



Universität für Bodenkultur Wien  
Department für Lebensmittelwissenschaften und -technologie  
Institut für Lebensmittelwissenschaften  
Arbeitsgruppe für Lebensmittelmikrobiologie und -hygiene

# Masterarbeit

---

Molekulare Typisierung und  
Antibiotikasensitivitätsprüfung von *E. coli*  
Isolaten aus der Lebensmittelkette

**Andreas Weiß**  
**Matr. Nr. 0840610**  
**Jänner 2016**

Betreuer/-in:  
Univ.Prof. Dipl.-Ing. Dr.nat.techn. Wolfgang Kneifel  
Priv.-Doz. Dipl.-Ing. Dr.nat.techn. Konrad J. Domig  
Mag. Dr. Sigrid Mayrhofer

# Kurzfassung

Die Entwicklung von Antibiotika zählt zu den bedeutendsten Fortschritten der modernen Medizin. Durch deren weitverbreiteten Einsatz im Human- und Veterinärbereich sind jedoch antibiotikaresistente Bakterien zu einem ernstzunehmenden Risiko geworden. Vor allem multiresistente Keime treten immer mehr in den Fokus. Die Problematik Antibiotikaresistenz betrifft auch die Veterinärmedizin und die Landwirtschaft. Die Entwicklung von Strategien zur Reduktion antibiotikaresistenter Bakterien ist deswegen eine der wichtigsten Herausforderungen der modernen Tierhaltung.

Im Rahmen der Masterarbeit wurde ein natürlicher Futterzusatzstoff auf dessen Fähigkeit, antibiotikaresistente Bakterien im Bereich der Tierproduktion zu verringern, überprüft. Dafür wurden insgesamt 480 Broiler in drei Gruppen eingeteilt. Der Kontrollgruppe wurde das Standardfutter verabreicht, während die beiden anderen Gruppen mit zusätzlichen Wirkstoffen versorgt wurden. Dabei wurde der zweiten Gruppe ein handelsübliches Zusatzprodukt gegeben, während die dritte Gruppe neben dem Standardfutter prophylaktisch das Antibiotikum Enrofloxacin erhielt. Nach einer ersten Sammelbeprobung der Küken wurden zu zwei weiteren Zeitpunkten (Tag 17 und Tag 38) aus jeder Fütterungsgruppe je acht Tiere beprobt. Die aus den Proben isolierten und reingezüchteten *E. coli* wurden anschließend phänotypisch mittels Agardiffusionstest auf ihr Antibiotikaresistenzverhalten untersucht. Die molekulare Typisierung erfolgte mittels Rep-PCR und das genotypische Resistenzverhalten von ausgewählten Isolaten wurde mit Hilfe von Microarrays untersucht. Darüber hinaus wurde ihr Wachstumsverhalten bei Anwesenheit von Antibiotika und organischen Säuren durch die Aufnahme von Wachstumskurven im Detail analysiert. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine Reduktion der Anzahl an resistenten Isolaten beim Einsatz des auf organischen Säuren basierenden Futtermittelzusatzes.

**Schlagwörter:** Antibiotikaresistenz, *Escherichia coli*, Agardiffusionstest, rep-PCR, Microarray, Wachstumsverhalten

# Abstract

The development of antibiotics belongs to the most important progress of modern medicine. Due to their widespread use in the human and veterinary field, however, antibiotic resistant bacteria have become a serious risk. Especially multi-resistant pathogens are in focus. The difficulties of antibiotic resistance also concern veterinary medicine and agriculture. Because of this, the development of strategies to reduce antibiotic resistant bacteria is one of the most important challenges of modern animal farming.

Within this master thesis a natural feed additive was tested for its ability to reduce antibiotic resistant bacteria in the area of animal production. Thus, 480 broilers were divided into three groups. The control group was administered standard feed while the two other groups were fed with additional substances. The natural feed additive was given to the second group, whereas the last group received standard feed as well as enrofloxacin during the first five days. After the arrival of the broilers in the fattening stable a sample of all chickens was collected. Next to this, samples of eight chickens were taken from each group at two different times (day 17 and day 38). Subsequently, *E. coli* was isolated from the samples and pure cultures were generated. These cultures were examined for their antimicrobial susceptibility to different antibiotics by agar disc diffusion. The typing of the isolates was carried out by rep-PCR and the resistance profile of selected isolates was genotypically analysed using a microarray. Furthermore, their growth in the presence of the acid based feed additive or antibiotics was investigated. The results of this work indicate that the tested feed additive causes a reduction in the number of antibiotic resistant *E. coli*.

**Keywords:** Antibiotic resistance, *Escherichia coli*, Disc diffusion method, rep-PCR, Microarray, Growth behavior

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Univ.Prof. Dipl.-Ing. Dr. nat. techn. Wolfgang Kneifel und Priv.-Doz. Dipl.-Ing. Dr. nat. techn. Konrad Domig für die Ermöglichung meiner Masterarbeit, am Institut für Lebensmittelwissenschaften an der Universität für Bodenkultur, danken.

Ein herzlicher Dank gilt meiner Betreuerin Mag. Dr. Sigrid Mayrhofer für die geduldige und großartige Beihilfe während meiner praktischen Arbeit im Labor als auch bei der Korrektur der Masterarbeit. Sie war mir eine große Hilfe.

Des Weiteren möchte ich Claudia König, Nicole Frind, Goran Basic, einschließlich des ganzen Teams der Arbeitsgruppe Lebensmittelmikrobiologie und -hygiene, die immer ein offenes Ohr für Fragen hatten und mir mit Tipps während meiner praktischen Durchführung der Arbeit im Labor zur Seite standen, danken.

Ein großer Dank gilt auch meiner Familie, die mir die Möglichkeit eines Studiums in Wien gaben, sowie meinen Freunden. Ich danke ihnen für die Geduld und eifrige Unterstützung in allen Bereichen meines Lebens und für die Anerkennung meiner Entscheidungen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Kurzfassung</b> .....	<b>I</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>II</b>
<b>Danksagung</b> .....	<b>III</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>VII</b>
<b>1 Einleitung und Fragestellung</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Literatur</b> .....	<b>3</b>
2.1 <i>Escherichia coli</i> .....	3
2.2 Antibiotika.....	5
2.2.1 Allgemeiner Überblick .....	5
2.2.2 Antibiotika, die auf die Proteinsynthese wirken .....	6
2.2.3 Antibiotika, die auf die Transkription wirken .....	8
2.2.4 Antibiotika, die auf die Folsäuresynthese wirken.....	8
2.2.5 Antibiotika, die auf die DNA-Replikation wirken .....	9
2.2.6 Antibiotika, die auf die Zellwandsynthese wirken.....	9
2.2.7 Antibiotikaresistenz .....	12
2.3 Genotypische Testmethoden .....	16
2.3.1 Typisierung.....	16
2.3.2 Molekulare Methoden zur Antibiotikaresistenz-Bestimmung .....	20
2.4 Phänotypische Testmethoden .....	21
2.4.1 Phänotypische Testmethoden zur Bestimmung der Antibiotikaresistenz .....	21
2.4.2 Bioscreen C: Wachstumstest zur Bestimmung des Fitness- und Resistenzverhaltens....	22
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>24</b>
3.1 Agardiffusionstest.....	24
3.1.1 Verwendete Chemikalien, Nährmedien, Geräte und Materialien.....	24
3.1.2 Durchführung.....	25
3.2 Vorbereitung für molekularbiologische Untersuchungen .....	26
3.2.1 Verwendete Chemikalien, Nährmedien, Geräte und Materialien.....	26
3.2.2 Durchführung.....	27
3.3 DNA-Isolation.....	28
3.3.1 Verwendete Chemikalien, Nährmedien, Geräte und Materialien.....	28
3.3.2 Durchführung.....	29
3.4 DNA-Konzentration-Messung .....	30

3.4.1	Verwendete Chemikalien, Nährmedien, Geräte und Materialien.....	30
3.4.2	Durchführung.....	30
3.5	PCR.....	31
3.5.1	Verwendete Chemikalien, Nährmedien, Geräte und Materialien.....	31
3.5.2	Durchführung.....	32
3.6	Agarose-Gelelektrophorese.....	34
3.6.1	Verwendete Chemikalien, Nährmedien, Geräte und Materialien.....	34
3.6.2	Durchführung.....	35
3.7	Auswertung der Ergebnisse mittels BioNumerics .....	36
3.7.1	Verwendete Geräte und Programme .....	36
3.7.2	Durchführung.....	36
3.8	DNA-Microarray.....	37
3.8.1	Verwendete Chemikalien, Nährmedien, Geräte und Materialien.....	37
3.8.2	Durchführung.....	38
3.9	Test des Wachstumsverhaltens .....	39
3.9.1	Verwendete Chemikalien, Nährmedien, Geräte und Materialien.....	39
3.9.2	Durchführung.....	41
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>43</b>
4.1	Agardiffusionstest.....	43
4.1.1	Ampicillin (10).....	45
4.1.2	Cefotaxim (5) .....	46
4.1.3	Ceftiofur (30).....	49
4.1.4	Meropenem (10).....	50
4.1.5	Ciprofloxacin (5).....	51
4.1.6	Enrofloxacin (5).....	53
4.1.7	Tetracyclin (30) .....	54
4.1.8	Streptomycin (10) .....	56
4.1.9	Sulfonamid (300).....	57
4.2	Antibiotikaresistenzverteilung.....	59
4.3	DNA-Isolation und DNA-Konzentrationsmessung .....	61
4.4	Vergleich der unterschiedlichen DNA-Isolationen.....	62
4.5	Vergleich der Primersysteme.....	62
4.6	PCR Typing-Gele.....	63
4.6.1	Primersystem ERIC1R + ERIC2.....	63
4.7	Bandenmuster kombiniert mit Antibiotikaresistenzprofilen.....	67
4.8	Microarray .....	71
4.9	Test des Wachstumsverhaltens .....	73
4.9.1	Nährmedienauswahl.....	73
4.9.2	Versuchsvergleich der Konzentrationen des Zusatzstoffes im Nährmedium TSB.....	74
4.9.3	Versuchsvergleich der Konzentrationen des Zusatzstoffes im Nährmedium MHB.....	76

4.9.4	Versuchsvergleich der Konzentrationen des Zusatzstoffes im Nährmedium TSB+Hem.....	78
4.9.5	Versuchsvergleich der Konzentrationen des Zusatzstoffes im Nährmedium VRBD alt 80	
4.9.6	Versuchs-Vergleich der Konzentrationen des Zusatzstoffes im Nährmedium VRBD .....	81
4.9.7	Versuch 4 - Vergleich der Isolate .....	83
4.9.8	Versuch 5 - Zusatzstoffkonzentrationsvergleich.....	86
4.9.9	Antibiotika Cipro-, Enrofloxacin.....	89
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>95</b>
5.1	Agardiffusionstest.....	95
5.2	Molekularbiologie.....	95
5.3	Bandenmuster kombiniert mit Antibiotikaresistenzprofilen.....	95
5.4	Microarray (Untersuchung genomische DNA).....	96
5.5	Wachstumsverhalten.....	97
5.6	Schlussfolgerung .....	97
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>98</b>
<b>7</b>	<b>Erklärung.....</b>	<b>103</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>104</b>
<b>9</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>113</b>
<b>10</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>114</b>
10.1	Agardiffusionstest.....	114
10.2	Microarray .....	120
10.3	Typing.....	136
10.3.1	Getestete RAPD- und rep-Primer - DNA-Isolation mittels Hitze.....	137
10.3.2	Getestete rep-Primer - DNA-Isolation mittels 5 Prime Kit.....	141
10.3.3	ERIC1R + ERIC2 Agarosegele .....	143

## Abkürzungsverzeichnis

OD	Optische Dichte
AMP	Ampicillin
EFT	Ceftiofur
S3	Sulfonamid
CTX	Cefotaxim
CIP	Ciprofloxacin
TE	Tetracyclin
S	Streptomycin
MEM	Meropenem
ENR	Enrofloxacin
PBPs	Penicillin-bindende-Proteine
DNA	Desoxyribonucleic acid
PCR	Polymerase Chain Reaction
rep-PCR	repetitive extragenic palindromic PCR
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
STEC	Shiga-Toxin produzierende <i>Escherichia coli</i>
EHEC	Enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
EPEC	Enteropathogene <i>Escherichia coli</i>
EIEC	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i> .
ETEC	Enterotoxischer <i>Escherichia coli</i>
EAEC	Enter aggregative <i>Escherichia coli</i>
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
VISA	Vancomycin-intermediäre <i>Staphylococcus aureus</i>
UHQ	Ultra High Quality
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
TAE-Puffer	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
MM	Mastermix
dNTP	Nukleosidtriphosphat
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dCTP	Desoxycystidintriphosphat
BHI-Bouillon	Brain Heart Infusion Bouillon
PCA	Plate Count Agar
TSB	Trypton Soja Broth
TSA	Trypton Soja Agar
Hem	Hemmstofflösung
LB	Lysogeny Broth
VRBD-Agar	Violet Red Bile Dextrose Agar
MHA	Müller-Hinton Agar
MHB	Müller-Hinton Bouillon
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
n.a.	nicht angegeben

# 1 Einleitung und Fragestellung

Auf der Erde existieren Bakterien seit über 3 Milliarden Jahren. Während dieser Zeit haben sie Antibiotika produziert um zu überleben und gleichzeitig Resistenzen gegen diese Substanzen entwickelt. Es ist daher nötig, dass neue effektive Antibiotika auf dem Markt kommen um ein wirksames Arsenal an Antibiotika zu haben. Jedoch hat das Auftreten von Resistenzen die Rate des Austausches von alten mit neuen Substanzen überholt. Diese Situation bedroht die Praxis der modernen Medizin (Coates, 2012).

Die EU verbot 2006 den Einsatz von Antibiotika als Leistungsförderer bzw. Wachstumsbeschleuniger (European Food Safety Authority, 2014). Doch seit dem Verbot nahm, laut Bericht der Europäischen Arzneimittelagentur (EMA), die Menge an eingesetzten Antibiotika kaum ab. Teilweise gibt es in EU-Ländern sogar wieder Zunahmen. Antibiotika können dabei als Prophylaxe, Metaphylaxe und zu therapeutischen Zwecke eingesetzt werden (European Medicines Agency, 2014). Wird bei einem Einzeltier eine Infektionskrankheit festgestellt, werden metaphylaktisch alle anderen Tiere des Bestandes behandelt, da bei ihnen ebenfalls eine gleiche Erkrankung im Entstehen sein kann. Die Metaphylaxe ist daher eine Sonderform der Prophylaxe in begründeten Verdachtsfällen auf eine konkrete Erkrankung. Bei der Prophylaxe werden im Gegensatz dazu Antibiotika ohne Verdacht auf eine konkrete Erkrankung als Vorbeugemaßnahme in kritischen Situationen verabreicht (Porm, 2013).

Innerhalb der EU ist die Resistenzsituation bei aus Geflügel isolierten Bakterien höchst unterschiedlich. Österreich ist in den meisten Fällen im Mittelfeld. Nur bei Fluoroquinolonen werden in Österreich überdurchschnittlich hohe Resistenzraten festgestellt. Die Zahl gegen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika resistenten Keime, zu denen auch ESBL-Produzenten (Extended-Spectrum-Betalaktamase) gehören, ist hierzulande jedoch geringer als im Durchschnitt (European Medicines Agency, 2014).

Das in dieser Masterarbeit betrachtete Thema, handelt von einem Broilerfütterungsversuch. 480 Broiler wurden in drei Gruppen aufgeteilt und unterschiedlich gefüttert. Der Kontrollgruppe wurde ein Standardfutter, der Versuchsgruppe Standardfutter mit einem auf Säurenbasierenden Produkt und der Antibiotikumgruppe Standardfutter sowie Enrofloxacin im Wasser in den ersten fünf Tagen nach der Ankunft der Küken im Maststall verabreicht. Es wurden aus jeder Gruppe acht Dickdarmproben zu zwei verschiedenen Zeiten (Tag 17 und Tag 38) entnommen. Zusätzlich wurde eine Kotprobe am Tag der Einstellung von allen Küken genommen. Diese entspricht der sogenannten Umweltprobe. Aus diesen Proben wurden *E. coli* isoliert und phänotypisch und genotypisch analysiert. Ziel ist es herauszufinden, ob das Produkt einen Einfluss auf das Vorkommen von Antibiotika-resistenten *E. coli* hat. Weiters soll im Rahmen von Vorversuchen Nährmedien für den Test des Wachstumsverhaltens ausgewählt werden. Diese findet in einer weiteren Masterarbeit Verwendung. Mittels Bioscreen kann das Wachstums-

verhalten von *E. coli* gegenüber Antibiotika und dem auf Säuren basierenden Produkt erfasst werden.

## 2 Literatur

### 2.1 *Escherichia coli*

Das Gram-negative Bakterium *Escherichia coli* (Abbildung 1) gehört zur Familie der *Enterobacteriaceae* und wurde 1885 durch Theodor Escherich entdeckt. Weil *E. coli* allgemein verfügbar und leicht zu züchten ist, gehört das fakultativ anaerobe Bakterium zu den zentralen Studienobjekten der Mikrobiologie. *E. coli* gilt gegenwärtig von allen in der Wissenschaft bekannten zellulären Organismen als am besten erforscht (Goodsell, 2009). Das stäbchenförmige Bakterium mit einer Länge von 1-2,5  $\mu\text{m}$  und einer Breite von ca. 0,6  $\mu\text{m}$  braucht nur ein Nährmedium mit einer Mischung aus Mineralsalzen, Wasser und einer Zuckerquelle. Es ist daher leicht dieses Bakterium in einer Flüssigkultur oder auf einem festen Medium (Agar) zu kultivieren. Das Bakterium besteht aus einer äußeren Membran, einer dünnen Zellwand und einer Plasmamembran, die die Zellkomponenten umhüllt. Die *E. coli*-Zelle trägt an der äußeren Oberfläche etwa 10 Flagellen, die für die Fortbewegung verantwortlich sind und außerdem tausende von Pili, die der Anheftung der Zelle an Oberflächen dienen. Um einen Vorrat an verschiedenen Stämmen anzulegen kann man die fakultativ anaeroben *E. coli*-Bakterien für 20 Jahre oder länger bei  $-70^{\circ}\text{C}$  einfrieren, ohne diese laufend kultivieren zu müssen. Der Mensch besitzt zwei Kopien von ca. 25000 Genen verteilt auf 46 Chromosomen. *E. coli* besitzt hingegen ein ringförmiges Chromosom mit 4000 Genen, die in je einer Kopie vorliegen. Dieses Chromosom liegt frei im Cytoplasma vor. Aus diesem Grund sind genetische Analysen bei Bakterien viel einfacher durchzuführen. Dieses Bakterium beinhaltet auch noch extrachromosomale Elemente, die als Plasmide bezeichnet werden. Diese Plasmide, aber auch Chromosomen, kann man aus der Zelle extrahieren, durch Hinzufügen oder Modifizieren von Genen verändern und in ein anderes Bakterium einschleusen, in dem dann die neuen Gene exprimiert werden (Clark & Pazdernik, 2009).



Abbildung 1: *E. coli* (Clark & Pazdernik, 2009)

Von *E. coli* sind die meisten Stämme weitverbreitete Mitglieder der enterischen Mikroflora des menschlichen Darms und nicht pathogen. Der sterile Darm eines Säuglings wird sofort nach der Geburt kolonisiert, wobei man nicht weiß woher die ersten Besiedler kommen. Der Dickdarm

ist der am meisten besiedelte Bereich des Magen-Darm-Trakts und enthält  $10^{11}$ - $10^{12}$  Bakterien/g Stuhl. *Escherichia coli* gehört mengenmäßig nicht zu den wichtigsten Darmbakterien, weil diese Spezies weniger als 1% der Stuhlmasse ausmacht. Ca. 200 pathogene *E. coli*-Stämme sind bekannt. Einige wenige solcher Stämme sind durch Übertragung mittels Lebensmittel potenziell pathogen. Diese Pathogene entfalten alle ihren Einfluss im Darm, bilden mehrere Enterotoxine und können lebensbedrohliche Durchfallerkrankungen sowie Harnwegsinfektionen verursachen (Madigan et al., 2013). Die Toxine schädigen den Darm, wodurch keine Flüssigkeit mehr aus dem Darm aufgenommen werden kann (Clark & Pazdernik, 2009). Die Klassifizierung der pathogenen Stämme erfolgt entsprechend dem von ihnen produzierten Toxin und der spezifischen Krankheit, die sie hervorrufen (Madigan et al., 2013).

Ein besonders pathogener Serotyp ist *E. coli* O157:H7 der zwei Toxingene trägt, die blutigen Durchfall verursachen. Für Kinder, Alte und Menschen mit einem geschwächten Immunsystem ist dieser Serotyp besonders gefährlich (Clark & Pazdernik, 2009). *E. coli* O157:H7 ist der am weitesten verbreitete Shigatoxin-bildende Organismus (STEC) und scheidet Verotoxin aus, das dem Shigatoxin ähnlich ist. Die frühere Bezeichnung wäre enterohämorrhagischer *E. coli* (EHEC). Fallweise werden Verotoxin-bildende *E. coli* (VTEC) auch Shigatoxin-bildende *E. coli* (STEC) genannt. Ungefähr 90% aller STEC-Infektionen werden von *E. coli* O157:H7 verursacht. In den USA treten jährlich ca. 60000 Infektionen auf, von denen 60 tödlich ausgehen. STEC-Stämme verursachen das hämolytisch urämisches Syndrom (HUS), wobei das Verotoxin Nierenversagen und blutigem Durchfall bewirkt. Dieses Toxin wird durch im Dünndarm wachsende Bakterien gebildet (Madigan et al., 2013).

Weitere pathogene *E. coli* sind die enterotoxischen *E. coli* (ETEC), enteropathogene *E. coli* (EPEC) und enteroinvasive Stämme von *E. coli* (EIEC). ETEC-Stämme verursachen Durchfall durch ein bis zwei hitzeunbeständige Enterotoxine. Die wichtigsten Vektoren sind Lebensmittel wie frisches Gemüse und Wasser. EPEC-Stämme hingegen bilden keine Toxine und sind bei Kleinkindern und Kindern Verursacher von Durchfall. Eine invasive Erkrankung des Darms wird durch EIEC ausgelöst. Dabei kommt es zu wässrigen und manchmal blutigen Durchfall (Madigan et al., 2013).

Das Fleisch gut zu garen ist die wirksamste Methode um Infektionen mit STEC durch Nahrungsmittel zu verhindern. In den USA ist es zugelassen, Hackfleisch zu bestrahlen um Bakterien, die Lebensmittelinfektionen verursachen, zu eliminieren oder zu dezimieren. In Deutschland und Österreich ist die Bestrahlung von Hackfleisch verboten. Wichtige Punkte zur Prävention, der Verbreitung von pathogenen *E. coli* sind sauberes Wasser, eine ordnungsgemäße Handhabung, das Waschen von rohen Lebensmitteln und angemessene Hygienestandards (Madigan et al., 2013).

*E. coli* und coliforme Bakterien werden häufig als Indikatorkeime in Wasser und Lebensmittel herangezogen. Das Konzept der Indikatorbakterien stammt aus dem letzten Jahrhundert. Diese ermöglichen eine relativ einfache Beurteilung und Überwachung der hygienisch-bakteriologischen Qualität. Methoden um pathogene Mikroorganismen nachzuweisen sind

sehr zeit- und arbeitsaufwendig und darum wurden vor allem in der Trinkwasserhygiene stellvertretend für die Krankheitserreger Indikatorbakterien untersucht (Nollet & De Gelder, 2013).

Des Weiteren wird von der normalen Microflora *E. coli* oft als Indikator von Antibiotikaresistenzen bei gramnegativen Bakterien ausgewählt, weil es im Allgemeinen in Tierfäkalien vorhanden ist, relevant für die Humanmedizin ist und konjugative Plasmide erwerben kann. Diese Plasmide können Resistenzplasmide sein, die auf andere Darmbakterien übertragen werden können. *E. coli* der normalen Microflora bilden ein Reservoir von Resistenzgenen, die sich horizontal zu Zoonoseerregern und anderer Bakterien in der Lebensmittelkette ausbreiten können. Das Monitoring von Antibiotikaresistenzen vom Indikatorkeim *E. coli* der entweder von gesunden Tieren oder anderen Kadavern und Fleisch von isoliert wurde, wurde ausgewählt um representative Daten von Antibiotikaresistenzen in dieser Population zu gewinnen (European Food Safety Authority, 2014).

## **2.2 Antibiotika**

### **2.2.1 Allgemeiner Überblick**

Selman Waksman (1888-1973) prägte 1941 erstmals den Begriff Antibiotikum (griech. anti: gegen und biotikos: zum Leben gehörig). Heutzutage wird dieser Begriff auch für Substanzen verwendet, die von natürlichen Antibiotika stammen und durch Partialsynthese so verändert werden, dass sie eine verbesserte Beschaffenheit aufweisen. 1928 hatte A. Fleming durch Zufall die Hemmung von *Staphylococcus aureus*, einem Erreger der Wundinfektion, durch *Penicillium chrysogenum* entdeckt (Drews, 2010). Nachdem Alexander Fleming (1881-1955) das Penicillin entdeckte, wurden bis heute mehrere tausend Antibiotika beschrieben. Jedoch sind heute nur mehr die wenigsten therapeutisch brauchbar (Gressner & Arndt, 2013).

Heutzutage verfügt die Menschheit über eine breite Palette an antibiotischen Arzneistoffen, mit denen Krankheiten entgegen gewirkt werden kann (Goodsell, 2009). Antibiotika sind natürliche vorkommende Wirkstoffe, die antimikrobiell wirken und als Sekundärstoffe von vielen Bakterien und Pilzen gebildet werden (Sahm et al., 2013). Sie können durch ein toxisches Wirken auf den Wirt oder eine fehlende Aufnahme von der Bakterienzelle andere Mikroorganismen hemmen (Bakteriostase) oder abtöten (Bakterizide). Antibiotika spielen als antimikrobielle Medikamente in der Human- und Tiermedizin, aber auch in der Landwirtschaft, eine wichtige Rolle. Die Klassifizierung erfolgt aufgrund ihrer molekularen Struktur, ihrer Wirkungsweise und der Aktivität gegen gramnegativen oder grampositiven Bakterien. Es gibt zwei große Gruppen der antimikrobiellen Wirkstoffe, nämlich die der synthetischen Wirkstoffe und die Gruppe der natürlichen Antibiotika (Madigan et al., 2013).

Wichtige Angriffsorte von Antibiotika bei Bakterien sind Ribosomen, die Zellwand, die Cytoplasmamembran, die Lipidbiosyntheseenzyme, die Thyminbildung, die DNA-Replikation- und Transkriptionselemente (Abbildung 2) (Madigan et al., 2013).

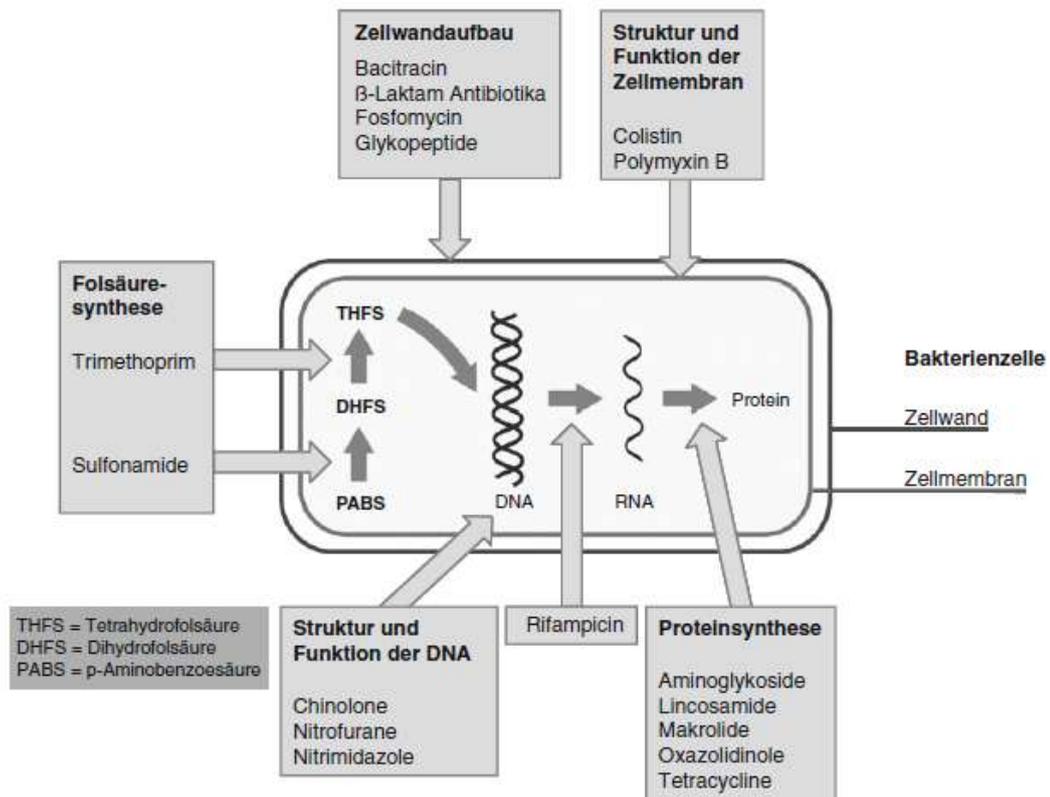


Abbildung 2: Wirkmechanismen von Antibiotika (Schmitz, 2011)

## 2.2.2 Antibiotika, die auf die Proteinsynthese wirken

Die Unterbindung der Translation wird durch die Interaktion vieler Antibiotika mit den Ribosomen ausgelöst. Dies hängt oft mit der Bindung an die ribosomalen RNA (rRNA), die sehr spezifisch ist, zusammen. Diese Antibiotika werden in der Forschung als Hilfsmittel eingesetzt und dienen auch der Medizin, denn sie blockieren die Proteinsynthese. Die Proteinketteninitiation wird zum Beispiel durch Streptomycin gehemmt. Chloramphenicol und Tetracyclin unterbinden hingegen die Proteinkettenelongation (Madigan et al., 2013).

### 2.2.2.1 Aminoglykoside

Aminoglykoside haben ihren Namen wegen den Aminosäuren, die glykosidisch verbunden sind, erhalten. Die 30S Untereinheiten der Ribosomen dienen den Aminoglykosiden als Angriffsziel. Sie hemmen dabei die Proteinsynthese der gramnegativen Bakterien sowie der grampositiven Staphylokokken. Streptomycin (Abbildung 3), das von *Streptomyces griseus* gebildet wird, gehört zu den klinisch genutzten Aminoglykosiden (Madigan et al., 2013).

Streptomycin wurde als erstes wirksames Antibiotikum gegen Tuberkulose eingesetzt. Jedoch werden Aminoglykosidantibiotika heutzutage kaum mehr verwendet. Aufgrund von schweren Nebenwirkungen wie Neuro- und Nierentoxizität wurde Streptomycin durch synthetische Antibiotika zur Behandlung von Tuberkulose ersetzt. Außerdem waren Bakterien schnell gegen Aminoglykoside resistent. Sie werden jetzt nur noch als Reserveantibiotika betrachtet und nur dann verwendet, wenn andere Antibiotika keine Wirkung zeigen (Madigan et al., 2013).

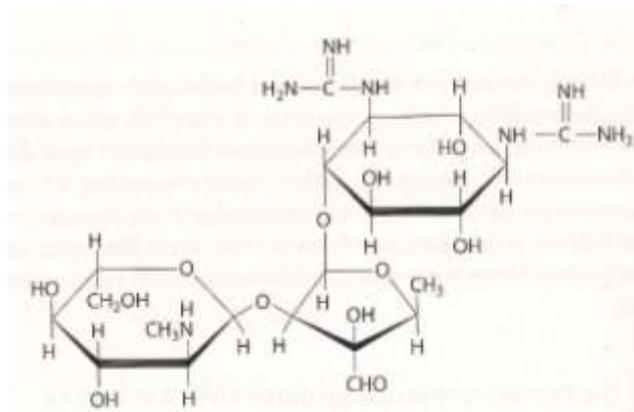


Abbildung 3: Streptomycin (Nelson & Cox, 2009)

### 2.2.2.2 Macrolide

Erythromycin (Abbildung 4), ein Macrolidantibiotikum, enthält einen an Zucker gebundene Lactonringe. Aufgrund von Veränderungen des Zuckers bzw. des Lactonringes gibt es eine große Anzahl an Macrolidantibiotika. Erythromycin, ein Breitband-Antibiotikum, wird von *Streptomyces erythems* gebildet und ist das bekannteste Macrolid. Es hemmt die Proteinsynthese indem es die 50S Untereinheit des bakteriellen Ribosoms angreift. Erythromycin wird zur Behandlung von Legionellose verwendet. Es kann auch Penicillin oder andere  $\beta$ -Lactam-Antibiotika bei Allergien ersetzen (Madigan et al., 2013).

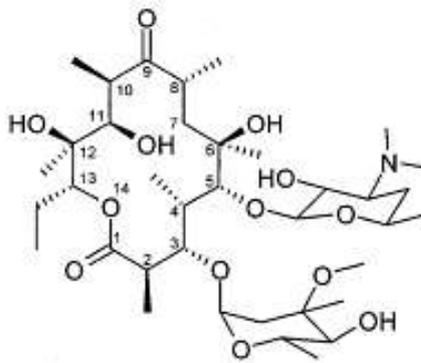


Abbildung 4: Erythromycin (Bailey, 2007)

### 2.2.2.3 Tetracycline

Die Gattung *Streptomyces* bildet auch Tetracycline (Abbildung 5).  $\beta$ -Lactam-Antibiotika und Tetracycline zählen zu den wichtigsten Gruppen der in der Medizin eingesetzten Antibiotika. Das Breitband-Antibiotikum hemmt fast alle grampositiven und gramnegativen Bakterien. Der Naphthacenring ist die Grundstruktur der Tetracycline. Tetracyclin hemmt, wie Erythromycin und die Aminoglykosidantibiotika, die Proteinsynthese indem es die 30S Untereinheit der bakteriellen Ribosomen angreift. Der Einsatz von Tetracyclin erfolgt auch in der Veterinärmedizin. Es wird in einigen Ländern, z.B. USA, noch immer in der Geflügel- und Schweinezucht als Leistungsförderer verwendet (Madigan et al., 2013).

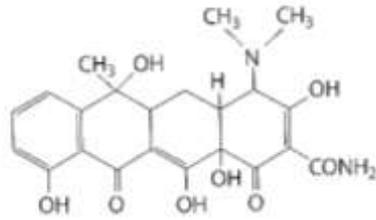


Abbildung 5: Tetracyclin (Nelson & Cox, 2009)

### 2.2.3 Antibiotika, die auf die Transkription wirken

Die Transkription wird spezifisch von einigen Antibiotika durch die Störung der RNA-Synthese gehemmt. Rifampin und Streptovarizine hemmen zum Beispiel die RNA-Synthese durch die Bindung an der  $\beta$ -Untereinheit der DNA-Polymerase. Diese Antibiotika sind für Bakterien und Mitochondrien spezifisch. Actinomycin verhindert die RNA-Elongation durch das Binden an die DNA. Dabei bindet dieser Wirkstoff stark mit den Guanin-Cytosin-Basenpaaren der DNA (Madigan et al., 2013).

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts entwickelte der deutsche Wissenschaftler Paul Ehrlich das Konzept der selektiven Toxizität. Diese selektive Toxizität beschreibt das Vermögen eines chemischen Wirkstoffs, pathogene Mikroorganismen zu hemmen oder zu töten, ohne den Wirt zu schädigen. Er untersuchte Farbstoffe nach ihrer selektiven Toxizität und entdeckte Salvarsan, ein arsenhaltiges Molekül, das zur Behandlung der Syphilis erfolgreich war (Madigan et al., 2013).

### 2.2.4 Antibiotika, die auf die Folsäuresynthese wirken

In den 30er Jahren des 20. Jahrhunderts entdeckte Gerhard Domagk Sulfonamide. Diese waren die ersten häufig verwendeten Wachstumsförderer. Sulfanilamid, ein Analog der p-Aminobenzoesäure, das ein Bestandteil des Vitamins Folsäure darstellt (Abbildung 6), ist das einfachste Sulfonamidmedikament. Diese Substanz unterbindet die Synthese der Folsäure, wodurch die Nucleinsäuresynthese gehemmt wird. Bakterien können ihre eigene Folsäure synthetisieren, Säugetiere nicht. Darum kann Sulfanilamid selektiv toxisch wirken. Sulfonamidmedikamente wurden anfänglich bei Streptokokkeninfektionen eingesetzt, jedoch stieg die Resistenz gegen Sulfonamide. Viele ehemals empfindliche Pathogene sind nun in der Lage, Folsäure aus ihrem Lebensraum zu nutzen. Sulfamethoxazol in Kombination mit Trimethoprim, einem verwandten, kompetitiven Hemmstoff der Folsäuresynthese, ist oft noch wirksam. Diese Kombination ruft eine sequenzielle Blockade des Folsäuresynthesewegs hervor und es werden zwei Mutationen in Genen des gleichen Weges benötigt um eine Resistenz zu verursachen, was relativ selten vorkommt (Madigan et al., 2013). Trimethoprim ist ein synthetisch hergestelltes Antibiotikum der Gruppe der Dihydrofolat-Reduktase- (DHFR) Inhibitoren. Die Folsäuresynthese erfolgt in zwei Schritten, der Synthese von Dihydrofolat und der Umwandlung durch die DHFR in Tetrahydroxyfolat. Der Angriffsort von Trimethoprim ist der zweite Syntheseschritt, indem es die DHFR-Aktivität blockiert. Die Wirkung richtet sich gegen ein brei-

tes Feld an grampositiven und aeroben gramnegativen Bakterien. Ausgenommen sind Enterokokken und Laktokokken (Bryskier, 2005).

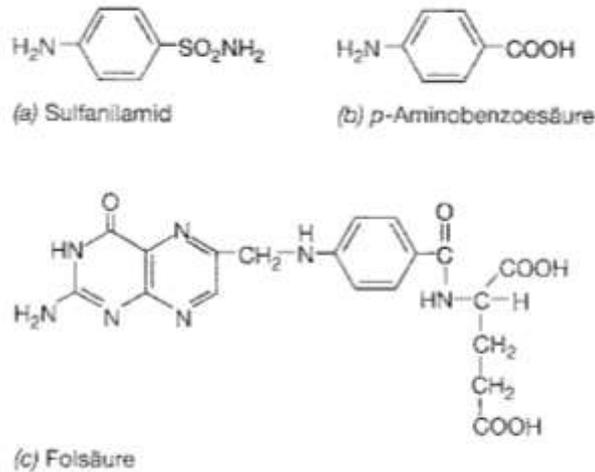


Abbildung 6: Sulfanilamid, *p*-Aminobenzoessäure, Folsäure (Madigan et al., 2013)

### 2.2.5 Antibiotika, die auf die DNA-Replikation wirken

Quinolone beeinflussen die DNA-Gyrase und verhindern somit eine Überspiralisierung der DNA, welche zum Einpacken der DNA in die bakterielle Zelle benötigt wird. Mit Fluoroquinolone werden Harnwegsinfektionen beim Menschen behandelt, da alle Bakterien eine DNA-Gyrase besitzen. Ciprofloxacin (Abbildung 7) wird als Medikament gegen Anthrax verwendet, da einige Stämme von *Bacillus anthracis* gegenüber Penicillin resistent sind. Die Dauer der Behandlung (sechs bis zwölf Monate) kann durch die Kombination mit anderen Medikamenten verkürzt werden. In der Vieh- und Geflügelzucht werden diese Antibiotika zur Vorbeugung und zur Behandlung von Atemwegserkrankungen verwendet (Madigan et al., 2013).

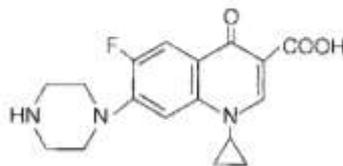


Abbildung 7: Ciprofloxacin (Madigan et al., 2013)

### 2.2.6 Antibiotika, die auf die Zellwandsynthese wirken

#### 2.2.6.1 $\beta$ -Lactam-Antibiotika

Historisch und medizinisch gesehen ist die  $\beta$ -Lactam-Antibiotikumgruppe eine der wichtigsten Gruppen. Dazu gehören Penicilline, Cephalosporine und Cephamycine, die alle miteinander einen  $\beta$ -Lactamring besitzen. Mehr als die Hälfte der weltweit hergestellten Antibiotika sind  $\beta$ -Lactam-Antibiotika (Madigan et al., 2013).

## Penicilline

Alexander Fleming, ein britischer Wissenschaftler, beschrieb 1929 das erste Antibiotikum. Diese antibakterielle Verbindung wird als Penicillin (Abbildung 8) bezeichnet, da er es aus dem Pilz *Penicillium chrysogenum* isoliert hatte. Sofort wurde allerdings nicht erkannt, dass man ein wichtiges Medikament entdeckt hat. In den 1930er Jahren beschränkte sich der Einsatz auf die Behandlung von Infektionskrankheiten, die durch grampositive Organismen wie *Streptococcus* verursacht wurden. Howard Florey und seine Kollegen entwickelten 1939 ein Verfahren, um Penicillin im großen Maßstab herzustellen. Das erste klinisch einsetzbare Antibiotikum war Penicillin G. Dieses wurde beim Militär zur Behandlung von Staphylokokken oder Pneumokokken verursachten Infektionen verwendet. Es wurden auch bessere Ergebnisse bei der Behandlung von Streptokokkeninfektionen als mit Sulfonamiden erzielt. Gegen Ende des Weltkrieges suchten und entwickelten Pharmazieunternehmen weitere Antibiotika und das Penicillin stand der breiten Bevölkerung zur Verfügung. Dies führte zur Revolution der Behandlung von Infektionen (Madigan et al., 2013).

Grampositive Bakterien werden durch Penicillin G bekämpft, denn es kann nicht in die Zelle von gramnegativen Bakterien eindringen. Darum wurde die chemische Struktur des Moleküls so verändert, dass diese auch gegen gramnegative Bakterien gute Ergebnisse erzielen. Gegen einige gramnegative Bakterien wirken Ampicillin und Carbenicillin. Diese sind semisynthetische Penicilline. Durch die strukturell unterschiedlichen N-Acetylgruppen können diese auch durch die äußere Membran der gramnegativen Bakterien befördert werden und dort die Zellwandsynthese hemmen (Madigan et al., 2013).

$\beta$ -Lactam-Antibiotika wirken indem sie die Quervernetzung der bakteriellen Zellwand stören. Dadurch verliert diese ihre Festigkeit. Die Transpeptidierung ist eine Reaktion die zur Quervernetzung von zwei Glykan verknüpften Peptidketten führt. Transpeptidaseenzyme binden an  $\beta$ -Lactam-Antibiotika und werden daher als Penicillin-bindende Proteine (PBPs) bezeichnet. Die Zellwandsynthese läuft weiter, obwohl PBPs Penicillin binden und sie keine Transpeptidase-reaktion katalysieren können. Darum erfolgt keine Quervernetzung der Zellwand. Zusätzlich wird durch den Antibiotika-PBP-Komplex auch die Freisetzung von Autolysinen und Enzymen, die die Zellwand abbauen, stimuliert. Die Lyse der Zelle entsteht dann durch den unterschiedlichen osmotischen Druck zwischen dem Zellinneren und der äußeren Zellumgebung (Madigan et al., 2013).

$\beta$ -Lactam-Antibiotika wirken nicht auf Wirtszellen, sondern sehr selektiv auf die Synthesemechanismen der Bakterien-Zellwand. Jedoch entwickeln manche Individuen bei wiederholter Verabreichung von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika Allergien (Madigan et al., 2013).

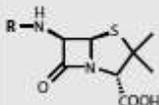
Penicilline		Grundgerüst: 6-Aminopenicillansäure
	<b>R</b>	
	Phenyl-CH <sub>2</sub> -CO-	Penicillin G
natürliche Penicilline	H <sub>3</sub> C-CH <sub>2</sub> -CH=CH-CH <sub>2</sub> -CO-	Penicillin F
	H <sub>3</sub> C-(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -CO-	Penicillin K
biosynthetische Penicilline	Phenyl-O-CH <sub>2</sub> -CO-	Penicillin V
	CH <sub>2</sub> =CH-CH <sub>2</sub> -S-CH <sub>2</sub> -CO-	Penicillin O
semisynthetische Penicilline	Phenyl-CH(NH <sub>2</sub> )-CO-	Ampicillin
	4-OH-Phenyl-CH(NH <sub>2</sub> )-CO-	Amoxicillin

Abbildung 8: Penicilline (Sahm et al., 2013)

## Cephalosporine

Der Pilz *Cephalosporium acremonium* bildet Cephalosporine (Abbildung 9), die eine weitere Gruppe klinisch wichtiger  $\beta$ -Lactam-Antibiotika darstellen. Diese unterscheiden sich in ihrer Struktur von den Penicillinen. Sie haben den  $\beta$ -Lactamring, besitzen aber statt des Thiazolidin-fünfferrings einen Dihydrothiazinsechsering. In der Wirkungsweise gibt es allerdings keinen Unterschied, denn sie binden auch irreversibel an die PBPs und unterbinden so die Quervernetzung des Peptidoglykans. Jedoch ist das Wirkungsspektrum größer, als bei den Penicillinen. Cephalosporine sind gegen  $\beta$ -Lactamasen resistenter und haben das Penicillin bei der Behandlung von Gonorrhö (*Neisseria gonorrhoeae*-Infektion) ersetzt, weil mittlerweile viele *N. gonorrhoeae*-Stämme gegen Penicillin resistent sind (Madigan et al., 2013).

Cefotaxim (Abbildung 10) gehört zur Gruppe der Drittgenerations-Cephalosporine und sie haben im Vergleich zur zweiten Generation eine höhere antimikrobielle Aktivität und ein breiteres Spektrum gegen gramnegative Bakterien (Lentze et al., 2001).

