittlichen MHK-Werte statistisch nicht abgesichert werden. Ebenso war kein Matrixeffekt statistisch zu belegen. Von 26 Isolaten mit Resistenz gegenüber mindestens einem Antibiotikum wurden zwölf aus Wurzelgemüse, sechs aus Salatgemüse, vier aus Zwiebelgemüse und je zwei aus Fruchtgemüse bzw. Getreide isoliert.

**Tabelle 64: Verteilung sensibel, intermediär und resistent einzustufender *P. fluorescens*-Isolate ( $n = 38$ ) aus pflanzlichen Lebensmitteln [n (%)]**

Antibiotikum	Sensibel	Intermediär	Resistent
Amikacin	36 (94,7)	1 (2,6)	1 (2,6)
Apramycin	36 (94,7)	-	2 (5,3)
Ceftazidim	31 (81,6)	5 (13,1)	2 (5,3)
Cefepim	35 (92,1)	0	3 (7,9)
Ciprofloxacin	38 (100)	0	0
Colistin	34 (89,5)	0	4 (10,5)
Doxyzyklin	17 (44,8)	19 (50,0)	2 (5,3)
Enrofloxacin	12 (31,6)	24 (67,2)	2 (5,3)
Gentamicin	36 (98,8)	1 (2,6)	1 (2,6)
Imipenem	30 (79,0)	6 (15,8)	2 (5,3)
Meropenem	37 (97,4)	1 (2,6)	0
Neomycin	37 (97,4)	-	1 (2,6)
Netilmicin	32 (84,2)	6 (15,8)	0
Piperacillin	22 (57,9)	16 (42,1)	0
Piperacillin/Tazobactam	19 (50,0)	19 (50,0)	0
Spectinomycin	17 (44,8)	-	21 (55,3)
Streptomycin	33 (86,9)	-	5 (13,1)
Tobramycin	37 (97,4)	0	1 (2,6)

„-“ Intermediärbereich ist nicht definiert

Mehrfachresistenzen bei *P. fluorescens*

Bei insgesamt acht Isolaten konnten Resistenzen gegenüber zwei bzw. drei Antibiotika festgestellt werden (vgl. Tabelle 65). Von den acht mehrfachresistenten Isolaten stammten sieben Isolate aus Supermarktpuben. Fast die Hälfte aller Isolate erwies sich als unempfindlich gegenüber einem Antibiotikum. Zwölf Isolate waren gegenüber allen Antibiotika empfindlich.

**Tabelle 65: Häufigkeiten nicht-, einfach- und mehrfachresistenter *P. fluorescens*-Isolate (n = 38) isoliert aus pflanzlichen Lebensmitteln unterschiedlicher Vermarktungsstufen**

Vermarktungsstufe	Anzahl Isolate (n)	Anzahl der Resistenzen							
		0		1		2		3	
		n	%	n	%	n	%	n	%
Landw. Betrieb	3	0	-	2	-	1	-	0	-
Supermarkt	35	12	-	16	-	5	-	2	-
Gesamt	38	12	31,6	18	47,4	6	15,8	2	5,3

Resistenzprofile

In Tabelle 66 sind dominante Resistenzprofile von *P. fluorescens* dargestellt. Mit Ausnahme von drei Isolaten wurde bei allen ein- und mehrfachresistenten *P. fluorescens*-Isolaten Unempfindlichkeit gegenüber Aminoglykosiden beobachtet. Auch hier war Spectinomycin der Wirkstoff, gegenüber dem die meisten Resistenzen bestanden. Die Resistenz gegen Colistin wurde von drei Isolaten exprimiert, die gegen Doxzyklin von einem Isolat.

**Tabelle 66: Verteilung der Mehrfachresistenz sowie dominante phänotypische Resistenzprofile von *P. fluorescens* (n = 38) aus pflanzlichen Lebensmitteln**

Anzahl der Resistenzen	Isolate n (%)		Resistenzprofile (n (%) der Gesamtisolate)	
	Wirkstoff (n = 18)	Wirkstoffklasse* (n = 7)	Wirkstoff**	Wirkstoffklasse*
0	12 (31,6)	12 (31,6)	-	-
1	18 (47,4)	16 (42,1)	SPT 16 (42,1)	AGL 16 (42,1)
2	6 (15,8)	5 (13,2)	SPT IMP 1 (2,6) o. STR COL 1 (2,6) o. STR SPT 1 (2,6) o. SPT DOX 1 (2,6) o. SPT ENR 1 (2,6)	AGL CARB 1 (2,6) o. AGL POL 1 (2,6) o. AGL 1 (2,6) o. AGL TET 1 (2,6) o. AGL FQL 1 (2,6)
3	2 (5,3)	2 (5,3)	APR STR COL 1 (2,6) o. STR COL IMP 1 (2,6)	AGL POL 1 (2,6) o. AGL POL CARB 1 (2,6)

\* Resistenz gegen einen oder mehrere Wirkstoffe aus der genannten Wirkstoffklasse; AGL: Aminoglykoside, CARB: Carbapeneme, POL: Polymyxine, TET: Tetracykline, FQL: Fluorquinolone

\*\* Kürzel der Antibiotika siehe Abkürzungsverzeichnis

„oder“ Profile traten in gleichem Umfang auf

### 2.3.4 Zusammenfassende Betrachtung der Resistenzeigenschaften von *Pseudomonas* spp.

Aus Tabelle 67 geht hervor, dass *Pseudomonas* spp. vor allem gegenüber Spectinomycin und Streptomycin als resistent eingestuft wurden. Bei den landwirtschaftlichen Isolaten erwiesen sich somit fast alle als unempfindlich gegenüber Spectinomycin (98,2 %), während die Resistenzraten gegenüber den anderen Antibiotika sich zwischen 0,3 % und 6,5 % bewegten. Auffallend sind die hohen Anteile der als intermediär eingestuften Isolate vor allem bei Enrofloxacin, Piperacillin, Piperacillin/Tazobactam, Doxyzyklin, Ceftazidim und Imipenem. Darüber hinaus konnte nur gegenüber Apramycin und hier wiederum nur bei Isolaten aus landwirtschaftlichem Probenmaterial vollständig sensibles Verhalten beobachtet werden. Auch bei Ciprofloxacin und Colistin waren Resistenzen bzw. intermediäres Verhalten selten festzustellen.

**Tabelle 67: Prozentuale Verteilung sensibel, intermediär und resistent einzustufender *Pseudomonas* spp. aus pflanzlichen Lebensmitteln**

Antibiotikum	Gesamt (n = 439)			Landw. Betrieb (n = 108)			Supermarkt (n = 331)		
	s	i	r	s	i	r	s	i	r
Amikacin	96,1	3,4	0,5	95,4	4,6	0	96,4	3,0	0,6
Apramycin	98,6	-	1,4	100	-	0	98,2	-	1,8
Ceftazidim	72,9	24,4	2,7	67,6	29,6	2,8	74,6	22,7	2,7
Cefepim	86,1	12,5	1,4	<b>79,6**</b>	<b>19,4</b>	<b>0,9</b>	<b>88,2**</b>	<b>10,3</b>	<b>1,5</b>
Ciprofloxacin	98,4	0,9	0,7	99,1	0,9	0	98,2	0,9	0,9
Colistin	97,3	-	2,7	99,1	-	0,9	96,7	-	3,3
Doxyzyklin	38,9	56,9	4,2	32,1	64,3	3,6	40,5	55,2	4,3
Enrofloxacin	11,9	86,6	1,6	<b>1,9**</b>	<b>97,2</b>	<b>0,9</b>	<b>15,1**</b>	<b>83,1</b>	<b>1,8</b>
Gentamicin	87,5	11,2	1,4	<b>78,7**</b>	<b>19,4</b>	<b>1,9</b>	<b>90,3**</b>	<b>8,5</b>	<b>1,2</b>
Imipenem	70,8	22,8	6,4	65,7	27,8	6,5	72,5	21,2	6,3
Meropenem	95,9	3,9	0,2	95,4	4,6	0	96,1	3,6	0,3
Neomycin	98,2	-	1,8	97,2	-	2,8	98,5	-	1,5
Netilmicin	87,0	11,2	1,8	86,1	11,1	2,8	87,3	11,2	1,5
Piperacillin	26,4	73,1	0,5	<b>14,8**</b>	<b>84,3</b>	<b>0,9</b>	<b>30,2**</b>	<b>69,5</b>	<b>0,3</b>
Piperacillin/Tazobactam	27,3	72,4	0,2	<b>18,5**</b>	<b>81,5</b>	<b>0</b>	<b>30,2**</b>	<b>69,5</b>	<b>0,3</b>
Spectinomycin	26,0	-	74,0	<b>1,9**</b>	-	<b>98,2*</b>	<b>33,8**</b>	-	<b>66,2*</b>
Streptomycin	87,0	-	13,0	84,3	-	15,7	87,9	-	12,1
Tobramycin	96,1	3,4	0,5	95,4	4,6	0	96,4	3,0	0,6

s: sensibel, i: intermediär, r: resistent; “-“ Intermediärbereich ist nicht definiert

**Fett:** Verteilungen sensibler, intermediärer und resistenter Isolate aus landw. Probenmaterial und aus Supermarktproben unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,05$ ) bezgl. des entsprechenden Antibiotikums

\* Raten für als resistent einzustufende Isolate aus landw. Probenmaterial und aus Supermarktproben unterscheiden sich signifikant bezgl. des entsprechenden Antibiotikums

\*\* Raten für als sensibel einzustufende Isolate aus landw. Probenmaterial und Supermarktproben unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,05$ ) bezgl. des entsprechenden Antibiotikums

### Einfluss der Vermarktungsstufe auf die Empfindlichkeit

Zwischen den Vermarktungsstufen bestanden signifikante Unterschiede hinsichtlich des Auftretens von Resistenzen. So waren insgesamt 98 % der Isolate aus landwirtschaftlichen Proben gegenüber 72 % der Isolate aus Supermarktproben als resistent gegenüber mindestens einem Antibiotikum einzustufen. Bei Spectinomycin waren 98 % der Isolate aus landwirtschaftlichem Probenmaterial gegenüber 66 % der Isolate aus Supermarktproben resistent. Bei Cefepim, Enrofloxacin, Gentamicin, Piperacillin und Piperacillin/Tazobactam waren zudem signifikant mehr Isolate aus landwirtschaftlichem Probenmaterial intermediär einzustufen als solche aus Supermarktproben. Die mittleren MHK-Werte der beiden Gruppen unterschieden sich hingegen nicht signifikant. Das Auftreten von Mehrfachresistenzen wurde bei Isolaten aus landwirtschaftlichem Probenmaterial zwar häufiger beobachtet als bei Isolaten aus Supermarktproben (23 % vs. 16 %), dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.

### Einfluss der Matrix auf die Empfindlichkeit

Wie bei *P. aeruginosa* und *P. putida* bereits beschrieben, waren signifikant mehr Isolate aus Fruchtgemüse als aus anderen Matrices unempfindlich gegenüber wenigstens einer geprüften Substanz. Dies spiegelt auch die Beobachtungen bei den Einzelsubstanzen wider. Dort war eine Tendenz zu höheren Resistenzraten bei Isolaten aus Fruchtgemüse im Vergleich zu Isolaten aus den übrigen Matrices zu erkennen. Bei Spectinomycin war dieser Unterschied stets signifikant. Auch die zusammenfassende Auswertung von *Pseudomonas* spp. belegt, dass Isolate aus Fruchtgemüse signifikant häufiger unempfindlich (97 %) gegenüber mindestens einem Antibiotikum waren als Isolate aus Salat- (66 %), Zwiebel- (77 %) und Wurzelgemüse (80 %). Alle acht Isolate aus Getreide verhielten sich unempfindlich gegenüber wenigstens einem Antibiotikum. Isolate mit Resistenzen gegenüber zwei und mehr Antibiotika waren ebenfalls in Fruchtgemüse signifikant häufiger zu beobachten als in den anderen Matrices (Fruchtgemüse: 40 %, Zwiebelgemüse: 22 %, Wurzelgemüse: 16 %, Salat: 7 %).

## **2.4 *Enterococcus* spp.**

### **2.4.1 *E. faecalis***

*E. faecalis*-Isolate waren insbesondere gegenüber Doxyzyklin, Fosfomycin und Rifampicin als intermediär bzw. resistent einzustufen (vgl. Tabelle 68). Gegenüber Enrofloxacin zeigten sich die Isolate fast vollständig intermediär. Intermediäres Verhalten wurde in hohem Maße auch gegenüber Erythromycin, Imipenem und zusätzlich bei Rifampicin beobachtet. Vollständig sensibel waren hingegen Isolate beider Vermarktungsstufen gegenüber den Glykopeptiden Teicoplanin und Vancomycin sowie gegenüber Gentamicin HL. Bei 6 % der Isolate



wurde Unempfindlichkeit gegenüber Streptomycin HL beobachtet. Die MHK-Wertverteilung findet sich in Tabelle A 17 im Anhang.

**Tabelle 68: Prozentuale Verteilung sensibel, intermediär und resistent einzustufender *E. faecalis*-Isolate aus pflanzlichen Lebensmitteln**

Antibiotikum	Gesamt (n = 100)			Landw. Betrieb (n = 42)			Supermarkt (n = 58)		
	s	i	r	s	i	r	s	i	r
Amoxicillin/Clavulansäure	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Ampicillin	99,0	1,0	0	97,6	2,4	0	100	0	0
Chloramphenicol	97,0	-	3,0	97,6	-	2,4	94,9	-	5,2
Ciprofloxacin	78,0	20,0	2,0	<b>69,1**</b>	<b>26,2</b>	<b>4,8</b>	<b>88,0**</b>	<b>12,1</b>	<b>0</b>
Doxyzyklin	73,0	4,0	23,0	81,0	2,4	16,7	66,0	7,1	30,4
Enrofloxacin	2,0	98,0	0	0	100	0	3,5	96,6	0
Erythromycin	25,0	54,0	21,0	21,5	57,2	21,5	25,9	50,1	24,2
Florfenicol	100	-	0	100	-	0	100	-	0
Fosfomycin	77,0	-	23,0	73,9	-	26,2	77,5	-	22,5
Gentamicin HL	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Imipenem	64,0	32,0	4,0	59,7	35,7	4,8	72,5	24,1	3,4
Linezolid	97,0	2,0	1,0	<b>92,9**</b>	<b>4,8</b>	<b>2,4</b>	<b>100**</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
Mezlocillin	98,0	1,0	1,0	95,3	2,4	2,4	100	0	0
Moxifloxacin	99,0	0	1,0	97,6	0	2,4	100	0	0
Nitrofurantoin	98,0	1,0	1,0	95,3	2,4	2,4	100	0	0
Rifampicin	11,0	24,0	65,0	4,8	28,6	66,7	15,6	27,6	56,9
Streptomycin HL	94,0	-	6,0	92,9	-	7,2	94,9	-	5,2
Co-Trimoxazol	98,0	0	2,0	97,6	0	2,4	98,3	0	1,7
Teicoplanin	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Tylosin	90,0	0	10,0	95,3	0	4,8	82,9	0	17,2
Vancomycin	100	0	0	100	0	0	100	0	0

s: sensibel, i: intermediär, r: resistent

“-“ Intermediärbereich ist nicht definiert

**Fett:** Verteilungen sensibler, intermediärer und resistenter Isolate aus landw. Probenmaterial und aus Supermarktproben unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,05$ ) bezgl. des entsprechenden Antibiotikums

\* Raten für als resistent einzustufende Isolate aus landw. Probenmaterial und aus Supermarktproben unterscheiden sich signifikant bezgl. des entsprechenden Antibiotikums

\*\* Raten für als sensibel einzustufende Isolate aus landw. Probenmaterial und Supermarktproben unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,05$ ) bezgl. des entsprechenden Antibiotikums

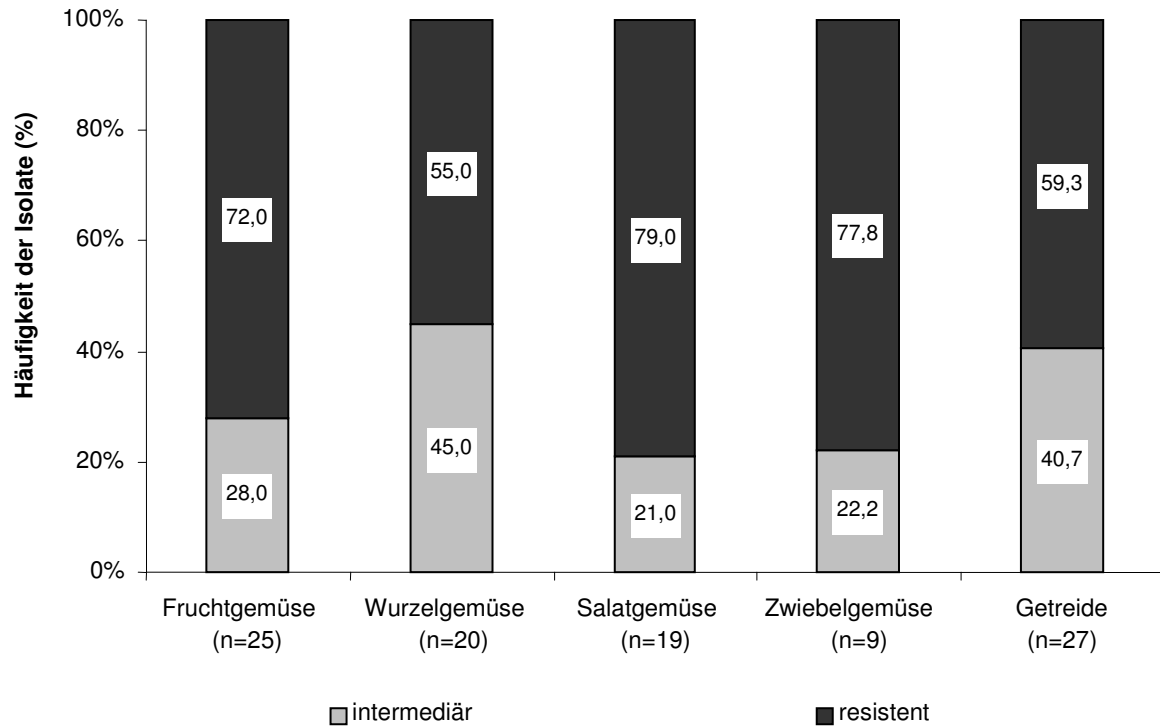
### Einfluss der Vermarktungsstufe auf die Empfindlichkeit und die mittleren MHK-Werte

Bei der Betrachtung der einzelnen Substanzen konnten keine Unterschiede zwischen Isolaten aus landwirtschaftlichem Probenmaterial und solchen aus Supermarktproben bezüglich der Resistenzrate festgestellt werden. Hinsichtlich der MHK-Werte unterschieden sich Isolate aus landwirtschaftlichem Probenmaterial von denen aus Supermärkten nur bei den Fluorchinolonen signifikant.

Bei allen drei Substanzen dieser Wirkstoffklasse (Ciprofloxacin, Enrofloxacin und Moxifloxacin) waren die mittleren MHK-Werte der Isolate aus landwirtschaftlichem Probenmaterial höher als die der Isolate aus Supermarktproben (CIP:  $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  0,10  $\log_2$  Konzentrationsstufen, ENR:  $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  0,11  $\log_2$ , MOX:  $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  0,05  $\log_2$ ). Bei allen anderen Substanzen war eine einheitliche Tendenz zu höheren MHK-Werten bei keiner der beiden Vermarktungsstufen zu erkennen.

#### Einfluss der Matrix auf die Empfindlichkeit

Bei den einzelnen Substanzen waren zunächst keine Unterschiede hinsichtlich der Resistenzrate zwischen den Matrices zu beobachten. Ausnahmen bestanden jedoch bei Rifampicin, Fosfomycin und Erythromycin. Gegenüber Rifampicin verhielten sich signifikant mehr Isolate aus Fruchtgemüse resistent als Isolate aus Wurzelgemüse (48 % vs. 15 %). Darüber hinaus erwiesen sich Isolate aus Zwiebelgemüse (66,6 %) signifikant öfter als unempfindlich gegenüber Rifampicin als Isolate aus Wurzelgemüse (15 %) und Salatgemüse (26,3 %). Gegenüber Fosfomycin waren Unterschiede hinsichtlich der Resistenzraten zwischen Fruchtgemüse (32 %) bzw. Salatgemüse (31,6 %) und Getreide (7,4 %) statistisch abzusichern. Gegenüber Erythromycin unterschieden sich außerdem die Resistenzraten der Isolate aus Salatgemüse (36,8 %) und Wurzelgemüse (10 %) signifikant. Hinsichtlich der Verteilung intermediärer und resistenter Isolate bestanden aufgrund geringer Isolatezahlen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Matrices. Der Anteil intermediärer und resistenter Isolate in der jeweiligen Matrix ist der Vollständigkeit halber dennoch in Abbildung 14 dargestellt. Bei der Betrachtung der Abbildung ist zu berücksichtigen, dass zwar vollständig (gegenüber allen geprüften Substanzen) sensible Isolate nicht auftraten, jedoch Isolate gegenüber den Einzelsubstanzen, z. B. Vancomycin, als sensibel eingestuft werden konnten (vgl. Tabelle 68).



**Abbildung 14: Verteilung intermediärer und resistenter *E. faecalis*-Isolate in unterschiedlichen Matrices pflanzlichen Ursprungs**

„intermediär“ Isolate sind intermediär gegenüber mindestens einem geprüften Antibiotikum, jedoch gegenüber keinem Antibiotikum resistent

„resistent“ Isolate sind gegenüber mindestens einem Antibiotikum resistent

#### Mehrfachresistenzen bei *E. faecalis*

Wie in Tabelle 69 dargestellt, erwiesen sich insgesamt 32 % der Isolate als unempfindlich gegenüber zwei oder mehr Antibiotika. 35 % der Isolate exprimierten Resistenz gegenüber einem Wirkstoff, während 33 % der Isolate keine Resistenz aufwiesen. Hinsichtlich der Verteilung nicht-, einfach- und mehrfachresistenter Isolate und hinsichtlich der Anzahl der Resistenzen waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Vermarktungsstufen festzustellen.

**Tabelle 69: Häufigkeiten nicht-, einfach- und mehrfachresistenter *E. faecalis* (n = 100) isoliert aus pflanzlichen Lebensmitteln unterschiedlicher Vermarktungsstufen**

Vermarktungsstufe	Anzahl Isolate (n)	Anzahl der Resistenzen													
		0		1		2		3		4		5		6-7	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Landw. Betrieb	42	13	31,0	16	38,1	5	11,9	5	11,9	0	0	1	2,4	2	4,8
Supermarkt	58	20	34,5	19	32,8	7	12,1	9	15,5	0	0	3	5,2	0	0
Gesamt	100	33	33,0	35	35,0	12	12,0	14	14,0	0	0,0	4	4,0	2	2,0

### Resistenzprofile

Einfachresistente *E. faecalis*-Isolate erwiesen sich am häufigsten als unempfindlich gegenüber Rifampicin, Fosfomycin oder Doxyzyklin. Bei mehrfachresistenten Isolaten (insbesondere bei Isolaten mit Resistenzen gegen zwei Wirkstoffe) wurde zusätzlich die Resistenz gegenüber Makroliden, hier fast immer gegenüber Erythromycin exprimiert. Auch unempfindliches Verhalten gegenüber Doxyzyklin wurde bei mehrfachresistenten Isolaten häufig beobachtet, wie aus Tabelle 70 hervorgeht. Die Resistenz gegenüber Rifampicin und Fosfomycin trat bei vielen Isolaten gleichzeitig auf. Im Vergleich zu den bereits genannten gramnegativen Bakterienarten fällt bei *E. faecalis* auf, dass Resistenzen gegenüber Wirkstoffen aus mehreren Wirkstoffklassen (bis zu sieben Wirkstoffklassen) vertreten waren, während bei den gramnegativen Isolaten häufig Resistenzen gegen mehrere Wirkstoffe einer Klasse festgestellt wurden.

**Tabelle 70: Verteilung der Mehrfachresistenz sowie dominante phänotypische Resistenzprofile von *E. faecalis* (n = 100) aus pflanzlichen Lebensmitteln**

Anzahl der Resistenzen	Isolate (%)		Häufigstes Resistenzprofil (% der Gesamtisolate)	
	Wirkstoff (n = 21)	Wirkstoffklasse* (n = 13)	Wirkstoff**	Wirkstoffklasse*
0	33	33	-	-
1	35	31	RAM (11) o. FOS (10) o. DOX (10)	RAM (11) oder FOS (10) o. TET (10)
2	12	12	ERY RAM (4) o. FOS RAM (4)	MLD RAM (5) o. FOS RAM (4)
3	14	11	ERY TLS DOX (4)	MLD TET (4)
5	4	4	ERY TSL DOX CMP SNH (2)	MLD TET FEN AGLH (2)
6	1	1	FOS RAM MZL CIP MOX LIZ (1)	FOS RAM PEN FQL LIZ (1)
7	1	1	FOS RAM ERY CIP DOX SXT NFT (1)	FOS RAM MLD FQL TET SUL/TRI NFT (1)

\* Resistenz gegen einen oder mehrere Wirkstoffe aus der genannten Wirkstoffklasse; RAM: Rifampicine, FOS: Fosfomycin, TET: Tetrazykline, MLD: Makrolide, FEN: Fenicole, AGLH: "High level"-Aminoglykoside, FQL: Fluorquinolone, PEN: Penicilline, SUL/TRI: Folatantagonisten, NFT: Nitrofurantoin, LIZ: Linezolid

\*\* Kürzel der Antibiotika siehe Abkürzungsverzeichnis

„oder“ Profile traten in gleichem Umfang auf

### 2.4.2 *E. faecium*

*E. faecium*-Isolate waren überwiegend als intermediär bzw. als resistent gegenüber Fluorchinolonen, Makroliden, Fosfomycin und Rifampicin einzustufen (vgl. Tabelle 71). Glykopeptidresistenzen konnten nicht festgestellt werden, allerdings verhielten sich 3,4 % der Isolate intermediär gegenüber Vancomycin. Gegenüber Gentamicin HL erwiesen sich alle Isolate als sensibel, gegenüber Streptomycin HL waren durchschnittlich 10,2 % der Stämme unempfindlich. Eine reduzierte Sensibilität wurde auch bei Quinupristin-Dalfopristin festgestellt.

So war hier ein Viertel der Isolate als intermediär einzustufen. Die MHK-Werte von *E. faecium* finden sich in Tabelle A 18 im Anhang.

**Tabelle 71: Prozentuale Verteilung sensibel, intermediär und resistent einzustufender *E. faecium*-Isolate (n = 59) aus pflanzlichen Lebensmitteln**

Antibiotikum	Sensibel	Intermediär	Resistent
Amoxicillin/Clavulansäure	100	0	0
Ampicillin	96,7	3,4	0
Chloramphenicol	100	-	0
Ciprofloxacin	40,7	42,4	17,0
Doxyzyklin	84,8	5,1	10,2
Enrofloxacin	1,7	69,4	28,8
Erythromycin	22,1	23,7	54,3
Florfenicol	100	-	0
Fosfomycin	61,0	-	39,0
Gentamicin HL	100	-	0
Linezolid	96,7	1,7	0
Mezlocillin	78,0	15,3	6,8
Moxifloxacin	61,0	28,8	10,2
Nitrofurantoin	77,9	22,1	0
Rifampicin	17,0	6,8	76,3
Streptomycin HL	89,8	-	10,2
Co-Trimoxazol	96,6	1,7	1,7
Quinupristin-Dalfopristin	69,5	27,1	3,4
Teicoplanin	100	0	0
Tylosin	89,9	-	10,2
Vancomycin	96,7	3,4	0

„-“, Intermediärbereich ist nicht definiert

#### Einfluss der Vermarktungsstufe auf die Empfindlichkeit und die mittleren MHK-Werte

Hinsichtlich des Vorkommens von Resistenzen unterschieden sich Isolate aus landwirtschaftlichem Probenmaterial nicht von solchen aus Supermarktproben. Es wurde zwar bei Rifampicin ein Trend zu höheren Resistenzraten bei Isolaten aus Supermärkten (78 % der Isolate) im Vergleich zu denen aus landwirtschaftlichen Proben (69 % der Isolate) beobachtet, der jedoch statistisch nicht abgesichert werden konnte. Die Konzentrationsbereiche der Isolate aus Supermarktproben zeigten tendenziell höhere MHK-Werte als Isolate aus landwirtschaftlichem Probenmaterial, statistisch abgesichert werden konnte diese Beobachtung jedoch nur bei Chloramphenicol (MHK<sub>S</sub> vs. MHK<sub>LW</sub> 0,08 log<sub>2</sub> Konzentrationsstufen).

#### Einfluss der Matrix auf die Empfindlichkeit

Wie bereits erwähnt, wurde bei 55 Isolaten Unempfindlichkeit gegenüber mindestens einem Antibiotikum festgestellt. Da die Isolatezahlen je Matrix gering sind, konnte keine statistisch

absicherbare Aussage zum Matrixeinfluss getroffen werden. Es war jedoch zu beobachten, dass die Hälfte der Isolate mit einer oder mehr Resistenzen aus Getreide isoliert worden war. Zehn unempfindliche Isolate stammten aus Zwiebelgemüse, acht bzw. sieben aus Salat- bzw. Wurzelgemüse. Zwei resistente Isolate waren dem Fruchtgemüse zuzuordnen.

#### Mehrfachresistenzen bei *E. faecium*

42 % der Isolate waren unempfindlich gegenüber zwei und mehr Antibiotika (vgl. Tabelle 72). Bei rund 22 % der Isolate wurde Resistenz gegenüber einem Wirkstoff beobachtet, während nur 7 % der Isolate sich als vollständig sensibel erwiesen. Bezüglich der Verteilung nicht-, einfach- und mehrfachresistenter Isolate waren zwischen den Vermarktungsstufen keine signifikanten Unterschiede zu beobachten. Ebenso trat in keiner der beiden Gruppen eine bestimmte Anzahl an Resistenzen häufiger auf als in der anderen.

**Tabelle 72: Häufigkeiten nicht-, einfach- und mehrfachresistenter *E. faecium*-Isolate (n = 59) aus pflanzlichen Lebensmitteln unterschiedlicher Vermarktungsstufen**

Vermarktungs- stufe	Anzahl Isolate (n)	Anzahl der Resistenzen													
		0		1		2		3		4		5		6-7	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Landw. Betrieb	13	1	7,7	3	23,1	5	38,5	2	15,4	0	0	0	0	2	15,4
Supermarkt	46	3	6,5	10	21,7	14	23,7	8	17,4	2	4,4	4	8,7	5	11,0
Gesamt	59	4	6,8	13	22,0	19	32,2	10	17,0	2	3,4	4	6,8	7	11,9

#### Resistenzprofile

Bei *E. faecium* wurde sowohl bei den einfach- als auch bei den mehrfach-resistenten Isolaten die Resistenz gegenüber Rifampicin am häufigsten beobachtet. Darüber hinaus zeigten sich mehrfachresistente Isolate vor allem unempfindlich gegenüber den Makroliden und gegenüber Fosfomycin. Bei den Makroliden war Erythromycin der dominierende Wirkstoff, während die Tylosinresistenz bei vergleichsweise wenigen Isolaten festgestellt wurde. Fluorchinolonunempfindlichkeit war ebenfalls seltener zu beobachten. Hier traten vor allem Resistenzen gegenüber Ciprofloxacin und Enrofloxacin, weniger gegenüber Moxifloxacin auf. In Tabelle 73 sind die dominanten Resistenzprofile von *E. faecium* dargestellt.

**Tabelle 73: Verteilung der Mehrfachresistenz sowie dominante phänotypische Resistenzprofile von *E. faecium* (n = 59) aus pflanzlichen Lebensmitteln**

Anzahl der Resistenzen	Isolate (%)		Häufigstes Resistenzprofil (% der Gesamtisolate)	
	Wirkstoff (n = 21)	Wirkstoffklasse* (n = 13)	Wirkstoff**	Wirkstoffklasse*
0	6,8	6,8	-	-
1	22,0	13,6	RAM (13,6)	RAM (13,6)
2	32,2	30,5	RAM ERY (20,3)	RAM MLD (20,3)
3	17,0	15,3	RAM FOS ERY (6,8)	RAM FOS MLD (6,8)
4	3,4	3,4	RAM ERY CIP ENR (1,7) o. RAM FOS ERY MZL (1,7)	RAM MLD FQL (1,7) o. RAM FOS MLD PEN (1,7)
5	6,8	6,8	RAM FOS CIP ENR MOX (3,4)	RAM FOS FQL (3,4)
6	1,7	Vgl. Tabelle 74	Vgl. Tabelle 74	Vgl. Tabelle 74
7	10,2	Vgl. Tabelle 74	Vgl. Tabelle 74	Vgl. Tabelle 74

\* Resistenz gegen einen oder mehrere Wirkstoffe aus der genannten Wirkstoffklasse

RAM: Rifampicine, FOS: Fosfomycin, MLD: Makrolide, FQL: Fluorquinolone, PEN: Penicilline, STR: Streptogramine, TET: Tetrazykline, AGLH: "High level"-Aminoglykoside

\*\* Kürzel der Antibiotika siehe Abkürzungsverzeichnis

„oder“ Profile traten in gleichem Umfang auf

In Tabelle 74 sind die Resistenzprofile der sechs- und siebenfach-resistenten *E. faecium*-Isolate dargestellt. Es fällt auf, dass die Isolate aus landwirtschaftlichem Probenmaterial gegenüber überwiegend bzw. ausschließlich in der Humanmedizin angewendeten Antibiotika unempfindlich waren. Fünf Isolate aus Supermarktproben zeigten außerdem gleiche Resistenzprofile, obwohl sie aus unterschiedlichen Supermärkten stammten und zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen wurden.

**Tabelle 74: Resistenzprofile hochmehrfachresistenter *E. faecium*-Isolate aus pflanzlichen Lebensmitteln unterschiedlicher Vermarktungsstufen**

Vermarktungsstufe	n Resistenzen		Häufigstes Resistenzprofil <sup>(b)</sup>
	Wirkstoff	Wirkstoffklassen <sup>(a)</sup>	(Anzahl der Isolate)
Landw. Betrieb	6	5	CIP/MOX/MZL/FOS/RAM/SYN (1)
	7	6	CIP/MOX/MZL/FOS/RAM/SYN/LIZ (1)
Supermarkt	7	6	ERY/TLS/DOX/ENR/FOS/RAM/SNH (5)

<sup>(a)</sup>: Resistenz gegen einen oder mehrere Wirkstoffe aus der genannten Wirkstoffklasse

<sup>(b)</sup>: Kürzel der Antibiotika siehe Abkürzungsverzeichnis

### 2.4.3 „*E. nonfaecium/nonfaecalis*“ (*E. nonfc.*)

Isolate der Gruppe *E. nonfc.* waren vor allem gegenüber Fosfomycin, Erythromycin, Ciprofloxacin und Rifampicin unempfindlich. Gegenüber Enrofloxacin konnte fast allen Isolaten intermediäres Verhalten festgestellt werden, wie aus Tabelle 75 hervorgeht. Bei den gegenüber Vancomycin intermediären Stämmen handelte es sich um erworbene Resistenzen, nicht aber um *E. gallinarum*-Isolate, bei denen natürliche „low level“-Resistenzen gegenüber diesem Antibiotika bestehen. Dennoch ist zu berücksichtigen, dass 53,4 % der Isolate bei Vancomycin eine MHK von 4 µg/ml aufwiesen und sich somit am Breakpoint von „sensibel“ nach „intermediär“ befanden (vgl. Tabelle A 19 im Anhang).

**Tabelle 75: Prozentuale Verteilung sensibel, intermediär und resistent einzustufender *E. nonfc.*-Isolate aus pflanzlichen Lebensmitteln**

Antibiotikum	Gesamt (n = 523)			Landw. Betrieb (n = 168)			Supermarkt (n = 355)		
	s	i	r	s	i	r	s	i	r
Amoxicillin/Clavulansäure	99,8	0,2	0	100	0	0	99,7	0,3	0
Ampicillin	99,8	0,2	0	100	0	0	99,7	0,3	0
Chloramphenicol	99,4	-	0,6	100	-	0	99,2	-	0,9
Ciprofloxacin	30,0	54,1	15,9	27,4	54,2	18,5	31,3	54,1	14,7
Doxyzyklin	95,0	1,7	3,3	96,4	1,8	1,8	94,4	1,7	3,9
Enrofloxacin	1,0	96,4	2,7	1,2	95,2	3,6	0,9	96,9	2,3
Erythromycin	24,1	33,7	42,3	<b>15,5**</b>	<b>31,6</b>	<b>53,0*</b>	<b>28,2**</b>	<b>34,7</b>	<b>37,2*</b>
Florfenicol	100	-	0	100	-	0	100	-	0
Fosfomycin	52,0	-	48,0	57,1	-	42,9	49,6	-	50,4
Gentamicin HL	100	-	0	100	-	0	100	-	0
Imipenem	78,6	14,7	6,7	77,4	13,7	8,9	79,2	15,2	5,6
Linezolid	97,1	2,7	0,2	96,4	3,6	0	97,5	2,3	0,3
Mezlocillin	95,0	4,8	0,2	94,6	5,4	0	95,2	4,5	0,3
Moxifloxacin	97,9	1,3	0,8	<b>97,6</b>	<b>2,4</b>	<b>0</b>	<b>98,0</b>	<b>0,9</b>	<b>1,1</b>
Nitrofurantoin	84,7	14,7	0,6	<b>89,3**</b>	<b>9,5</b>	<b>1,2</b>	<b>82,5**</b>	<b>17,2</b>	<b>0,3</b>
Rifampicin	20,1	34,6	45,3	15,5	37,5	47,0	22,3	33,2	44,5
Streptomycin HL	92,0	-	8,0	<b>85,1**</b>	-	<b>14,9*</b>	<b>95,2**</b>	-	<b>4,8*</b>
Co-Trimoxazol	83,8	6,9	9,4	<b>89,3**</b>	<b>6,0</b>	<b>4,8*</b>	<b>81,1**</b>	<b>7,3</b>	<b>11,6*</b>
Quinupristin-Dalfopristin	22,0	74,0	4,0	<b>19,6</b>	<b>73,8</b>	<b>6,6*</b>	<b>23,1</b>	<b>74,1</b>	<b>2,8*</b>
Teicoplanin	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Tylosin	90,1	-	9,9	<b>85,7**</b>	-	<b>14,3*</b>	<b>92,1**</b>	-	<b>7,9*</b>
Vancomycin	94,8	5,2	0	<b>99,4**</b>	<b>0,6</b>	<b>0</b>	<b>92,7**</b>	<b>7,3</b>	<b>0</b>

s: sensibel, i: intermediär, r: resistent

„-“, Intermediärbereich ist nicht definiert

**Fett:** Verteilungen sensibler, intermediärer und resistenter Isolate aus landw. Probenmaterial und aus Supermarktpuben unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,05$ ) bezgl. des entsprechenden Antibiotikums

\* Raten für als resistent einzustufende Isolate aus landw. Probenmaterial und aus Supermarktpuben unterscheiden sich signifikant bezgl. des entsprechenden Antibiotikums

\*\* Raten für als sensibel einzustufende Isolate aus landw. Probenmaterial und Supermarktpuben unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,05$ ) bezgl. des entsprechenden Antibiotikums



### Einfluss der Vermarktungsstufe auf die Empfindlichkeit und die mittleren MHK-Werte

Bei den meisten Antibiotika unterschieden sich die Resistenzraten der Isolate aus landwirtschaftlichem Probenmaterial von denen der Isolate aus Supermarktproben nicht signifikant. Höhere Resistenzraten bei „landwirtschaftlichen Isolaten“ als bei „Supermarktisolaten“ wurden jedoch bei Erythromycin (53,0 % vs. 37 %), Nitrofurantoin (2,8 % vs. 0,3 %), Streptomycin HL (14,9 % vs. 4,8 %), Quinupristin-Dalfopristin (6,6 % vs. 2,8 %) und Tylosin (14,3 % vs. 7,9 %) statistisch abgesichert. Hingegen war die Resistenzrate bei Co-Trimoxazol bei Isolaten aus Supermarktproben signifikant höher als die der Isolate aus landwirtschaftlichem Probenmaterial (11,3 % vs. 6,4 %). Bei Nitrofurantoin (17,2 % vs. 9,5 %) und Vancomycin (7,3 % vs. 0,6 %) war darüber hinaus die Rate intermediär eingestufte Keime aus Supermarktproben signifikant höher als bei Isolaten aus landwirtschaftlichem Probenmaterial. Hinsichtlich der MHK-Werte zeichnete sich bei keiner der beiden Gruppen eine einheitliche Tendenz ab. Höhere MHK-Werte landwirtschaftlicher Isolate waren bei vielen Substanzen festzustellen. Statistisch abgesichert werden konnte dies jedoch nur für Imipenem (Differenz  $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  0,71  $\log_2$  Konzentrationsstufen), Erythromycin ( $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  0,29  $\log_2$ ), Chloramphenicol ( $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  0,14  $\log_2$ ) und Streptomycin HL ( $MHK_{LW}$  vs.  $MHK_S$  0,08  $\log_2$ ).

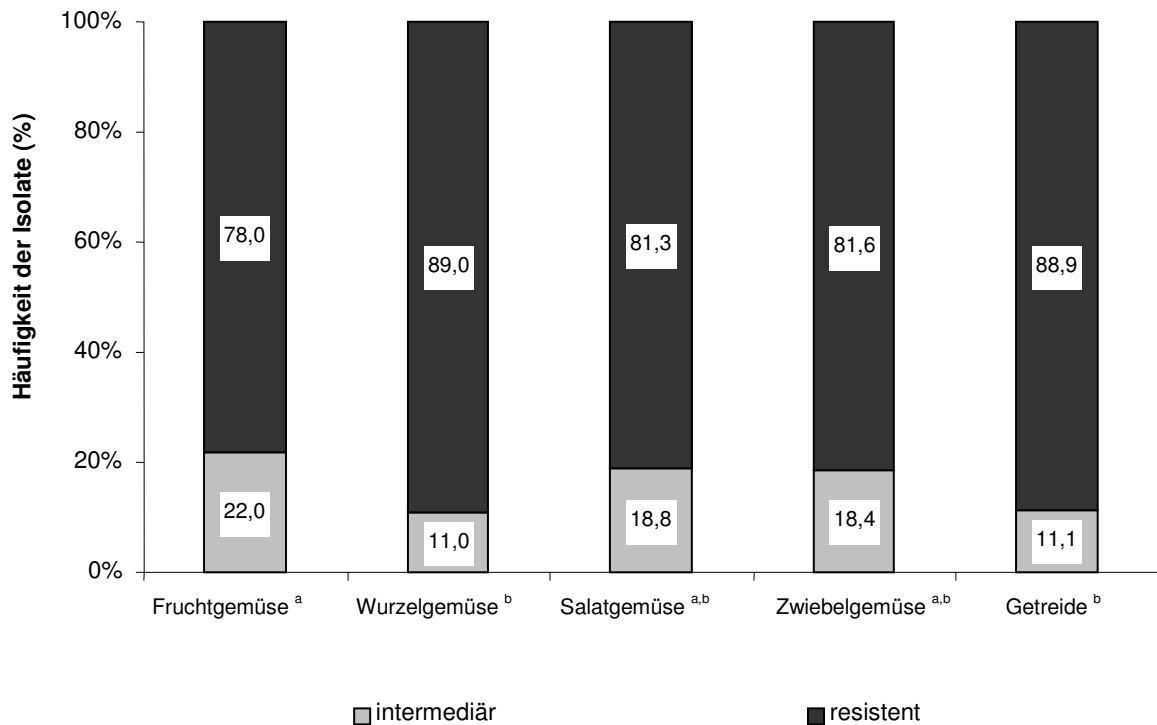
### Einfluss der Matrix auf die Empfindlichkeit

Die Resistenzraten der Isolate aus Fruchtgemüse erwiesen sich bei *E. nonfc.* bei fast allen geprüften Antibiotika geringer als die der Isolate aus anderen Matrices. Ein Trend zu höheren Resistenzraten in einer bestimmten Matrix im Vergleich zu den anderen konnte jedoch nicht beobachtet werden. Während beispielsweise gegenüber Imipenem Isolate aus Getreide signifikant häufiger Resistenzen exprimierten als Isolate aus den übrigen Matrices (21,1 %<sub>G</sub>, 2 %<sub>F</sub>, 5,9 %<sub>W</sub>, 2,3 %<sub>S</sub>, 4,6 %<sub>Z</sub>)<sup>4</sup>, verhielten sich jene gegenüber Ciprofloxacin signifikant seltener unempfindlich als Isolate aus Wurzel-, Salat- und Zwiebelgemüse (10 %<sub>G</sub>, 10 %<sub>F</sub> vs. 20,3 %<sub>W</sub>, 13,3 %<sub>S</sub>, 26,4 %<sub>Z</sub>). Bei folgenden weiteren Antibiotika bestanden signifikante Unterschiede zwischen den Resistenzraten der Isolate aus unterschiedlichen Matrices: Fosfomycin (34,4 %<sub>G</sub> vs. 55,1 %<sub>W</sub>, 49,2 %<sub>S</sub>, 54 %<sub>Z</sub>), Rifampicin (57,6 %<sub>W</sub> vs. 37 %<sub>F</sub>, 43 %<sub>S</sub>, 37,8 %<sub>G</sub>), Streptomycin HL (13,6 %<sub>W</sub> und 11,1 %<sub>G</sub> vs. 5 %<sub>F</sub>, 3,1 %<sub>S</sub>), Co-Trimoxazol (16,1 %<sub>W</sub> und 9,4 %<sub>Z</sub> vs. 2 %<sub>F</sub> und 16,1 %<sub>W</sub> vs. 7,8 %<sub>S</sub> bzw. 6,7 %<sub>G</sub>) und Tylosin (16,7 %<sub>G</sub> vs. 4,7 %<sub>Z</sub>). Aus Abbildung 15 geht hervor, dass sich alle Isolate als intermediär oder resistent erwiesen. Vollständig sensible Isolate konnten nicht festgestellt werden. 78 bis 89 % der Isolate zeigten Resistenz gegenüber mindestens einem Antibiotikum. Signifikante Unterschiede bezüglich der Verteilung intermediärer und resistenter Isolate wurden zwischen Isolaten aus

---

<sup>4</sup> G=Getreide, F=Fruchtgemüse, W=Wurzelgemüse, S=Salatgemüse, Z=Zwiebelgemüse

Fruchtgemüse und Wurzelgemüse bzw. zwischen Isolaten aus Fruchtgemüse und Getreide festgestellt: Bei Isolaten aus Fruchtgemüse wurden signifikant weniger Isolate als resistent eingestuft als Isolate aus Wurzelgemüse und Getreide.