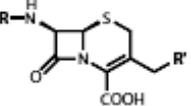
Cephalosporine		Grundgerüst: 7-Aminocephalosporansäure	
	<b>R</b>	<b>R'</b>	
natürliche Cephalosporine	HO <sub>2</sub> C-CH(NH <sub>2</sub> )-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -CO-	AcO-	Cephalosporin C
	HO <sub>2</sub> C-CH(NH <sub>2</sub> )-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -Cl(O)-	HO-	Deacetyl-cephalosporin C
	4-OH-Phenyl-CH(NH <sub>2</sub> )-CO-	H-	Cefadroxil
semisynthetische Cephalosporine	Phenyl-CH(NH <sub>2</sub> )-CO-	H-	Cephalexin
	Thiophen-CH <sub>2</sub> -CO-	AcO-	Cephalotin

Abbildung 9: Cephalosporine (Sahm et al., 2013)

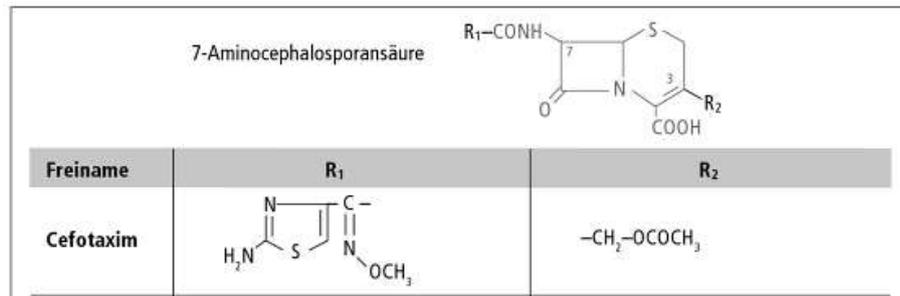


Abbildung 10: Cefotaxim (Brodth, 2013)

## Carbapeneme

Meropenem gehört zur Carbapenemgruppe, die eine Wirksamkeit gegen *P. aeruginosa* haben. Die Carbapeneme hemmen die Peptidoglykansynthese in der Bakterienzellwand. Alle Carbapeneme haben eine von der Einwirkungszeit abhängige, aber konzentrationsunabhängige, bakterizide Wirkung (Suerbaum et al., 2012).

### 2.2.7 Antibiotikaresistenz

Antibiotikaresistenzen stellen im Umgang mit den vielen pathogenen Mikroorganismen, vor allem im medizinischen Bereich, ein ernst zu nehmendes Problem dar (Madigan et al., 2013).

#### 2.2.7.1 Antimikrobielle Antibiotikaresistenz

Die erworbene Fähigkeit eines Mikroorganismus, der Wirkung eines antimikrobiellen Wirkstoffes gegen den er normalerweise empfindlich wäre, zu widerstehen, wird antimikrobielle Medikamentenresistenz genannt. Kein antimikrobieller Wirkstoff hemmt alle Mikroorganismen. Mikroorganismen bilden Antibiotika, wobei dieser Organismus fähig sein muss, das Antibiotikum selber zu zerstören oder zu neutralisieren. Antibiotikaresistenzgene müssen praktisch in jedem Mikroorganismus, der ein Antibiotikum bildet, vorkommen. Durch einen horizontalen Gentransfer von Antibiotikaresistenzen kodierender Gene zwischen und unter Mikroorganismen kann eine weitverbreitete antimikrobielle Medikamentenresistenz entstehen (Madigan et al., 2013).

#### 2.2.7.2 Resistenzmechanismen

Für den Besitz von Resistenzen gegenüber Antibiotika gibt es mindestens sechs Gründe. Der erste ist, dass der Organismus gar nicht die Struktur besitzt die das Antibiotikum hemmt. Zum Beispiel haben Mycoplasmen, die keine bakterielle Zellwand aufweisen, eine natürliche Resistenz gegenüber Penicillinen. Ein weiterer Grund ist, dass der Organismus von einem Antibiotikum nicht durchdrungen werden kann. So kann Penicillin G in die meisten gramnegativen Bakterien nicht eindringen. Der dritte Grund ist, dass der Organismus in der Lage ist, das Antibiotikum in eine inaktive Form zu verändern. Ein Beispiel wäre das Enzym  $\beta$ -Lactamase von vielen Staphylokokken, das den  $\beta$ -Lactamring der meisten Penicilline spaltet. Der Organismus kann auch das Ziel des Antibiotikums verändern. Diese Resistenz beruht auf Mutationen in chromosomalen Genen. Die fünfte Möglichkeit wäre, dass der Organismus einen resistenten bioche-

mischen Weg entwickelt und so das Antibiotikum keine Wirkung mehr zeigen kann. Zum Beispiel verändern Sulfonamid-resistente Bakterien ihren Metabolismus so, dass sie auf den, durch das Antibiotikum gehemmten Folsäuresyntheseweg, verzichten können, da sie Folsäure aus ihrer Umgebung aufnehmen. So besteht kein Bedarf mehr an einem biochemischen Weg, Folsäure zu produzieren. Efflux ist ein weiterer Weg zur Gegenwirkung eines Antibiotikums. Dabei wird das Molekül aus der Zelle herausgepumpt (Madigan et al., 2013).

Die Kodierung der Antibiotikaresistenz kann entweder auf dem bakteriellen Chromosom oder auf einem Plasmid, dem sogenannten R-Plasmid (R=Resistenz), liegen. Aus klinischen Proben isolierte Bakterien müssen auf ihre Antibiotikaempfindlichkeit getestet werden. Dies ist auf die Tatsache, dass laufend neue Resistenzen entstehen, zurückzuführen (Madigan et al., 2013).

Transposone und Integrone sind mobile DNA-Elemente, die für die Evolution des Genoms von Bedeutung sind. Diese mobilen DNA-Elemente tragen oft Gene, die Antibiotikaresistenzen kodieren (Madigan et al., 2013).

Transposon- und Insertionssequenzen sind genetische Elemente, die von einem Ort auf dem DNA-Molekül des Wirts zu einem anderen springen können. Diese Bewegung erfolgt durch Transposition, eine Art Locus-spezifischer Rekombination (Madigan et al., 2013).

Integrone sind genetische Elemente, die Gene sammeln und exprimieren. Diese Gene werden auf mobilen DNA-Segmenten getragen, den so genannten Kassetten. Die Integrone selbst besitzen eine Aufnahmestelle in welche eine Genkassette eingebaut werden kann. Das Integron verfügt weiters über ein Gen, das die Integrase kodiert. Dieses Enzym fügt Kassetten ein. Das Einfügen erfolgt durch Rekombination zwischen der Integraseerkennungsstelle (attC-Stelle) und der Aufnahmestelle (attI-Stelle). Nach dem Einbau der Genkassette in ein Integron kann das Gen, das es trägt, durch einen Promotor exprimiert werden, der von dem Integron zur Verfügung gestellt wird. Integrone und Genkassetten besitzen weder umgekehrte terminale Wiederholungssequenzen noch transponieren sie diese. Die meisten Integrone kommen auf Plasmiden oder in Transposone vor und sind in der Lage mehrere Genkassetten zu bündeln (Madigan et al., 2013).

Streptomycin, Neomycin, Kanamycin und Spectinomycin haben als Aminoglykosidantibiotika ähnliche Strukturen. Stämme mit R-Plasmiden können diese Antibiotika inaktivieren, indem sie es phosphorylieren, adenylieren oder acetylieren.

Die Penicillinresistenz beruht auf eine durch R-Plasmide codierte Penicillinase. Das ist eine  $\beta$ -Lactamase, die das Antibiotikum durch die Spaltung dessen  $\beta$ -Lactamringes, inaktiviert (Madigan et al., 2013).

### 2.2.7.3 Durch R-Plasmide vermittelte Resistenz

Die meisten resistenten Bakterien, die man aus Patienten isoliert hat, enthalten Resistenzgene die auf R-Plasmiden und nicht auf dem Chromosom liegen. Die Gene auf dem R-Plasmid codieren für Enzyme, die das Antibiotikum inaktivieren, oder für Strukturen, die die Aufnahme von Antibiotika verhindern oder diese aus der Zelle pumpen.

Es können auch mehrere Resistenzgene auf einem R-Plasmid vorhanden sein, dadurch ist eine Zelle, die dieses Plasmid beinhaltet, gegen mehrere Antibiotika resistent (Madigan et al., 2013).

#### 2.2.7.4 Ursprung von Resistenzplasmiden

Bevor man schon künstliche Antibiotika verwendete, existierten R-Plasmide. Ein Plasmid mit Tetracyclin- und Streptomycin-Resistenzgenen wurde bereits in einem 1949 gefriergetrockneten Stamm von *E. coli* entdeckt, obwohl diese Antibiotika erst später klinisch verabreicht wurden. Ganz ähnlich ist es auch mit R-Plasmidgenen, die eine Resistenz gegen semisynthetische Penicilline codieren. Diese waren bereits vorhanden, bevor man diese Penicilline synthetisierte. Lang vor der Entdeckung der Antibiotika entstanden wahrscheinlich R-Plasmide. Diese natürlichen Plasmide wurden vermehrt und verbreitet als immer mehr Antibiotika in der Landwirtschaft und Medizin eingesetzt wurden (Madigan et al., 2013).

#### 2.2.7.5 Anstieg der Antibiotikaresistenz

Durch den häufigen Gebrauch von Antibiotika in der Landwirtschaft, Medizin und der Veterinärmedizin werden sehr selektive Bedingungen für die Verbreitung von R-Plasmide geschaffen. Eine Antibiotikaresistenz ist ein sofortiger Selektionsvorteil und deren Verbreitung ein vorhersehbares Ergebnis der natürlichen Selektion. Eine langfristige Verwendung eines einzelnen Antibiotikums als wirksames Medikament ist wegen den Resistenzgenen von R-Plasmiden oder anderen genetischen Elementen nicht möglich. Als Hauptursache für die rasante Entwicklung von Antibiotikaresistenzen bei krankheitserregenden Mikroorganismen gelten die unangemessene Verwendung und der übermäßige Einsatz von Antibiotika. Nun müssen andere antimikrobielle Wirkstoffe zur Behandlung bestimmter Infektionen verschrieben werden.

Fast jedes Jahr werden die Richtlinien zur Behandlung von durch Geschlechtsverkehr übertragene Gonorrhö überarbeitet, um der zunehmenden Medikamentenresistenz entgegen zu wirken. Zunächst wurde Ciprofloxacin anstatt Penicillin verwendet. Jedoch wurde schon kurze Zeit später eine Zunahme von Ciprofloxacin-resistenten Stämmen, die man aus homosexuellen Männern in Asien, Hawaii und Kalifornien isoliert hatte, festgestellt. Dadurch war man gezwungen, das Fluoroquinolon durch Ceftriaxon zu ersetzen. Dieses Medikament ist gegenüber der  $\beta$ -Lactamase resistent. Trotz des Wissens der Problematik werden Antibiotika in der Praxis wesentlich häufiger, eingesetzt als nötig. In 80% der Fälle werden Antibiotika verabreicht, jedoch nur bei 20% der Individuen die an Infektionskrankheiten erkrankt sind, ist der Einsatz auch empfohlen. Weiters liegt bei 50% der Fälle eine falsche Behandlungsdauer oder Dosierung vor und oft geht der Patient auch falsch mit dem Antibiotikum um. Zum Beispiel wird von vielen die Medikation abgebrochen, wenn sie sich bereits besser fühlen. Die Selektion von Antibiotika-resistenten Stämmen kann, durch die Verabreichung einer nicht ausreichend hohen Menge von Antibiotika über einen nicht vorgeschriebenen Zeitraum, gefördert werden. Es gibt allerdings Untersuchungen die belegen, dass in den letzten Jahren Ärzte in den USA um

etwa ein Drittel weniger Antibiotika verschrieben als vor 10 Jahren. Dieser Rückgang ist auf den richtigen Umgang mit einer Antibiotikatherapie zurückzuführen.

In der Landwirtschaft werden Antibiotika als Zusatzstoffe für Tierfutter eingesetzt. Dabei kann die Vorbeugung von Krankheiten oder die Wachstumsförderung das Ziel sein. Circa 50% aller Antibiotika werden weltweit in der Nutztierhaltung eingesetzt. Auch in Aquakulturen und im Obstanbau finden Antibiotika Anwendung. Antibiotika, die in der Lebensmittelindustrie viel zu häufig, über längere Zeiträume und in hohen Dosen eingesetzt wurden, sind eine Quelle für Lebensmittelinfektionen. Diese Infektionen entstehen durch die Selektion von Pathogenen, die gegenüber Antibiotika eine Resistenz erworben haben. Ciprofloxacin, ein Breitband-Antibiotikum, wurde mehr als 20 Jahre als Prophylaxe und als Wachstumsförderer in der Landwirtschaft, verwendet. Dies führte in den USA zur Entwicklung von Fluoroquinolon-resistenten *Campylobacter jejuni*. Wahrscheinlich entstand dies in den USA durch die zur Vorbeugung von Atemwegserkrankungen übliche Behandlung von Geflügel mit Fluoroquinolone. Der Einsatz von Fluoroquinolonen in der Geflügelhaltung ist hingegen in Europa verboten. Das Verbot von Antibiotika als Wachstumsfaktor existiert seit 2006. Auf eine Verringerung von Resistenzen in „Umweltkeimen“ weisen erste Daten hin (Madigan et al., 2013).

#### 2.2.7.5.1 Antibiotikaresistente Pathogene

In erster Linie sind der falsche Umgang mit Antibiotika und das Versäumnis, entstehende Resistenzen zu überwachen, Schuld, dass viele pathogene Mikroorganismen seit Beginn des Einsatzes von Antibiotika in den 50er Jahren Resistenzen entwickelten. Penicilline und Sulfonamid-medikamente werden aus diesem Grund nicht mehr oft verschrieben. Zum Beispiel müssen heute wesentlich höhere Dosierungen an Penicillin als vor 10 Jahren gegen *Staphylococcus pyogenes*, das Halsentzündungen, rheumatisches Fieber und Scharlach verursacht, eingesetzt werden (Madigan et al., 2013).

Es gibt auch pathogene Mikroorganismen, die gegenüber allen antimikrobiellen Wirkstoffen resistent sind, wie zum Beispiel Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA). Dieser Organismus ist für eine erhebliche Anzahl an ambulant erworbenen Infektionen verantwortlich. Weiters gibt es auch noch eine anwachsende Menge an *Staphylococcus aureus*-Stämmen, die sogar gegenüber Vancomycin eine verminderte Sensibilität besitzen und Vancomycin-intermediäre *Staphylococcus aureus* (VISA) genannt werden. Resistenzen gegenüber allen bekannten Antibiotika haben Vancomycin-resistente *Enterococcus faecium* (VRE) und einige Isolate von *Mycobacterium tuberculosis* und *Candida albicans* erworben. Für die Verminderung der Antibiotikaresistenz sind ausschließlich Antibiotika zur Behandlung von durch Bakterien verursachten Krankheiten zu benutzen, ausreichend zu dosieren und über den richtigen Zeitraum zu verschreiben. Dadurch soll die mikrobielle Population dezimiert werden bevor sich resistente Mutanten entwickeln können (Madigan et al., 2013).

Es gibt auch die Möglichkeit ein Antibiotikum mit einem anderen zu kombinieren, denn die Wahrscheinlichkeit ist geringer, dass ein mutiertes Isolat gegenüber zwei antimikrobiellen Wirkstoffen resistent ist. Allerdings gibt es auch R-Plasmide mit mehrfacher Antibiotikaresis-

tenz, die relativ häufig vorkommen und dadurch eine Therapie mit zwei Antibiotika nicht sinnvoll ist. Man hat festgestellt, dass durch das Entfernen eines Antibiotikums aus dem Markt, die Wirksamkeit dieses Antibiotikums bei einer Wiedereinführung wieder erlangt werden kann (Madigan et al., 2013).

## **2.3 Genotypische Testmethoden**

### **2.3.1 Typisierung**

Zum Erstellen von genetischen Fingerabdrücken werden molekulare Methoden eingesetzt. Muster aus DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge werden erzeugt und miteinander verglichen. Genotypische Verfahren zeugen stark unterschiedliche Reproduzierbarkeit und variieren deutlich in ihrem Differenzierungspotential, welches von Gattungs- bis zur Subspezies bzw. Stammebene reichen kann. Entsprechende Datenbanken können zur Identifizierung der Organismen aufgrund eines typischen Musters angelegt werden.

#### **2.3.1.1 Isolierung genomischer DNA**

Als ein extrem langes, aber sehr dünnes Fadenmolekül liegt die DNA im Zellkern vor. Extrem hohe Temperaturen und extreme pH-Werte führen wegen ihrer physikalischen Anfälligkeit zur Denaturierung oder Präzipitation der DNA. Strangbrüche können besonders durch Scherkräfte entstehen. Solche Scherkräfte können zum Beispiel beim Pipettieren auftreten. Dadurch werden üblicherweise nur DNA-Fragmente gewonnen, wobei Fragmentlängen von ca. 50 kb für die meisten molekularischen Arbeiten völlig ausreichen. Mit Hilfe von schwach alkalischem Puffer kann aus Zellen (Blut, Mikroorganismen, Gewebeteile) hochreine und biologisch aktive DNA gewonnen werden. Die Zellmembranen werden dabei durch vorsichtiges Homogenisieren und ionischen Detergenzien aufgeschlossen. Zum Beispiel ist EDTA als Komplexbildner von zweiwertigen Kationen wie  $Mg^{2+}$  und  $Mn^{2+}$ , die nukleolytische Enzyme aktivieren können, für den Zellaufschluss wichtig. Der Abbau der Proteine erfolgt durch Zugabe eines proteolytischen Enzyms, wie zum Beispiel Proteinase K, das selbst unter diesen Reaktionsbedingungen noch aktiv ist und sich anschließend selbst abbaut. Durch Ausschütteln mit Phenol werden die Proteinreste und Abbauprodukte abgetrennt. Die Phenolrückstände werden wiederum durch Ausschütteln mit Chloroform entfernt, da Spuren von Phenol die späteren Analysen mit Restriktionsenzymen stören können. Die Fällung der DNA kann mittels Alkohol (Ethanol, Isopropanol) erfolgen. Nach dem Entfernen von Salzen mit Alkohol kann die DNA getrocknet und gelagert werden. Üblicherweise wird DNA in TE-Puffer (10 mM Tris und 1 mM EDTA, pH 8,0) gelagert. Es werden bereits viele automatische Verfahren angeboten, um einen hohen Durchsatz mit gleich bleibender Qualität zu erreichen (Graw, 2006).

#### **2.3.1.2 PCR**

Die Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) bietet vielfältige Anwendungsmöglichkeiten und macht sie dadurch zu einer der wichtigsten und am häufigsten einge-

setzten Methoden in der Molekularbiologie. Kary Mullis wurde 1993 für diese Technologie mit dem Nobelpreis prämiert (Busch, 2010).

Ein spezifischer DNA-Abschnitt kann mit dieser Methode aus einer DNA-Mischung selektiv und effektiv amplifiziert werden. Das Grundprinzip ist, wenige DNA-Moleküle durch Erhitzung in Einzelstränge aufzutrennen. Danach kann jeder Einzelstrang mit den zugesetzten komplementären Primern (Oligonucleotiden) hybridisieren. Oligonucleotide mit beliebiger Basensequenz werden durch spezielle Verfahren produziert. Die Sequenz der Primer wird so gewählt, dass der Bereich, der vermehrt werden soll, flankiert wird. Nach dem Annealing der Primer wird ausgehend vom 3'-Ende der Template-DNA der neue DNA-Doppelstrang mittels einer DNA-Polymerase synthetisiert (Jansohn & Rothhämel, 2012). Aktivierte DNA-Monomere (Desoxyribonukleotidtriphosphate),  $Mg^{2+}$  und eine Pufferlösung sind für die Reaktion notwendige Chemikalien. Die Denaturierung der Doppelstränge, das Annealing der Primer und die Synthese der Komplementärstränge werden bei unterschiedlichen Temperaturen vollzogen und bilden einen Reaktionszyklus. Die Verdoppelung der Zahl der DNA-Doppelstränge erfolgt pro Zyklus. Durch die Abfolge von mehreren Zyklen (Abbildung 11) wird die gewünschte DNA exponentiell vervielfältigt ( $2^n$ ). In der Regel erfolgen 30-40 Zyklen. Durch die Verfügbarkeit von speziellen und hitzestabilen DNA-Polymerasen ist die PCR-Technologie weit verbreitet. Die "Taq-Polymerase" ist eine solche hitzestabile DNA-Polymerase. Sie wurde aus dem in heißen Quellen vorkommende Archaeobakterium *Thermus aquaticus* isoliert. Der weitgehend automatisierte Ablauf der Erhitzungs- und Kühlungsschritte erfolgt mittels PCR-Geräten, die programmierbare Thermostaten sind. Dies ermöglicht eine schnelle und nahezu beliebige Vermehrung der DNA-Sequenzen (Chmiel, 2011).

Die PCR weist eine hohe Empfindlichkeit auf. Das heißt, dass extrem geringe Mengen an Ausgangs-DNA für eine PCR ausreichend sind (Chmiel, 2011).

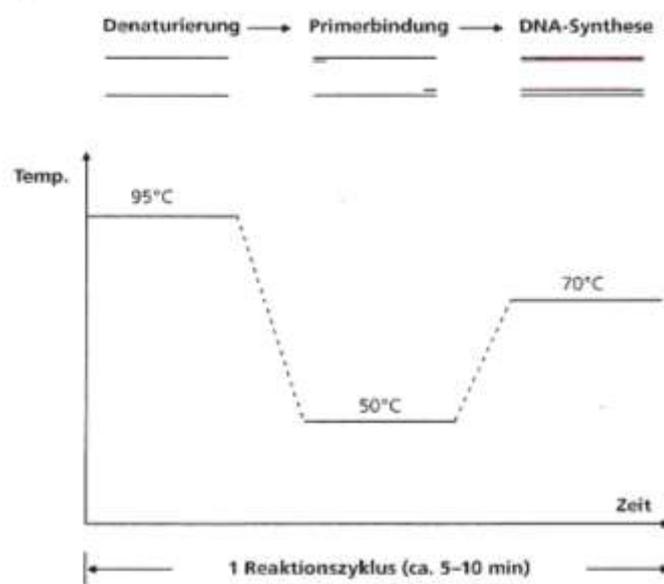


Abbildung 11: Ein Reaktionszyklus bei der PCR (Chmiel, 2011)

## RAPD-PCR

Die Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-PCR ist eine Schnellmethode, mit der bis auf Stammebene unterschieden werden kann. Der ausgewählte Primer agiert gleichzeitig als Vorwärts- und Rückwärtsprimer. Dieser Primer bindet an verschiedenen Stellen am Genom und bildet verschieden lange DNA-Fragmente mit unterschiedlicher Intensität. Die PCR wird bei einer niedrigen Annealing-Temperatur (37-42°C) vollzogen (Busch, 2010).

Abraham et al. (2012), Ouyang-Latimer et al. (2010), Nielson et al. (2014), Ansaruzzaman et al. (2007) und de Lastours et al. (2012) verwendeten zum Typing von *Escherichia coli*-Stämmen eine RAPD-PCR.

## rep-PCR

Bei der rep-PCR (repetitive extragenic palindromic-PCR) wird mittels verschieden langer Wiederholungen einfacher Sequenzmotive die Differenzierung bis hin zur Stammebene durchgeführt. Dabei werden zu den Primer komplementäre Sequenzen amplifiziert. Anschließend werden die daraus entstandenen DNA-Fragmente gelelektrophoretisch untersucht. Im Vergleich zur RAPD-Technik ist die Reproduzierbarkeit vergleichbar, jedoch unterscheiden sich die PCR-Reaktionsbedingungen (Busch, 2010).

Bandyopadhyay et al. (2011), Agostinho et al. (2014), Markovska et al. (2013), Lyautey et al. (2014), Bandyopadhyay et al. (2011), Blyton et al. (2013), Mohapatra et al. (2007), Tramuta et al. (2010) und Askari et al. (2014) verwendeten zur Untersuchung der genetischen Variabilität in *Escherichia coli*-Stämmen eine rep-PCR mit dem Primersystem ERIC1R + ERIC2 Pereira et al. (2013), Tomas-Callejas et al. (2011), Ateba & Mbewe (2013), Agostinho et al. (20014) Ma, et al. (2011), Rodriguez-Bano et al. (2014), Mohapatra et al. (2007), Jadhav et al. (2011) und Tramuta et al. (2010) verwendeten das Primersystem REP1R + REP2I. (GTG)<sub>5</sub> wendeten Ma et al. (2011) und Mohapatra et al. (2007) an. Carlos et al. (2012), Ansaruzzaman et al. (2007), Ateba & Mbewe (2013), Pathak et al. (2013), Agostinho et al. (2014), Chandran & Mazumder (2014), Ma et al. (2011), Mohapatra et al. (2007) verwendeten zum Genotyping das Primersystem BOXA1R.

## Pulsfeld-Gelelektrophorese

Ein weiteres Verfahren zur Genotypisierung stellt die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) dar, welche es ermöglicht, hochmolekulare DNA-Fragmente im Bereich vieler Kilo-Basenpaare zu trennen. Die DNA verändert wegen zweier zueinander quer verlaufender, pulsierender elektrischer Felder ständig ihre Migrationsrichtung im Agarosegel. Dadurch lässt sich die DNA auch im hochmolekularen Bereich auftrennen (Busch, 2010).

## RFLP/Ribotyping

Der Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) wird auch zur Genotypisierung verwendet. Dieses Verfahren basiert auf unterschiedliche Resitriktionsfragmentmustern aufgrund unterschiedlicher DNA-Sequenzen. Hierbei wird chromosomale DNA mit

Restriktionsendonukleasen in Fragmente unterschiedlicher Längen verdaut. Die Auftrennung erfolgt elektrophoretisch und anschließend werden diese auf Nylon oder Nitrocellulosemembranen geblottet. Die immobilisierten Fragmente werden mit markierten Sonden hybridisiert. Mit Hilfe des Hybridisierungsmusters kann auf die Zugehörigkeit zu einer bestimmten Spezies geschlossen werden. Die verbreitetste Variante der RFLP ist das Ribotyping, bei dem für 23S-, 16S- und 5S-rRNA spezifische Sonden eingesetzt werden (Busch, 2010).

### 2.3.1.3 Gelelektrophorese

In einem elektrischen Feld wandern geladene Substanzen zu jedem Pol, der ihrer Ladung entgegengesetzt ist. Die Ladung lässt sich durch die Umgebungsbedingungen definieren. Die Ladungsstärke, die Konformation (linear, ringförmig mit Einzelstrangbruch, superhelikal) der ladungstragenden Moleküle und die molekularen Eigenschaften des Elektrophoresesystems (z.B.: Porenweite des Trägermaterials) legen die Wanderungsgeschwindigkeit fest. Die Elektrophorese wird in einem geeigneten Puffersystem das zur Stabilisierung, aber auch zur Festlegung des Trennbereichs der Moleküle dient, durchgeführt. Polyacrylamide unterschiedlicher Konzentration (ca. 3 bis 20%) und unterschiedlichen Vernetzungsgrades werden vor allem als Trägermaterialien für kürzere DNA-Fragmente, aber auch RNA, herangezogen. Die Fraktionierung erfolgt nach Größe und Ladung. Agarosegele (0,8 bis 4%) werden für DNA und RNA-Trennungen gebraucht (Chmiel, 2011). Agarose ist ein Polysaccharid, das aus roten Meeresalgen gewonnen wird und deren Gele eine Porengröße von 150 nm (1% (w/v) Agarose) bis 500 nm (0,16% (w/v) Agarose) haben. DNA-Fragmente der Größe 0,1-60 kb können durch die Variation der Agarosekonzentration aufgetrennt werden. Die Agarose wird durch Aufkochen in Pufferlösungen oder in Wasser aufgeschmolzen und geliert beim Abkühlen. Hierbei bilden sich Doppelhelices aus, die sich in Gruppen parallel zu Fäden zusammenlagern (Jansohn & Rothhämel, 2012). Das elektrische Feld wird zwischen zwei Elektroden produziert und je nach Anwendungsbereich werden geringe (15-150 V) oder auch sehr hohe Spannungen (2000 V) angelegt um eine Trennung von Makromolekülen zu erzielen. Die Dicke des Trägermaterials kann, je nach Anwendung, zwischen 0,1 mm und etwa 6-8 mm variieren. Die DNA wird in Taschen des Agarosegels geladen. Aufgrund der negativen Ladung der DNA wandern die Fragmente zur Anode (Graw, 2006). Zur Detektion von aufgetrennten DNA- und RNA-Proben wird am öftesten die Ethidiumbromidfärbung verwendet. Zwischen den Basen der Nukleinsäuren interkaliert das Ethidiumbromid und nach Anregung mit UV-Licht (254, 302 oder 366 nm) erscheint der Ethidiumbromid/Nukleinsäure-Komplex im sichtbaren Bereich (500-590 nm) als leuchtende Bande. Somit kann in Agarose-Gelsystemen je nach DNA-Fragmentgröße mindestens eine Menge von 2-5 ng DNA angezeigt werden. Zu Einzelstrang-Nucleotiden ist die Affinität von Ethidiumbromid drastisch geringer (Jansohn & Rothhämel, 2012).

### 2.3.1.4 BioNumerics

Die BioNumerics ist eine Software-Plattform, die eine integrierte Analyse von allen wichtigen Anwendungen in der Bioinformatik bietet: 1D Gel-Elektrophorese, alle Arten von chromatog-

raphischen und spektrometrischen Profilen, Phänotyp, Microarrays und Sequenzen. BioNumerics ist in der Lage, Informationen aus verschiedenen genomischen und phänotypischen Quellen zu einer globalen Datenbank zu verbinden. Daraus lassen sich schlüssige Analysen durchführen. BioNumerics läuft auf Datenbank-Engines wie Oracle und Microsoft SQL Server (Applied Maths NV, 2015).

## 2.3.2 Molekulare Methoden zur Antibiotikaresistenz-Bestimmung

### 2.3.2.1 DNA-Microarray

Ursprünglich ermöglichte die Microarray-Technik die Erforschung der Genexpression von vielen Genen innerhalb kürzester Zeit. Das Prinzip ist es, dass ein festes Trägermaterial mit tausenden, unterschiedlichen und einzigartigen Sequenzen beschichtet ist und diese "Sonden" mit Zielmolekülen in der Probe hybridisieren (Clark & Pazdernik, 2009). Mittels Microarray können DNA- oder RNA-Stränge spezifisch erkannt werden. Ist die Sequenz des zu analysierenden RNA- oder DNA-Fragments der Probe komplementär, kann sie aufgrund der Watson-Crick-Basenpaarung selektiv hybridisieren (Jansohn & Rothhämel, 2012).

DNA-Microarrays bestehen aus einer festen Oberfläche, wie z.B. aus Glas, einer Nylonmembran, einem Silikon Chip oder anderen dreidimensionalen Strukturen. Eine große Sammlung an Fragmentsonden wird auf diese feste Oberfläche aufgebracht (Fluit et al., 2001). Das Prinzip ist in Abbildung 12 ersichtlich. Die DNA des zu untersuchenden Stammes wird isoliert und anschließend mittels PCR mit unspezifischen Primern vervielfältigt. Dabei erfolgt gleichzeitig eine Markierung durch den Einbau von Biotin-16-dUTP. Die PCR-Produkte werden auf den Microarray aufgebracht. Dabei hybridisieren DNA-Fragmente mit den komplementären Fangsonden. Alle anderen DNA-Fragmente werden ausgewaschen. Die Detektion der vorhandenen Resistenzgene erfolgt durch einen Biotin-Streptavidin Komplex und einer anschließenden Färbereaktion (Perreten et al., 2005).

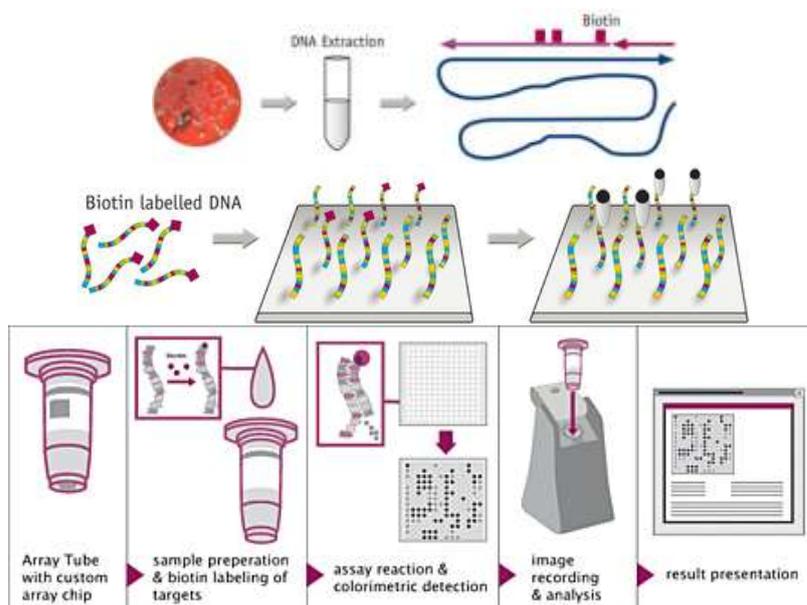


Abbildung 12: Prinzip Microarray (Alere Technologies GmbH, 2015)

## 2.4 Phänotypische Testmethoden

### 2.4.1 Phänotypische Testmethoden zur Bestimmung der Antibiotikaresistenz

#### 2.4.1.1 Agardiffusionstest

Zur Messung der antimikrobiellen Aktivität von Antibiotika kann die Plättchendiffusionstechnik (Agardiffusionstest) herangezogen werden. Dabei wird eine Petrischale mit einem geeigneten Nährmedium mit dem Testorganismus beimpft. Anschließend wird ein Filterpapierplättchen mit dem zu testendem Wirkstoff auf die Oberfläche des Nährmediums gelegt. Je weiter die chemische Substanz vom Papierfilter diffundiert, desto geringer ist die Konzentration. Der Teststamm wächst so lange bis er vom Antibiotikum gehemmt wird. Dadurch entsteht ein Hemmhof, in dem kein Wachstum auftritt. Der Durchmesser der Hemmzone ist proportional zur Menge des antimikrobiellen Wirkstoffs, der dem Filterplättchen zugefügt wurde und hängt von der Löslichkeit, dem Diffusionskoeffizienten und der Wirksamkeit ab. Um Pathogene auf ihre Antibiotikaempfindlichkeit zu überprüfen, werden der Agardiffusionstest oder andere wachstumsabhängige Methoden verwendet (Madigan et al., 2013).

Gebräuchliche Methoden der phänotypischen Antibiotikaresistenz-Untersuchung sind der Agardiffusionstest, der E-Test (Epsilon-Test), der Mikro- und Makrodilutionstest und der Agardilutionstest.

#### 2.4.1.2 Dilutionstest

Beim Mikrodilutionstest wird eine festgesetzte Menge an Bakterien in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen des betreffenden Wirkstoffs inkubiert. Als minimale Hemmstoffkonzentration wird die niedrigste Wirkstoffkonzentration bezeichnet, bei welcher, wie in Abbildung 13 ersichtlich ist, kein sichtbares Wachstum der Bakterien erkennbar ist. Reihenverdünnungstests können unter Verwendung flüssiger Medien in Röhrchen (Makrodilution) und Mikrotiterplatten (Mikrodilution), sowie mittels fester Medien als Agardilution durchgeführt werden (Kronthaler, 2009).

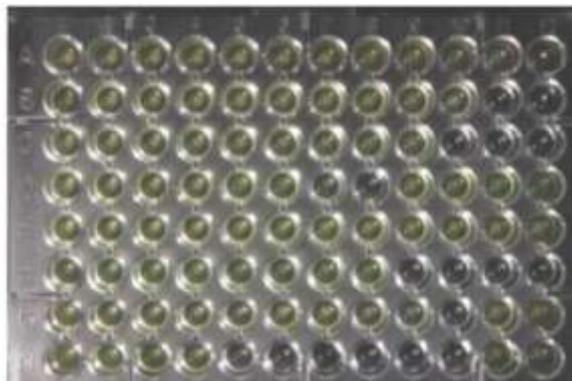


Abbildung 13: Mikrotiterplatte mit *Pseudomonas aeruginosa*

### 2.4.1.3 E-Test

Der E-Test ist eine Kombination aus Agardiffusionstest und MHK (Minimale Hemmstoffkonzentration)-Bestimmung. Die Wirkstoffträger aus Kunststoffstreifen enthalten einen Wirkstoffgradienten. Wie beim Agardiffusionstest wird der Streifen auf eine beimpfte Agarplatte aufgelegt. Der Hemmhof bei sensiblen Keimen kann am Schnittpunkt des ellipsoiden Hemmhofes mit dem Teststreifen anhand der aufgedruckten Skala der MHK-Wert abgelesen werden (Kronthaler, 2009).

## 2.4.2 Bioscreen C: Wachstumstest zur Bestimmung des Fitness- und Resistenzverhaltens

Man versteht unter der Fitness von Bakterien die komplexe Eigenschaft eines Genotyps sich innerhalb eines Wirtes zu vermehren, zu verbreiten und sich gegen die Abwehrmechanismen des Wirtes zu verteidigen. Die Erwerbung von Antibiotikaresistenzen kann mit einem physiologischen Aufwand für das Bakterium verbunden sein. Die Antibiotikaresistenz in einer Bakterienvolkkultur ist in Gegenwart von Antibiotika auf die Auswahl von widerstandsfähigen Mutanten zurückzuführen. Die Bestimmung der Generationszeit und der Wachstumsrate wird oft verwendet um den Zusammenhang zwischen Antibiotikaresistenz und Fitness zu messen (Pope et al., 2010).

Die durch Resistenzelemente (zum Beispiel Transposone) erworbene Antibiotikaresistenz wurde noch nicht intensiv untersucht, wobei Enne et al. 2005 feststellten, dass sich die erhaltene Resistenz auch positiv auf die Fitness des Bakteriums auswirken kann.

Bioscreen C ist ein System, das zur Automatisierung von Routinearbeiten in der Mikrobiologie entwickelt worden ist. Es verwendet ein einzigartiges Mikrotiterplattenformat (10x10 Wells), das sogenannte "Honeycomb" Format, das für die hochgenaue Temperaturregelung besonders gut geeignet ist. Zusätzlich verfügt es über zwei überdachte Wabenplatten, die es ermöglichen bis zu 200 Proben gleichzeitig laufen zu lassen. Bioscreen C MBR ist ein computergesteuerter Inkubator und Shaker, sowie ein Photometer das mit 8 Filtern ausgestattet ist. Der Breitbandfilter deckt einen Bereich von 405 nm bis 600 nm ab. Die Testlänge kann von einer einzigen Messung bis zu einem Jahr eingestellt werden. Das Inkubator System verfügt über eine Temperaturregelung zur Beibehaltung der eingestellten Temperatur mit einer Genauigkeit von 0,1 Grad Celsius. Dabei wird gleichzeitig die Bildung von Kondenswasser auf der Innenseite des Mikroplatte-Deckels vermieden. Der Arbeitsbereich liegt zwischen 1 und 60 Grad in Schritten von 0,1 Grad Celsius. Mit Hilfe einer Software lassen sich die OD-Werte exportieren (Oy Growth Curves Ab Ltd, 2015).

### 2.4.2.1 Wachstumskurve

Bei Wachstumskurven (Abbildung 13) wird die Zellmassekonzentration mittel OD (Optische Dichte) gemessen. Das Wachstum durchläuft mehrere typische Phasen, die allerdings nicht alle vom Mono-Modell beschrieben werden können. Zuerst beginnt die Adaptions- oder "lag"-Phase, in welcher kaum oder sogar "negatives" Wachstum zu beobachten ist. Danach tritt die

exponentielle Wachstumsphase ein, bei der die Zellmasse, durch ein sehr rasches Wachstum, exponentiell zunimmt. In einem geschlossenen System können sich die Zellen aufgrund von limitierten essenziellen Medienkomponenten nicht unendlich vermehren, darum kommt es nach einer kurzen Übergangsphase zur stationären Phase. Die maximale Zellkonzentration wird zu dieser Zeit erreicht und danach folgt eine Absterbephase, bei der die lebende Zellmasse geringer wird (Chmiel, 2011).

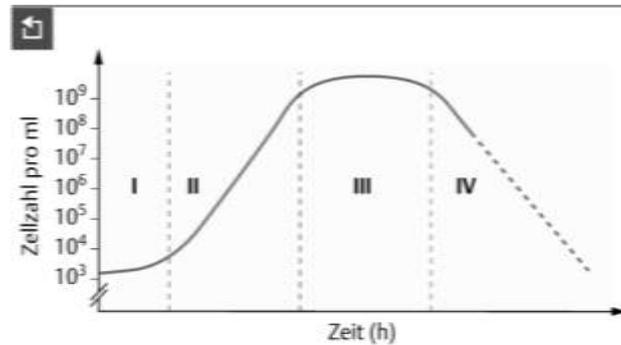


Abb. 10.11 Wachstumsphasen einer Bakterienkultur.

**I** Lag-Phase = Verzögerungsphase = Anwachsphase; Ursache: schlechter Zellzustand aus der letzten Züchtung.

**II** Log-Phase = **logarithmische Wachstumsphase**, gleichmäßige Zellverdopplung

**III** stationäre Phase = Reduktion des Bakterienwachstums bis zum Einstellen jeder Vermehrung; Ursache: Nahrungsmangel, Toxine, Erschöpfung der Sauerstoff-Versorgung.

**IV** Sterbephase = Zelltod; Ursache: Sterilisation, extremer Sauerstoff-Mangel; diese Phase ist nicht bei allen Bakterien obligat.

Abbildung 14: Wachstumskurve (Hirsch-Kauffmann, et al., 2009)

### 3 Material und Methoden

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Methoden und dafür benötigten Materialien werden in diesem Kapitel beschrieben. Zur Untersuchung des phäno- und genotypischen Verhaltens gegenüber Antibiotika wurden alle Isolate mit dem Agardiffusionstest nach CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)/EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) untersucht. Ausgewählte Isolate wurden anschließend mittels Microarray getestet. Um geeignete *E. coli*-Isolate für den Microarray auswählen zu können, sind die Proben mit Hilfe einer rep-PCR typisiert und mit den Resistenzprofilen kombiniert ausgewertet worden. Weiters wurden Vorversuche mit dem Bioscreen durchgeführt, um für eine weiterführende Masterarbeit, geeignete Nährmedien zu suchen.

Alle Methoden wurden nach der guten mikrobiologischen Praxis durchgeführt. Dies wird nachfolgend nicht mehr explizit erwähnt. Das bedeutet, dass Pinzetten und Spatel aus Metall vor dem Arbeiten mit 70%igen Ethanol abgeflammt wurden und dass sterile Einweggebinde oder autoklavierte Gefäße verwendet wurden. Die Arbeitsschritte erfolgten in der Laminar-Flow-Werkbank oder in unmittelbarer Umgebung der Bunsenbrennerflamme, wobei die Arbeitsfläche desinfiziert wurde.

#### 3.1 Agardiffusionstest

##### 3.1.1 Verwendete Chemikalien, Nährmedien, Geräte und Materialien

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und Nährmedien - Agardiffusionstest

Chemikalie	Artikelnummer	Hersteller
Natriumchlorid	3957.1	Carl Roth
Müller-Hinton-Agar	CM0337	Oxoid
Antibiotika-Testplättchen:		
Ampicillin (10 µg)	CT0003B	Oxoid
Cefotaxim (5 µg)	CT0407B	Oxoid
Cefotaxim (30 µg)	CT0166B	Oxoid
Ceftiofur (30 µg)	CT1751B	Oxoid
Meropenem (10 µg)	CT0774B	Oxoid
Ciprofloxacin (5 µg)	CT0425B	Oxoid
Enrofloxacin (5 µg)	CT0639B	Oxoid

Tetracyclin (3 µg)	CT0053B	Oxoid
Streptomycin (10 µg)	CT0047B	Oxoid
Sulfonamid (300 µg)	CT0059B	Oxoid

### 3.1.1.1 Herstellung der Nährmedien und Lösungen

Natriumchlorid (NaCl)-Lösung 0,85%ig:

Für 1000 ml der Natriumchloridlösung wurden 8,5 g NaCl in eine sterile Schraubflasche eingewogen und in 1000 ml deionisiertem Wasser gelöst. Die Lösung wurde bei 121°C für 15 Minuten autoklaviert und danach bei 5°C gelagert.

Müller-Hinton-Agar:

Für 1000 ml Nährmedium wurden 38,0 g Müller-Hinton-Agar in eine sterile Schraubflasche eingewogen und in 1000 ml deionisiertem Wasser gelöst. Der Agar wurde in der Mikrowelle aufgeschmolzen und für 15 Minuten bei 121°C autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurde das Nährmedium bei 50°C in einem Wasserbad temperiert. Je 24 ± 0,2 g des Nährmediums wurden in Petrischalen gegossen. Die Petrischalen wurden bei 5°C gelagert.

**Tabelle 2: Verwendete Geräte und Materialien - Agardiffusionstest**

Gerät	Beschreibung	Hersteller
Andruckdispenser	8 Plättchen	Oxoid
Serologische Pipetten	5 ml; 2 ml; 1 ml	Eppendorf
Pipettierhelfer macro	0,1-200 ml	Carl Roth
Photometer Spectronic	Genesys 10 Bio	Bartelt Labor- & Datentechnik
Brutschrank	35°C	WTC Binder
Labormischer	Genie 1 Touch Mixer	Vortex Scientific Ind.
Stieltupfer	steril	Lohmann&Rauscher
Petrischalen	steril	Sarstedt
Schraubflasche	1000 ml	Carl Roth
Tischautoklav	CetroClav Multicontrol	CertoClav

### 3.1.2 Durchführung

Aus einem bei -78°C eingefrorenem Isolat wurde Biomasse entnommen und ein fraktionierter Ausstrich auf Müller-Hinton-Agar hergestellt. Die Inkubation erfolgte aerob für 24 h bei 35°C. Danach wurden ein paar einzelne Kolonien mit einem angefeuchteten sterilen Stieltupfer aufgenommen und in 5 ml einer 0,85%ige NaCl-Lösung suspendiert und mit einem Labormischer

gemischt. Anschließend wurde die Bakteriensuspension auf eine optische Dichte (OD) bei 625 nm zwischen 0,08 und 0,1 eingestellt. Diese Dichte entspricht dem Mc Farland Standard 0,5. Dann wurde diese Bakteriensuspension mit einem sterilem Stieltupfer auf eine Müller-Hinton-Agar-Platte ( $24 \pm 0,2$  g) von einer Seite ausgehend flächendeckend ausgestrichen. Dies erfolgte weitere zweimal, wobei die Platte jedes Mal um  $120^\circ$  gedreht wurde. Nun wurde 15 Minuten gewartet um die Antibiotikaplättchen mit Hilfe eines Andruckdispensers aufzutragen. Nach 18 h Inkubation bei  $35^\circ\text{C}$  wurden die Durchmesser der Hemmhöfe ausgewertet. Zur Methodenprüfung wurde zusätzlich immer der Kontrollstamm Ec4 (LMG 8223/ATCC 25922) mit getestet und mit den Sollwerten verglichen. Anhand der Hemmhofdurchmesser wurden die Isolate mit Hilfe der Breakpoints von CLSI und EUCAST in die Kategorien resistent, sensibel und intermediär eingeteilt.

## 3.2 Vorbereitung für molekularbiologische Untersuchungen

### 3.2.1 Verwendete Chemikalien, Nährmedien, Geräte und Materialien

**Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Nährmedien - Vorbereitung Molekularbiologie**

Chemikalie	Artikelnummer	Hersteller
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	A3145	AppliChem
Natriumchlorid	27800.291	VWR
Plate-Count-Agar	1.05463.0500	Merck
Brain-Heart-Infusion-Bouillon (BHI-Bouillon)	CM1136	Oxoid

#### 3.2.1.1 Herstellung der Nährmedien und Lösungen

50 mM EDTA-Lösung:

Für 1000 ml der 50 mM EDTA-Lösung wurden 14,612 g EDTA in eine sterile Schraubflasche eingewogen und mit 1000 ml deionisiertem Wasser gelöst. Die Lösung wurde bei  $121^\circ\text{C}$  für 15 Minuten autoklaviert und danach bei  $5^\circ\text{C}$  gelagert.

0,9%ige NaCl-Lösung:

Für 1000 ml der Natriumchloridlösung wurden 9 g NaCl in eine sterile Schraubflasche eingewogen und mit 1000 ml deionisiertem Wasser gelöst. Die Lösung wurde bei  $121^\circ\text{C}$  für 15 Minuten autoklaviert und danach bei  $5^\circ\text{C}$  gelagert.

Plate-Count-Agar:

Für 1000 ml Nährmedium wurden 17,5 g Plate-Count-Agar in eine sterile Schraubflasche eingewogen und mit 1000 ml deionisiertem Wasser gelöst. Der Agar wurde in der Mikrowelle aufgeschmolzen und für 15 Minuten bei  $121^\circ\text{C}$  autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurde das

Nährmedium bei 50°C in einem Wasserbad temperiert. Das Nährmedium wurde danach in Petrischalen gegossen. Die Petrischalen wurden bei 5°C gelagert.

BHI-Bouillon:

Für 450 ml Nährmedium wurden 16,65 g BHI-Bouillon in eine sterile Schraubflasche (500 ml) eingewogen und mit 450 ml deionisiertem Wasser gelöst. Danach wurde das Nährmedium portioniert. Dafür wurden je 5 ml in Reaktionsgefäße pipettiert. Die Reaktionsgefäße mit BHI-Bouillon wurden mit einem Verschluss abgedeckt und für 15 Minuten bei 121°C autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurden die Reaktionsgefäße bei 5°C gelagert.

**Tabelle 4: Verwendete Geräte und Materialien - Vorbereitung Molekularbiologie**

Gerät	Beschreibung	Hersteller
Einmal-Impföse	steril	Carl Roth
Serologische Pipetten	5 ml; 2 ml; 1 ml	Carl Roth
Reaktionsglas	14 ml	Carl Roth
Flaschendosierer	10 ml, Dispensette	Brand
Labocap-Verschluss	-	Carl Roth
Brutschrank	37°C	WTC Binder
Labormischer	Genie 1 Touch Mixer	Vortex Scientific
Laminarflow-Werkbank	HS-P 12/2	Heraeus Instruments
Petrischale	steril	Sarstedt
Eppendorf Tubes	2 ml	Eppendorf
Zentrifuge	5804 R	Eppendorf
Schraubflasche	1000 ml	Carl Roth
Tischautoklav	CetroClav Multicontrol	CertoClav

### 3.2.2 Durchführung

Aus einem bei -78°C eingefrorenen Isolat wurde mit einer sterilen Impföse etwas Biomasse entnommen und auf einer Plate-Count-Agar-Platte ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte über Nacht aerob bei 37°C. Danach wurde eine einzelne Kolonie mit einer sterilen Impföse aufgenommen, in 5 ml BHI-Bouillon suspendiert und gevortext. Die Inkubation erfolgte über Nacht aerob bei 37°C. Für die Biomassegewinnung wurde die Bouillon gevortext und mit einer serologischen Pipette 2 ml in ein 2 ml Eppendorf Tube pipettiert. Nun wurde die Biomasse bei 8000 rpm für 6 Minuten bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit

900 µl 0,9 %iger NaCl-Lösung resuspendiert. Jetzt wurde erneut bei 8000 rpm für 6 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der klare Überstand wurde wieder verworfen und das Pellet in 900 µl 50 mM EDTA-Lösung resuspendiert, gevortext und bei 8000 rpm für 6 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die letzten Tropfen abpipettiert. Das Pellet wurde nun bei -25°C eingefroren.

### 3.3 DNA-Isolation

#### 3.3.1 Verwendete Chemikalien, Nährmedien, Geräte und Materialien

Tabelle 5: Verwendete Chemikalien - DNA-Isolation

Chemikalie	Artikelnummer	Hersteller
TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	A4577	Serva Elektrophoresis
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	A3145	AppliChem
ArchivePure DNA Yeast&Gram+ Kit	2301210	5Prime
Isopropanol 100%	AE73.1	Carl Roth
Ethanol 100%	5054.4	Carl Roth

##### 3.3.1.1 Herstellung der Nährmedien und Lösungen

500 mM EDTA-Lösung:

Für 1000 ml der 500 mM EDTA-Lösung wurden 146,24 g EDTA in eine sterile Schraubflasche eingewogen und mit 1000 ml deionisiertem Wasser gelöst. Die Lösung wurde bei 121°C für 15 Minuten autoklaviert und danach bei 5°C gelagert.

TE (TRIS-EDTA)-Puffer:

1 ml 1 M TRIS-HCl pH 8,0 wurden 0,2 ml 500 mM EDTA zugefügt und mit deionisiertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Diese Lösung wurde bei 121°C für 15 Minuten autoklaviert.

70%iger Ethanol:

Für 100 ml 70%igen Ethanol wurden 70 ml 100%iger Ethanol mit 30 ml sterilem Wasser gemischt.

Tabelle 6: Verwendete Geräte und Materialien - DNA-Isolation

Gerät	Beschreibung	Hersteller
Eppendorf-Tube	1,5 ml, Safelock	Eppendorf
Thermo-Shaker	TS-100	Biosan

Reaktionsglas	14 ml	Carl Roth
Labocap-Verschluss	-	Carl Roth
Heizblock	QBD4, 37°C, 80°C	Grant
Labormischer	Genie 1 Touch Mixer	Vortex Scientific
Pipettenspitzen	2 µl; 100 µl; 1000 µl	Biozym Scientific
Kolbenhubpipette	20 µl; 100 µl; 1000 µl	Gilson
Zentrifuge	5417 R	Eppendorf

### 3.3.2 Durchführung

#### 3.3.2.1 DNA-Isolation mittels Hitzeaufschluss

Als Kurzmethode diente die Isolierung der DNA mittels Hitzeaufschluss. Dafür wurde das eingefrorene Zellpellet bei 4°C aufgetaut in 200 µl TE-Puffer (pH 8,0) gelöst und gevortext. Danach wurde das Eppendorf Tube für 10 Minuten bei 95°C in den Heizblock gestellt. Das Pellet wurde 20 Sekunden lang bei 5000 rpm abzentrifugiert. Der entnommene Überstand wurde bei -25°C eingefroren.

#### 3.3.2.2 DNA Isolation mittels ArchivePure DNA Yeast&Gram+ Kit

Um DNA mit einer höheren Reinheit als beim Hitzeaufschluss zu gewinnen, wurde der ArchivePure DNA Yeast&Gram+ Kit verwendet. Das eingefrorene Zellpellet wurde aufgetaut und mit 300 µl Cell Lysis Solution auf und ab pipettiert um es erneut zu suspendieren. Danach wurde das gelöste Zellpellet für 5 Minuten in den Heizblock bei 80°C gestellt. Nach Zugabe von 1,5 µl RNase A Solution und 25-maligen Wenden der Eppendorf Tubes erfolgte eine Inkubation bei 37°C für 30 Minuten. Zur Abkühlung wurden die Eppendorf Tubes in ein eingefrorenes Rack gestellt und für eine Minute in den Kühlschrank bei 5°C gegeben. Anschließend wurden 100 µl Protein Precipitation Solution dazu pipettiert und für 20 Sekunden auf höchster Stufe gevortext. Das Protein wurde bei 12000 rpm für drei Minuten abzentrifugiert. Der Überstand, der die DNA enthält, wurde in ein 1,5 ml Eppendorf Tube, das bereits 300 µl 100%igen Isopropanol enthielt, überführt. Nach einem 50-maligen Wenden der Eppendorf Tubes wurde die DNA bei 12000 rpm für eine Minute abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Eppendorf Tube auf einem sauberen Papierhandtuch trocken geklopft. Nun wurde das weiße DNA Pellet mit 300 µl 70%igen Ethanol gewaschen. Dies erfolgte durch ein 5-maliges Wenden der Eppendorf Tubes und ein erneutes Zentrifugieren bei 12000 rpm für eine Minute. Der ethanolhaltige Überstand wurde verworfen und abpipettiert. Danach wurde das Eppendorf Tube für 15 Minuten offen in der Lamina stehen gelassen damit der Ethanol vollständig verdampfen kann. Nach Zugabe von 50 µl DNA Hydration Solution wurden die Eppendorf Tubes in den Thermo-Shaker bei 65°C und 350 rpm für eine Stunde gegeben und danach über Nacht bei Raumtemperatur bei 350 rpm geschüttelt. Nun wurde die DNA bei -25°C eingefroren.

### 3.4 DNA-Konzentration-Messung

#### 3.4.1 Verwendete Chemikalien, Nährmedien, Geräte und Materialien

Tabelle 7: Verwendete Chemikalien - DNA-Konzentration-Messung

Chemikalie	Artikelnummer	Hersteller
Qubit dsDNA Assay Kit	Q32851	Life Technologies

Tabelle 8 Verwendete Geräte und Materialien - DNA-Konzentration-Messung

Gerät	Beschreibung	Hersteller
Labormischer	Genie 1 Touch Mixer	Vortex Scientific
Qubit 2.0 Fluorometer	Q32867	Life Technologies
Pipettenspitzen	1,5 µl; 2 µl	Eppendorf
Kolbenhubpipette	20 µl; 2 µl	Gilson
Eppendorf-Tube	1,5 ml; 0,2 ml	Eppendorf

#### 3.4.2 Durchführung

Zuerst wurden entsprechend der Probenanzahl je 199 µl Qubit Buffer und 1 µl Qubit Reagent in ein 1,5 ml Eppendorf Tube pipettiert und gevortext. Dann wurden jeweils 190 µl dieser Lösung für die beiden Standards, die die Kalibrationsgerade ergeben, in ein 0,2 ml Eppendorf Tube vorgelegt. Dasselbe wurde für die Proben mit je 199 µl durchgeführt. Danach wurden für die Standards 10 µl Standard 1 in das erste Eppendorf Tube und 10 µl Standard 2 in das zweite Eppendorf Tubes pipettiert. Für die Proben wurde 1 µl der DNA-Lösung in je ein Eppendorf Tube pipettiert. Nach dem Vortexen und einer 2-minütigen Inkubationsphase erfolgte die Messung der DNA-Konzentration mittels Qubit 2.0 Fluorometer. Vor der Messung wurde das Gerät zuerst mit den beiden Standards kalibriert und für die Konzentrationsmessung der Punkt "dsDNA High Sensitivity" im Menü ausgewählt. Das Ergebnis der Konzentration der DNA in der Messlösung wurde in die ursprüngliche DNA-Lösung umgerechnet.

## 3.5 PCR

### 3.5.1 Verwendete Chemikalien, Nährmedien, Geräte und Materialien

Tabelle 9: Verwendete Primer - PCR

Primer	Sequenz	PCR	erstmals verwendet	Konzentration
RAPD 4	GTTTCGCTCC	RAPD	Al-Janabi et al., (1993)	10 pmol/μl
Torriani	CCGCAGCCAA	RAPD	Ursi et al., (1994)	10 pmol/μl
RAPD13	GCGATCCCCA	RAPD	Kersulyte et al., (1992)	25 pmol/μl
ERIC1R	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC	rep	Versalovic et al., (1991)	50 pmol/μl
ERIC2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG			50 pmol/μl
(GTG)5	GTGGTGGTGGTGGTG	rep	Meyer et al., (1993)	50 pmol/μl
REP1R-I	IIICGICGICATCIGGC	rep	Malathum et al., (1998)	50 pmol/μl
Rep2-I	ICGICTTATCIGGCCTAC			50 pmol/μl
BOXA1R	CTACGGCAAGGCGACGCTGACG	rep	Koeuth et al., (1995)	50 pmol/μl

Tabelle 10: Verwendete Chemikalien - PCR

Chemikalie	Artikelnummer	Hersteller
10 x PCR Puffer 15 mM MgCl <sub>2</sub>	11 146 173 001	Roche
dNTP-Mix 10 mM	28-4065-51	GE Healthcare
DynaZyme II DNA Polymerase 2U/μl	F-501S	Thermo Scientific

#### 3.5.1.1 Herstellung der Nährmedien und Lösungen

Mastermix für 40 Ansätze:

In einem 1,5 ml Eppendorf Tube wurden 740 μl steriles UHQ-Wasser vorgelegt und 100 μl 10xPCR-Puffer mit 15 mM MgCl<sub>2</sub> zugefügt. Danach wurden 20 μl dNTP-Mix (10 mM, von Laborant hergestellt) und 20 μl DynaZyme (2U/μl) dazu pipettiert. Diese Lösung wurde gevortext und bei -20°C gelagert.

Tabelle 11: Verwendete Geräte und Materialien - PCR

Gerät	Beschreibung	Hersteller
Eppendorf-Tube	1,5 ml	Eppendorf

Mastercycler	egradient S	Eppendorf
PCR-Werkbank	captair bio	Erlab
PCR-Tubes-Streifen	0,2ml; PCR clean	Eppendorf
Mini-Zentrifuge	Aufsatz für 2 Streifen 8er-PCR-Tubes	Carl Roth
Kolbenhubpipette	1,5 µl; 10 µl; 100 µl; 1000 µl	Gilson
Pipettenspitzen	10 µl; 200 µl, 1000 µl	Biozym Scientific
Labormischer	Genie 1 Touch Mixer	Vortex Scientific
Kühlblock (PCR-Cooler)	für 200 µl und 500 µl-PCR-Gefäße; 96 Well-PCR-Platten	Eppendorf
Reaktionsgefäß	30 ml	Thermo Scientific

### 3.5.2 Durchführung

Zuerst wurden die DNA, der Mastermix und der Primer ca. 15 Minuten lang im Kühlschrank bei 5°C aufgetaut und die Eppendorf Tubes außerhalb des Kühlschranks im Kühlblock beschriftet. Für den PCR-Ansatz wurde zuerst ein Prämix hergestellt. Der Prämix für je eine Probe besteht aus 22 µl aufgetautem und bei 5°C gekühltem Mastermix, 1 µl Primer (verwendete Konzentrationen siehe Tabelle 9) und 1 µl UHQ Wasser. Bei zwei verwendeten Primern, wurde auf 1 µl UHQ Wasser verzichtet. Das Endvolumen des Prämix sind somit 24 µl. Der Probenanzahl entsprechend wurde der Prämix berechnet. Vor dem Herstellen des Prämixes wurden die Primer und der Mastermix noch kurz gevortext und abzentrifugiert. Der Prämix wurde dann zu je 24 µl auf die PCR-Tubes aufgeteilt. Danach erfolgte die Zugabe von je 1 µl DNA oder UHQ Wasser für die Negativkontrolle. Das ergab ein PCR-Ansatz-Endvolumen von 25 µl für jede Probe. Alle Proben wurden nochmals kurz gevortext und zentrifugiert. Danach wurden die Eppendorf-Tubes im Thermocycler platziert und das Programm gestartet. In den nachfolgenden Tabellen sind die PCR-Programme zu entnehmen. Bei dem Primersystem (GTG)5 wurden 30 und 25 Zyklen getestet.

**Tabelle 12: PCR-Programm - RAPD-PCR (RAPD4, RAPD13, Torriani)**

Temperatur [°C]	Zeit [Minuten]	Zyklen
95	5	
95	1	45 x
36	1	
72	1	
72	8	
4	∞	

**Tabelle 13: PCR-Programm - ERIC1R + ERIC2; BOXA1R**

Temperatur [°C]	Zeit [Minuten]	Zyklen
95	7	
90	0,5	30 x
52	1	
65	8	
65	16	
4	∞	

**Tabelle 14: PCR-Programm - REP-1R + REP-2I**

Temperatur [°C]	Zeit [Minuten]	Zyklen
95	7	
90	0,5	30 x
40	1	
65	8	
65	16	
4	∞	

**Tabelle 15: PCR-Programm - (GTG)5**

Temperatur [°C]	Zeit [Minuten]	Zyklen
95	7	
90	0,5	30/25 x
40	1	
65	8	
65	16	
4	∞	

## 3.6 Agarose-Gelelektrophorese

### 3.6.1 Verwendete Chemikalien, Nährmedien, Geräte und Materialien

Tabelle 16: Verwendete Chemikalien - Agarose-Gelelektrophorese

Chemikalie	Artikelnummer	Hersteller
TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	A4577	Serva Elektrophoresis
Eisessig	37384	Serva Elektrophoresis
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	A3145	AppliChem
Agarose	840004	Biozym Scientific
Bromphenolblau	A4968	AppliChem
Xylenecyanol	A4976	AppliChem
Ficoll Type 400	A22252	AppliChem
Ethidiumbromid	2218.2	Carl Roth
100 bp DNA-Leiter, extended	T835.1	Carl Roth

#### 3.6.1.1 Herstellung der Nährmedien und Lösungen

TAE (TRIS-Acetat-EDTA)-Puffer 50x:

242 g TRIS wurden in 57,5 ml Eisessig gelöst und mit 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) gemischt. Diese Lösung wurde in einem Messkolben auf 1 l mit deionisiertem Wasser aufgefüllt. Diese Lösung wurde für 15 Minuten bei 121°C autoklaviert.

TAE-Puffer 0,75x:

15 ml 50x TAE-Puffer wurden auf 1000 ml mit sterilem Wasser verdünnt.

Gelladepuffer 6x:

0,025 g Bromphenolblau, 0,025 g Xylenecyanol und 1,5 g Ficoll Type 400 wurden eingewogen und in 9 ml sterilem UHQ Wasser gelöst. Diese Lösung wurde zur Quellung für 24 h stehen gelassen.

Tabelle 17: Verwendete Geräte und Materialien - Agarose-Gelelektrophorese

Gerät	Beschreibung	Hersteller
Labormischer	Genie 1 Touch Mixer	Vortex Scientific
Wasserbad	WAM 6/15, 50°C	Unitherm

Mini-Zentrifuge	Aufsatz für 2 Streifen 8er-PCR-Tubes	Carl Roth
Kolbenhubpipette	20 µl, 2 µl	Gilson
Pipettenspitzen	1,5 µl, 2 µl	Eppendorf
Mikrowelle	800 Watt	Panasonic
Gelgießform mit Kamm	15x10 cm, 26 Slots	Biozym
Kühl-Wasserbad	F12, 18°C	Julabo
Elektrophorese-Kammer mit Pumpensteuerung und Stromversorgungsgerät	SEA2000	Elchrom Scientific
Gel Doc XR+ System Molekular Imager		Bio-Rad
Kühlblock (PCR-Cooler)	für 200 µl/500 µl-PCR-Tubes und 96 Well-PCR-Platten	Eppendorf

### 3.6.2 Durchführung

Für ein großes 2%iges Gel wurden 1,4 g Agarose mit 70 ml 0,75x TAE-Puffer versetzt und in der Mikrowelle aufgeschmolzen. Der Flüssigkeitsverlust wurde mit deionisiertem Wasser ausgeglichen. Nun wurde die Flüssigkeit für 15 Minuten im 50°C Wasserbad abgekühlt. Anschließend wurde das Gel luftblasenfrei in eine, mit Klebestreifen abgedichtete, Gelgießform gegossen und der Kamm eingesetzt (26 Slots). Nach einer 30 minütigen Polymerisationszeit wurden der Kamm und die Klebestreifen entfernt und die Gelgießform mit dem Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Diese Kammer wurde zuvor mit ca. 1,9 l TAE-Puffer (0,75x) aufgefüllt und die Wasser-Kühlung (18°C) eingeschaltet. Vom Gelladepuffer wurden 1,5 µl mit 5 µl Probe auf einem Parafilm gemischt und anschließend 5 µl der Mischung in ein Slot geladen. Als Marker wurden 4 µl des 100 bp DNA-ladder, extended verwendet. Nach dem Laden der Proben wurde die Pumpe mit einer 4,5-minütigen Verzögerung eingeschaltet und die Elektrophorese mit den Bedingungen 80V, 2000 mA, 300 W und einer Laufzeit von 1 h 50 Minuten gestartet.

Für die Färbelösung wurden 350 ml steriles, deionisiertes Wasser mit 35 µl Ethidiumbromid gemischt. Das Gel wurde darin eingelegt und für 20 Minuten gefärbt. Danach wurde das Gel zum Entfärben für 10 Minuten in eine Wanne mit 350 ml TAE-Puffer (0,75 x; aus der Elektrophoresekammer) gelegt. Abschließend wurde das Gel fotografiert.

## 3.7 Auswertung der Ergebnisse mittels BioNumerics

### 3.7.1 Verwendete Geräte und Programme

Tabelle 18: Verwendete Geräte und Programme: Auswertung Agardiffusionstest und Fingerprint-

Daten		
Gerät/Programm	Version	Hersteller
BioNumerics	6.6	Applied Maths

### 3.7.2 Durchführung

Die Auswertung der Gele erfolgte mittels BioNumerics 6.6. Dafür wurde zuerst eine neue SQL-verknüpfte Datenbank erstellt. Nachdem die Informationen über die Proben hochgeladen wurden, wurde ein neues Experiment entsprechend dem Primersystem ERIC kreiert. Die TIFF-Dateien der Gele wurden hochgeladen, invertiert, ausgeschnitten und zur Datenbank hinzugefügt. Danach wurden die Fingerprint-Daten bearbeitet. Dafür wurde eine OD-Range von 255 pts für PCR-Agarosegele eingestellt. Nach dem Suchen der Spuren wurde noch deren Position manuell angepasst. Danach erfolgten das Bearbeiten mittels "Ton"-Kurve und eine anschließende Spektral-Analyse. Als "Wiener cutoff scale" wurde 0,213% und als "background scale" 10,228% ermittelt. Diese Werte wurden für alle anderen Gele verwendet. Als Spurbreite wurde 43 pts und 2 Knoten eingestellt. Für die Normalisierung wurde zuerst die Spur des 100 bp extended DNA-Markers definiert und als Referenz verwendet. Danach wurden die Banden des Markers markiert und überprüft. Nach der Normalisierung erfolgte die automatische Bandensuche. Als Einstellungen wurden "Min. profiling" 5%, "Grey Zone" 5%, "Min. Area" 0% und "Shoulder Sensitivity" 1% verwendet. Nach der Überprüfung und Nachbearbeitung der ausgewählten Banden wurde das Gel abgespeichert und die Gel-Spuren den in die Datenbank eingetragenen Isolaten zugewiesen.

Für die Auswertung wurde eine Cluster-Analyse durchgeführt. Dafür wurde eine neue "Comparison" erstellt und die "Dice"-Methode mit den Einstellungen "Optimization" 0,5% und "Tolerance" 1% verwendet. Die Ähnlichkeit und Plausibilität der Probenbanden im Vergleich zum Cluster wurden überprüft und korrigiert.

Nun wurden die Daten des Agardiffusionstest importiert. Dafür wurde zuerst das "Antibiotics susceptibility"-Plugin installiert. Danach wurde im Antibiotics-Menü ein neues Experiment hinzugefügt. Im Menü wurde dem Experiment ein Name gegeben, als Organismus *E. coli* festgelegt und der Punkt "Zone Diameter (Disk Diffusion method)" ausgewählt. Jetzt wurde eine Textdatei mit den Informationen der Breakpoints hochgeladen. Danach wurde das "antibiotics\_SIR"-Experiment geöffnet und das Farbspektrum verändert. Zu Beginn befand sich Grün für die Kategorie "Sensibel", in der Mitte Gelb für "Intermediär" und am rechten Ende Rot für "Resistent". Diese Einstellung wurde für alle Antibiotika übernommen. In diesem Menüfenster wurde unter dem Punkt "Mapping" der Name "N/A" gelöscht, sodass nur "S", "I" und "R" übrig

blieben. "S" hat einen "Range start" von 1 und ein "Range end" von 1. "I" hat einen "Range start" von 2 und ein "Range end" von 2. "R" hat einen "Range start" von 3 und ein "Range end" von 3. Anschließend wurde das Fenster geschlossen und im Antibiotics-Menü die Daten des Agardiffusionstests hochgeladen. Dies erfolgte wieder als Textdatei. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Reihenfolge, die Schreibweise der Antibiotika und die Reihenfolge der Zeichen ("<,> und =") in den beiden Textdateien (Agardiffusionstestergebnis-Datei und Breakpoints-Datei) übereinstimmen. Beim Importieren wurde der "Key" als "Text field" und die Antibiotika als "Character value" mit der Assoziation zur Breakpoint-Datei festgelegt. Durch das Hochladen der Ergebnisse des Agardiffusionstests wurden diese Daten mit den Breakpoints miteinander verknüpft. Dies war im "Experiment card"-Fenster farblich, entsprechend der Einteilung in "S" (grün), "I" (gelb) und "R" (rot), ersichtlich.

Für die weitere Auswertung wurden dieses Experiment und die Fingerprint-Daten in einem Dendrogramm kombiniert. Dafür wurde ein neues "Composite data set" Experiment erstellt, im Menü das ERIC-Experiment und das Agardiffusionstest-Experiment ausgewählt und die Gewichtung beider Experimente auf je 50% korrigiert. Jetzt wurden im Experiment beide ausgewählt und eine Cluster-Analyse durchgeführt. Bei den Fingerprint Daten wurden ein "band matching" mit der Einstellung "Find classes on all entries" ausgeführt. Dies konnte für die Ergebnisse des Agardiffusionstests nicht gemacht werden. Abschließend wurde noch eine Cluster-Analyse ("similarity matrix") mit der Methode "Dice" vollzogen. Das Dendrogramm lässt sich mit Hilfe vom "Matrix dimensional scaling" auch dreidimensional darstellen.

## 3.8 DNA-Microarray

### 3.8.1 Verwendete Chemikalien, Nährmedien, Geräte und Materialien

**Tabelle 19: Verwendete Chemikalien - DNA-Microarray**

Chemikalie	Artikelnummer	Hersteller
AMR-ve Genotyping Kit AT-1	205300050	Alere Technologies

**Tabelle 20: Verwendete Geräte und Materialien - DNA-Microarray**

Gerät	Beschreibung	Hersteller
PCR-Tubes-Streifen	0,2 ml, PCR clean	Eppendorf
Einmal-Pasteurpipette	steril	VWR
Mastercycler	epgradient S	Eppendorf
Thermoshaker TS-100	55°C, 30°C, 550 rpm	BIOSAN
Labormischer	Genie 1 Touch Mixer	Vortex Scientific

Pipettenspitzen	2 µl; 100 µl; 1000 µl	Eppendorf
Kolbenhubpipette	2 µl; 100 µl; 1000 µl	Gilson
Mini-Zentrifuge	0,2 ml Tubes	Carl Roth
ArrayMate Reader	ATR 03	Alere Technologies
Software	IconoClust	Alere Technologies

### 3.8.2 Durchführung

Für den DNA-Microarray wurden zuerst eine lineare Amplifikation und eine interne Biotin-Markierung durchgeführt. Dafür wurden 4,9 µl B1<sup>AMR</sup> (Labelling-Reagenz) und 0,1 µl B2 (DNA-Polymerase) als Mastermix pro Probe in ein 200 µl PCR-Eppendorf Tube pipettiert. Zu den 5 µl Mastermix wurden 5 µl DNA zugefügt, gevortext und anschließend kurz anzentrifugiert. Danach wurden die Proben in den Mastercycler gestellt und folgendes Programm gestartet:

**Tabelle 21: PCR-Programm - DNA-Microarray**

Temperatur [°C]	Zeit [Sekunden]	Zyklen
96	300	
50	20	45 x
72	30	
96	20	
4	∞	

10 µl des PCR-Produkts wurden in 90 µl C1-Puffer (Hybridization-Buffer) pipettiert und gevortext. Als nächstes wurden 500 µl UHQ-Wasser in die Microarray-Tubes pipettiert und im Thermoshaker bei 55°C für 2 Minuten bei 550 rpm inkubiert. Danach wurde mit einer sterilen Pasteurpipette das Wasser entfernt und ein Waschschriff mit 500 µl C1-Puffer durchgeführt, wobei die Inkubation auf 4 Minuten verlängert wurde. Nach dem Absaugen der C1-Pufferlösung wurden die 100 µl PCR-Produkt-C1-Puffer-Lösung in das Microarray-Tube pipettiert und für eine Stunde bei 55°C im Thermoshaker bei 550 rpm inkubiert. Danach wurde das C3-Reagenz (Streptavidin-Horseradish-Peroxidase-HRP-Conjugate-Puffer 100x) mit dem C4-Puffer (Conjugate-Buffer) 1:100 verdünnt. Von der Lösung D1 wurden für jede Probe 100 µl in ein separates Eppendorf Tube pipettiert um es bei Raumtemperatur zu temperieren. Nach der Hybridisierung erfolgten zwei Waschschriffe. Dafür wurde die Hybridisierungs-Lösung im Microarray entfernt, 500 µl C2-Puffer (Washing-Buffer 1) dazugegeben und der Array für 5 Minuten im Thermoshaker bei 30°C und 550 rpm inkubiert. Danach wurde die Lösung wieder abgesaugt und 100 µl der C3/C4-Mischung zugefügt. Die Inkubation erfolgte für 10 Minuten im Thermoshaker bei 30°C und 550 rpm. Nach dem kompletten Verwerfen der C3/C4-Mischung wurden wieder zwei Waschschriffe vollzogen. Dafür wurden jeweils die vorige Lösung entfernt, 500 µl

C5-Puffer (Washing-Buffer 2) dazu pipettiert und für 1 Minute im Thermoshaker bei 30°C und 550 rpm inkubiert. Jetzt wurde in das Microarray-Tube 100 µl D1 (HRP-Substrate) pipettiert und für 10 Minuten bei Raumtemperatur ohne Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte die Datenanalyse mittels ArrayMate Reader.

### 3.9 Test des Wachstumsverhaltens

#### 3.9.1 Verwendete Chemikalien, Nährmedien, Geräte und Materialien

Tabelle 22: Verwendete Chemikalien - Test des Wachstumsverhaltens

Chemikalie	Artikelnummer	Hersteller
Pepton aus Fleisch	LP0034	Oxoid
Hefeextrakt	1.03753.0500	Merck
Gallensalze Nr. 3	LP0055	Oxoid
Natriumchlorid	3957.1	Carl Roth
Glukose	X987.2	Carl Roth
Kristallviolett	1.15940.0100	Merck
Pepton aus Casein	LP0042	Oxoid
Ciprofloxacin (≥98,0% HPLC) C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub> MW=359,39 g/mol	17850 Lot# BCBK3650V	Sigma-Aldrich
Enrofloxacin (≥98,0% HPLC) C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub> Mw=331,95 g/mol	17849 1298025 11607247	Sigma-Aldrich
Trypton-Soja Bouillon (TSB)	CM0129	Oxoid
Trypton-Soja Agar (TSA)	CM0131	Oxoid
Müller-Hinton Bouillon (MHB)	CM0405	Oxoid
LB Bouillon	1.10285.0500	Merck

##### 3.9.1.1 Herstellung der Nährmedien und Lösungen

Trypton-Soja Agar:

Für dieses Nährmedium wurden 40 g Trypton-Soja Agar in eine Schraubflasche eingewogen und in 1000 ml deionisiertem Wasser gelöst. Der Agar wurde in der Mikrowelle aufgeschmolzen und anschließend bei 121°C für 15 Minuten autoklaviert. Der im Wasserbad auf 50°C tem-

perierte Agar wurde danach in Petrischalen gegossen. Die ausgehärteten Platten wurden bei 5°C gelagert.

#### Trypton-Soja Bouillon:

30 g Trypton-Soja Bouillon wurden in eine Schraubflasche eingewogen und in 1000 ml deionisiertem Wasser gelöst. Weiters wurde TSB in Epprouvetten zu je 10 ml portioniert. Anschließend wurde die Bouillon bei 121°C für 15 Minuten autoklaviert und danach bei 5°C gelagert.

#### LB Bouillon:

Hierfür wurden 25 g LB Bouillon in eine Schraubflasche eingewogen und in 1000 ml deionisiertem Wasser gelöst. Anschließend wurde die Bouillon bei 121°C für 15 Minuten autoklaviert und danach bei 5°C gelagert.

#### Müller-Hinton Bouillon:

Für dieses Nährmedium wurden 21 g Müller-Hinton Bouillon in eine Schraubflasche eingewogen und in 1000 ml deionisiertem Wasser gelöst. Anschließend wurde die Bouillon bei 121°C für 15 Minuten autoklaviert und danach bei 5°C gelagert.

#### Trypton-Soja Bouillon + Hemmstofflösung:

Für die Hemmstofflösung wurden 7,5 g Gallensalze, 0,1 g Kristallviolett und 0,03 g TSB in einem Reaktionsgefäß in 100 ml sterilem Wasser gelöst. Nun wurde diese Lösung sterilfiltriert (0,20 µm). 1 ml dieser Hemmstofflösung wurde mit 40 ml TSB gemischt.

#### VRBD Bouillon "alte" Rezeptur:

Für die Herstellung der "alten" Rezeptur wurden 7 g Pepton aus Fleisch, 3 g Hefeextrakt, 1,5 Gallensalze, 5 g NaCl, 10 g Glucose und 0,002 g Kristallviolett in eine Schraubflasche eingewogen. Danach wurden 1000 ml deionisiertem Wasser zugefügt und die Bouillon wurde anschließend in der Mikrowelle für 2 Minuten zum Kochen gebracht. Die Lagerung erfolgte bei 5°C gelagert.

#### VRBD Bouillon "neue" Rezeptur:

Für dieses Nährmedium wurden 7 g Pepton aus Casein, 3 g Hefeextrakt, 1,5 Gallensalze, 5 g NaCl, 10 g Glucose und 0,002 g Kristallviolett in eine Schraubflasche eingewogen. Danach wurden 100 ml deionisiertem Wasser zugefügt. Anschließend wurde die Bouillon in der Mikrowelle für 2 Minuten zum Kochen gebracht. Die Lagerung erfolgte bei 5°C gelagert.

**Tabelle 23: Verwendete Geräte und Materialien - Test des Wachstumsverhaltens**

Gerät	Beschreibung	Hersteller
Eppendorf-Tube	1,5 ml	Eppendorf
Honeycombplatte	10x10 Wells	Oy Growth Curves Ab Ltd
Reaktionsgefäß	7 ml; 30 ml	Thermo Scientific

Spritzenvorsatzfilter	0,20 µm	Sartorius Austria
Petrischalen	steril	Sarstedt
Brutschrank	37°C	WTC Binder
Analysenwaage	Max. 220 g d=0,1 mg	Satorius
Oberschalenwaage CPA 5202	Max. 5200 g d=0,01 g	Satorius
Labormischer	Genie 1 Touch Mixer	Vortex Scientific
Pipettenspitzen	100 µl; 1000 µl	Eppendorf
Kolbenhubpipette	2 µl; 100 µl; 1000 µl	Gilson
Bioscreen C	Computergesteuerter Inkubator/Schüttler/Photometer	Oy Growth Curves Ab Ltd
Labocap-Verschluss	-	Carl Roth
Reaktionsglas	14 ml	Carl Roth
Spatel	steril	Carl Roth

### 3.9.2 Durchführung

Als Nährmedien wurden TS-Bouillon, MH-Bouillon, VRBD-Bouillon, LB-Bouillon und TS-Bouillon mit Hemmstofflösung verwendet.

Für den Bioscreen-Ansatz wurden zuerst die Wirkstoff-Verdünnungen hergestellt. Dafür wurde angenommen, dass die Konzentration der Wirkstofflösung 100% entsprach. Zuerst wurde der Wirkstoff in einem 1,5 ml Eppendorf Tube mit dem entsprechenden Nährmedium zweimal 1:10 verdünnt, was einer Wirkstofflösung von 1% entsprach. Daraus wurden anschließend fünf Verdünnungen hergestellt: 0,1%, 0,2%, 0,4%, 0,6% und 0,8%.

- Für 0,1%: 100 µl 1:100 + 900 µl Nährmedium
- Für 0,2%: 200 µl 1:100 + 800 µl Nährmedium
- Für 0,4%: 400 µl 1:100 + 600 µl Nährmedium
- Für 0,6%: 600 µl 1:100 + 400 µl Nährmedium
- Für 0,8%: 800 µl 1:100 + 200 µl Nährmedium
- Für 1%: 1000 µl 1:100

Als Antibiotika-Stammlösung (Ciprofloxacin, Enrofloxacin: 2000 µg/ml) wurden ca. 12000 µg für 6ml in einem Reaktionsgefäß eingewogen. Nach der Einwaage wurde das Volumen entsprechend korrigiert. Danach wurde Ciprofloxacin in 600 µl 1 M HCl (0,20 µm sterilfiltriert) und Enrofloxacin in 300 µl 2 M NaOH (0,20 µm sterilfiltriert) gelöst. Auf das berechnete Volumen

wurde dann mit sterilem Wasser aufgefüllt. Diese Stammlösung wurde danach mit dem verschiedenen Testmedien entweder 1:100 oder 1:1000 in einem 1,5 ml Eppendorf Tube verdünnt.

- Für 8 µg/ml: 400 µl 1:100 + 600 µl Nährmedium
- Für 2 µg/ml: 1000 µl 1:1000

Von den Proben wurde zuerst ein fraktioniert Ausstrich auf TS-Agar hergestellt und für 24 Stunden aerob bei 37°C inkubiert. Eine Kolonie davon wurde danach in 10 ml TS-Boullion überimpft und wiederum für 24 Stunden aerob bei 37°C bebrütet. Diese Suspension an Bakterien wurde nun gevortext und 1:10 mit TSB verdünnt. Jetzt erfolgte eine Messung der OD bei 625 nm im Photometer, wobei der Leerwert mit TSB eingestellt wurde. Die Bakteriensuspension wurde so verdünnt, dass die OD bei 625 nm zwischen 0,08 und 0,1 lag (Mc Farland Standard 0,5). Diese Lösung wurde nun 1:100 mit dem entsprechenden Nährmedium verdünnt.

Nachdem alle Lösungen verdünnt und hergestellt wurden, wurde nun der Bioscreen-Ansatz in die Honeycomb-Platte pipettiert. Dafür wurden 150 µl Wirkstofflösung und 150 µl Bakteriensuspension verwendet. Somit ergibt das Endvolumen 300 µl. Die Wirkstofflösungen und die Bakteriensuspensionen wurden dadurch erneut 1:2 verdünnt, wodurch die Endkonzentration der Wirkstofflösungen 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2% und 0,1% entsprachen und jener der Antibiotika-Lösung 4 µg/ml und 1 µg/ml. Als Leerwert wurden zu den 150 µl der Wirkstofflösung 150 µl des entsprechenden Nährmediums pipettiert. Als Positivkontrolle wurden 150 µl Bakteriensuspension und 150 µl entsprechendes Nährmedium gemischt. Nachdem der Ansatz fertig pipettiert wurde, wurde der Bioscreen mit folgenden Settings gestartet:

- Temperatur: 37°C
- Bebrütung: aerob
- Filter 1: 600 nm
- Dauer: 72 h
- Messintervall: 15 Minuten
- Mischintervall und Zeitpunkt: 15 Sekunden, normale Geschwindigkeit, mittlere Intensität, vor der Messung

## 4 Ergebnisse

Insgesamt 245 Isolate standen für die Untersuchungen zur Verfügung. Alle Isolate können anhand Ihres Probencodes den verschiedenen Gruppen und Zeitpunkten zugeordnet werden. Dabei entspricht A der Kontrollgruppe, B der Zusatzstoffgruppe und C der Antibiotikumgruppe. Die erste Ziffer nach der Gruppenbezeichnung entspricht den 8 Dickdarmproben (1-8), die von jeder Gruppe bei jedem Zeitpunkt gezogen wurde. Die letzte Ziffer steht für den Zeitpunkt (1-2) und a-e für die fünf Isolate, die pro Probe gewonnen wurden. Die Umweltproben werden durch die Zahl 18 mit einem nachstehenden Kleinbuchstaben (a-e) beschrieben. Ec mit einer Zahl steht für einen *E. coli* Referenzstamm aus der Stammsammlung.

### 4.1 Agardiffusionstest

In den folgenden Diagrammen wird die Häufigkeitsverteilung der mittels Agardiffusionstest erhaltenen Durchmesser des Agardiffusionstests von allen Isolaten dargestellt. Die blauen Pfeile symbolisieren die Breakpoints/Cut-off values von CLSI/EUCAST. Der Intermediärbereich befindet sich zwischen den Pfeilen. Ein kleinerer Durchmesser entspricht einem resistenten Verhalten gegenüber dem Antibiotikum. Größere Durchmesser kennzeichnen hingegen den sensiblen Bereich. Die Breakpoints/Cut-off values von CLSI/EUCAST sind aus den nachfolgenden Tabellen zu entnehmen.

Für die Auswertung mittels BioNumerics wurden die von CLSI oder EUCAST vorgegebenen Breakpoints/Cut-off values verwendet. Bei Cefotaxim (30), Ceftiofur (30), Meropenem (10), Ciprofloxacin (5) und Enrofloxacin (5) wurden selbst die Breakpoints aufgrund der Häufigkeitsverteilung festgelegt.

**Tabelle 24: Verwendete Breakpoints/cut-off - CLSI, EUCAST und aufgrund der Häufigkeitsverteilung**

Antibiotikum	Abkürzung	CLSI/ EUCAST/ eigene Breakpoints	Sensibel (S)	Intermediär (I)	Resistent (R)
Ampicillin (10)	AMP (10)	CLSI	≥17	14-16	≤13
Cefotaxim (5)	CTX (5)	EUCAST	≥20	17-19	≤16
Cefotaxim (30)	CTX (30)	eigene Breakpoints	≥23	15-22	≤21
Ceftiofur (30)	EFT (30)	eigene Breakpoints	≥22	19-21	≤18
Meropenem (10)	MEM (10)	eigene Breakpoints	≥23	20-22	≤19
Ciprofloxacin (5)	CIP (5)	eigene Breakpoints	≥31	21-30	≤20
Enrofloxacin (5)	ENR (5)	eigene Breakpoints	≥28	21-27	≤20
Tetracyclin (30)	TE (30)	CLSI	≥15	12-14	≤11
Streptomycin (10)	S (10)	CLSI	≥15	12-14	≤11
Sulfonamid (300)	S 3 (300)	CLSI	≥17	13-16	≤12

**Tabelle 25: Breakpoints - EUCAST**

Agent	Abkürzung	S	R
Ampicillin (10)	AMP (10)	≥14	<14
Cefotaxim (5)	CTX (5)	≥20	<17
Cefotaxim (30)	CTX (30)	n.a.	n.a.
Ceftiofur (30)	EFT (30)	n.a.	n.a.
Meropenem (10)	MEM (10)	≥22	<16
Ciprofloxacin (5)	CIP (5)	≥22	<19
Enrofloxacin (5)	ENR (5)	n.a.	n.a.
Tetracyclin (30)	TE (30)	n.a.	n.a.
Streptomycin (10)	S (10)	n.a.	n.a.
Sulfonamid (300)	S 3 (300)	n.a.	n.a.

**Tabelle 26: Breakpoints - CLSI**

Agent	Abkürzung	S	I	R
Ampicillin (10)	AMP (10)	≥17	14-16	≤13
Cefotaxim (5)	CTX (5)	n.a.	n.a.	n.a.
Cefotaxim (30)	CTX (30)	≥23	15-22	≤14
Ceftiofur (30)	EFT (30)	n.a.	n.a.	n.a.
Meropenem (10)	MEM (10)	≥16	14-15	≤13
Ciprofloxacin (5)	CIP (5)	≥21	16-20	≤15
Enrofloxacin (5)	ENR (5)	n.a.	n.a.	n.a.
Tetracyclin (30)	TE (30)	≥15	12-14	≤11
Streptomycin (10)	S (10)	≥15	12-14	≤11
Sulfonamid (300)	S 3 (300)	≥17	13-16	≤12

Die nächsten Diagramme beleuchten die unterschiedliche Behandlung der Gruppen. Die Isolate wurden an 2 verschiedenen Zeitpunkten gezogen. In den folgenden Diagrammen werden die Gruppen zu den beiden Zeitpunkten miteinander verglichen. A steht für die Kontrollgruppe, B für die Zusatzstoffgruppe und C für die Antibiotikumgruppe.