**Abbildung 15: Verteilung intermediärer und resistenter *E. nonfc.*-Isolate in unterschiedlichen Matrices pflanzlichen Ursprungs**

a,b Matrices mit unterschiedlichen Superskripten unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,05$ ) bezügl. der Verteilung sensibler, intermediärer und resistenter Isolate

„intermediär“ Isolate sind intermediär gegenüber mindestens einem geprüften Antibiotikum, jedoch gegenüber keinem Antibiotikum resistent

„resistent“ Isolate sind gegenüber mindestens einem Antibiotikum resistent

### Mehrfachresistenzen bei *E. nonfc.*

Tabelle 76 zeigt die Anzahl der Resistenzen bei *E. nonfc.*. 16 % der getesteten Isolate erwiesen sich gegenüber keinem der geprüften Antibiotika als resistent. 60 % waren gegenüber zwei und mehr Antibiotika resistent, während bei 23 % der Isolate nur eine Resistenz beobachtet wurde. Bei einem Isolat aus einer Supermarktprobe und einem Isolat aus landwirtschaftlichem Probenmaterial wurde eine acht- bzw. eine sechsfache Resistenz festgestellt. Bezüglich der Verteilung nicht-, einfach- und mehrfachresistent einzustufender Isolate waren signifikante Unterschiede zwischen den Vermarktungsstufen feststellbar. So erwiesen sich Isolate aus landwirtschaftlichem Probenmaterial signifikant häufiger als ein- und mehr-

fachresistent – so z. B. bei der Fünffachresistenz - als Isolate aus Supermarktproben. Isolate mit zwei und mehr Resistenzen wurden aus landwirtschaftlichen Proben nicht häufiger isoliert als aus Supermarktproben, es konnte jedoch statistisch abgesichert werden, dass Isolate ohne Resistenz in landwirtschaftlichem Probenmaterial seltener nachzuweisen waren als in Supermarktproben ( $p < 0,01$ ).

**Tabelle 76: Häufigkeiten nicht-, einfach- und mehrfachresistenter *E. nonfc.* (n = 523) isoliert aus pflanzlichen Lebensmitteln unterschiedlicher Vermarktungsstufen**

Vermarktungsstufe	Anzahl Isolate (n)	Anzahl der Resistenzen													
		0		1		2		3		4		5		6-8	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Landw. Betrieb <sup>a</sup>	168	17	<b>10,1*</b>	40	23,8	49	29,2	34	20,2	16	9,5	11	<b>6,6*</b>	1	0,6
Supermarkt <sup>b</sup>	355	68	<b>19,2*</b>	82	23,1	94	26,5	64	18,0	34	9,6	9	<b>2,5*</b>	4	1,1
Gesamt	523	85	16,4	122	23,3	143	27,3	98	18,7	50	9,6	20	3,8	5	1,0

<sup>a,b</sup> Unterschied zwischen den Vermarktungsstufen ist signifikant ( $p < 0,05$ ) bezügl. der Verteilung nicht-, einfach- und mehrfachresistenter Isolate

\* Unterschied zwischen den Vermarktungsstufen ist signifikant ( $p < 0,05$ ) bezügl. der entsprechenden Anzahl der Resistenzen in der jeweiligen Spalte

### Resistenzprofile

Aus Tabelle 77 gehen die häufigsten Resistenzprofile von *E. nonfc.* hervor. Die Resistenz gegenüber den Wirkstoffklassen Rifampicin, Fosfomycin und Makrolide (auch hier vor allem gegen Erythromycin) konnte, wie auch bei *E. faecium* und *E. faecalis* als häufigstes Profil herausgestellt werden. Im Vergleich zu den beiden vorher genannten Spezies fällt jedoch bei den als *E. nonfc.* zusammengefassten Spezies auf, dass hier die Fluorchinolone bei den mehrfachresistenten Isolaten im Resistenzprofil etwas häufiger erscheinen, während Doxzyklinresistenz selten auftritt.

**Tabelle 77: Verteilung der Mehrfachresistenz sowie dominante phänotypische Resistenzprofile von *E. nonfc.* (n = 523) aus pflanzlichen Lebensmitteln**

Anzahl Resistenzen	Isolate (%)		Häufigstes Resistenzprofil (% der Gesamtisolate)	
	Wirkstoff (n = 22)	Wirkstoffklasse* (n = 14)	Wirkstoff**	Wirkstoffklasse*
0	16,3	16,3	-	-
1	23,3	14,9	ERY (7,7) oder FOS (7,1)	MLD (7,8) oder FOS (7,1)
2	27,3	26,8	ERY FOS (7,5) oder FOS RAM (6,3)	FOS MLD (7,7) oder FOS RAM (6,3)
3	18,7	17,8	FOS RAM ERY (4,6)	FOS RAM MLD (5,9)
4	9,6	9,6	FOS RAM CIP SXT (2,5) oder FOS RAM CIP ERY (1,5)	FOS RAM FQL SUL/TRI (2,5) oder FOS RAM FQL MLD (2,1)
5	3,8	3,8	FOS RAM CIP ERY TLS (0,6)	FOS RAM FQL MLD (0,8)
6	0,8	0,8	RAM ERY CIP ENR MOX IMP (0,4)	RAM MLD FQL CBP (0,4)
8	0,2	0,2	RAM ERY CIP ENR MOX DOX SXT SNH (0,2)	RAM MLD FQL TET SUL/TRI AGLH (0,2)

\* Resistenz gegen einen oder mehrere Wirkstoffe aus der genannten Wirkstoffklasse; RAM: Rifampicine, FOS: Fosfomycin, MLD: Makrolide, FQL: Fluorquinolone, PEN: Penicilline, STR: Streptogramine, TET: Tetracykline, AGLH: "HL"-Aminoglykoside; SUL/TRI: Folatantagonisten; CBP: Carbapeneme

\*\* Kürzel der Antibiotika siehe Abkürzungsverzeichnis

„oder“ Profile traten in gleichem Umfang auf

#### 2.4.4 Zusammenfassende Betrachtung der Resistenzeigenschaften von *Enterococcus* spp.

Wie aus Tabelle 78 hervorgeht, waren Enterokokken vor allem gegenüber Fosfomycin, Rifampicin und Erythromycin unempfindlich. Während die Resistenz gegenüber Gentamicin HL nicht festgestellt wurde, bewegte sich diejenige gegenüber Streptomycin HL zwischen 6 und 13 %. Glykopeptidunempfindlichkeiten kamen nicht vor. Doxyzyklinresistenz zeigte sich bei durchschnittlich 7 % der Isolate. Gegenüber dem ausschließlich in der Veterinärmedizin eingesetzten Tylosin waren mehr Isolate aus landwirtschaftlichem Probenmaterial unempfindlich als Isolate aus Supermarktproben, dies konnte jedoch statistisch nicht abgesichert werden.

**Tabelle 78: Prozentuale Verteilung sensibel, intermediär und resistent einzustufender *Enterococcus* spp. aus pflanzlichen Lebensmitteln**

Antibiotikum	Gesamt (n = 682)			Landw. Betrieb (n = 223)			Supermarkt (n = 459)		
	s	i	r	s	i	r	s	i	r
Amoxicillin/Clavulansäure	99,9	0,2	0	100	0	0	99,8	0,2	0
Ampicillin	99,4	0,6	0	99,6	0,5	0	99,4	0,7	0
Chloramphenicol	99,1	-	0,9	99,6	-	0,5	98,9	-	1,1
Ciprofloxacin	38,0	48,1	13,9	35,0	48,9	16,1	39,4	47,7	12,9
Doxyzyklin	90,9	1,9	6,8	92,8	1,4	4,5	90,0	2,2	7,8
Enrofloxacin	1,2	94,3	4,6	0,9	95,5	3,6	1,3	93,7	5,0
Erythromycin	24,1	35,8	40,2	<b>17,0**</b>	<b>36,8</b>	<b>46,2*</b>	<b>27,5**</b>	<b>35,3</b>	<b>37,3*</b>
Florfenicol	100	-	0	100	-	0	100	-	0
Fosfomycin	56,5	-	43,6	60,5	-	39,5	54,5	-	45,5
Gentamicin HL	100	-	0	100	-	0	100	-	0
Imipenem	76,2	17,5	6,3	73,8	18,1	8,1	77,5	17,2	5,3
Linezolid	97,1	2,5	0,4	<b>95,1**</b>	<b>4,0</b>	<b>0,9</b>	<b>98,0**</b>	<b>1,7</b>	<b>0,2</b>
Mezlocillin	94,0	5,1	0,9	93,7	4,9	1,4	94,1	5,2	0,7
Moxifloxacin	94,9	3,5	1,6	95,5	3,1	1,4	94,6	3,7	1,7
Nitrofurantoin	86,1	13,3	0,6	<b>89,7</b>	<b>9,0</b>	<b>1,4</b>	<b>84,3</b>	<b>15,5</b>	<b>0,2</b>
Rifampicin	18,5	35,2	46,3	<b>13,9**</b>	<b>39,0</b>	<b>47,1</b>	<b>20,7**</b>	<b>33,3</b>	<b>46,0</b>
Streptomycin HL	92,1	-	7,9	<b>87,0**</b>	-	<b>13,0*</b>	<b>94,6**</b>	-	<b>5,5*</b>
Co-Trimoxazol	87,0	5,4	7,6	<b>91,5**</b>	<b>4,5</b>	<b>4,0*</b>	<b>84,8**</b>	<b>5,9</b>	<b>9,4*</b>
Quinupristin-Dalfopristin	26,8	69,2	4,0	<b>21,6**</b>	<b>71,3</b>	<b>7,2*</b>	<b>29,2**</b>	<b>68,3</b>	<b>2,5*</b>
Teicoplanin	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Tylosin	90,0	-	10,0	88,3	-	11,7	90,9	-	9,2
Vancomycin	95,8	4,3	0	<b>99,6**</b>	<b>0,5</b>	<b>0</b>	<b>93,9**</b>	<b>6,1</b>	<b>0</b>

s: sensibel, i: intermediär, r: resistent; "-" Intermediärbereich ist nicht definiert

**Fett:** Verteilungen sensibler, intermediärer und resistenter Isolate aus landw. Probenmaterial und aus Supermarktproben unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,05$ ) bezgl. des entsprechenden Antibiotikums

\* Raten für als resistent einzustufende Isolate aus landw. Probenmaterial und aus Supermarktproben unterscheiden sich signifikant bezgl. des entsprechenden Antibiotikums

\*\* Raten für als sensibel einzustufende Isolate aus landw. Probenmaterial und Supermarktproben unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,05$ ) bezgl. des entsprechenden Antibiotikums

### Einfluss der Vermarktungsstufe auf die Empfindlichkeit

Gemäß Tabelle 78 war eine einheitliche Tendenz zu höheren Resistenzraten bei keiner der beiden Vermarktungsstufen erkennbar. Eine Ausnahme bildeten Erythromycin, Linezolid, Rifampicin, Streptomycin HL und Quinupristin-Dalfopristin. Bei diesen Substanzen waren signifikant mehr Isolate aus landwirtschaftlichem Probenmaterial als aus Supermarktproben resistent oder intermediär. Hingegen wurden bei Nitrofurantoin, Co-Trimoxazol und Vancomycin signifikant höhere Intermediär- bzw. Resistenzraten bei Isolaten aus Supermarktproben als bei solchen aus landwirtschaftlichem Probenmaterial beobachtet.

Hinsichtlich des Vorkommens von Resistenzen gegenüber zwei und mehr Antibiotika konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Isolaten aus landwirtschaftlichem Probenmaterial und solchen aus Supermarktproben festgestellt werden ( $p = 0,412$ ). Die mittleren MHK-Werte beider Gruppen unterschieden sich ebenfalls nicht signifikant.

#### Einfluss der Matrix auf die Empfindlichkeit

Wenngleich Isolate aus Fruchtgemüse bei *Enterococcus* spp. deutlich weniger Resistenzen gegenüber mindestens einem Antibiotikum (77 % der Isolate) exprimierten als Isolate aus Salatgemüse (82 %), Zwiebelgemüse (82 %), Wurzelgemüse (84 %) und Getreide (84 %), konnte dieser Unterschied statistisch nicht abgesichert werden ( $p = 0,545$ ). Resistenzen gegenüber zwei und mehr Antibiotika waren bei Isolaten aus Fruchtgemüse (45 %) hingegen signifikant weniger festgestellt worden als bei Isolaten aus Getreide, Salat, Zwiebelgemüse und Wurzelgemüse (57 %<sub>G</sub>, 56 %<sub>S</sub>, 65 %<sub>Z</sub>, 63 %<sub>W</sub>;  $p = 0,023$ )<sup>5</sup>.

#### Unterschiede zwischen den Spezies

Hinsichtlich des Auftretens von einer oder mehr Resistenzen unterschieden sich die Spezies bzw. als Gruppe zusammengefassten Spezies (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. nonfc.*) signifikant ( $p < 0,001$ ). So exprimierten 65 % der *E. faecalis*-Isolate Resistenz (gegenüber mindestens einem Antibiotikum), während bei den anderen Gruppen die Resistenzrate mit jeweils 89 % deutlich höher lag. Auch hinsichtlich des Vorkommens von Mehrfachresistenzen waren Unterschiede statistisch abzusichern. Bei *E. faecalis* erwiesen sich 26 % der Isolate als „mehrfachresistent“. Demgegenüber waren es bei *E. faecium* 42 % und bei *E. nonfc.* 67 % ( $p < 0,001$ ).

### **2.4.5 Abschließende zusammenfassende Betrachtung der phänotypischen Resistenzergebnisse**

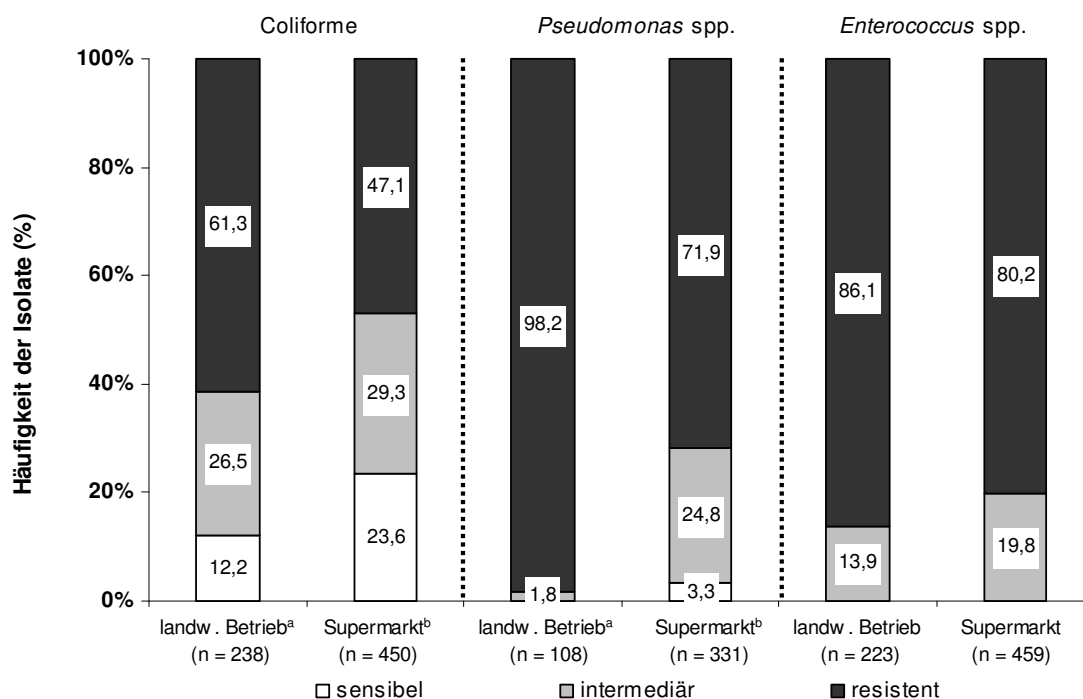
Insgesamt waren Pseudomonaden und Enterokokken die Bakterienarten, bei denen Resistenzen am häufigsten zu beobachten waren. Bezogen auf die Gesamtzahl aller resistenzgetesteten Isolate waren mehr Isolate aus landwirtschaftlichem Probenmaterial als aus Supermarktproben resistent gegenüber mindestens einem Antibiotikum ( $p < 0,001$ ). Als vollständig sensibel erwiesen sich 5 % der Isolate aus landwirtschaftlichem Probenmaterial gegenüber 9 % der Isolate aus Supermarktproben. Es ist jedoch zu erwähnen, dass eine Vielzahl gramnegativer Bakterien mit nur einer Resistenz vor allem gegenüber Spectinomycin – einem Antibiotikum, das in der Regel nur zur Behandlung von *Neisseria gonorrhoeae* angewendet wird – unempfindlich waren. Desweiteren ist zu berücksichtigen, dass der Anteil der Gattungen bzw. der einzelnen Spezies an der Gesamtzahl aller getesteten Isolate unterschiedlich war.

---

<sup>5</sup> G=Getreide, S=Salatgemüse, Z=Zwiebelgemüse, W=Wurzelgemüse

Somit ist der hohe Anteil der resistenten Isolate überwiegend durch die in höherem Maße resistenten Pseudomonaden und Enterokokken, weniger durch die in geringerem Maße resistenten coliformen Bakterien bestimmt.

Bei der Betrachtung der einzelnen Bakterienarten waren signifikante Unterschiede zwischen Isolaten aus landwirtschaftlichem Probenmaterial und solchen aus Supermarktpuben vor allem bei den coliformen Bakterien sowie bei *Pseudomonas* spp. zu erkennen (vgl. Tabellen 57 und 67 und Abbildung 16). Gegenüber vielen Substanzen, insbesondere gegenüber Spectinomycin, verhielten sich signifikant mehr Isolate aus landwirtschaftlichem Probenmaterial als aus Supermarktpuben als unempfindlich. Häufig wurde dies auch bezüglich der Mehrfachresistenzen beobachtet. Zu berücksichtigen ist dabei, dass bezüglich des Anteils der einzelnen Spezies in beiden Vermarktungsstufen - mit Ausnahme von *Pantoea agglomerans* und *P. fluorescens* - keine signifikanten Unterschiede festzustellen waren. Bei *Enterococcus* spp. war hinsichtlich des Vorkommens von Resistenzen zwar eine Tendenz zu mehr Resistenzen bei Isolaten aus landwirtschaftlichem Probenmaterial als bei solchen aus Supermarktpuben erkennbar, diese ließ sich jedoch statistisch nicht absichern.



**Abbildung 16: Anteil sensibler, intermediärer und resistenter Bakterien aus pflanzlichen Lebensmitteln unterschiedlicher Vermarktungsstufen**

<sup>a,b</sup> Isolate aus landw. Probenmaterial und solche aus Supermarktpuben unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,05$ ) bezügl. der Verteilung sensibler, intermediärer und resistenter Isolate innerhalb der entsprechenden Bakterienart

„sensibel“: Isolate sind sensibel gegenüber allen geprüften Antibiotika

„intermediär“: Isolate sind intermediär gegenüber mindestens einem Antibiotikum, jedoch gegenüber keinem Antibiotikum resistent

„resistent“: Isolate sind resistent gegenüber mindestens einem Antibiotikum

### Einfluss der Vermarktungsstufe auf das Vorkommen von Mehrfachresistenzen

Aus landwirtschaftlichem Probenmaterial isolierte Bakterien wiesen vor allem bei den coliformen Keimen und bei *Pseudomonas* spp. oftmals signifikant häufiger Mehrfachresistenzen auf als Isolate aus Supermarktproben. Hingegen konnte dies bei den Enterokokken nicht beobachtet werden. Eine Ausnahme stellten bei den Enterokokken die als „*E. nonfc.*“ zusammengefassten Spezies dar. So waren Isolate aus landwirtschaftlichem Probenmaterial signifikant häufiger gegenüber mindestens einem Antibiotikum unempfindlich als Isolate aus Supermärkten. Ebenso wiesen landwirtschaftliche Isolate signifikant mehr eine Vierfachresistenz auf als Supermarktisolate (vgl. Tabelle 76).

### Einfluss der Matrix auf die Empfindlichkeit

Während resistente coliforme Bakterien und *Pseudomonas* spp. aus Fruchtgemüse in vielen Fällen signifikant häufiger isoliert werden konnten als aus den anderen Matrices (vgl. Abschnitt D 2.2 und D 2.3), konnte bei *Enterococcus* spp. keine statistisch abgesicherte Aussage über die Häufigkeit von Resistenzen bei einer bestimmten Matrix getroffen werden ( $p = 0,070$ ). Eine Ausnahme stellte auch hier wieder die Gruppe der als „*E. nonfc.*“ zusammengefassten Spezies dar: Hier waren resistente Isolate am häufigsten aus Getreide zu isolieren (vgl. Abbildung 15)

### Einfluss der Matrix auf das Auftreten von Mehrfachresistenzen

Während bei den coliformen Bakterien und bei *Pseudomonas* spp. signifikant mehr Isolate aus Fruchtgemüse als aus anderen Matrices Resistenzen gegenüber zwei und mehr Antibiotika zeigten, waren es bei *Enterococcus* spp. signifikant weniger Isolate aus Fruchtgemüse. Bei der Gesamtbetrachtung aller Bakterienisolate konnte keine statistisch abgesicherte Aussage über den Einfluss der Matrix auf das Vorkommen von Resistenzen gegenüber zwei und mehr Antibiotika getroffen werden.



### **3 Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen**

#### **3.1 Methodvalidierung**

##### **3.1.1 Qualitativer Nachweis von Tetrazyklin-Resistenzgenen aus Bakterienisolaten**

Die Methode von AMINOV ET AL. (2001) war zunächst an den LightCycler<sup>®</sup> anzupassen. Als Methodenkontrolle erfolgte, wie bei HÖLZEL (2006) beschrieben, zunächst die DNA-Extraktion aus bakteriellem Kulturmaterial, um die störenden Matrixeffekte auszuschließen. Mittels Realtime-PCR wurden die Tetrazyklinresistenzgene *tet(M)*, *tet(O)* und *tet(B)* der von HÖLZEL (2006) aus Gülle isolierten Gattungen *Enterococcus faecalis* und *E. faecium* für *tet(M)* und *tet(O)* sowie *E. coli* und *Salmonella* für *tet(B)* nachgewiesen. Die produzierten Amplifikate wurden durch externe Sequenzierung, wie bei HÖLZEL (2006) beschrieben, bestätigt.

###### *tet(M)*

Bei allen 21 tetrazyklinresistenten *Enterococcus*-Isolaten aus der Untersuchung von HÖLZEL (2006) führte die LightCycler<sup>®</sup>-Amplifizierung zu einem in der Schmelzkurvenanalyse zum Referenzstamm *Bacillus* R89 identischen Amplifikat.

###### *tet(O)*

Aus fünf der sechs *E. faecium*- und neun der 15 *E. faecalis*-Isolate von HÖLZEL (2006) wurde mittels Realtime PCR ein Amplifikat mit einheitlicher Schmelzkurve und einer Zielgröße von 171 Basenpaaren entsprechenden Größe gewonnen. Die externe Sequenzierung ergab 100 % Identität zu mehreren in der Genbank gespeicherten *tet(O)*-Gensequenzen (HÖLZEL, 2006).

###### *tet(B)*

Bei drei der fünf *E. coli*-Isolate und bei allen 13 *Salmonella*-Isolaten der Untersuchung von HÖLZEL (2006) ergab die Amplifizierung im LightCycler<sup>®</sup> eine identische Schmelzkurve. Die Sequenzierung ergab 100 % Identität zu den in der Genbank für *tet(B)* aufgeführten genetischen Elementen (HÖLZEL, 2006).

##### **3.1.2 Validierung des Nachweises von *tet(M)*-Genen in pflanzlichem Probenmaterial**

Zur orientierenden Quantifizierung von *tet(M)*, *tet(O)* und *tet(B)* und damit zur Herstellung eines Standards, wurden DNA-freie Pflanzenproben artifiziell mit *tet(M)*, *tet(O)* und *tet(B)* kontaminiert. DNA-freie Proben wurden zuvor durch Cobalt<sub>60</sub>-Bestrahlung, wie unter C 2.5.4 beschrieben, gewonnen. Als Standard wurden *Bacillus* R89 für *tet(M)*, *E. faecalis* 3952 für

*tet(O)* und *E. coli* 2628 für *tet(B)* verwendet. *Tet(O)* und *tet(B)* liegen in den Bakterien in mehrfacher Kopie vor, so dass die Herstellung eines Standards mit dotiertem Pflanzenmaterial orientierenden Charakter für die Quantifizierung besitzt.

Nach der Bestrahlung der Proben mit 409 kGy in Anlehnung an die Methode von HÖLZEL (2006) war in den Pflanzenproben zunächst kein *tet(M)*-Produkt mehr nachweisbar. Die Untersuchung der Extraktionsleerwerte ergab jedoch teilweise ein *tet(M)*-PCR-Produkt von  $1,1 \log_{10}$  copies im Aliquot. Bei *tet(B)* lag der mittlere Gehalt bei  $1,8 \log_{10}$  copies im Aliquot. Die mittleren Gehalte des untersuchten Probenmaterials und der Extraktionsleerwerte unterschieden sich signifikant. Es konnte nicht abschließend geklärt werden, ob eine Kontamination erst während des Extraktionsprozesses eingetreten war oder ob die verwendeten Säulen mit *tet(M)* bereits vor der Verwendung kontaminiert waren. WILSON (1997) beschreibt Kontaminationen der Zentrifugenröhrchen bzw. der Säulen bei unterschiedlichen Extraktionskits. Zur Abklärung dieser Problematik wurden auch die Zentrifugenröhrchen und Säulen im Institut für Radiochemie, wie bereits unter C 2.5.4 für das pflanzliche Probenmaterial beschrieben, bestrahlt, um DNA-freies Material zu bekommen. Der Vergleich des „bestrahlten Materials“ mit „unbestrahlten“ Säulen und Zentrifugenröhrchen ergab wiederum eine Kontamination des unbestrahlten Materials bis zu  $1,0 \log_{10}$  copies im Aliquot, während in den „bestrahlten Säulen“ keine *tet*-Gene mehr nachzuweisen waren. Auch eine regelmäßige Reinigung des Labors mit Wasserstoffperoxid brachte keinen Erfolg.

Um daher Konflikte mit eventuell vorhandener Kreuzkontamination zu vermeiden, wurde ein „Cut off“ bei  $2,0 \log_{10}$  copies je PCR-Aliquot für *tet(M)* und  $2,4 \log_{10}$  copies je PCR-Aliquot für *tet(B)* gesetzt. Der „Cut off“ für *tet(M)* und *tet(B)* wurde, wie bei HÖLZEL (2006) beschrieben, nach folgender Gleichung berechnet: Mittelwert (der positiven Extraktionsleerwerte) + 3 x Standardabweichung. Für *tet(O)* wurden keine positiven Extraktionsleerwerte festgestellt.

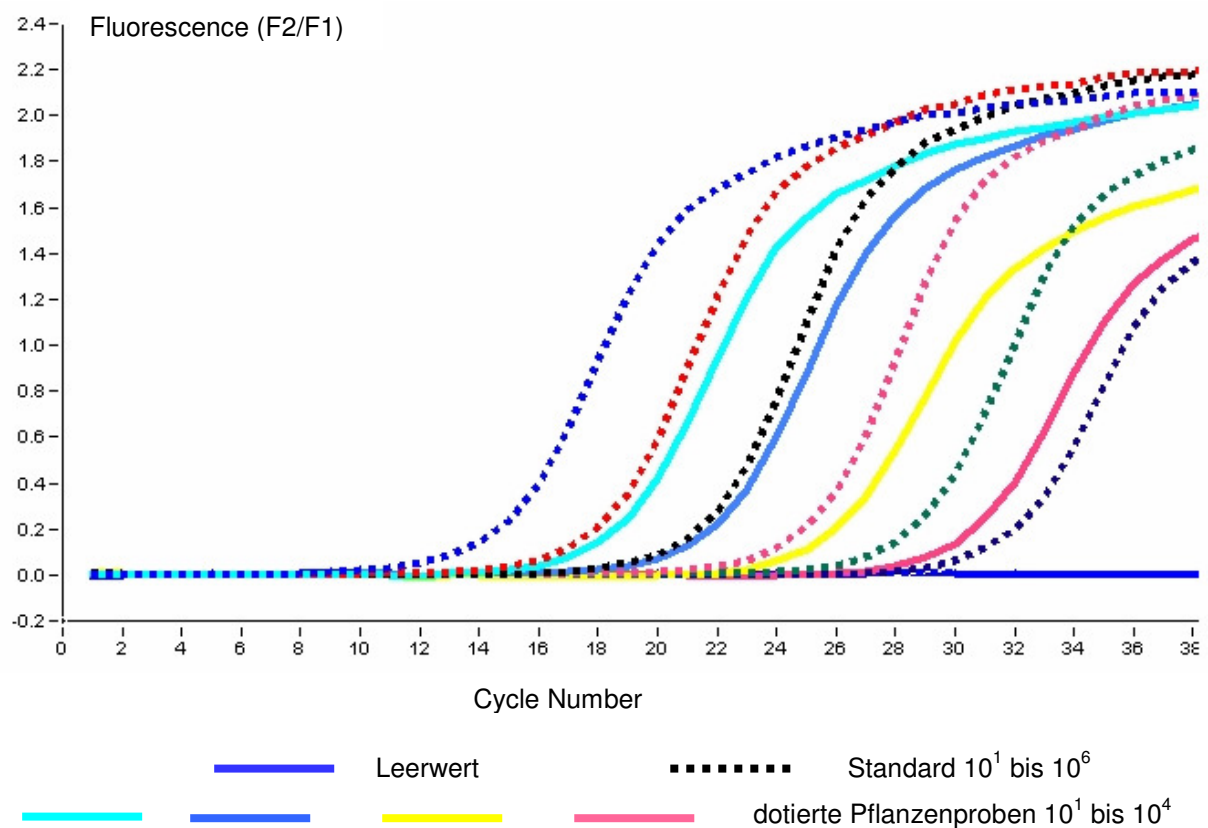
#### Ermittlung der Wiederfindungsrate für *tet(M)*

*Bacillus* R89 trägt, wie bereits erwähnt, in jeder Zelle nur eine Kopie von *tet(M)*, so dass *tet(M)* zur Ermittlung der Wiederfindungsrate in dotiertem Pflanzenmaterial herangezogen wurde. Die im Dotierungsversuch für *tet(M)* ermittelten Wiederfindungsraten in den jeweiligen Konzentrationsbereichen sind Tabelle 79 zu entnehmen. Daraus wird ersichtlich, dass bei Salatgemüse und Wurzelgemüse teilweise eine stärkere Inhibition der PCR als bei den übrigen Matrices zu beobachten war. So betrug die mittlere Wiederfindungsrate bei Wurzelgemüse beispielsweise 20 %, während bei Fruchtgemüse durchschnittlich 51 % des inokulierten Keimmaterials detektiert wurden. Desweiteren waren die Wiederfindungsraten innerhalb einer Matrix teilweise weit gestreut. So reichten sie z. B. bei Getreide von 18 % bis 57 %.

**Tabelle 79: Wiederfindungsraten (%) für *tet(M)*-Gene aus *Bacillus* R89 in pflanzlichen Lebensmitteln (drei Wiederholungen)**

Matrix	Verhältnis Keimsuspension : Probe	mittlere Wiederfindung [% (SD)]	Wiederfindung [% (SD)]			
			10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>
Fruchtgemüse	1 : 10	51,2 (3,2)	56,9 (50,8)	49,7 (42,9)	53,9 (55,6)	50,9 (53,1)
Wurzelgemüse	1 : 10	20,3 (5,5)	14,5 (25,2)	26,0 (32,1)	15,6 (14,1)	15,2 (19,1)
Salatgemüse	1 : 10	28,3 (23,0)	59,0 (68,8)	20,5 (10,8)	4,3 (2,4)	29,3 (44,9)
Zwiebelgemüse	1 : 10	29,4 (5,5)	27,2 (32,8)	35,9 (26,3)	23,2 (17,3)	31,3 (29,2)
Getreide	1 : 10	43,1 (17,5)	18,2 (13,4)	57,9 (49,9)	44,4 (51,7)	51,9 (56,6)

Abbildung 17 stellt die Amplifikate der mittels E.Z.N.A. Bacterial Kit extrahierten dotierten Pflanzenproben im Konzentrationsbereich 10<sup>4</sup> bis 10<sup>1</sup> einer Wiederholung und den Standard im Konzentrationsbereich von 10<sup>6</sup> bis 10<sup>1</sup> dar.



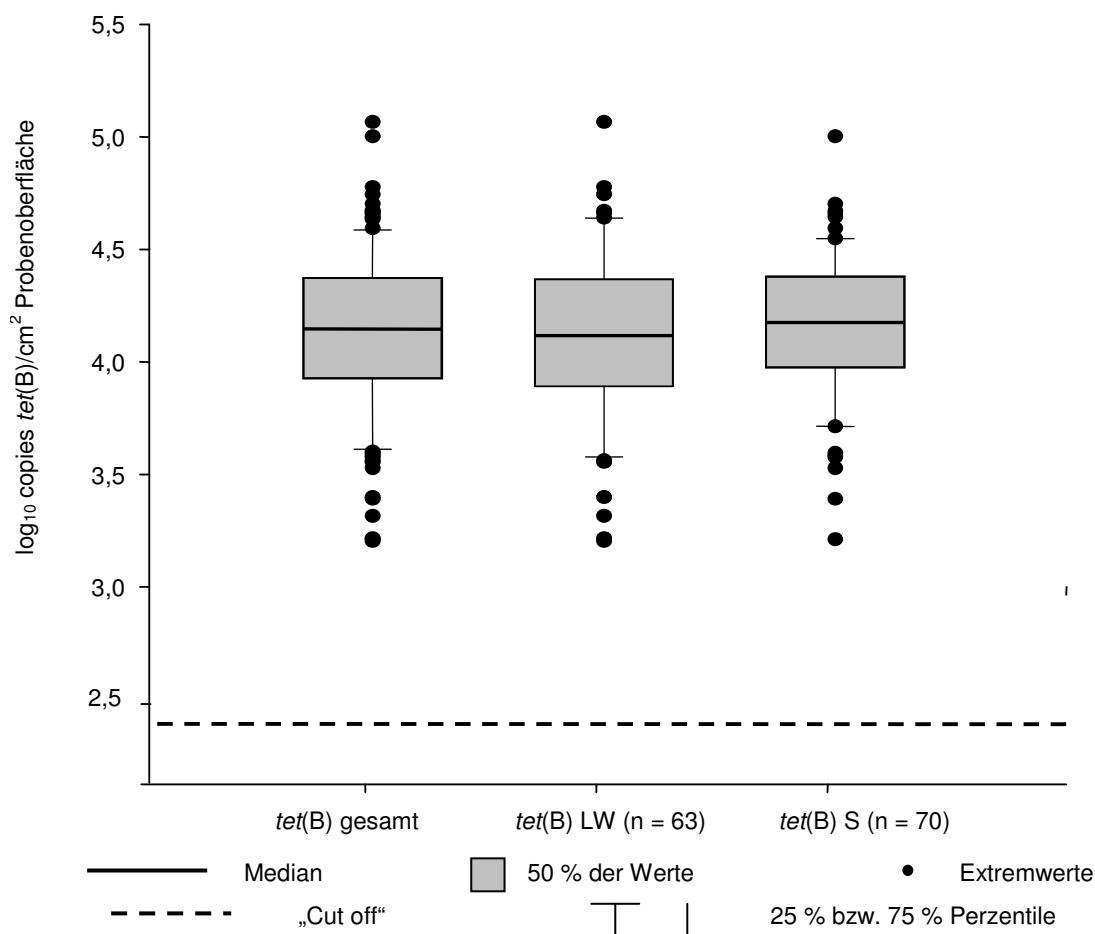
**Abbildung 17: PCR-Amplifikat von *tet(M)*, Standard und dotierte Pflanzenproben**

## 3.2 Resultate der Feldproben

In den Abbildungen 18 bis 20 sind die Gehalte der einzelnen *tet*-Gene aufgeführt, unterteilt nach Proben aus landwirtschaftlichen Betrieben und solchen aus Supermärkten. Die Gehalte an *tet*(B) waren zwar insgesamt höher als die der Gene *tet*(M) und *tet*(O) (4,1 vs. jeweils 3,0  $\log_{10}$  copies je  $\text{cm}^2$  Probe), statistisch konnte dies jedoch nicht abgesichert werden.

### 3.2.1 *tet*(B)

In 168 Proben (55,8 %) wurden keine *tet*(B)-Gehalte festgestellt. Keine der positiven Proben fiel unter den oben beschriebenen „Cut off“. Je  $\text{cm}^2$  Probenoberfläche wurden durchschnittlich 4,1  $\log_{10}$  copies *tet*(B) festgestellt (vgl. Abbildung 19). Proben aus unterschiedlichen Vermarktungsstufen unterschieden sich nicht hinsichtlich der Kopienzahl von *tet*(B). Hingegen waren Unterschiede bezüglich des Anteils der Proben, in denen *tet*(B) detektiert wurde, signifikant ( $p < 0,001$ ). So war in 62,4 % des landwirtschaftlichen Probenmaterials gegenüber 35 % der Supermarktproben *tet*(B) festzustellen.

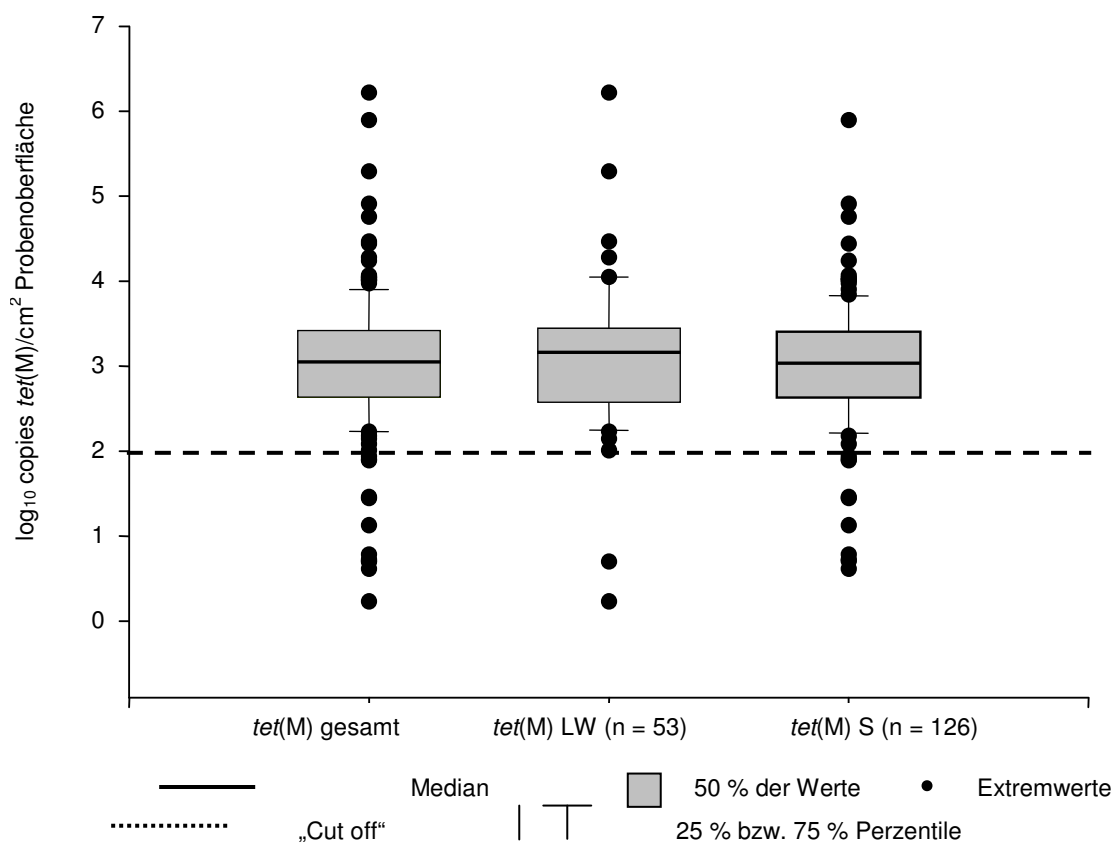


**Abbildung 18: *tet*(B)-Gehalte je  $\text{cm}^2$  Oberfläche in Probenmaterial unterschiedlicher Vermarktungsstufen**

LW: Proben aus landwirtschaftlichen Betrieben; S: Proben aus Supermärkten

### 3.2.2 *tet*(M)

Insgesamt wurden 301 Proben hinsichtlich des *tet*(M)-Gehalts untersucht. In 40,5 % der Proben ( $n = 122$ ) konnten keine *tet*(M)-Gehalte festgestellt werden. In 13 Proben bewegten sich die *tet*(M)-Gehalte in einem Bereich bis zu  $2,0 \log_{10}$  copies je Aliquot und fielen damit in den Bereich des „Cut off“. Die *tet*(M)-Gehalte der 179 positiven Feldproben betrug durchschnittlich  $3,0 \log_{10}$  copies je  $\text{cm}^2$  Probenoberfläche, wie in Abbildung 20 dargestellt ist. Proben aus landwirtschaftlichen Betrieben und solche aus Supermärkten unterschieden sich hinsichtlich der Detektion von *tet*(M) nicht ( $p = 0,571$ ).



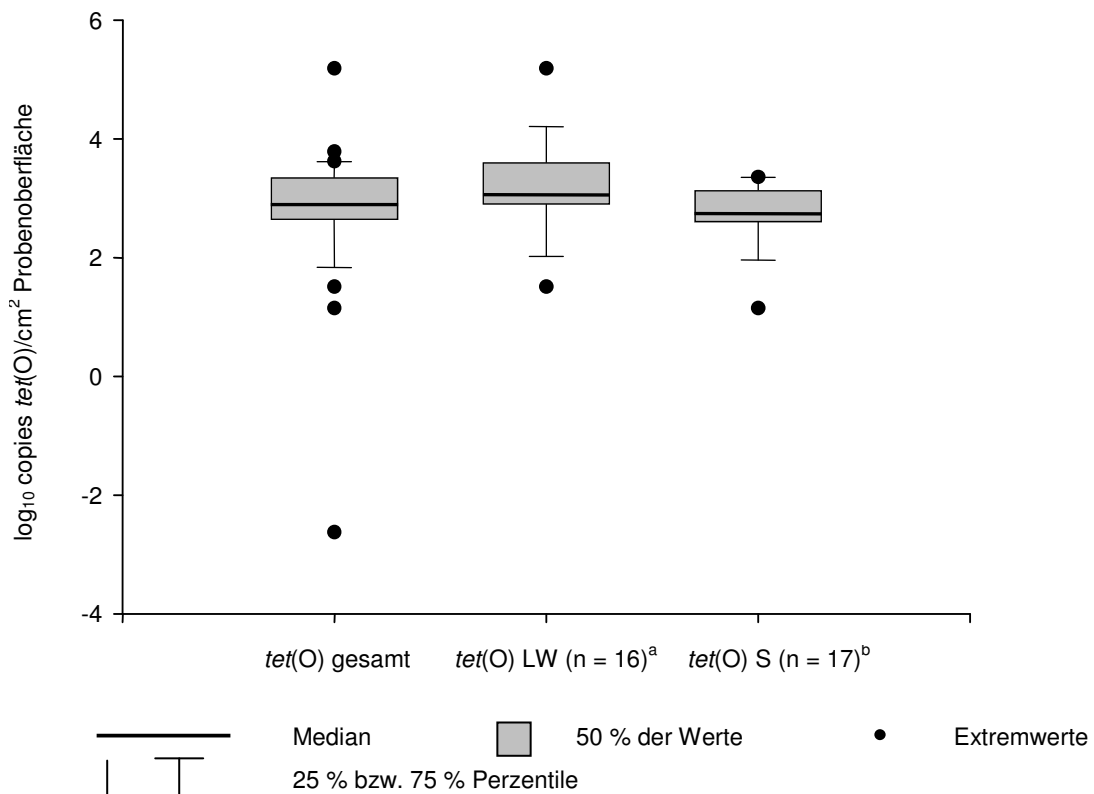
**Abbildung 19: *tet*(M)-Gehalte je  $\text{cm}^2$  Oberfläche in Probenmaterial unterschiedlicher Vermarktungsstufen**

LW: Proben aus landwirtschaftlichen Betrieben; S: Proben aus Supermärkten

### 3.2.3 *tet*(O)

Da die Extraktionsleerwerte für *tet*(O) stets negativ waren, war hier kein „Cut off“ zu berücksichtigen. Aus 11 % der Proben ( $n = 33$ ) wurde *tet*(O) isoliert. Die Feldproben enthielten durchschnittlich  $3,0 \log_{10}$  copies je  $\text{cm}^2$  Probenoberfläche. Zwischen Proben aus landwirtschaftlichen Betrieben und solchen aus Supermärkten waren signifikante Unterschiede hinsichtlich des *tet*(O)-Gehalts festzustellen ( $t$ -Test:  $p = 0,044$ ). Hier waren in landwirtschaftli-

chem Probenmaterial signifikant höhere Gehalte an *tet(O)* festgestellt worden als in Supermarktproben (3,2 vs. 2,7  $\log_{10}$  copies je  $\text{cm}^2$  Probenoberfläche, vgl. Abb. 21). Bezüglich des Nachweises *tet(O)*-positiver Proben waren ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen den Vermarktungsstufen festzustellen. So wurden in 15,8 % der Proben aus landwirtschaftlichen Betrieben gegenüber 8,5 % der Proben aus Supermärkten *tet(O)* detektiert ( $p = 0,004$ ).