### 4.1.1 Ampicillin (10)

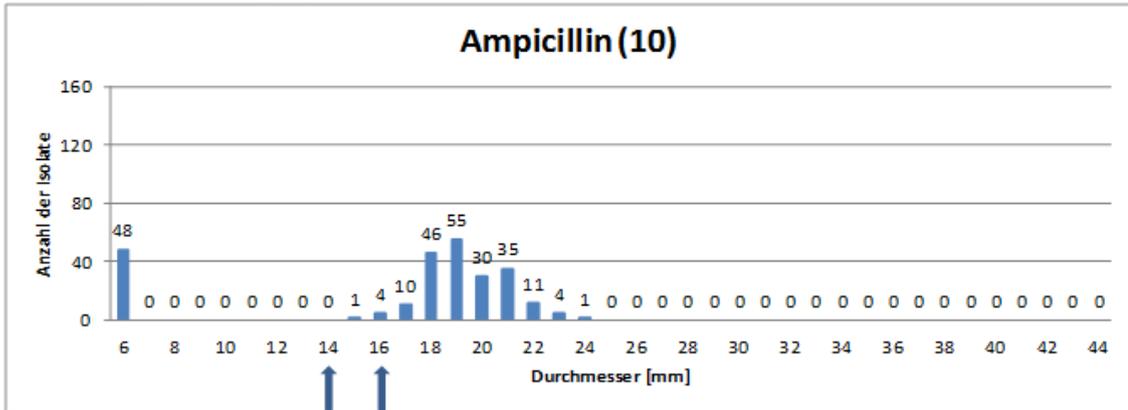


Abbildung 15: Häufigkeitsverteilung Ampicillin (10) - alle Isolate

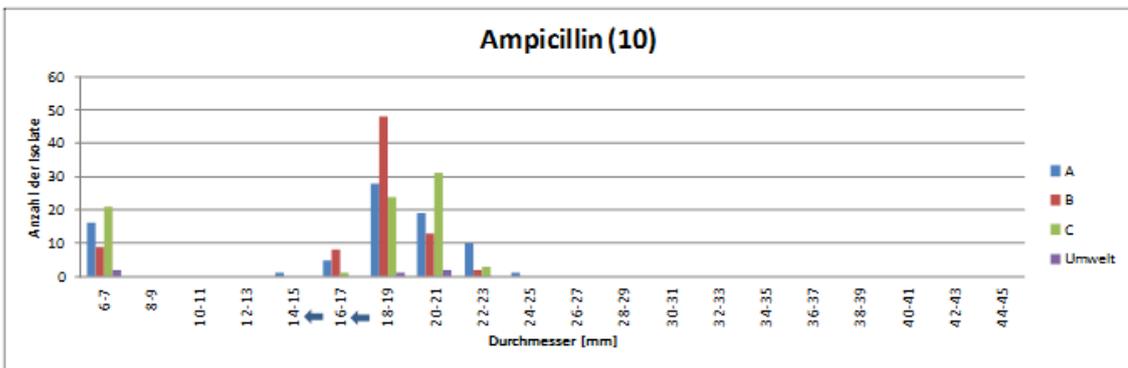


Abbildung 16: Gruppenvergleich - Ampicillin (10)

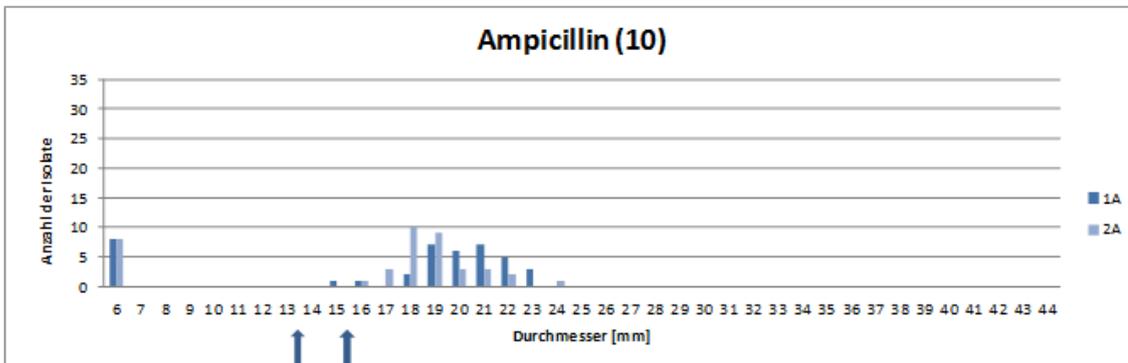


Abbildung 17: Zeitpunktvergleich Kontrollgruppe - Ampicillin (10)

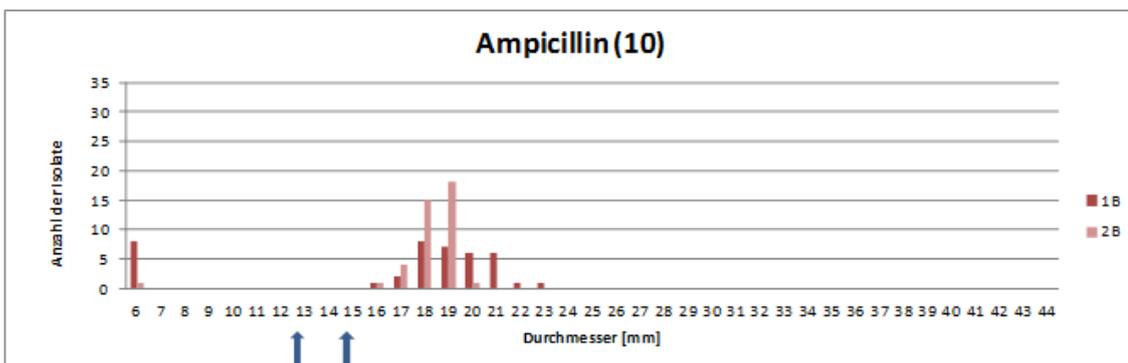


Abbildung 18: Zeitpunktvergleich Zusatzstoffgruppe - Ampicillin (10)

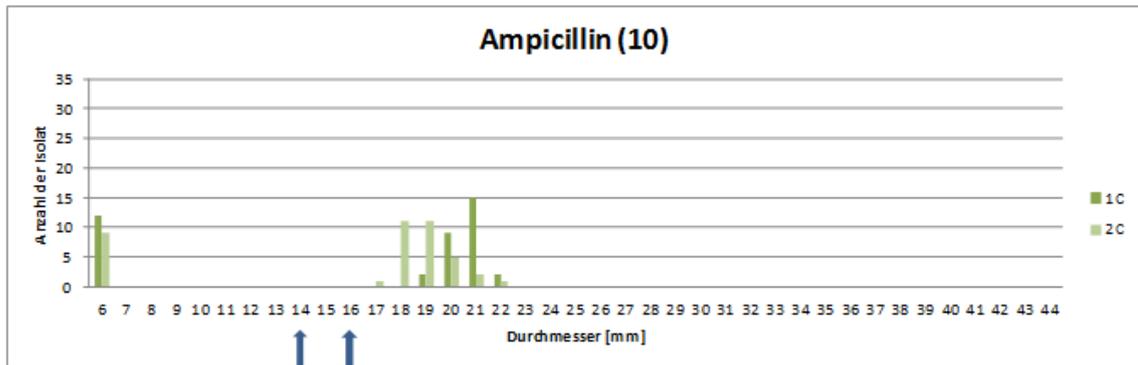


Abbildung 19: Zeitpunktvergleich Antibiotikumgruppe - Ampicillin (10)

Bei Ampicillin verteilen sich die Isolate so, dass bei einem Hemmhof von 19 mm eine annähernde Gauß'sche Normalverteilung auftritt. Von den getesteten Isolate sind 182 sensibel, 15 intermediär und 48 resistent. Isolate der Kontrollgruppe, Zusatzstoffgruppe, Antibiotikumgruppe und Umweltgruppe sind in allen Bereichen vertreten und es gibt auch keinen markanten Unterschied zwischen den beiden Zeitpunkten.

#### 4.1.2 Cefotaxim (5)

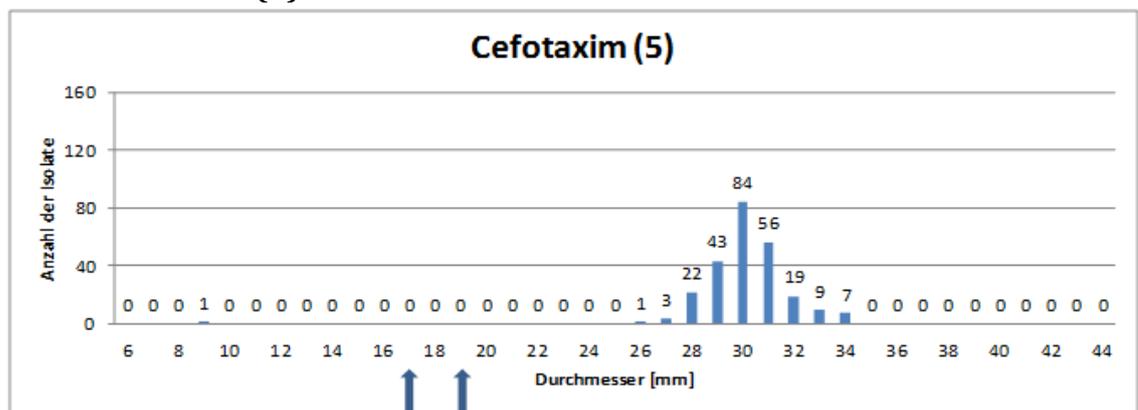


Abbildung 20: Häufigkeitsverteilung Cefotaxim (5) - alle Isolate

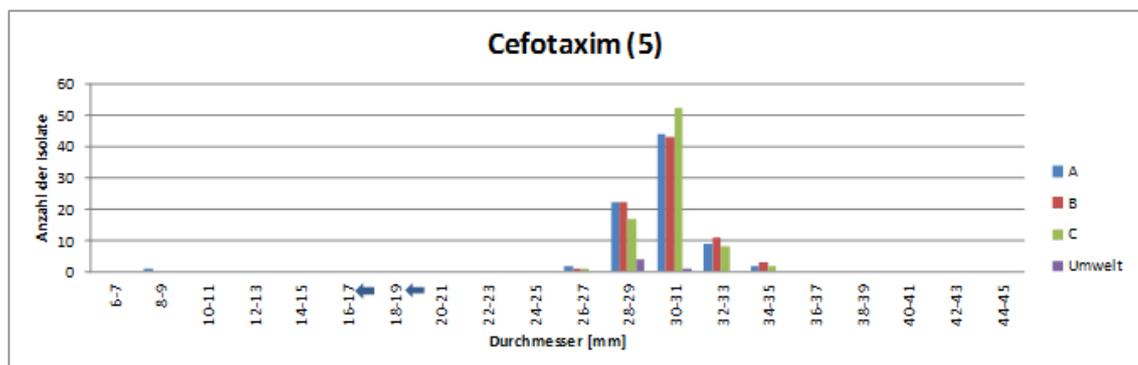


Abbildung 21: Gruppenvergleich - Cefotaxim (5)

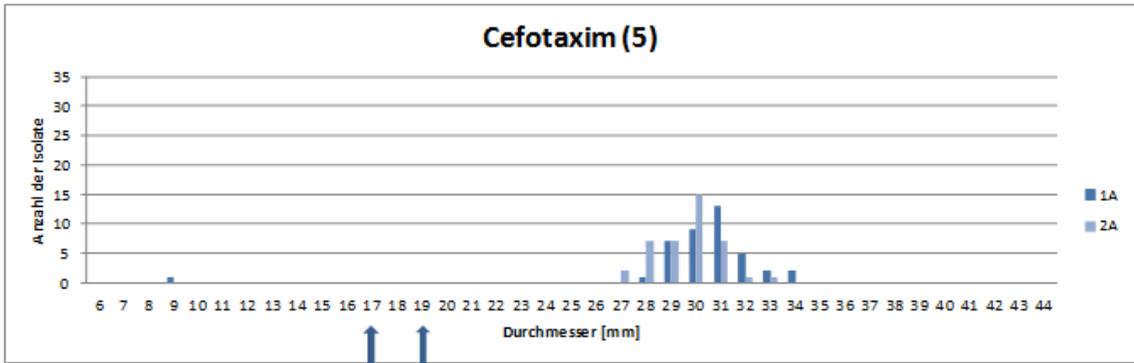


Abbildung 22: Zeitpunktvergleich Kontrollgruppe - Cefotaxim (5)

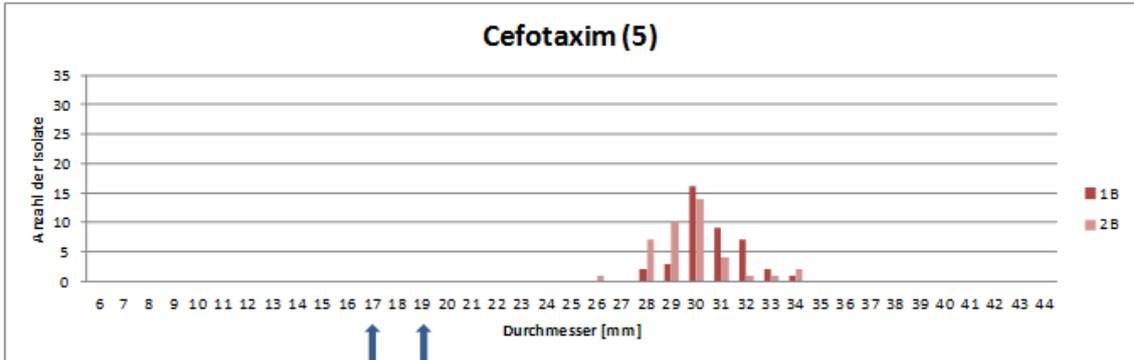


Abbildung 23: Zeitpunktvergleich Zusatzstoffgruppe - Cefotaxim (5)

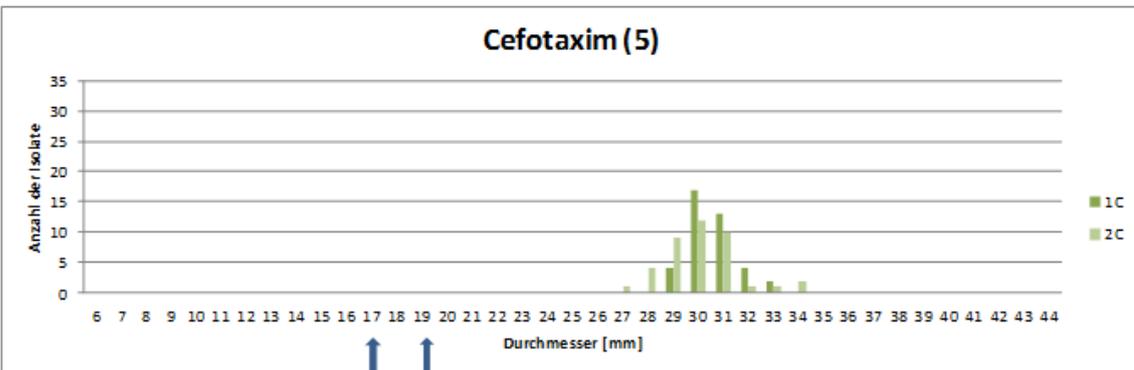


Abbildung 24: Zeitpunktvergleich Antibiotikumgruppe - Cefotaxim (5)

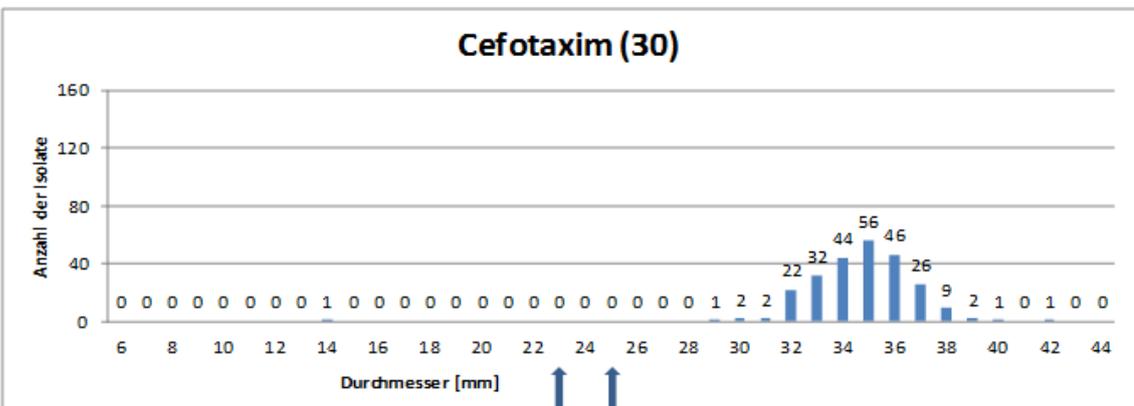


Abbildung 25: Häufigkeitsverteilung - Cefotaxim (30)

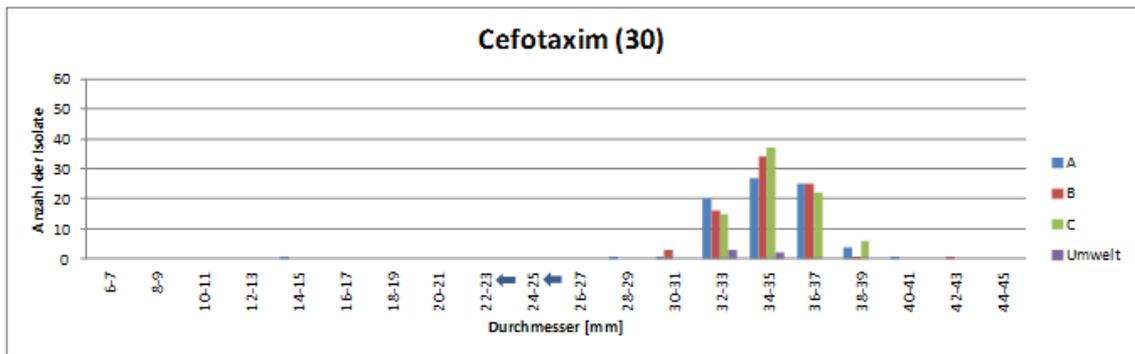


Abbildung 26: Gruppenvergleich - Cefotaxim (30)

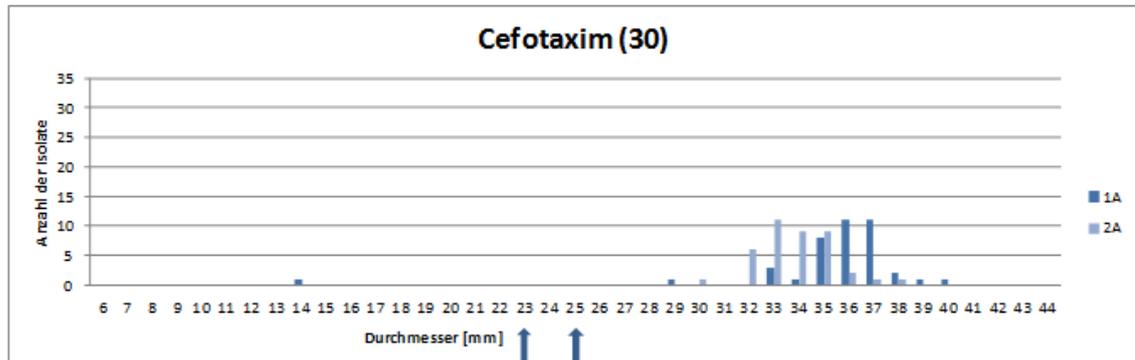


Abbildung 27: Zeitpunktvergleich Kontrollgruppe - Cefotaxim (30)

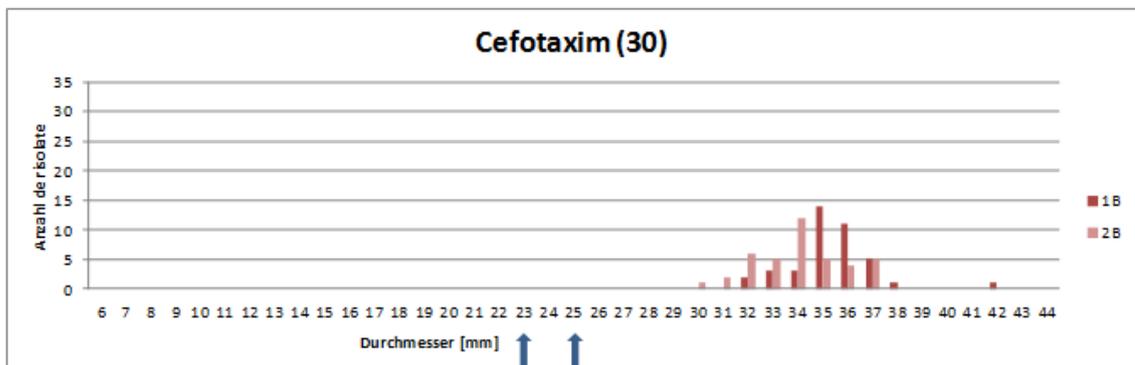


Abbildung 28: Zeitpunktvergleich Zusatzstoffgruppe - Cefotaxim (30)

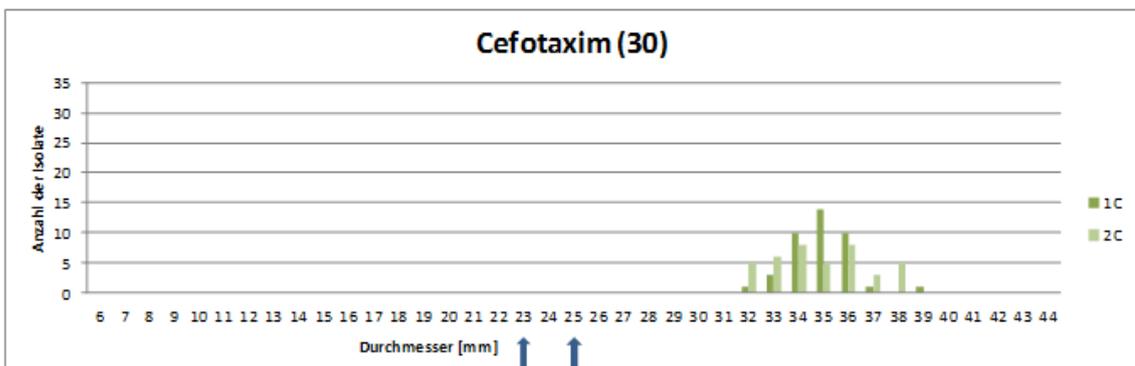


Abbildung 29: Zeitpunktvergleich Antibiotikumgruppe - Cefotaxim (30)

Beim Wirkstoff Cefotaxim (5 und 30) sind alle 244 Isolate normal verteilt und sensibel. Nur ein resistentes Isolat konnte detektiert werden, das aus der Gruppe A vom Zeitpunkt 1 stammt.

Einen Unterschied zwischen den beiden Konzentrationen von Cefotaxim zeigt sich dahingegen, dass die höhere Konzentration eine stärkere Hemmung der Isolate bewirkt. Dadurch verschiebt sich die Normalverteilung von 30 mm auf 35 mm.

### 4.1.3 Ceftiofur (30)

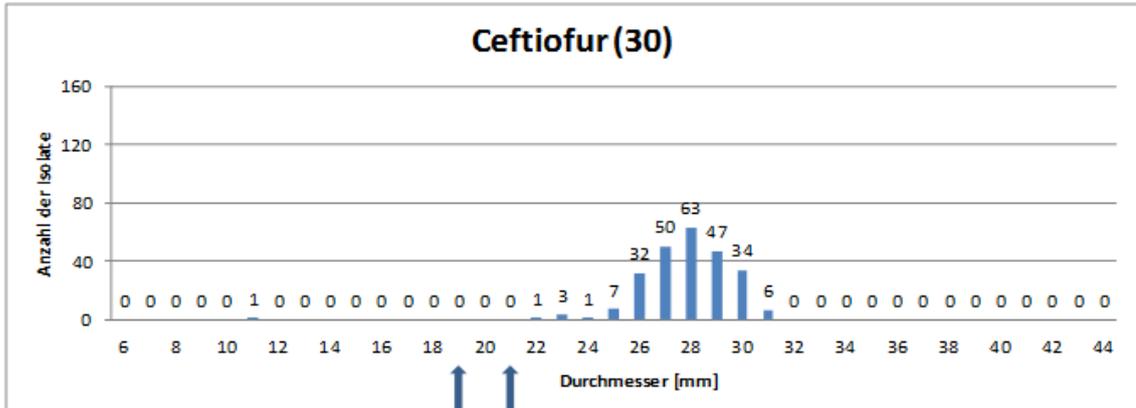


Abbildung 30: Häufigkeitsverteilung Ceftiofur (30) - alle Isolate

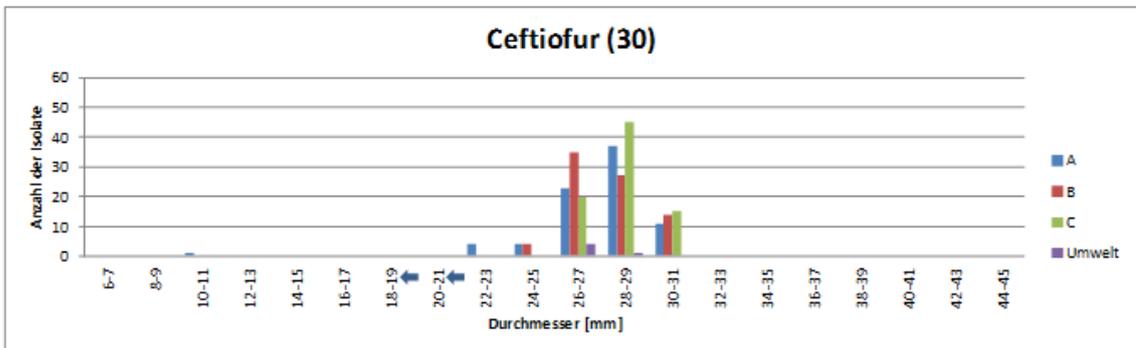


Abbildung 31: Gruppenvergleich - Ceftiofur (30)

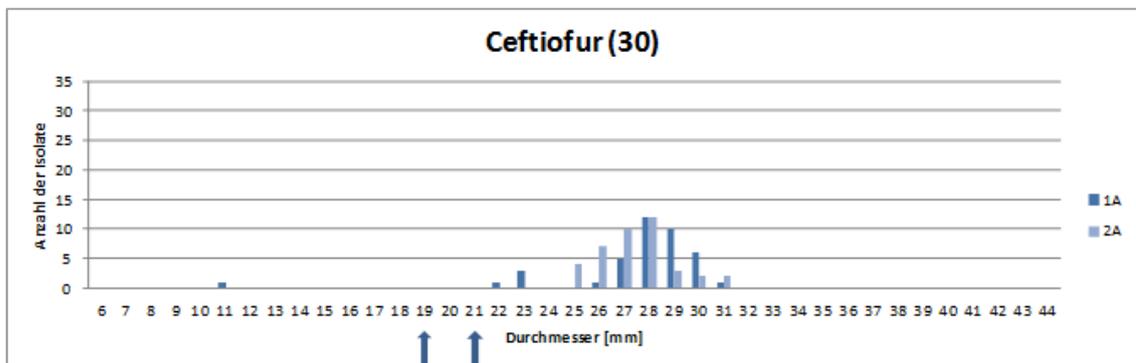


Abbildung 32: Zeitpunktvergleich Kontrollgruppe - Ceftiofur (30)

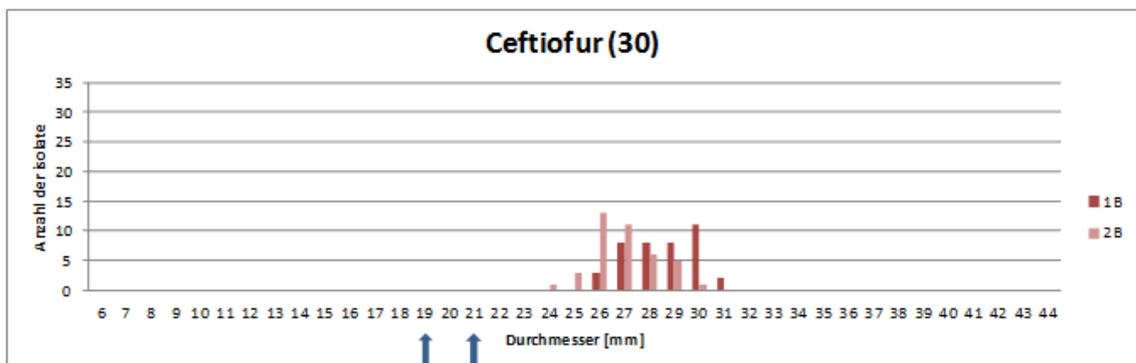


Abbildung 33: Zeitpunktvergleich Zusatzstoffgruppe - Ceftiofur (30)

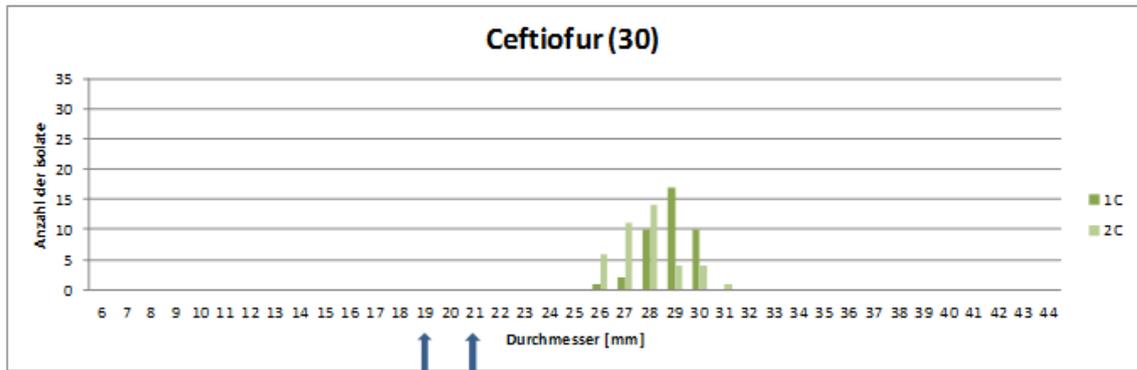


Abbildung 34: Zeitpunktvergleich Antibiotikumgruppe - Ceftiofur (30)

Ein Isolat weist einen Hemmhofdurchmesser von 11 mm auf. Bei diesem Isolat handelt es sich um dasselbe wie bei Cefotaxim, das von Zeitpunkt 1 der Kontrollgruppe stammt. Die anderen 244 Isolate sind normalverteilt, sensibel und es gibt keine Diskrepanz zwischen den einzelnen Gruppen und Zeitpunkten.

Ceftiofur und Cefotaxim sind beide Cephalosporine der 3. Generation, jedoch wird Ceftiofur in der Veterinärmedizin und Cefotaxim in der Humanmedizin verwendet. Beide Antibiotika haben den selben Einfluss auf die Isolate. Ceftiofur hat einen Peak bei 28 mm und Cefotaxim (30) bei 35 mm.

#### 4.1.4 Meropenem (10)

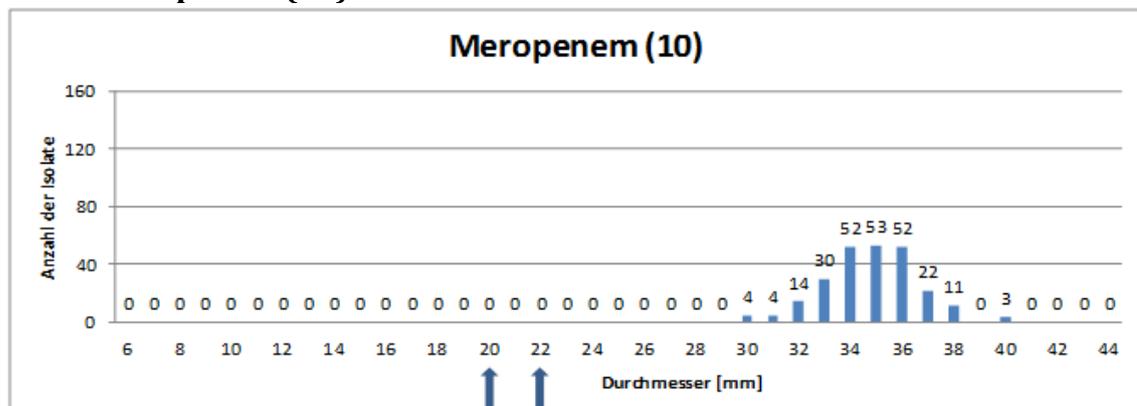


Abbildung 35: Häufigkeitsverteilung Meropenem (10) - alle Isolate

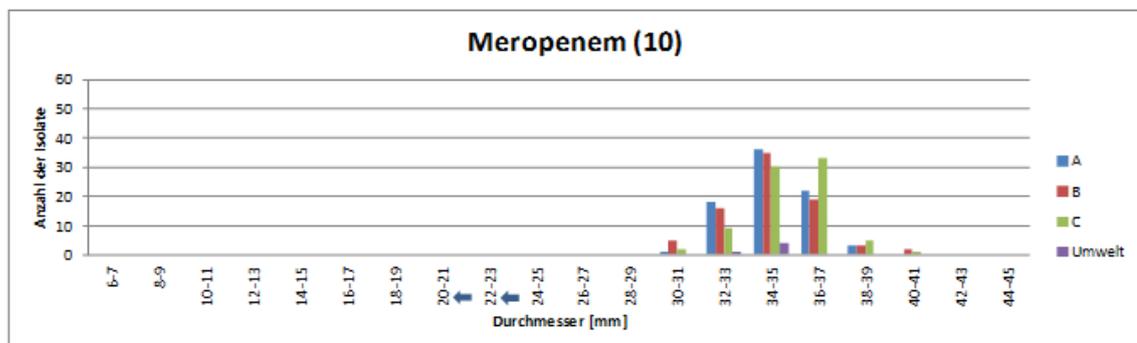


Abbildung 36: Gruppenvergleich Meropenem - (10)

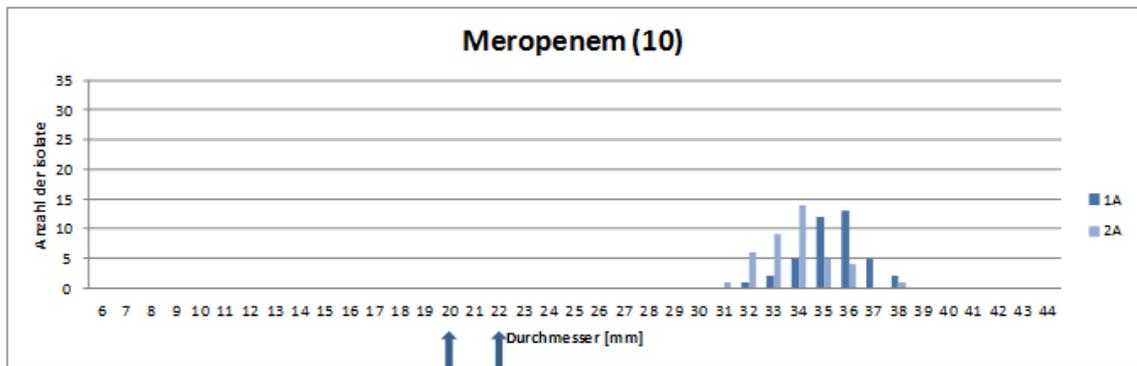


Abbildung 37: Zeitpunktvergleich Kontrollgruppe - Meropenem (10)

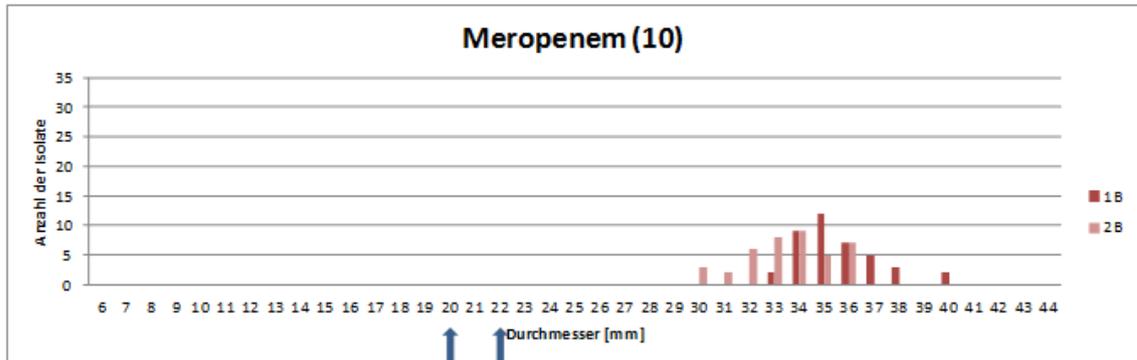


Abbildung 38: Zeitpunktvergleich Zusatzstoffgruppe - Meropenem (10)

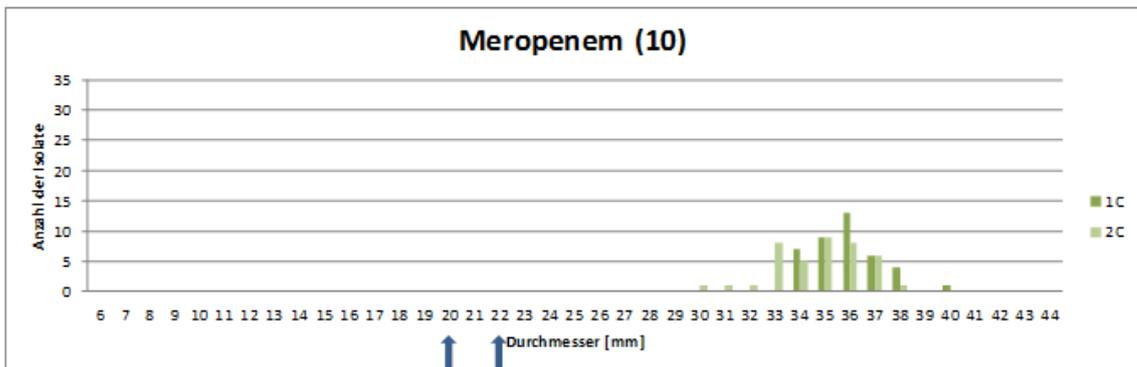


Abbildung 39: Zeitpunktvergleich Antibiotikumgruppe - Meropenem (10)

Alle Isolate sind gegenüber Meropenem sensibel und verteilen sich annähernd normal. Es gibt keinen auffälligen Unterschied zwischen den Gruppen und Zeitpunkten.

#### 4.1.5 Ciprofloxacin (5)

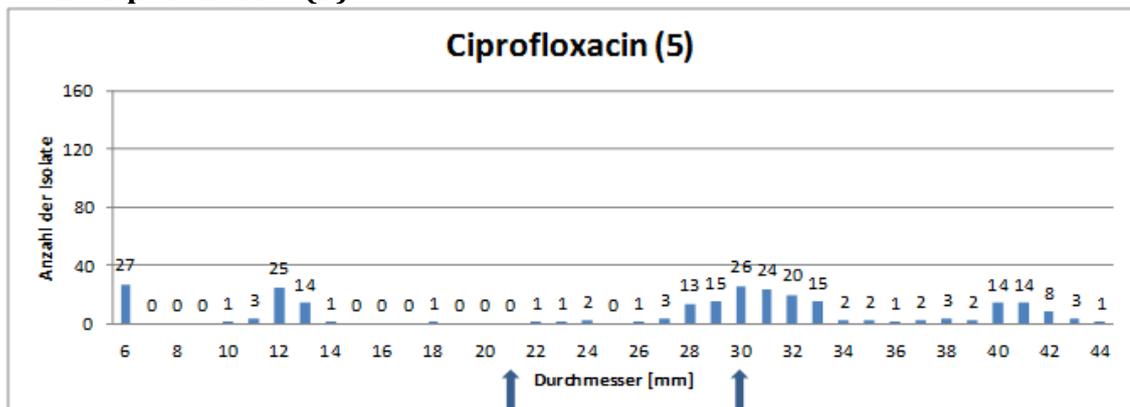


Abbildung 40: Häufigkeitsverteilung Ciprofloxacin (5) - alle Isolate

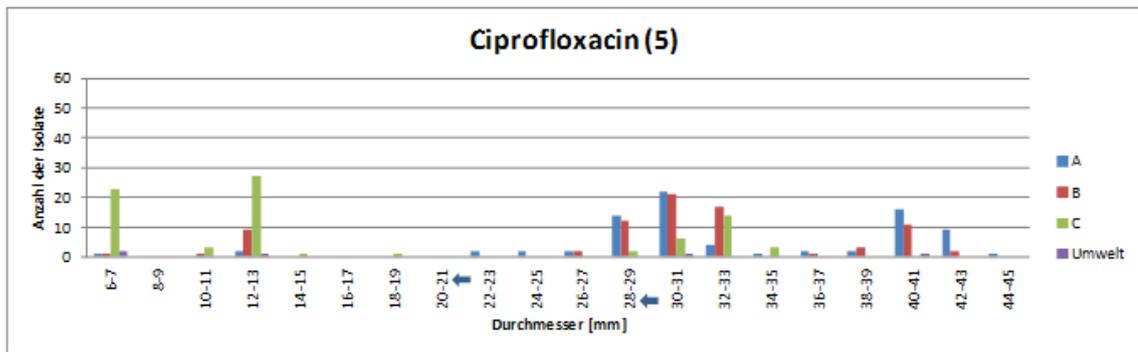


Abbildung 41: Gruppenvergleich - Ciprofloxacin (5)

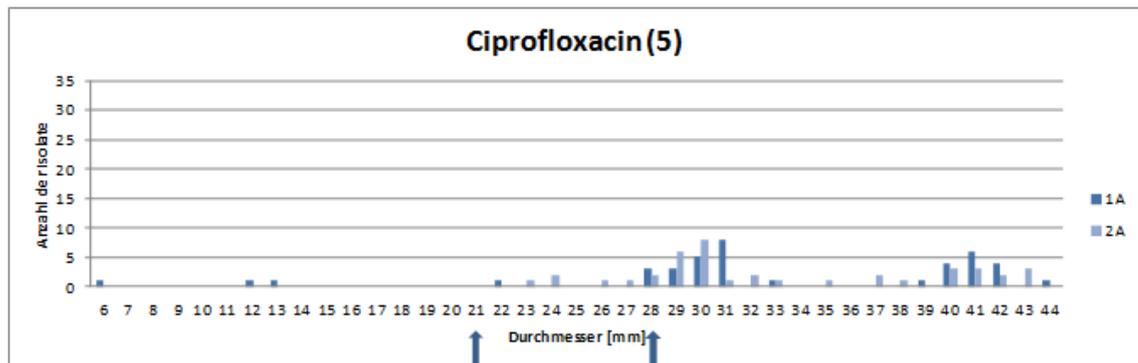


Abbildung 42: Zeitpunktvergleich Kontrollgruppe - Ciprofloxacin (5)

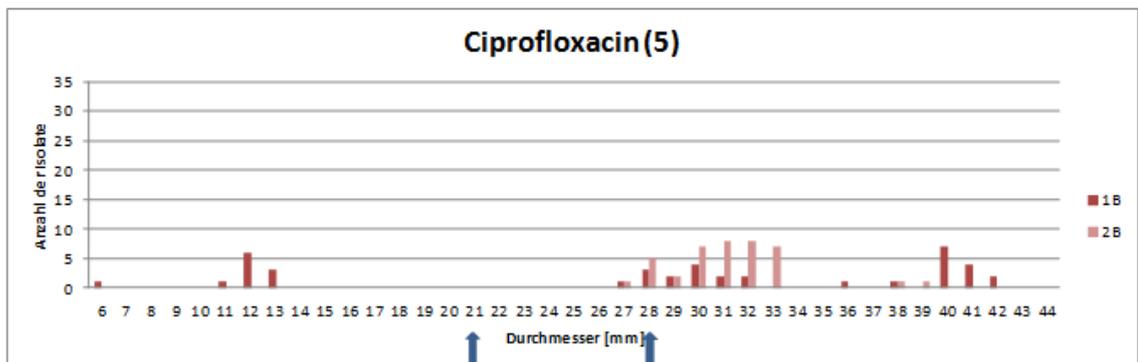


Abbildung 43: Zeitpunktvergleich Zusatzstoffgruppe - Ciprofloxacin (5)

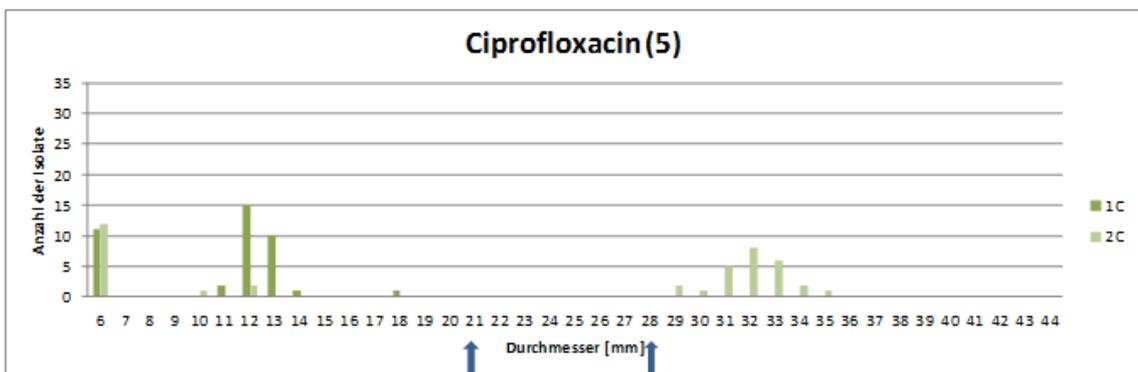


Abbildung 44: Zeitpunktvergleich Antibiotikumgruppe - Ciprofloxacin (5)

Bei Ciprofloxacin gibt es 72 resistente, 62 intermediäre und 111 sensible Isolate. Resistente Isolate stammen vor allem aus der Antibiotikumgruppe, wohin gegen intermediäre und sensible Isolate vor allem aus der Kontrollgruppe und Zusatzstoffgruppe sind. Es gibt sogar drei resistente Isolate in der Umweltgruppe. Die Fluoroquinolon-resistenten Isolate weisen wahrscheinlich mehrere Mutationen von verschiedenen Genen auf, was zu multimodalen Verteilungen

führen kann (Lindgren et al., 2003). Lindgren et al. (2003) untersuchten die Entwicklung einer Fluoroquinolon-Resistenz von *E. coli* bei Harnwegsinfektionen. Dabei trat eine Korrelation zwischen der Zahl der Mutationen und den Fluoroquinolon-MIC-Werten auf. Vor allem Isolate vom Zeitpunkt 1 der Antibiotikumgruppe gehörten zu den resistenten Isolat. Isolate, die von der Zusatzstoffgruppe stammen und resistent sind, stammen ausschließlich vom Zeitpunkt 1. Auch aus der Kontrollgruppe sind die resistenten Isolate dem Zeitpunkt 1 zugehörig.

#### 4.1.6 Enrofloxacin (5)

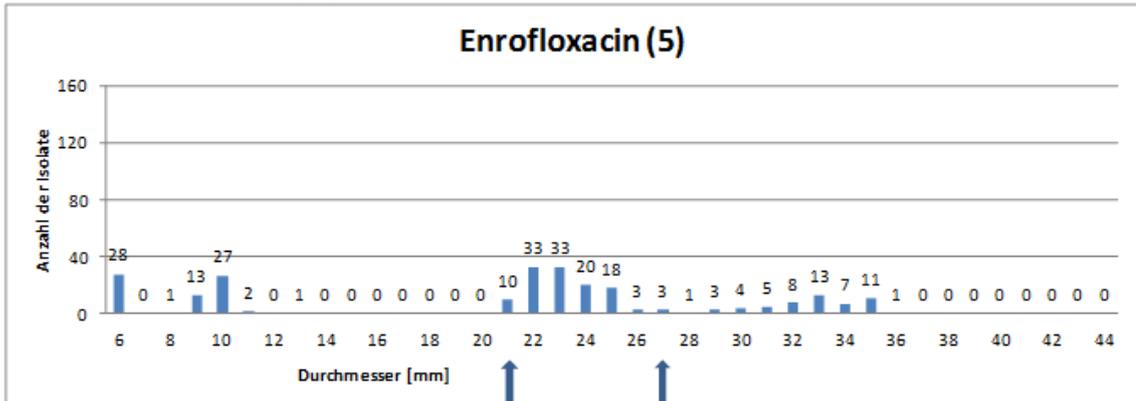


Abbildung 45: Häufigkeitsverteilung Enrofloxacin (5) - alle Isolate

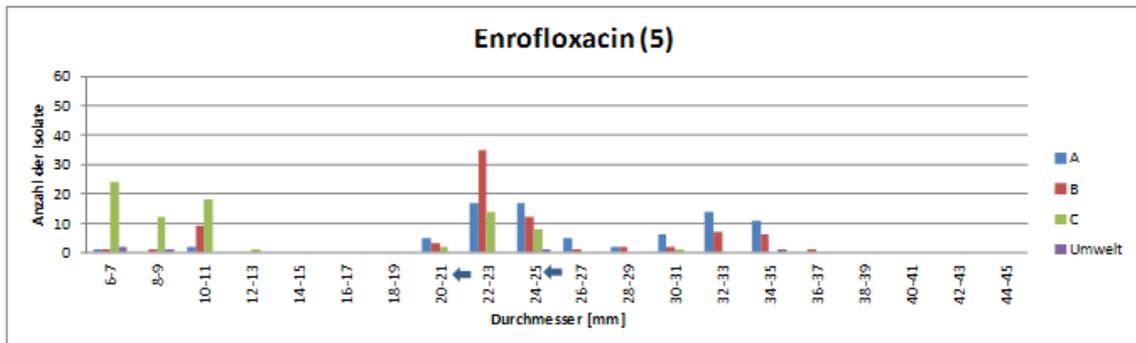


Abbildung 46: Gruppenvergleich - Enrofloxacin (5)

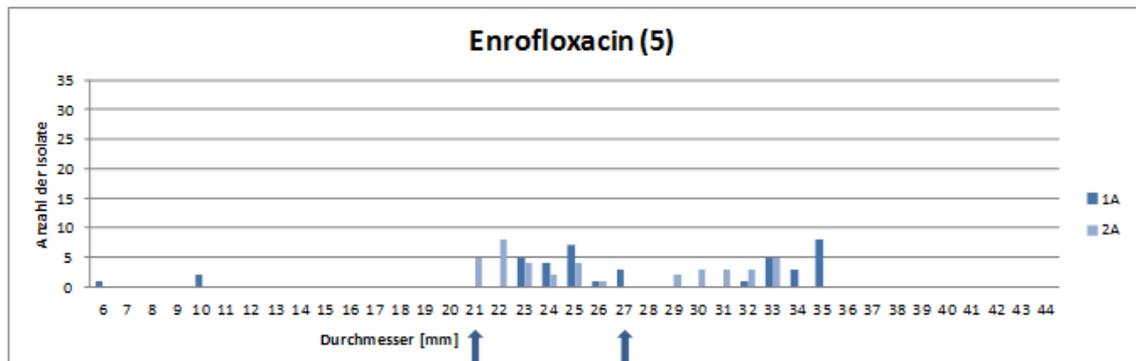


Abbildung 47: Zeitpunktvergleich Kontrollgruppe - Enrofloxacin (5)

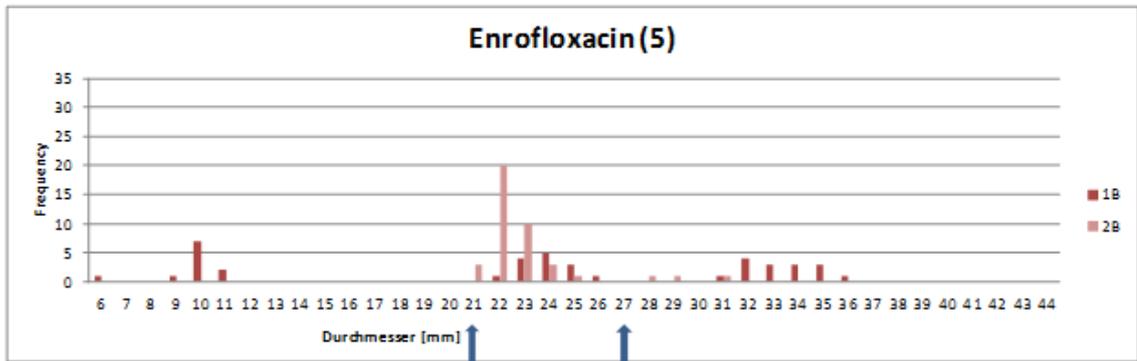


Abbildung 48: Zeitpunktvergleich Zusatzstoffgruppe - Enrofloxacin (5)

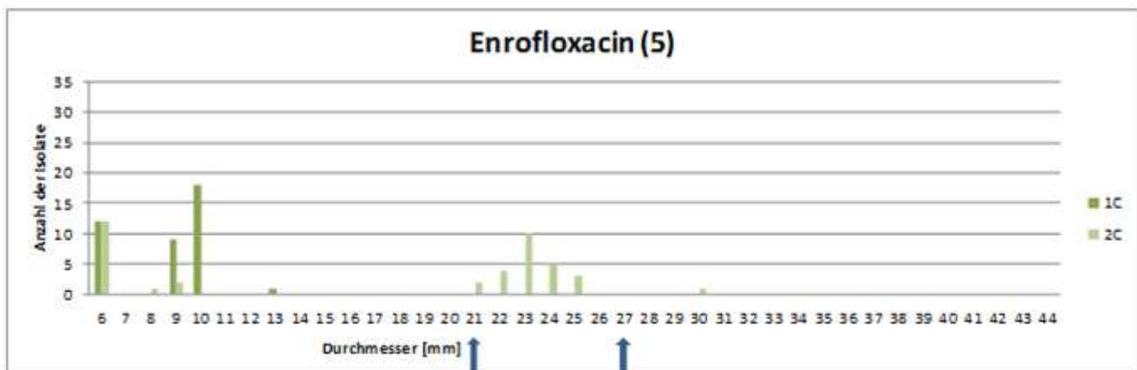


Abbildung 49: Zeitpunktvergleich Antibiotikumgruppe - Enrofloxacin (5)

Enrofloxacin weist ein sehr ähnliches Bild wie Ciprofloxacin auf. Beide Antibiotika gehören zur Wirkstoffgruppe der Fluoroquinolone. Ciprofloxacin findet in der Humanmedizin Anwendung und Enrofloxacin in der Veterinärmedizin.

#### 4.1.7 Tetracyclin (30)

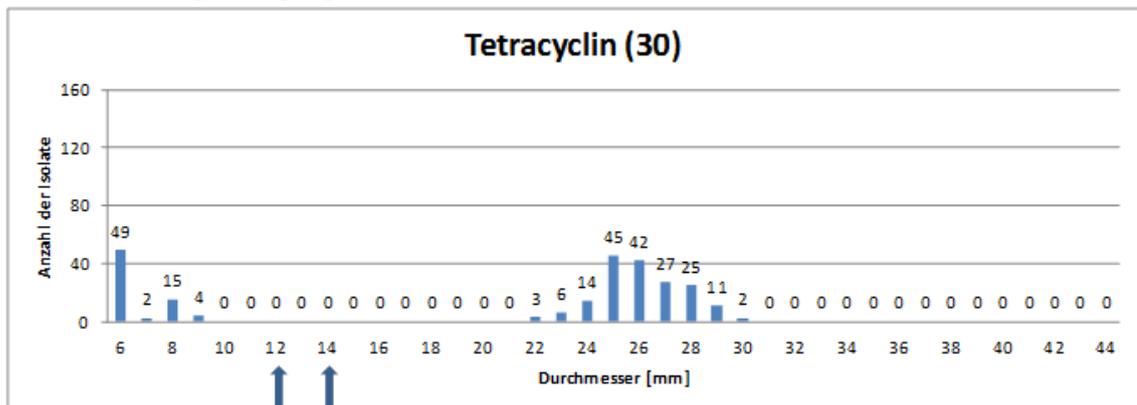


Abbildung 50: Häufigkeitsverteilung Tetracyclin (30) - alle Isolate

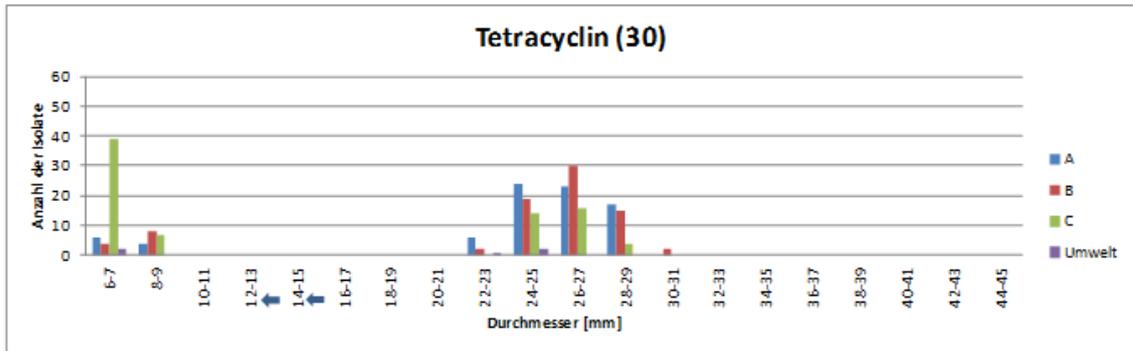


Abbildung 51: Gruppenvergleich - Tetracyclin (30)

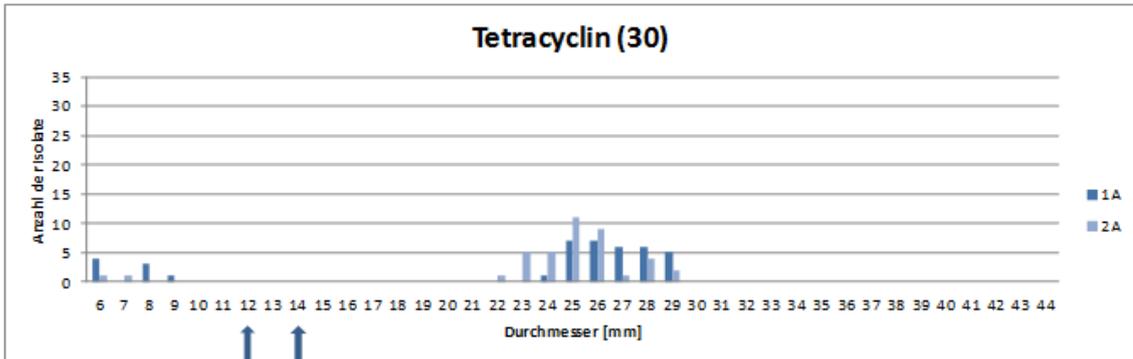


Abbildung 52: Zeitpunktvergleich Kontrollgruppe - Tetracyclin (30)

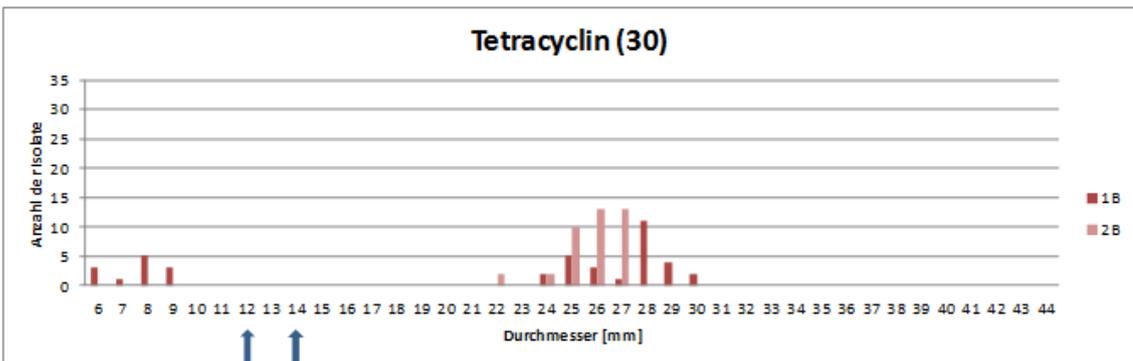


Abbildung 53: Zeitpunktvergleich Zusatzstoffgruppe - Tetracyclin (30)

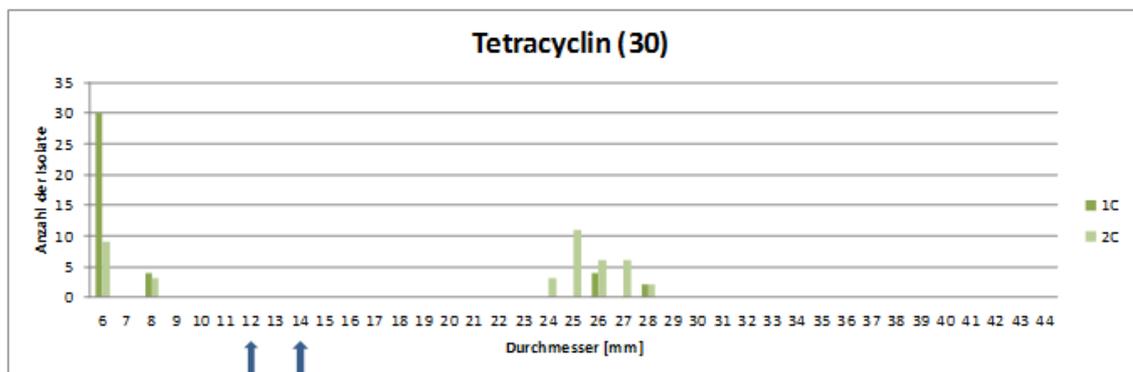


Abbildung 54: Zeitpunktvergleich Antibiotikumgruppe - Tetracyclin (30)

Es gibt 70 Tetracyclin-resistente Isolate. Alle anderen 175 Isolate sind gegenüber diesem Antibiotikum sensibel. Im Intermediärbereich sind keine Isolate vorhanden. Die Antibiotikumgruppe dominiert bei dem Vorkommen resistenter Isolate. Sonst sind die Gruppen gleich aufgeteilt. Die resistenten Isolate der Antibiotikumgruppe stammen vor allem vom Zeitpunkt 1. Auch die resistenten Isolate der Zusatzstoffgruppe sind vorwiegend von diesem Zeitpunkt.

#### 4.1.8 Streptomycin (10)

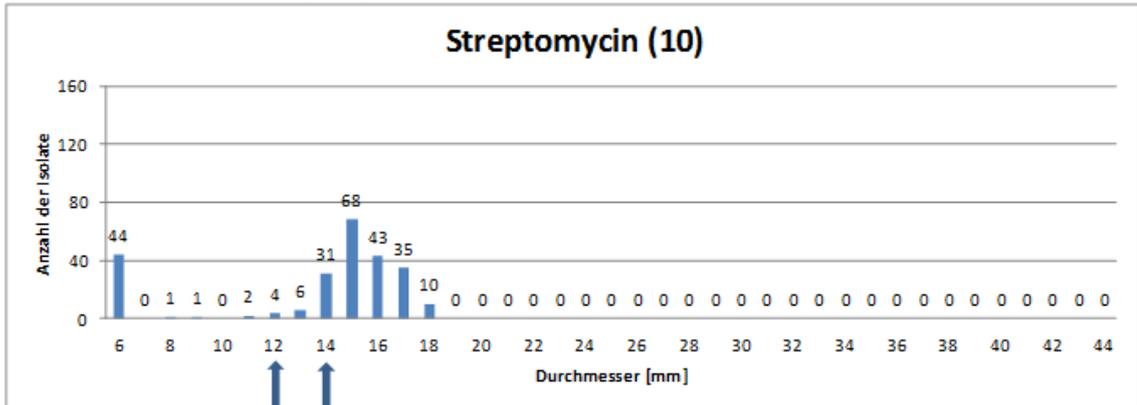


Abbildung 55: Häufigkeitsverteilung Streptomycin (10) - alle Isolate

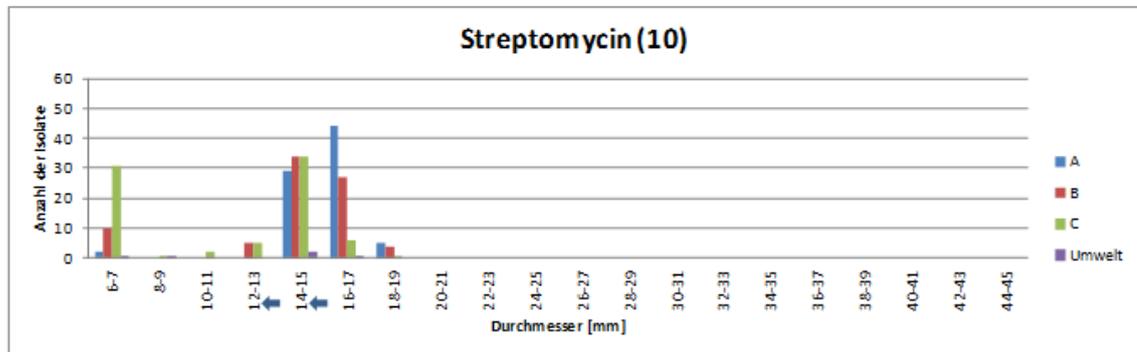


Abbildung 56: Gruppenvergleich - Streptomycin (10)

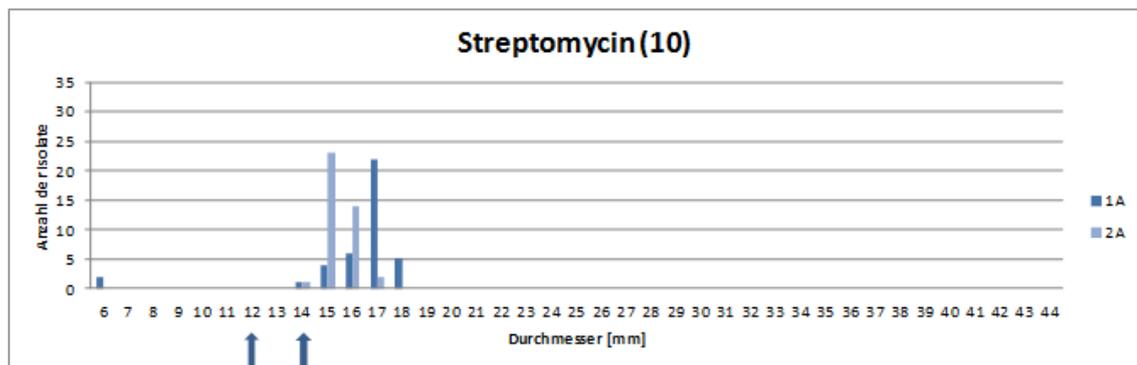


Abbildung 57: Zeitpunktvergleich Kontrollgruppe - Streptomycin (10)

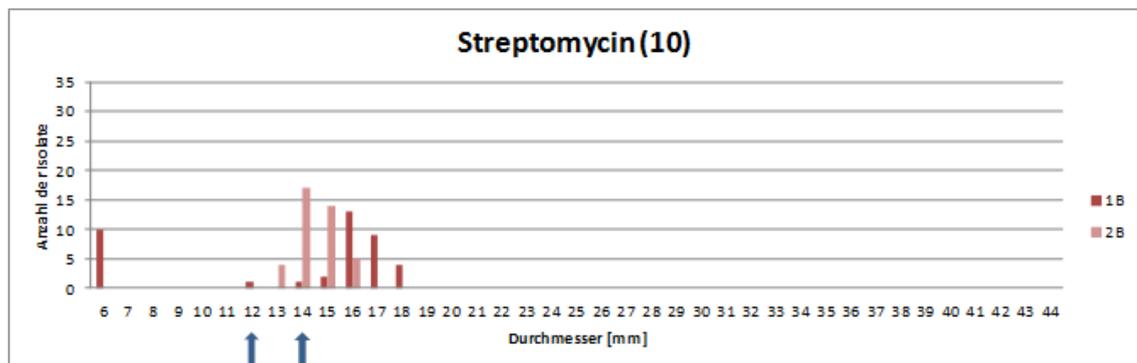


Abbildung 58: Zeitpunktvergleich Zusatzstoffgruppe - Streptomycin (10)

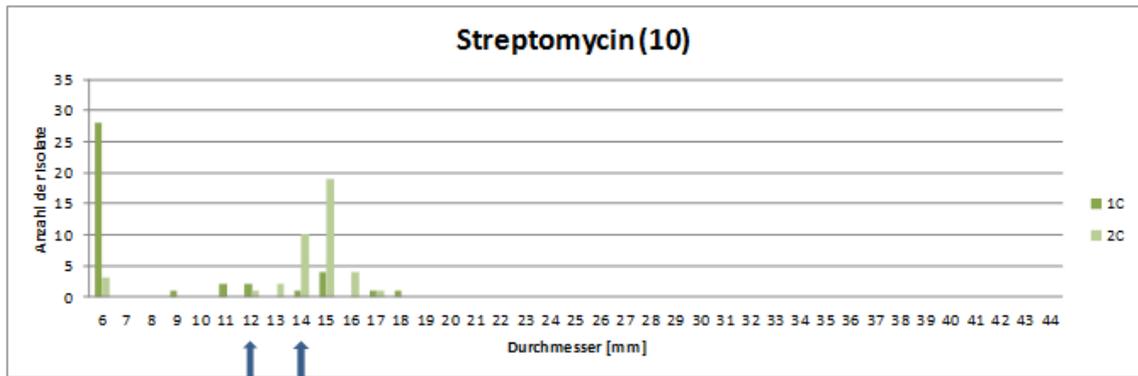


Abbildung 59: Zeitpunktvergleich Antibiotikumgruppe - Streptomycin (10)

Bei Streptomycin gibt es 47 resistente Isolate, die vor allem von der Antibiotikumgruppe des 1. Zeitpunktes stammen. Die restlichen Streptomycin-resistenten Isolate sind von der Zusatzstoffgruppe desselben Zeitpunktes. Bei diesem Antibiotikum stellt sich die Abgrenzung zwischen den sensiblen und resistenten Isolaten als schwierig dar.

#### 4.1.9 Sulfonamid (300)

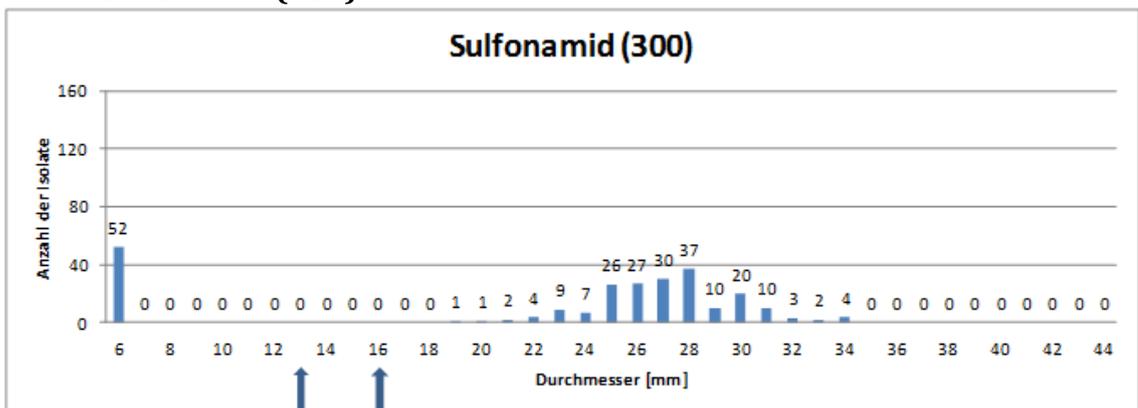


Abbildung 60: Häufigkeitsverteilung Sulfonamid (300) - alle Isolate

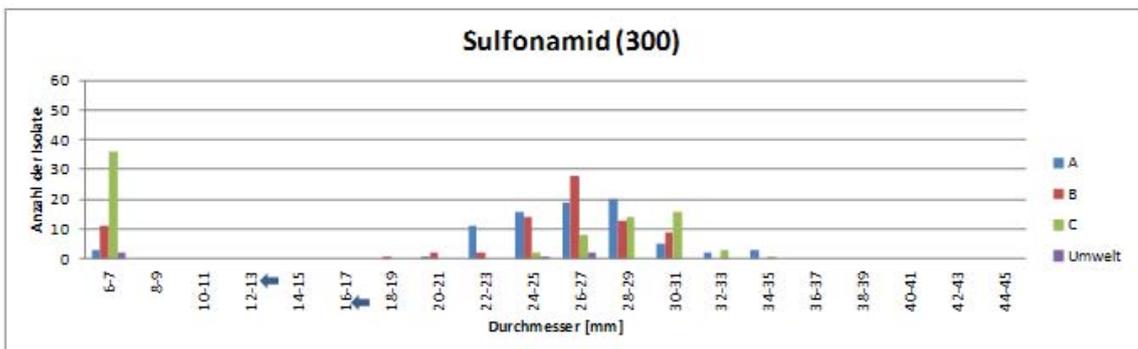


Abbildung 61: Gruppenvergleich - Sulfonamid (300)

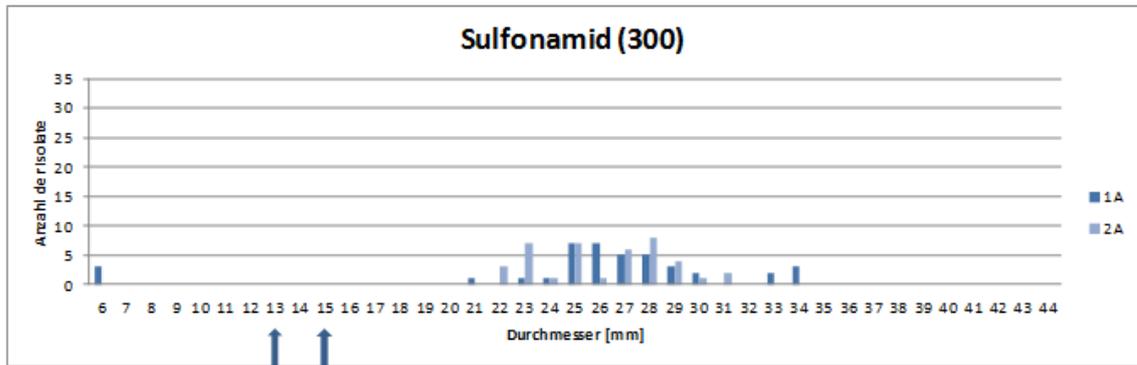


Abbildung 62: Zeitpunktvergleich Kontrollgruppe - Sulfonamid (300)

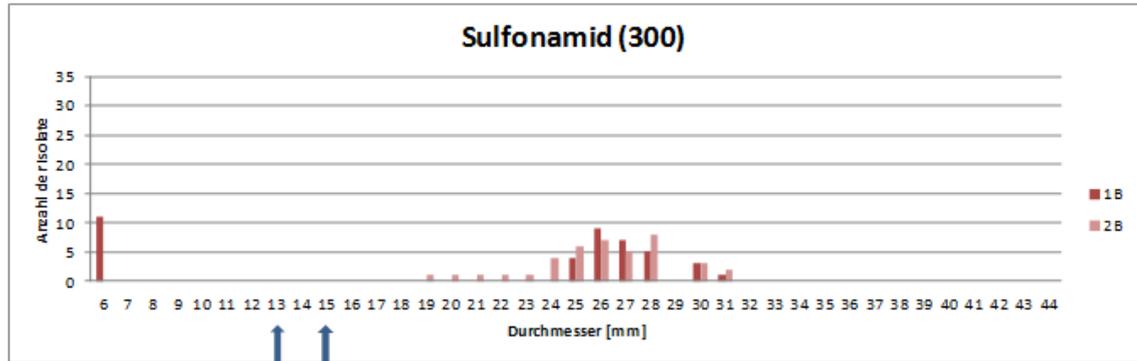


Abbildung 63: Zeitpunktvergleich Zusatzstoffgruppe - Sulfonamid (300)

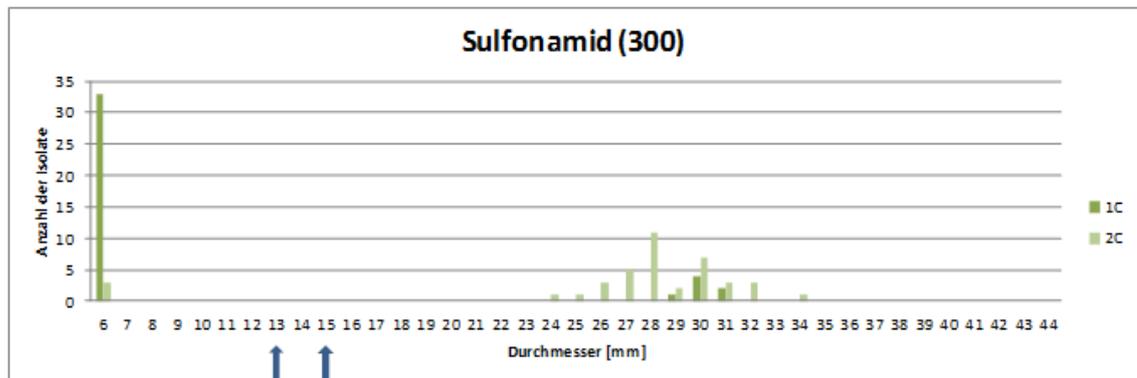


Abbildung 64: Zeitpunktvergleich Antibiotikumgruppe - Sulfonamid (300)

Bei Sulfonamid gibt es keine intermediären Isolate. Somit gibt es insgesamt 52 resistente und 193 sensible Isolate. Isolate des ersten Zeitpunktes sind wiederum in der resistenten Gruppe stark vertreten. Hauptsächlich sind die resistenten Isolate der Antibiotikumgruppe zuzuordnen.

## 4.2 Antibiotikaresistenzverteilung

Tabelle 27: Resistenzverteilung auf die einzelnen Gruppen

Antibiotikum	Zeitpunkt 1	Zeitpunkt 2	A1	A2	B1	B2	C1	C2	Umwelt	Gesamt
Penicilline und Cephalosporine	28	18	8	8	8	1	12	9	2	48
Carbapeneme	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Quinolone	53	15	3	0	11	0	39	15	3	71
Tetracyclin	54	14	8	2	12	0	34	12	2	70
Streptomycin	43	3	2	0	10	0	31	3	2	48
Sulfonamide	47	3	3	0	11	0	33	3	2	52

Die Quinolonresistenzen treten zahlenmäßig am häufigsten auf, gefolgt von Tetracyclin, Sulfonamid, Streptomycin und  $\beta$ -Lactam-Antibiotika (Ampicillin und Cefotaxim)-Resistenzen. Bei den Carbapeneme (Meropenem) traten keine Resistenzen auf. In der Kontrollgruppe wurden die wenigsten Resistenzen festgestellt. Die Zusatzstoffgruppe weist bereits mehr Resistenzen auf. Die Antibiotikumgruppe brachte die meisten Resistenzen hervor, vor allem gegenüber Quinolone.

Betrachtet man die beiden Zeitpunkte so stellt man fest, dass die Resistenzen sowohl bei der Kontrollgruppe, der Zusatzstoffgruppe und der Antibiotikumgruppe abnehmen. Zum Zeitpunkt 2 hatte die Zusatzstoffgruppe nur noch ein  $\beta$ -Laktam-resistentes Isolat. In der Kontrollgruppe gab es weiterhin acht resistente Stämme. Auch in der Antibiotikumgruppe wurden die Resistenzen dezimiert, aber nicht eliminiert.

Tabelle 28: Resistenzprofile

Antibiotikum	Zeitpunkt 1	Zeitpunkt 2	A1	A2	B1	B2	C1	C2	Umwelt	Gesamt
AMP	8	6	2	6	5	0	1	0	0	14
CIP	0	3	0	0	0	0	0	3	0	3
AMP + TE	6	2	4	2	2	0	0	0	0	8
AMP + TE + CIP	7	4	1	0	0	0	5	4	1	12
AMP + CTX + TE + S3	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1
AMP + CIP + S + S3	3	0	0	0	0	0	3	0	1	4
CIP + TE + S + S3	40	3	2	0	10	0	28	3	1	44
AMP + CIP + (S) + S3	3	0	0	0	1	0	2	0	0	3
AMP + CIP + TE + (S)	1	5	1	0	0	0	0	5	0	6
AMP + (S)	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1
(AMP) + (S)	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1
(S)	2	28	1	0	1	20	0	8	0	30
(AMP)	3	1	2	1	1	0	0	0	0	4

Die in Klammern stehenden Antibiotika stellen ein intermediäres Verhalten dar. Manche Isolate weisen auch Multiresistenzen auf.

Von den 245 Isolaten sind 44 Isolate sind gegen Ciprofloxacin, Tetracyclin, Streptomycin und Sulfonamid resistent. Diese Gruppe ist zahlenmäßig die größte. Die meisten Isolate (28) sind der Antibiotikumgruppe vom Zeitpunkt 1 zugehörig. Auch die Umweltgruppe hat ein Isolat mit solch einem Multiresistenzprofil.

Zwölf Isolate weisen eine Ampicillin-, Tetracyclin und Ciprofloxacin-Resistenz auf, wobei aus der Zusatzstoffgruppe kein einziges Isolat stammt. Ein Isolat der Umweltgruppe hat auch dieses Resistenzprofil.

Insgesamt 30 Isolate, die vor allem aus der Zusatzstoff- und Antibiotikumgruppe kommen, verhalten sich gegen Streptomycin intermediär. Davon sind 28 Isolate vom Zeitpunkt 2.

Weitere 14 Isolate sind gegenüber Ampicillin resistent, wobei nur eines aus der Antibiotikumgruppe vom Zeitpunkt 1 kommt. Fünf Isolate stammen aus der Zusatzstoffgruppe zum Zeitpunkt 1. Zwei Isolate sind aus der Kontrollgruppe vom Zeitpunkt 1 und sechs aus der Kontrollgruppe vom Zeitpunkt 2.

Neben diesen großen Profilgruppen gibt es auch kleinere Gruppen, die sich aus drei bis acht Isolaten zusammensetzen. Sie weisen entweder Einfachresistenzen (CIP); Zweifachresistenzen (AMP + TE) oder sogar Vierfachresistenzen (AMP + CIP + S + S3) auf, wobei bei einem von den vier Antibiotika auch nur ein intermediäres Verhalten festgestellt wurde (AMP + CIP + TE + (S); AMP + CIP + (S) + S3). Einige Resistenzprofile waren jeweils nur von einem Isolat vertreten. Hier ist interessant, dass das einzige Isolat, das gegenüber Ampicillin, Cefotaxim, Tetracyclin und Sulfonamid resistent ist, aus der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt 1 stammt.

### 4.3 DNA-Isolation und DNA-Konzentrationsmessung

Die DNA-Konzentration wurde bei ausgewählten Isolaten gemessen, um abschätzen zu können, ob sie für die PCR ausreichend ist. Jedoch wurde festgestellt, dass eine geringere Konzentration als 120 ng/ml keinen Einfluss auf das Ergebnis der PCR-Produkte hat. Als Beispiel wäre das Isolat A6d2 zu nennen. Dieses Phänomen hängt wahrscheinlich mit der Qualität der DNA zusammen und damit, dass eine höhere DNA-Konzentration mit einer höheren Konzentration an Hemmstoffen einhergeht. Generell wurde eine ausreichende DNA-Konzentration nachgewiesen. Um eine exakte Messung durchzuführen hätte eine Verdünnung der DNA erfolgen müssen. Die entsprechenden Agarosebilder sind aus dem Anhang zu entnehmen.

Tabelle 29: Ergebnisse DNA-Konzentrationsmessung

Isolat	End-Konzentration [ng/μl]	Isolat	End-Konzentration [ng/μl]
A1a1	>120,0	C1a1	>120,0
A1b2	>120,0	C1a2	>120,0
A2a2	>120,0	C1b2	>120,0
A2c1	>120,0	C1d2	>120,0
A2c2	94,4	C2a1	52,0
A3c2	>120,0	C3a2	>120,0
A3e1	>120,0	C3b2	>120,0
A3e2	>120,0	C3c1	>120,0
A4c1	51,6	C3d2	>120,0
A4c2	>120,0	C4b2	>120,0
A5d1	>120,0	C4d1	>120,0
A5d2	>120,0	C4e1	54,0
A6b1	77,6	C4e2	>120,0
A6d2	>120,0	C5b2	>120,0
A7c1	75,2	C5d1	>120,0
A7d2	>120,0	C5e2	>120,0
A8b1	>120,0	C6a1	>120,0
A8c1	>120,0	C6d1	>120,0
A8c2	>120,0	C7a2	>120,0
A8e2	>120,0	C7d2	>120,0
B1a1	>120,0	C7e2	>120,0
B1d2	>120,0	C8a2	>120,0
B2a1	>120,0	C8c1	118,0
B2b2	>120,0	C8d2	>120,0
B2c2	>120,0	Ec2	>120,0
B3b1	>120,0	Ec4	>120,0
B3c2	>120,0	Ec7	>120,0

Isolat	End-Konzentration [ng/μl]	Isolat	End-Konzentration [ng/μl]
B4d2	>120,0	Ec11	>120,0
B4e1	>120,0	Ec12	>120,0
B5d1	>120,0	Ec13	>120,0
B5b1	>120,0	Ec14	83,6
B5d2	>120,0	Ec15	>120,0
B6b2	>120,0	Ec16	>120,0
B6e2	>120,0	Ec17	>120,0
B7c1	>120,0	Ec18	>120,0
B7c2	89,4	Ec19	>120,0
B7d1	>120,0	Ec21	>120,0
B8e1	>120,0	-	-

#### 4.4 Vergleich der unterschiedlichen DNA-Isolationen

Die DNA-Isolation mittels Hitze wurde als eine Schnellvariante eingesetzt um verschiedene Primersysteme zu testen. Jedoch wurde festgestellt, dass bei wenigen Isolaten keine Banden sichtbar waren und darum wurde die Isolation mittels eines Kits von 5Prime durchgeführt. Hiermit wurde die DNA in höherer Reinheit und Quantität gewonnen. Die Wiederholbarkeit war nur begrenzt gegeben. Die zugehörigen Abbildungen 242 und 244 sind im Anhang zu finden.

#### 4.5 Vergleich der Primersysteme

Beim Vergleich der verschiedenen Primer wurde darauf geachtet, dass eine möglichst hohe Differenzierung erreicht wurde. Primer der RAPD-PCR waren für diesen Versuch nicht geeignet, da nur geringe Unterschiede in den Bandenmustern zu sehen war. Bei der rep-PCR wurden BOXA1R (siehe Anhang Abbildung 247) und (GTG)<sub>5</sub> (siehe Anhang Abbildung 245) ausgeschlossen, weil sie zu viele Banden mit einem hellen Hintergrund aufwiesen. Dies hätte bei der Auswertung Schwierigkeiten bereitet. Beim Primersystem ERIC1R + ERIC2 (siehe Anhang Abbildung 246) traten schärfere Banden mit einem höheren Kontrast im Vergleich zu REP1 + REP2 (siehe Anhang Abbildung 244) auf. Außerdem verteilten sich die auswertbaren Banden des ERIC-Systems über einen großen Bereich (100 bp - 3000 bp) als jene des rep-Systems (400 bp - 3000 bp). Somit erwies sich das Primersystem ERIC1R + ERIC2 als am besten geeignete Methode für die Klassifizierung der Isolate im Vergleich zur RAPD- und den anderen rep-PCR-Systemen. Es wurde als geeignet betrachtet, weil diese eine hohe Differenzierung ermöglichte und bei der Auswertung mittels BioNumerics keine Probleme bereitete.