**Abbildung 20: *tet(O)*-Gehalte je  $\text{cm}^2$  Oberfläche in Probenmaterial unterschiedlicher Vermarktungsstufen**

<sup>a,b</sup> Zahlen mit unterschiedlichen Superskripten unterscheiden sich signifikant ( $p = 0,044$ ) bezügl. der Kopienzahl; LW: Proben aus landwirtschaftlichen Betrieben, S: Proben aus Supermärkten

Unterschiede zwischen den Matrices hinsichtlich der Kopien wurden für alle drei Gene festgestellt. So waren die Gehalte an *tet(M)* in Zwiebelgemüse (3,5  $\log_{10}$  copies) und Getreide (3,2  $\log_{10}$ ) signifikant höher als in den anderen Matrices (F: 2,8  $\log_{10}$ , W: 2,7  $\log_{10}$ , S: 2,9  $\log_{10}$ ). Die Gehalte an *tet(B)* waren in Wurzelgemüse (3,9  $\log_{10}$ ) und Salatgemüse (4,0  $\log_{10}$ ) signifikant niedriger als in Fruchtgemüse (4,3  $\log_{10}$ ), Zwiebelgemüse (4,2  $\log_{10}$ ) und Getreide (4,2  $\log_{10}$ ). Bei *tet(O)* wurde ein Unterschied nur für Getreide und Salatgemüse abgesichert (G: 3,3  $\log_{10}$  vs. S: 1,9  $\log_{10}$ ).

## E Diskussion

Die vorliegende Untersuchung liefert Informationen zum Vorkommen von antibiotikaresistenten Bakterien und Tetracyclinresistenzgenen in Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft. Insgesamt wurden 1001 Proben aus Supermärkten und von landwirtschaftlichen Betrieben in Bayern hinsichtlich des Vorkommens von Bakterienarten, die im Resistenzgeschehen eine bedeutende Rolle spielen, untersucht. 1854 Isolate wurden einer Empfindlichkeitsprüfung gegenüber 29 bzw. 30 Antibiotika unterzogen. 301 Gemüseproben wurden zudem mittels Realtime-PCR auf das Vorkommen der Tetracyclinresistenzgene *tet(B)*, *tet(M)* und *tet(O)* untersucht.

Die Motivation dieser Erhebung bei Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft liegt in der Bedeutung der Antibiotikaresistenzentwicklung für die Humanmedizin. Zunehmende Resistenzen bei humanpathogenen Bakterien auch gegenüber Reserveantibiotika (REINERT ET AL., 1999; GENARS, 2004) und hohe Resistenzraten bei Isolaten aus Lebensmitteln tierischer Herkunft (FRANZ ET AL., 2001; DANMAP, 2004; HUYS ET AL., 2004) warfen die Frage auf, ob auch Lebensmittel pflanzlicher Herkunft als Reservoir und Überträger antibiotikaresistenter Bakterien fungieren.

Die Ergebnisse der oben beschriebenen Untersuchungen werden unter Berücksichtigung der angewandten Methoden in der folgenden Diskussion mit Resistenzdaten von Isolaten aus pflanzlichen und tierischen Lebensmitteln, Gülle und Bodenproben und aus klinischem Untersuchungsmaterial verglichen, um die Bedeutung hinsichtlich einer Übertragung resistenter Bakterien durch das pflanzliche Lebensmittel einordnen zu können.

Beim Vergleich mit den Daten der GENARS-Studie (2004) und den Daten weiterer Empfindlichkeitsprüfungen klinischer Isolate muss berücksichtigt werden, dass es sich hierbei in der Regel um vorselektiertes Untersuchungsmaterial handelt.

### 1 Resistenzrelevante Bakterien in pflanzlichen Lebensmitteln

Aus Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft waren - unter den für ein Resistenzmonitoring bedeutenden Bakterien - vor allem fakultativ pathogene, ubiquitär vorkommende Bakterienarten zu isolieren. Bei den coliformen Bakterien dominierten vor allem *Enterobacter* spp. (68 %) und *Pantoea* spp. (14 %), während *Serratia* spp., *Klebsiella* spp. und *Rahnella* spp. deutlich seltener (6 %, 5 % bzw. 3 %) und *Hafnia* spp., *Kluyvera* spp., *Citrobacter* spp., *Yersinia* spp., *Ewingella* spp. und *Leclercia* spp. nur vereinzelt isoliert worden waren. Die phytopathogene Bakterienart *Erwinia amylovora* wurde nicht isoliert. Auch ÖSTERBLAD ET AL. (1999) und BOEHME ET AL. (2004) isolierten aus pflanzlichen Lebensmitteln am häufigsten - jedoch in geringeren Raten als in der vorliegenden Untersuchung - *Enterobacter* spp. (28 % bzw. 27 %).

Der Anteil von *Klebsiella* spp. und *Citrobacter* spp. war hingegen sowohl bei ÖSTERBLAD ET AL. (1999) als auch bei BOEHME ET AL. (2004) deutlich höher als in der vorliegenden Untersuchung (14 % bzw. 23 % vs. 5 %; 10 % bzw. 24 % vs. 0,6 %), während HAMILTON-MILLER UND SHAH (2001) diese Gattungen nicht isolierten. *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp. und *Serratia* spp. gehören zur Mikroflora der Pflanzen (WRIGHT ET AL., 1976; MANDRELL ET AL., 2006) und bilden hier vor phytopathogenen Bakterien schützende Biofilme. Der Anteil der einzelnen Bakterienarten an diesem Biofilm wird unter anderem durch die Pflanzenart (z. B. Blatt- oder Wurzelgemüse), die Anbauweise (z. B. Gewächshaus oder Feld, Beregnung) und Verarbeitungsprozesse (z. B. Waschen, Zerkleinern, Kühlen oder Einfrieren) beeinflusst (MORRIS UND MONIER, 2003). So zeigte sich auch in der vorliegenden Untersuchung die Prävalenz der coliformen Bakterien, der Pseudomonaden und der Enterokokken zwischen den Vermarktungsstufen signifikant verschieden (vgl. Tabelle 18). Die Prävalenzrate der coliformen Bakterien und die der Enterokokken war z. B. in Proben landwirtschaftlicher Herkunft signifikant höher als in Proben aus Supermärkten, die der Pseudomonaden dagegen signifikant geringer.

Die genannten coliformen Gattungen werden auch aus Lebensmitteln tierischen Ursprungs (HUTHER, 2007) und aus humanklinischem Untersuchungsmaterial isoliert. Nach DUFOUR (1977) bilden *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. und *Citrobacter* spp. jedoch lediglich einen Anteil von 1,5 bis 4 % an der coliformen Flora in *Faeces* von Säugetieren. Hingegen besteht diese zu 94 % aus *E. coli* (DUFOUR, 1977). INGHAM ET AL. (2004) beschreiben eine Kontamination pflanzlicher Lebensmittel mit *E. coli* aus der Tierhaltung über Wirtschaftsdünger. Nach BRANDL (2006) sind 0,6 % bis 4 % der pflanzlichen Lebensmittel mit *E. coli* kontaminiert. Entsprechend gering war auch die – auf humanen oder tierischen Ursprung zurückzuführende - Prävalenzrate von *E. coli* in pflanzlichen Lebensmitteln sowohl in der vorliegenden Untersuchung (4 %) als auch in den Arbeiten von ÖSTERBLAD ET AL. (1999) (4 %), HAMILTON-MILLER UND SHAH (2001) (0 %) und BOEHME ET AL. (2004) (9 %).

*Salmonella* spp. wurde lediglich aus einer einzigen Probe isoliert. Die Raten isolierter Salmonellen aus pflanzlichen Lebensmitteln reichen von 0 % nach Untersuchungen der FDA und 0,7 % bei JOHNSTON ET AL. (2005) und FAHEY ET AL. (2006) über 33 % bei VISWANATHAN UND KAUR (2001) bis 41 % bei LONG ET AL. (2002). Dabei handelt es sich stets um Kreuzkontamination, denn *Salmonella* spp. ist an den Darm von Säugetieren, Vögeln und Reptilien adaptiert (SELBITZ, 2002). BRANDL (2006) zitiert verschiedene Arbeiten, die eine hohe Tenazität obligat humanpathogener *Enterobacteriaceae*, insbesondere von *Salmonella* spp. auf Pflanzen beschreiben. Jedoch waren diese Anbauflächen zuvor mit Wirtschaftsdünger behandelt worden. Hingegen stammte das Probenmaterial der vorliegenden Untersuchung überwiegend aus landwirtschaftlichen Betrieben, in denen – nach Angabe der Landwirte - keine Wirtschaftsdünger verwendet werden.



In der vorliegenden Untersuchung wurden *Pseudomonas* spp. als *P. aeruginosa*, *P. putida* und *P. fluorescens* bestätigt (67 %, 24 % und 9 %). Diese Ergebnisse entsprechen den Untersuchungen von HAMILTON-MILLER UND SHAH (2001), JENSEN ET AL. (2001) und LIAO UND FETT (2001) insofern, als auch sie aus pflanzlichen Lebensmitteln und Bodenproben *P. aeruginosa*, *P. putida* und *P. fluorescens* isolierten, während andere pflanzenassoziierte, teilweise auch phytopathogene Spezies - *P. syringae* und *P. stuartii* - weder in der vorliegenden Untersuchung noch in den Arbeiten der genannten Autoren festgestellt werden konnten. *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* und *P. putida* sind typische pflanzenassoziierte Bakterien und werden daher regelmäßig sowohl von Pflanzenteilen der Rhizosphäre als auch der Phyllosphäre isoliert, wo sie an der Bildung der bereits beschriebenen Biofilme beteiligt sind (TROXLER ET AL., 1997; MORRIS UND MONIER, 2003; MANDRELL ET AL., 2006).

Die als „*E. nonfaecalis/nonfaecium*“ zusammengefasste Gruppe stellte bei den Enterokokken den größten Anteil dar (77 %). Untersuchungen zum Vorkommen von Enterokokken in pflanzlichen Lebensmitteln finden sich bei ULRICH UND MÜLLER (1998), MÜLLER ET AL. (2001), OTT ET AL. (2001) und JOHNSTON UND JAYKUS (2004). Die Prävalenz von *E. faecalis* und *E. faecium* wird jedoch bei JOHNSTON UND JAYKUS (1994) in größerem Umfang als in der vorliegenden Arbeit beschrieben (21 % *E. faecalis*, 52 % *E. faecium*, 27 % *E. nonfc.*), während OTT ET AL. (2001) ähnliche Resultate wie in der vorliegenden Untersuchung erzielten (*E. faecalis* 8 %, *E. faecium* 5 %, 87 % *E. nonfc.*). Die Zusammensetzung der Mikroflora von Pflanzen bzw. pflanzlichen Lebensmitteln ist jedoch auch in großem Maße von der Behandlung der Anbauflächen mit Wirtschaftsdünger und von weiteren potentiellen Kontaminationsarten, wie Beregnung der Pflanzen, Beweidung durch Nutztiere oder Transport und Verarbeitung der Produkte abhängig (BRANDL, 2006), was unterschiedliche Prävalenzraten der einzelnen Spezies in Pflanzenproben erklärt. So beschreiben ULRICH UND MÜLLER (1998) in Weidegras vor allem *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. mundtii* und *E. casseliflavus*, also Spezies, die sich auch bzw. vor allem im Intestinum von Säugetieren finden (DEVRIESE ET AL., 1991; DUTKA-MALEN ET AL., 1994; KLEIN, 2003; KÜHN ET AL., 2003).

Lediglich aus elf Proben wurden Listerien isoliert. Die meisten Listerien sind typische bodenassoziierte Bakterien, so dass ihr Vorkommen hier nicht verwundert. Die niedrige Prävalenzrate ist vermutlich in pflanzenassoziierten Antagonisten begründet. So wurde das Wachstum von *L. monocytogenes* in Untersuchungen von LIAO UND SAPERS (1999), DEL CAMPO ET AL. (2001) und LIAO UND FETT (2001) durch die Anwesenheit pflanzenassoziiierter Bakterien, so z. B. *Pantoea agglomerans*, *Rahnella aquatilis*, *P. putida* und *P. fluorescens*, gehemmt. Eine hohe Listerienbelastung von Gemüse – vor allem mit dem humanpathogenen Stamm *L. monocytogenes* - besteht, wenn Anbauflächen mit tierischen *Faeces* gedüngt werden (DAVIES ET AL., 1984; BRANDL, 2006). So isolierten z. B. VITAS ET AL. (2004) aus 10 % der Gemüseproben Listerien, davon in 2 % der Fälle *L. monocytogenes*, bei Lebensmitteln tieri-

scher Herkunft waren dagegen bis zu 76 % der Proben mit Listerien kontaminiert. Bei SIMON ET AL. (1992) enthielten 8 % der pflanzlichen Lebensmittel *L. monocytogenes*. Die geringe Prävalenzrate isolierter Listerien in der vorliegenden Untersuchung ist damit zu erklären, dass – nach Aussage der Landwirte – die Anbauflächen des Probenmaterials nicht mit Wirtschaftsdünger behandelt wurden.

### Unterschiede der Bakterienisolierung nach Matrix

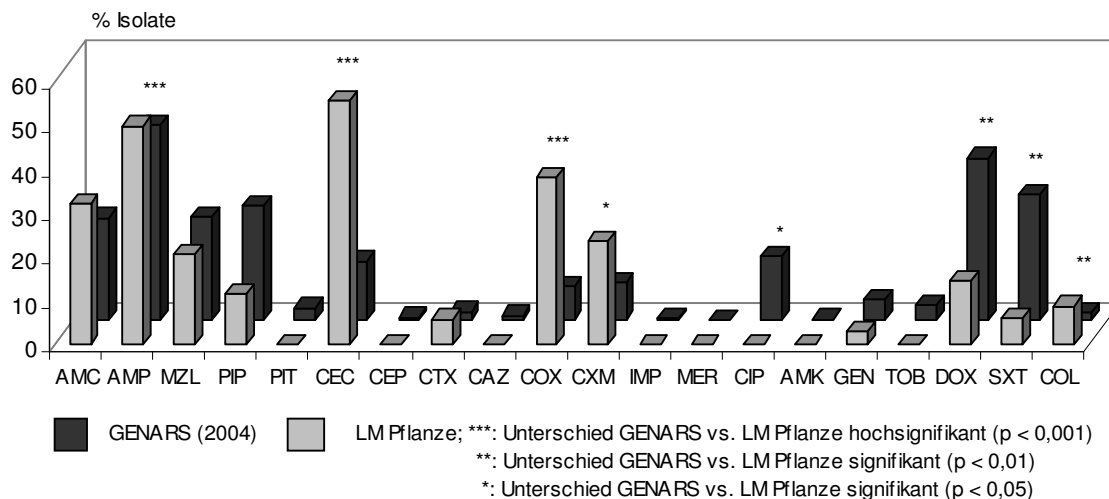
Aus Zwiebel- und Fruchtgemüse waren die ausgewählten Bakteriengruppen signifikant seltener zu isolieren als aus Wurzelgemüse und Salat- und Blattgemüse. LEVY (1984) konnte aus Zwiebeln keine Bakterien isolieren und begründete dies mit den antimikrobiellen Substanzen (Allicin) des Zwiebelsaftes. LEE ET AL. (2003) zeigen, dass Knoblauchextrakt eine signifikante Aktivität gegenüber *Staphylococcus epidermis* und *K. pneumoniae* bis zu einer Verdünnungsstufe von 1:128 zeigte. Auch so genannte „rote Gemüsesorten“, z. B. Tomaten, Paprika - in der vorliegenden Untersuchung als „Fruchtgemüse“ bezeichnet - zeigten antimikrobielle Aktivität. ANKRI UND MIRELMAN (1999), UNAL ET AL. (2001) LEUSCHNER UND IELSCH (2003) beschreiben *in vitro* eine bakteriostatische Wirkung von Knoblauch gegenüber *L. monocytogenes*. Allicin reagiert mit den Thiol-Gruppen verschiedener Enzyme und greift damit in den essentiellen Metabolismus der Proteinsynthese ein (ANKRI UND MIRELMAN, 1999). ANKRI UND MIRELMAN (1999) stellten außerdem fest, dass multiresistente Stämme von *E. faecium* und *P. aeruginosa* auch resistent gegenüber dem Pflanzenwirkstoff Allicin waren. Resistenzen gegenüber antimikrobiellen Pflanzensubstanzen sind demnach möglich. In der vorliegenden Untersuchung wurden bei *Ent. cloacae*, *Ent. gergoviae*, *P. aeruginosa* und *P. putida* so auch signifikant mehr resistente Isolate aus Fruchtgemüse als aus anderen Matrices isoliert. Resistente Isolate aus Fruchtgemüse verhielten sich dabei fast immer gegen Antibiotika der Cephalosporine oder Antibiotika der Aminoglykoside resistent. Eine Analyse der Pflanzeninhaltsstoffe könnte über die hier beobachteten Zusammenhänge Aufschluss geben. Als Ursache für die geringere Prävalenzrate isolierter Bakterien in Frucht- und Zwiebelgemüse, z. B. bei *Pantoea agglomerans*, als in Wurzel- und Salatgemüse nennt BRANDL (2006) signifikant negative Einflüsse auf das Bakterienwachstum, wie UV-Licht, geringe Humidität und Nährstoffverfügbarkeit in der Phyllosphäre.

## **2 Einordnung der phänotypischen Resistenzbefunde**

### **2.1 *E. coli***

*E. coli* aus pflanzlichen Lebensmitteln erwies sich gegenüber fünf der 20 mit GENARS (2004) verglichenen Substanzen signifikant häufiger als resistent als Isolate aus humanklinischem Untersuchungsmaterial (vgl. Abbildung 21). Gegenüber Ciprofloxacin, Doxzyklin und

Co-Trimoxazol waren hingegen mehr Isolate bei GENARS (2004) resistent als in der vorliegenden Untersuchung, wie in Abbildung 21 dargestellt ist. Problematisch ist dieser Vergleich aufgrund der stark differierenden Isolatezahlen beider Studien. So wurden aus pflanzlichen Lebensmitteln 34 Isolate getestet, während dies in humanklinischem Untersuchungsmaterial zwischen 586 und 6379 Isolate waren.



**Abbildung 21: Vergleich der prozentualen Resistenzraten von *E. coli* aus pflanzlichen Lebensmitteln ( $n = 34$ ) und klinischem Untersuchungsmaterial ( $n = 586-6379$ ) (GENARS, 2004)**

Resistenzen bestanden vor allem gegenüber Ampicillin (50 %), Amoxicillin/Clavulan-säure (32 %), Mezlocillin (21 %), Cefaclor (56 %), Cefoxitin (38 %) und Cefuroxim (24 %). Dies entspricht den Resistenzraten von *E. coli*-Isolaten aus Lebensmitteln tierischer Herkunft (HUTHER, 2007). Gegen Cefaclor waren Isolate aus tierischen Lebensmitteln (HUTHER, 2007) und aus klinischem Untersuchungsmaterial (GENARS, 2004) dagegen überwiegend intermediär bzw. sensibel, während in der vorliegenden Untersuchung 56 % der Isolate ( $n = 9$ ) als resistent einzustufen waren. Bei Isolaten aus Schweinegülle (HÖLZEL, 2006) waren die Resistenzraten gegenüber Penicillinen und Cephalosporinen deutlich geringer als bei Isolaten aus pflanzlichen Lebensmitteln. Dies könnte als Indiz dafür gewertet werden, dass die Isolate der vorliegenden Untersuchung vermutlich aus humaner Kontamination stammen, da im Humanbereich  $\beta$ -Lactamantibiotika die am häufigsten verordnete Wirkstoffklasse darstellt (ANONYMUS, 2000; KERN, 2004). Dagegen sprechen jedoch die im Vergleich zur Humanmedizin unterschiedlichen Resistenzprofile. So ist beispielsweise die Rate doxzyklinresistenter Isolate aus pflanzlichen Lebensmitteln signifikant geringer als die Rate der Isolate aus klinischem Untersuchungsmaterial. Die im Vergleich zur „Tierhaltung“ (HÖLZEL, 2006; HUTHER, 2007) hohe prozentuale Resistenzrate in dieser Untersuchung ist daher vermutlich auf die vergleichsweise geringe Isolatezahl bei pflanzlichen Lebensmitteln ( $n = 34$ ) zurückzuführen.

Über die Wirksamkeit von Ampicillin und Cefaclor gegen *E. coli* existieren in der Literatur unterschiedliche Aussagen. So zeigen nach SIMON UND STILLE (2000) etwa 30 % der *E. coli*-Stämme Resistenz gegenüber Ampicillin und Cefaclor. Nach STAHLMANN UND LODE (2005) ist die Wirkung von Ampicillin gegen *E. coli* aufgrund zunehmender Resistenzen eingeschränkt, während die Empfindlichkeit gegenüber Cefaclor von den Autoren als günstig beurteilt wird.

Wie bereits erwähnt wird die häufige Verordnung von  $\beta$ -Lactamantibiotika in der Humanmedizin als Ursache für die Resistenzhäufigkeit gegen diese Wirkstoffklasse verantwortlich gemacht. So beschreiben auch GEISS ET AL. (2004) bei *E. coli* eine zunehmende Resistenz gegenüber  $\beta$ -Lactamantibiotika. Allerdings reflektieren die Daten von GENARS (2004) über drei Jahre hingegen eine gewisse Konstanz der Resistenz, wenn auch in hohen Raten (z. B. bei Ampicillin 43 % im Jahr 2002 bis 45 % in 2004).

Die Überproduktion der häufig plasmidvermittelten, induzierbaren AmpC- $\beta$ -Lactamasen bewirkt Resistenz gegenüber Ampicillin und - durch partielle Kreuzresistenzen bedingt - auch Resistenz gegenüber Piperacillin und Mezlocillin (BLACK ET AL., 2005). Nach FLUIT ET AL. (2001) ist TEM-1 bei *E. coli* die am häufigsten auftretende  $\beta$ -Lactamase und tritt oftmals in Verbindung mit TEM-2 und OXA-2 auf. Durch Mutationen dieser „Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamases“ (ESBLs) wird das Spektrum der  $\beta$ -Lactamasen erweitert, z. B. auf Cefaclor. Darüber hinaus sind ESBLs auf Plasmiden lokalisiert und werden häufig durch Konjugation zwischen verschiedenen *Enterobacteriaceae* transferiert (DEFLAUN UND LEVY, 1989; FLUIT ET AL., 2001; GEISS ET AL., 2004). So lassen sich auch die Resistenzprofile mehrfachresistenter *E. coli* in der vorliegenden Untersuchung erklären, die belegen, dass Mehrfachresistenzen vor allem gegenüber Penicillinen und Cephalosporinen bestanden.

Gegenüber **Spectinomycin** und **Streptomycin** erwiesen sich in der vorliegenden Untersuchung 15 (44 %) bzw. 3 (9 %) der 34 Isolate als unempfindlich. Damit war die Resistenzrate bei Spectinomycin aus pflanzlichen Lebensmitteln höher, bei Streptomycin geringer als bei Isolaten aus Schweine- und Hähnchenfleisch (SPT: 40 bzw. 31 %; STR: 36 bzw. 26 %; HUTHER, 2007). Auch Isolate aus Schweinegülle (HÖLZEL, 2006) verhielten sich in höherem Maße resistent als Isolate aus pflanzlichen Lebensmitteln (STR 56 %; SPT 40 %).

Beide Antibiotika werden in der Human- und Veterinärmedizin, dort auch zur Behandlung von Infektionen lebensmittelliefernder Tiere, angewendet (STAHLMANN UND LODE, 2005; VETIDATA, 2006). Die Resistenz gegenüber beiden Antibiotika wird nach CHIEW ET AL. (1998) von dem Gen *ant(3'')*-Ia, das auf dem Transposon Tn21 lokalisiert ist, codiert. DEFLAUN UND LEVY (1989) beschreiben darüber hinaus einen gemeinsamen Ursprung der Streptomycin- bzw. Spectinomycinresistenz und der Resistenz gegenüber  $\beta$ -Lactamantibiotika – in der vorliegenden Untersuchung in hohem Maße vorhanden - in Verbindung mit dem Transposon

Tn<sub>4</sub>, während auf einigen Plasmiden additiv die Resistenz gegenüber Tetrazyklin und Chloramphenicol transferiert wird. Die letztgenannten Resistenzkombinationen traten in der vorliegenden Untersuchung jedoch nicht gemeinsam auf.

Die Verschiebung der MHK-Werte von Amikacin, Gentamicin, Netilmicin und Tobramycin in den intermediären Bereich ist möglicherweise in der Resistenz gegenüber Spectinomycin und Streptomycin begründet. Nach MEYER ET AL. (1983) ist die Resistenz gegenüber Spectinomycin und Streptomycin auf dem Transposon Tn<sub>2424</sub> lokalisiert, das zudem die „low level“-Resistenz gegenüber Amikacin trägt. Eine Co-Selektion gegenüber Amikacin scheint also durch den Einsatz von Streptomycin und Spectinomycin möglich.

Darüber hinaus bestehen vermutlich Zusammenhänge zwischen der Intermediärverschiebung der MHK-Werte von Gentamicin, Netilmicin und Tobramycin. Die Resistenzgene *aac(3)-II* und *aac(3)-IV* codieren Enzyme, die das Gentamicin und aufgrund struktureller Merkmale auch Netilmicin und Tobramycin modifizieren und damit zu einer eingeschränkten Wirksamkeit führen (SIMON UND STILLE, 2000; SAENZ ET AL., 2004; WRIGHT, 2005). Bei GENARS (2004) war jedoch nur gegenüber Tobramycin, nicht aber gegenüber Gentamicin eine Intermediärverschiebung zu erkennen.

Gegenüber **Doxyzyklin** erwiesen sich aus pflanzlichen Lebensmitteln signifikant weniger *E. coli*-Isolate als unempfindlich als Isolate aus klinischem Probenmaterial (15 % vs. 37 % bei GENARS, 2004) oder aus Lebensmitteln tierischer Herkunft (15 % vs. 38 % bei HUTHER, 2007; 44 % bei DANMAP, 2004). Allerdings wurden 29 % der Isolate aus pflanzlichen Lebensmitteln als intermediär eingestuft. In einer Untersuchung von ÖSTERBLAD ET AL. (1999) waren 6 % der Isolate aus pflanzlichem Untersuchungsmaterial resistent. Inwieweit sich die Isolate dieser Autoren intermediär verhielten, konnte nicht festgestellt werden, da dort gemäß NCCLS lediglich eine Einteilung in „sensibel“ und „resistent“ vorgenommen wurde. Isolate aus Gülleproben von schweinehaltenden Betrieben aus Bayern (HÖLZEL, 2006) wiesen Doxyzyklinresistenzen in einer Größenordnung von 55 % auf. Die Resistenzraten von *E. coli*-Isolaten aus pflanzlichen Lebensmitteln liegen damit insgesamt deutlich unter denen von Isolaten aus Gülle, tierischen Lebensmitteln und klinischem Untersuchungsmaterial. Tetrazykline gehören zu den in der Human- und Veterinärmedizin am häufigsten eingesetzten Antibiotika (ANONYMUS, 2000; KERN, 2004), so dass die genannten Resistenzraten bei Isolaten aus Gülle, tierischen Lebensmitteln und klinischem Untersuchungsmaterial nicht verwundern. Tetrazyklinresistenzgene sind auch bei *E. coli* aufgrund eines weitreichenden horizontalen Resistenzgen-Transfers weit verbreitet. So ist das *tet(B)*-Gen das bei *E. coli* am häufigsten isolierte Resistenzgen. *Tet(B)* ist auf dem Transposon Tn<sub>10</sub> lokalisiert und kann zwischen verschiedenen Bakterienarten transferiert werden (HILLEN UND BERENS, 1994; CHOPRA UND ROBERTS, 2001). Dass eine Übertragung resistenter Isolate vom Tier über die Gülleausbrin-

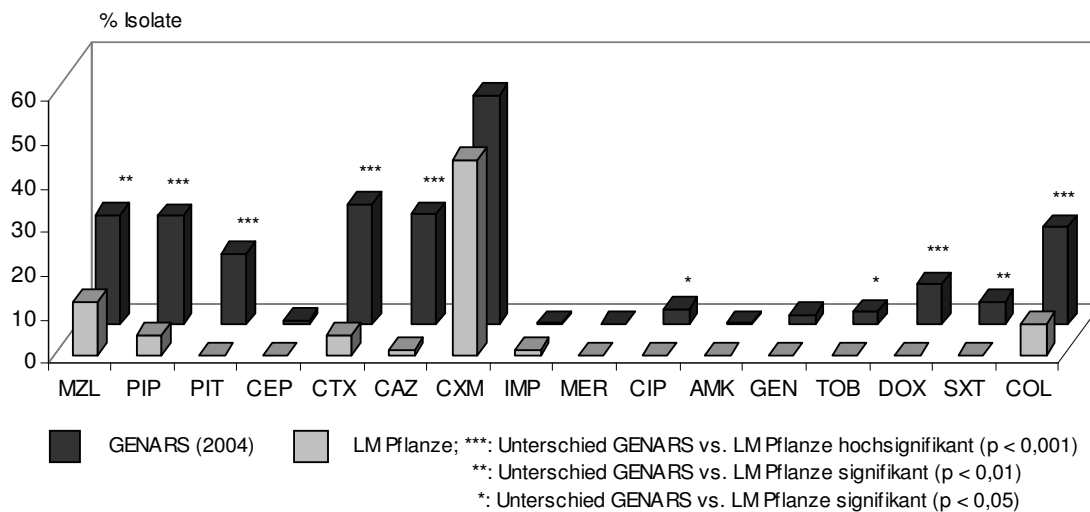
gung auf Anbauflächen und damit zur Pflanze erfolgt, ist zwar möglich, jedoch stellte HÖLZEL (2006) fest, dass Tetrazyklin-Resistenzgene im Boden drei Wochen nach der Gülleausbringung nicht mehr nachweisbar waren.

#### Mehrfachresistenzen bei *E. coli*

*E. coli*-Isolate mit Resistenzen gegenüber zwei und mehr Antibiotika wiesen – wie beschrieben - vor allem Resistenzen gegenüber Penicillinen und Cephalosporinen auf. Die Betrachtung der Resistenzprofile, die hauptsächlich Resistenzen gegenüber einer Wirkstoffklasse darstellen, lässt vermuten, dass es sich bei den vorhandenen Mehrfachresistenzen bei *E. coli* vor allem um Kreuzresistenzen handelt (SIMON UND STILLE, 2000). 42 % der Isolate exprimierten darüber hinaus Resistenzen gegenüber zwei und mehr Wirkstoffklassen. Hierbei handelt es sich oft um die Kombination eines  $\beta$ -Lactamantibiotikums (primär Penicilline und Cephalosporine) mit dem Aminoglykosid Spectinomycin. SAENZ ET AL. (2004) stellten fest, dass *E. coli* vor allem durch seine Fähigkeit zur Konjugation eine Vielzahl verschiedener Resistenzen auf einem einzigen Plasmid beherbergen kann. Die von SAENZ ET AL. (2004) beobachteten Multiresistenzen gegenüber  $\beta$ -Lactamen, Aminoglykosiden, Chloramphenicol und Tetrazyklinen konnten in der vorliegenden Untersuchung jedoch lediglich bei einem einzigen Isolat beobachtet werden. Die bereits beschriebenen Resistenzprofile gegen  $\beta$ -Lactame und Spectinomycin/Streptomycin, die auf dem Transposon Tn4 gemeinsam lokalisiert sind (DEFLAUN UND LEVY, 1989), wurden dagegen bei elf von 34 (32 %) Isolaten festgestellt.

## **2.2 Coliforme Bakterien**

Vergleicht man die in dieser Studie für *Enterobacter cloacae* ermittelten Daten mit denen des GENARS-Projekts (2004), so ergeben sich für Isolate aus pflanzlichen Lebensmitteln bei 15 von 16 Antibiotika niedrigere Resistenzraten als bei Isolaten aus klinischem Untersuchungsmaterial. Signifikant waren diese Unterschiede vor allem bei den  $\beta$ -Lactamantibiotika, hier insbesondere bei den Penicillinen Mezlocillin, Piperacillin und Piperacillin/Tazobactam und bei den Cephalosporinen Cefotaxim und Ceftazidim. Besonders deutlich ist der Unterschied auch bei Doxyzyklin. Hier konnten keine Isolate aus pflanzlichen Lebensmitteln als resistent eingestuft werden, während immerhin 9 % der Isolate aus humanklinischem Untersuchungsmaterial unempfindlich waren. Es verwundert nicht, dass die Resistenzraten der GENARS-Studie vor allem bei Antibiotika, die ausschließlich in der Humanmedizin und dort sehr häufig angewendet werden – z. B. Mezlocillin, Piperacillin, Ciprofloxacin (ANONYMUS, 2000; KERN, 2004) - , signifikant höher waren als bei Isolaten aus pflanzlichen Lebensmitteln.



**Abbildung 22: Vergleich der prozentualen Resistenzraten von *Ent. cloacae* aus pflanzlichen Lebensmitteln (n = 172) und klinischem Untersuchungsmaterial (n = 195-1159) (GENARS, 2004)**

Wie bereits erwähnt waren bei *Ent. cloacae* Resistenzen vor allem gegenüber den  **$\beta$ -Lactamantibiotika** Cefuroxim und Mezlocillin festzustellen. Bei der Testung der Bakterien gegenüber Piperacillin verhielten sich 22 % der Isolate intermediär. ÖSTERBLAD ET AL. (1999) und BOEHME ET AL. (2004) beschreiben für coliforme Bakterien, jedoch nicht explizit für *Ent. cloacae*, aus pflanzlichen Lebensmitteln höhere Resistenzraten gegenüber Penicillinen und Cephalosporinen als in der vorliegenden Untersuchung (bis zu 30 %).

Von zunehmend plasmidvermittelten AmpC- $\beta$ -Lactamasen, die bei *Enterobacteriaceae*, vor allem bei *Klebsiella* spp. und *Enterobacter* spp. zu Resistenzen gegenüber Penicillinen und Cephalosporinen führen, berichten auch GEISS ET AL. (2004) und BLACK ET AL. (2005). Die Aussagen dieser Autoren stützen die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung. So zeigten auch *Ent. sakazakii*, *Ent. gergoviae* und *Pantoea agglomerans* in der vorliegenden Untersuchung Resistenzraten von 30 bis zu 57 % gegenüber den Antibiotika Ampicillin und Cefaclor. Die Hemmung der Resistenzausbildung durch einen  $\beta$ -Lactamase-Inhibitor – hier z. B. Clavulansäure und Tazobactam – ist ein typisches Merkmal der ESBLs (GRIMM ET AL., 2004). So wurden auch in der vorliegenden Untersuchung bei Mezlocillin, Piperacillin und Cefoxitin, nicht jedoch bei Amoxicillin/Clavulansäure und Piperacillin/Tazobactam resistente *Klebsiella*-Stämme beobachtet. Nach THEURETZBACHER (2004) sind mittlerweile mehr als 150 dieser ESBLs bekannt, was die teils unterschiedlichen phänotypischen Resistenzen gegenüber  $\beta$ -Lactamantibiotika in der vorliegenden Untersuchung erklärt.

*Rahnella aquatilis* dagegen besitzt eine chromosomal codierte Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase (AmpA- $\beta$ -Lactamase), die in einer low-level-Resistenz gegenüber Mezlocillin und Piperacillin bzw. Resistenzen gegenüber Ampicillin und Cefaclor resultiert. Piperacillin/Tazo-

bactam, Ceftazidim und Imipenem haben indes eine starke Wirkung gegen *R. aquatilis* (BELLAIS ET AL., 2001). Dies konnte auch in der vorliegenden Untersuchung beobachtet werden: Wenngleich Resistenzen gegenüber  $\beta$ -Lactamantibiotika nur in geringem Umfang (1-3 Isolate) festgestellt wurden, so verhielten sich 17 bzw. 10 von 22 Isolaten bei Mezlocillin bzw. Piperacillin intermediär.

Hohe Resistenzraten wie bei den Coliformen aus pflanzlichen Lebensmitteln – wie bereits oben dargestellt - gegenüber den Penicillinen stellten auch GALLERT ET AL. (2005) bei den coliformen Bakterien fest. Die Autoren vermuten einen ausgeprägten Resistenztransfer zwischen coliformen Bakterien, die auch Bestandteile der so genannten Biofilme im Boden und auf Pflanzen darstellen und teilweise Resistenzgene antibiotikaproduzierender Mikroorganismen beherbergen und diese weitergeben.

Die Resistenzraten bei den **Aminoglykosiden** Amikacin, Gentamicin und Tobramycin unterschieden sich bei *Ent. cloacae* kaum von denen der GENARS-Studie (2004) und bewegten sich zwischen 0 und 3 % (GENARS: 0,5 bis 3 %). Einzig bei Spectinomycin war eine hohe Resistenzrate (28 %) bei Isolaten aus pflanzlichen Lebensmitteln festzustellen.

Als Bestandteil sowohl der natürlichen Mikroflora des Intestinaltrakts von Säugetieren und Vögeln (DUFOUR, 1977) als auch der Mikroflora von Pflanzen (MEHNAZ ET AL., 2001; MANDRELL ET AL., 2006) erfolgt eine Selektion spectinomycinresistenter *Ent. cloacae*-Stämme zum einen durch die Anwendung von Streptomycin und Spectinomycin in Human- und Veterinärmedizin und einer anschließenden Kontamination pflanzlicher Lebensmittel via der unter Abbildung 5 dargestellten Kontaminationswege, zum anderen durch bodenassoziierte aminoglykosidproduzierende Mikroorganismen (THOMAS ET AL., 1981; RIESENFELD ET AL., 2004). *Ent. cloacae* ist als stickstofffixierendes Bakterium im Boden bekannt (MEHNAZ ET AL., 2001) und somit möglicherweise dem Selektionsdruck durch aminoglykosidproduzierende Mikroorganismen ausgesetzt. Resistenz gegenüber Spectinomycin und Streptomycin wird zudem oftmals mit Transposons – z. B. Tn21 und Tn2424 – auch zwischen *Enterobacteriaceae* transferiert und auf diesem Weg verbreitet (MEYER ET AL., 1983; CHIEW ET AL., 1998). Auf dem Transposon Tn21 ist darüber hinaus die Resistenz gegenüber Schwermetallionen, z. B.  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , lokalisiert (MINDLIN ET AL., 2001; ESSA ET AL., 2003) – eine Co-Selektion streptomycin- und spectinomycinresistenter Stämme ist somit auch durch das natürliche Vorkommen von Schwermetallionen im Boden und auf Pflanzen möglich.

Bei den übrigen coliformen Bakterien – mit Ausnahme von *Ser. marcescens* – war die Resistenz gegenüber Spectinomycin und Streptomycin vergleichsweise gering (bis zu 10 %). Gegenüber den neueren Aminoglykosid-Antibiotika wurden keine Resistenzen festgestellt. Diese Ergebnisse entsprechen den Aussagen von ÖSTERBLAD ET AL. (1999), CHANG ET AL. (1999), HABSAH ET AL. (2005) und TASH (2005), die bei coliformen Bakterien aus pflanzlichen



Lebensmitteln sowie bei *Pantoea agglomerans*- und *R. aquatilis*-Isolaten aus klinischem Untersuchungsmaterial ausschließlich aminoglykosidsensible Stämme feststellten.

Bei *Ser. marcescens* traten Resistenzen und intermediäres Verhalten gegenüber Aminoglykosiden - ungeachtet der Tatsache geringer Isolatezahlen (n = 25) - vergleichsweise oft auf (vgl. Tabelle 54). Vergleichsdaten von GENARS (2004) liegen für diese Spezies nicht vor, es existieren jedoch Daten der europäischen SENTRY-Studie von 1999. Dort verhielten sich gegenüber Amikacin, Gentamicin und Tobramycin lediglich 0 bis 15 % der Isolate resistent bzw. 3 bis 6 % intermediär. Es ist nach STOCK ET AL. (2003 B) nicht vollständig abgeklärt, ob Resistenzen bzw. intermediäres Verhalten gegenüber Aminoglykosiden bei *Ser. marcescens* intrinsisch verankert sind, da die Autoren sowohl natürlich sensible als auch natürlich intermediäre und resistente Stämme feststellten.

CENTRON UND ROY (2002) beschreiben dagegen bei *Ser. marcescens* drei Klasse-I-Integrone auf einem einzigen Plasmid, die die Resistenz gegenüber Gentamicin (*aac(3)-Ia*, *ant(2'')-Ia*, *ant(3'')-Ii-aac(6')-IId*) und Streptomycin (*ant(3'')-Ii-aac(6')-IId*, *ant(3'')-Ia*) codieren, sowie ein neues Integron, das ein kombiniertes Aminoglykosidresistenzgen (*ant(3'')-Ii-aac(6')-IId*) und ein weiteres Intron enthält. Isolate dieser Untersuchung exprimierten neben Streptomycin- und Spectinomycinresistenz auch Resistenz gegenüber Amikacin (low level), Gentamicin, Netilmicin und Tobramycin.

Gegenüber **Doxyzyklin** waren signifikant weniger *Ent. cloacae*-Isolate aus pflanzlichem Probenmaterial resistent (0 % vs. 9 %) bzw. intermediär (41 % vs. 80 %) als Isolate aus klinischem Untersuchungsmaterial. Untersuchungen von ÖSTERBLAD ET AL. (1999) beschreiben 94 % der Isolate aus pflanzlichen Lebensmitteln als „sensibel“. Hier dürfte jedoch die unterschiedliche Einstufung der Isolate nach NCCLS bzw. in der vorliegenden Untersuchung nach DIN (2004) ursächlich für die Differenzen zwischen beiden Untersuchungen sein. So werden nach NCCLS Isolate noch als „sensibel“ eingestuft, die nach DIN (2004) bereits intermediär sind.

Die Unterschiede zu GENARS (2004) hinsichtlich der Resistenzrate können in dem häufigen Einsatz der Tetrazykline in der Humanmedizin erklärt werden. Darüber hinaus werden zwar Tetrazykline auch in der landwirtschaftlichen Tierhaltung angewendet und somit in Gülle nachgewiesen (HARMS, 2006), jedoch werden Tetrazykline im Boden an Metallionen (z. B.  $\text{Ca}^{2+}$ ) gebunden und damit inaktiviert. Der Selektionsdruck auf die Mikroorganismen wird damit verringert. So konnte auch HÖLZEL (2006) drei Wochen nach der Ausbringung tetrazyklinhaltiger Gülle keine Tetrazyklin-Resistenzgene mehr nachweisen.

STOCK ET AL., 2001 stellten zudem fest, dass *Ent. cloacae* sich gegenüber Doxyzyklin natürlich sensibel bis intermediär verhält, so dass die hohe Rate intermediärer Isolate in der vor-

liegenden Untersuchung auf das natürlich sensible bis intermediäre Verhalten dieser Spezies gegenüber Tetrazyklinen zurückgeführt werden kann.

**Colistin** wird im Allgemeinen eine gute Wirksamkeit gegenüber gramnegativen Bakterien zugesprochen (VILJANEN UND VARA, 1984; VOGEL ET AL., 2004; LI ET AL., 2005) und daher als wirkungsvolle Alternative bei multiresistenten Bakterien betrachtet. So war die Resistenz gegenüber diesem Antibiotikum bei den coliformen Bakterien, mit Ausnahme von *Ent. sakazakii* (12,5 %) und *Ent. aerogenes* (25 %, n = 6) selten. Bei *K. pneumoniae* spp. *pneumoniae* wurden 19 % (n = 4) der Isolate als unempfindlich eingestuft, demgegenüber waren in der GENARS-Studie (2004) zwar nur 4 % der Isolate resistent, allerdings verhielten sich dort 42 % der Isolate intermediär. Die Unterschiede zwischen den beiden Untersuchungen sind neben stark unterschiedlichen Isolatezahlen vermutlich auf die Anwendung unterschiedlicher Breakpoints zurückzuführen. So wurden bei GENARS (2004) die Konzentrationsbereiche und Breakpoints nach DIN (2004), in der vorliegenden Untersuchung die Konzentrationsbereiche und Breakpoints nach DANMAP (2004) herangezogen. Bei einer Einordnung der Isolate aus pflanzlichen Lebensmitteln nach DIN (2004) wären – bei Verwendung des Konzentrationsbereiches der vorliegenden Untersuchung – 81 % der Isolate intermediär und 4 % der Isolate resistent.