## 4.6 PCR Typing-Gele

### 4.6.1 Primersystem ERIC1R + ERIC2

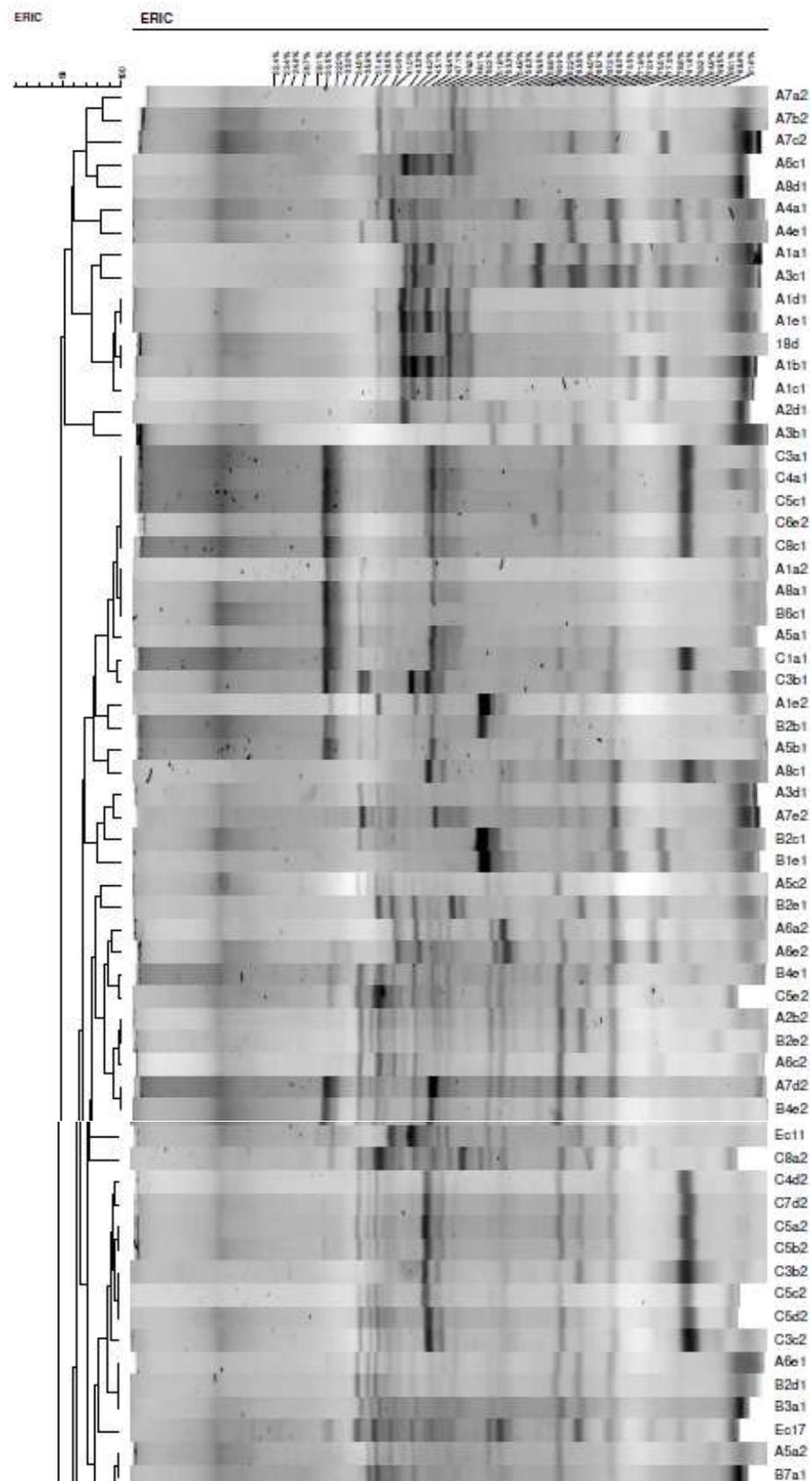


Abbildung 65: BioNumerics Auswertung

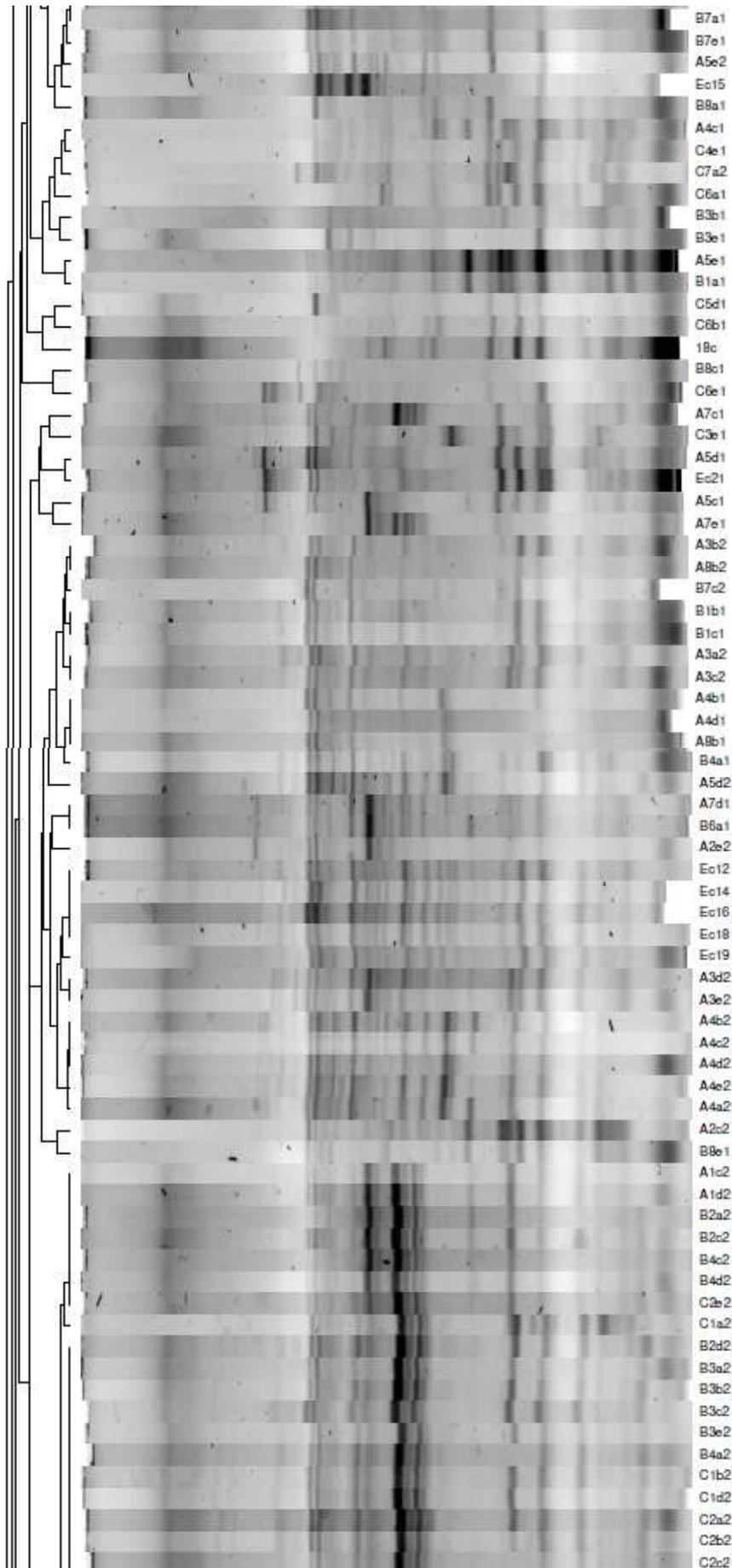


Abbildung 65: fortführend

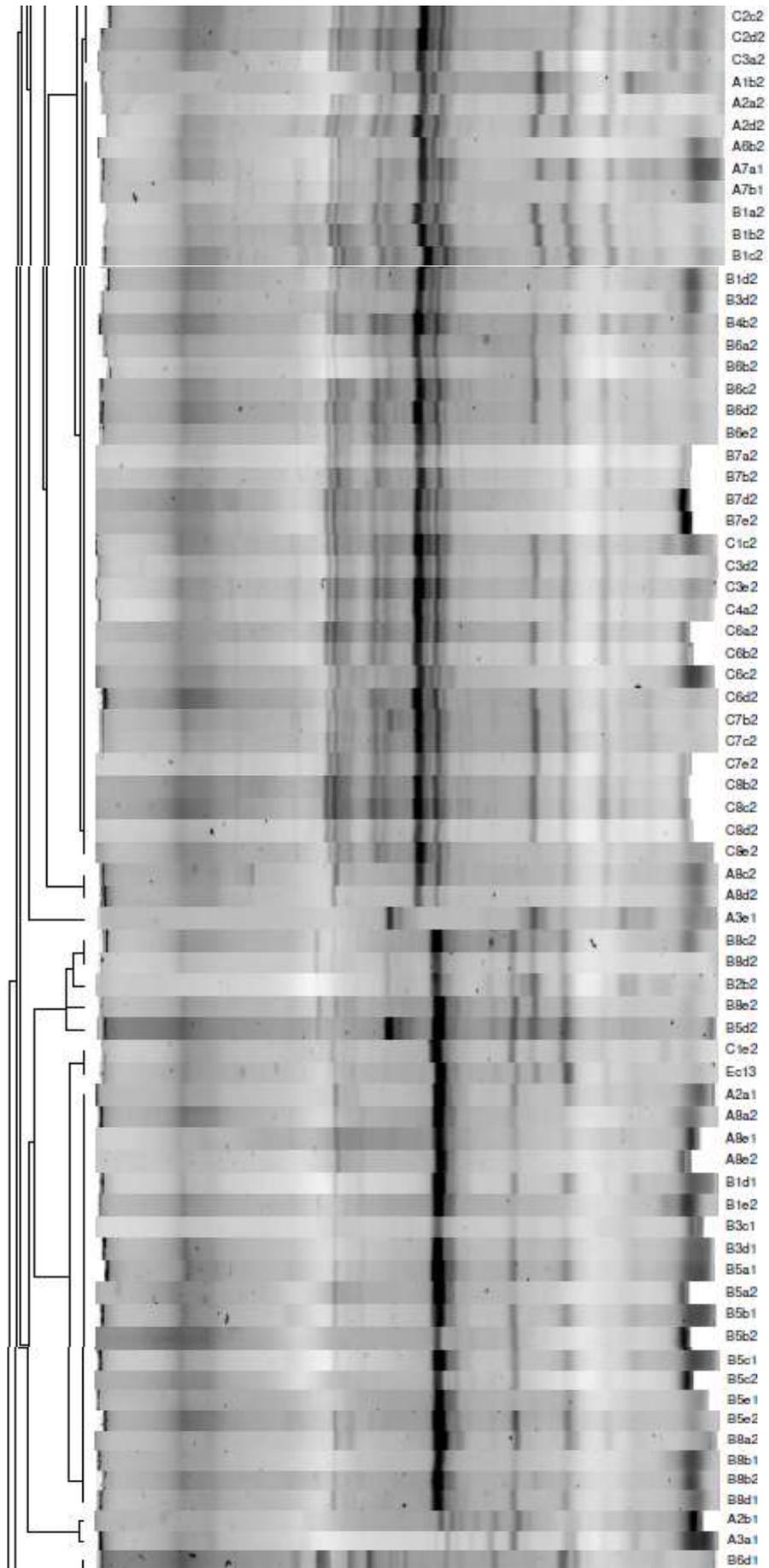
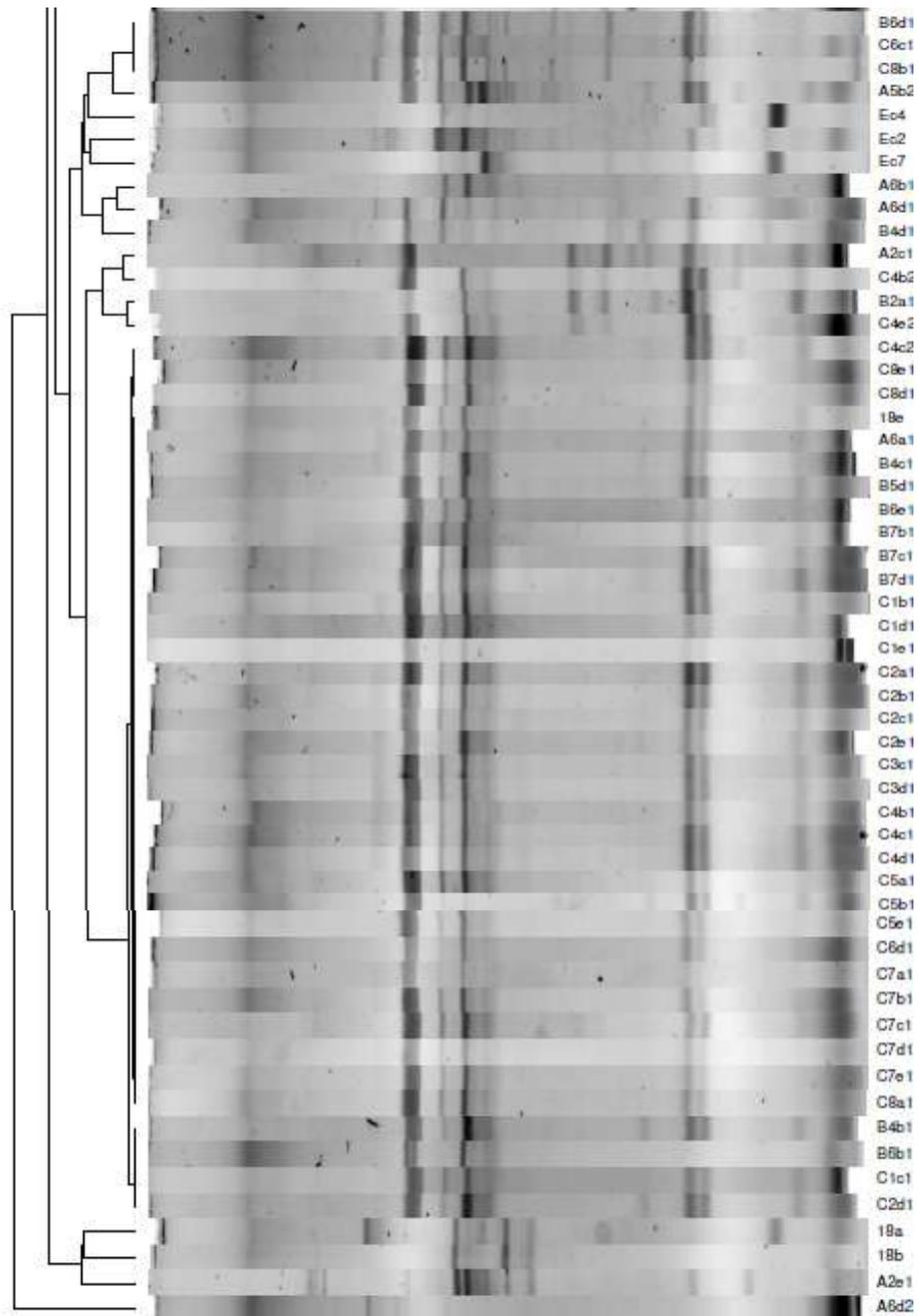


Abbildung 65: fortführend



**Abbildung 65: fortführend**

Die erhaltenen Bandenmuster sind stark mit scharf abgegrenzten Banden. Außerdem konnten die Isolate gut differenziert werden, die Ergebnisse waren gut wiederholbar und die hohe Differenzierung, guter Wiederholbarkeit und durch einen geringen Hintergrund aus. Die Agarosegelbilder sind aus dem Anhang zu entnehmen.

## 4.7 Bandenmuster kombiniert mit Antibiotikaresistenzprofilen

Die folgende Grafik zeigt eine kombinierte Auswertung von Bandenmustern und Antibiotikaresistenzprofilen.

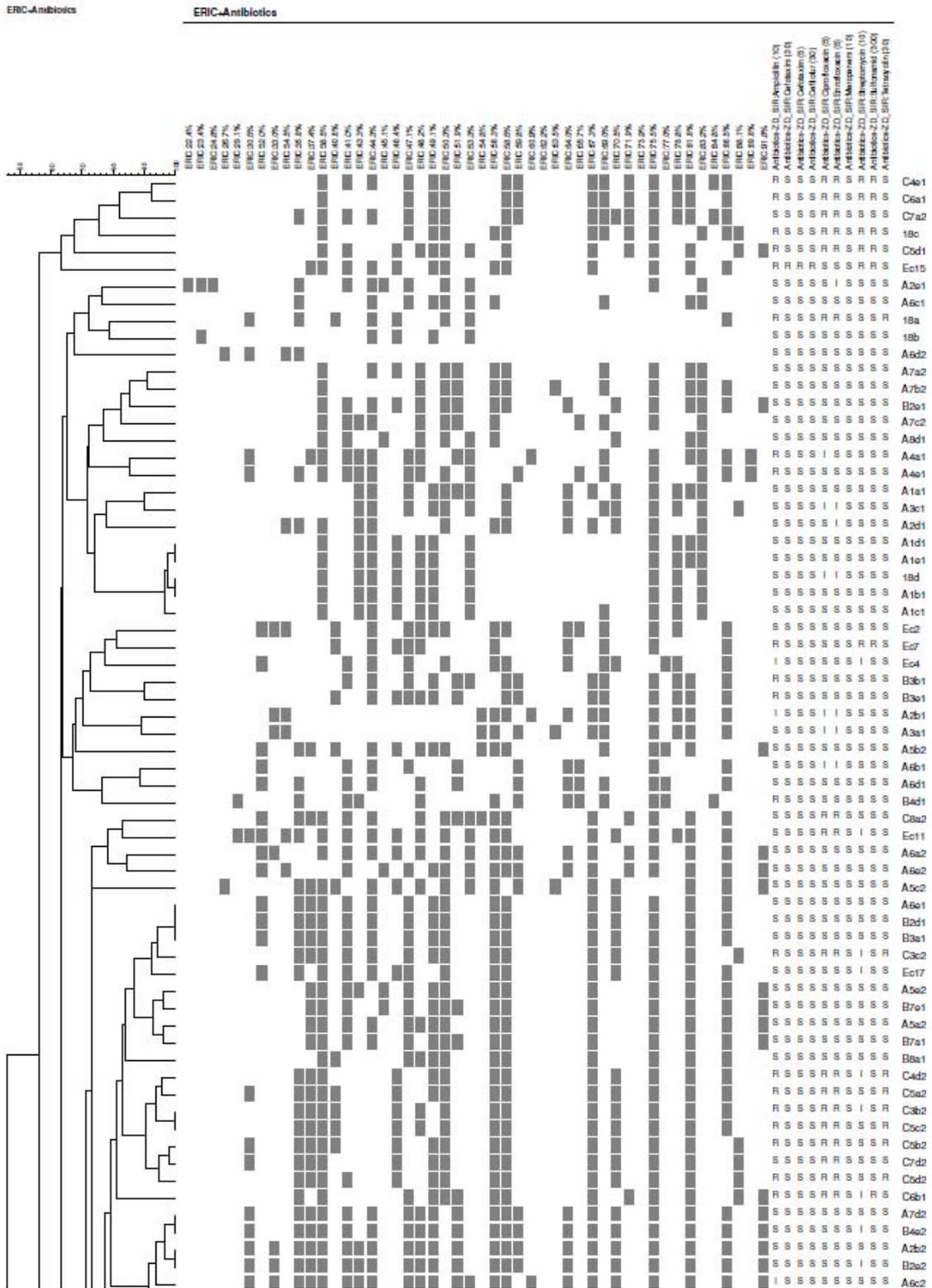


Abbildung 66: BioNumerics Auswertung Comparison Typing+Antibiotics

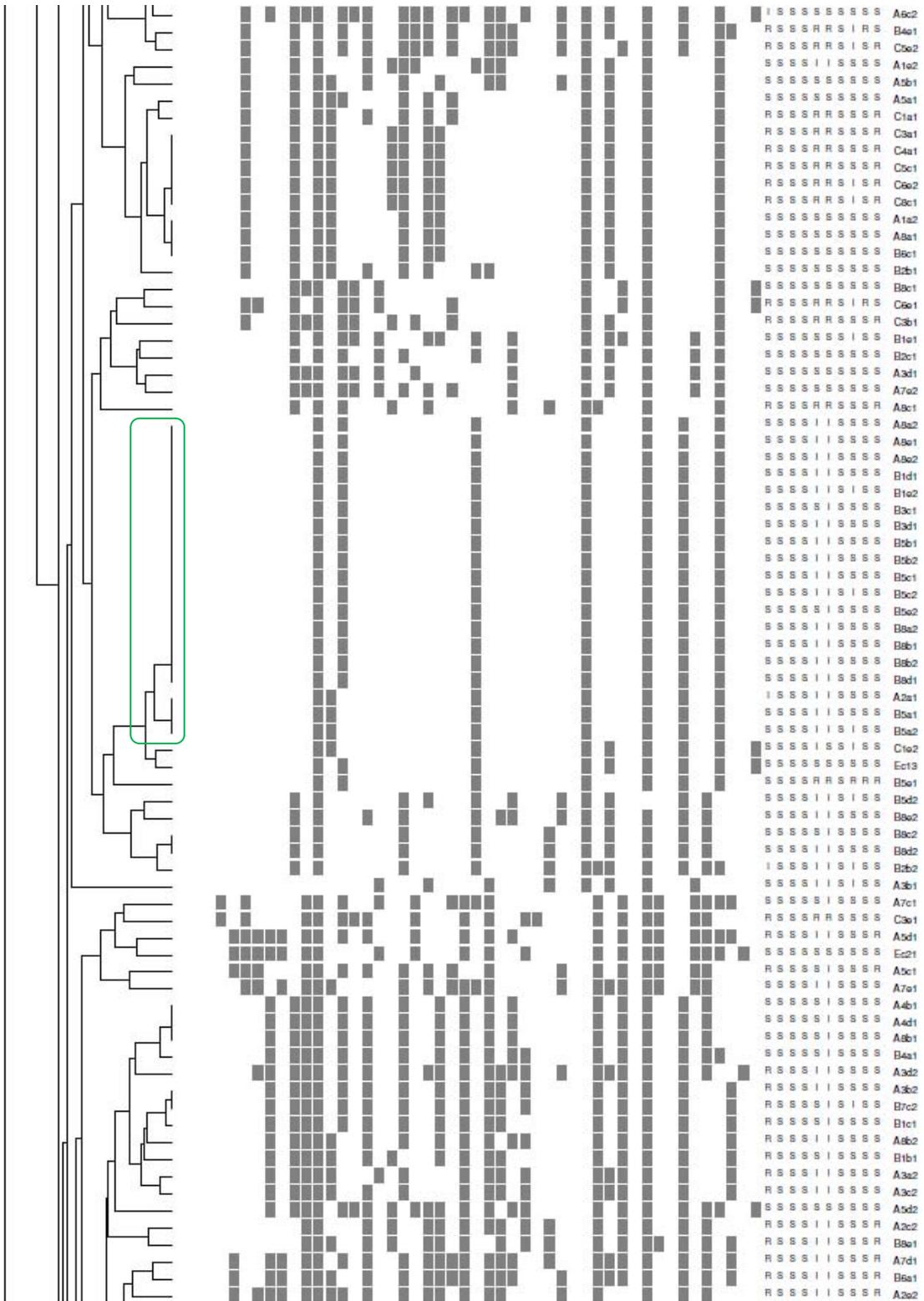


Abbildung 66: fortführend

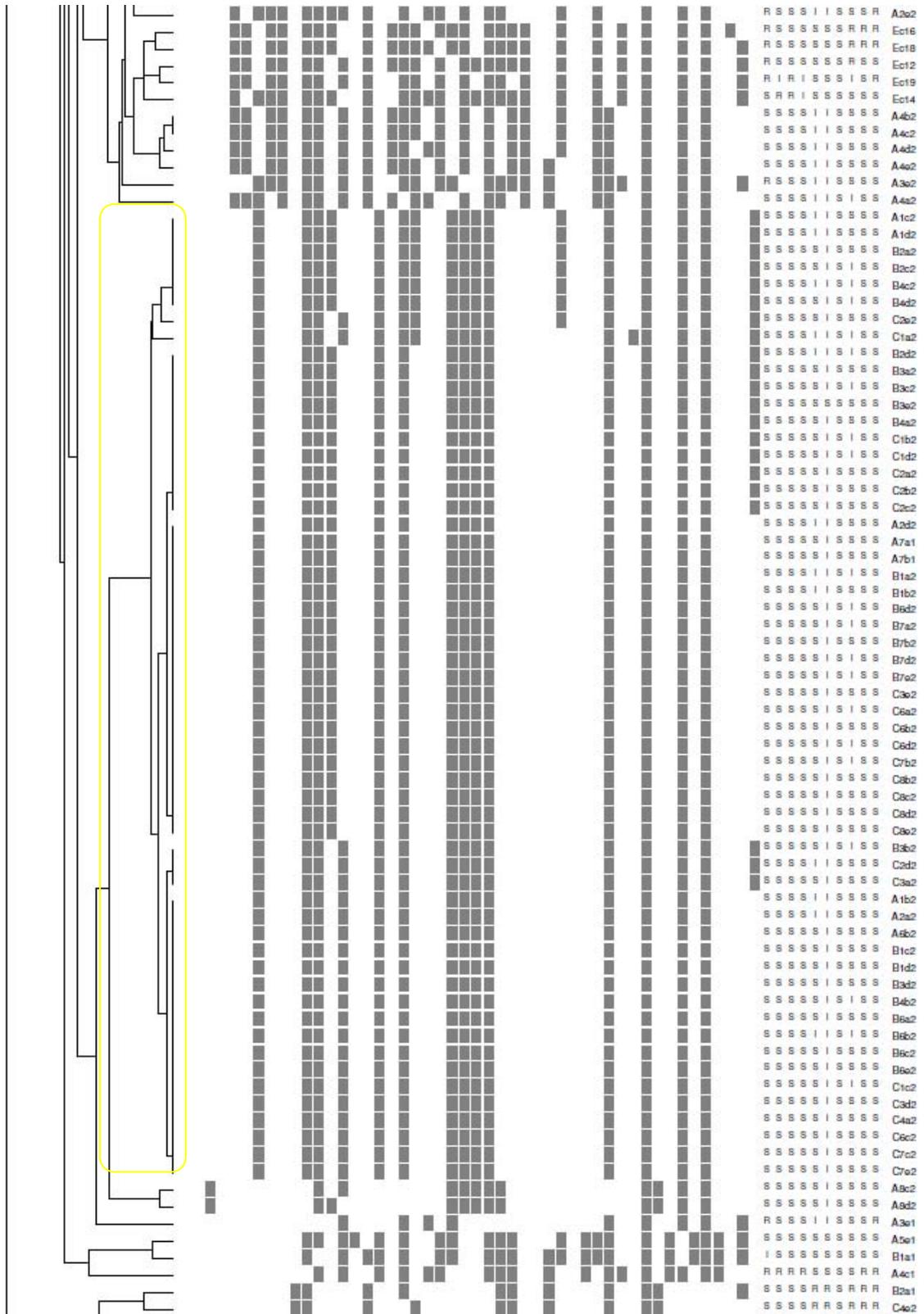


Abbildung 66: fortführend

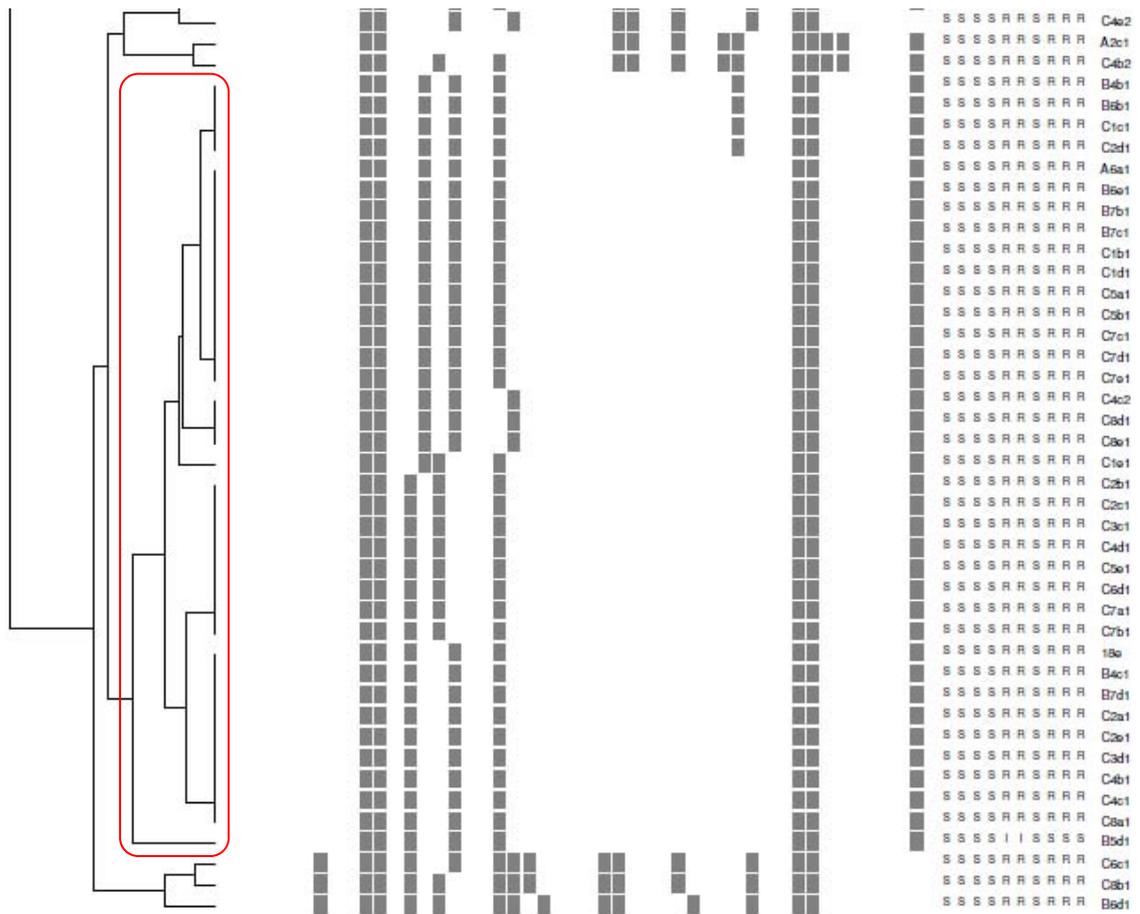


Abbildung 66: fortführend

Auffällig ist, dass vor allem rund um das Isolat der Umweltprobe 18e sich eine große Gruppe mit einem ähnlichen Bandenmuster (rote Markierung) befindet. Zahlenmäßig sind die Isolate der Antibiotikumgruppe vom Zeitpunkt 1 am meisten in diesem Cluster vertreten. Isolate dieses Clusters sind gegen Ciprofloxacin, Enrofloxacin, Tetracyclin, Streptomycin und Sulfonamid resistent.

Eine weiterer großer Cluster mit einem markanten Bandenmuster (gelbe Markierung) besteht aus Isolaten von der Kontroll-, Zusatzstoff-, und Antibiotikumgruppe zum Zeitpunkt 2. Isolate dieses Clusters verhalten sich vor allem gegenüber Cipro- und Enrofloxacin intermediär. Dieses Resistenzmuster weisen aber auch noch Isolate eines anderen Clusters mit einem anderen Bandenmuster (grüne Markierung) auf. Dieser Cluster beinhaltet Isolate aus der Zusatzstoff- und Kontrollgruppe, die zu beiden Zeitpunkten gezogen worden sind.

Es gibt auch noch viele kleinere Cluster, die sich durch ihr Bandenmuster und Resistenzverhalten unterscheiden. Von jedem Cluster wurden für weitere Analysen geeignete Isolate ausgewählt.

## 4.8 Microarray

Die mit dieser Methode detektierbaren Gene sind im Anhang angeführt.

Im Rahmen der Microarray-Analysen konnten durchwegs starke Signale detektiert werden, wobei manche Familien-spezifische Gene schwach und unter dem Schwellenwert (Treshold) lagen. Diese schwachen Signale sind in der Tabelle 30 und 31 mit gelber Schrift markiert, grün hingegen sind alle positiven Signale. Keine Familien-spezifischen Gene wurden bei 18b, A2e2, A5e1 und A4b2 nachgewiesen. Die Kontrollen haben fast alle Proben, außer C8a2 und A5e1, bestanden. Somit konnte bei diesen Isolaten die Zugehörigkeit zur Familie der *Enterobacteriaceae* nicht bestätigt werden.

**Tabelle 30: Microarray-Kontrolle**

Isolat	Positiv Kontrolle	Negativ Kontrolle	<i>Enterobacteriaceae</i>	Familien-spezifische Gene
18b	bestanden	bestanden	Nein	negativ
A1d1	bestanden	bestanden	Ja	gapA, ihfA, hemL, dnaE
A8a1	bestanden	bestanden	Ja	gapA, ihfA, hemL, dnaE
A5d2	bestanden	bestanden	Ja	gapA, ihfA, hemL, dnaE
A6e2	bestanden	bestanden	Ja	gapA, ihfA, hemL, dnaE
B8a1	bestanden	bestanden	Ja	gapA, ihfA, hemL, dnaE
B2c1	bestanden	bestanden	Ja	gapA, ihfA, hemL, dnaE
B3e2	bestanden	bestanden	Ja	gapA, ihfA, hemL, dnaE
18e	bestanden	bestanden	Ja	gapA, ihfA, hemL, dnaE
C4e2	bestanden	bestanden	Ja	gapA, ihfA, hemL, dnaE
C2a1	bestanden	bestanden	Ja	gapA, ihfA, hemL, dnaE
A2c1	bestanden	bestanden	Ja	gapA, ihfA, hemL, dnaE
C2a2	bestanden	bestanden	Ja	gapA, ihfA, hemL, dnaE
18d	bestanden	bestanden	Ja	gapA, ihfA, hemL, dnaE
B8e2	bestanden	bestanden	Ja	gapA, ihfA, hemL, dnaE
B5a2	bestanden	bestanden	Ja	gapA, ihfA, hemL, dnaE
A5d1	bestanden	bestanden	Ja	gapA, ihfA, hemL, dnaE
A2e2	bestanden	bestanden	Nein	negativ
A4c1	bestanden	bestanden	Ja	gapA, ihfA, hemL, dnaE
A8c1	bestanden	bestanden	Ja	gapA, ihfA, hemL, dnaE
18a	bestanden	bestanden	Ja	gapA, ihfA, hemL, dnaE
C3b1	bestanden	bestanden	Ja	gapA, ihfA, hemL, dnaE
A4e1	bestanden	bestanden	Ja	gapA, ihfA, hemL, dnaE
B4d1	bestanden	bestanden	Ja	gapA, ihfA, hemL, dnaE
A3d2	bestanden	bestanden	Ja	gapA, ihfA, hemL, dnaE
B1a1	bestanden	bestanden	Ja	gapA, ihfA, hemL, dnaE
C6e1	bestanden	bestanden	Ja	gapA, ihfA, hemL, dnaE
B7d2	bestanden	bestanden	Ja	gapA, ihfA, hemL, dnaE
C1b2	bestanden	bestanden	Ja	gapA, ihfA, hemL, dnaE
C3e1	bestanden	bestanden	Ja	gapA, ihfA, hemL, dnaE
18c	bestanden	bestanden	Ja	gapA, ihfA, hemL, dnaE
C6a1	bestanden	bestanden	Ja	gapA, ihfA, hemL, dnaE
C3c2	bestanden	bestanden	Ja	gapA, ihfA, hemL, dnaE
C8a2	fehlgeschlagen	bestanden	Nein	gapA, ihfA, hemL, dnaE
C7d2	bestanden	bestanden	Ja	gapA, ihfA, hemL, dnaE
A5e1	fehlgeschlagen	fehlgeschlagen	Nein	negativ
A4b2	bestanden	bestanden	Nein	negativ

Isolat	Positiv Kontrolle	Negativ Kontrolle	Enterobacteriaceae	Familien-spezifische Gene
CM	bestanden	bestanden	Ja	gapA, ihfA, hemL, dnaE
Ec16	bestanden	bestanden	Ja	gapA, ihfA, hemL, dnaE

Tabelle 31: Resistenzprofile und Resistenzgene ausgewählter Isolate

Isolat	AMP (10)	CTX (5)	CTX (30)	EFT (30)	MEM (10)	CIP (5)	ENR (5)	TE (30)	S (10)	S3 (300)	Aminoglycoside	β-Lactamase	Chinolone	Sulphonamide	Tetracycline	Integrase
A1d1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S						
A8a1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S						
A5d2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S						
A6e2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S						
B8a1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S						
B2c1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S						
B3e2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S						
18e	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	strA, strB			sul2	tetA_11	
C4e2	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	strA, strB			sul2	tetA_11	
C2a1	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	strA, strB			sul2	tetA_11	
A2c1	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	strA, strB			sul2	tetA_11	
C2a2	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S						
18d	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S						
B8e2	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S						
B5a2	S	S	S	S	S	I	I	S	I	S						
A5d1	R	S	S	S	S	I	I	R	S	S		blaTEM			tetA_11	
A4c1	R	R	R	R	S	S	S	R	S	R	aadA4			sul2	tetA_11	int1
A8c1	R	S	S	S	S	R	R	R	S	S		ctxM1			tetA_11	
18a	R	S	S	S	S	R	R	R	S	S		blaTEM			tetB_11	
C3b1	R	S	S	S	S	R	R	R	S	S		blaTEM			tetB_11	
A4e1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S		blaTEM				
B4d1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S		blaTEM				
A3d2	R	S	S	S	S	I	I	S	S	S		blaTEM	qnrS			
B1a1	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S		blaTEM				
C6e1	R	S	S	S	S	R	R	S	I	R	aadA1			sul3		int1
B7d2	S	S	S	S	S	S	I	S	I	S						
C1b2	S	S	S	S	S	S	I	S	I	S						
C3e1	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S		blaTEM				
18c	R	S	S	S	S	R	R	S	R	R	aadA1, aadA2			sul3		int1
C6a1	R	S	S	S	S	R	R	S	R	R	aadA1, aadA2			sul3		int1
C3c2	R	S	S	S	S	R	R	R	I	S		blaTEM			tetB_11	
C8a2	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	blaTEM					
C7d2	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	blaTEM				tetB_11	
CM					n. t.						aac6Ib				tetA_11	
Ec16	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R	aadA1			sul1	tetC_11	int1

S = sensibel; I = intermediär; R = resistent; n.t. = nottested

In der vorigen Tabelle wird der Vergleich zwischen den genotypischen und phänotypischen Ergebnissen gezeigt. Bei Streptomycin konnten bei allen resistenten Isolaten die Resistenzgene gefunden werden. Bei dem Isolat A4c1 wurde zusätzlich das Gen für die Aminoglycosidresistenz detektiert, aber keine Resistenz beim Agardiffusionstest festgestellt. Alle gegenüber Ampicillin phänotypisch resistenten Isolate weisen auch ein dafür verantwortliches Resistenzgen auf. Die Isolate C8a2 und C7d2 haben wiederum ein  $\beta$ -Lactamase-Resistenzgen, obwohl keine Ampicillin-Resistenz beim Agardiffusionstest detektiert wurde. Ein Gen für die Quinolonresistenz wurde nur bei dem Isolat A3d2 gefunden, das bei der phänotypischen Untersuchung nur ein intermediäres Verhalten gegenüber Cipro- und Enrofloxacin zeigte. Ein Gen für die Quinolonresistenz wurde nicht bei den Stämmen mit einer ausgeprägten Enro- und Ciprofloxacinresistenz festgestellt. Alle Sulfonamid-resistenten Isolate besitzen ein Resistenzgen und ebenso alle Tetracyclin-resistenten Isolate.

Mit Hilfe des Microarray wurde auch eine Integrase bei den Isolaten A4c1, 18c, C6a1 und Ec16 nachgewiesen.

## **4.9 Test des Wachstumsverhaltens**

Es wurde jeweils ein Doppelansatz durchgeführt. Das heißt, dass die erhaltenen Kurven Mittelwerte darstellen. Jedoch wurde bei Versuch 4 die doppelten Ansätze einzeln dargestellt, da es teilweise zu einem unterschiedlichen Kurvenverlauf kam.

Für den Test des Wachstumsverhaltens wurden resistente und sensible Isolate ausgewählt. Für die Entscheidungsfindung wurden Informationen der kombinierten Auswertung vom Typing und Microarray herangezogen. Das Isolat 18e weist eine Cipro- und Enrofloxacinresistenz auf. Auch A4c1 verfügt über mehrere Resistenzen. A1d1 gehört zu den sensiblen Isolaten, A2d2 verfügt als einziges Isolat über ein Quinolonresistenzgen, gehört aber zu den intermediären Isolaten. Genauere Informationen sind aus der Tabelle 32 zu entnehmen.

### **4.9.1 Nährmedienauswahl**

Als geeignete Nährmedien wurden MHB und TSB ausgewählt. TSB wurde gewählt, weil es zur Anzucht verwendet wird und damit die beste Wachstumsperformance möglich war. Das Nährmedium MHB erlaubt am ehesten eine Differenzierung der Wachstumsperformance der Isolate unter Einfluss des Zusatzstoffes. Diese werden in der weiterführenden Masterarbeit verwendet. Die Nährmedien LB-Bouillon, TSB+Hem und VRBD wurden ausgeschlossen, da diese eine schlechtere Wachstumsperformance als MHB und TSB aufweisen.

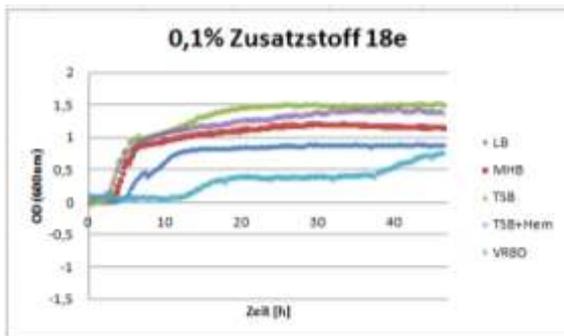


Abbildung 67: Wachstumskurven des Isolates 18e bei 0,1% Zusatzstoff in verschiedenen Nährmedien

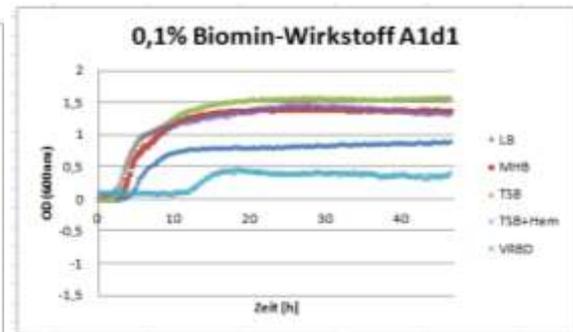


Abbildung 68: Wachstumskurven des Isolates A1d1 bei 0,1% Zusatzstoff in verschiedenen Nährmedien

#### 4.9.2 Versuchsvergleich der Konzentrationen des Zusatzstoffes im Nährmedium TSB

Bei diesem Nährmedium kam es bei der Umweltprobe 18e bei den Konzentrationen 0,3% und 0,4% des Zusatzstoffes zu unterschiedlichen Wachstumskurven, wohingegen zwischen 0,1% und 0,2% nur minimale Diskrepanzen auftraten. Bei der Konzentration 0,3% unterscheidet sich der Versuch 2 von den anderen. Bei den Konzentrationen 0,1%, 0,2% und 0,3% zeigen die Kurven nach einer exponentiellen Phase das Einsetzen einer stationären Phase und anschließend begann erneut ein Wachstumsanstieg. Bei 0,4% beginnt bei Versuch 4 bei einem Ansatz das Wachstum erst nach ca. 48h und bei einem anderen Ansatz nach ca. 58 h. Bei Versuch 5 fängt 18e erst nach ca. 65 h zu wachsen an. Bei den Versuchen 1 und 2 betrug die Laufzeit noch nicht 72 h, das heißt, dass ein möglicher Anstieg des Wachstums noch nicht detektiert werden konnte.

Das Isolat A4c1 verhält sich in diesem Nährmedium ähnlich. Beim 4. Versuch wurde bei der Zusatzstoffkonzentration von 0,4%, auch ein unterschiedlicher Kurvenverlauf bei den beiden Ansätzen festgestellt.

Das Isolat A1d1 verfügt über ähnliche Wachstumskurven wie die beiden zuvor erwähnten Isolate.

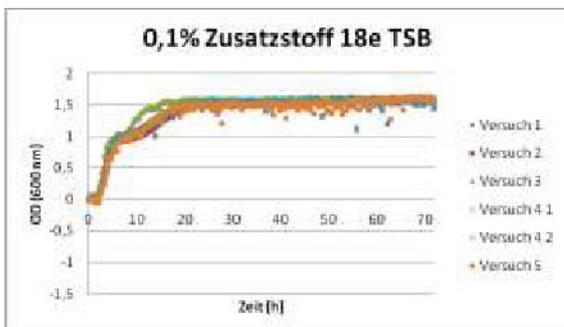


Abbildung 69: Wachstumskurven des Isolates 18e bei 0,1% Zusatzstoff im Nährmedium TSB

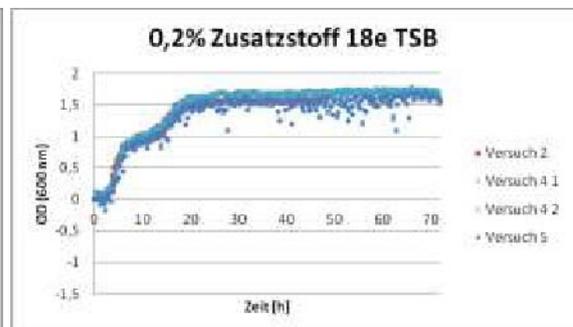


Abbildung 70: Wachstumskurven des Isolates 18e bei 0,2% Zusatzstoff im Nährmedium TSB

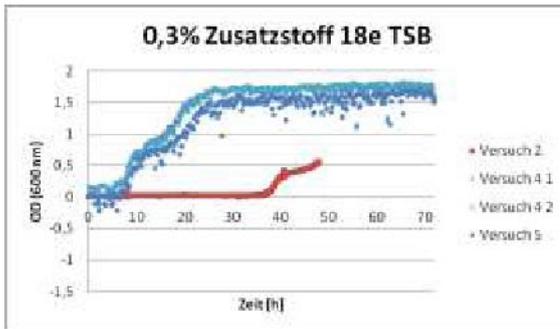


Abbildung 71: Wachstumskurven des Isolates 18e bei 0,3% Zusatzstoff im Nährmedium TSB

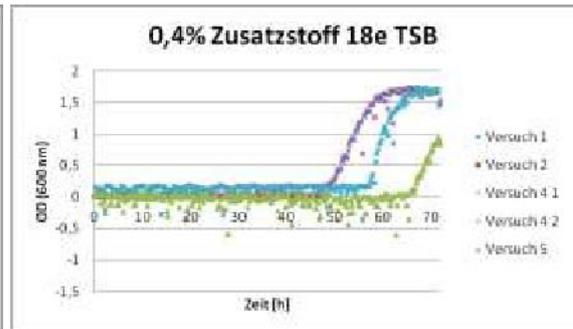


Abbildung 72: Wachstumskurven des Isolates 18e bei 0,4% Zusatzstoff im Nährmedium TSB

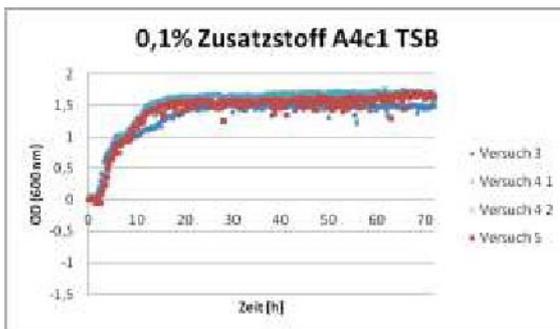


Abbildung 73: Wachstumskurven des Isolates A4c1 bei 0,1% Zusatzstoff im Nährmedium TSB

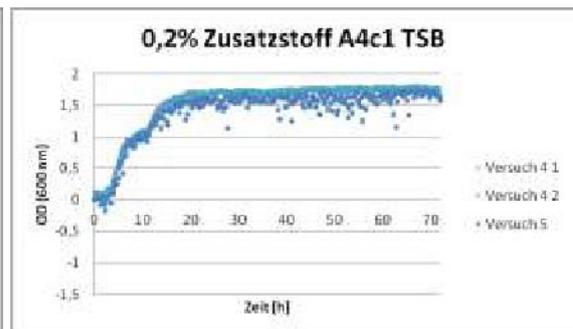


Abbildung 74: Wachstumskurven des Isolates A4c1 bei 0,2% Zusatzstoff im Nährmedium TSB

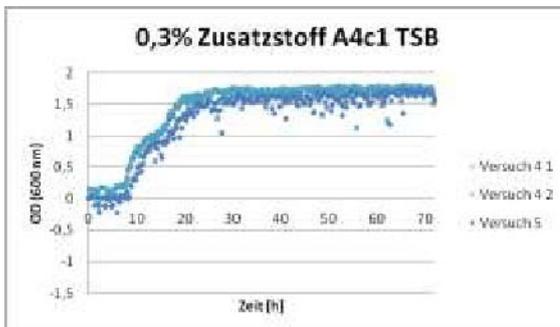


Abbildung 75: Wachstumskurven des Isolates A4c1 bei 0,3% Zusatzstoff im Nährmedium TSB

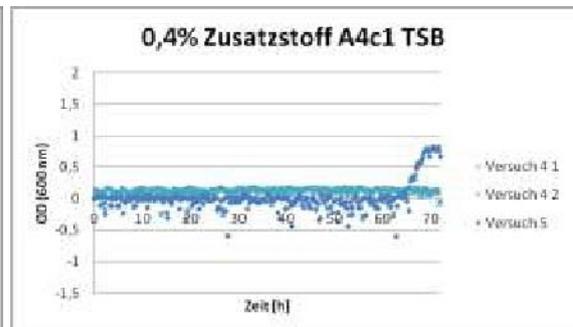


Abbildung 76: Wachstumskurven des Isolates A4c1 bei 0,4% Zusatzstoff im Nährmedium TSB

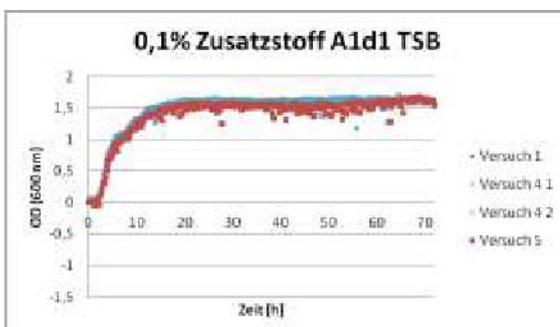


Abbildung 77: Wachstumskurven des Isolates A1d1 bei 0,1% Zusatzstoff im Nährmedium TSB

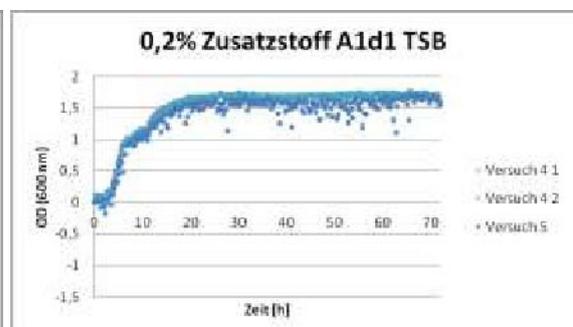
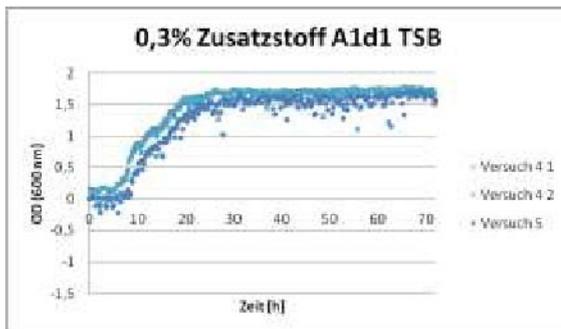
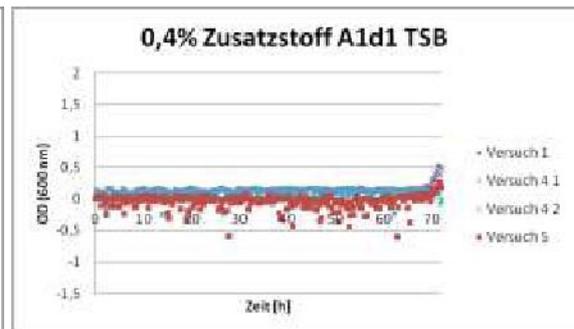


Abbildung 78: Wachstumskurven des Isolates A1d1 bei 0,2% Zusatzstoff im Nährmedium TSB



**Abbildung 79: Wachstumskurven des Isolates A1d1 bei 0,3% Zusatzstoff im Nährmedium TSB**



**Abbildung 80: Wachstumskurven des Isolates A1d1 bei 0,4% Zusatzstoff im Nährmedium TSB**

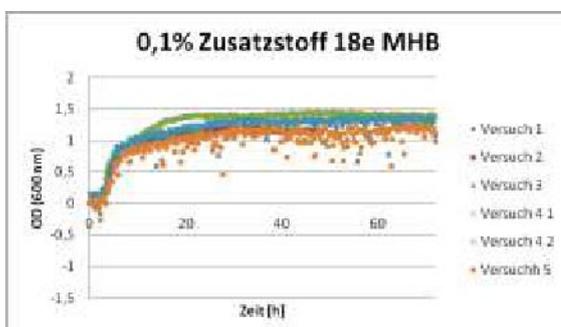
### 4.9.3 Versuchsvergleich der Konzentrationen des Zusatzstoffes im Nährmedium MHB

Beim Isolat 18e traten bei der Konzentration 0,1% kaum Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchen auf. Bei 0,2% stellten sich große Unterschiede ein. Bei Versuch 2 setzte etwa nach 15 h das Wachstum ein, bei Versuch 5 hingegen erst nach ca. 55 h. Beim Versuch 4 gab es wiederum zwei verschiedenen Wachstumskurven dieses Isolates. Bei dem ersten Ansatz trat nach 20 h und bei der zweiten erst nach 25 h Wachstum auf. Eine derartige Diskrepanz unter den einzelnen Versuchen könnte durch eine Anwesenheit von Kontamination begründet werden. Ebenso wäre ein nicht exakter Pipettiervorgang, das heißt, dass eine Konzentrationsabweichung des Zusatzstoffes oder der Bakteriensuspension vorliegen könnte, als Ursache zu nennen.