**Chloramphenicol** und **Co-Trimoxazol** zeigten sich in der vorliegenden Untersuchung fast vollständig wirksam gegenüber coliformen Bakterien. Dies widerspricht jedoch den Aussagen von ÖSTERBLAD ET AL. (1999), die bei 38 % der *Ser. marcescens*-Isolate aus pflanzlichen Lebensmitteln Resistenzen gegenüber Chloramphenicol beschreiben. Chloramphenicol-resistenz entsteht zum einen durch spontane Mutationen des *cat*-Gens im Bakteriengenom, zum anderen wird sie plasmidisch, jedoch nicht zwischen grampositiven und gramnegativen Bakterien vermittelt (FLUIT ET AL., 2001). ÖSTERBLAD ET AL. (1999) und DEFLAUN UND LEVY (1989) beschreiben einen häufigen gemeinsamen Plasmidtransfer der Resistenz gegenüber Chloramphenicol, Co-Trimoxazol und  $\beta$ -Lactamantibiotika. In der vorliegenden Untersuchung wurde das Vorkommen dieser Resistenzprofile bei den coliformen Bakterien jedoch nicht beobachtet.

Entsprechend den Arbeiten von BOEHME ET AL. (2004) und ÖSTERBLAD ET AL. (1999) korrelieren Resistenzen gegenüber Chloramphenicol und Co-Trimoxazol bei Bakterien aus pflanzlichen Lebensmitteln mit dem – womöglich lokal unterschiedlichen - Einsatz dieser Verbindungen in der landwirtschaftlichen Tierhaltung und der damit verbundenen Verbreitung von Plasmiden, die diese Resistenzen codieren (SAENZ ET AL., 2004). So waren Resistenzen bei coliformen Bakterien aus bayerischem Hähnchen- und Schweinefleisch (HUTHER, 2007) zwar gering, jedoch bei *E. coli* aus Schweinegülle (HÖLZEL, 2006) bei immerhin 17 % der Isolate vorhanden.

**Fluorchinolone**, insbesondere das in der Humanmedizin angewendete Ciprofloxacin, besitzen im Allgemeinen eine gute Wirksamkeit gegenüber den meisten coliformen Bakterien (VOGEL ET AL., 2004). Entsprechend werden Resistenzen gegenüber Ciprofloxacin bei klinischen Isolaten in Arbeiten von CHANG ET AL. (1999), HABSAH ET AL. (2005) und TASH (2005) sowie bei GENARS (2004) nur wenig (3,5 %) oder gar nicht beschrieben. Auch in der vorliegenden Untersuchung wurden Resistenzen gegenüber Ciprofloxacin bei coliformen Bakterien nicht festgestellt. Dies entspricht den Untersuchungen von ÖSTERBLAD ET AL. (1999), die bei Isolaten aus pflanzlichen Lebensmitteln keine Resistenz gegenüber Ciprofloxacin feststellten. Fluorchinolonresistenz tritt meist unter der Behandlung mit dieser Wirkstoffklasse durch spontane Mutationen der Gene *gyr(A)* / *gyr(B)* oder durch Ausschleusung aufgrund vorhandener Multidrug-Effluxsysteme auf (FLUIT ET AL., 2001; POOLE, 2004), seltener aufgrund plasmidischen Resistenztransfers (MAMMERI ET AL., 2005), so dass die fehlenden Resistenzen bei Isolaten aus pflanzlichen Lebensmitteln in der vorliegenden Untersuchung nicht verwundern. So exprimierten auch Isolate aus Lebensmitteln tierischer Herkunft (HUTHER, 2007) und aus Gülle (HÖLZEL, 2006) nicht oder nur in geringem Umfang Resistenz gegenüber Ciprofloxacin.

#### Mehrfachresistenzen bei coliformen Bakterien

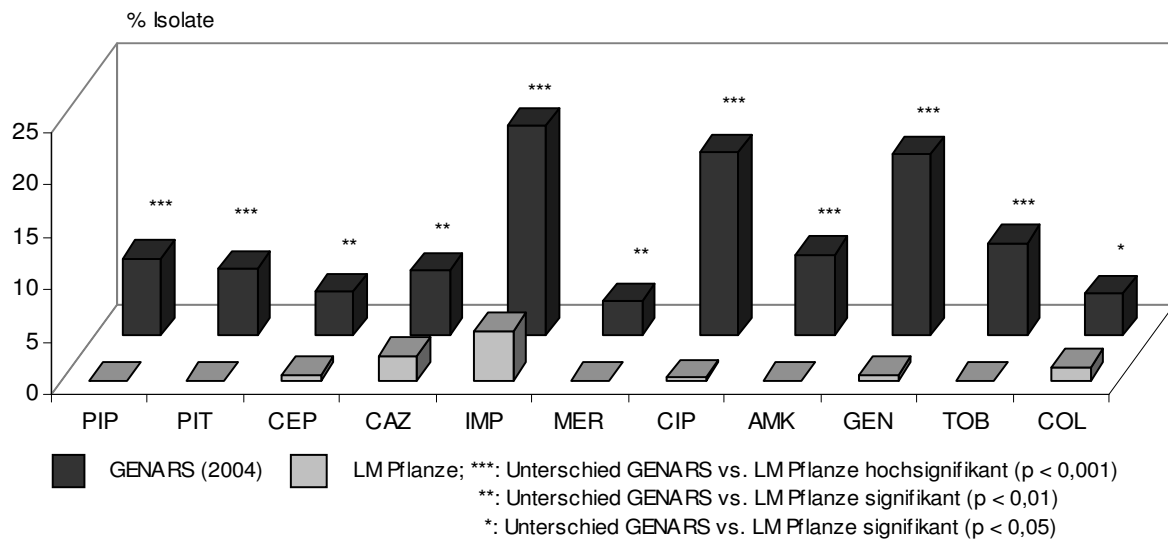
Die Resistenzprofile mehrfachresistenter coliformer Bakterien beinhalten vor allem Resistenzen gegenüber Penicillinen und Cephalosporinen. In einigen Fällen konnte zusätzlich die Resistenz gegenüber Spectinomycin bzw. Streptomycin festgestellt werden. Nach DEFLAUN UND LEVY (1989), TOLMASKY (1992) und WATERS (1999) werden Resistenzen gegenüber  $\beta$ -Lactamantibiotika und Aminoglykosiden aufgrund ihrer Lage im Bakteriengenom häufig gemeinsam plasmidisch vermittelt. So beschreibt z. B. TOLMASKY (1992) das Transposon Tn1331 mit den Resistenzgenen für Aminoglykosidresistenz (*aac(6')-Ib* und *ant(3'')-Ia*) und  $\beta$ -Lactam-Resistenz (*bla<sub>TEM</sub>* und *bla<sub>OXA-9</sub>*) auf dem Plasmid pJHCMW1.

Nach WATERS (1999) werden genetische Elemente mit Resistenzgenen gegenüber  $\beta$ -Lactam- und Aminoglykosidantibiotika von Bodenmikroorganismen zunächst an grampositive Bakterien transferiert, die diese Resistenzen wiederum – oftmals durch Konjugation - an gramnegative Bakterien weitergeben. Vor allem *Enterobacteriaceae* besitzen die Fähigkeit, mehrere dieser Resistenzgene durch Transformation oder Konjugation regelrecht „anzusammeln“ und diese weiterzugeben (WATERS, 1999).

### **2.3 *Pseudomonas* spp.**

*P. aeruginosa* aus pflanzlichen Lebensmitteln verhielt sich bei keiner der elf mit dem GENARS-Projekt (2004) verglichenen Substanzen häufiger resistent als humanklinische Isolate, wie aus Abbildung 23 hervorgeht. So bestanden bei allen Substanzen signifikante Unterschiede in der Resistenzhäufigkeit dahingehend, dass bei GENARS (2004) höhere

Resistenzraten festgestellt wurden als in der vorliegenden Untersuchung. Deutlich höhere Resistenzraten bei klinischen als bei pflanzlichen Isolaten konnten vor allem bei den Wirkstoffen Piperacillin und Piperacillin/Tazobactam, Imipenem, Ciprofloxacin und den Aminoglykosiden Amikacin, Gentamicin und Tobramycin beobachtet werden, die im Allgemeinen eine gute Wirksamkeit gegenüber *P. aeruginosa* besitzen (GRIMM UND ULLMANN, 2005).



**Abbildung 23: Vergleich der prozentualen Resistenzraten von *P. aeruginosa* aus pflanzlichen Lebensmitteln (n = 295) und klinischem Untersuchungsmaterial (n = 923-3075, GENARS, 2004)**

Resistenzen gegenüber den  $\beta$ -Lactamantibiotika Piperacillin und Piperacillin/Tazobactam wurden bei Isolaten aus pflanzlichen Lebensmitteln nicht festgestellt, dennoch verhielten sich bei *P. aeruginosa* und *P. putida* mehr als zwei Drittel und bei *P. fluorescens* die Hälfte aller Isolate intermediär gegenüber beiden Wirkstoffen. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von GENARS (2004) und SADER UND JONES (2005). Dort waren zwar 7 % bzw. 10 % der Isolate aus klinischem Untersuchungsmaterial resistent, jedoch konnte bei GENARS (2004) nur ein Drittel der Isolate als „intermediär“ eingestuft werden. Der Vergleich mit den Daten von SADER UND JONES (2005) ist aufgrund deren Einstufung der Empfindlichkeit nach den NCCLS-Richtlinien problematisch, da bei NCCLS *P. aeruginosa* mit einer MHK von 64  $\mu\text{g/ml}$  noch als „sensibel“, nach DIN (2004) – und somit auch in der vorliegenden Untersuchung – jedoch bereits als „resistent“ eingestuft wird, während eine Einstufung als „intermediär“ bei NCCLS gänzlich fehlt. Die Ergebnisse von GENARS (2004) bestätigen jedoch die Aussagen diverser Autoren (SIMON UND STILLE, 2000; GRIMM UND ULLMANN, 2005; PALLERONI, 2005; STAHLMANN UND LODE, 2005), wonach Piperacillin und Piperacillin/Tazobactam gegen *Pseudomonas* spp. eine starke Wirkung zeigen.

TRIAS UND NIKAIKO (1990), LEPPER ET AL. (2002) und EL AMIN ET AL. (2005) beschreiben bei *P. aeruginosa* Korrelationen zwischen einer reduzierten Sensibilität gegenüber Imipenem und den Antibiotika Ceftazidim, Piperacillin sowie Piperacillin/Tazobactam – wie auch in der vorliegenden Untersuchung beobachtet ( $CAZ_{\text{GENARS}}$  8 % vs.  $CAZ_{\text{PFLANZE}}$  25 %;  $IMP_{\text{GENARS}}$  10 % vs.  $IMP_{\text{PFLANZE}}$  22 %). So führt eine zunehmende Impermeabilität der Zellwand durch den Verlust des Proteins OprD2 sowie die gleichzeitige Synthese plasmidisch vermittelter  $\beta$ -Lactamasen (IMP, VIM) mit schwacher Carbapenemase-Aktivität zu einem Anstieg – also Rechtsverschiebung - der MHK-Werte bei Imipenem, Ceftazidim und Piperacillin um eine MHK-Stufe (HANCOCK UND SPEERT, 2000). In der vorliegenden Untersuchung wurde immerhin bei 24 *P. aeruginosa*- und bei neun *P. putida*-Isolate dieses Profil (IMP, CAZ, PIP, jeweils intermediär) beobachtet. Zudem befanden sich bei Piperacillin bzw. Piperacillin/Tazobactam 56 % der Isolate eine MHK-Stufe über dem Breakpoint von „sensibel“ nach „intermediär“. Die Verschiebung um eine MHK nach rechts hat damit eine große Auswirkung auf die klinische Einstufung der Bakterien als „sensibel“ oder „intermediär“.

BÜSCHER ET AL. (1987) sahen hingegen keine Zusammenhänge zwischen einer geringeren Empfindlichkeit gegenüber Imipenem – bedingt durch den Verlust des OprD2 - und anderen  $\beta$ -Lactamantibiotika. OprD2 ist ein substratspezifisches Protein, dessen Verlust ausschließlich in der reduzierten Aufnahme von Imipenem, nicht aber Meropenem, in die Bakterienzelle resultiert. So war in der vorliegenden Untersuchung bei 15 *P. aeruginosa*-, neun *P. putida*- und fünf *P. fluorescens*-Isolaten reduzierte Sensitivität ausschließlich gegenüber Imipenem nachzuweisen.

HIGGINS ET AL. (2002) beobachteten auch eine Korrelation zwischen steigenden MHK-Werten bei  $\beta$ -Lactamen und Fluorchinolonen. SAITO ET AL. (1999) und SRIKUMAR ET AL. (2000) beschreiben als Ursache hierfür die Überexpression des intrinsischen Multidrug-Efflux-Systems MexAB-OprM, basierend auf der Mutation des *nal(B)*-Gens im *mexR*-Locus – unter Selektionsdruck sowohl *in vitro* als auch *in vivo* -, das in einem erhöhten Efflux und damit steigenden MHK-Werten bei Fluorchinolonen und  $\beta$ -Lactamantibiotika sowie bei Tetracyclin und Chloramphenicol resultiert. So bestehen vermutlich auch in der vorliegenden Untersuchung Zusammenhänge zwischen der Intermediärverschiebung bei Enrofloxacin und der Intermediärverschiebung bei den  $\beta$ -Lactamen Piperacillin und Piperacillin/Tazobactam. Immerhin wiesen 226 *P. aeruginosa*-Isolate (77 %) dieses (Intermediär-)Profil auf. Nach LIVERMORE (2001) treten diese Efflux-Systeme bei *P. aeruginosa* weit verbreitet auf, während die Metallo- $\beta$ -Lactamasen IMP und VIM selten sind.

NORDMANN UND POIREL (2002) zitieren hingegen Autoren, die die genannten Metallo- $\beta$ -Lactamasen aus in der Umwelt vorhandenen Bakterienarten isolierten, die diese Enzyme konstitutiv produzieren. So gehören z. B. *Bacillus cereus* – ein typisches Bodenbakterium – und *Xanthomonas maltophilia* – pflanzenassoziiert - zu diesen Arten (LIM ET AL., 1988;

WALSH ET AL., 1994). Möglicherweise ist daher die Intermediärverschiebung bei Imipenem, Ceftazidim und Piperacillin in der vorliegenden Untersuchung auf das natürliche Vorkommen der Metallo- $\beta$ -Lactamasen IMP und VIM in Bakterien zurückzuführen, die sich den Lebensraum mit *Pseudomonas* spp. teilen und so eine Selektion der low level Resistenz gegenüber Imipenem und Ceftazidim induzieren.

Gegenüber Ciprofloxacin waren bei GENARS (2004) rund 18 % der *P. aeruginosa*-Isolate, in der vorliegenden Untersuchung dagegen fast keine Isolate resistent. Resistenz gegen Ciprofloxacin entsteht, wie bereits erwähnt, bei gramnegativen Bakterien durch spontane Mutationen der Gene *gyr(A)* / *gyr(B)* (HANCOCK UND SPEERT, 2000; FLUIT ET AL., 2001). Plasmidvermittelter Transfer der Ciprofloxacinresistenz wird dagegen selten beschrieben (FLUIT ET AL., 2001; MAMMERI ET AL., 2005). Bei Pseudomonaden tritt häufig die Mutation des *nfxc*-Gens und dadurch bedingte Expression des Multi-Drug-Effluxsystems MexEF-OprN unter Ciprofloxacin auf (LIVERMORE, 2001). Die Resistenz gegen Ciprofloxacin, Imipenem und Meropenem wurde hier allerdings nicht festgestellt.

Die Resultate der Untersuchungen pflanzlicher Lebensmittel und von GENARS (2004) spiegeln sich auch in den Ergebnissen von HAMILTON-MILLER UND SHAH (2001), JENSEN ET AL. (2001) und SADER UND JONES (2005) wider: Während Ciprofloxacinresistenz bei *Pseudomonas*-Isolaten aus landwirtschaftlichen Bodenproben nicht festzustellen war (HAMILTON-MILLER UND SHAH, 2001; JENSEN ET AL. 2001), wurden aus klinischem Material *Pseudomonas* spp. mit Ciprofloxacinresistenz in einer Größenordnung von 25 % isoliert (SADER UND JONES, 2005).

*P. aeruginosa* erwies sich bei den **Aminoglykosiden** vor allem gegenüber Spectinomycin (78 %) und Streptomycin (11 %) als resistent. Gegenüber neueren Aminoglykosid-Antibiotika waren Resistenzen nur in geringem Umfang (0,6 bis 2,4 % bei APR, GEN, NET) bzw. gar nicht vorhanden (bei AMK und TOB). Ähnliche Resistenzraten wie für *P. aeruginosa* wurden in der vorliegenden Untersuchung auch für *P. putida* und *P. fluorescens* festgestellt.

Bei der GENARS-Studie (2004) waren *P. aeruginosa*-Isolate vor allem gegenüber Gentamicin resistent (17 %), während sich gegenüber Amikacin und Tobramycin noch 8 bzw. 9 % der Isolate resistent zeigten. Die Empfindlichkeit gegenüber Streptomycin und Spectinomycin wurde dort nicht getestet.

Nach AIRES ET AL. (1999), HANCOCK UND SPEERT (2000) und POOLE (2004) ist *P. aeruginosa* aufgrund der natürlichen Impermeabilität der Zellwand in Verbindung mit dem Multidrug-Efflux-System MexXY-OprM oft in einer Größenordnung von 10 % bis hin zu intrinsischen

Raten ( $\geq 90\%$ )<sup>6</sup> resistent gegenüber Streptomycin. Dies entspricht der Resistenzrate gegenüber Streptomycin und Spectinomycin in der vorliegenden Untersuchung.

Die Resistenz gegenüber Spectinomycin ist bei *Pseudomonas* spp. gewöhnlich auf dem Plasmid RPL11 lokalisiert, das zudem die genetischen Informationen für die Resistenzen gegenüber Carbenicillin, Co-Trimoxazol und Chloramphenicol trägt (DEFLAUN UND LEVY, 1989). Letztere sind bei *P. aeruginosa* intrinsisch verankert (STRATTON UND TAUSK, 1989). Nach DEFLAUN UND LEVY (1989) ist auch die Resistenz gegenüber Spectinomycin bei *P. aeruginosa* intrinsisch, während sie bei den übrigen *Pseudomonas* spp. ausschließlich erworben wird. In der Literatur wird dies unterschiedlich diskutiert. Die Resistenzrate von immerhin 78 % bei *P. aeruginosa* könnte ein intrinsisch intermediäres bis resistentes Verhalten dieser Spezies vermuten lassen.

Streptomycin wird im Pflanzenschutz – in der EU jedoch selten und in geringen Mengen, wie bereits beschrieben - angewendet (ANONYMUS, 2001; ZORNBACH, 2005). In den USA, Mexiko, Osteuropa und Nordafrika ist der prophylaktische Einsatz dieses Antibiotikums im Pflanzenbau jedoch gängige Praxis. SUNDIN ET AL. (1995), SUNDIN UND BENDER (1996) und SUNDIN (2000) berichten in diesem Zusammenhang bei *Pseudomonas* spp. (isoliert von Pflanzen und landwirtschaftlichen Anbauflächen) von Resistenzen gegenüber Streptomycin. Sie beschreiben außerdem das Transposon Tn5393 mit dem Resistenzgen *strA-strB* (codiert Resistenz gegenüber Streptomycin und Spectinomycin) bei phytopathogenen Bakterien, so auch *P. syringae*. JENSEN ET AL. (2001) isolierten zudem aus Bodenproben *Pseudomonas* spp., die resistent gegenüber Streptomycin (7 %) waren, was der Rate der vorliegenden Untersuchung (11 %) weitgehend entspricht.

Die Resistenz gegenüber Streptomycin wird nach THOMAS ET AL. (1981), WATERS (1999) und RIESENFELD ET AL. (2004) – wie bereits unter B2.2.1 beschrieben - auch durch das Vorkommen aminoglykosidproduzierender Mikroorganismen in der Rhizosphäre des Bodens und auf Pflanzen selektiert. So gehen auch AIRES ET AL. (1999) von der Überexpression des intrinsisch vorhandenen Effluxsystems MexXY-OprM in Folge eines Selektionsdrucks durch verschiedene antibakterielle Substanzen aus. Eine Überexpression des MexXY-OprM resultiert jedoch auch in der Resistenz gegenüber Amikacin und Gentamicin. Dieses Resistenzprofil wurde in der vorliegenden Untersuchung jedoch nicht festgestellt. Hingegen beschreiben LLANES ET AL. (2006) eine Gencasette (*aadA11*) mit dem Gen *ant(3'')* auf Integrons der Klasse 1, das Resistenz gegenüber Streptomycin und Spectinomycin – in Form enzymatischer Modifikation der beiden Antibiotika – codiert. Eine molekularbiologische Untersuchung könn-

---

<sup>6</sup> Die Einstufung als „intrinsisch resistent“ legt eine unimodale Population zugrunde, die mit 90 % der Stämme über dem Breakpoint zur Resistenz liegt (STOCK UND WIEDEMANN, 1998).

te über die genetische Grundlage der Streptomycin-Spectinomycin-Resistenz in der vorliegenden Untersuchung Aufschluss geben.

Nach INOUE (1999) werden streptomycin- und spectinomycinresistente *Pseudomonas* spp. durch das Vorkommen von Schwermetallionen z. B. im Boden coselektiert, da auf dem Transposon Tn21, das die Resistenz gegen beide Substanzen codiert, auch die Resistenzgene gegen Schwermetallionen – z. B. gegen  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  und  $\text{Co}^{2+}$  - lokalisiert sind (MINDLIN ET AL., 2001; ESSA ET AL., 2003).

*P. aeruginosa* verhält sich gegenüber **Doxyzyklin** aufgrund der geringen Zellwandpermeabilität und der Expression des Effluxsystems MexAB-OprM intrinsisch intermediär bis resistent (SCHWEIZER, 2003). *P. putida* und *P. fluorescens* sind nicht intrinsisch resistent gegenüber Tetrazyklinen. In der vorliegenden Untersuchung verhielten sich dennoch immerhin 59 % der *P. putida*- und 50 % der *P. fluorescens*-Isolate intermediär gegenüber Doxyzyklin. Wie aus den Tabellen A 15 und A 16 im Anhang hervorgeht, wurde jedoch jeweils bei 45 % der Isolate ein MHK-Wert von 2 µg/ml festgestellt, so dass eine Verschiebung um nur eine MHK-Stufe nach rechts eine bedeutende Auswirkung hinsichtlich der Einstufung als „sensibel“ oder „intermediär“ hatte. Die Einstufung als „natürlich resistent“ legt eine unimodale Population zugrunde, die mit 90 % der Stämme über dem Breakpoint zur Resistenz liegt (STOCK UND WIEDEMANN, 1998). Dies war in der vorliegenden Untersuchung nicht gegeben, so dass ein natürlich resistentes Verhalten bei diesen Spezies ausgeschlossen wird. Bei JENSEN ET AL. (2001) lagen *P. fluorescens*- und *P. putida*-Isolate aus Bodenproben zudem überwiegend im sensiblen Bereich (92 %), was der Vermutung eines intrinsisch intermediären bis resistenten Verhaltens gegenüber Tetrazyklinen ebenfalls widerspricht.

Als Ursache für die hohe Anzahl intermediärer Isolate in der vorliegenden Untersuchung könnte der Einsatz von Tetrazyklinen (u. a. Doxyzyklin) in Human- und Veterinärmedizin (ANONYMUS, 2000; KERN, 2004) mit der Folge eines weitreichenden horizontalen Resistenztransfers angenommen werden. Dagegen spricht jedoch die geringe Anzahl intermediärer bzw. resistenter Isolate bei den coliformen Bakterien wie auch bei den Enterokokken. PANG ET AL. (1994 B) beschreiben dagegen oxytetrazyklinproduzierende *Streptomyces* spp., die eine Selektion der low-level-Resistenz bei Bodenbakterien – so auch bei *P. putida* und *P. fluorescens* - induzieren. Des Weiteren führen bei Pseudomonaden Mutationen des *nalB*-Gens im *mexR*-Locus, auch durch Selektionsdruck *in vitro*, zu einer Überexpression des Effluxsystems MexAB-OprM. Wie bereits beschrieben führt diese Expression zu verringerter Empfindlichkeit gegenüber Fluorchinolonen, Piperacillin, Ceftazidim und darüber hinaus auch Tetrazyklinen. Der Verlust des OprD2 bewirkt außerdem geringere Sensitivität gegen Imipenem (SAITO ET AL., 1999; SRIKUMAR ET AL., 2000; LIVERMORE, 2001). Ob die Expression des MexAB-OprM jedoch spontan durch den Antibiotikadruck *in vitro* oder auch durch z. B.



Pflanzenmetaboliten oder Schwermetalle im Boden (TORRES ET AL., 1991; SALYERS ET AL., 1995; ALONSO ET AL., 2001) induziert wurde, konnte nicht abgeklärt werden.

*P. aeruginosa* erwies sich in der vorliegenden Untersuchung als vollständig sensibel gegenüber **Colistin**, während SADER UND JONES (2005) 18 % der *Pseudomonas* spp. aus klinischem Untersuchungsmaterial als „resistent“ beschreiben und bei der GENARS-Studie (2004) immerhin 84 % der Isolate als „intermediär“ eingestuft wurden. Colistin besitzt eine sehr gute Wirksamkeit gegenüber *Pseudomonas* spp., die sich auch in der vorliegenden Untersuchung bestätigen ließ. Somit wird Colistin als wirkungsvolle Alternative vor allem gegen multiresistente gramnegative Bakterien betrachtet (LI ET AL., 2005). *In vivo* kann jedoch unter physiologischen Calcium-Konzentrationen eine vollständige Inaktivierung des Wirkstoffs gegen *P. aeruginosa* eintreten (DEVRIESE UND DUTTA, 1981). Die unterschiedlichen Resistenz- bzw. Intermediärraten zwischen der vorliegenden Untersuchung und GENARS (2004) sind hingegen vermutlich auf die unterschiedlich angewendeten Breakpoints beider Untersuchungen zurückzuführen. Denn die Anwendung der Breakpoints nach DIN (2004) in der vorliegenden Untersuchung - wie bei GENARS (2004) - würde in einer Intermediärrate von 95 % und einer Resistenzrate von 5 % resultieren. In der vorliegenden Untersuchung wurden die Breakpoints nach DANMAP (2004) herangezogen.

### Mehrfachresistenzen

Wie aus den Tabellen 59, 62 und 65 hervorgeht, war die Resistenz gegenüber zwei und mehr Antibiotika bei 15 % der *P. aeruginosa*-Isolate vorhanden. Der Anteil der *P. putida*-Isolate mit Resistenz gegenüber zwei und mehr Antibiotika war deutlich höher (25 %). Bei *P. fluorescens* waren 20 % der Isolate resistent gegenüber zwei und mehr Antibiotika.

Aus den Resistenzprofilen geht hervor, dass es sich bei den Mehrfachresistenzen fast ausschließlich um  $\beta$ -Lactam-Aminoglykosid-Unempfindlichkeit handelt. Die Resistenz gegenüber Spectinomycin und/oder Streptomycin trat bei fast allen mehrfachresistenten Isolaten auf. Nach STRATTON UND TAUSK (1989) ist bei *P. aeruginosa* die gleichzeitige Resistenz gegenüber  $\beta$ -Lactamen und Aminoglykosiden weit verbreitet und beruht auf der Überexpression der intrinsischen Effluxsysteme MexAB-OprM und MexXY-OprM unter Selektionsdruck. Aminoglykoside dienen in der Kombinationsbehandlung der Verbesserung der Zellwandpermeabilität, so dass  $\beta$ -Lactamantibiotika bis zum Ort ihrer Wirkung – den Penicillin-Bindeproteinen - vordringen können. Bei Resistenz gegenüber einem der beiden Antibiotika, z. B. dem Aminoglykosid, wird der synergistische Effekt beider Antibiotika aufgehoben. Dies begünstigt die Resistenzentwicklung gegenüber dem anderen Antibiotikum (STRATTON UND TAUSK, 1989). In der Humanmedizin werden bei Pseudomonadeninfektionen meist Kombinationsbehandlungen mit den  $\beta$ -Lactamantibiotika (Imipenem, Ceftazidim und Piperacillin) und Aminoglykosiden empfohlen (VOGEL ET AL., 2004; PALLERONI, 2005; STAHLMANN UND LODE, 2005). Ge-

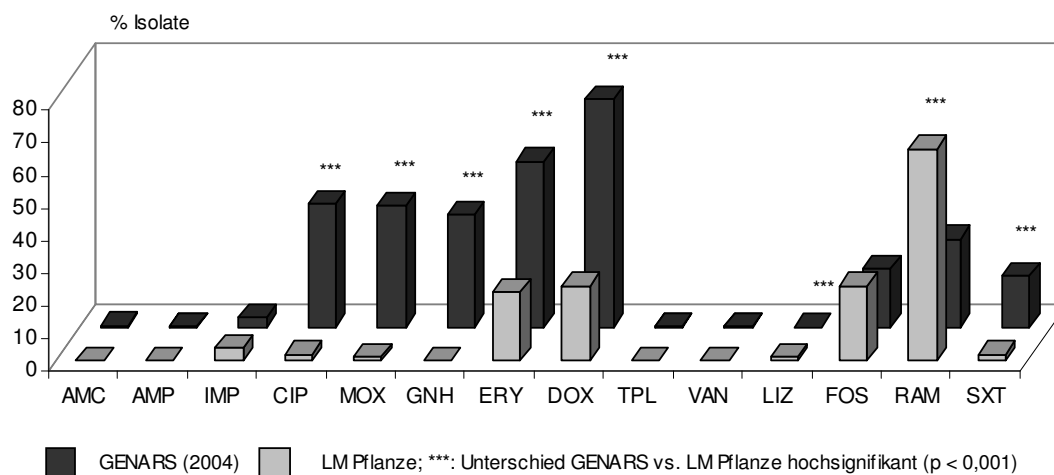
genüber den so genannten „Pseudomonaden-Aminoglykosiden“ (Amikacin, Gentamicin und Tobramycin) wurde Unempfindlichkeit in der vorliegenden Untersuchung selten beobachtet. Mehrfachresistenz gegenüber Imipenem oder Ceftazidim und „*Pseudomonas*-Aminoglykosiden“ wurde nicht festgestellt.

## 2.4 *Enterococcus* spp.

### *E. faecalis*: Vergleich der Daten mit der GENARS-Studie (2004)

Gegenüber sechs von 14 mit der GENARS-Studie (2004) verglichenen Substanzen zeigte sich *E. faecalis* aus pflanzlichen Lebensmitteln signifikant weniger resistent als *E. faecalis* aus humanklinischem Untersuchungsmaterial (vgl. Abbildung 24). Dies betrifft zum einen Antibiotika, die ausschließlich in der Humanmedizin Anwendung finden – so z. B. Ciprofloxacin und Moxifloxacin -, zum anderen Antibiotika, die auch in der Veterinärmedizin angewendet werden (Doxzyklin, Erythromycin und Co-Trimoxazol). Insbesondere Doxzyklin gehört zu den in der Human- und Veterinärmedizin am häufigsten angewendeten Antibiotika (DE WITH ET AL., 2004).

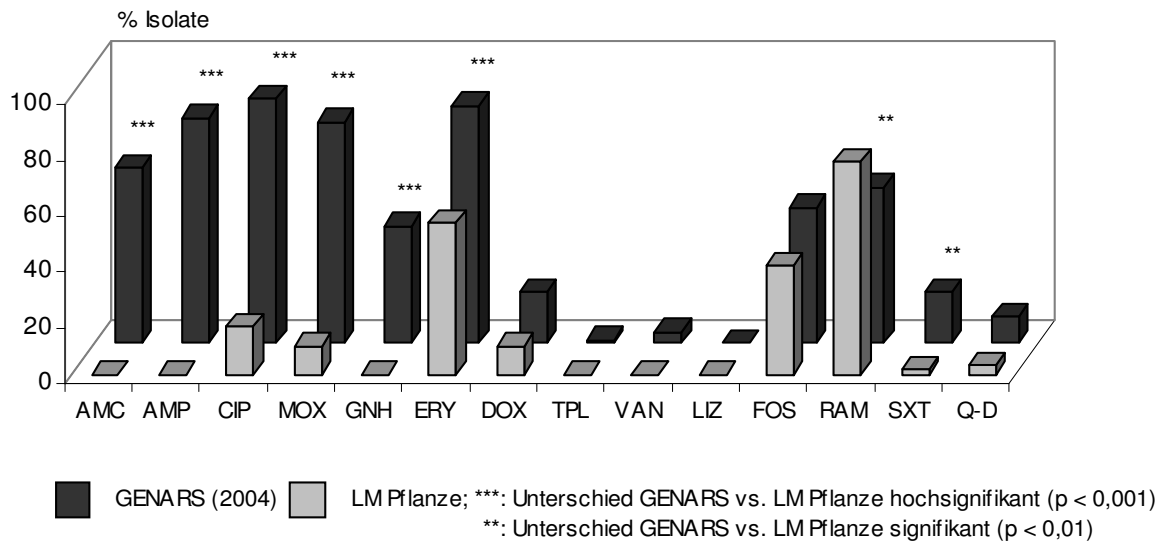
Gegenüber Linezolid und Rifampicin, beide ebenfalls ausschließlich in der Humanmedizin angewendet, waren signifikant mehr Isolate aus pflanzlichen Lebensmitteln resistent als humanklinische Isolate. Ob rifampicinresistente Isolate in pflanzlichen Lebensmitteln jedoch aus humaner Kontamination stammten oder durch spontane Mutation des *rpo(B)*-Gens ihre Resistenz erst während der Empfindlichkeitsprüfung erlangten, kann nicht nachvollzogen werden. Resistenz gegenüber den Reserveantibiotika Teicoplanin und Vancomycin war in beiden Gruppen nicht zu beobachten.



**Abbildung 24: Vergleich der prozentualen Resistenzraten von *E. faecalis* aus pflanzlichen Lebensmitteln (n = 100) und klinischem Untersuchungsmaterial (n = 518-2931) (GENARS, 2004)**

#### *E. faecium*: Vergleich der Daten mit der GENARS-Studie (2004)

*E. faecium* aus pflanzlichen Lebensmitteln verhielt sich gegenüber sieben der 14 mit der GENARS-Studie (2004) verglichenen Substanzen signifikant weniger resistent als Isolate aus humanklinischem Material, wie aus Abbildung 25 hervorgeht. Neben den in der Humanmedizin angewendeten Antibiotika Ciprofloxacin, Moxifloxacin und Gentamicin „high level“ betrifft dies auch die zusätzlich in der Veterinärmedizin eingesetzten Substanzen Erythromycin, Amoxicillin/Clavulansäure, Ampicillin und Co-Trimoxazol. Wie bei *E. faecalis* wurde hier gegenüber Rifampicin eine signifikant höhere Resistenz bei pflanzlichen Isolaten beobachtet, Resistenz gegenüber Glykopeptiden konnte weder bei pflanzlichen Isolaten noch bei humanklinischen Isolaten festgestellt werden.



**Abbildung 25: Vergleich der prozentualen Resistenzraten von *E. faecium* aus pflanzlichen Lebensmitteln (n = 59) und klinischem Untersuchungsmaterial (n = 292-1158) (GENARS, 2004)**

In der vorliegenden Untersuchung verhielten sich 23 % der *E. faecalis*-Isolate resistent gegenüber **Doxyzyklin**. Doxyzyklinresistenz wurde dagegen bei *E. faecium* in deutlich geringem Umfang festgestellt (10 %). Insgesamt war die Resistenzrate beider Spezies gegenüber Doxyzyklin in der vorliegenden Untersuchung auch deutlich niedriger als bei der GENARS-Studie (2004) (*E. faecalis*<sub>GENARS</sub>: 70 %; *E. faecium*<sub>GENARS</sub>: 18 %).

Tetrazyklinresistenz ist vor allem bei Isolaten von *E. faecalis* und *E. faecium* aus Fleisch- und Fleischprodukten (52 % bzw. 23 %; HUTHER, 2007) sowie Gülleproben (79 % bzw. 27 %; HÖLZEL, 2006) verbreitet und ist vermutlich auf die Einsatzhäufigkeit der Tetrazykline im veterinärmedizinischen Bereich – vor allem auch auf die Behandlung von Infektionen bei landwirtschaftlichen Nutztieren - zurückzuführen (BUTAYE ET AL., 2000). So bewegen sich auch bei DANMAP (2004) die Tetrazyklin-Resistenzraten bei Isolaten aus Fleisch und von Schlachttieren zwischen 44 und 82 %, während sich die *E. faecalis*-Isolate aus pflanzlichen Lebensmitteln bei JOHNSTON UND JAYKUS (2004) als vollständig sensibel gegenüber Tetrazyklin erweisen. Die Ergebnisse dieser Arbeiten spiegeln sich auch in der Untersuchung von HUYS ET AL. (2004) wider, die bei *E. faecalis*-Isolaten aus Fleisch und Milchprodukten hohe Tetrazyklin-Resistenzraten (37 %) ermittelten, bei pflanzlichen Lebensmitteln hingegen Tetrazyklinresistenz nicht feststellten.

Tetrazyklinresistenzgene, insbesondere das bei *Enterococcus* spp. häufig vorkommende Gen *tet(M)*, sind gewöhnlich auf dem konjugativen Transposon Tn916 lokalisiert (MURRAY,

1990). Ein ausgeprägter horizontaler Gen-Transfer findet, wie bereits unter B3.5 beschrieben, auch bei Enterokokken statt (KLARE ET AL., 2003; HUYS ET AL., 2004).

Ein Resistenztransfer über die Beregnung der Pflanzen mit kontaminiertem Wasser oder über *Faeces* landwirtschaftlicher Nutztiere ist möglich, da auch aus Schweinegülle tetracyklinresistente *E. faecium* isoliert wurden (HÖLZEL, 2006). *E. nonfc.*-Isolate exprimierten in der vorliegenden Untersuchung nur in geringem Umfang Doxycyclinresistenz (3 %). Dies entspricht weitgehend den Ergebnissen von HUYS ET AL. (2004). So isolierten die Autoren aus Stämmen der *E. nonfc.*-Gruppe deutlich weniger Tetracyklinresistenzgene als aus *E. faecalis*.

Die Resistenzrate bei **Rifampicin** stellte sich bei *E. faecalis* in der vorliegenden Untersuchung als signifikant höher dar als bei Isolaten aus klinischem Untersuchungsmaterial der GENARS-Studie (2004) (65 % vs. 27 %). Eine ähnlich hohe Resistenzrate wie in dieser Arbeit wurde auch von OMAR ET AL. (2004) bei Isolaten aus pflanzlichen Lebensmitteln festgestellt (57 %). Die Resistenzrate von *E. faecium* lag in der vorliegenden Untersuchung mit 76 % sogar deutlich über der Rate von *E. faecalis*. Doch auch bei der GENARS-Studie (2004) ist der Anteil resistenter *E. faecium*-Isolate höher als der von *E. faecalis* (56 % vs. 27 %). Bei OMAR ET AL. (2004) erwiesen sich *E. faecium*-Isolate aus unterschiedlichen Lebensmitteln sogar als fast vollständig rifampicinresistent (94 %). Rifampicin ist in der Humanmedizin ein Reserveantibiotikum zur Behandlung der Tuberkulose. Das Antibiotikum wird in der Therapie stets in Kombination mit anderen Antibiotika eingesetzt, da es zu unterschiedlich hohen Resistenzraten kommt (VOGEL ET AL., 2004). MOELLERING UND WENNERSTEN (1983) beschreiben zudem eine schwache Aktivität von Rifampicin gegen Enterokokken, die auch in der vorliegenden Untersuchung bei *E. nonfc.*, der – überwiegend - natürlichen Mikroflora von Pflanzen zutrifft. So beschreiben auch MÜLLER ET AL. (2001) bei 39 % der pflanzenassoziierten Enterokokken Rifampicinresistenz.

Rifampicinresistenz entsteht durch spontane Mutationen des *rpo(B)*-Gens, das die  $\beta$ -Untereinheit der RNA Polymerase codiert (TANIGUCHI ET AL., 1996). Diese Mutationen treten relativ häufig, jedoch in regional unterschiedlichen Raten auf (RICE und BONOMO, 1996). So wurden auch bei Isolaten aus tierischen Lebensmitteln (17 bzw. 28 %, HUTHER, 2007) und aus Schweinegülle (52 bzw. 73 %, HÖLZEL, 2006) hohe Resistenzraten gegenüber Rifampicin beobachtet, während sich z. B. bei BUSANI ET AL. (2004) die Resistenzraten von Isolaten aus *Faeces* landwirtschaftlicher Nutztiere lediglich zwischen 10 % und 33 % bewegen. Die horizontale Ausbreitung des mutierten Gens wird durch die chromosomale Lage vermutlich gering gehalten.

Die Resistenzraten der vorliegenden Untersuchung gegenüber **Fosfomycin** entsprechen weitgehend denen der GENARS-Studie (2004) (*E. faecalis*: 23 % bzw. vs. GENARS: 18 %;

*E. faecium*: 39 % vs. 48 %). Bei 66 % der sensiblen *E. faecalis*-Isolate der vorliegenden Untersuchung war zudem ein MHK-Wert von 32 µg/ml festzustellen. Diese befanden sich damit bereits am Breakpoint zur Resistenz.

Resistenz gegenüber Fosfomycin entsteht entweder durch chromosomale Mutation oder wird durch Plasmidtransfer der Gene *fos(A)*, *fos(B)* und *fos(C)* vermittelt und häufig bei *Staphylococcus epidermis* beschrieben (ETIENNE ET AL., 1989; ZILHAO UND COURVALIN, 1990). SHOJI ET AL. (1986) beschreiben pflanzenassoziierte *P. syringae* als Fosfomycinproduzenten. HENDLIN ET AL. (1969) isolierten Fosfomycin aus *Streptomyces* spp.. Die hohe Resistenzrate bei vor allem pflanzenassoziierten *E. nonfc.* (48 %) in der vorliegenden Untersuchung spricht für die Anwesenheit natürlich vorhandenen Fosfomycins in der Phyllosphäre und auch Rhizosphäre von Pflanzen. So verhielten sich auch bei HÖLZEL (2006) und HUTHER (2007) 20 - 53 % der *E. nonfc.*-Isolate (teilweise als Passanten des Intestinaltrakts von Tieren beschrieben) unempfindlich gegenüber Fosfomycin, während nur 8 % bis 10 % der *E. faecalis*-Isolate resistent gegenüber diesem Wirkstoff waren. Die deutlich höhere Resistenzrate bei Isolaten der *E. nonfc.*-Gruppe als von *E. faecalis* liegt vermutlich am höheren Anteil der *E. nonfc.*-Isolate an der Mikroflora von Pflanzen. Die enzymatische Modifikation des Fosfomycin in der Bakterienzelle – bei grampositiven Bakterien vermittelt durch das Resistenzgen *fos(B)* - wird zudem nach SUAREZ UND MENDOZA (1991) durch die Spurenelemente  $Fe^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  und  $Mn^{2+}$  sowie nach GARCIA ET AL. (1995) durch ATP gesteigert, also Substanzen, die unmittelbar auch in den Stoffwechsel der Pflanze (und des Tieres) involviert sind und in der Rhizosphäre der Pflanze vorliegen. Die Resistenz gegen Fosfomycin in der vorliegenden Untersuchung ist damit möglicherweise zum einen grundlegend in plasmidvermittelten Fosfomycinresistenz-Genen in pflanzenassoziierten Bakterien, zum anderen in der zusätzlichen Steigerung der enzymatischen Funktion durch die beschriebenen Spurenelemente sowie Phosphat zu erklären.

Gegenüber **Moxifloxacin** verhielten sich *E. faecalis*-Isolate fast vollständig sensibel, während gegenüber Ciprofloxacin 20 % der Isolate als „intermediär“, 2 % als „resistent“ und bei Enrofloxacin 98 % der Isolate als „intermediär“ eingestuft worden waren. Für *E. faecium* konnte gegenüber Moxifloxacin und Enrofloxacin eine höhere Resistenzrate (10 % bzw. 29 %) festgestellt werden als für *E. faecalis*. Insgesamt lagen die Resistenzraten gegenüber Ciprofloxacin und Moxifloxacin jedoch deutlich unter denen von GENARS (2004), bei dem 37 %<sub>MOX</sub> bzw. 38 %<sub>CIP</sub> der *E. faecalis*-Isolate und 79 %<sub>MOX</sub> bzw. 87 %<sub>CIP</sub> der *E. faecium*-Isolate als „resistent“ gegenüber den beiden Antibiotika eingestuft worden waren. Ciprofloxacin-Resistenzen wurden auch bei *E. nonfc.* festgestellt (18 %), während gegenüber dem stärker wirksamen Moxifloxacin 3 % der Isolate als „resistent“ eingestuft worden waren. Die Resistenz gegenüber Enrofloxacin war zwar gering (3,4 %), dennoch erwiesen sich auch hier 95 % der Isolate als intermediär gegenüber diesem Antibiotikum.