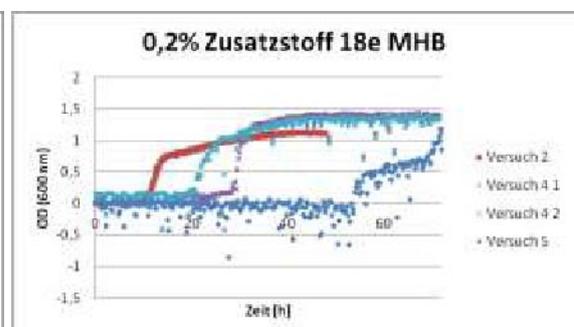
A4c1 weist bei 0,1% ähnliche Kurvenverläufe auf wie 18e. Bei 0,2% kam es genauso wie bei 18e zu variierenden Kurven bei den verschiedenen Versuchen.

Das Isolat A1d1 hat bei einer Zusatzstoffkonzentration von 0,1% eine sehr ähnliche Wachstumsperformance wie 18e und A4c1. Bei 0,2% war eine Diskrepanz wie bei 18e und A4c1 nicht zu beobachten.

Bei den Konzentrationen 0,3% und 0,4% kam es bei allen Isolaten zu keinem Wachstum.



**Abbildung 81: Wachstumskurven des Isolates 18e bei 0,1% Zusatzstoff im Nährmedium MHB**



**Abbildung 82: Wachstumskurven des Isolates 18e bei 0,2% Zusatzstoff im Nährmedium MHB**

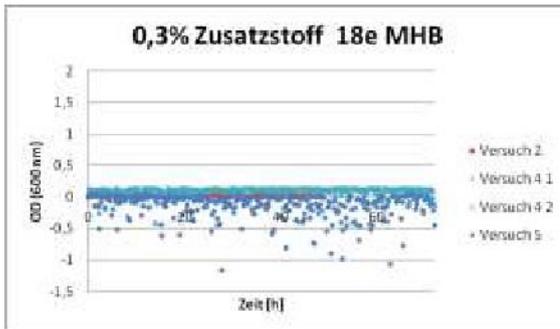


Abbildung 83: Wachstumskurven des Isolates 18e bei 0,3% Zusatzstoff im Nährmedium MHB

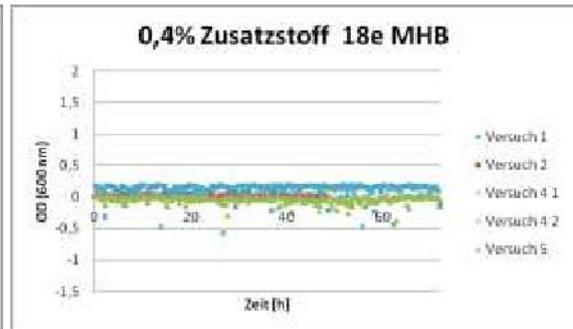


Abbildung 84: Wachstumskurven des Isolates 18e bei 0,4% Zusatzstoff im Nährmedium MHB

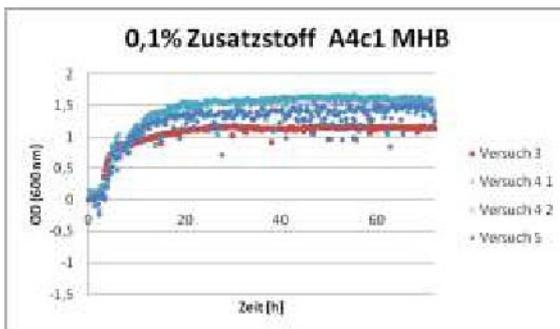


Abbildung 85: Wachstumskurven des Isolates A4c1 bei 0,1% Zusatzstoff im Nährmedium MHB

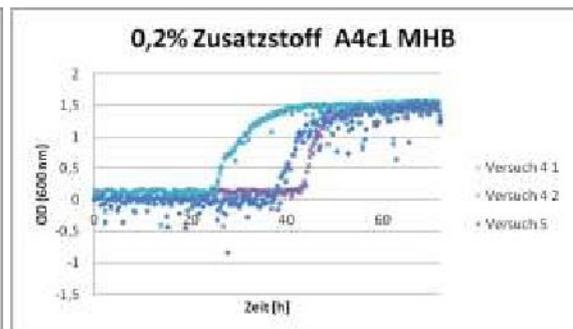


Abbildung 86: Wachstumskurven des Isolates A4c1 bei 0,2% Zusatzstoff im Nährmedium MHB

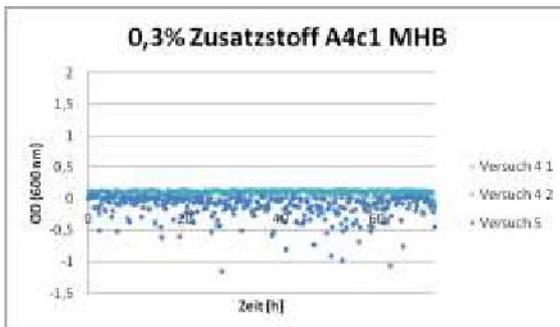


Abbildung 87: Wachstumskurven des Isolates A4c1 bei 0,13% Zusatzstoff im Nährmedium MHB

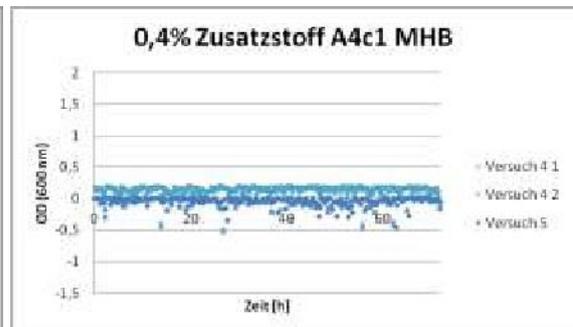


Abbildung 88: Wachstumskurven des Isolates A4c1 bei 0,4% Zusatzstoff im Nährmedium MHB

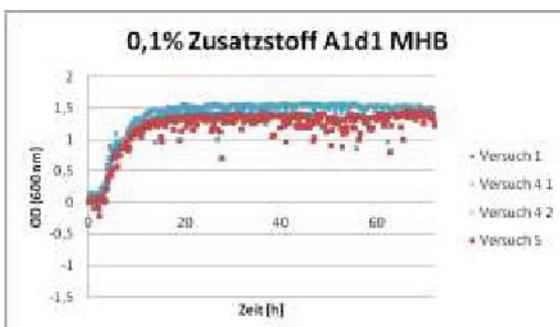


Abbildung 89: Wachstumskurven des Isolates A1d1 bei 0,1% Zusatzstoff im Nährmedium MHB

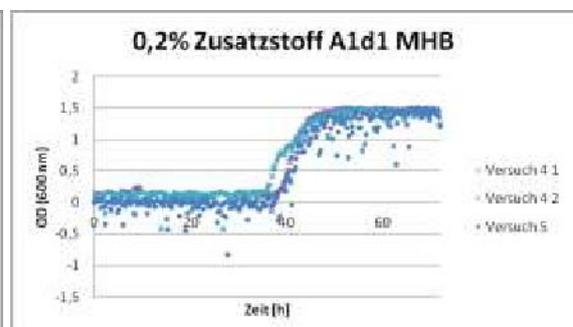


Abbildung 90: Wachstumskurven des Isolates A1d1 bei 0,2% Zusatzstoff im Nährmedium MHB

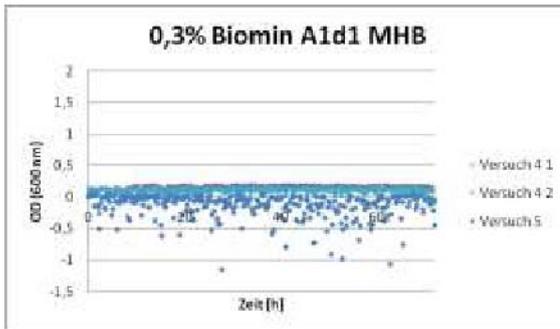


Abbildung 91: Wachstumskurven des Isolates A1d1 bei 0,3% Zusatzstoff im Nährmedium MHB



Abbildung 92: Wachstumskurven des Isolates A1d1 bei 0,4% Zusatzstoff im Nährmedium MHB

#### 4.9.4 Versuchsvergleich der Konzentrationen des Zusatzstoffes im Nährmedium TSB+Hem

Bei den Konzentrationen 0,1%, 0,2% und 0,3% des Zusatzstoffes wurde eine gute Vergleichbarkeit der einzelnen Versuche festgestellt. Bei allen 3 Isolaten gilt, dass je höher die Konzentration ist, desto später setzt die exponentielle Phase ein.

Alle drei Isolate waren in diesem Nährmedium bei einer Zusatzstoffkonzentration von 0,4% nicht in der Lage zu wachsen.

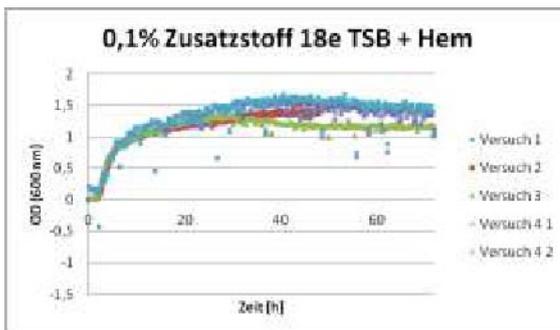


Abbildung 93: Wachstumskurven des Isolates 18e bei 0,1% Zusatzstoff im Nährmedium TSB+Hem

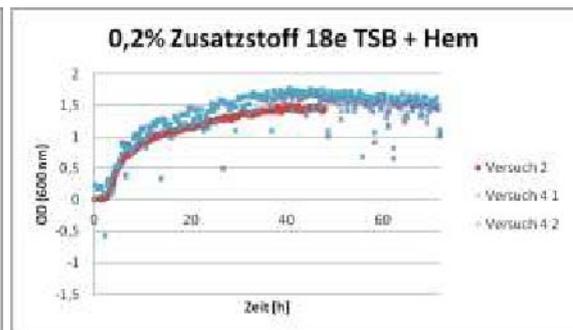


Abbildung 94: Wachstumskurven des Isolates 18e bei 0,2% Zusatzstoff im Nährmedium TSB+Hem

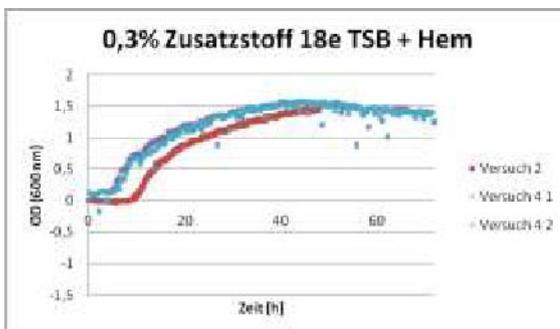


Abbildung 95: Wachstumskurven des Isolates 18e bei 0,3% Zusatzstoff im Nährmedium TSB+Hem

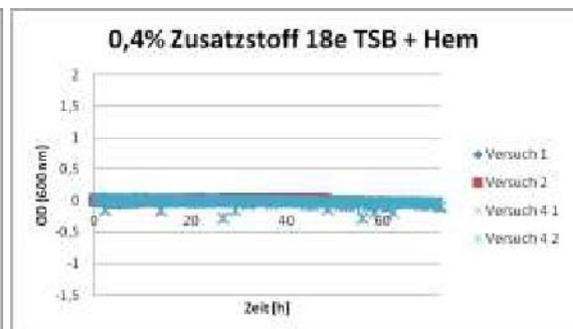


Abbildung 96: Wachstumskurven des Isolates 18e bei 0,4% Zusatzstoff im Nährmedium TSB+Hem

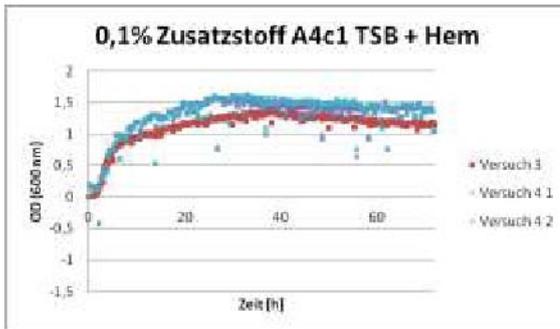


Abbildung 97: Wachstumskurven des Isolates A4c1 bei 0,1% Zusatzstoff im Nährmedium TSB+Hem

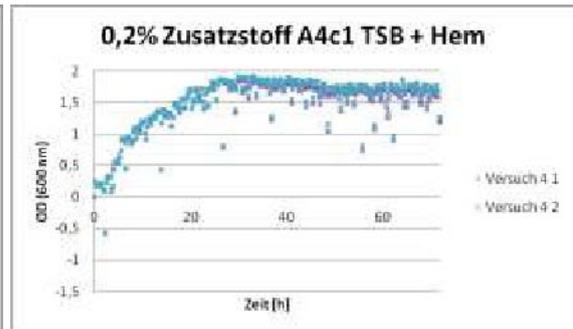


Abbildung 98: Wachstumskurven des Isolates A4c1 bei 0,2% Zusatzstoff im Nährmedium TSB+Hem

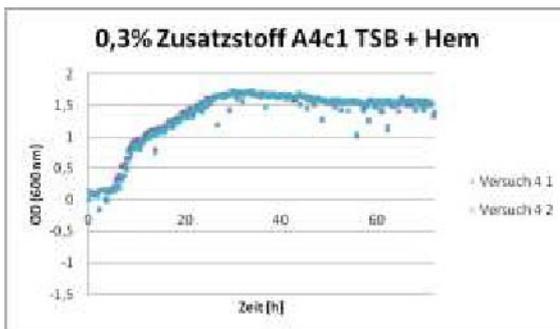


Abbildung 99: Wachstumskurven des Isolates A4c1 bei 0,3% Zusatzstoff im Nährmedium TSB+Hem

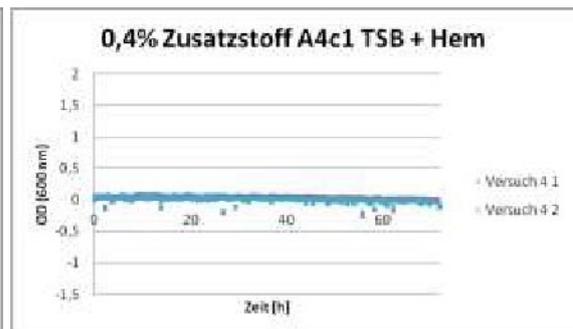


Abbildung 100: Wachstumskurven des Isolates A1c1 bei 0,4% Zusatzstoff im Nährmedium TSB+Hem

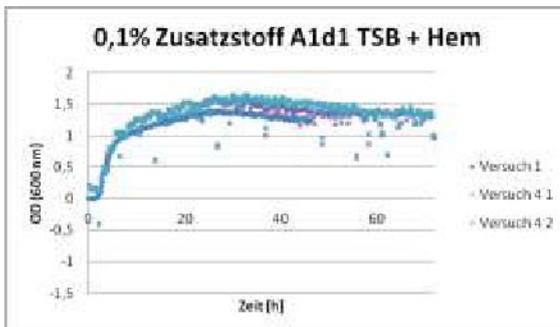


Abbildung 101: Wachstumskurven des Isolates A1d1 bei 0,1% Zusatzstoff im Nährmedium TSB+Hem

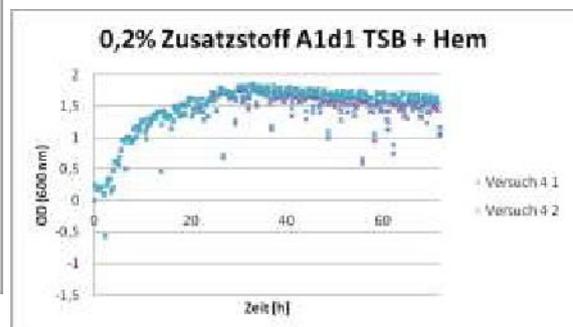


Abbildung 102: Wachstumskurven des Isolates A1d1 bei 0,2% Zusatzstoff im Nährmedium TSB+Hem

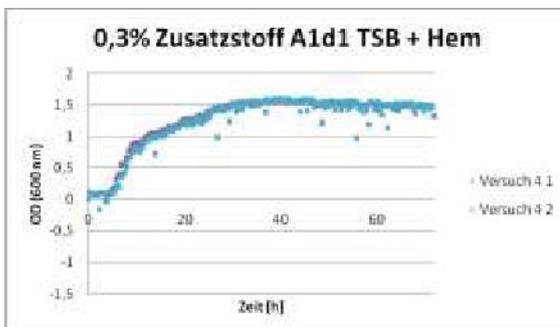


Abbildung 103: Wachstumskurven des Isolates A1d1 bei 0,3% Zusatzstoff im Nährmedium TSB+Hem

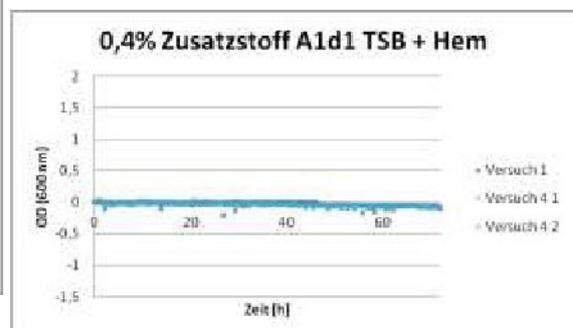


Abbildung 104: Wachstumskurven des Isolates A1d1 bei 0,4% Zusatzstoff im Nährmedium TSB+Hem

#### 4.9.5 Vergleich der Konzentrationen des Zusatzstoffes im Nährmedium VRBD alt

Bei 0,1% weist 18e unterschiedliche Wachstumskurven auf. Beim Versuch 3 kam es zur besten Wachstumsperformance, während bei Versuch 4 bei einem der beiden Ansätze ein sehr schlechtes Wachstum zu erkennen war. Bei A4c1 und A1d1 kam es genauso zu unterschiedlichen Kurven.

Bei den Zusatzstoffkonzentrationen 0,2%, 0,3% und 0,4% trat bei allen Isolatens kein Wachstum auf.

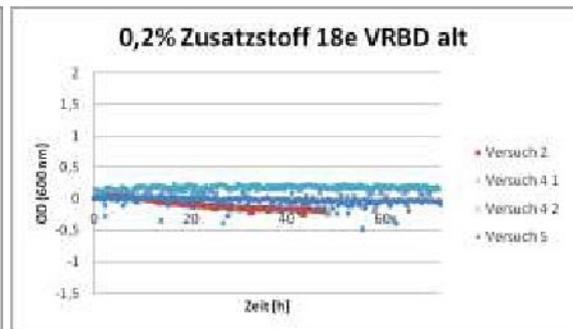
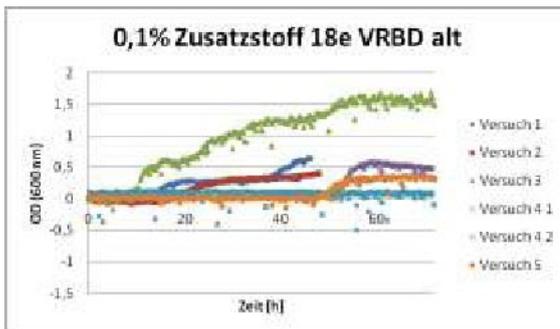


Abbildung 105: Wachstumskurven des Isolates 18e bei 0,1% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD alt

Abbildung 106: Wachstumskurven des Isolates 18e bei 0,2% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD alt

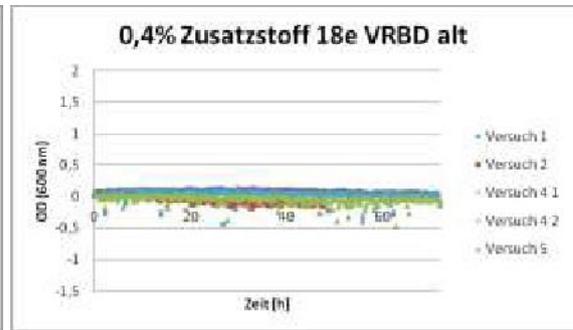
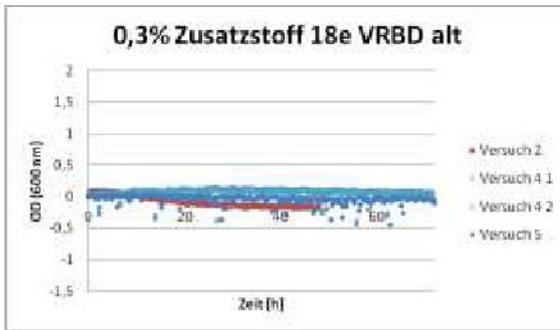


Abbildung 107: Wachstumskurven des Isolates 18e bei 0,3% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD alt

Abbildung 108: Wachstumskurven des Isolates 18e bei 0,4% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD alt

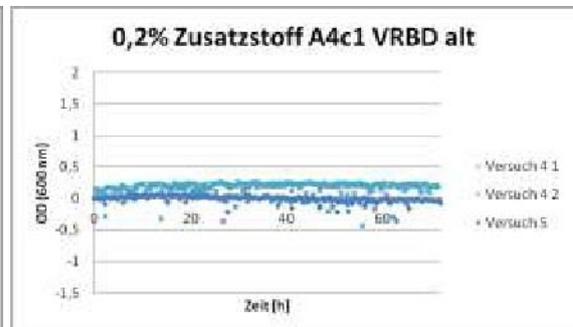
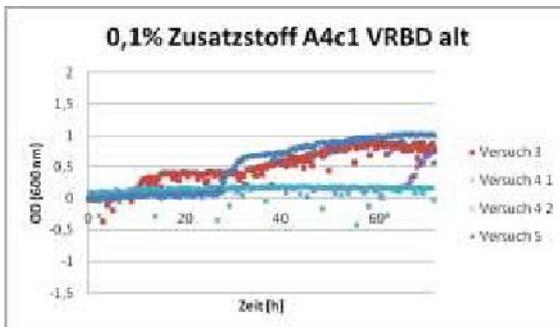


Abbildung 109: Wachstumskurven des Isolates A4c1 bei 0,1% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD alt

Abbildung 110: Wachstumskurven des Isolates A4c1 bei 0,2% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD alt

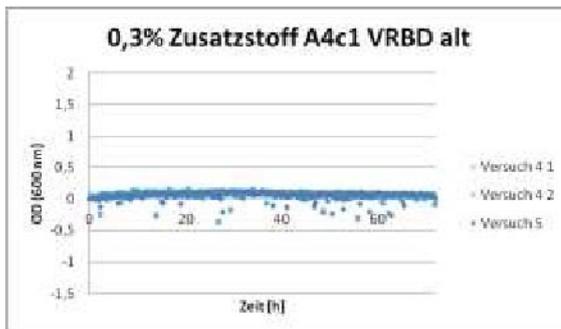


Abbildung 111: Wachstumskurven des Isolates A4c1 bei 0,3% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD alt

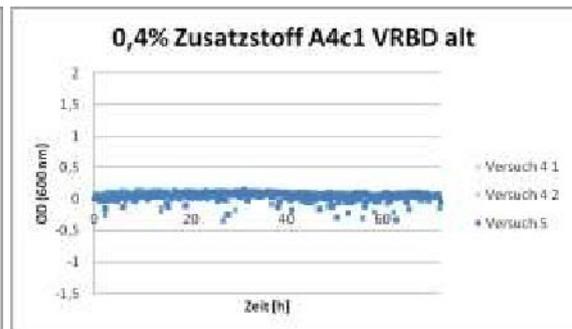


Abbildung 112: Wachstumskurven des Isolates A4c1 bei 0,4% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD alt

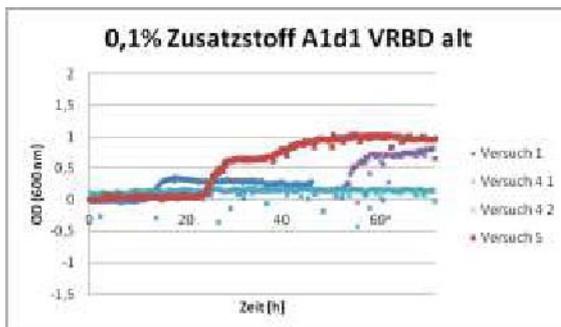


Abbildung 113: Wachstumskurven des Isolates A1d1 bei 0,1% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD alt

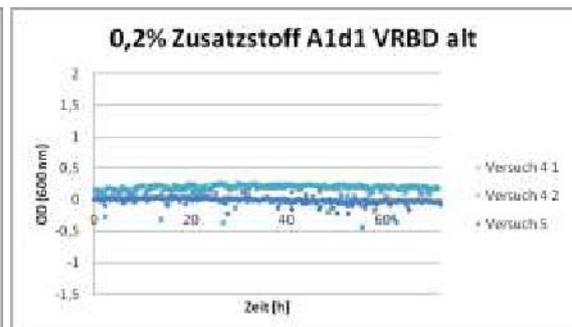


Abbildung 114: Wachstumskurven des Isolates A1d1 bei 0,2% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD alt

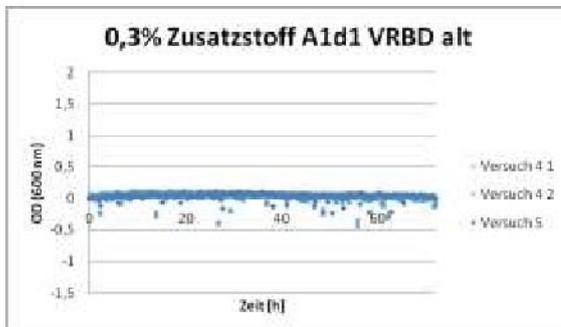


Abbildung 115: Wachstumskurven des Isolates A1d1 bei 0,3% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD alt

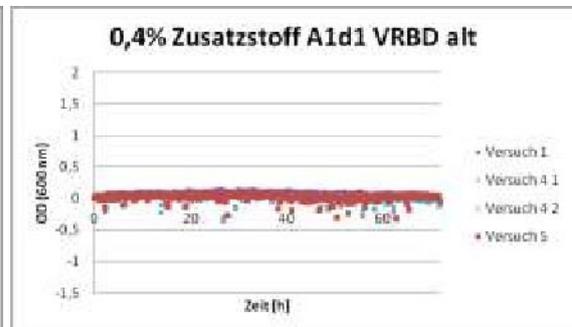


Abbildung 116: Wachstumskurven des Isolates A1d1 bei 0,4% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD alt

#### 4.9.6 Versuchs-Vergleich der Konzentrationen des Zusatzstoffes im Nährmedium VRBD

Beim 3. Versuch konnte das Isolat 18e nach ca. 5 Stunden wachsen, wobei dies beim 4. Versuch nicht der Fall war. Dasselbe trat bei A4c1 auf. Eine mögliche Erklärung ist, dass es vielleicht zu Kontaminationen kam, oder dass die Wirkstoffkonzentrationen falsch pipettiert worden sind.

Die Isolate 18e, A4c1 und A1d1 waren nicht in der Lage, im Nährmedium VRBD (neue Rezeptur) bei den Konzentrationen von 0,2%, 0,3% und 0,4%, zu wachsen.

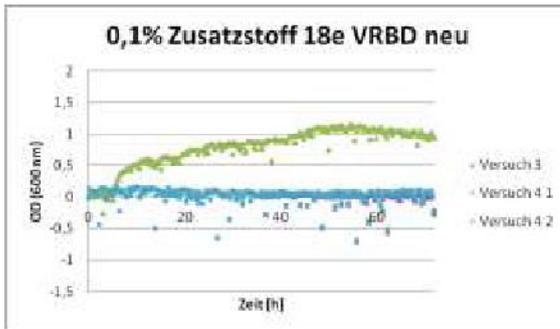


Abbildung 117: Wachstumskurven des Isolates 18e bei 0,1% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD neu

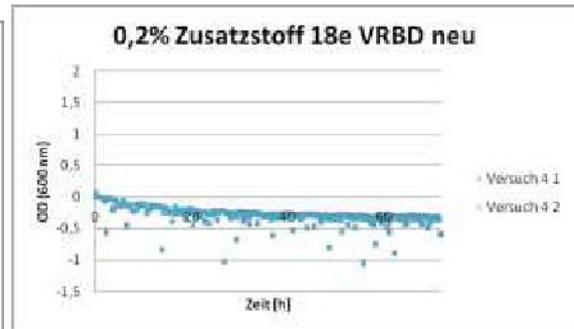


Abbildung 118: Wachstumskurven des Isolates 18e bei 0,2% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD neu



Abbildung 119: Wachstumskurven des Isolates 18e bei 0,3% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD neu

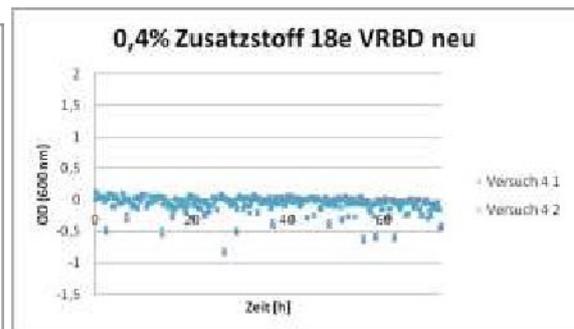


Abbildung 120: Wachstumskurven des Isolates 18e bei 0,4% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD neu

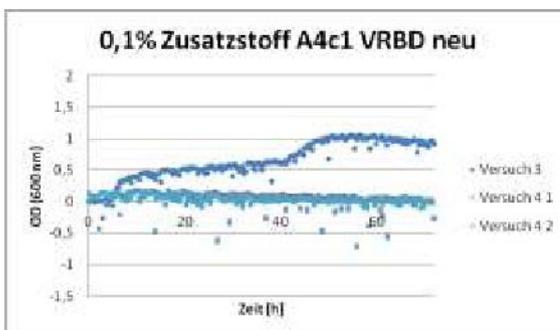


Abbildung 121: Wachstumskurven des Isolates A4c1 bei 0,1% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD neu

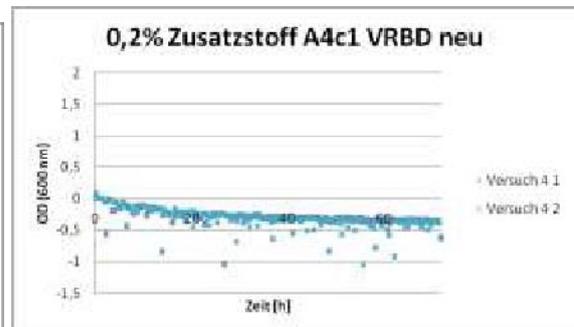


Abbildung 122: Wachstumskurven des Isolates A4c1 bei 0,2% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD neu

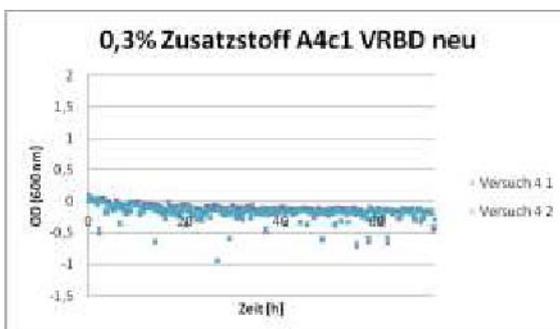


Abbildung 123: Wachstumskurven des Isolates A4c1 bei 0,3% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD neu

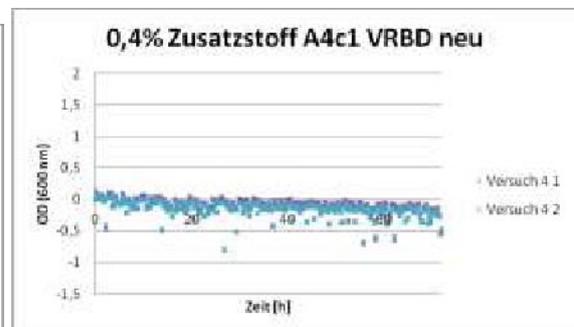
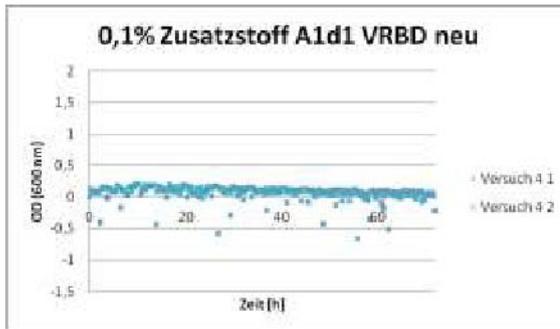
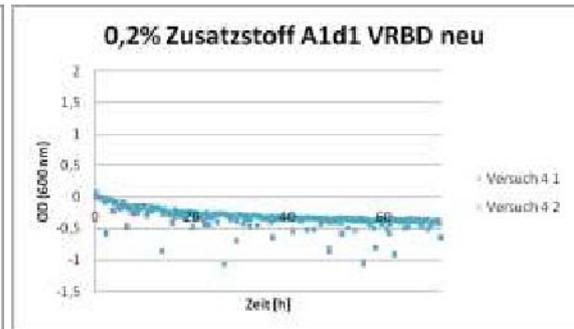


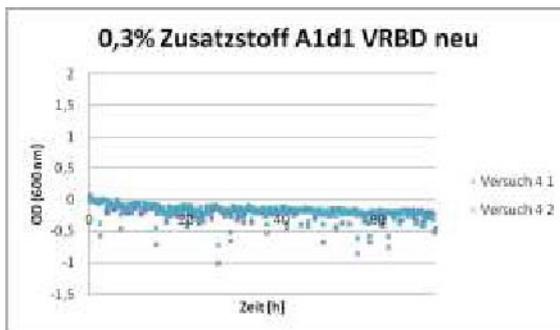
Abbildung 124: Wachstumskurven des Isolates A4c1 bei 0,4% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD neu



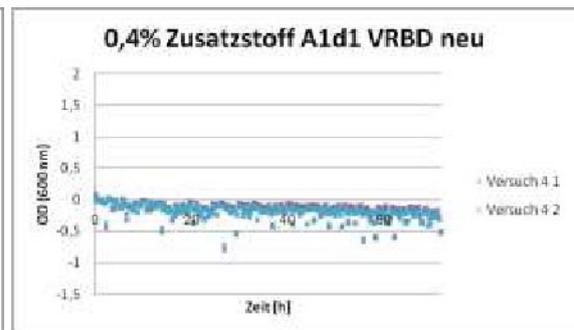
**Abbildung 125: Wachstumskurven des Isolates A1d1 bei 0,1% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD neu**



**Abbildung 126: Wachstumskurven des Isolates A1d1 bei 0,2% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD neu**



**Abbildung 127: Wachstumskurven des Isolates A1d1 bei 0,3% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD neu**



**Abbildung 128: Wachstumskurven des Isolates A1d1 bei 0,4% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD neu**

#### 4.9.7 Versuch 4 - Vergleich der Isolate

Im Nährmedium TSB sind die verschiedenen Isolate (18e, A4c1 und A1d1) bei den Zusatzstoffkonzentrationen 0,1%, 0,2% und 0,3% nicht voneinander unterscheidbar. Jedoch war bei 0,4% nur das Isolate 18e sowie ein einziges Mal A1d1 in der Lage zu wachsen. 18e schaffte dies nach ca. 50 bzw. 60 h und A1d1 erst nach ca. 70 h.

Im Nährmedium MHB trat bei den Konzentrationen 0,3% und 0,4% kein Wachstum auf. Bei 0,1% sind die Isolate kaum zu unterscheiden. Jedoch wuchs bei einer Konzentration von 0,2% 18e am schnellsten an, gefolgt von A1d1 und A4c1. Bei 18e begann das Wachstum nach etwa 20 h, bei A1d1 nach etwa 38 h und bei A4c1 nach ca. 42 h.

Die verschiedenen Isolate konnten im Nährmedium TSB+Hem bei allen Konzentrationen nicht von einander differenziert werden. Bei 0,4% trat kein Wachstum auf.

Bei den Konzentrationen 0,2%, 0,3% und 0,4% im Nährmedium VRBD alt kam es bei allen Isolate zu keinem Anstieg der optischen Dichte. Bei 0,1% hingegen wiesen alle Isolate nur bei einem der zwei Ansätze Wachstum auf, wobei 18e und A1d1 ca. 10 Stunden früher mit der exponentiellen Phase starteten als A4c1.

Im Nährmedium VRBD mit der neuen Rezeptur wuchs keines der Isolate an.