Enrofloxacin wird in der EU ausschließlich in der Veterinärmedizin eingesetzt und besitzt zudem eine schwache Wirksamkeit gegenüber Enterokokken (FLUIT ET AL., 2001; VETIDATA, 2006). Zur Bewertung der Resistenzeigenschaften gegenüber Enrofloxacin wurden die NCCLS-Richtlinien „Veterinärmedizin“ herangezogen, so dass eine Verschiebung des Breakpoints für „intermediär“ um zwei MHK-Stufen nach links (also in den sensiblen Bereich) erfolgt. Isolate, die also nach NCCLS „Humanmedizin“ noch sensibel wären, werden bei Anwendung der NCCLS „Veterinärmedizin“ als „intermediär“ eingestuft.

Ähnliche Resultate wie in der vorliegenden Untersuchung werden bei Ciprofloxacin auch von JOHNSTON UND JAYKUS (2004) bei *E. faecalis* und *E. faecium* aus pflanzlichen Lebensmitteln beobachtet, während OMAR ET AL. (2004) eine deutlich höhere Verschiebung nach „intermediär“ und „resistent“ feststellten. Fluorchinolonresistenzen basieren bei grampositiven Bakterien vor allem auf spontanen Mutationen der Gene *par(C)* und *par(E)* und treten bei Enterokokken häufig auf (EL AMIN ET AL., 1999; FLUIT ET AL., 2001). Ein Großteil der Enterokokken verhält sich daher überwiegend intermediär bis resistent gegenüber dieser Wirkstoffgruppe (KLARE ET AL., 2003; KRESKEN, 2000).

Gegenüber **Tylosin**, einem Antibiotikum, das ausschließlich in der Veterinärmedizin verwendet wird (VETIDATA, 2006), waren jeweils 10 % der *E. faecalis*- und *E. faecium*-Isolate resistent. **Erythromycinresistenz** wurde bei 21 % der *E. faecalis*-Isolate und bei 54 % der *E. faecium*-Isolate beobachtet. Bei GENARS (2004) exprimierten *E. faecalis*- und *E. faecium*-Isolate aus klinischem Untersuchungsmaterial gegenüber Erythromycin signifikant mehr Resistenzen (29 % bzw. 85 %) als in der vorliegenden Arbeit. Bei JOHNSTON UND JAYKUS (2004) waren hingegen nur 3 % der Isolate aus pflanzlichen Lebensmitteln resistent.

Plasmide und Transposons, die das Erythromycin-Resistenzgen *erm(B)* tragen, sind bei allen Enterokokken-Stämmen und darüber hinaus auch bei pflanzenassoziierten Bakterien weit verbreitet (MURRAY, 1990; SZCZEPANOWSKI ET AL., 2002). Dies steht nachweislich mit dem ehemaligen Einsatz des Tylosin als Leistungsförderer in der landwirtschaftlichen Nutztierhaltung und Anwendung des Erythromycin in der Human- und Veterinärmedizin in Zusammenhang (BUSANI ET AL., 2004; GEISS ET AL., 2004). Zwischen beiden Antibiotika sind Kreuzresistenzen möglich. Diese wurden auch von HULTQVIST (2003), BUSANI ET AL. (2004), HÖLZEL (2006) und HUTHER (2007) bei Isolaten tierischer Herkunft beobachtet. So wurden auch bei Isolaten aus Lebensmitteln tierischer Herkunft (HUTHER, 2007) und aus Schweinegülle (HÖLZEL, 2006) ähnlich hohe Resistenzraten (53 bis 65 %) wie bei Isolaten aus pflanzlichen Lebensmitteln beobachtet.

Bei *E. nonfc.* fällt neben den Resistenzraten gegenüber den Makroliden das überwiegend intermediäre Verhalten gegenüber **Quinupristin/Dalfopristin** (74 %) auf. Erythromycinresistenz ist Teil der phänotypischen Makrolid-Lincosamid-Streptogramin B-Resistenz (MLS<sub>B</sub>),

die eine „high level“ Resistenz gegenüber Clindamycin und die Resistenz gegenüber Streptogramin B bewirkt (MURRAY, 1990). Die sogenannte MLS<sub>B</sub>-Resistenz wird gewöhnlich durch das *erm(B)*-Gen codiert, das auf dem Transposon Tn917 lokalisiert ist. Das Transposon Tn917 ist bei Streptokokken- und Enterokokken-Isolaten von Menschen und Tieren weit verbreitet (MURRAY, 1990; KLARE ET AL., 2003). Antibiotika der MLS<sub>B</sub>-Gruppe - so auch Tylosin und die Streptogramin A/B-Kombination Virginiamycin S/M - wurden in der Vergangenheit als Leistungsförderer in der landwirtschaftlichen Nutztierhaltung eingesetzt. Resistenzen gegenüber Virginiamycin bewirken Kreuzresistenzen gegenüber Quinupristin/Dalfopristin, einem Reserveantibiotikum für glykopeptidresistente *E. faecium*-Stämme (KLARE ET AL., 2003).

WERNER ET AL. (2000) isolierten zudem aus Umweltproben in hohem Maße die Gene *sat(A)* und *sat(G)*, die die Resistenz gegenüber Streptogramin-Antibiotika codieren. Demnach sind diese Resistenzgene in der Umwelt weit verbreitet und stellen eine weitere Erklärung für die Intermediärverschiebung bei Quinupristin/Dalfopristin dar.

Resistenzen gegenüber **Vancomycin** und **Teicoplanin** waren bei allen *Enterococcus* spp. in der vorliegenden Untersuchung nicht festzustellen. Dies entspricht auch den Ergebnissen von HÖLZEL (2006) und HUTHER (2007) bei Isolaten aus Schweinegülle bzw. Schweine- und Geflügelfleisch als auch weitgehend den Ergebnissen von GENARS (2004). Hier waren lediglich 4,5 % bzw. 2 % der Isolate als „intermediär“ oder „resistent“ gegenüber Vancomycin bzw. Teicoplanin eingestuft worden.

In den vergangenen Jahren wurden einige Untersuchungen zum Resistenzverhalten von Enterokokken gegenüber den Reserveantibiotika Vancomycin und Teicoplanin durchgeführt. Die Autoren berichten sowohl von sehr hohen (KLARE ET AL., 1995; TEUBER ET AL., 1996; MURRAY, 1998; KLARE ET AL., 2003) als auch von sehr geringen Resistenzraten (KLEIN ET AL., 1998; REINERT ET AL., 1999; FRANZ ET AL., 2001; WEGENER ET AL., 2003) bei Isolaten aus klinischem Probenmaterial und Lebensmitteln tierischer Herkunft. Hohe Resistenzraten wurden dabei oft mit dem Einsatz des Glykopeptids Avoparcin als Leistungsförderer in der Geflügelhaltung in Verbindung gebracht. Tatsächlich berichten KLARE ET AL. (1999) von einer Abnahme der Glykopeptidresistenz bei Enterokokken seit dem Verbot von Avoparcin in der Tierhaltung. KLEIN ET AL. (1998) konnten jedoch anhand molekularbiologischer Methoden keine Zusammenhänge zwischen Resistenzen bei Isolaten aus Lebensmitteln und solchen aus klinischem Material feststellen.

Die günstige Resistenzlage der Enterokokken aus pflanzlichen Lebensmitteln gegenüber Vancomycin und Teicoplanin in der vorliegenden Untersuchung könnte somit durch zwei Faktoren bedingt sein: Zum einen könnte das Verbot des Avoparcin in der Tiermast und die daraus folgende Abnahme der Resistenzen bis hin zur vollständigen Sensibilität auch zu einer geringeren Ausbringung resistenter Bakterien mit den tierischen *Faeces* auf Anbauflächen pflanzlicher Lebensmittel geführt haben – vorausgesetzt, es erfolgte überhaupt eine



Düngung der Anbauflächen für Gemüsepflanzen mit Wirtschaftsdüngern. Zum anderen spiegeln die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung die zuvor beschriebene, gegenüber den Glykopeptiden allgemein günstige Resistenzlage der Enterokokken in Deutschland auch bei klinischen Isolaten (GENARS, 2004) und bei Isolaten aus Lebensmitteln tierischer Herkunft (HÖLZEL, 2006; HUTHER, 2007) wider.

Glykopeptidresistenzen wurden in der vorliegenden Untersuchung auch bei *E. nonfc.* nicht nachgewiesen. Bei einzelnen Stämmen dieser Gruppe (*E. gallinarum*) sind „low level“-Resistenzen gegenüber Vancomycin und Teicoplanin aufgrund der chromosomalen Lage der Gene *van(A)*, *van(B)* und *van(C-1)* bis *van(C-3)* intrinsisch verankert (KLARE UND WITTE, 1997 A UND 1997 B; LEMCKE UND BÜLTE, 2000). In der vorliegenden Untersuchung waren Isolate der *E. nonfc.*-Gruppe jedoch überwiegend *E. raffinosus*, bei dem keine intrinsische Resistenz gegenüber Glykopeptiden besteht.

Gegenüber **Imipenem** erwiesen sich 32 % der *E. faecalis*-Isolate als intermediär und 4 % als resistent. Im Vergleich zu GENARS (2004) ist diese Intermediärverschiebung relativ hoch (5 % intermediär, 3 % resistent). Vergleichsdaten von Isolaten aus Untersuchungen pflanzlicher Lebensmittel liegen derzeit nicht vor. Doch auch bei *E. nonfc.* wurde in der vorliegenden Untersuchung intermediäres Verhalten bei 22 % der Isolate beobachtet. Bei *E. faecalis*-Isolaten aus Hähnchen- und Schweinefleisch (HUTHER, 2007) sowie Schweinegülle (HÖLZEL, 2006) konnten jedoch nur geringe Intermediär- bzw. Resistenzraten gegenüber Imipenem festgestellt werden, während Isolate aus Rind- und Schweinefleisch einer anderen Studie ebenfalls eine Intermediärverschiebung erkennen lassen (13 % intermediär bzw. 4 % resistent) (KLEIN ET AL., 1998). Imipenem ist wirksam gegen Enterokokken, jedoch - aufgrund einer ausgeprägten Überproduktion des so genannten Penicillinbindeproteins PBP5 - nicht gegen *E. faecium* (EL AMIN ET AL., 2001). Durch die Untersuchung mit dem BBL Chrystal<sup>®</sup> konnten hier jedoch alle Isolate, die sich gegenüber Imipenem resistent verhielten, als *E. faecalis* bzw. *E. nonfc.* bestätigt werden. ONO ET AL. (2005) wiesen nach, dass imipenemresistente *E. faecalis*-Isolate aufgrund einer Punktmutation des Penicillinbindeproteins PBP4 ebenfalls ampicillinresistent waren. In der vorliegenden Untersuchung verhielten sich jedoch alle imipenemintermediären und -resistenten *E. faecalis*- und *E. nonfc.*-Isolate sensibel gegenüber Ampicillin.

Resistenzen gegenüber **Streptomycin HL** wurden bei 10 % der *E. faecium* und bei 9 % der *E. nonfc.*-Isolate, solche gegenüber **Gentamicin HL** gar nicht festgestellt. Hier sind die Ergebnisse anderer Arbeiten weit gestreut. So verhielten sich gegenüber Gentamicin HL 35 bzw. 42 % der Isolate (*E. faecalis* bzw. *E. faecium*) bei GENARS (2004) resistent. Bei WALLRAUCH ET AL. (1997) waren 2,5 % bzw. 55 % der *E. faecium*-Isolate aus klinischem Untersuchungsmaterial gegenüber Gentamicin HL bzw. Streptomycin HL resistent. In Untersuchun-

gen von Isolaten aus pflanzlichen Lebensmitteln, Fleisch und Käse waren dagegen diese Resistenzen gar nicht oder nur in sehr geringem Umfang (bis zu 4 %) vorhanden (KLEIN ET AL., 1998; FRANZ ET AL., 2001; JOHNSTON UND JAYKUS, 2004; OMAR ET AL., 2004). Bei DANMAP (2004) und HÖLZEL (2006) wurden hingegen Resistenzraten von 25 bzw. 34 % gegenüber Streptomycin HL bei Isolaten aus Schweinegülle beobachtet, während die Raten gegenüber Gentamicin HL, wie in der vorliegenden Untersuchung, dort gering waren (2 bzw. 8 %).

Es wird deutlich, dass Enterokokken aus pflanzlichen Lebensmitteln und der Umwelt gegenüber HL-Aminoglykosiden deutlich seltener als „resistent“ eingestuft wurden als Isolate aus klinischem Material oder vom Tier, was vermutlich auf die Anwendung dieser Substanzen im Human- und Veterinärbereich zurückzuführen ist. So sehen RICE ET AL. (1995) bei Enterokokken aus Wasserproben (Grundwasser, kommunalen Abwässern, Bächen und Flüssen sowie landwirtschaftlichem Oberflächenabfluss) bei 1,6 bzw. 5 % der Isolate Gentamicin HL- bzw. Streptomycin HL-Resistenz und führen diese Ergebnisse auf die Anwendung von Aminoglykosiden in der Humanmedizin und anschließenden Eintrag in die Umwelt mittels Abwasser zurück. Entsprechend könnte auch die Resistenzrate von *E. nonfc.* gegenüber Streptomycin HL in der vorliegenden Untersuchung erklärt werden. Andererseits steht die Ausprägung einer Streptomycin-HL-Resistenz evtl. in Verbindung mit bakteriellen Plasmiden, die insbesondere in der Umwelt von Pflanzen und im Boden weit verbreitet sind, die z. B. bei *Pseudomonas* spp. auch die Resistenz gegenüber Streptomycin und Pflanzenmetaboliten, Nährstoffen und Schwermetallionen tragen (INOUE, 1999). Ein Plasmidtransfer von gramnegativen auf grampositive Bakterien ist möglich (WATERS, 1999).

HL-Aminoglykosid-Resistenzen treten oft in Verbindung mit Resistenzen gegenüber  $\beta$ -Lactamantibiotika auf, da der Synergismus beider Antibiotika durch die Resistenz gegenüber einem der Antibiotika fehlt (MURRAY, 1990). In der vorliegenden Untersuchung erwiesen sich jedoch gegenüber Streptomycin HL resistente Enterokokken stets sensibel gegenüber Penicillinen.

#### Mehrfachresistenzen und Resistenzprofile bei *Enterococcus* spp.

Resistenzen gegenüber zwei und mehr Antibiotika wurden bei *Enterococcus* spp. in der vorliegenden Untersuchung wesentlich häufiger beobachtet als bei den übrigen Bakterienarten. Doch auch hier wurde deutlich, dass Enterokokken überwiegend gegenüber Antibiotika aus einer Wirkstoffklasse resistent waren. Beispielsweise wurde die Resistenz gegenüber den Makroliden Tylosin und Erythromycin, bei denen eine komplette Kreuzresistenz besteht, bei fast allen mehrfachresistenten Isolaten beobachtet. Ein häufiges Resistenzprofil stellte auch die Kombination Rifampicin und Fosfomycin dar. Insgesamt exprimierten damit bei den Ente-

rokokken deutlich mehr Isolate Resistenzen gegenüber verschiedenen Wirkstoffklassen als bei den anderen Bakterienarten. Enterokokken gelten aufgrund ihrer Möglichkeit eines ausgeprägten Resistenztransfers somit zurecht als Reservoir vieler Antibiotikaresistenzen (KLARE UND WITTE, 1997 A; KLARE ET AL., 2003).

### 3 Einordnung der molekularbiologischen Untersuchungen

Die molekularbiologischen Untersuchungen dienten als Orientierung zur Einschätzung des potentiellen Tetrazyklin-Resistenzgehalts für *tet(M)*, *tet(O)* und *tet(B)* in den Proben, da nur eine gewisse Auswahl der zu isolierenden Bakterienarten getroffen wurde und somit weitere potentiell tetrazyklinresistente Bakterien in pflanzlichem Material in der phänotypischen Empfindlichkeitstestung nicht erfasst wurden. Nach LEBUHN ET AL. (2005) beträgt der Anteil nichtkultivierbarer Bakterien zudem 80 % bis 95 %, so dass das in ubiquitär vorkommenden Bakterien vorhandene Resistenzpotential durch die phänotypische Empfindlichkeitstestung nicht vollständig abgeschätzt werden kann.

Wenngleich die molekularbiologischen Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit einen orientierenden Charakter besitzen, soll nicht unerwähnt bleiben, dass die Ergebnisse insbesondere unter Berücksichtigung der Daten aus der Tierhaltung (HÖLZEL, 2006) richtungweisend hinsichtlich einer potentiellen Kontamination mit tetrazyklinresistenten Bakterien sind.

#### 3.1 Methodische Aspekte

Veröffentlichungen zur Isolierung von Tetrazyklinresistenzgenen aus pflanzlichen Lebensmitteln sind derzeit nicht bekannt. Es existieren jedoch Untersuchungen zum Tetrazyklinresistenzgen-Gehalt in Boden- und Gülleproben (AGERSØ ET AL., 2004; HÖLZEL, 2006). In Anlehnung an diese Arbeiten wurde zunächst die Untersuchungsmethode validiert. Wie bereits unter C2.5 „Methoden der molekularbiologischen Untersuchungen“ beschrieben, wurde zur Herstellung einer DNA-freien Pflanzenprobe für den Dotierungsversuch eine Cobalt<sub>60</sub>-Bestrahlungsdosis von 409 kGy für 72 h gewählt. Dabei wurde in der vorliegenden Untersuchung berücksichtigt, dass bei AGERSØ ET AL. (2004) die behandelte Probe bereits im PCR-Ansatz schon vor der Bestrahlung negativ hinsichtlich *tet(M)* war und dort eine Bestrahlungsdosis von 25 kGy ausreichte, um eine „sicher“ negative Probe zu erhalten. Die Feldprobe der vorliegenden Untersuchung enthielt dagegen vor der Bestrahlung  $10^3 \log_{10}$  Kopien *tet(M)* je cm<sup>2</sup> Probenoberfläche. Somit musste die Bestrahlung an die Kopienzahl des pflanzlichen Probenmaterials angepasst werden. Nach der Bestrahlung wurde zunächst in der Probe keines der zu untersuchenden tet-Gene festgestellt. In den Extraktionsleerwerten hingegen wurden *tet(M)* und *tet(B)* in Gehalten von bis zu 1,8  $\log_{10}$  Kopien je Aliquot beobachtet. Dies erschwerte die Einschätzung des tatsächlichen *tet(M)*- und *tet(B)*-Gehalts der Feldproben. Die Berücksichtigung des oben beschriebenen „Cut off“ erlaubte zwar eine gewisse

Sicherheit in der Bewertung der realen Gengehalte, möglicherweise wurde jedoch der tatsächliche *tet*(M)- bzw. *tet*(B)-Gehalt der Proben damit über- oder unterschätzt. Nach WILSON (1997) gehören Kreuzkontaminationen zu den häufigsten Ursachen falschpositiver Ergebnisse. Der Autor beschreibt zudem unterschiedliche Kontaminationen der Zentrifugenröhrchen bzw. der Säulen bei unterschiedlichen Extraktionskits. Nach AMINOV ET AL. (2001) und CHOPRA UND ROBERTS (2001) sind Tetrazyklinresistenzgene jedoch auch ohne antibiotischen Selektionsdruck weit verbreitet. Inwieweit es sich in der vorliegenden Untersuchung um eine „Grundkontamination“ der Säulen oder um eine spätere Kreuzkontamination anderen Ursprungs, z. B. durch kontaminierte Arbeitsflächen, handelte, konnte abschließend nicht geklärt werden. Die Bestrahlung der Säulen und Zentrifugenröhrchen brachte zumindest einen kurzfristigen Erfolg.

#### Kopienanzahl der Standardstämme

Die Ergebnisse von *tet*(M) waren bereits indirekt um die Wiederfindungsraten - aufgrund der Verwendung eines DNA-Extrakts aus pflanzlichem Material - bereinigt. Die Verwendung eines *tet*(M)-Extrakts aus pflanzlichen Lebensmitteln hat den Vorteil, dass eventuell auftretende inhibitorische Effekte den Standard ebenso betreffen wie die Probe (AGERSØ ET AL., 2004). *Tet*(O) und *tet*(B)-Standardstämme tragen eine nicht bekannte Anzahl von Kopien des jeweiligen Gens im Genom. Eine vergleichende Bewertung der einzelnen Gene ist daher unmittelbar nicht möglich. Desweiteren könnten die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung hinsichtlich der „wahren“ Gehalte für *tet*(O) und *tet*(B) unterschätzt worden sein, dahingehend, dass die Standardstämme mehr als eine Kopie des jeweiligen Gens im Genom tragen. Die ermittelten Werte für *tet*(O) und *tet*(B) müssen daher als Minimalwerte betrachtet werden.

#### Inhibition der PCR, falsch-negative Ergebnisse

Die Isolierung von Bakterien-DNA aus Umweltproben wird aufgrund der in den Proben enthaltenen, mitextrahierten Hemmstoffe (Inhibitoren) als problematisch beschrieben. So können diese Inhibitoren zu einer kompletten Hemmung der Reaktion oder zu einem Herabsetzen der Sensitivität des Nachweises führen. Inhibitoren in pflanzlichen Lebensmitteln sind oftmals Saccharide und Salze (ROSSEN ET AL., 1992; WILSON, 1997; MÜLLER, 2001). Ziel der vorliegenden Untersuchung war es die DNA aus Bakterien, von der Oberfläche des Probenmaterials zu isolieren. Somit erfolgte im Gegensatz zu LLOP ET AL. (1999) lediglich ein „Abspülen“ der Bakterien von der Pflanzenoberfläche und eine anschließende Extraktion der DNA aus diesen Bakterien. Der Anteil mitextrahierter Pflanzeninhaltsstoffe war daher im Vergleich zu LLOP ET AL. (1999), die DNA phytopathogener Bakterien aus dem Pflanzenepithel isolierten, geringer. Dennoch konnten die Autoren eine Nachweisgrenze von  $10^2$  bis  $10^3 \log_{10}$  Kopien/ml Pflanzenextrakt im Dotierungsversuch ermitteln.

### 3.2 Gehalte der Feldproben

Insgesamt wurden 301 Proben pflanzlicher Herkunft einer molekularbiologischen Untersuchung hinsichtlich ihrer Gehalte an *tet(B)*, *tet(M)* und *tet(O)* unterzogen. Die Kopienzahl aus pflanzlichem Probenmaterial lag mit  $3,0 \log_{10}$  Kopien/cm<sup>2</sup> Probenoberfläche bei *tet(M)* (entspr.  $5,3 \log_{10}$  Kopien/g),  $2,8 \log_{10}$  Kopien/cm<sup>2</sup> bei *tet(O)* (entspr.  $4,8 \log_{10}$ /g) und  $4,1 \log_{10}$  Kopien/cm<sup>2</sup> bei *tet(B)* (entspr.  $5,3 \log_{10}$ /g) weit unter der Kopienzahl von HÖLZEL (2006), die aus Schweinegülle bei *tet(M)*  $8,2 \log_{10}$ , bei *tet(O)*  $6,9 \log_{10}$  und bei *tet(B)*  $5,8 \log_{10}$  Kopien/g Probe isolierte. Im Lebensmittel tierischer Herkunft (HUTHER, 2007) waren ähnliche Kopienzahlen wie im pflanzlichen Lebensmittel nachzuweisen (*tet(M)*: 2,16 bzw.  $3,38 \log_{10}$  Kopien/cm<sup>2</sup> Probenoberfläche, *tet(O)*: 2,0 bzw.  $2,27 \log_{10}$  Kopien/cm<sup>2</sup>).

Die höheren Gehalte der Tetrazyklinresistenzgene in Schweinegülle als in pflanzlichen Lebensmitteln lassen den häufigen Einsatz der Tetrazykline in der Behandlung erkrankter landwirtschaftlicher Nutztiere (ANONYMUS, 2000) erkennen. Die Ausbringung der Schweinegülle auf Anbauflächen für pflanzliche Lebensmittel stellt einen potentiellen Weg des Transfers für Resistenzgene auf das pflanzliche Lebensmittel dar. So war in der vorliegenden Untersuchung signifikant mehr *tet(O)* und *tet(B)* aus landwirtschaftlichem Probenmaterial als aus Supermarktproben (*tet(B)* 62 % vs. 35 % bzw. *tet(O)* 16 % vs. 8 %) auffindbar. Immerhin 53 % der Proben aus landwirtschaftlichen Betrieben waren positiv hinsichtlich *tet(M)*. Auch AGERSØ ET AL. (2004) isolierten noch ein Jahr nach der Ausbringung von Gülle aus Bodenproben *tet(M)*. HÖLZEL (2006) konnte hingegen die Gene *tet(B)*, *tet(M)* und *tet(O)* aus Bodenproben zwar unmittelbar nach der Gülleausbringung, jedoch drei Wochen nach der Behandlung mit tetrazyklinhaltiger Gülle nicht mehr isolieren. Die bereits genannte Inaktivierung der Tetrazykline (z. B. aus Gülle) durch Schwermetallionen im Boden wird als mögliche Ursache für einen abnehmenden Selektionsdruck diskutiert (HÖLZEL, 2006). SCHNABEL UND JONES (1999), CHOPRA UND ROBERTS (2001) UND HUYS ET AL. (2004) stellten hingegen eine weite Verbreitung von *tet(M)* und *tet(B)* fest. Beide Gene wurden in grampositiven wie gramnegativen Bakterien tierischen und humanen Ursprungs sowie in Lebensmitteln, auf Pflanzen und in der Umwelt nachgewiesen. Eine Kontamination des pflanzlichen Lebensmittels kann somit auch auf den Einsatz der Tetrazykline zur Behandlung erkrankter Nutztiere und in der Humanmedizin und eine anschließende Kontamination, z. B. über „belastetes“ Wasser bei der Verarbeitung der Produkte zurückgeführt werden.

Desweiteren waren *tet(B)* in 44 % und *tet(M)* in 60 % des Probenmaterials detektiert worden. Dies entspricht den Aussagen von ROBERTS (1989), ROBERTS (1990) und CHOPRA UND ROBERTS (2001), die *tet(B)* bei gramnegativen Bakterien und *tet(M)* bei grampositiven als am häufigsten isolierte Tetrazyklinresistenzgene beschreiben. *Tet(B)* wurde von HILLEN UND BERENS (1994) und SCHNABEL UND JONES (1999) stets auf dem Transposon Tn10 lokalisiert. Hingegen befindet sich *tet(M)* auf dem Transposon Tn916 (MURRAY, 1990; SALYERS ET AL.,

1995). Eine weite Verbreitung dieser Gene wird also auch durch ihre Lage auf transferierbaren Elementen begünstigt.

Wenngleich aufgrund unterschiedlicher Wiederfindungsraten – bedingt durch verschiedene Extraktionsmethoden und damit potentielle Inhibition der PCR (BURTSCHER, 2002) – ein direkter Vergleich zwischen den Untersuchungen (Pflanzen und Gülle) problematisch ist, spiegeln sich die Ergebnisse der genetischen Untersuchungen in den Ergebnissen der phänotypischen Empfindlichkeitstestung bei Doxyzyklin wider. Beispielsweise war hier die Resistenzrate bei *E. coli* aus Gülleproben bis zu dreimal höher als die Resistenzrate bei *E. coli* aus pflanzlichen Lebensmitteln.

#### 4 Einordnung der Befunde hinsichtlich einer Übertragung resistenter Keime auf den Verbraucher

Aus pflanzlichen Lebensmitteln wurden - unter Berücksichtigung der ausgewählten zu isolierenden Bakterienarten - hauptsächlich ubiquitär vorkommende, fakultativ pathogene Gattungen isoliert. Die isolierten Bakterienarten sind sowohl teilweise Bestandteil der Intestinalflora von Mensch und Tier als auch der Mikroflora von Pflanzen.

Die Resistenzraten gegenüber den in der Humanmedizin angewendeten Antibiotika waren bei gramnegativen Isolaten aus pflanzlichen Lebensmitteln stets, bei allen anderen Antibiotika fast immer geringer als bei Isolaten aus klinischem Untersuchungsmaterial. Auch bei den Enterokokken zeigten sich in fast allen Fällen signifikant mehr Isolate aus klinischem Untersuchungsmaterial resistent als Isolate aus pflanzlichen Lebensmitteln. Die hohen Resistenzraten gegenüber Rifampicin bei Isolaten aus pflanzlichen Lebensmitteln sind in der bekannten schwächeren Wirkung dieses Antibiotikums gegenüber Enterokokken begründet, denn auch Isolate vom Tier (HUTHER, 2007) und aus Schweinegülle (HÖLZEL, 2006) sowie aus Weidegras (ULRICH UND MÜLLER, 1998) wiesen hohe Resistenzraten gegenüber Rifampicin auf. Die Rifampicinresistenz entsteht durch spontane Mutationen im Bakteriengenom (RICE UND BONOMO, 1996). Zu horizontalvermittelter Rifampicinresistenz ist derzeit keine Veröffentlichung bekannt. Ob eine Übertragung dieser Resistenz auf humanpathogene Bakterien möglich ist, müssten weitere Untersuchungen klären.

Hohe Resistenzraten gegenüber Penicillinen und Cephalosporinen bei – an den Darm adaptiertem - *E. coli* sind vermutlich auf den häufigen Einsatz dieser Antibiotika in der Humanmedizin - und eine anschließende Kontamination der pflanzlichen Produkte – zurückzuführen. Die Kontamination mit *E. coli* lag jedoch lediglich bei 4 %, so dass eine Gefährdung des Verbrauchers sich mit resistenten *E. coli*-Isolaten über pflanzliche Lebensmittel zu infizieren geringer ist als über tierische Lebensmittel (HUTHER, 2007), die deutlich häufiger belastet waren (49 % Schweinefleisch, 86 % Hähnchenfleisch).

Die Resistenz gegenüber Streptomycin und Spectinomycin war bei allen gramnegativen Bakterien vergleichsweise hoch und erreichte auch – insbesondere bei Spectinomycin - die Rate von Isolaten aus tierischen Lebensmitteln und Schweinegülle. Die Resistenz gegenüber beiden Antibiotika ist - auch in pflanzlichen und tierischen Lebensmitteln - aufgrund eines weitreichenden Gentransfers weit verbreitet, wenngleich die Ursachen – zum einen der Einsatz beider Antibiotika in Human- und Veterinärmedizin, zum anderen aminoglykosidproduzierende Mikroorganismen sowie nicht-antibakterielle Selektoren im Boden und auf Pflanzen - unterschiedlich sind. Die Resistenz gegenüber Spectinomycin ist zudem in der schwachen Wirkung gegen Bakterien – mit Ausnahme von *Neisseria gonorrhoeae* - begründet. Die Empfindlichkeit gegenüber Amikacin, Gentamicin und Tobramycin war in der vorliegenden Unter-

suchung nicht beeinträchtigt, dies zeigte sich auch bei *P. aeruginosa*, der als oftmals hochresistent gegenüber einer Vielzahl klinisch wichtiger Aminoglykoside gilt und dementsprechend bei GENARS (2004) auch signifikant höhere Resistenzraten erreichte als in der vorliegenden Untersuchung.

Die Resistenz gegenüber Doxzyklin war deutlich geringer als bei Isolaten vom Tier (HÖLZEL, 2006; HUTHER, 2007) und aus klinischem Untersuchungsmaterial (GENARS, 2004). Lediglich bei *E. faecalis* und *E. faecium* war diese Resistenz in der vorliegenden Untersuchung in nennenswertem Maße vorhanden und ist vermutlich auf den häufigen Einsatz dieses Wirkstoffs in Human- und Veterinärmedizin zurückzuführen. Eine Infektion mit doxzyklinresistenten Enterokokken über das pflanzliche Lebensmittel ist demnach möglich, das Risiko im Vergleich zu einer Infektion über tierische Lebensmittel, eine direkte Kontamination mit *Faeces* oder im klinischen Bereich jedoch gering. Die genetischen Untersuchungen zeigten zwar eine weite Verbreitung von *tet(B)* und *tet(M)* auch in pflanzlichen Lebensmitteln. Dennoch waren Schweinegülle (HÖLZEL, 2006) erwartungsgemäß stärker belastet als pflanzliche oder tierische Lebensmittel.

Aus der vorliegenden Untersuchung geht hervor, dass es sich bei mehrfachresistenten Bakterien vor allem um Gattungen handelt, die gewöhnlich aus dem Darm von Mensch und Tier isoliert werden. Pflanzen- und bodenassoziierte Bakterien zeigten dagegen deutlich weniger Resistenzen. Eine Kontamination pflanzlicher Lebensmittel mit bereits resistenten Bakterien aus dem humanen oder tierischen Bereich begünstigt den Resistenztransfer zum Menschen. Nach HIRSCH ET AL. (1999) und ESIOBU ET AL. (2002) ist ein Resistenztransfer von Krankenhausbakterien und solchen aus Nutztierbeständen auf das pflanzliche Lebensmittel auch durch die Beregnung mit kontaminiertem Wasser möglich. Dies erklärt möglicherweise das Vorkommen resistenter, an den Menschen oder das Tier adaptierter Bakterien.

Die Produktion von antimikrobiellen Substanzen durch Pflanzen oder Mikroorganismen sowie das Vorkommen von Schwermetallen und weiteren Selektoren im Boden und auf Pflanzen wurde in der Literatur mehrfach als Ursache auch für die Entstehung von Resistenzen gegenüber medizinisch angewandten Antibiotika (Streptomycin, Tetrazyklin) beschrieben (THOMAS ET AL., 1981; LIM ET AL., 1988; PANG ET AL., 1994 B; WALSH ET AL., 1994). Tatsächlich wurde auch in der vorliegenden Untersuchung beobachtet, dass boden- und pflanzenassoziierte Bakterien, z. B. *Pseudomonas* spp., reduzierte Sensitivität gegenüber diesen Wirkstoffen zeigten. Zudem zeigten Bakterien, wie *Enterobacter* spp. und *Pseudomonas* spp., aus Fruchtgemüse signifikant häufiger Resistenzen als Bakterien aus anderen Gemüsesorten, so dass hier mitunter Zusammenhänge zwischen den (antimikrobiellen) Substanzen dieser Pflanzen und dem Resistenzverhalten der Bakterien bestehen. Eine Analyse der Pflanzeninhaltsstoffe könnte diese Zusammenhänge näher beleuchten.



Eine Selektion antibiotikaresistenter Bakterien ist, wie beschrieben, auch durch das Vorkommen von Schwermetallen, wie Kupfer, im Boden und auf Pflanzen möglich. Kupfer ist auch Bestandteil von Pestiziden (ANONYMUS, 2006).

Der Boden der Anbauflächen für pflanzliche Lebensmittel stellt möglicherweise einen „Puffer“ im Resistenztransfer „Tier → Gülle → Pflanze“ dar, indem Wirkstoffverbindungen, z. B. Tetrazykline, an Metallionen gebunden und auf diese Weise unwirksam gemacht werden. Die Beobachtung der Resistenzsituation bei pflanzlichen Lebensmitteln kann damit ein Hinweis darauf sein, inwieweit die Pufferkapazität des Bodens ausgereizt ist.

Wenngleich Resistenzen bei klinisch bedeutsamen Antibiotika hier nicht oder nur in geringem Umfang festgestellt wurden und Resistenzen gegenüber häufig in der Human- und Veterinärmedizin verwendeten Antibiotika meist geringer waren als bei Isolaten aus klinischem Untersuchungsmaterial, kann eine Beteiligung pflanzlicher Lebensmittel an der Verbreitung von Resistenzen – insbesondere aus dem Humanbereich durch Kontamination – zwar nicht ausgeschlossen werden, zumal die in der vorliegenden Untersuchung ausgewählten Lebensmittel überwiegend roh verzehrt werden. ÖSTERBLAD ET AL. (1999), BOEHME ET AL. (2004) und OMAR ET AL. (2004) ermittelten jedoch teils höhere Resistenzraten im pflanzlichen Lebensmittel. Somit besteht möglicherweise ein Zusammenhang der „Belastung“ pflanzlicher Lebensmittel mit der regionalen Verschreibungspraxis für Antibiotika.

In der vorliegenden Untersuchung erwiesen sich Bakterien aus pflanzlichen Lebensmitteln meist in geringerem Umfang als unempfindlich als Isolate aus Lebensmitteln tierischer Herkunft, Gülle oder klinischem Untersuchungsmaterial. Die Möglichkeiten eines Resistenztransfers auch über pflanzliche Lebensmittel wurden in der vorliegenden Arbeit aufgeführt und diskutiert. Ein Resistenzmonitoring empfiehlt sich auch bei pflanzlichen Lebensmitteln. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass bei pflanzlichen Lebensmitteln hinsichtlich der isolierten Bakterienarten und hinsichtlich der getesteten Antibiotika zum Untersuchungszeitpunkt von einem in geringem Maße einzustufenden Resistenztransfer über pflanzliche Lebensmittel auf den Verbraucher auszugehen ist.

## F Zusammenfassung

Die zunehmende Verbreitung antibiotikaresistenter, humanpathogener Bakterien ist ein weltweites Problem, das die erfolgreiche Behandlung von Infektionskrankheiten erschwert. Als Ursache gelten der nicht indizierte Einsatz von Antibiotika in der Humanmedizin und die Behandlung von Infektionen bei landwirtschaftlichen Nutztieren. Es existieren zahlreiche Studien zum Vorkommen von antibiotikaresistenten Bakterien in Lebensmitteln tierischer Herkunft. Veröffentlichungen zu Untersuchungen der Resistenzproblematik bei pflanzlichen Lebensmitteln sind nur in geringem Umfang verfügbar. Die vorliegende Arbeit sollte das Vorkommen antibiotikaresistenter Bakterien im pflanzlichen Lebensmittel beleuchten. Hierzu wurde untersucht, ob und in welchem Umfang Bakterien in pflanzlichen Lebensmitteln, die überwiegend roh verzehrt werden, gegenüber ausgewählten, therapeutisch bedeutsamen Antibiotika für die Veterinär- und Humanmedizin Resistenzen exprimieren. Weiterhin wurden die Gehalte ausgewählter Tetrazyklin-Resistenzgene ermittelt, da Tetrazyklin zu den am häufigsten angewendeten Wirkstoffen gehört und *tet(B)*, *tet(M)* und *tet(O)* oftmals aus unterschiedlichen Matrices isoliert werden.

Insgesamt wurden 1000 Proben pflanzlicher Herkunft zu diesem Zweck aus landwirtschaftlichen Betrieben und von Supermärkten mikrobiologisch-kulturellen Untersuchungen sowie einem phänotypischen Resistenzmonitoring unterzogen. 301 der Proben wurden zudem mittels Realtime-PCR nach der direkten DNA-Extraktion aus dem Probenmaterial auf die quantitativen Gehalte der Tetrazyklin-Resistenzgene *tet(B)*, *tet(M)* und *tet(O)* untersucht.

Aus 141 Proben wurden keine der ausgewählten Bakterienarten isoliert. In 34 Proben wurde *E. coli* nachgewiesen, hingegen wurden coliforme Bakterien aus 688 Proben isoliert. Weiterhin wurden *Enterococcus* spp. (n = 682) und *Pseudomonas* spp. (n = 439) bestätigt, während *Listeria* spp. in elf und *Salmonella* spp. nur in einer Probe nachgewiesen werden konnten. Im Mikrodilutionsverfahren wurden die Isolate einer Empfindlichkeitsprüfung gegenüber bis zu 30 Wirkstoffen unterzogen.

Der Vergleich der Resistenzdaten mit den Werten humanklinischer Isolate ergab, dass der Prozentsatz resistenter Bakterienisolate aus pflanzlichen Lebensmitteln in den meisten Fällen deutlich unter den Resistenzraten der klinischen Isolate lag. Auch im Vergleich mit Isolaten aus Schweinegülle erwiesen sich weniger Isolate aus pflanzlichen Lebensmitteln als unempfindlich. Vor allem bei den coliformen Bakterien wurden geringe Resistenzraten ermittelt. Unempfindlich waren diese Isolate meist gegenüber den Penicillinen – vor allem Ampicillin und Amoxicillin/Clavulansäure - und den Cephalosporinen – hier vor allem Cefaclor und Cefoxitin. Die bei *Pseudomonas* spp. erwarteten Mehrfach-Resistenzen wurden in der vorliegenden Untersuchung nicht beobachtet. Sehr häufig wurde hier hingegen Unempfindlichkeit gegenüber einem einzigen Wirkstoff – meist Spectinomycin – festgestellt. Resistenz gegen-

über Reserveantibiotika wurde lediglich in geringem Umfang beobachtet, allein bei den Enterokokken war eine höhere Unempfindlichkeit gegenüber Rifampicin vorhanden als bei klinischen Isolaten. Glykopeptidresistenz war nicht festzustellen.

Die Bestimmung der Tetrazyklin-Resistenzgen-Gehalte mittels PCR hatte orientierenden Charakter. Es zeigte sich jedoch im Vergleich mit den Daten der Gehalte in Schweinegülle (HÖLZEL, 2006), dass die Gehalte der drei zu isolierenden *tet*-Gene aus pflanzlichen Lebensmitteln deutlich geringer waren. *Tet(B)* war zudem aus pflanzlichen Lebensmitteln qualitativ und quantitativ am häufigsten zu isolieren, während *tet(M)* und *tet(O)* in deutlich geringerem Umfang zu detektieren waren.

Ein Resistenzmonitoring empfiehlt sich – trotz relativ geringer Resistenzraten – auch beim pflanzlichen Lebensmittel. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung weisen eine zum Untersuchungszeitpunkt in geringem Maße vorhandene Gefährdung des Verbrauchers durch einen Resistenztransfer über das pflanzliche Lebensmittel auf.

## G Summary

### Antibiotic resistant bacteria and tetracycline resistance encoding genes in vegetable food

A worldwide problem which undermines the successful treatment of infectious diseases is the increasing antibiotic resistance of human pathogen bacteria. A known cause is the non-indicative use of antibiotics in human medicine and the treatment of infections when applied using to domesticated animals. Numerous studies exist identifying the occurrence of antibiotic resistant bacteria in foodstuffs of animal origin. Publications referring to examinations of the resistance problems in vegetable foodstuffs are available on a small scale. This paper should shed highlight antibiotic resistant bacteria in vegetable foods.

For this reason we examined vegetable food predominantly consumed raw and ascertained to which extent, if at all, bacteria in vegetable foods express resistance against selected, therapeutically important antibiotics as used in veterinary and human medicine. In addition, the contents of select tetracycline resistance genes were found as tetracycline is part of the active agents most frequently used and moreover, *tet(B)*, *tet(M)* and *tet(O)* are often isolated from different matrices.

All in all, 1000 samples of vegetable origin were subjected to microbiological culture examinations in addition to a phenotypic resistance monitoring, hence the samples were taken from farms and supermarkets. Moreover, 301 of the samples were examined by using the method of real time PCR after the direct DNA extraction of the specimen material and analysed for the quantitative contents of the tetracycline resistance genes *tet(B)*, *tet(M)* and *tet(O)*.

Out of 141 samples none of the select bacterium types was isolated. In only 34 samples *E. coli* were found, coliform bacteria, in contrast however, were isolated from 688 samples. Furthermore *Enterococcus* spp. (n = 682) and *Pseudomonas* spp. (n = 439) were confirmed, whereas *Listeria* spp. Appeared in eleven and *Salmonella* spp. only in one sample. Using the microdilution method all isolates underwent sensitivity testing using up to 30 active agents.

A comparison of the resistance data with the values of human clinical isolates indicated that the percentage rates of resistant bacteria isolates from vegetable food was, in most cases, considerably below that of the resistance rates of the clinical isolates. Furthermore, comparing isolates from pig manure fewer isolates from vegetable food showed resistance. Low resistance instalments were determined primarily among the coliform bacteria. These isolates were mainly insensitive towards the penicillins, above all, ampicillin and amoxicillin/clavulanic acid, and the cephalosporines, among which primarily cefaclor and cefoxitin may be noted. The multiple resistances expected towards *Pseudomonas* spp. were not observed in this examination.

Insensitivity was, however, very frequently observed mostly towards one single active agent, spectinomycin. Moreover, resistance against reserve antibiotics was seen merely to a lesser extent, however, a higher insensitivity opposite rifampicin was only noted among the clinical isolates rather than among the enterococci. Glycopeptide resistance have not seen.

The regulation of the tetracycline resistance gene contents by means of the PCR method had set the orientation. This was revealed, however, when comparing the data from pig manure (HÖLZEL, 2006) with the data of this research study, the contents of the three isolated *tet*-genes was considerably lower in vegetable food than in pig manure.

Moreover, *tet*(B) were qualitatively and quantitatively most frequently isolated from vegetable food whereas it was only possible to isolate *tet*(M) and *tet*(O) on a considerably smaller scale.

A resistance monitoring recommends itself despite relatively low resistance rates even in the vegetable foods. The research results of the examination at present to hand reveal a minor risk to the consumer of a resistance transfer occurring via intake of vegetable foods.

## H Literaturverzeichnis

- AARESTRUP, F.M., AGERSØ, Y., GERNER-SMIDT, P., MADSEN, M., JENSEN, L.B. (2000): Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers and pigs in Denmark. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 37, 123-37
- ABBAS, B., LINKE, I., KRATZ, W. (2000): Erhebung von Arzneimittel-Wirkstoffen im Land Brandenburg. Landesumweltamt Brandenburg, Studien- und Tagungsberichte Band 24, Brandenburgisches Symposium zur bodenschutzbezogenen Forschung, 22. Juni 2000, 72-79
- ABUIN, C.M., FERNANDEZ, E.J., SAMPAYO, C.F., OTERO, J.L., RODRIGUEZ, L.D., SAENZ, A.C. (1994): Susceptibilities of *Listeria* species from food to nine antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, July, 1655-1657
- ADACHI, H., ISHIGURO, M., IMAJOH, S., OHTA, T., MATSUZAWA, H. (1992): Active-site residues of the transpeptidase domain of penicillin-binding protein 2 from *Escherichia coli*: similarity catalytic mechanism to class A beta-lactamases. *Biochemistry*, 31, 430-437
- AGERSØ, Y., SENGELOV, G., JENSEN, L.B. (2004): Development of a rapid method for direct detection of *tet(M)* genes in soil from Danish farmland. *Environment International*, 30, 117-122
- AIRES, J.R., KÖHLER, T., NIKAIIDO, H., PLESIAT, P. (1999): Involvement in an active efflux-system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Nov, 2624-2628
- ALLERBERGER, F., FIDA, P., GROSSGUT, R., SCHÖNBAUER, M., WÜRZNER, H. (2003): Antibiotics in horticulture and antibiotic feed additives in animal husbandry, Austria 2002. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 115, 17-18, 615-617
- ALONSO, A., CAMPANARIO, E., MARTINEZ, J.L. (2001): Environmental selection of antibiotic resistance genes. *Environmental Microbiology*, 3, 1-10
- ALPERS, K., STARK, K., HELLENBRAND, W., AMMON, A. (2004): Zoonotische Infektionen beim Menschen. *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz*, 47, 622-632
- AMINOV, R.I., GARRIGUES-JEAN-JEAN, N., MACKIE, R.I. (2001): Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 22-32

- AMINOV, R.I., CHEE-SANFORD, J.C., GARRIGUES, N., MEHBOOB, A., MACKIE, R.I. (2004): Detection of tetracycline resistance genes by pcr methods. *Methods in Molecular Microbiology*, 268, 3-14
- ANDERSSON, D.I., LEVIN, B.R. (1999): The biological cost of antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology*, 2, 489-493
- ANDERSSON, D.I. (2003): Persistence of antibiotic resistance bacteria. *Curr Opin Microbiol*, 6, 452-456
- ANKRI, S., MIRELMAN, D. (1999): Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes and Infection*, 2, 125-129
- ANONYMUS (2000): FEDESA: Verbrauch von Antibiotika. *Deutsches Tierärzteblatt* 11, 1093
- ANONYMUS (2001): Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz: Pflanzenschutzgesetz.
- ANONYMUS (2005 A): Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft: Agrarbericht der Bundesregierung 2005.
- ANONYMUS (2005 B): Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft: Bericht über die Feuerbrandsituation im Jahr 2004 und die Strategie zur Bekämpfung des Feuerbranderregers in 2004.
- ANONYMUS (2006): Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit: Pflanzenschutzmittelverzeichnis, Teil 2: Gemüsebau, Obstbau, Zierpflanzenbau.
- AUSTIN, D.J., KRISTINSSON, K.G., ANDERSON, R.M. (1999): The relationship between the volume of antimicrobial consumption in human communities and frequencies of resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, 1152-1156
- AYCICEK, H., OGUZ, U., KARCI, K. (2006): Determination of total aerobic and indicator bacteria on some raw eaten vegetables from wholesalers in Ankara, Turkey. *Int J Hyg Environ Health*, 209(2), 197-201
- BAQUERO, F., MOROSINI, M.I., NEGRI, M.C., CANTON, R., BLAZQUEZ, J. (1997): Meropenem against bacteria carriers of wide spectrum TEM beta-lactamases: evolutive aspects. *Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica*, 15 Suppl 1, 27-31
- BARAKAT, R., TANCREDE, C. (1988): Ecological impact of low doses of oxytetracycline on human intestinal microflora. In Merieux, F.M.: *Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Symposium on Gnotobiology*. Frankreich, 1988
- BARBOSA, T.M., LEVY, S.B. (2000): The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. *Drug Resistance Updates*, 3, 303-311

- BAUMGART, J. (1999): Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln. 4. Auflage. Hamburg: Behr, 1999
- BAUERNFEIND, A., PETERS, G. (2001): Antimikrobielle Chemotherapie. In: KÖHLER ET AL. 2001 (Hrsg.): Medizinische Mikrobiologie. 8. Auflg.. München, Jena: Urban und Fischer, 2001
- BEJUK, D., BEGOVAC, J., GAMBERGER, D., KUCISEC-TEPES, N. (2000): Evaluation of phenotypic characteristics for differentiation of enterococcal species using an example based algorithm. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 38, 2001-2005
- BELL, K.S., SEBAIHIA, M., PRITCHARD, L., HOLDEN, M.T.G., HYMAN, L.J., HOLEVA, M.C., THOMSON, N.R., BENTLEY, S.D. ET AL. (2004): Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and characterization of virulence factors. PNAS, 27, 101(30), 11105-11110
- BELLAIS, S., POIREL, L., FORTINEAU, N., DECOUSSER, J.W., NORDMANN, P. (2001): Biochemical-genetic characterization of the chromosomally encoded extended-spectrum Class A  $\beta$ -Lactamase from *Rahnella aquatilis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Oct, 2965-2968
- BENVENISTE, R., DAVIES, J. (1973): Aminoglycoside antibiotic-inactivating enzymes in actinomycetes similar to those present in clinical isolates of antibiotic resistant bacteria. Proc Natl Acad Sci USA, 70, 2276-2280
- BIAVASCO, F., GIOVANETTI, E., MIELE, A., VIGNAROLI, C., FACINELLI, B., VARALDO, P.E. (1996): In vitro conjugative transfer of VanA vancomycin resistance between enterococci and *Listeriae* of different species. European Journal of Clinical Microbiology and Infection Diseases, 15, 50-59
- BLACK, J.E., MOLAND, E.S., THOMSON, K.S. (2005): AmpC disk test for detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* lacking chromosomal AmpC beta-lactamases. Journal of Clinical Microbiology, Jul, 43(7), 3110-3
- BOEHME, S., WERNER, G., KLARE, I., REISSBRODT, R., WITTE, W. (2004): Occurrence of antibiotic-resistant enterobacteria in agricultural foodstuffs. Molecular Nutrition and Food Research, 48, 522-31
- BOUMA, J.E., LENSKI, R.E. (1988): Evolution of a bacteria/plasmid association. Nature, 335, 351-352
- BRANDL, M.T. (2006): Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. Annual Review of Phytopathology, 44(17), 1-26



- BRAUN, J., PREUSS, R. (2005): *Klinikleitfaden Intensivmedizin*. München: Urban und Fischer Verlag, 2005
- BRENNER, D.J., FARMER, J.J. (2005): *Enterobacteriaceae*. In: GARRITY, G.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second Edition. Volume Two, Part B – The Gammaproteobacteria. USA: Springer, 2005
- BURNES, B.S. (2003): Antibiotic resistance analysis of fecal coliforms to determine pollution sources in a mixed-use watershed. *Environmental Monitoring and Assessment*, 85, 87-98
- BURTSCHER, C. (2002): Einsatz der Polymerasekettenreaktion (PCR) für den Nachweis pathogener Bakterien in Bioabfallproben. Dissertation an der Technischen Universität zu München. München: Hieronymus, 2002
- BUSANI, L., DEL GROSSO, M., PALADINI, C., GRAZIANI, C., PANTOSTI, A., BIAVASCO, F., CAPRIOLI, A. (2004): Antimicrobial susceptibility of vancomycin-susceptible and –resistant enterococci isolated in Italy from raw meat products, farm animals and human infections. *International Journal of Food Microbiology*, 97, 17-22
- BÜSCHER, K.-H., CULLMANN, W., DICK, W., OPFERKUCH, W. (1987): Imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* resulting from diminished expression of an outer membrane protein. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 31(5), 703-708
- BUTAYE, P., VAN DAMME, K., DEVRIESE, L.A., VAN DAMME, L., BAELE, M., LAUWERS, S., HAESBROUCK, F. (2000): In vitro susceptibility of *Enterococcus faecium* isolated from food to growth-promoting and therapeutic antibiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 54, 181-187
- BYWATER, R.J. (2004): Veterinary use of antimicrobials and emergence of resistance in zoonotic and sentinel bacteria in the EU. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, 51, 361-363
- CARIAS, L.L., RUDIN, S.D., DONSKEY, C.J., RICE, L.B. (1998): Genetic linkage and cotransfer of a novel, vanB-containing transposon (Tn5382) and a low-affinity penicillin-binding protein 5 gene in a clinical vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolate. *Journal of Bacteriology*, 180, 4426-4434
- CARRAMINANA, J.J., ROTA, C., AGUSTIN, I., HERRERA, A. (2004): High prevalence of multiple resistance to antibiotics in *Salmonella* serovars isolated from poultry slaughterhouse in Spain. *Veterinary Microbiology*, 104, 133-139
- CENTRON, D., ROY, P.H. (2002): Presence of a group II intron in a multiresistant *Serratia marcescens* strain that harbors three integrons and a novel gene fusion. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(5), 1402-1409

- CHANG, C.L., JEONG, J., SHIN, J.H., LEE, E.Y., SON, H.C. (1999): *Rahnella aquatilis* sepsis in an immunocompetent adult. *Journal of Clinical Microbiology*, Dec, 4161-4162
- CHARPENTIER, E., COURVALIN, P. (1999): Antibiotic resistance in *Listeria* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Sept, 2103-2108
- CHIEW, Y.-F., YEO, S.-F., HALL, L.M.C., LIVERMORE, D.M., (1998): Can susceptibility to an antimicrobial be restored by halting its use? The case of streptomycin versus *Enterobacteriaceae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 41, 247-251
- CHOPRA, I., ROBERTS, M. (2001): Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 6, 232-260
- CHRISTIE, R., ATKINS, N. E., MUNCH-PETERSEN, E. (1944): A note of lytic phenomenon shown by Group B streptococci. *Aust J Exp Bio Med Sci*, 22, 197-200
- CONNELL, S.R., TRACZ, D.M., NIERHAUS, K.H., TAYLOR, D.E. (2003): Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Dec, 3675-3681
- CORPET, D.E. (1988): Antibiotic resistance from food. *New England Journal of Medicine*, 318, 1206-1207
- CORPET, D.E., LUMEAU, S., CORPET, F. (1989): Minimum antibiotic levels for selecting a resistance plasmid in a gnotobiotic animal model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33, 535-540
- COURVALIN, P. (1994): Transfer of antibiotic resistance genes between grampositive and gramnegative bacteria. *Antimicrobiol Agents and Chemotherapy*, 38, 1447-1451
- CUMMINGS, K., BARRETT, E., MOHLE-BOETANI, J.C., BROOKS, J.T., FARRAR, J. ET AL. (2001): A multistate outbreak of *Salmonella enterica* serotype Baildon associated with domestic raw tomatoes. *Emerging Infectious Diseases*, 7, 1046-1048
- DALLAIRE, R., LEBLANC, D.I., TRANCHANT, C.C., VASSEUR, L., DELAQUIS, P., BEAULIEU, C. (2006): Monitoring the microbial populations and temperatures of fresh broccoli from harvest to retail display. *Journal of Food Protection*, 69(5), 1118-1125
- DANMAP (2002): Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark. Copenhagen, Denmark, 2002
- DANMAP (2004): Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark. Copenhagen, Denmark, 2004

- DANTLEY, K.A., DANNELLY, H.K., BURDETT, V. (1998): Binding interaction between Tet(M) and the ribosome: requirements for binding. *Journal of Bacteriology*, 180, 4089-4092
- DAVIES, J.W., EWAN, E.P., VARUGHESE, P., ACRES, S.E. (1984): *Listeria monocytogenes* infections in Canada. *Clinical and Investigative Medicine*, 7(4), 315-320
- DAVIES, J. (1994): Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science*, 264, 375-382
- DAVIES, J.E. (1997): Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants. *Ciba Found Symposium*, 207, 15-27
- DAVIS, S.D., IANNETTA, A., WEDGWOOD, R.J. (1971): Antibiotics for *Pseudomonas aeruginosa* sepsis: inadequate proof efficacy. *Journal of Infectious Diseases*, 124, 104-106
- DAVIS, B.D. (1990): Gene variation and transfer. In: DAVIS, D.B., DULBECCO, R., EISEN, N., GINSBERG, H.S. (Hrsg.): *Microbiology*. Lippincott, 123-142
- DEFLAUN, M.F., LEVY, S.B. (1989): Genes and their varied hosts. In: LEVY, S.B.; MILLER, R.V. (1989): *Gene Transfer in the Environment*. New York: Donney and Sons, 1989
- DEL CAMPO, J., CARLIN, F., NGUYEN-THE, C. (2001): Effects of epiphytic *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonads* on the growth of *Listeria monocytogenes* in model media. *Journal of Food Protection*, 64(5), 721-724
- DE ROEVER, C. (1998): Microbiological safety evaluations and recommendations on fresh produce. *Food Control*, 9(6), 321-347
- DE SIMON, M., TARRAGO, C., FERRER, M.D. (1992): Incidence of *Listeria monocytogenes* in fresh foods in Barcelona (Spain). *International Journal of Food Microbiology*, 16, 153-156
- DEVRIESE, L.A., DUTTA, G.N. (1981): Antibiotic sensitivity testing: correlations between in vitro tests and in vivo situations. *Annales Recherches et Veterinaires*, 12(1), 41-46
- DEVRIESE, L.A., HOMMEZ, J., WIJFELS, R., HAESBROUCK, F. (1991): Composition of the enterococcal and streptococcal intestinal flora of poultry. *Journal of Applied Bacteriology*, 71, 46-50
- DEVRIESE, L.A., LAURIER, L., DE HERDT, P., HAESBROUCK, F. (1992): Enterococcal and streptococcal species isolated from faeces of calves, young cattle and dairy cows. *Journal of Applied Bacteriology*, 72, 29-31
- DEVRIESE, L.A., HOMMEZ, J., POT, B., HAESBROUCK, F. (1994): Identification and composition of the streptococcal and enterococcal flora of tonsils, intestines and faeces of pigs. *Journal of Applied Bacteriology*, 77, 31-36

- DEVRIESE, .A., POT, B. (1995): The genus *Enterococcus*. In: WOOD, B.J.B., HOLZAPFEL, W.H. (Hrsg.): The genera of the lactic acid bacteria. London: Blackie Verlag, 1995
- DEVRIESE, L.A., VANCANNEYT, M., DESCHEEMAEKER, P., BAELE, M., VAN LANDUYT, H.W., GORDTS, B., BUTAYE, P., SWINGS, J., HAESBROUCK, F. (2002): Differentiation and identification of *Enterococcus durans*, *E. hirae* and *E. villorum*. *Journal of Applied Microbiology* 92, 821-827
- DE WITH, K., SCHRÖDER, H., MEYER, E., NINK, K., HOFFMANN, S., STEIB-BAUERT, M., KÄMMERER, R., RUEß, S., DASCHNER, F.D., KERN, W.V. (2004): Antibiotikaaanwendung in Deutschland im europäischen Vergleich. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 129, 1987-1992
- DIN 58940-81 (2002): Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika. Teil 81: Mikrodilution. Spezielle Anforderungen an die Testung von nicht anspruchsvollen Bakterien. Beuth-Verlag, Berlin.
- DIN 58940-4 Beiblatt 1 (2004): Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika. Teil 4: Bewertungsstufen für die minimale Hemmkonzentration; MHK-Grenzwerte von antibakteriellen Wirkstoffen. Beuth-Verlag, Berlin.
- DIN 20873 (2004): Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln – Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln – Anforderungen an die Probenvorbereitung für den qualitativen Nachweis (ISO/DIS 20837: 2004). Berlin: Beuth Verlag, 2004
- DINA, J., MALBRUNY, B., LECLERCQ, R. (2003): Nonsense mutations in the *Isa*-like gene in *Enterococcus faecalis* isolates susceptible to lincosamides and streptogramins a. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, June, 2307-2309
- DOGANAY, M. (2003): Listeriosis: clinical presentation. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 35, 173-175
- DUFOUR, A.P. (1977): *Escherichia coli*: the faecal coliform. In: HOADLEY, A. W., DUTKA, B. J. (Hrsg.): Bacterial indicators/health hazards associated with water. ASTM Special technical Publication, Philadelphia, 1977
- DUTKA-MALEN, S., BLAIMONT, B., WAUTERS, G., COURVALIN, P. (1994): Emergence of high-level resistance to glycopeptides in *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38, 1675-1677
- EARSS (2004): <http://www.earss.rivm.nl>

- ELLERBROEK, L., MAC, K.N., PETERS, J., HULTQVIST, L. (2004): Hazard potential from antibiotic-resistant commensals like *Enterococci*. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, 51, 393-399
- EL AMIN, N.A., JALAL, S., WRETLIND, B. (1999): Alterations in GyrA and ParC associated with fluorquinolone resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43, 947-949
- EL AMIN, N.A., LUND, B., TJERNLUND, A., LUNDBERG, C., JALAKAS, K., WRETLIND, B. (2001): Mechanisms of resistance to imipenem in imipenem-resistant ampicillin-sensitive *Enterococcus faecium*. *APMIS*, 109, 791-796
- EL AMIN, N., GISKE, C.G., JALAL, S., KEIJSER, B., KRONVALL, G., WRETLIND, B. (2005): Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*: alterations of porin OprD and efflux proteins do not fully explain resistance patterns observed in clinical isolates. *APMIS*, 113; 187-196
- ESIOBU, N., ARMENTA, L., IKE, J. (2002): Antibiotic resistance in soil and water environments. *Environmental Health Research*, 12, 145-151
- ESPINOSA-URGEL, M. (2004): Plant-associated *Pseudomonas* populations: molecular biology, DNA dynamics and gene transfer. *Plasmid*, 52, 139-150
- ESSA, A.M.M., JULIAN, D.J., KIDD, S.P., BROWN, N.L., HOBMAN, J.L. (2003): Mercury resistance determinants related to Tn21, Tn1696, and Tn5053 in enterobacteria from the preantibiotic era. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(3), 1115-1119
- ETIENNE, J., GERBAUD, G., COURVALIN, P., FLEURETTE, J. (1989): Plasmid-mediated resistance to fosfomycin in *Staphylococcus epidermis*. *FEMS Microbiology Letters*, Oct 1, 52(1-2), 133-7
- EVANS, R.P., MACRINA, F.L. (1983): Streptococcal R plasmid pIP501-endonuclease site map, resistance determinant location and construction of novel derivatives. *Journal of Bacteriology*, 154, 1347-1355
- EVANS, K., ADEWOYE, L., POOLE, K. (2001): MexR repressor of the mexAB-oprM multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of MexR binding sites in the mexA-mexR intergenic region. *Journal of Bacteriology*, 183, 807-12
- FAHEY, J.W., OURISSON, P.J., DEGNAN, F.H. (2006): Pathogen detection, testing, and control in fresh broccoli sprouts. *Nutrition Journal*, 21(5), 13
- FALKINER, F.R. (1998): The consequences of antibiotic use in horticulture. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 41, 429-431

- FARBER, J.M., PETERKIN, P.I. (1991): *Listeria monocytogenes*: a foodborne pathogen. CMAJ, 138, 413-418
- FARMER, J.J. (2005): *Kluyvera*. In: BRENNER, D. J., KRIEG, N. R., STALEY, J. T. (Hrsg.): Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 2, Part B. Springer, USA
- FERRE, J., VAN RIE, J. (2002): Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. Annual Review of Entomology, 47, 501-533
- FLUIT, A.C., SCHMITZ, F.J. (1999): Class 1 integrons, gene cassettes, mobility and epidemiology. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 18, 761-770
- FLUIT, C., VISSER, M.R., SCHMITZ, F.-J. (2001): Molecular detection of antimicrobial resistance. Clinical Microbiology Reviews, Oct, 836-871
- FRANKLIN, A., ACAR, J., ANTHONY, F., GUPTA, R., NICHOLLS, T., TAMURA, Y., THOMPSON, S., THRELFALL, E.J., VOSE, D., VAN VUUREN, M., WHITE, D.G., WEGENER, H.C., COSTARRICCA, M.L.; OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES AD HOC GROUP. (2001): Antimicrobial resistance: harmonisation of national antimicrobial resistance monitoring and surveillance programmes in animals and in animal-derived food. Scientific and Technical Review, 20(3), 859-870
- FRANZ, C.M., HOLZAPFEL, W.H., STILES, M.E. (1999): Enterococci at the crossroads of food safety? International Journal of Food Microbiology, 47, 1-24
- FRANZ, C.M., MUSCHOLL-SILBERHORN, A.B., YOUSIF, M.N., VANCANNEYT, M., SWINGS, J., HOLZAPFEL, W.H. (2001): Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. Applied and Environmental Microbiology, 67, 4385-4389
- FRIEDLAND, I., STINSON, L., IKAIDDI, M., HARM, S., WOODS, G.L. (2003): Phenotypic antimicrobial resistance patterns in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter*: results of a Multi-center Intensive Care Unit Surveillance Study, 1995-2000. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 45, 245-250
- Frohne, D., Jensen, U. (1998): Systematik des Pflanzenreichs: unter besonderer Berücksichtigung chemischer Merkmale und pflanzlicher Drogen. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag
- GAFFNEY, T.D., LAM, S.T., LIGON, J., GATES, K., FRAZELLE, A., DI MAIO, J., HILL, S., GOODWIN, S., TORKEWITZ, N., ALLSHOUSE, A.M. (1994): Global regulation of expression of antifungal factors by a *Pseudomonas fluorescens* biological control strain. Molecular Plant-Microbe Interactions, 7(4), 455-463

- GALLERT, C., FUND, K., WINTER, J. (2005): Antibiotic resistance of bacteria in raw and biologically treated sewage in groundwater below leaking sewers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69, 106-112
- GARCIA, P., ARCA, P., SUAREZ, J.E. (1995): Product of *fosC*, a gene from *Pseudomonas syringae*, mediates fosfomycin resistance by using ATP as cosubstrate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(7), 1569-1573
- GEDEK, B. (1974): Möglichkeiten und Grenzen der mikrobiologischen Futtermittelkontrolle. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 81, 37 – 40 und 65 – 69
- GENARS (2004): Resistenzdaten auf <http://www.genars.de/data.htm>
- GEISS, H.K., MACK, D., SEIFERT, H. (2004): Identifizierung von speziellen Resistenzmechanismen und Interpretation von Ergebnissen der Antibiotika-Empfindlichkeitstestung bei grampositiven und gram-negativen Erregern. *Chemotherapie Journal*, 13, 1-16
- GOMEZ, M.A., GONZALEZ-LOPEZ, J., CALVO, C. (2000): Antibiotic resistance patterns of coliforms isolated from six protected wetlands in the southeast of Spain. *Folia Microbiology*, 45(6), 555-560
- GOSENS, H., FERCH, M., VAN DER STICHELE, R., ELSEVIERS, M. FORT THE ESAC PROJECT GROUP (2005): Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. *Lancet*, 365, 579-87
- GRAEVENITZ, V. A. (2001): Pseudomonaden und andere, nicht fermentierende gramnegative Bakterien. In: KÖHLER ET AL. (2001) (Hrsg.): *Medizinische Mikrobiologie*. München, Jena: Urban und Fischer
- GRAFE, A. (2001): Untersuchungen zum Einsatz pharmakologisch wirksamer Stoffe in der Veredelungswirtschaft unter besonderer Berücksichtigung der Tetracykline. Göttingen: Cuvillier
- GRAPE, M., FARRA, A., KRONVALL, G., SUNDSTRÖM, L. (2005): Integrons and gene cassettes in clinical isolates of cotrimoxazole-resistant gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology and Infection*, 11, 185-192
- GRENIER, A.-M., DUPORT, G., PAGES, S., CONDEMINE, G., RAHBE, Y. (2006): The phytopathogen *Dickeya dadantii* (*Erwinia chrysanthemi* 3937) is a pathogen of the pea aphid. *Applied and Environmental Microbiology*, Mar, 1956-1965
- GRIMM, H., ULLMANN, U. (2005): In vitro-Wirksamkeit von Piperacillin/Tazobactam zehn Jahre nach der klinischen Einführung im Vergleich zu acht anderen Antibiotika. *Chemotherapie Journal*, 14, 84-93

- GROPP, J. (1986): Leistungsförderer: Wirkung und Einsatz beim Nutztier. Kongressband 1986, VDLUFA-Schriftenreihe, 20, 99-137
- HABSAH, H., ZEEHAIDA, M., VAN ROSTENBERGHE, H., NORAI DA, R., WAN PAUZI, W.I., FATIMAH, I., ROSLIZA, A.R., NIK SHAMIRAH, N.Y., MAIMUNAH, H. (2005): An outbreak of *Pantoea* spp. In a neonatal parenteral care unit secondary to contaminated parenteral nutrition. Journal of Hospital Infection, 61, 213-218
- HAMILTON-MILLER, J.M.T., SHAH, S. (2001): Identity and antibiotic susceptibility of enterobacterial flora of salad vegetables. International Journal of Antimicrobial Agents, 18, 81-83
- HANCOCK, R.E.W. (1998): Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. Clinical Infectious Diseases, 1998; 27 (Suppl 1): S93-9
- HANCOCK, R.E.W., SPEERT, D.P. (2000): Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. Drug Resistance Updates, 3, 247-255
- HANSON, N.D., SANDERS, C.C. (1999): Regulation of inducible AmpC beta-lactamase expression among *Enterobacteriaceae*. Current Pharmaceutical Design, 5, 881-94
- HARMS, K.S. (2006): Untersuchungen zum Nachweis und Vorkommen von Antibiotika und deren Metaboliten in Schweinegülle. Dissertation an der TU München.
- HAYES, J.R., ENGLISH, L.L., CARR, L.E., WAGNER, D.D., JOSEPH, S.W. (2004): Multiple-antibiotic resistance of *Enterococcus* spp. Isolated from commercial poultry production environments. Applied and Environmental Microbiology, Oct, 6005-11
- HEESEMAN, J. (2001): Die Familie der *Enterobacteriaceae*. In: KÖHLER ET AL. (Hrsg.): Medizinische Mikrobiologie. 8. Aufl.; München, Jena: Urban und Fischer Verlag, 2001
- HEINEMANN, J.A., SPRAGUE, G.F. (1989): Bacterial conjugative plasmids mobilize DNA transfer between bacteria and yeast. Science, 340, 205-209
- HENDLIN, D., STAPLEY, E.O., JACKSON, M., WALLICK, H., MILLER, A.K., WOLF, F.J., MILLER, T.W., CHAIET, L., KAHAN, F.M., FOLTZ, E.L., WOODRUFF, H.B., MATA, Y.M., HERNANDEZ, S., MOCHALES, S. (1969): Phosphonomycin, a new antibiotic produced by strains of *Streptomyces*. Science, 166, 122-123
- HERSHBERGER, E., DONABEDIAN, S., KONSTANTINOU, K., ZERVOS, M.J. (2004): Quinupristin-Dalfopristin resistance in gram-positive bacteria: mechanism of resistance and epidemiology. Clinical Infectious Diseases, 38, 92-8



- HIGGINS, P.G., FLUIT, A.C., MILATOVIC, D., VERHOEF, J., SCHMITZ, F.-J. (2002): Antimicrobial susceptibility of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50, 293-307
- HILLEN, W., BERENS, C. (1994): Mechanisms underlying expression of *Tn10* encoded tetracycline resistance. *Annual Review of Microbiology*, 48, 345-369
- HIRSCH, R., TERNES, T., HABERER, K., KRATZ, K.-L. (1999): Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Science of the Total Environment*, 225, 109-118
- HOF, H. (2003): History and epidemiology of listeriosis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 35, 199-202
- HOLMES, A., GOVAN, J., GOLDSTEIN, R. (1998): Agricultural use of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*: a threat to human health. *Emerging Infectious Diseases*, 4, 221-227
- HÖLZEL, C. (2006): Zum Vorkommen von antibiotikaresistenten Bakterien und Tetrazyklinresistenzgenen in Gülle und Bodenproben. Dissertation an der Ludwig-Maximilian-Universität zu München
- HUANG, T.-C., BURR, T.J. (1999): Characterization of plasmids that encode streptomycin-resistance in bacterial epiphytes of apple. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 741-51
- HULTQVIST, L. (2003): Zum Vorkommen und zur Bedeutung antibiotikaresistenter Enterokokken im Bereich der Fleischgewinnung bei landwirtschaftlichen Nutztieren. Dissertation an der Freien Universität zu Berlin
- HUTHER, S. (2007): Zum Vorkommen von antibiotikaresistenten Bakterien und Resistenzgenen in Lebensmitteln tierischer Herkunft. Dissertation an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München
- HUYS, G., D'HAENE, K., COLLARD, J.-M., SWINGS, J. (2004): Prevalence and molecular characterization of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from food. *Applied and Environmental Microbiology*, Mar, 1555-1562
- HWANG, M.S.H., MORGAN, R.L., SARKAR, S.F., WANG, P.W., GUTTMAN, D.S. (2005): Phylogenetic characterization of virulence and resistance phenotypes of *Pseudomonas syringae*. *Applied and Environmental Microbiology*, Sept, 5182-5191
- INGHAM, S.C., LOSINSKI, J.A., ANDREWS, M.P., BREUER, J.E., BREUER, J.R., WOOD, T.M., WRIGHT, T.H. (2004): *Escherichia coli* contamination of vegetables grown in soils fertilized with noncomposted bovine manure: garden-scale studies. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(11), 6420-6427

- INOUE, S. (1999): Plasmids. In: MONTIE, T.C. (Hrsg.) : *Pseudomonas*. New York, Plenum Press
- JALAL, S., CIOFU, O., HOIBY, N., GOTOH, N. (2000): Molecular mechanisms of fluorquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44, 710-712
- JENSEN, L.B., BALODA, S., BOYE, M., AARESTRUP, F.M. (2001): Antimicrobial resistance among *Pseudomonas* spp. and the *Bacillus cereus* group isolated from Danish agricultural soil. *Environment International*, 26, 581-587
- JIANG, X., NI, Y., JIANG, Y. ET AL. (2005): Outbreak of infection caused by *Enterobacter cloacae* producing the novel VEB-3 beta-lactamase in China. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 826-831
- JOHNSON, J.R., KUSKOWSKI, M.A., SMITH, K., O'BRYAN, T.T., TATINI, S. (2005): Antimicrobial-resistant and extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in retail foods. *Journal of Infectious Diseases*, 191, 1040-1049
- JOHNSTON, L.M., JAYKUS, L.A. (2004): Antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from produce. *Applied and Environmental Microbiology*, May, 3133-3137
- JOHNSTON, L.M., JAYKUS, L.A., MOLL, D., MARTINEZ, M.C., ANCISO, J., MORA, B., MOE, C.L. (2005): A field study of the microbiological quality of fresh produce. *Journal of Food Protection*, 68(9), 1840-1847
- JONKERS, D., SLUIMER, J., STOBBERINGH, E. (1999): Effect of garlic on vancomycin-resistant Enterococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Dec, 3045
- JUNTTILA, J. R., NIEMELA, S. I., HIRN, J. (1988): Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic *Listeria*. *Journal of Applied Bacteriology*, 65(4), 321-327
- KARLOWSKY, J.A., KELLY, L.J., THORNSBERRY, C., JONES, M.E., SAHM, D.F. (2002): Trends in antimicrobial resistance among urinary tract infection isolates of *Escherichia coli* from female outpatients in the United states. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46, 2540-2545
- KAYSER, F.H., BIENZ, K.A., ECKERT, J., LINDENMANN, J. (1993): *Medizinische Mikrobiologie*. Wiesmann, E. (Hrsg.). Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1993
- KERN, W.V., DE WITH, K., GONNERMANN, C., ET AL. (2004): Update on glycopeptide use in German university hospitals. *Infection*, 32(3), 157-162
- KERN, W.V. (2004): *Antibiotika und Chemotherapeutika*. In: *Arzneiverordnungsreport*. Berlin, Heidelberg: 2004

- KIM, J., LIM, Y.-M. (2005): Prevalence of derepressed AmpC mutants and extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producers among clinical isolates of *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp. and *Serratia marcescens* in Korea: Dissemination of CTX-M-3, TEM-52 and SHV-12. *Journal of Clinical Microbiology*, May, 2452-2455
- KLARE, I., KONSTABEL, C., BADSTÜBNER, D., WERNER, G., WITTE, W. (2003): Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 269-290
- KLARE, I., BADSTÜBNER, D., KONSTABEL, C., BOHME, G., CLAUS, H., WITTE, W. (1999): Decreased incidence of VanA-type vancomycin-resistant *enterococci* isolated from poultry meat and from fecal samples of humans in the community after discontinuation of avoparcin usage in animal husbandry. *Microbial Drug Resistance Mechanisms Epidemiol Dis*, 5, 45-55
- KLARE, I., WITTE, W. (1997 A): Glycopeptid-resistente Enterokokken: Zur Situation in Deutschland. *Hyg Mikrob*, 2, 31-38
- KLARE, I., WITTE, W.: (1997 B): Glykopeptidresistente Enterokokken: Auftreten, Verbreitung, Resistenzübertragung, Bedeutung. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 109(9), 293-300
- KLEIN, G., PACK, A., REUTER, G. (1998): Antibiotic resistance patterns of enterococci and occurrence of vancomycin-resistant enterococci in raw minced beef and pork in Germany. *Environmental Microbiology*, 64, 1825-1830
- KLEIN, G. (2003): Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinaltrakt. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 123-131
- KNOX, J.R., MOEWS, P.C., FRERE, J.M. (1996): Molecular evolution of bacterial beta-lactam resistance. *Chemical Biology*, 3, 937-947
- KRÄMER, J. (2002): *Lebensmittelmikrobiologie*. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer, 2002
- KRESKEN, M., HAFNER, D., STUDIENGRUPPE, (2000): Resistenzsituation bei klinisch wichtigen Infektionserregern gegenüber Chemotherapeutika in Mitteleuropa. *Chemotherapie Journal*, 2, 51-86
- KRUSE, H., SØRUM, H. (1994): Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. *Applied and Environmental Microbiology*, Nov, 4015-4021

- KÜHN, I., IVERSEN, A., BURMAN, L.G., OLSSON-LILJEQUIST, B., FRANKLIN, A., FINN, M., AARESTRUP, F., SEYFARTH, A.M., BLANCH, A.R., VILANOVA, X., TAYLOR, H., CAPLIN, J., MORENO, M.A., DOMINGUEZ, L., HERRERO, I.A., MÖLLBY, R. (2003): Comparison of enterococcal populations in animals, humans, and the environment. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 133-145
- KUMAR, K., GUPTA, S.C., BAIDOO, S.K., CHANDER, Y., ROSEN, C.J (2005): Antibiotic uptake by plants from soil fertilized with animal manure. *Journal of Environmental Quality*, 34, 2082-2085
- LACEY, S.L., MEHMET, S., TAYLOR, G.W. (1995): Inhibition of *Helicobacter pylori* growth by 4-hydroxy-2-alkyl-quinolines produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 36(5), 827-831
- LAMPIS, G., DEIDDA, D., MAULLU, C., PETRUZZELLI, S., POMPEI, R., MONACHE, F.D., SATTA, G. (1996): Karalicin, a new biologically active compound from *Pseudomonas fluorescens/putida*. II. Biological properties. *J Antibiot (Tokyo)*, 49(3), 263-266
- LANDGREN, M., ODEN, H., KUHN, I., OSTERLUND, A., KAHLMETER, G. (2005): Diversity among 2481 *Escherichia coli* from women with community-acquired lower urinary tract infections in 17 countries. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55, 928-937
- LEBUHN, M.; EFFENBERGER, M.; GARCES, G.; GRONAUER, A.; WILDERER, P.A. (2005): Hygienization by anaerobic digestion: comparison between evaluation by cultivation and quantitative real-time PCR. *Water Science and Technology* 52, 93-99
- LECLERCQ, R., COURVALIN, P. (1991): Intrinsic and unusual resistance to Macrolide, Lincosamide, and Streptogramin antibiotics in bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, July, 1273-76
- LECLERCQ, R., DUTKA-MALEN, S., DUVAL, J., COURVALIN, P. (1992): Vancomycin resistance gene *VanC* is specific to *Enterococcus gallinarum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Sept, 2005-2008
- LECLERC, H., MOSSEL, D.A.A., EDBERG, S.C., STRUIJK, C.B. (2001): Advances in the bacteriology of the coliform group: Their suitability as markers of microbial water safety. *Annual Review of Microbiology*, 55, 201-34
- LECLERC, J.E., LI, B., PAYNE, W.L., CEBULA, T.A. (1996): High mutation frequencies among *Escherichia coli* and *Salmonella* pathogens. *Science*, 274, 1208-1211
- LEE, Y.-L., CESARION, T., WANG, Y., SHANBROM, E., THRUPP, L. (2003): Antibacterial activity of vegetables and juices. *Nutrition*, 19(1-2), 994-996

- LEMCKE, R., BÜLTE, M. (2000): Occurrence of the vancomycin-resistant genes vanA, vanB, vanC1, vanC2 and vanC3 in *Enterococcus* strains isolated from poultry and pork. *International Journal of Food Microbiology*, 60, 185-194
- LENSKI, R.E. (1998): Bacterial evolution and the cost of antibiotic resistance. *International Microbiology*, 1, 265–270
- LEPPER, P.M., GRUSA, E., REICHL, H., HÖGEL, J., TRAUTMANN, M. (2002): Consumption of Imipenem correlates with  $\beta$ -lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Sept, 2920-2925
- LEUSCHNER, R.G., IELSCH, V. (2003): Antimicrobial effects of garlic, clove and red hot chilli on *Listeria monocytogenes* in broth model systems and soft cheese. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 54(2), 127-33
- LEVIN, B.R., LIPSITCH, M., PERROT, V., SCHRAG, S., ANTIA, R., SIMONSEN, L., WALKER, N.M., STEWART, F.M. (1997): The population genetics of antibiotic resistance. *Clinical Infectious Diseases*, 24 Supplement 1, 9–16
- LEVIN, B.R., PERROT, V., WALKER, N. (2000): Compensatory mutations, antibiotic resistance and the population genetics of adaptive evolution in bacteria. *Genetics*, 154, 985-997
- LEVISON, M.E., MAILAPUR, Y.V., PRADHAN, S.K., JACOBY, G.A., ADAMS, P., EMERY, C.L., MAY, P.L., PITSAKIS, P.G. (2002): Regional occurrence of plasmid-mediated SHV-7, an extended-spectrum beta-lactamase, in *Enterobacter cloacae* in Philadelphia Teaching Hospital. *Clinical Infectious Diseases*, 35, 1551-1554
- LEVY, S.B. (1984): Drug resistant bacteria in food for humans and animals. In: Woodbine, M.: *Antimicrobials and Agriculture*. London: Butterworth, 1984
- LEVY, S.B., MCMURRY, L.M., BARBOSA, T.M., BURDETT, V., COURVALIN, P., HILLEN, W., ROBERTS, M.C., ROOD, J.I., TAYLOR, D. (1999): Nomenclature for new tetracycline resistance determinants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1523-24
- LI, X.Z., ZHANG, L., POOLE, K. (1998): Role of the multidrug efflux systems of *Pseudomonas aeruginosa* in organic solvent tolerance. *Journal of Bacteriology*, 180, 2987-2991
- LI, J., NATION, R.L., MILNE, R.W., TURNIDGE, J.D., COULTHARD, K. (2005): Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant gram-negative bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25, 11-25
- LIAO, C.-H., SAPERS, G.M. (1999): Influence of soft rot bacteria on growth of *Listeria monocytogenes* on potato tuber slices. *Journal of Food Protection*, 62(4), 343-348

- LIAO, C.-H., FETT, W.F. (2001): Analysis of native microflora and selection of strains antagonistic to human pathogens on fresh produce. *Journal of Food Protection*, 64(8), 1110-1115
- LIETZAU, S., HOEWNER, M., VON BAUM, H., MARRE, R., BRENNER, H. (2006): Antibiotic resistant fecal isolates of *Enterococci* among unselected patients outside the clinical sector: an epidemiological study from Southern Germany. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety*, 15, 275-277
- LIM, H.M., PENE, J.J., SHAW, R.W. (1988): Cloning, nucleotide sequence and expression of the *Bacillus cereus* 5/B/6  $\beta$ -lactamase II structural gene. *Journal of Bacteriology*, 170(6), 2873-2878
- LIPSITCH, M. (2001): The rise and fall of antimicrobial resistance. *Trends in Microbiology*, 9(9), 438-444
- LIVERMORE, D.M. (2001): Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47, 247-250
- LLANES, C., NEUWIRTH, C., EL GARCH, F., HOCQUET, D., PLESIAT, P. (2006): Genetic analysis of a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* producing PER-1  $\beta$ -Lactamase. *Clinical Microbiology and Infection*, 12, 270-278
- LLOP, P., CARUSO, P., CUBERO, J., MORENTE, C., LOPEZ, M.M. (1999): A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reactio. *Journal of Microbiological Methods*, 37, 23-31
- LOGUE, C.M., SHERWOOD, J.S., OLAH, P.A., ELIJAH, L.M., DOCKTER, M.R. (2003): The incidence of antimicrobial-resistant *Salmonella* spp. on freshly processed poultry from US Mid-western processing plants. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 16-24
- LONG, S.M., ADAK, G.K., O'BRIEN, S.J., GILLESPIE, I.A. (2002): General outbreaks of infectious disease linked with salad vegetables and fruit, England and Wales, 1992-2000. *Commun Dis Public Health*, 5(2): 101-105
- LOZAN, J.L. (1992): *Angewandte Statistik für Naturwissenschaftler*, Berlin, Hamburg: Verlag Parey, 1992
- MAMMERI, H., VAN DE LOO, M., POIREL, L., MARTINEZ-MARTINEZ, L., NORDMANN, P. (2005): Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Jan, 71-76
- MANDRELL, R.E., GORSKI, L., BRANDL, M.T. (2006): Attachment of microorganisms to fresh produce. In: SAPERS, G.M., GORNY, J.R., YOUSEF, A.E. (Hrsg.): *Microbiology of fruits and vegetables*. Taylor & Francis Group: USA, 2006

- MARSHALL, C.G., BROADHEAD, G., LESKIW, B.K., WRIGHT, G.D. (1997): D-Ala-D-Ala ligases from glycopeptide antibiotic-producing organisms are highly homologous to the enterococcal vancomycin-resistance ligases VanA and VanB. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94, 6480-6483
- MARTINEZ, J.L., BAQUERO, F. (2000): Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44, 1771-1777
- MARTINEZ, J.L., BAQUERO, F. (2002): Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, Oct, 647-679
- MCMANUS, P.S., JONES, A.L. (1994): Epidemiology and genetic analysis of streptomycin resistant *Erwinia amylovera* from Michigan and evaluation of oxytetracycline for control. *Phytopathology*, 84, 627-33
- MCMANUS, P.S., STOCKWELL, V.O., SUNDIN, G.W., JONES, A.L. (2002): Antibiotic use in plant agriculture. *Annu Rev Phytopathol*, 40, 443-65
- MEAD, P.S., SLUTSKER, L., DIETZ, V., MCCAIG, L.F., BRESEE, J.S., SHAPIRO, C., GRIFFIN, P.M., TAUXE, R.V. (1999): Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, 5(5): 607-625
- MEHNAZ, S., MIRZA, M.S., HAURAT, J., BALLY, R., NORMAND, P., BANO, A., MALIK, K.A. (2001): Isolation and 16S rRNA sequence analysis of the beneficial bacteria from the rhizosphere of rice. *Can J Microbiol*, 47, 110-117
- MENG, J., DOYLE, M. P., ZHAO, T., ZHAO, S. (2001): Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: DOYLE, M. P., BEUCHAT, L. R., MONTVILLE, T. J. (Hrsg.): *Food Microbiology*. ASM Press, Washington
- MEYER, J.F., NIES, B.A., WIEDEMANN, B.(1983): Amikacin resistance mediated by multiresistance transposon Tn2424. *Journal of Bacteriology*, 155, 755-760
- MINDLIN, S., KHOLODII, G., GORLENKO, Z., MINAKHINA, S., MINAKHIN, L., KALYAEVA, E., KOPTEVA, A., PETROVA, M., YURIEVA, O., NIKIFOROV, V. (2001): Mercury resistance transposons of gram-negative environmental bacteria and their classification. *Res Microbiol*, 152, 811-822
- MOELLERING, R.C., WENNERSTEN, C. (1983): Therapeutic potential of rifampicin in enterococcal infections. *Rev Infect Dis*, 5 (Suppl. 3), 528-532
- MORRIS, C.E., MONIER, J.-M. (2003): The ecological significance of biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annu Rev Phytopathol*, 41, 429-453
- MÜLLER, T., ULRICH, A., OTT, E.-M., MÜLLER, M. (2001): Identification of plant-associated enterococci. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 268-278

- MÜLLER, H.-J. (2001): Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Heidelberg, Berlin: Spektrum, Akad. Verl., 2001
- MUNDT, J. O. (1986): Enterococci. In: SNEATH, P. H. A., STALEY, J. T., MAIR, N. S., SHARPE, M. E., HOLT, J. G. (Hrsg.): Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol.2, Williams & Wilkins, Baltimore, USA
- MURRAY, B.E. (1990): The life and times of the *Enterococcus*. Clinical Microbiology Reviews, Jan, 46-65
- MURRAY, B.E. (1998): Diversity of multidrug-resistant enterococci. Emerging Infectious Diseases, 4(1), 37-47
- NAKAJIMA, Y. (1999): Mechanisms of bacterial resistance to macrolide antibiotics. J Infect Chemother, 5, 61-74
- NCCLS (2004): National Committee for Clinical Laboratory Standards, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Forteenth Informational Supplement: ISO 20776 Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility devices. Vol. 22(1), Jan/02
- NEMETH, J. (2004): Practice of applying streptomycin to control fireblight in Hungary. O-EPP/EPPO Bulletin, 34, 381-382
- NIEMI, M., SIBAKOV, M., NIEMELA, S. (1983): Antibiotic resistance among different species of fecal coliforms isolated from water samples. Applied and Environmental Microbiology, Jan, 79-83
- NOBLE, W.C., VIRANI, Z., CREE, R.G. (1992): Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiology Letters, 93, 195-198
- NORDMANN, P., POIREL, L. (2002): Emerging carbapenemases in gram-negative aerobes. Clin Microbiol Infect, 8, 321-331
- NORELLI, J.L., BURR, T.J., LO CICERO, L.M., GILBERT, M.T., KATZ, B.H. (1991): Homologous streptomycin resistance gene present among diverse gram-negative bacteria in New York State apple orchards. Applied and Environmental Microbiology, 57, 486-91
- NORMARK, B.H., NORMARK, S. (2002): Evolution and spread of antibiotic resistance. Journal of Internal Medicine, 252, 91-106
- NØRRUNG, B., ANDERSEN, J.K., SCHLUNDT, J. (1999): Incidence and control of *Listeria monocytogenes* in foods in Denmark. International Journal of Food Microbiology, 53, 195-203



- OMAR, B.N., CASTRO, A., LUCAS, R., ABRIUEL, H., YOUSIF, N.M.K., FRANZ, C.M.A.P., HOLZAPFEL, W.H., PEREZ-PULIDO, R., MARTINEZ-CANAMERO, M., GALVEZ, A. (2004): Functional and safety aspects of Enterococci isolated from different spanish foods. *System Appl Microbiol*, 27, 118-130
- ONO, S., MURATANI, T., MATSUMOTO, T. (2005): Mechanisms of resistance to Imipenem and Ampicillin in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(7), 2954-2958
- ÖSTERBLAD, M., PENSALA, O., PETERZENS, M., HELENIUS, H., HUOVINEN, P. (1999): Antimicrobial susceptibility of *Enterobacteriaceae* isolated from vegetables. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 43, 503-509
- OTT, E.-M., MÜLLER, T., MÜLLER, M., FRANZ, C.M., ULRICH, A., GABEL, M., SEYFARTH, W. (2001): Population dynamics and antagonistic potential of enterococci colonizing the phyllosphere of grasses. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 54-66
- PALLERONI, N.J. (2005): *Pseudomonas*. In: Garrity, G.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second Edition. Volume Two, Part B – The Gammaproteobacteria. USA: Springer, 2005
- PANG, Y., BOSCH, T., ROBERTS, M.C. (1994 A): Single polymerase chain reaction for the detection of tetracycline-resistant determinants Tet K and Tet L. *Molecular and Cellular Probes*, 8, 417-422
- PANG, Y., BROWN, B.A., STEINGRUBE, V.A., WALLACE, R.J.J., ROBERTS, M.C. (1994 B): Tetracycline resistance determinants in *Mycobacterium* and *Streptomyces* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38, 1408-1412
- PARKE, J.L., GURIAN-SHERMAN, D. (2001): Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. *Annu Rev Phytopathol*, 39, 225-258
- PARTRIDGE, S.R., BROWN, H.J., STOKES, H.W., HALL, R.M. (2001): Transposons Tn1696 and Tn21 and their integrons In4 and In2 have independent origins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45, 1263-1270
- PATERSON, D.L., KO, W.C., VON GOTTBURG, A., ET AL. (2004): International prospective study of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: implications of extended-spectrum beta-lactamase production in nosocomial infections. *Annals of Internal Medicine*, 140, 26-32
- PENA, A., SERRANO, C., REUS, C., BAETA, L., CALDERON, V., SILVEIRA, I., SOUSAS, J.C., PEIXES, L. (2004): Antibiotic residues in edible tissues and antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in pigs from Portugal. *Food Additives and Contaminants*, 21(8), 749-755

- PETERS, J., MAC, K., WICHMANN-SCHAUER, H., KLEIN, G., ELLERBROEK, L. (2003): Species distribution and antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from food of animal origin in Germany. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 311-314
- PETRIDIS, M., BAGDASARIAN, M., WALDOR, M.K., WALKER, E. (2006): Horizontal transfer of shiga toxin and antibiotic resistance genes among *Escherichia coli* strains in house fly (dip-tera: *Muscidae*) gut. *Journal of Medical Entomology*, 43(2), 288-295
- POOLE, K., GOTOH, N., TSUJIMOTO, H. (1996): Overexpression of the mexC-mexD-oprJ efflux operon in nfxB-type multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 21, 713-24
- POOLE, K., SRIKUMAR, R. (2001): Multidrug efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: components, mechanisms and clinical significance. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 1, 59-71
- POOLE, K. (2004): Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology and Infection*, 10, 12-26
- POPOFF, M.-Y., BOCKEMÜHL, J., BRENNER, F.W. (2000): Supplement 1998 (no. 42) to the Kauffmann-White scheme. *Research in Microbiology*, 151, 63-65
- POPOFF, M. Y., MINOR, L. E. (2005): *Salmonella*. In Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T. (Hrsg.): *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 2, Part B. Springer, USA
- POROS-GLUCHOWSKA, J., MARKIEWICZ, Z. (2003): Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes*. *Acta Microbiologica Polonica*, 52(2), 113-129
- POYART-SALMERON, C., CARLIER, C., TRIEU-CUOT, P., COURTIEU, A.-L., COURVALIN, P. (1990): Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*. *Lancet*, 335, 1422-1426
- RICE, E.W., MESSER, J.W., KOHNSON, C.H., REASONER, D.J. (1995): Occurrence of high-level aminoglycoside resistance in environmental isolates of enterococci. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(1), 374-376
- RICE, B., BONOMO, R.A. (1996): Genetic and Biochemical Mechanisms of Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents. In: LORIAN, V.: *Antibiotics in Laboratory Medicine* (Fourth Edition), Williams & Wilkins, Baltimore, 1996, 453 – 501
- RIESENFELD, C.S., GOODMAN, M., HANDELSMAN, J. (2004): Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes. *Environmental Microbiology*, 6(9), 981-989
- ROBERTS, M.C. (1989): Gene transfer in the urogenital and respiratory tract. In: LEVY, S.B., MILLER, R.V.: *Gene Transfer in the Environment*. New York: Donneley and Sons, 1989

- ROBERTS, M.C. (1990): Genetic basis of tetracycline resistance in *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34, 1816-1818
- ROBERTS, M.C. (1996): Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiology Reviews*, 19, 1-24
- ROBERTS, M. C: (2005): Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiology Letters*, 245, 195-203
- ROBERTS, M.C., PANG, Y., RILEY, D.E., HILLIER, S.L., BERGER, R.C., KRIEGER, J.N. (1993): Detection of *tet(M)* and *tet(O)* tetracycline resistance genes by polymerase chain reaction. *Molecular and Cellular Probes*, 7, 387-393
- ROLLINS, L.D., GAINES, S.A., POCURULL, D.W., MERCER, H.D. (1975): Animal model for determining the no-effect level of an antimicrobial drug on drug resistance in the lactose-fermenting enteric flora. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 7, 661-665
- ROSSEN, L., NØRSKOV, P., HOLMSTRØM, K., RASMUSSEN, O.F. (1992): Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *International Journal of Food Microbiology*, Sep, 17(1), 37-45
- ROSSI, F., BAQUERO, F., HSUEH, P.-R., PATERSON, D.L., BOCHICCHIO, G.V., SNYDER, T.A., SATISHCHANDRAN, V., MCCARROLL, K., DINUBILE, M.J., CHOW, J.W. (2006): *In vitro* susceptibilities of aerobic and facultatively anaerobic gram-negative bacilli isolated from patients with intra-abdominal infections worldwide: 2004 results from SMART (Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 22, 1-6
- ROWE-MAGNUS, D.A., MAZEL, D. (1999): Resistance gene capture. *Current Opinion in Microbiology*, 2, 483-488
- RUPP, M.E., FEY, P.D. (2003): Extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae*: considerations for diagnosis, prevention and drug treatment. *Drugs*, 63, 353-365
- SADER, H.S., JONES, R.N. (2005): Antimicrobial susceptibility of uncommonly isolated non-enteric gram-negative bacilli. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25, 95-109
- SAENZ, Y., BRINAS, L., DOMINGUEZ, E., RUIZ, J., ZARAZAGA, M., VILA, J., TORRES, C. (2004): Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal and food origins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Oct, 3996-4001
- SAGOO, S.K., LITTLE, C.L., WARD, L., GILLESPIE, I.A., MITCHELL, R.T. (2003): Microbiological study of ready-to-eat salad vegetables from retail establishments uncovers a national outbreak of salmonellosis. *Journal of Food Protection*, 66(3), 403-409

- SAITO, K., YONEYAMA, H., NAKAE, T. (1999): *nalB*-type mutations causing the overexpression of the MexAB-OprM efflux pump are located in the *mexR* gene of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosome. FEMS Microbiology Letters, 179, 67-72
- SALYERS, A.A., SHOEMAKER, N.B., STEVENS, A.M., LI, L.-Y. (1995): Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. Microbiological Reviews, 12, 579-590.
- SCHEUTZ, F., STROCKBINE, N. A. (2005): *Escherichia*. In: BRENNER, D. J., KRIEG, N. R., STALEY, J. T. (Hrsg.): Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 2, Part B. Springer, USA
- SCHMIEGER, H., SCHICKLMAIER, P. (1999): Transduction of multiple drug resistance of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* DT104. FEMS Microbiology Letters, 170, 251-256
- SCHMITZ, F.J., VERHOEF, J., FLUIT, C. and the Sentry Participants Group (1999): Prevalence of resistance to MLS antibiotics in 20 European university hospitals participating in the European SENTRY surveillance programme. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 43, 783-792
- SCHNABEL, E.L., JONES, A.L. (1999): Distribution of tetracycline resistance genes and transposons among phylloplane bacteria in Michigan apple orchards. Applied and Environmental Microbiology, 65(11), 4898-4907
- SCHRAG, S.J., PERROT, V., LEVIN, B.R. (1997): Adaptation to the fitness costs of antibiotic resistance in *Escherichia coli*. Proceedings of the Royal Society London B, 264, 1287-1291
- SCHROETER, A., HOOG, B., HELMUTH, R. (2004): Resistance of *Salmonella* isolates in Germany. Journal of Veterinary Medicine Part B, 51, 389-392
- SCHWARZ, S., KEHRENBURG, C., WALSH, T.R. (2001): Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. International Journal of Antimicrobial Agents, 17, 431-437
- SCHWEIZER, H.P. (2003): Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. Genetics and Molecular Research, 2(1), 48-62
- SEELIGER, H. P. R, JONES, D. (1986): *Listeria*. In: SNEATH P. H. A., STALEY J. T., MAIR, N. S., SHARPE, M. E., HOLT, J. G. (Hrsg.): Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol.2, Williams & Wilkins, Baltimore, USA
- SEGURA, A., DUQUE, E., MOSQUEDA, G., RAMOS, J.L., JUNKER, F. (1999): Multiple responses of gramnegative bacteria to organic solvents. Environmental Microbiology, 1, 191-198
- SELBITZ, H.J. (2002) In: ROLLE, M., MAYR, A. (HRSG.) (2002): Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 7. Aufl.. Stuttgart: Enke Verlag, 2002

- SENGELOV, G., AGERSØ, Y., HALLING-SØRENSEN, B., BALODA, S.B., ANDERSEN, J.S., JENSEN, L.B. (2003): Bacterial antibiotic resistance levels in Danish farmland as a result of treatment with pig manure slurry. *Environmental International*, 28, 587-595
- SFM (1998) : SMED und Comité de l' AntibioGramme de la Société Française de Microbiologie Communiqué. Statement. *Pathologie et Biologie* 46, I-XVI; 1998
- SHEPARD, B.D., GILMORE, M.S. (2002): Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. *Microbes and Infection*, 4, 215-224
- SHTIENBERG, D., ZILBERSTEIN, D., HERZOG, Z., MANULIS, S. ET AL. (2001): Efficacy of oxolinic acid and other bactericides in suppression of *Erwinia amylovora* in pear orchards in Israel. *Phytoparasitica*, 29, 143-54
- SHOJI, J., KATO, T., HINOO, H., HATTORI, T., HIROOKA, K., MATSUMOTO, K., TANIMOTO, T., KONDO, E. (1986): Production of fosfomycin (phosphonomycin) by *Pseudomonas syringae*. *Journal of Antibiotics (Tokyo)*, 39(7), 1011-1012
- SIMON, C., STILLE, W. (2000): *Antibiotikatherapie in Klinik und Praxis*. 10. Aufl.. Stuttgart: Schattauer Verlags GmbH, 2000
- SINGH, K.V., WEINSTOCK, G.M., MURRAY, B.E. (2002): An *Enterococcus faecalis* ABC homologue (*lsa*) is required for the resistance of this species to Clindamycin and Quinupristin-Dalfopristin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, June, 1845-50
- SINGH, K.V., MALATHUM, K., MURRAY, B. (2001): Disruption of an *Enterococcus faecium* species-specific gene, a homologue of acquired macrolide resistance genes of Staphylococci, is associated with an increase in macrolide susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Jan, 263-266
- SRIKUMAR, R., PAUL, C.J., POOLE, K. (2000): Influence of mutations in the *mexR* repressor gene on expression of the MexA-MexB-OprM multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 182, 1410-1414
- STAHLMANN, R., LODE, H. (2005): *Antibiotika und Chemotherapeutika – antiinfektiöse Therapie*. In: FORTH, W., HENSCHLER, D., RUMMEL, W.: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 9., neu bearb. Auflage. München, Jena: Fischer, 2005
- STEINBACH, G., KROELL, U. (1999): *Salmonella* infections in swine herds- epidemiology and importance for human diseases. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 106, 282-288
- STOCK, I., BURAK, S., SHERWOOD, K.J., GRÜGER, T., WIEDEMANN, B. (2003 A): Natural antimicrobial susceptibilities of strains of unusual *Serratia* spp.: *S. ficaria*, *S. fonticola*, *S. odorata*, *S. plymuthica* and *S. rubidea*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51, 865-885

- STOCK, I., GRÜGER, T., WIEDEMANN, B. (2003 B): Natural antibiotic susceptibility of strains of *Serratia marcescens* and the *S. liquefaciens* complex: *S. liquefaciens* sensu stricto, *S. proteamaculans* and *S. grimesii*. International Journal of Antimicrobial Agents, 22, 35-47
- STOCK, I., WIEDEMANN, B. (2003): Natural antimicrobial susceptibilities and biochemical profiles of *Yersinia enterocolitica*-like strains: *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii* and *Y. rohdei*. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 38, 139-152
- STOCK, I., WIEDEMANN, B. (2002): Natural antibiotic susceptibility of *Enterobacter amnigenus*, *Enterobacter cancerogenus*, *Enterobacter gergoviae* and *Enterobacter sakazakii*. Clinical Microbiology and Infection, 8, 564-578
- STOCK, I. (2002): Natural antibiotic susceptibility of *Enterobacter* spp., with special reference to *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter intermedius* strains. Journal of Chemotherapy, 14(5), 444-460
- STOCK, I., WIEDEMANN, B. (2001): Natural antibiotic susceptibility of *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. planticola*, *K. ornithinolytica* and *K. terrigena* strains. Journal of Medical Microbiology, 50, 396-406
- STOCK, I., GRÜGER, T., WIEDEMANN, B. (2001): Natural antibiotic susceptibility of strains of the *Enterobacter cloacae* complex. International Journal of Antimicrobial Agents, 18, 537-545.
- STOCK, I., WIEDEMANN, B. (2000): Natural antibiotic susceptibility of *Salmonella enterica* strains. International Journal of Antimicrobial Agents, 16, 211-217
- STOCK, I., GRÜGER, T., WIEDEMANN, B. (2000): Natural antibiotic susceptibility of *Rahnella aquatilis* and *R. aquatilis*-related strains. Journal of Chemotherapy, 12(1), 30-39.
- STOCK, I., WIEDEMANN, B. (1999 A): Natural antibiotic susceptibility of *Escherichia coli*, *Shigella*, *E. vulneris*, *E. hermannii* strains. Diagn Microbiol Infect Dis, 33, 187-199
- STOCK, I., WIEDEMANN, B. (1999 B): An in-vitro study of the antimicrobial susceptibilities of *Yersinia enterocolitica* and the definition of a database. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 43, 37-45.
- STOCK, I., WIEDEMANN, B. (1998): Die Bestimmung der natürlichen Antibiotikaempfindlichkeit. Chemotherapie Journal, 7(4), 127-135
- STRATTON, C.W., TAUSK, F. (1989): Intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. Antibiotics and Chemotherapy, 42, 275-286
- SUAREZ, J.E., MENDOZA, M.C. (1991): Plasmid-encoded fosfomycin resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 35(5), 791-795

- SUNDIN, G.W., MONKS, D.E., BENDER, C.L. (1995): Distribution of the streptomycin-resistance transposon Tn5393 among phylloplane and soil bacteria from managed agricultural habitats. *Can J Microbiol*, 41, 792-99
- SUNDIN, G.W., BENDER, C.L. (1996): Dissemination of the *strA-strB* streptomycin-resistance genes among commensal and pathogenic bacteria from humans, animals and plants. *Mol Ecol*, 5, 133-43
- SUNDIN, G.W. (2000): Examination of base pair variants of the *strA-strB* streptomycin resistance genes from bacterial pathogens of humans, animals and plants. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48, 848-49
- SUNDSTROM, L. (1998): The potential of integrons and connected programmed rearrangements for mediating horizontal gene transfer. *APMIS*, 84, 37-42
- SZCZEPANOWSKI, R., KRAHN, I., LINKE, B., GOESMANN, A., PÜHLER, A., SCHLÜTER, A. (2004): Antibiotic multiresistance plasmid pRSB101 isolated from a wastewater treatment plant is related to plasmids residing in phytopathogenic bacteria and carries eight different resistance determinants including a multidrug transport system. *Microbiology*, 150, 3613-3630
- SZYCH, J., CIESLIK, A., PACIOREK, J., KALUZEWSKI, S. (2001): Antibiotic resistance in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* strains isolated in Poland from 1998 to 1999. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 18, 37-42
- TANIGUCHI, H., ARAMAKI, H., NIKAIDO, Y., MIZUGUCHI, Y., NAKAMURA, M., KOGA, T., YOSHIDA, S. (1996): Rifampicin resistance and mutation of the *rpoB* gene in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiology Letters*, 144, 103-108
- TASH, K. (2005): *Rahnella aquatilis* bacteremia from a suspected urinary source. *Journal of Clinical Microbiology*, May, 2526-2528
- TEUBER, M., PERRETTEN, V., WIRSCHIN, F. (1996): Antibiotikumresistente Bakterien: eine neue Dimension. *Lebensmitteltechnologie*, 29, 182-199
- THEURETZBACHER, U. (2004): Beta-Lactamasen und Beta-Lactamase-Inhibitoren. *Chemotherapie Journal*, 13, 206-217
- THOMAS, A.D., FORBES-FAULKNER, J.C., DUFFIELD, B. J. (1981): Susceptibility of *Pseudomonas pseudomallei* isolates of non-human origin to chemotherapeutic agents by the single disc sensitivity methods. *Vet Microbiol*, 6, 367-74
- THONG, K.L., GOH, Y.L., RADU, S., NOORZALEHA, S., YASIN, R., KOH, Y.T., LIM, V.K.E., RUSUL, G., PUTHUCHEARY, S.D. (2002): Genetic diversity of clinical and environmental strains of *Sal-*

*monella enterica* serotype Weltevreden isolated in Malaysia. Journal of Clinical Microbiology, July, 2498-2503

TOLMASKY, M.E. (2000): Bacterial resistance to aminoglycosides and beta-lactams: the Tn1331 Transposon paradigm. Frontiers in Bioscience, Jan 1, 5, 20-29

TORRES, O.R., KORMAN, R.Z., ZAHLER, S.A., DUNNY, G.M. (1991): The conjugative transposon Tn925: enhancement of conjugal transfer by tetracycline in *Enterococcus faecalis* and mobilization of chromosomal genes in *Bacillus subtilis* and *E. faecalis*. Mol Gen Genet, 225, 395-400

TRIAS, J., NIKAIDO, H. (1990): Outer membrane protein D2 catalyzes facilitated diffusion of carbapenems and penems through the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 34(1), 52-57

TRIEU-CUOT, P., CARLIER, C., MARTIN, P., COURVALIN, P. (1987): Plasmid transfer from *Escherichia coli* to grampositive bacteria. FEMS Microbiology Letters, 48, 289-294

TROXLER, J., AZELVANDRE, P., ZALA, M., VE DE FAGO, G., HAAS, D. (1997): Conjugative transfer of chromosomal genes between fluorescent pseudomonads in the rhizosphere of wheat. Applied and Environmental Microbiology, 63, 213-219

TROXLER, R., VON GRAEVENITZ, A., FUNKE, G., WIEDEMANN, B., STOCK, I. (2000): Natural antibiotic susceptibility of *Listeria* species: *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monozytogenes*, *L. seeligeri* and *L. welshimeri* strains. Clin Microbiol Infect, 6, 525-535

ULRICH, A., MÜLLER, T. (1998): Heterogeneity of plant-associated streptococci as characterized by phenotypic features and restriction analysis of PCR-amplified 16S rDNA. Journal of Applied Microbiology, 84, 293-303

UNAL, R., FLEMING, H.P., MCFEETERS, R.F., THOMPSON, R.L., BREIDT, F., GIESBRECHT, F.G. (2001): Novel quantitative assays for estimating the antimicrobial activity of fresh garlic juice. Journal of Food Protection, 64(2), 189-94

UNGEMACH, F.R. (1999): Einsatz von Antibiotika in der Veterinärmedizin: Konsequenzen und rationaler Umgang. Tierärztliche Praxis, 27(G), 335-340

UNGEMACH, F.R. (2000): Figures on quantities of antibacterials used for different purposes in the EU countries and interpretation. Acta Vet Scand, Suppl. 93, 89-98

URFER, E., ROSSIER, P., MEAN, F., KRENDING, M. J., BURNENS, A., BILLE, J., FRANCIOLI, P., ZWAHLEN, A. (2000): Outbreak of *Salmonella* Braenderup gastroenteritis due to contaminated meat pies. Clin Microbiol Infect, 6(10), 536-542



- VAN DEN BOGAARD, A.E., WILLEMS, R., LONDON, N., TOP, J., STOBBERINGH, E.E. (2002): Antibiotic resistance of faecal enterococci in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49, 497-505
- VAN DEN BOGAARD, A.E., STOBBERINGH, E.E. (2000): Epidemiology of resistance to antibiotics – links between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 14, 327-335
- VETIDATA (2006): [www.vetidata.de](http://www.vetidata.de)
- VILJANEN, P., VAARA, M. (1984): Susceptibility of gram-negative bacteria to Polymyxin B nonapeptide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, June, 701-705
- VISWANATHAN, P., KAUR, R. (2001): Prevalence and growth of pathogens on salad vegetables, fruits and sprouts. *Int J Hyg Environ Health*, 203(3), 205-213
- VITAS, A.I., AGUADO, V., GARCIA-JALON, I. (2004): Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). *International Journal of Food Microbiology*, 90, 349-356
- VOGEL, F., BODMANN, K.-F. und die Expertenkommission der Paul-Ehrlich-Gesellschaft (2004): Empfehlungen zur kalkulierten parenteralen Initialtherapie bakterieller Erkrankungen bei Erwachsenen. *Chemotherapie Journal*, 13(1), 46-105
- VOGEL, F., NABER, K.G., WACHA, H., SHAH, P., SÖRGEN, F., KAYSER, F.H., MASCHMEYER, G., LODE, H. (1999): Parenterale Antibiotika bei Erwachsenen. *Chemotherapie Journal*, 1, 3-51
- WALKER, S. J., ARCHER, P., BANKS, J.G. (1990): Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. *Journal of Applied Bacteriology*, 68(2), 157-162
- WALLMANN, J., SCHRÖTER, K., WIELER, L.H., KROKER, R. (2003): National antibiotic resistance monitoring in veterinary pathogens from sick food-producing animals: the German programme and results from the 2001 pilot study. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22, 420-428
- WALSH, T.R., HALL, L., ASSINDER, S.J., NICHOLS, W.W., CARTWRIGHT, S.J., MACGOWAN, A.P., BENNETT, P.M. (1994): Sequence analysis of the L1 metallo- $\beta$ -lactamase from *Xanthomonas maltophilia*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1218, 199-201
- WALSH, D., DUFFY, G., SHERIDAN, J.J., BLAIR, I.S., MCDOWELL, D.A. (2001): Antibiotic resistance among *Listeria*, including *Listeria monocytogenes*, in retail foods. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 517-522

- WALTER, M.V., VENNES, J.W. (1985): Occurrence of multiple-antibiotic-resistant enteric bacteria in domestic sewage and oxidation lagoons. *Applied and Environmental Microbiology*, Oct, 930-933
- WATERS, V.L. (1999): Conjugative transfer in the dissemination of  $\beta$ -Lactam and aminoglykoside resistance. *Frontiers in Bioscience*, 4, 433-456
- WATERS, V.L. (2001): Conjugation between bacterial and mammalian cells. *Nat Genet*, 29(4), 375-376
- WEBB, V., DAVIES, J. (1994): Accidental release of antibiotic-resistance genes. *Trends in Biotechnology*, 12, 74-75
- WEGENER, H.C. (2003): Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. *Current Opinion in Microbiology*, 6, 439-445
- WEIGEL, L.M., CLEWELL, D.B., GILL, S.R., CLARK, N.C., MCDUGAL, L.K., FLANNAGAN, S.E., KOLONAY, J.F., SHETTY, J., KILLGORE, G.E., TENOVER, F.C. (2003): Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science*, 302, 1569-1571
- WELDHAGEN, G.F. (2004): Integrons and  $\beta$ -lactamases – a novel perspective on resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 23, 556-562
- WERNER, G., KLARE, I., HEIER, H., HINZ, K.-H., BÖHME, G., WENDT, M., WITTE, W. (2000): Quinupristin/Dalfopristin-resistant enterococci of the *sat(A)* (*vat(D)*) and *sat(G)* (*vat(E)*) genotypes from different ecological origins in Germany. *Microbial Drug Resistance*, 6(1), 37-47
- WHITE, P.A., MCIVER, C.J., RAWLINSON, W.D. (2001): Integrons and gene cassettes in the *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 45, 2658-2661
- WHO (1996): Guidelines for drinking-water quality, Vol. 2. Health criteria and other supporting information, pp. 82-106. Geneva: WHO. 973 pp.
- WHO (1997): The medical impact of antimicrobial use in food Animals. Report of a WHO Meeting, Berlin, Germany, 13 – 17 October 1997. WHO/EMC/ZOO/97.4
- WILCKS, A., ANDERSEN, S.R., LICHT, T.R. (2005): Characterization of transferable tetracycline resistance genes in *Enterococcus faecalis* isolated from raw food. *FEMS Microbiology Letters*, 243, 15-19
- WILSON, I.G. (1997): Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, Oct, 3741-51
- WINCKLER, C., GRAFE, A. (2000): Charakterisierung und Verwertung von Abfällen aus der Massentierhaltung unter Berücksichtigung verschiedener Böden. Hrsg.: Umweltbundesamt Berlin 2000, Forschungsbericht 297 33 911; UBA-Texte 44

- WITTE, W. (1998): Medical Consequences of antibiotic use in agriculture. *Science*, 279 (5353), 2, 996-997
- WRIGHT, G.D. (2005): Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 1451-1470
- WU, C.-J., LEE, H.-C., LEE, N.-Y., SHIH, H.-I., KO, N.-Y., WANG, L.-R., KO, W.-C. (2006): Prevalence of gram-negative bacilli and increasing antimicrobial resistance in nosocomial bloodstream infections at a university hospital in southern Taiwan, 1996-2003. *J Microbiol Immunol Infect*, 39, 135-143
- ZAMBRYSKI, P.C. (1992): Chronicles from the *Agrobacterium*-plant cell DNA transfer story. *Annu Rev Plant Physiol*, 43, 465-490
- ZERVOS, M.J., SCHABERG, D.R. (1985): Reversal of the *in vitro* susceptibility of enterococci to trimethoprim-sulfamethoxazole by folinic acid. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Sept, 446-448
- ZILHAO, R., COURVALIN, P. (1990): Nucleotide sequence of the *fos(B)* gene conferring fosfomycin resistance in *Staphylococcus epidermis*. *FEMS Microbiology Letters*, 68, 267-272
- ZORNBACH, W. (2005), Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft: Persönliche Informationen zum Einsatz von Antibiotika im Pflanzenschutz.
- ZMP (2003): Zentrale Markt- und Preisberichtsstelle: Marktbilanz/Gemüse. Bonn: ZMP, 2003

## I Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Antibiotika-Einsatz in der Human- und Veterinärmedizin in Europa (EU und Schweiz) in den Jahren 1997 und 1999	13
Tabelle 2:	Prozentualer Anteil einzelner Antibiotikaklassen an den gesamten Antibiotikaverordnungen im Jahr 2004 in Deutschland im Bereich Humanmedizin	14
Tabelle 3:	Übersicht über die anhand von tierärztlichen Herstellungsaufträgen ermittelten Mengen an Antibiotika in der EU (mit Schweiz) im Jahr 1997	17
Tabelle 4:	Wichtige Mechanismen der Antibiotika-Resistenz	33
Tabelle 5:	Mechanismen der Tetrazyklinresistenz und ihre Determinanten bei verschiedenen Bakterienarten	37
Tabelle 6:	Ausgewählte Bakterienarten der Gruppe coliformer Bakterien	40
Tabelle 7:	Übersicht über die verwendeten Primer	53
Tabelle 8:	Übersicht über die verwendeten Hybridisierungs sonden	54
Tabelle 9:	Orientierende biochemische Differenzierungsreaktionen	56
Tabelle 10:	Metabolismus ausgewählter Stoffe durch <i>Enterococcus</i> spp.	58
Tabelle 11:	Übersicht über die verwendeten Antibiotika	60
Tabelle 12:	Optimierter Mix für die Realtime-PCR mit Hybridisierungssonden	67
Tabelle 13:	PCR-Programm für <i>tet</i> (B)	67
Tabelle 14:	PCR-Programm für <i>tet</i> (M)	68
Tabelle 15:	PCR-Programm für <i>tet</i> (O)	68
Tabelle 16:	Statistische Tests in der Auswertung der Daten	71
Tabelle 17:	Signifikanzgrenzen	71
Tabelle 18:	Vorkommen ausgewählter Bakteriengruppen in pflanzlichem Probenmaterial	73
Tabelle 19:	Systematische Zugehörigkeit coliformer Bakterien isoliert aus pflanzlichen Lebensmitteln unterschiedlicher Vermarktungsstufen	75
Tabelle 20:	Systematische Zugehörigkeit von <i>Pseudomonas</i> spp. isoliert aus pflanzlichen Lebensmitteln unterschiedlicher Vermarktungsstufen	76
Tabelle 21:	Systematische Zugehörigkeit von <i>Enterococcus</i> spp. isoliert aus pflanzlichen Lebensmitteln unterschiedlicher Vermarktungsstufen	77
Tabelle 22:	Systematische Zugehörigkeit von <i>Listeria</i> spp. isoliert aus pflanzlichen Lebensmitteln unterschiedlicher Vermarktungsstufen	77
Tabelle 23:	Verteilung sensibel, intermediär und resistent einzustufender <i>E. coli</i> -Isolate aus Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft	79
Tabelle 24:	Häufigkeiten nicht-, einfach- und mehrfachresistenter <i>E. coli</i> -Isolate aus pflanzlichen Lebensmitteln unterschiedlicher Vermarktungsstufen	80

Tabelle 25: Verteilung der Mehrfachresistenz sowie dominante phänotypische Resistenzprofile von <i>E. coli</i> -Isolaten aus pflanzlichen Lebensmitteln	81
Tabelle 26: Resistenzprofile hochmehrfachresistenter <i>E. coli</i> aus pflanzlichen Lebensmitteln	82
Tabelle 27: Verteilung sensibel, intermediär und resistent einzustufender <i>Ent. aerogenes</i> -Isolate aus Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft	83
Tabelle 28: Häufigkeiten nicht-, einfach- und mehrfachresistenter <i>Ent. aerogenes</i> -Isolate aus pflanzlichen Lebensmitteln unterschiedlicher Vermarktungsstufen	84
Tabelle 29: Verteilung der Mehrfachresistenz sowie dominante phänotypischer Resistenzprofile von <i>Ent. aerogenes</i> aus pflanzlichen Lebensmitteln	85
Tabelle 30: Prozentuale Verteilung sensibel, intermediär und resistent einzustufender <i>Ent. cloacae</i> -Isolate aus Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft	86
Tabelle 31: Häufigkeiten nicht-, einfach- und mehrfachresistenter <i>Ent. cloacae</i> -Isolate aus pflanzlichen Lebensmitteln unterschiedlicher Vermarktungsstufen	88
Tabelle 32: Verteilung der Mehrfachresistenz sowie dominante phänotypische Resistenzprofile von <i>Ent. cloacae</i> aus pflanzlichen Lebensmitteln	89
Tabelle 33: Resistenzprofile hochmehrfach-resistenter <i>Ent. cloacae</i> -Isolate aus pflanzlichen Lebensmitteln unterschiedlicher Vermarktungsstufen	89
Tabelle 34: Prozentuale Verteilung sensibel, intermediär und resistent einzustufender <i>Ent. sakazakii</i> -Isolate aus pflanzlichen Lebensmitteln	90
Tabelle 35: Häufigkeiten nicht-, einfach- und mehrfachresistenter <i>Ent. sakazakii</i> isoliert aus pflanzlichen Lebensmitteln unterschiedlicher Vermarktungsstufen	93
Tabelle 36: Verteilung der Mehrfachresistenz sowie dominante phänotypische Resistenzprofile von <i>Ent. sakazakii</i> aus pflanzlichen Lebensmitteln	93
Tabelle 37: Resistenzprofile hochmehrfachresistenter <i>Ent. sakazakii</i> -Isolate aus pflanzlichen Lebensmitteln unterschiedlicher Vermarktungsstufen	94
Tabelle 38: Prozentuale Verteilung sensibel, intermediär und resistent einzustufender <i>Ent. gergoviae</i> -Isolate aus Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft	95
Tabelle 39: Häufigkeiten nicht-, einfach- und mehrfachresistenter <i>Ent. gergoviae</i> -Isolate isoliert aus pflanzlichen Lebensmitteln unterschiedlicher Vermarktungsstufen	98
Tabelle 40: Prozentuale Verteilung der Mehrfachresistenz sowie dominante phänotypische Resistenzprofile von <i>Ent. gergoviae</i> aus pflanzlichen Lebensmitteln	98
Tabelle 41: Resistenzprofil des hochmehrfachresistenten <i>Ent. gergoviae</i> -Isolats aus pflanzlichen Lebensmitteln	99

Tabelle 42: Verteilung sensibel, intermediär und resistent einzustufender <i>Ent. cancerogenus</i> -Isolate aus Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft	100
Tabelle 43: Häufigkeiten nicht-, einfach- und mehrfachresistenter <i>Ent. cancerogenus</i> -Isolate aus pflanzlichen Lebensmitteln unterschiedlicher Vermarktungsstufen	101
Tabelle 44: Verteilung der Mehrfachresistenz sowie dominante phänotypische Resistenzprofile von <i>Ent. cancerogenus</i> aus pflanzlichen Lebensmitteln	102
Tabelle 45: Prozentuale Verteilung sensibel, intermediär und resistent einzustufender <i>Pantoea agglomerans</i> -Isolate aus Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft	103
Tabelle 46: Häufigkeiten nicht-, ein- und mehrfachresistenter <i>Pantoea agglomerans</i> -Isolate aus pflanzlichen Lebensmitteln unterschiedlicher Vermarktungsstufen	106
Tabelle 47: Prozentuale Verteilung der Mehrfachresistenz sowie dominante phänotypische Resistenzprofile von <i>Pantoea agglomerans</i> -Isolaten aus pflanzlichen Lebensmitteln	106
Tabelle 48: Verteilung sensibel, intermediär und resistent einzustufender <i>K. pneumoniae</i> spp. <i>pneumoniae</i> -Isolate aus Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft	107
Tabelle 49: Häufigkeiten nicht-, einfach- und mehrfachresistenter <i>K. pneumoniae</i> spp. <i>pneumoniae</i> isoliert aus pflanzlichen Lebensmitteln unterschiedlicher Vermarktungsstufen	108
Tabelle 50: Verteilung der Mehrfachresistenz sowie dominante phänotypische Resistenzprofile von <i>K. pneumoniae</i> spp. <i>pneumoniae</i> aus pflanzlichen Lebensmitteln	109
Tabelle 51: Verteilung sensibel, intermediär und resistent einzustufender <i>R. aquatilis</i> -Isolate aus Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft	110
Tabelle 52: Häufigkeiten nicht-, einfach- und mehrfachresistenter <i>R. aquatilis</i> -Isolate aus pflanzlichen Lebensmitteln unterschiedlicher Vermarktungsstufen	111
Tabelle 53: Verteilung der Mehrfachresistenz sowie dominante phänotypische Resistenzprofile von <i>R. aquatilis</i> aus pflanzlichen Lebensmitteln	111
Tabelle 54: Verteilung sensibel, intermediär und resistent einzustufender <i>Ser. marcescens</i> -Isolate aus Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft	112
Tabelle 55: Häufigkeiten nicht-, einfach- und mehrfachresistenter <i>Ser. marcescens</i> -Isolate aus pflanzlichen Lebensmitteln unterschiedlicher Vermarktungsstufen	113
Tabelle 56: Verteilung der Mehrfachresistenz sowie dominante phänotypische Resistenzprofile von <i>Ser. marcescens</i> aus pflanzlichen Lebensmitteln	114

Tabelle 57: Prozentuale Verteilung sensibel, intermediär und resistent einzustufender coliformer Bakterienisolate aus pflanzlichen Lebensmitteln	115
Tabelle 58: Prozentuale Verteilung sensibel, intermediär und resistent einzustufender <i>P. aeruginosa</i> -Isolate aus pflanzlichen Lebensmitteln	117
Tabelle 59: Häufigkeiten nicht-, einfach- und mehrfachresistenter <i>P. aeruginosa</i> isoliert aus pflanzlichen Lebensmitteln unterschiedlicher Vermarktungsstufen	120
Tabelle 60: Verteilung der Mehrfachresistenz sowie dominante phänotypische Resistenzprofile von <i>P. aeruginosa</i> aus pflanzlichen Lebensmitteln	120
Tabelle 61: Prozentuale Verteilung sensibel, intermediär und resistent einzustufender <i>P. putida</i> -Isolate aus pflanzlichen Lebensmitteln	121
Tabelle 62: Häufigkeiten nicht-, einfach- und mehrfachresistenter <i>P. putida</i> -Isolate aus pflanzlichen Lebensmitteln unterschiedlicher Vermarktungsstufen	124
Tabelle 63: Verteilung der Mehrfachresistenz sowie dominante phänotypische Resistenzprofile von <i>P. putida</i> aus pflanzlichen Lebensmitteln	124
Tabelle 64: Verteilung sensibel, intermediär und resistent einzustufender <i>P. fluorescens</i> -Isolate aus pflanzlichen Lebensmitteln	125
Tabelle 65: Häufigkeiten nicht-, einfach- und mehrfachresistenter <i>P. fluorescens</i> -Isolate isoliert aus pflanzlichen Lebensmitteln unterschiedlicher Vermarktungsstufen	126
Tabelle 66: Verteilung der Mehrfachresistenz sowie dominante phänotypische Resistenzprofile von <i>P. fluorescens</i> aus pflanzlichen Lebensmitteln	126
Tabelle 67: Prozentuale Verteilung sensibel, intermediär und resistent einzustufender <i>Pseudomonas</i> spp. aus pflanzlichen Lebensmitteln	127
Tabelle 68: Prozentuale Verteilung sensibel, intermediär und resistent einzustufender <i>E. faecalis</i> -Isolate aus pflanzlichen Lebensmitteln	129
Tabelle 69: Häufigkeiten nicht-, einfach- und mehrfachresistenter <i>E. faecalis</i> isoliert aus pflanzlichen Lebensmitteln unterschiedlicher Vermarktungsstufen	131
Tabelle 70: Verteilung der Mehrfachresistenz sowie dominante phänotypische Resistenzprofile von <i>E. faecalis</i> aus pflanzlichen Lebensmitteln	132
Tabelle 71: Prozentuale Verteilung sensibel, intermediär und resistent einzustufender <i>E. faecium</i> -Isolate aus pflanzlichen Lebensmitteln	133
Tabelle 72: Häufigkeiten nicht-, einfach- und mehrfachresistenter <i>E. faecium</i> -Isolate aus pflanzlichen Lebensmitteln unterschiedlicher Vermarktungsstufen	134
Tabelle 73: Verteilung der Mehrfachresistenz sowie dominante phänotypische Resistenzprofile von <i>E. faecium</i> aus pflanzlichen Lebensmitteln	135
Tabelle 74: Resistenzprofile hochmehrfachresistenter <i>E. faecium</i> -Isolate aus pflanzlichen Lebensmitteln unterschiedlicher Vermarktungsstufen	135

---

Tabelle 75: Prozentuale Verteilung sensibel, intermediär und resistent einzustufender <i>E. nonfc.</i> -Isolate aus pflanzlichen Lebensmitteln	136
Tabelle 76: Häufigkeiten nicht-, einfach- und mehrfachresistenter <i>E. nonfc.</i> isoliert aus pflanzlichen Lebensmitteln unterschiedlicher Vermarktungsstufen	139
Tabelle 77: Verteilung der Mehrfachresistenz sowie dominante phänotypische Resistenzprofile von <i>E. nonfc.</i> aus pflanzlichen Lebensmitteln	140
Tabelle 78: Prozentuale Verteilung sensibel, intermediär und resistent einzustufender <i>Enterococcus</i> spp. aus pflanzlichen Lebensmitteln	141
Tabelle 79: Wiederfindungsraten für <i>tet(M)</i> -Gene aus <i>Bacillus</i> R89 in pflanzlichen Lebensmitteln	147





Fortsetzung Tabelle A 1

Antibiotikum	<i>E. coli</i>	<i>C. freundii</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>E. asburiae</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. sakazakii</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. cancerogenus</i>	<i>E. gergoviae</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>S. liquefaciens</i>	<i>S. plymuthica</i>	<i>S. enterica</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Hafnia alvei</i>	<i>E. vulneris</i>	<i>E. hermannii</i>
<b>Aminoglykoside</b>																		
Amikacin	si										X?							
Apramycin																		
Gentamicin	si																	
Tobramycin	si										X?							
Neomycin																		
Netilmicin	si										X?							
Spectinomycin	si																	
Streptomycin																		
<b>Fluorchinolone</b>																		
Ciprofloxacin																		
Enrofloxacin																		
<b>Chloramphenicolderivate</b>																		
Chloramphenicol											X?	X?						
Florfenicol																		
<b>Tetrazykline</b>																		
Doxyzyklin	(si)										X <sup>i,r</sup>					X	X <sup>i</sup>	
<b>Andere Antibiotika</b>																		
Colistin											X	X	X					
Co-Trimoxazol																		X <sup>i</sup>

X = intrinsisch resistent; X<sup>i</sup> = intrinsisch intermediär; X? = nicht abgeklärt, da sowohl intrinsisch sensible als auch intrinsisch resistente Populationen (STOCK ET AL. 2003); X<sup>b2</sup> = nur Biovar 2; X<sup>i,r</sup> = natürlich intermediär bis resistent

**Tabelle A 2: Natürliche Resistenzen bei Nonfermentern (STRATTON UND TAUSK, 1989; AIRES ET AL. 1999; SIMON UND STILLE, 2000; SCHWEIZER, 2003)**

<b>Antibiotikum</b>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i>
<b>Penicilline</b>			
Amoxicillin/Clavulansäure	X	X	X
Ampicillin	X	X	X
Mezlocillin	X	X	X
Piperacillin			
Piperacillin/Tazobactam			
<b>Cephalosporine</b>			
Cefaclor	X	X	X
Cefuroxim	X	X	X
Cefoxitin	X	X	X
Cefotaxim	X	X	X
Ceftazidim			
Cefepim			
Ceftiofur	X	X	X
<b>Carbapeneme</b>			
Imipenem			
Meropenem			
<b>Aminoglykoside</b>			
Amikacin			
Apramycin			
Gentamicin			
Tobramycin			
Neomycin			
Netilmicin			
Spectinomycin			
Streptomycin			
<b>Tetrazykline</b>			
Doxyzyklin	X		
<b>Fluorchinolone</b>			
Ciprofloxacin			
Enrofloxacin			
<b>Chloramphenicolderivate</b>			
Chloramphenicol	X	X	X
Florfenicol	X	X	X
<b>andere Antibiotika</b>			
Colistin			
Sulfamethoxazol/Trimethoprim	X	X	X

X = intrinsisch resistent

**Tabelle A 3: Natürliche Resistenzen bei gram-positiven Bakterien (DUTTA UND DEVRIESE 1984; LECLERCQ ET AL., 1992; MURRAY, 1990; MURRAY, 1998; TROXLER ET AL., 2000; SINGH ET AL., 2001; SHEPARD UND GILMORE, 2002; SINGH ET AL., 2002; DINA ET AL., 2003; HERSHBERGER ET AL., 2004; KRESKEN, 2005)**

Antibiotikum	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. grayi</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. seelgeri</i>
<b>Penicilline</b>								
Penicillin G	X	X	X					
Oxacillin	X	X	X	X s,r	X s,r	X s,r	X s,r	X s,r
Mezlocillin								
Amoxycillin/Clavulansäure								
Ampicillin								
<b>Cephalosporine</b>								
Cefazolin	X	X	X					
Cefuroxim	X	X	X	X	X	X	X	X
<b>Carbapeneme</b>								
Imipenem								
<b>Aminoglykoside</b>								
Gentamicin	X	X	X					
Kanamycin	X	X	X					
<b>Tetrazykline</b>								
Doxyzyklin								
<b>Fluorchinolone</b>								
Ciprofloxacin		X <sup>i</sup>				X	X	X
Enrofloxacin								
Moxifloxacin								
<b>Makrolide</b>								
Erythromycin	X <sup>i</sup>	X <sup>i</sup>	X <sup>i</sup>					
Tylosin								

X: intrinsische Resistenz; X<sup>i</sup>: intrinsisch intermediär

Fortsetzung Tabelle A 3

Antibiotikum	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. grayi</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. seelgeri</i>
<b>Lincosamide</b>								
Clindamycin	X	X	X					
<b>Glykopeptide</b>								
Vancomycin			X					
Teicoplanin								
<b>Chloramphenicolivate</b>								
Chloramphenicol								
Florfenicol								
<b>Oxazolidinone</b>								
Linezolid								
<b>Streptogramine</b>								
Quinupristin/Dalfopristin	X			X <sup>s,i,r</sup>	X <sup>s,i,r</sup>	X <sup>s,i,r</sup>	X <sup>s,i,r</sup>	X <sup>s,i,r</sup>
<b>Andere Antibiotika</b>								
Co-Trimoxazol								
Rifampicin								
Fosfomycin				X	X	X	X	X
Nitrofurantoin								
Metronidazol	X	X	X	X	X	X	X	X

X: intrinsische Resistenz; X<sup>i</sup>: intrinsisch intermediär; X<sup>s,i,r</sup>: sowohl intrinsisch sensibel, als auch intermediär als auch resistent

**Tabelle A 4: Prozentuale Verteilung der MHK-Werte von *E. coli* (n = 34), Herkunft landwirtschaftlicher Betrieb und Supermarkt**

MHK (µg/ml)	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	>
AMC					11,8	14,7	17,7	23,5	14,7	0	2,9	8,8	5,9
AMK						41,2	44,1	11,8	2,9	0			0
AMP					5,9	14,7	23,5	5,9	8,8	11,8	2,9	5,9	20,6
APR							79,4	8,8	5,9	2,9	2,9		0
C/C			79,4	2,9	2,9	0							14,7
CAZ			64,7	14,7	2,9	5,9	5,9	5,9	0	0			0
CEC					17,7	2,9	23,5	14,7					41,2
CEP						97,1	0	2,9	0				0
CET				58,8	20,6	5,9	2,9	2,9					8,8
CIP	73,5	23,5	2,9	0	0	0	0	0					0
CMP						26,5	23,5	29,4	5,9	8,8	2,9		2,9
COL						88	2,9	0	0	0	2,9		5,9
COX						21	21	21	11,8				26,5
CTX			82	5,9	0	0	2,9	2,9	0	2,9			2,9
CXM				2,9	0	11,8	32	29,4	5,9	5,9	2,9		8,8
CZC			73,5	17,7	0	2,9							5,9
DOX		8,8	2,9	17,7	26,5	23,5	5,9	2,9	11,8				0
ENR	61,8	23,5	5,9	8,8	0	0	0	0					0
FLL						26,5	20,6	26,5	8,8	5,9	0		2,9
GEN			20,6	32,4	24	11,8	9	2,9	0	0			0
IMP		23,5	29,4	32,4	11,8	0	2,9	0	0				0
MER		97,1	0	2,9	0	0	0	0	0				0
MZL							61,8		17,7				20,6
NEO						64,7	26,5	8,8	0	0			0
NET					64,7		35,3						0
PIP					35,3	23,5	11,8	5,9	11,8	0	2,9	0	8,8
PIT					61,8	29,4	2,9	0	5,9	0	0	0	0
SPT					2,9	0	0	5,9	17,7	11,8	18	23,5	20,6
STR							67,7	17,7	5,9	2,9	0		5,9
SXT					47,1	29,4	2,9	8,8	0	2,9	2,9	0	5,9
TOB			23,5	32,4	29,4	14,7	0	0	0	0			0

Trennt sensibel u. intermediär
  Werte rechts der Linie resistent
 >: höher als höchste Konz.

nicht gemessener Bereich
  gemessene Konzentrationen

**Tabelle A 5: Prozentuale Verteilung der MHK-Werte von *Enterobacter aerogenes* (n = 24), Herkunft landwirtschaftlicher Betrieb und Supermarkt**

MHK (µg/ml)	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	>
AMC					29,2	16,7	16,7	12,5	12,5	4,2	4,2	0	4,2
AMK						62,5	37,5	0	0	0			0
AMP				0	4,2		8,3	33,3	16,7	8,3	4,2	8,3	16,7
APR							95,8	4,2	0	0			0
C/C			87,5	4,2	4,2	0							4,2
CAZ			83,3	8,3	8,3	0	0	0	0	0			0
CEC					45,8	4,2	0	4,2					45,8
CEP						100	0	0	0				0
CET				75,0	4,2	4,2	4,2	8,3					4,2
CIP	87,5	8,3	0	0	4,2	0	0	0					0
CMP						70,8	16,7	12,5	0	0	0		0
COL						75,0	16,7	12,5	0	0	0		16,7
COX						8,3	45,8	25,0	12,2				8,3
CTX			70,8	16,7	0	4,2	4,2	0	4,2	0			0
CXM				0	16,7	29,2	12,5	16,7	0	0	4,2		20,8
CZC			87,5	8,3	4,2	0							0
DOX		0	0	41,7	45,8	0	0	4,2	4,2				4,2
ENR	79,2	16,7	4,2	0	0	0	0	0					0
FLL						66,7	16,7	12,5	4,2	0	0		0
GEN			37,5	37,5	25,0	0	0	0	0	0			0
IMP		4,2	33,3	41,7	16,7	4,2	0	0	0				0
MER		100	0	0	0	0	0	0	0				0
MZL							79,2		8,3				12,5
NEO						95,8	4,2	0	0	0			0
NET					91,7		8,3						0
PIP				37,5	41,7	8,3	4,2	0	0	0	4,2	0	4,2
PIT				79,2	16,7	4,2	0	0	0	0	0	0	0
SPT				0	0	4,2	4,2	8,3	4,2	62,5	8,3	8,3	8,3
STR							91,7	0	0	0	8,3		0
SXT				50,0	25,0	12,5	8,3	0	4,2	0	0	0	0
TOB			45,8	33,3	20,8	0	0	0	0	0			0

Trennt sensibel u. intermediär
  Werte rechts der Linie resistent
 >: höher als höchste Konz.

nicht gemessener Bereich
  gemessene Konzentrationen

**Tabelle A 6: Prozentuale Verteilung der MHK-Werte von *Enterobacter cloacae* (n = 172), Herkunft: Landwirtschaftlicher Betrieb und Supermarkt**

MHK (µg/ml)	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	>
AMC					29,7	13,4	11,1	7,0	2,3	1,2	4,1	8,7	22,7
AMK						69,8	26,2	4,1	0	0			0
AMP					1,7	7,6	9,3	10,5	12,8	17,4	16,0	13,4	11,6
APR							91,9	7,0	1,2	0	0		0
C/C			73,3	7,6	4,1	4,1							11,1
CAZ			69,2	22,7	2,3	3,5	1,2	0	0	0			1,2
CEC					11,1	5,2	14,0	16,3					53,5
CEP						98,8	1,2	0	0				0
CET				35,5	37,2	12,8	4,7	1,2					8,7
CIP	74,4	16,3	5,2	3,5	0	0,6	0	0					0
CMP						36,6	23,8	30,2	7,6	1,2	0		0,6
COL						88,4	4,1	0,6	0,6	0,6	1,7		4,1
COX						23,3	17,4	18,0	4,1				37,2
CTX			66,3	11,1	7,6	5,8	2,3	2,3	2,9	1,7			0
CXM				0,6	0	5,8	25,0	23,8	14,5	13,4	9,3		7,4
CZC			67,4	17,4	5,8	1,7							7,6
DOX		1,7	1,2	34,9	21,5	36,6	4,1	0	0				0
ENR	65,1	20,4	11,1	3,5	0	0	0	0					0
FLL						37,8	23,8	29,7	7,6	0,6	0		0,6
GEN			41,9	30,8	20,4	7,0	0	0	0	0			0
IMP		20,4	22,7	32,6	12,8	7,0	3,5	0	0				1,2
MER		97,1	1,2	0,6	1,2	0	0	0	0				0
MZL							66,3		21,5				12,2
NEO						82,0	14,0	4,0	0	0			0
NET					92,4		7,6						0
PIP					28,5	29,1	15,7	14,5	5,2	2,3	1,7	0	2,9
PIT					61,1	29,1	5,8	2,3	1,2	0,6	0	0	0
SPT					2,3	1,2	9,3	15,7	7,0	11,6	25,0	25,6	2,3
STR							93,6	4,1	0,6	0	1,7		0
SXT					47,7	26,2	20,9	4,1	0,6	0,6	0	0	0
TOB			45,9	31,4	19,2	3,5	0	0	0	0			0

Trennt sensibel u. intermediär
Werte rechts der Linie resistent
>: höher als höchste Konz.

nicht gemessener Bereich
  gemessene Konzentrationen



**Tabelle A 7: Prozentuale Verteilung der MHK-Werte von *Enterobacter sakazakii* (n = 129), Herkunft: Landwirtschaftlicher Betrieb und Supermarkt**

MHK (µg/ml)	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	>
AMC					9,3	22,5	42,6	13,2	2,3	1,6	1,6	2,3	4,7
AMK						72,9	24,8	2,3	0	0			0
AMP					7,8	32,6	24,0	14,7	4,7	7,8	3,9	3,1	1,6
APR							89,9	10,1	0	0	0		0
C/C			91,5	4,7	0	1,6							2,3
CAZ			88,4	6,2	2,3	0,8	1,6	0	0	0			0,8
CEC					12,4	9,3	21,7	22,5					34,1
CEP						100	0	0	0				0
CET				77,5	16,3	1,6	1,6	1,6					1,6
CIP	93,8	3,1	0,8	0,8	1,6	0	0	0					0
CMP						76,0	16,3	5,4	0,8	1,6	0		0
COL						82,2	3,1	2,3	0,8	1,6	1,6		8,5
COX						7,0	31,8	32,6	14,7				14,0
CTX			90,7	5,4	1,6	1,6	0	0	0,8	0			0
CXM				2,3	3,9	29,5	38,8	13,2	4,7	3,9	1,6		2,3
CZC			91,5	5,4	3,1	0							0
DOX		6,2	18,6	48,8	20,9	4,7	0	0	0				0,8
ENR	93,8	3,9	0,8	0	0	1,6	0	0					0
FLL						76,0	16,3	7,8	0	0	0		0
GEN			33,3	33,3	19,4	6,2	0	0	0	0			0
IMP		14,0	32,6	40,3	8,5	4,7	0	0	0				0
MER		100	0	0	0	0	0	0	0				0
MZL							93,0		3,9				3,1
NEO						81,4	17,1	1,6	0	0			0
NET					97,7		2,3						0
PIP					77,5	14,7	3,9	1,6	0,8	0	0,8	0	0,8
PIT					92,3	7,0	0	0	0	0	0	0	0,8
SPT					0	0	3,9	14,7	4,7	25,6	41,1	7,8	2,3
STR							96,9	0,8	1,6	0,8	0		0
SXT					71,3	25,6	1,6	0,8	0	0	0	0	0,8
TOB			45,7	33,3	17,8	3,1	0	0	0	0			0

Trennt sensibel u. intermediär
  Werte rechts der Linie resistent
 >: höher als höchste Konz.

nicht gemessener Bereich
  gemessene Konzentrationen

**Tabelle A 8: Prozentuale Verteilung der MHK-Werte von *Enterobacter gergoviae* (n = 92), Herkunft: Landwirtschaft und Supermarkt**

MHK (µg/ml)	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	>
AMC					8,7	20,7	51,1	10,9	3,3	1,1	1,1	0	3,3
AMK						79,4	19,6	1,1	0	0			0
AMP					6,5	20,7	37,0	14,1	8,7	5,4	2,2	0	5,4
APR							95,7	4,4	0	0	0		0
C/C			96,8	1,1	0	1,1							1,1
CAZ			89,1	5,4	0	4,4	1,1	0	0	0			0
CEC					20,7	17,4	32,6	16,3					13,0
CEP						100	0	0	0				0
CET				84,8	7,6	3,3	2,2	0					2,2
CIP	95,7	2,2	2,2	0	0	0	0	0					0
CMP						90,2	5,4	3,3	0	0	1,1		0
COL						95,7	0	0	0	1,1	0		3,3
COX						9,8	48,9	26,1	8,7				6,5
CTX			89,1	5,4	1,1	2,2	0	0	0	1,1			1,1
CXM				2,2	9,8	45,7	17,4	16,3	4,4	3,3	0		1,1
CZC			93,5	3,3	1,1	0							2,2
DOX		4,4	39,1	50,0	1,1	2,2	2,2	0	1,1				0
ENR	93,5	3,3	1,1	0	1,1	0	1,1	0					0
FLL						83,7	9,8	4,4	1,1	0	0		1,1
GEN			43,5	41,3	12,0	3,3	0	0	0	0			0
IMP		26,1	37,0	30,4	4,4	1,1	0	0	1,1				0
MER		100	0	0	0	0	0	0	0				0
MZL							92,4		2,2				5,4
NEO						87,0	12,0	1,1	0	0			0
NET					97,8		1,1						1,1
PIP					84,8	4,4	3,3	2,2	2,2	1,1	1,1	1,1	0
PIT					88,0	7,6	1,1	1,1	2,2	0	0	0	0
SPT					2,2	1,1	5,4	27,2	2,2	22,8	30,4	6,5	2,2
STR							96,8	1,1	1,1	0	0		1,1
SXT					90,2	7,6	0	0	0	0	0	0	2,2
TOB			43,5	41,3	15,2	0	0	0	0	0			0

Trennt sensibel u. intermediär
  Werte rechts der Linie resistent
 >: höher als höchste Konz.

nicht gemessener Bereich
  gemessene Konzentrationen

**Tabelle A 9: Prozentuale Verteilung der MHK-Werte von *Enterobacter cancerogenus* (n = 46),  
Herkunft: Landwirtschaftlicher Betrieb und Supermarkt**

MHK (µg/ml)	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	>
AMC					6,5	41,3	30,4	15,2	4,4	0	0	2,2	0
AMK						76,1	21,7	2,2	0	0			0
AMP					4,4	41,3	21,7	26,1	0	2,2	2,2	0	2,2
APR							95,7	4,4	0	0	0		0
C/C			97,8	0	0	0							2,2
CAZ			87,0	6,5	4,4	0	0	2,2	0	0			0
CEC					21,7	17,4	28,3	13,0					19,6
CEP						100	0	0	0				0
CET				82,6	10,9	4,4	0	0					2,2
CIP	89,1	6,5	2,2	0	2,2	0	0	0					0
CMP						84,8	6,5	6,5	2,2	0	0		0
COL						91,3	0	2,2	0	0	0		6,5
COX						19,6	37,0	26,1	2,2				15,2
CTX			93,5	2,2	2,2	0	2,2	0	0	0			0
CXM				0	21,7	34,8	17,4	19,6	0	2,2	0		4,4
CZC			91,3	6,5	0	2,2							0
DOX		10,9	32,6	30,4	19,6	4,4	2,2	0	0				0
ENR	93,5	2,2	4,4	0	0	0	0	0					0
FLL						78,3	13,0	4,4	4,4	0	0		0
GEN			63,0	17,4	15,2	4,4	0	0	0	0			0
IMP		19,6	45,7	23,9	8,7	0	0	2,2	0				0
MER		97,8	2,2	0	0	0	0	0	0				0
MZL							95,7		4,4				0
NEO						87,0	10,9	2,2	0	0			0
NET					97,8		2,2						0
PIP					80,4	13,0	2,2	2,2	0	0	0	0	2,2
PIT					89,1	8,7	0	0	0	0	0	0	2,2
SPT					2,2	0	10,9	19,6	6,5	19,6	34,8	6,5	0
STR							100	0	0	0	0		0
SXT					82,6	13,0	4,4	0	0	0	0	0	0
TOB			58,7	17,4	23,9	0	0	0	0	0			0

Trennt sensibel u. intermediär
  Werte rechts der Linie resistent
 >: höher als höchste Konz.

nicht gemessener Bereich
  gemessene Konzentrationen

**Tabelle A 10: Prozentuale Verteilung der MHK-Werte von *Pantoea agglomerans* (n = 96), Herkunft: Landwirtschaftlicher Betrieb und Supermarkt**

MHK (µg/ml)	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	>
AMC					17,7	30,2	28,1	12,5	4,2	3,1	2,1	0	2,1
AMK						74,0	25,0	1,0	0	0			0
AMP					9,4	25,0	21,9	21,9	10,4	4,2	2,1	4,2	1,0
APR							94,8	5,2	0	0	0		0
C/C			97,9	1,0	0	0							1,0
CAZ			77,1	11,5	4,2	2,1	4,2	1,0	0	0			0
CEC					19,8	13,5	26,0	24,0					16,7
CEP						100	0	0	0				0
CET				79,2	11,5	5,2	1,0	2,1					1,0
CIP	92,7	6,3	1,0	0	0	0	0	0					0
CMP						82,3	13,5	4,2	0	0	0		0
COL						93,8	3,1	0	0	2,1	1,0		0
COX						18,8	36,5	25,0	12,5				7,3
CTX			84,4	9,4	4,2	0	1,0	0	0	0			1,0
CXM				8,3	7,3	24,0	29,2	19,8	7,3	2,1	2,1		0
CZC			89,6	8,3	2,1	0							0
DOX		6,3	47,9	29,2	16,7	0	0	0	0				0
ENR	92,7	6,3	1,0	0	0	0	0	0					0
FLL						84,4	10,4	5,2	0	0	0		0
GEN			50,0	28,1	13,5	8,3	0	0	0	0			0
IMP		10,4	43,8	36,5	7,3	0	0	1,0	0				1,0
MER		99,0	1,0	0	0	0	0	0	0				0
MZL							87,5		6,3				6,3
NEO						84,4	13,5	2,1	0	0			0
NET					97,9		2,1						0
PIP					74,0	11,5	1,0	4,2	1	2,1	3,1	2,1	1,0
PIT					83,3	8,3	5,2	1,0	1,0	0	0	0	1,0
SPT					2,1	0	4,2	5,2	8,3	26,0	48,0	6,3	0
STR							99,0	1,0	0	0	0		0
SXT					88,5	10,4	1,0	0	0	0	0	0	0
TOB			41,7	39,6	18,8	0	0	0	0	0			0

Trennt sensibel u. intermediär
  Werte rechts der Linie resistent
 >: höher als höchste Konz.

nicht gemessener Bereich
  gemessene Konzentrationen

**Tabelle A 11: Prozentuale Verteilung der MHK-Werte von *Klebsiella pneumoniae* spp. *pneumoniae* (n = 21), Herkunft: Landwirtschaftlicher Betrieb und Supermarkt**

MHK (µg/ml)	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	>
AMC					61,9	23,8	0	4,8	0	4,8	4,8	0	0
AMK						71,4	19,1	9,5	0	0			0
AMP					0	4,8	14,3	19,1	23,8	19,1	9,5	0	9,5
APR							95,2	4,8	0	0			0
C/C		100	0	0	0								0
CAZ			95,2	0	4,8	0	0	0	0	0			0
CEC					66,7	19,1	9,5	0					4,8
CEP						100	0	0	0				0
CET				95,2	4,8	0	0	0					0
CIP	100	0	0	0	0	0	0	0					0
CMP						66,7	33,3	0	0	0	0		0
COL						81,0	0	0	4,8	0	0		14,3
COX						28,6	23,8	23,8	19,1				4,8
CTX			100	0	0	0	0	0	0	0			0
CXM				4,8	19,1	42,9	14,3	9,5	9,5	0	0		0
CZC			90,5	4,8	0	0							4,8
DOX		0	14,3	57,1	9,5	0	9,5	0	0				9,5
ENR	95,2	4,8	0	0	0	0	0	0					0
FLL						61,9	23,8	14,3	0	0	0		0
GEN			38,1	33,3	19,1	9,5	0	0	0	0			0
IMP		4,8	47,6	38,1	4,8	4,8	0	0	0				0
MER		100	0	0	0	0	0	0	0				0
MZL							47,6		14,3				38,1
NEO						85,7	14,3	0	0	0			0
NET					95,2		4,8						0
PIP					23,8	28,6	23,8	14,3	0	0	0	0	9,5
PIT					85,7	9,5	4,8	0	0	0	0	0	0
SPT					0	0	0	9,5	4,8	14,3	57,1	14,3	0
STR							90,5	0	0	4,8	0		4,8
SXT					61,9	33,3	4,8	0	0	0	0	0	0
TOB			57,1	14,3	28,6	0	0	0	0	0			0

Trennt sensibel u. intermediär
  Werte rechts der Linie resistent
 >: höher als höchste Konz.

nicht gemessener Bereich
  gemessene Konzentrationen

**Tabelle A 12: Prozentuale Verteilung der MHK-Werte von *Rahnella aquatilis* (n = 22), Herkunft: Landwirtschaftlicher Betrieb und Supermarkt**

MHK (µg/ml)	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	>
AMC					72,7	27,3	0	0	0	0	0	0	0
AMK						95,5	4,6	0	0	0			0
AMP					0	0	0	9,1	27,3	36,4	22,7	0	4,6
APR							100	0	0	0			0
C/C			95,5	4,6	0	0							0
CAZ			86,4	13,6	0	0	0	0	0	0			0
CEC					4,6	13,6	4,6	31,8					45,5
CEP						95,5	4,6	0	0				0
CET				18,2	31,8	13,6	22,7	4,6					9,1
CIP	59,1	27,3	9,1	4,6	0	0	0	0					0
CMP						40,9	36,4	9,1	4,6	9,1	0		0
COL						86,4	9,1	0	0	4,6	0		0
COX						77,3	13,6	4,6	4,6				0
CTX			22,7	9,1	27,3	31,8	9,1	0	0	0			0
CXM				4,6	0	0	0	0	18,2	45,5	27,3		4,6
CZC			100	0	0	0							0
DOX		0	0	59,1	27,3	13,6	0	0	0				0
ENR	45,5	31,8	13,6	4,6	4,6	0	0	0					0
FLL						31,8	50,0	0	13,6	4,6	0		0
GEN			90,9	4,6	4,6	0	0	0	0	0			0
IMP		50,0	18,2	22,7	9,1	0	0	0	0				0
MER		100	0	0	0	0	0	0	0				0
MZL							22,7		77,3				0
NEO						95,5	4,6	0	0	0			0
NET					95,5		4,6						0
PIP					4,6	4,6	45,5	40,9	4,6	0	0	0	0
PIT					81,8	18,2	0	0	0	0	0	0	0
SPT					4,6	18,2	13,6	18,2	0	22,7	22,7	0	0
STR							95,5	0	4,6	0	0		0
SXT					22,7	36,4	40,9	0	0	0	0	0	0
TOB			90,9	0	9,1	0	0	0	0	0			0

Trennt sensibel u. intermediär
  Werte rechts der Linie resistent
 >: höher als höchste Konz.

nicht gemessener Bereich
  gemessene Konzentrationen

**Tabelle A 13: Prozentuale Verteilung der MHK-Werte von *Serratia marcescens* (n = 25), Herkunft: Landwirtschaftlicher Betrieb und Supermarkt**

MHK (µg/ml)	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	>
AMC					0	0	8,0	20,0	0	24,0	32,0	8,0	8,0
AMK						40,0	40,0	16,0	4,0	0			0
AMP					0	0	16,0	12,0	16,0	20,0	24,0	0	12,0
APR							72,0	20,0	4,0	4,0	0		0
C/C			44,0	20,0	20,0	4,0							12,0
CAZ			80,0	4,0	8,0	0	0	0	4,0	4,0			0
CEC					0	4,0	0	0					96,0
CEP						96,0	4,0	0	0				0
CET				40,0	44,0	8,0	0	4,0					4,0
CIP	48,0	48,0	0	0	4,0	0	0	0					0
CMP						8,0	28,0	20,0	44,0	0	0		0
COL						12,0	0	0	4,0	4,0	4,0		76,0
COX						0	4	32,0	28,0				36,0
CTX			56,0	40,0	0	0	0	4,0	0	0			0
CXM				0	0	0	4,0	4,0	8,0	32,0	24,0		28,0
CZC			84,0	12,0	0	4,0							0
DOX		0	0	24,0	8,0	12,0	32,0	24,0	0				0
ENR	36,0	16,0	36,0	8,0	0	4,0	0	0					0
FLL						8,0	28,0	16,0	40,0	8,0	0		0
GEN			8,0	28,0	40,0	16,0	0	8,0	0	0			0
IMP		4,0	12,0	36,0	20,0	8,0	8,0	12,0	0				0
MER		100	0	0	0	0	0	0	0				0
MZL							92,0		0				0
NEO						56,0	32,0	12,0	0	0			0
NET					52,0		40,0						0
PIP					48,0	28,0	12,0	0	0	0	0	8,0	4,0
PIT					68,0	24,0	4,0	0	0	4,0	0	0	0
SPT					0	0	0	4,0	12,0	0	28,0	44,0	12,0
STR							68,0	12,0	8,0	8,0	0		4,0
SXT					20,0	16,0	36,0	28,0	0	0	0	0	0
TOB			8,0	36,0	24,0	20,0	12,0	0	0	0			0

Trennt sensibel u. intermediär    
  Werte rechts der Linie resistent    
 >: höher als höchste Konz.

nicht gemessener Bereich    
  gemessene Konzentrationen

**Tabelle A 14: Prozentuale Verteilung der MHK-Werte von *Pseudomonas aeruginosa* (n = 295),  
Herkunft: Landwirtschaftlicher Betrieb und Supermarkt**

MHK (µg/ml)	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	>
AMC					0	0,3	0	0,3	1,0	2,4	4,8	13,0	78,6
AMK						71,2	25,8	2,7	0,3	0			0
AMP					0	0,3	0,3	0	0,7	0	1,0	7,8	89,8
APR							90,9	5,8	2,7	0,3	0,3		0
C/C			0,7	0,3	0,3	0,7							98,0
CAZ			0	0	2,0	13,9	57,0	23,1	1,7	1,7			0,7
CEC					0,3	0,3	0	0					99,3
CEP						55,6	30,5	10,9	2,4				0,7
CET				1,4	0,3	0	0,3	3,4					94,6
CIP	7,8	40,7	32,9	14,9	2,4	1,0	0,3	0					0
CMP						0	0	0,7	1,7	7,8	30,0		59,7
COL						95,3	2,7	0,7	0,7	0	0,3		0,3
COX						0,3	0	0	0				99,7
CTX			0	0	0,3	0,3	0	0,7	15,9	58,0			24,8
CXM				0	0	0,3	0	0	0	0	0,3		99,3
CZC			0,3	0,3	1,0	17,0							81,4
DOX		1,0	0,3	4,4	23,1	57,6	11,5	1,0	0,7				0,3
ENR	2,0	0,7	4,4	38,6	43,7	9,8	0,3	0,3					0
FLL						0,7	0	0,7	1,0	3,1	15,0		79,7
GEN			38,0	26,4	25,4	6,1	3,4	0,3	0,3	0			0
IMP		0,3	0	4,1	22,0	46,4	22,4	3,4	0,7				0,7
MER		22,0	23,4	24,1	18,6	9,5	1,4	1,0	0				0
MZL							4,4		0,7				94,9
NEO						80,3	15,6	3,1	0,3	0,7			0
NET					90,9		6,8						2,4
PIP					0,3	3,1	17,6	55,9	20,7	2,4	0	0	0
PIT					0,7	3,7	17,3	57,0	20,7	0,7	0	0	0
SPT					1,0	0,3	1,0	2,0	2,0	5,8	10,0	10,0	67,5
STR							67,1	14,9	7,1	6,4	2,7		1,7
SXT					0,7	0	0,3	3,7	1,7	6,4	28,0	40,0	19,7
TOB			49,2	30,5	17,3	2,7	0,3	0	0	0			0

Trennt sensibel u. intermediär    
  Werte rechts der Linie resistent    
 >: höher als höchste Konz.

nicht gemessener Bereich    
  gemessene Konzentrationen



**Tabelle A 15: Prozentuale Verteilung der MHK-Werte von *Pseudomonas putida* (n = 106), Herkunft: Landwirtschaftlicher Betrieb und Supermarkt**

MHK (µg/ml)	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	>
AMC					0	0	0	0,9	0,9	2,8	19,0	10,4	66,0
AMK						62,3	32,1	4,7	0	0,9			0
AMP					0	0	0	0	1,9	0	0,9	19,8	77,4
APR							78,3	13,0	6,6	0	0,9		0,9
C/C			0	0,9	0	0,9							98,1
CAZ			0	0,9	0,9	13,2	54,7	20,0	7,6	1,9			0,9
CEC					0,9	0	0	0					99,1
CEP						56,6	27,4	13,0	1,9				0,9
CET				0	0,9	0,9	0	10,0					87,7
CIP	16,0	28,3	33,0	19,0	0,9	0,9	0,9	0					0,9
CMP						1,9	0	0,9	5,7	13,2	32,0		46,2
COL						91,5	2,8	1,9	0,9	1,9	0		0,9
COX						0	0	0	0				100
CTX			0	0	0	0	0,9	2,8	29,3	44,3			22,6
CXM				0	0	0	0	0	0,9	0,9	0,9		97,2
CZC			0	0,9	0,9	15,1							83,0
DOX		0,9	0	9,4	26,4	39,6	19,8	3,8	0				0
ENR	3,8	1,9	12,3	30,0	36,8	12,3	2,8	0					0
FLL						1,9	0	0,9	6,6	6,6	21,0		63,2
GEN			32,1	25,0	21,7	13,2	5,7	1,9	0	0			0,9
IMP		0	0	5,7	16,0	40,6	26,4	9,4	0				1,9
MER		18,9	16,0	13,0	18,9	23,6	8,5	0	0				0,9
MZL							5,7		3,8				90,6
NEO						75,5	14,2	6,6	2,8	0			0,9
NET					77,4		21,7						0,9
PIP					0	9,4	20,8	41,0	20,8	6,6	0,9	0	0,9
PIT					0	8,5	26,4	37,0	21,7	5,7	0	0	0,9
SPT					4,7	0	0,9	2,8	0,9	8,5	11,0	3,8	67,0
STR							50,0	17,0	14,2	8,5	6,6		3,8
SXT					1,9	0,9	0,9	3,8	2,8	11,3	17,0	33,1	28,3
TOB			42,5	35,0	16,0	5,7	0	0	0	0			0,9

Trennt sensibel u. intermediär
  Werte rechts der Linie resistent
 >: höher als höchste Konz.

nicht gemessener Bereich
  gemessene Konzentrationen

**Tabelle A 16: Prozentuale Verteilung der MHK-Werte von *Pseudomonas fluorescens* (n = 38),  
Herkunft: Landwirtschaftlicher Betrieb und Supermarkt**

MHK (µg/ml)	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	>
AMC					2,6	0	0	0	2,6	0	5,3	5,3	84,2
AMK						81,6	13,2	0	2,6	2,6			0
AMP					0	0	0	0	5,3	0	0	5,3	89,5
APR							94,7	0	0	0	0		5,3
C/C			0	0	0	5,3							94,7
CAZ			0	0	2,6	21,1	57,9	10,5	2,6	2,6			2,6
CEC					0	2,6	0	2,6					94,7
CEP						47,4	44,7	0	0				7,9
CET				5,3	0	2,6	10,5	13,2					68,4
CIP	29,0	50,0	21,1	0	0	0	0	0					0
CMP						2,6	0	2,6	5,3	27,7	26,3		39,5
COL						84,2	5,3	0	0	0	2,6		7,9
COX						0	2,6	0	0				97,4
CTX			0	0	0	0	0	7,9	18,4	47,4			26,3
CXM				0	0	0	0	0	0	0	2,6		97,4
CZC			0	0	0	18,4							81,6
DOX		2,6	0	21,1	21,1	44,7	5,3	2,6	0				2,6
ENR	10,5	7,9	13,2	39,5	27,7	0	2,6	0					2,6
FLL						2,6	0	2,6	7,9	18,4	18,4		50,0
GEN			63,2	27,7	7,9	2,6	0	0	0	0			2,6
IMP		0	0	5,3	31,6	42,1	15,8	5,3	0				0
MER		29,0	21,1	23,7	23,7	0	2,6	0	0				0
MZL							10,5		5,3				84,2
NEO						89,5	5,3	2,6	0	0			2,6
NET					84,2		15,8						0
PIP					0	15,8	42,1	36,8	5,3	0	0	0	0
PIT					2,6	13,2	34,2	44,7	5,3	0	0	0	0
SPT					5,3	0	5,3	7,9	7,9	10,5	7,9	21,1	34,2
STR							71,1	13,2	2,6	0	0		13,2
SXT					2,6	0	5,3	5,3	7,9	18,4	26,3	18,4	15,8
TOB			71,1	21,1	5,3	0	0	0	0	0			2,6

Trennt sensibel u. intermediär
  Werte rechts der Linie resistent
 >: höher als höchste Konz.

nicht gemessener Bereich
  gemessene Konzentrationen

Tabelle A 17: Prozentuale Verteilung der MHK-Werte von *E. faecalis* (n = 100), Herkunft: Landwirtschaftlicher Betrieb und Supermarkt

MHK (µg/ml)	0,031	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	>
AMC			0	3,0	51,0	44,0	2,0	0	0									0
AMP			0	2,0	12,0	73,0	12,0	1,0	0	0								0
CEZ			0	0	0	0	1,0	1,0	4,0	22,0								72,0
CIP				1,0	8,0	69,0	20,0	1,0	0	0	0							1,0
CLI		0	0	1,0	1,0	3,0	2,0	2,0	4,0									87,0
CMP							2,0	33,0	62,0	0	0	2,0						1,0
CXM						1,0	2,0	1,0	2,0									94,0
DOX			38,0	34,0	1,0	0	0	4,0	21,0	2,0								0
ENR		0	0	2,0	29,0	62,0	7,0	0	0									0
ERY		0	0	4,0	5,0	16,0	16,0	38,0	14,0									7,0
FLL							69,0	31,0	0	0	0							0
FOS									1,0	10,0	66,0	17,0						6,0
GEN				0	0	1,0	6,0	15,0	48,0	18,0								12,0
GNH															100			0
IMP			4,0	3,0	14,0	17,0	26,0	32,0	2,0	1,0								1,0
KAN									4,0	15,0	56,0	13,0						12,0
LIZ			0	0	1,0	26,0	70,0	2,0	0	0								1,0
MOX		0	2	37,0	55,0	5,0	0	0	0									1,0
MTR								0	0	0	1							99,0
MZL							97,0	1,0	0	1,0	0	0	0	0				1,0
NFT											96,0	2,0	0	1,0				1,0
OXA				0	0	0	1,0	2,0	7,0	51,0	35,0							4,0
PEN	0	0	1,0	2,0	2,0	8,0	79,0	8,0										0
RAM					6,0	5,0	24,0	29,0										36,0
STR													91,0	3,0	1,0	1,0		4,0
SXT									98,0	0	0	0						2,0
SYN			0	2,0	0	5,0	14,0	56,0	22,0	0								1,0
TLS					2,0	18,0	53,0	17,0	0									10,0
TPL			94,0	4,0	2,0	0	0	0	0	0	0							0
VAN					16,0	53,0	23,0	8,0	0	0	0	0						0

Trennt sensibel u. intermediär
  Werte rechts der Linie resistent
 >: höher als höchste Konz.

nicht gemessener Bereich
  gemessene Konzentrationen

Tabelle A 18: Prozentuale Verteilung der MHK-Werte von *E. faecium* (n = 59), Herkunft: Landwirtschaftlicher Betrieb und Supermarkt

MHK (µg/ml)	0,031	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	>
AMC			6,8	17,0	50,9	22,0	3,4	0	0									0
AMP			0	10,2	11,9	49,2	25,4	3,4	0	0								0
CEZ			0	0	0	0	3,4	6,8	1,7	0								88,1
CIP				5,1	18,6	17,0	42,4	8,5	1,7	3,4	0							3,4
CLI		22,0	6,8	8,5	6,8	5,1	8,5	10,2	10,2									22,0
CMP							11,9	67,8	18,6	1,7	0	0						0
CXM						3,4	1,7	0	1,7									93,2
DOX			83,1	1,7	0	0	3,4	1,7	8,5	1,7								0
ENR		0	0	1,7	18,6	23,7	27,1	23,7	5,1									0
ERY		0	8,5	3,4	6,8	3,4	1,7	22,0	44,1									10,2
FLL							93,2	6,8	0	0	0							0
FOS									0	20,3	40,7	25,4						13,6
GEN				0	0	3,4	8,5	20,3	22,0	23,7								22,0
GNH															100			0
IMP			3,4	5,1	3,4	6,8	20,3	40,7	18,6	1,7								0
KAN									3,4	3,4	17,0	20,3						55,9
LIZ			1,7	0	0	50,9	44,1	1,7	0	0								0
MOX		0	5,1	22,0	18,6	15,3	28,8	6,8	0									3,4
MTR								0	0	0	0							100
MZL							39,0	39,0	13,6	1,7	3,4	0	0	0				3,4
NFT											25,4	52,5	18,6	3,4				0
OXA				0	0	5,1	6,8	3,4	18,6	22,0	17,0							27,1
PEN	0	0	0	8,5	8,5	32,2	40,7	6,8										3,4
RAM					17,0	0	6,8	3,4										72,9
STR													88,1	1,7	0	6,8		3,4
SXT									95,0	1,7	1,7	0						1,7
SYN			5,1	18,6	11,9	33,9	27,1	0	0	0								3,4
TLS					8,5	47,5	15,3	18,6	8,5									1,7
TPL				91,5	8,5	0	0	0	0	0	0							0
VAN					67,8	11,9	13,6	3,4	3,4	0	0	0						0

  Trennt sensibel u. intermediär   
  Werte rechts der Linie resistent   
>: höher als höchste Konz.

nicht gemessener Bereich   
 gemessene Konzentrationen

Tabelle A 19: Prozentuale Verteilung der MHK-Werte von *E. nonfc.* (n = 523), Herkunft: Landwirtschaftlicher Betrieb und Supermarkt

MHK ( $\mu\text{g/ml}$ )	0,031	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	>
AMC			2,3	21,4	60,2	14,5	1,3	0,2	0									0
AMP			0,4	10,7	52,8	30,2	5,7	0,2	0	0								0
CEZ			0	0,2	0	0,8	8,8	36,5	27,5	7,7								18,6
CIP				0,8	3,8	25,4	54,1	14,2	1,3	0,4	0							0
CLI		2,5	4,8	1,5	1,5	1,2	4,6	10,9	35,8									37,3
CMP							0,2	28,1	69,0	2,1	0,6	0						0
CXM						8,6	1,5	4,2	12,1	0	0	0						73,6
DOX			75,9	18,4	0,8	0	0,2	1,5	2,3	1,0								0
ENR		0,	0,2	0,8	9,6	61,0	25,8	2,1	0,6									0
ERY		0	3,8	7,5	7,1	5,7	7,1	26,6	37,7									4,6
FLL							45,7	53,5	0,8	0	0							0
FOS									2,9	11,7	37,5	23,1						24,9
GEN				0	0,2	2,3	19,1	48,0	20,8	6,7								2,9
GNH															100			0
IMP			10,5	18,4	12,8	15,7	21,2	14,7	3,3	1,7								1,7
KAN									10,9	19,9	55,1	9,2						5,0
LIZ			0	0	0,2	10,1	86,8	2,7	0	0,2								0
MOX		0,4	0,8	11,9	66,9	18,0	1,3	0,8	0									0
MTR					0	0	0,4	0	0	0								99,6
MZL							89,3	5,7	4,2	0,6	0,2	0	0	0				0
NFT											77,3	7,5	11,3	3,4				0,6
OXA				0	0,2	4,2	4,0	3,6	14,5	44,2	19,1							10,1
PEN	0,2	0,4	1,9	29,8	43,6	7,8	12,2	3,6										0,4
RAM					16,4	3,6	11,7	23,0										45,3
SNH														86,4	5,6	1,9	0,4	5,7
SXT									79,2	4,6	3,4	3,4						9,4
SYN			0,4	1,7	1,7	18,2	65,0	9,0	3,8	0,2								0
TLS					0	9,9	53,2	27,0	0									9,9
TPL				49,7	48,8	1,3	0,2	0	0	0	0							0
VAN					17,8	8,6	14,9	53,5	5,2	0	0	0						0

  Trennt sensibel u. intermediär   
  Werte rechts der Linie resistent   
>: höher als höchste Konz.

nicht gemessener Bereich   
 gemessene Konzentrationen

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name Katharina Helmke  
geboren 5. September 1974 in Fulda  
Eltern Dieter Helmke  
Anita Helmke, geb. Fuser

## Schulbildung

08/1981 – 07/1985 Bardoschule, Fulda  
08/1985 - 06/1994 Rabanus-Maurus-Schule (Domgymnasium), Fulda  
Abschluss Allgemeine Hochschulreife

## Praktische Ausbildung

03/1995 – 07/1998 Ausbildung zur Pferdewirtin, Hessisches Landgestüt, Dillenburg

## Hochschulausbildung

09/1999 – 07/2003 Studium der Agrarwissenschaften, Studiengang Landwirtschaft,  
Fachhochschule Osnabrück  
Abschluss Dipl. Ing. (FH)  
seit 11/2003 Promotion am Lehrstuhl für Tierhygiene der Technischen Uni-  
versität München, Freising-Weihenstephan

## Berufliche Tätigkeiten

09/1998 – 08/1999 Tätigkeit als Pferdewirtin, Ovelgönne und Sinsheim-Steinsfurth  
seit 11/2003 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Tierhygiene der  
TU München

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Johann Bauer danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und die hervorragende Betreuung der Forschungstätigkeit und der Arbeit.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Scherer für die Übernahme des Koreferates und Herrn Prof. Dr. Wenzel für den Prüfungsvorsitz.

Dem Bayerischen Staatsministerium für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz danke ich für die Bereitstellung der finanziellen Mittel.

Den Mitarbeitern und Kollegen des Lehrstuhls für Tierhygiene möchte ich meinen Dank aussprechen für das freundschaftliche Arbeitsverhältnis und die konstruktive Zusammenarbeit. Ganz besonders bedanken möchte ich mich aber bei Frau Dr. Angelika Notzon, die mir stets zur Seite stand, wenn es um fachliche Angelegenheiten ging, wie die Einweisung in die PCR und das Beheben von Formatierungsproblemen. Ich danke ihr für die vielen Ratschläge und die nette Unterstützung bei Problemen. Herzlich danken möchte ich auch Frau Dr. Katrin Harms, die bei allen Problemen, gleich welcher Art, immer ein offenes Ohr hatte und mir hilfsbereit zur Seite stand. Beiden danke ich sehr für das schöne Arbeits- und Büroklima und die vielen netten Gespräche und Gedanken.

Danken möchte ich auch Frau Barbara Dörr und unseren Auszubildenden Katharina Rank, Magdalena Schmid und Toni Kuhnt für die tolle Unterstützung im Labor. Ohne sie wären die 1000 Proben nicht zu bewältigen gewesen. Durch ihre humorvolle Art ließen sie das manchmal nicht enden wollende Einwiegen, Ausspateln und Keimdifferenzieren sehr kurzweilig werden. Außerdem danke ich Frau Elisabeth Schmied und Frau Anne Keller für die Durchführung der Resistenztests.

Besonderer Dank gilt Frau Margret Laubmeier vom Lehrstuhl für Tierhygiene, die mir stets bei allen organisatorischen Angelegenheiten weiterhalf.

Bedanken möchte ich mich auf diesem Wege bei Herrn Prof. Dr. Robby Andersson und Dr. Luis Leon vom Fachgebiet für Tierhygiene der FH Osnabrück, die mir den Anstoß zur Promotion gaben.

Mein Dank gilt auch meinen Freunden, die mir in den vergangenen Jahren zur Seite standen und mich motiviert haben. Herzlich dafür danken möchte ich hier vor allem Bernhard Fetsch, Christoph Dicke und Alexander Fischer.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern. Sie ermöglichten mir meine Ausbildung, das Studium und die Promotion und unterstützten mich in allen Phasen dieser Arbeit uneingeschränkt.

Ganz herzlich danke ich meinem lieben Mann Günther Fabian, der meine Arbeit durch alle Höhen und Tiefen begleitete, immer ein offenes Ohr für alle meine Probleme hatte, mich immer wieder motivierte und mir mit viel Liebe zur Seite stand.

Weihenstephan, im Februar 2007

*Katharina Helmke*