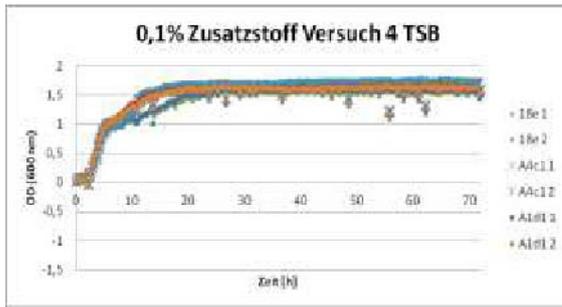


Abbildung 129: Wachstumskurven des 4. Versuches bei 0,1% Zusatzstoff im Nährmedium TSB

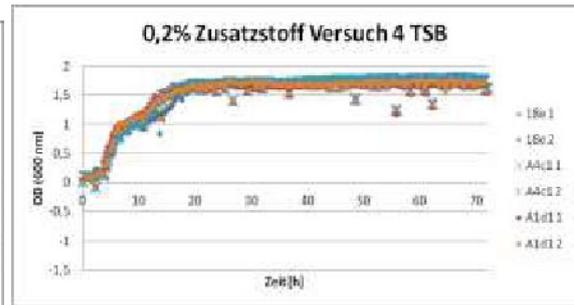


Abbildung 130: Wachstumskurven des 4. Versuches bei 0,2% Zusatzstoff im Nährmedium TSB

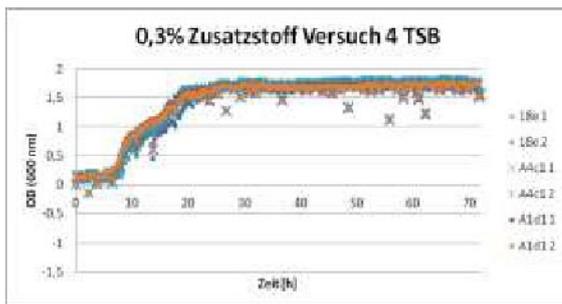


Abbildung 131: Wachstumskurven des 4. Versuches bei 0,3% Zusatzstoff im Nährmedium TSB

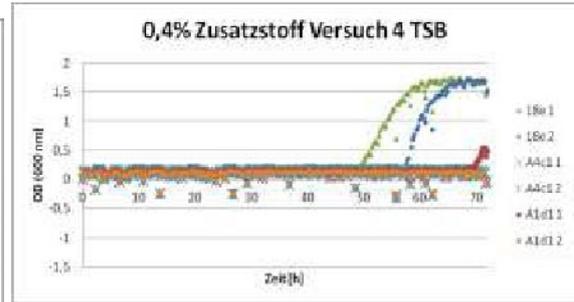


Abbildung 132: Wachstumskurven des 4. Versuches bei 0,4% Zusatzstoff im Nährmedium TSB

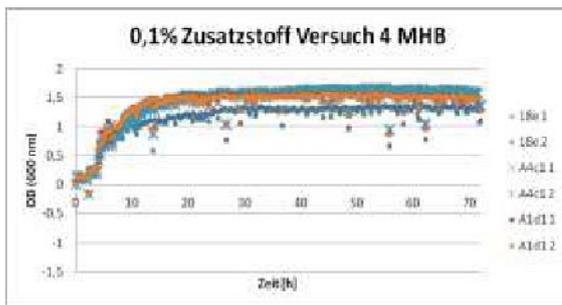


Abbildung 133: Wachstumskurven des 4. Versuches bei 0,1% Zusatzstoff im Nährmedium MHB

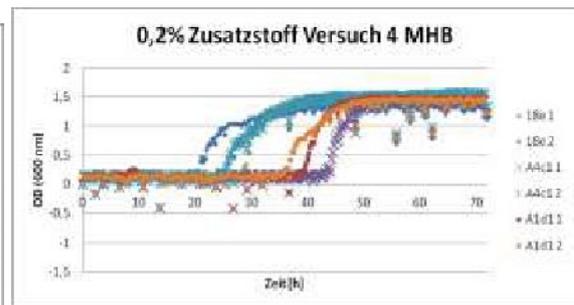


Abbildung 134: Wachstumskurven des 4. Versuches bei 0,2% Zusatzstoff im Nährmedium MHB

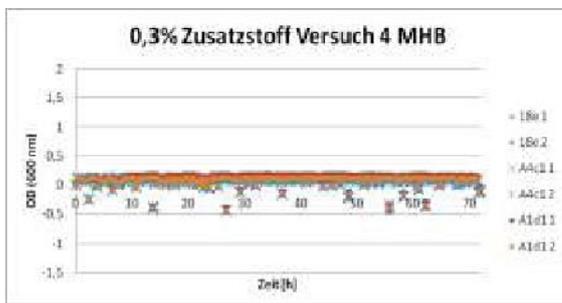


Abbildung 135: Wachstumskurven des 4. Versuches bei 0,3% Zusatzstoff im Nährmedium MHB

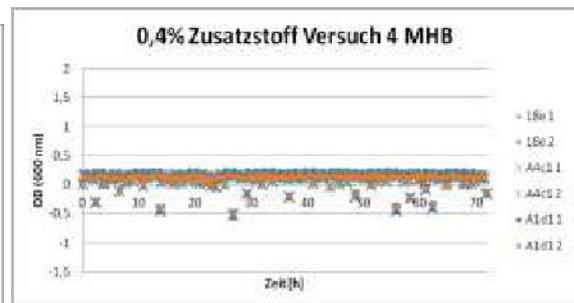


Abbildung 136: Wachstumskurven des 4. Versuches bei 0,4% Zusatzstoff im Nährmedium MHB

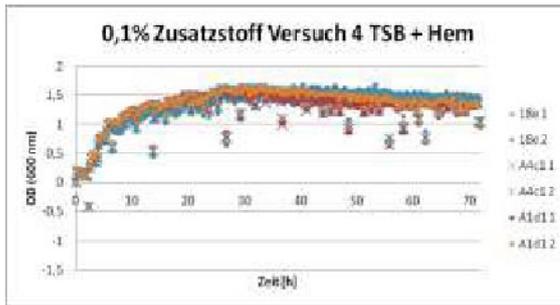


Abbildung 137: Wachstumskurven des 4. Versuches bei 0,1% Zusatzstoff im Nährmedium TSB+Hem

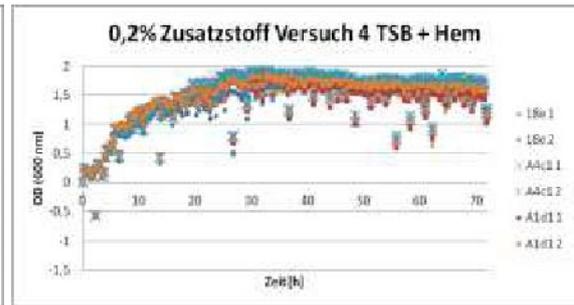


Abbildung 138: Wachstumskurven des 4. Versuches bei 0,2% Zusatzstoff im Nährmedium TSB+Hem

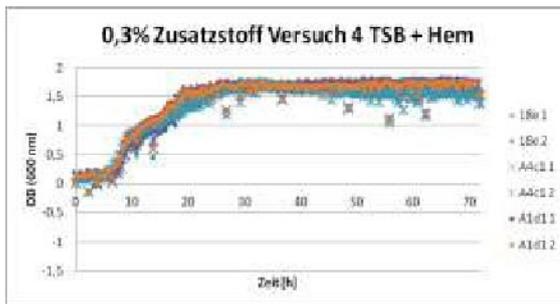


Abbildung 139: Wachstumskurven des 4. Versuches bei 0,3% Zusatzstoff im Nährmedium TSB+Hem

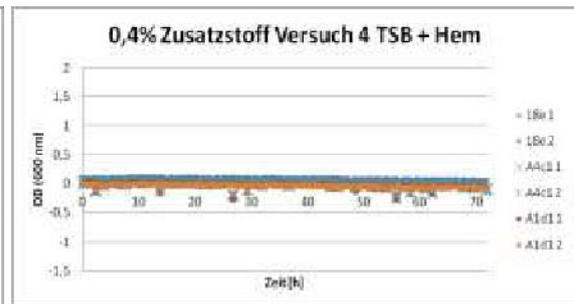


Abbildung 140: Wachstumskurven des 4. Versuches bei 0,4% Zusatzstoff im Nährmedium TSB+Hem

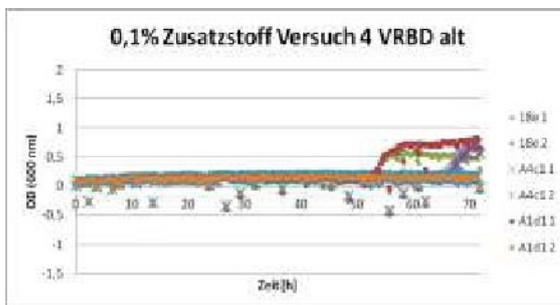


Abbildung 141: Wachstumskurven des 4. Versuches bei 0,1% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD alt

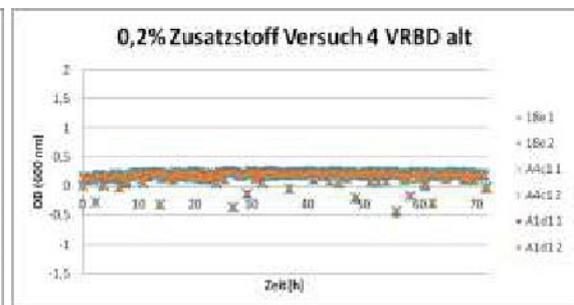


Abbildung 142: Wachstumskurven des 4. Versuches bei 0,2% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD alt

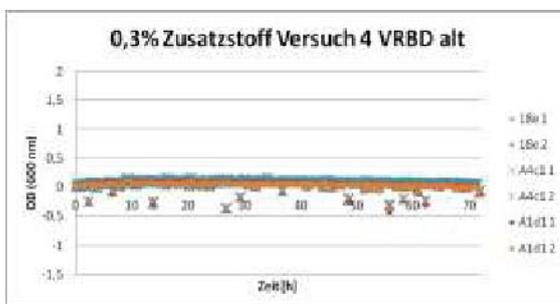


Abbildung 143: Wachstumskurven des 4. Versuches bei 0,3% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD alt

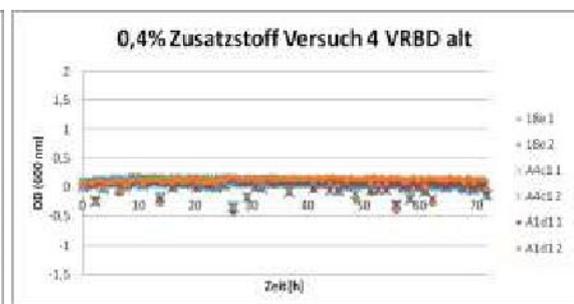
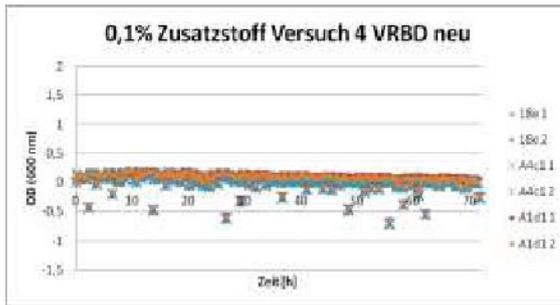
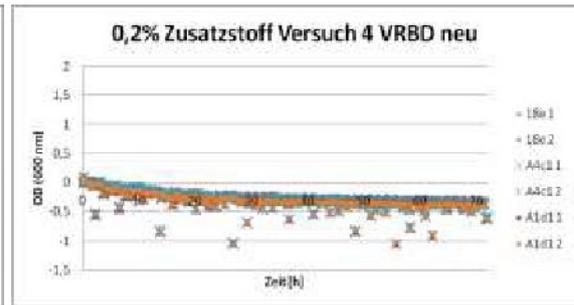


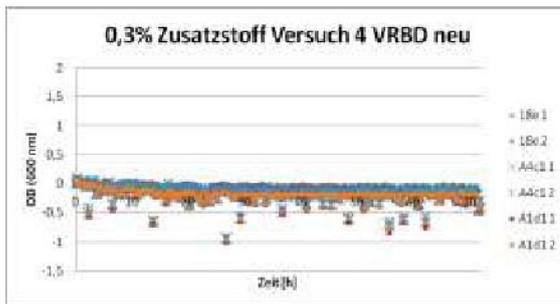
Abbildung 144: Wachstumskurven des 4. Versuches bei 0,4% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD alt



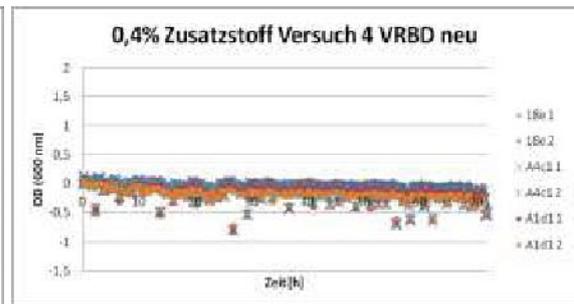
**Abbildung 145: Wachstumskurven des 4. Versuchs bei 0,1% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD neu**



**Abbildung 146: Wachstumskurven des 4. Versuchs bei 0,2% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD neu**



**Abbildung 147: Wachstumskurven des 4. Versuchs bei 0,3% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD neu**



**Abbildung 148: Wachstumskurven des 4. Versuchs bei 0,4% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD neu**

#### 4.9.8 Versuch 5 - Zusatzstoffkonzentrationsvergleich

Beim 5. Versuch wurden gegenüber dem 4. Versuch zusätzlich die Zusatzstoffkonzentrationen 0,05% und 0,5% herangezogen, um den Konzentrationsbereich nach oben und unten hin abzudecken.

Bei einer Konzentration von 0,5% des Zusatzstoffes im Nährmedium TSB sind alle Isolate gehemmt und nicht fähig zu wachsen. Diese Hemmung war ab einer Konzentration von 0,3% feststellbar, bei der die exponentielle Phase später einsetzte. Hier beginnt das exponentielle Wachstum nach etwa 8 h. Bei einer Konzentration von 0,4% startet das Wachstum von B8a1 nach ca. 55 h gefolgt von A3d2, A4c1, 18e und A1d1.

Im Nährmedium MHB waren alle Isolate bei einer Zusatzstoffkonzentration von 0,3%, 0,4% und 0,5% gehemmt. Bei 0,05% und 0,1% sind ähnliche Wachstumskurven zu erkennen, wobei 18e die schlechteste Wachstumsperformance aufweist und B8a1 die beste. Eine eindeutige Differenzierung weist die Konzentration 0,2% auf. Bei 18e startet die exponentielle Phase nach etwa 52 h, bei A4c1 und A1d1 nach ca. 38 h. Das Isolat A3d2 beginnt das exponentielle Wachstum nach etwa 35 h und bei B8a1 nach etwa 30 h.

Bei dem Nährmedium VRBD mit alter Rezeptur war generell ein schlechteres Wachstum, als bei MHB und TSB festzustellen. Eine Differenzierung der Isolate bei einer Zusatzstoffkonzentration von 0,05% war nicht möglich, jedoch bei 0,1%. 18e startet hier erst die exponentielle Wachstumsphase nach ungefähr 50 h. Die Isolate B8a1, A4c1, A1d1 und A3d2 weisen ein ex-

ponentielles Wachstum nach etwa 25 h auf. Alle Isolate wurden bei den Konzentrationen 0,2%, 0,3%, 0,4% und 0,5% gehemmt.

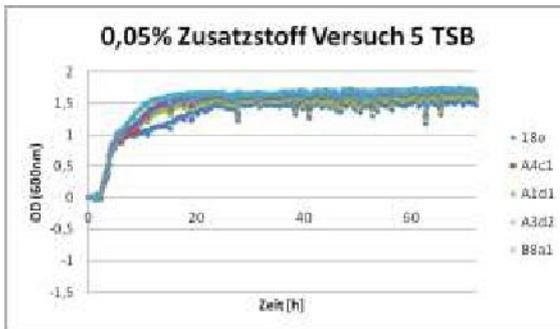


Abbildung 149: Wachstumskurven des 5. Versuchs bei 0,05% Zusatzstoff im Nährmedium TSB

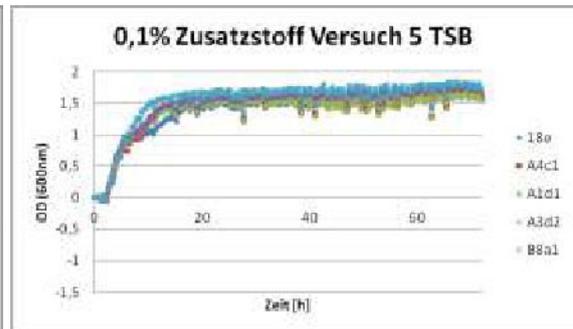


Abbildung 150: Wachstumskurven des 5. Versuchs bei 0,1% Zusatzstoff im Nährmedium TSB

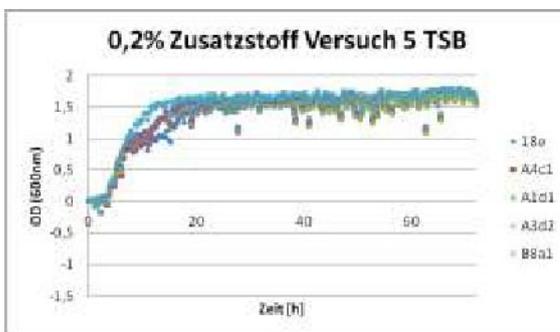


Abbildung 151: Wachstumskurven des 5. Versuchs bei 0,2% Zusatzstoff im Nährmedium TSB

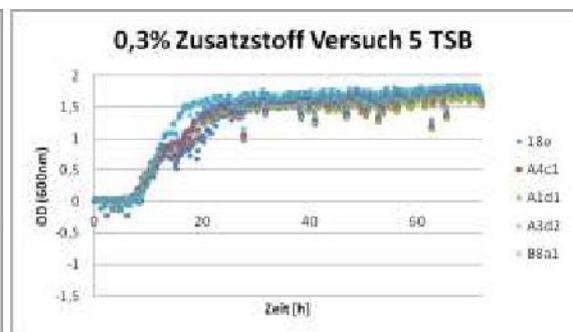


Abbildung 152: Wachstumskurven des 5. Versuchs bei 0,3% Zusatzstoff im Nährmedium TSB

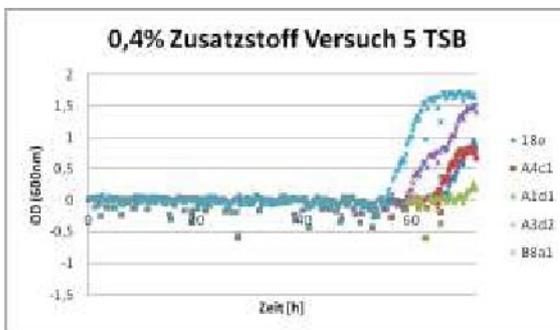


Abbildung 153: Wachstumskurven des 5. Versuchs bei 0,4% Zusatzstoff im Nährmedium TSB

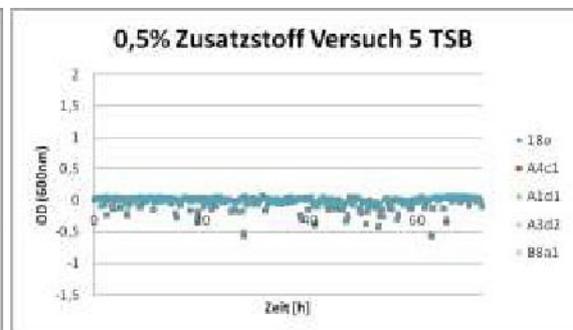


Abbildung 154: Wachstumskurven des 5. Versuchs bei 0,5% Zusatzstoff im Nährmedium TSB

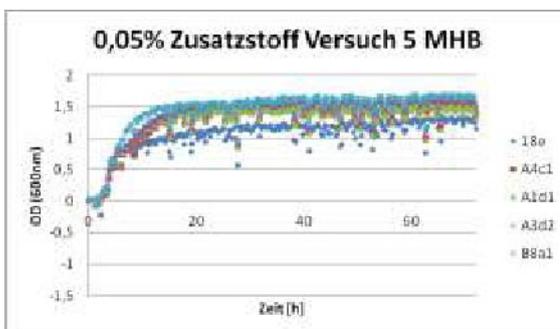


Abbildung 155: Wachstumskurven des 5. Versuchs bei 0,05% Zusatzstoff im Nährmedium MHB

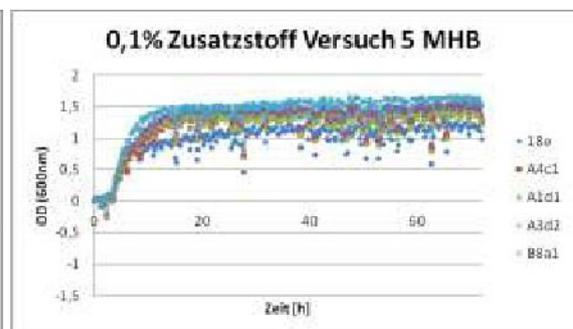


Abbildung 156: Wachstumskurven des 5. Versuchs bei 0,1% Zusatzstoff im Nährmedium MHB

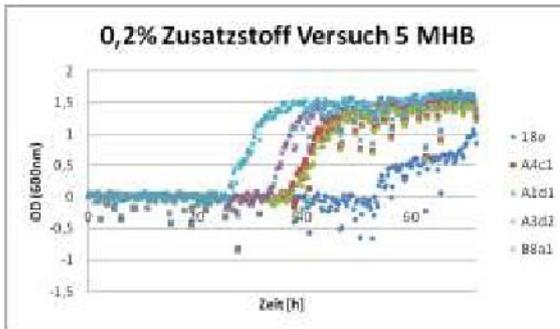


Abbildung 157: Wachstumskurven des 5. Versuchs bei 0,2% Zusatzstoff im Nährmedium MHB

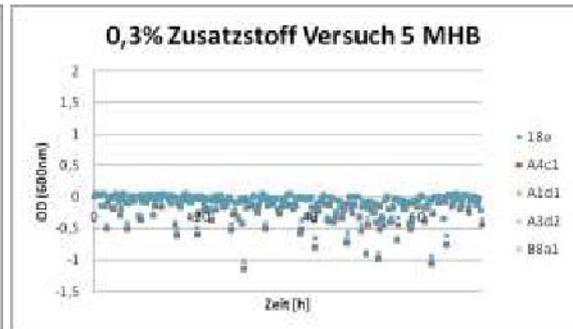


Abbildung 158: Wachstumskurven des 5. Versuchs bei 0,3% Zusatzstoff im Nährmedium MHB

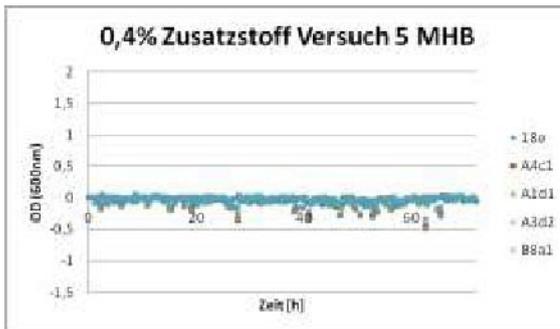


Abbildung 159: Wachstumskurven des 5. Versuchs bei 0,4% Zusatzstoff im Nährmedium MHB

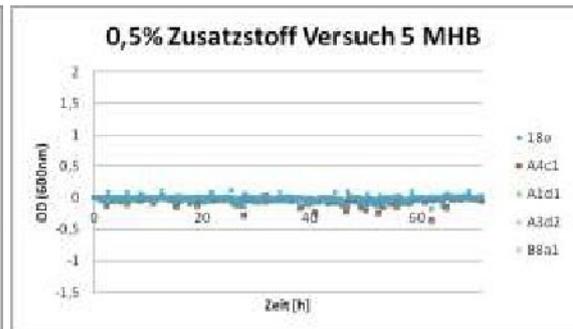


Abbildung 160: Wachstumskurven des 5. Versuchs bei 0,5% Zusatzstoff im Nährmedium MHB

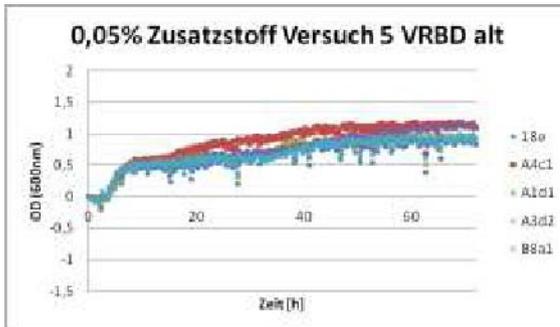


Abbildung 161: Wachstumskurven des 5. Versuchs bei 0,05% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD alt

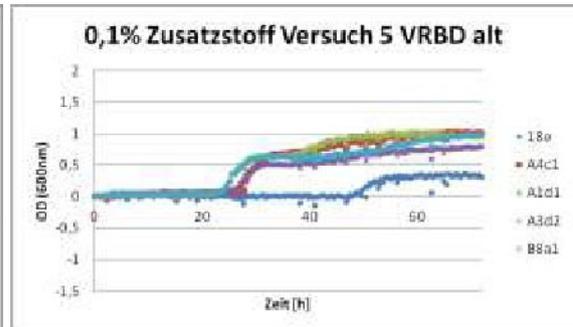


Abbildung 162: Wachstumskurven des 5. Versuchs bei 0,1% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD alt

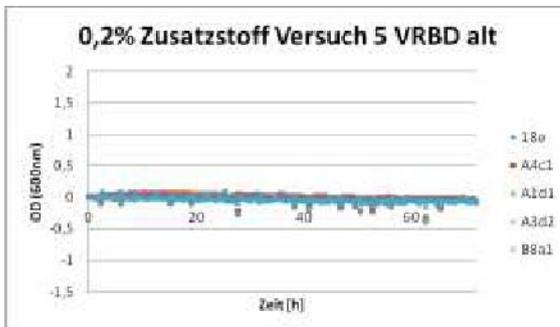


Abbildung 163: Wachstumskurven des 5. Versuchs bei 0,2% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD alt

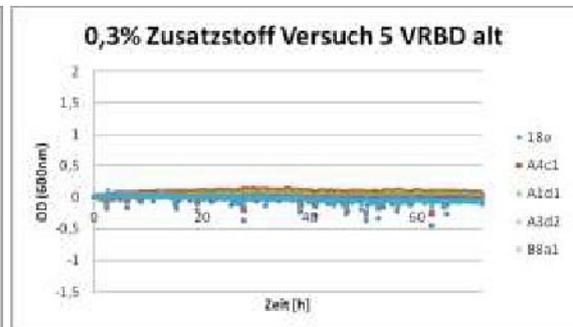


Abbildung 164: Wachstumskurven des 5. Versuchs bei 0,3% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD alt

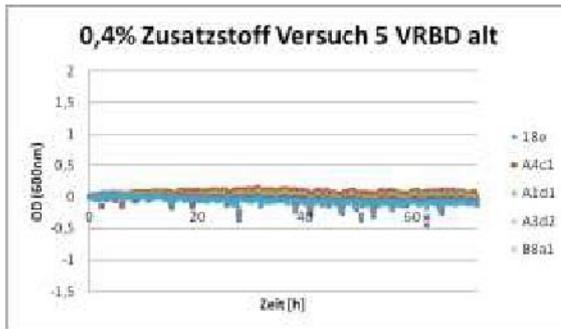


Abbildung 165: Wachstumskurven des 5. Versuchs bei 0,4% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD alt

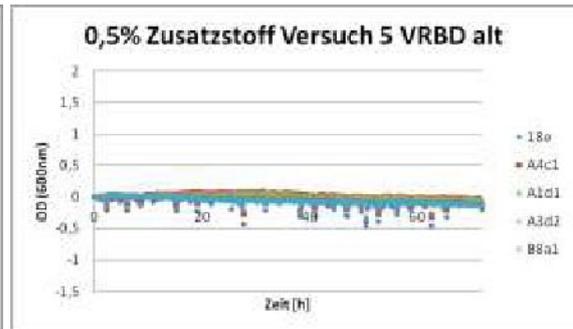


Abbildung 166: Wachstumskurven des 5. Versuchs bei 0,5% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD alt

#### 4.9.9 Antibiotika Cipro-, Enrofloxacin

Das gegenüber Cipro- und Enrofloxacin sensible Isolat A4c1 und das intermediäre Isolat A3d2 waren durch die Antibiotika Cipro- und Enrofloxacin (1 und 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) nicht in der Lage zu wachsen. Dabei verfügt A3d2 als einziges Isolat über das Quinolonresistenzgen *qnrS*.

18e war allerdings fähig in jedem Nährmedium anzuwachsen. Dieses Isolat verhält sich auch im Agardiffusionstest gegenüber Enro- und Ciprofloxacin resistent, besitzt jedoch keines der Quinolonresistenzgene, die auf dem Microarray präsent waren. Alle Versuche sind miteinander vergleichbar. Im Nährmedium TSB konnte das Isolat 18e im Vergleich zu TSB+Hem, MHB und VRBD am besten wachsen. Bei einer höheren Konzentration von 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  erfolgte eine starke Hemmung des Wachstums. Das heißt die exponentielle Phase trat später ein. Nur im Nährmedium TSB und teilweise in TSB+Hem erreichte das Isolat bei einer höheren Konzentration annähernd dasselbe Niveau wie bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Antibiotikum. Im Nährmedium TSB+Hem bei einer Konzentration von 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  trat die exponentielle Phase schon zur selben Zeit wie bei 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ein, allerdings ist der Anstieg flacher. Im Nährmedium MHB konnte sich das Isolat 18e nicht so schnell an die höhere Konzentration adaptieren und es kam erst nach ca. 10 Stunden zur exponentiellen Phase. Im Nährmedium VRBD war die Unterscheidung zwischen den beiden Antibiotikakonzentrationen aufgrund des schlechten Wachstums von 18e ebenfalls nicht möglich.

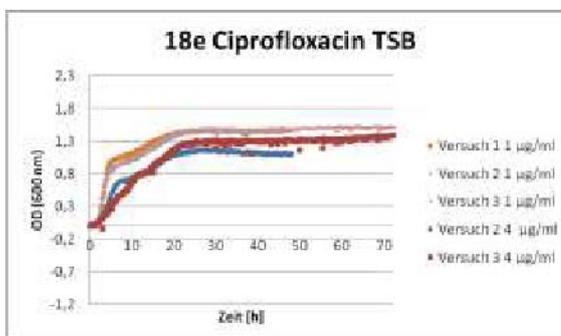


Abbildung 167: Wachstumskurven des Isolates 18e bei verschiedenen Konzentrationen von Ciprofloxacin im Nährmedium TSB

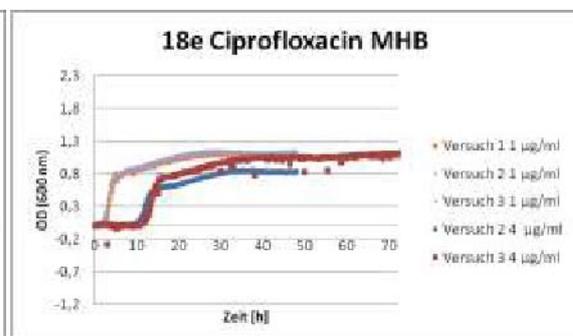


Abbildung 168: Wachstumskurven des Isolates 18e bei verschiedenen Konzentrationen von Ciprofloxacin im Nährmedium MHB

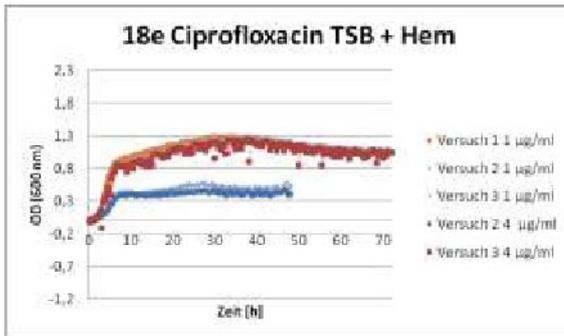


Abbildung 169: Wachstumskurven des Isolates 18e bei verschiedenen Konzentrationen von Ciprofloxacin im Nährmedium TSB+Hem

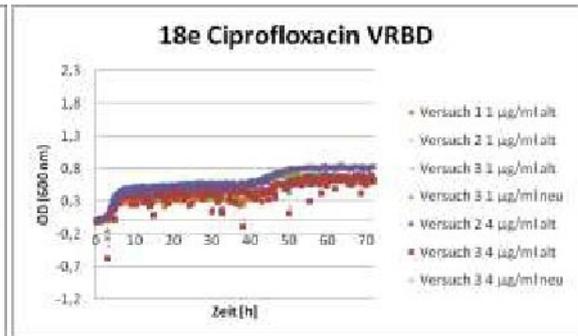


Abbildung 170: Wachstumskurven des Isolates 18e bei verschiedenen Konzentrationen von Ciprofloxacin im Nährmedium VRBD

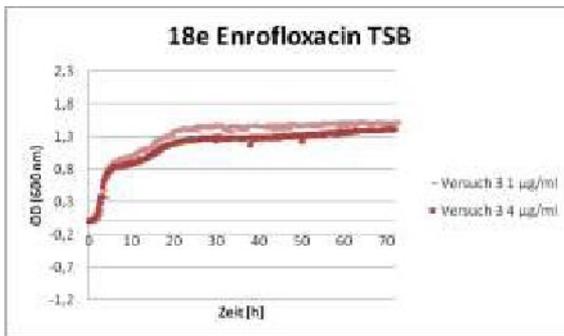


Abbildung 171: Wachstumskurven des Isolates 18e bei verschiedenen Konzentrationen von Enrofloxacin im Nährmedium TSB

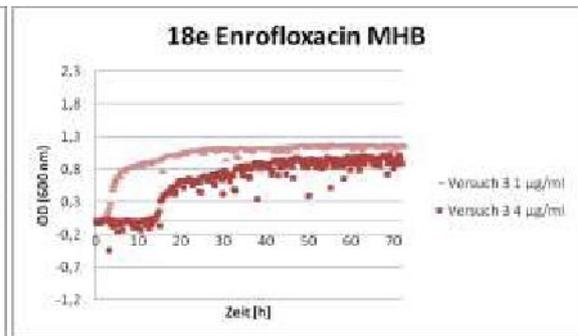


Abbildung 172: Wachstumskurven des Isolates 18e bei verschiedenen Konzentrationen von Enrofloxacin im Nährmedium MHB

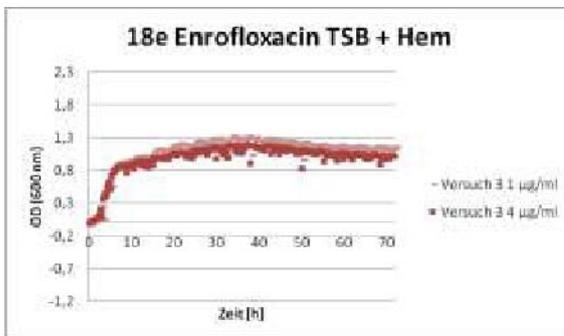


Abbildung 173: Wachstumskurven des Isolates 18e bei verschiedenen Konzentrationen von Enrofloxacin im Nährmedium TSB+Hem

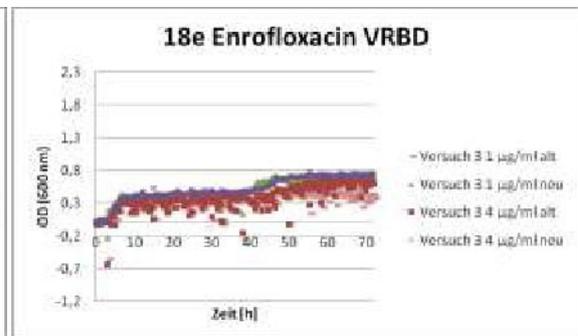
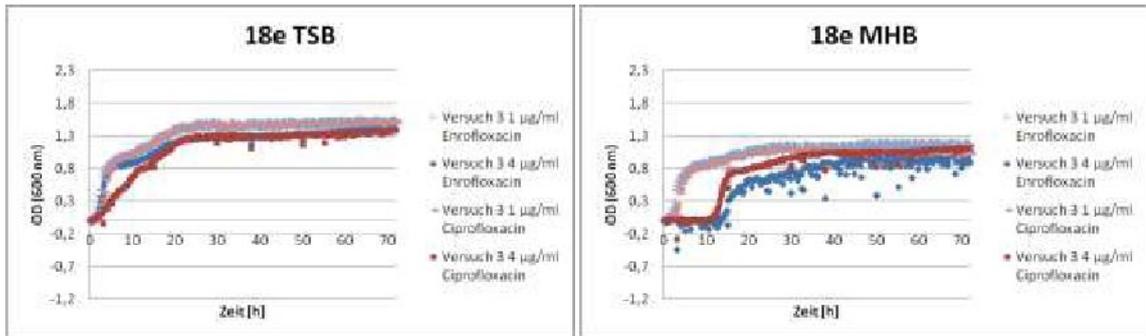
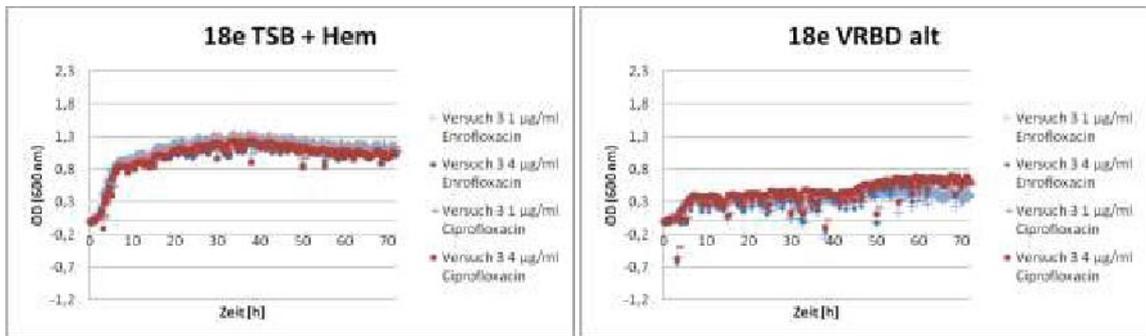


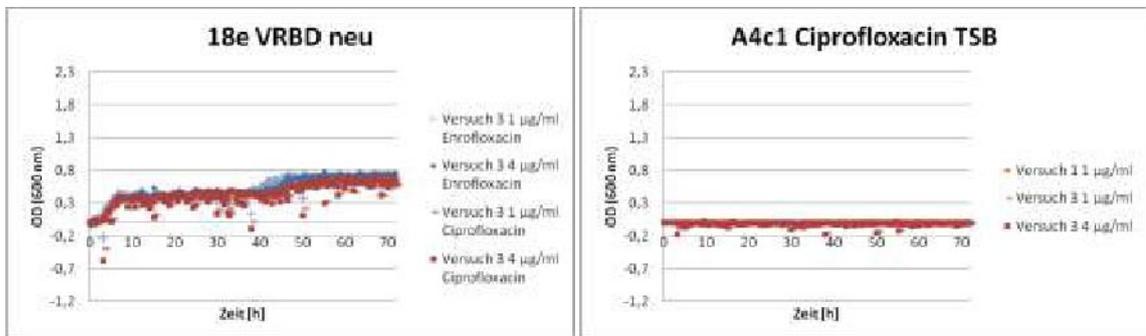
Abbildung 174: Wachstumskurven des Isolates 18e bei verschiedenen Konzentrationen von Enrofloxacin im Nährmedium VRBD



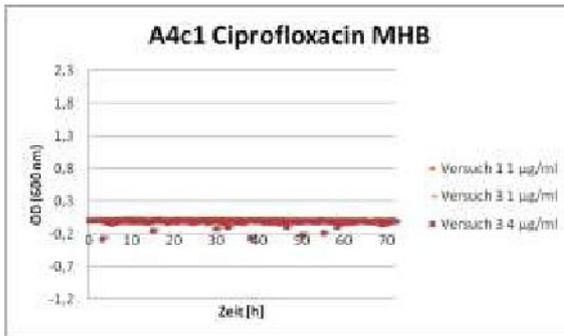
**Abbildung 175: Wachstumskurven des Isolates 18e bei verschiedenen Konzentrationen von Cipro- und Enrofloxacin im Nährmedium TSB** **Abbildung 176: Wachstumskurven des Isolates 18e bei verschiedenen Konzentrationen von Cipro- und Enrofloxacin im Nährmedium MHB**



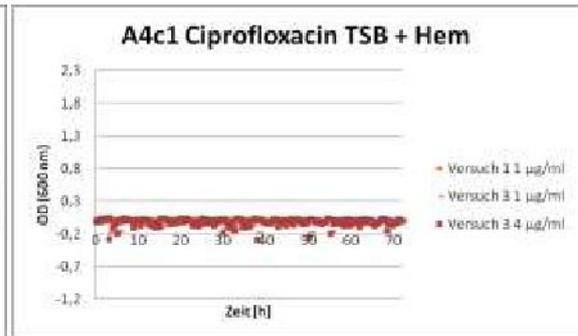
**Abbildung 177: Wachstumskurven des Isolates 18e bei verschiedenen Konzentrationen von Cipro- und Enrofloxacin im Nährmedium TSB+Hem** **Abbildung 178: Wachstumskurven des Isolates 18e bei verschiedenen Konzentrationen von Cipro- und Enrofloxacin im Nährmedium VRBD alt**



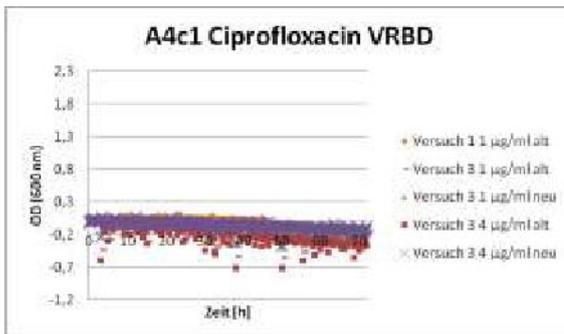
**Abbildung 179: Wachstumskurven des Isolates 18e bei verschiedenen Konzentrationen von Cipro- und Enrofloxacin im Nährmedium VRBD neu** **Abbildung 180: Wachstumskurven des Isolates A4c1 bei verschiedenen Konzentrationen von Ciprofloxacin im Nährmedium TSB**



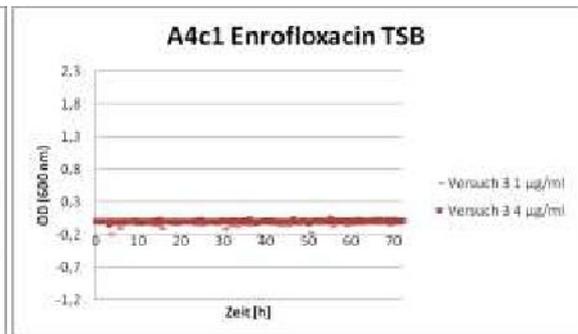
**Abbildung 181:** Wachstumskurven des Isolates A4c1 bei verschiedenen Konzentrationen von Ciprofloxacin im Nährmedium MHB



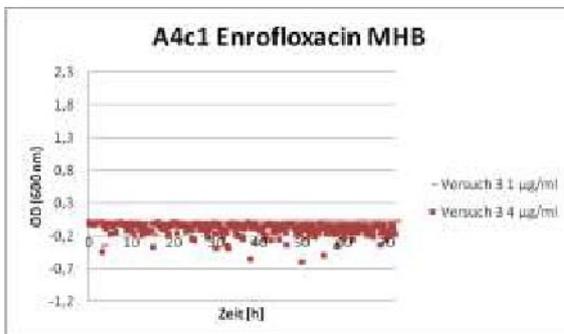
**Abbildung 182:** Wachstumskurven des Isolates A4c1 bei verschiedenen Konzentrationen von Ciprofloxacin im Nährmedium TSB+Hem



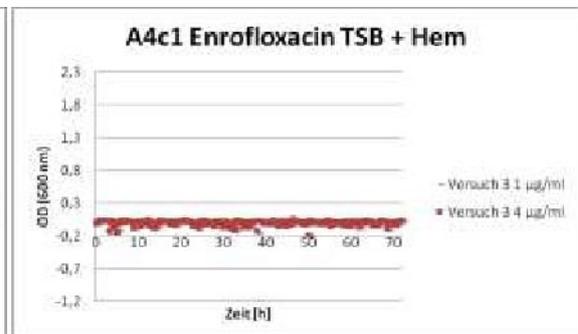
**Abbildung 183:** Wachstumskurven des Isolates A4c1 bei verschiedenen Konzentrationen von Ciprofloxacin im Nährmedium VRBD



**Abbildung 184:** Wachstumskurven des Isolates A4c1 bei verschiedenen Konzentrationen von Enrofloxacin im Nährmedium TSB



**Abbildung 185:** Wachstumskurven des Isolates A4c1 bei verschiedenen Konzentrationen von Enrofloxacin im Nährmedium MHB



**Abbildung 186:** Wachstumskurven des Isolates A4c1 bei verschiedenen Konzentrationen von Enrofloxacin im Nährmedium TSB+Hem

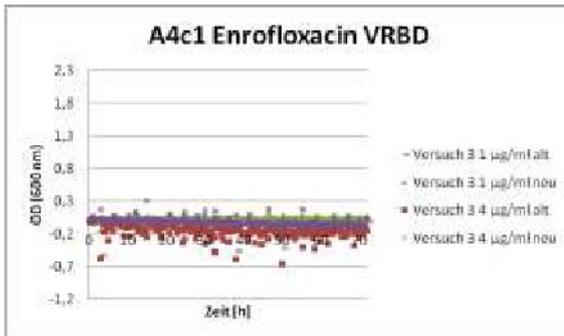


Abbildung 187: Wachstumskurven des Isolates A4c1 bei verschiedenen Konzentrationen von Enrofloxacin im Nährmedium VRBD

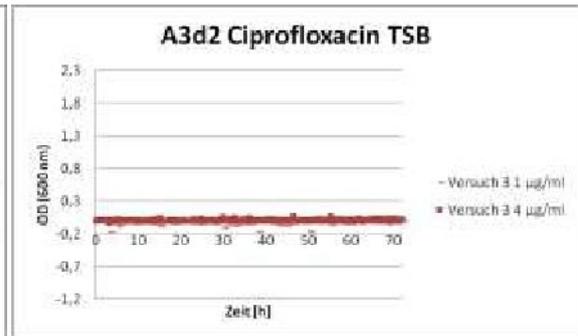


Abbildung 188: Wachstumskurven des Isolates A3d2 bei verschiedenen Konzentrationen von Ciprofloxacin im Nährmedium TSB

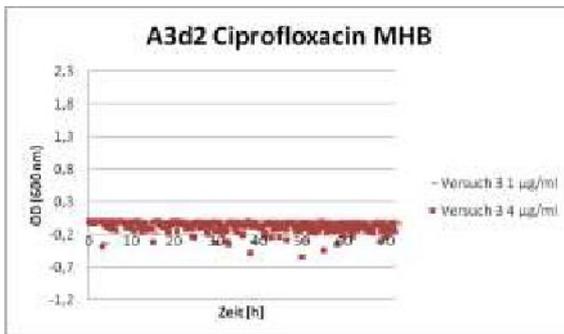


Abbildung 189: Wachstumskurven des Isolates A3d2 bei verschiedenen Konzentrationen von Ciprofloxacin im Nährmedium MHB

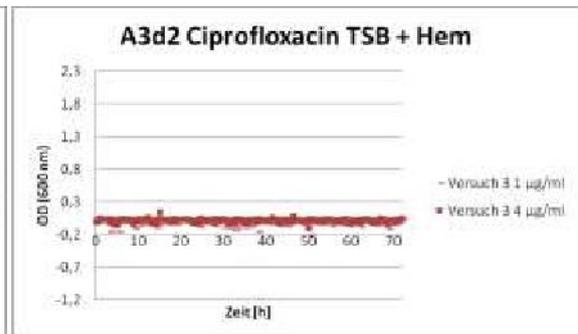


Abbildung 190: Wachstumskurven des Isolates A3d2 bei verschiedenen Konzentrationen von Ciprofloxacin im Nährmedium TSB+Hem

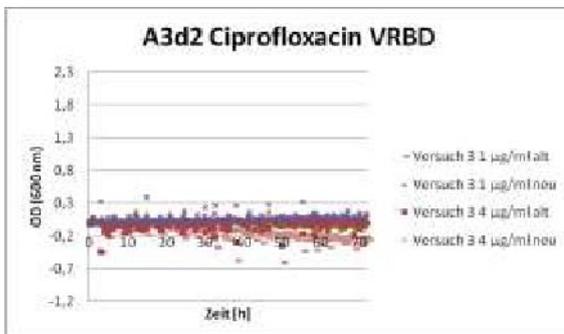


Abbildung 191: Wachstumskurven des Isolates A3d2 bei verschiedenen Konzentrationen von Ciprofloxacin im Nährmedium VRBD

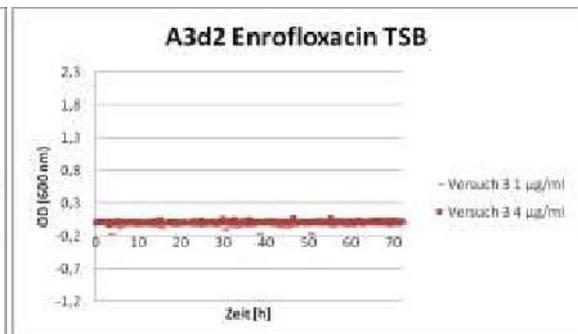
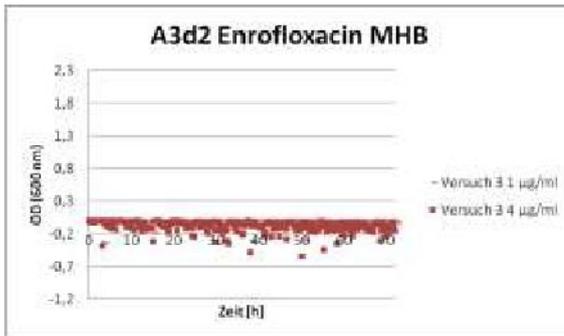
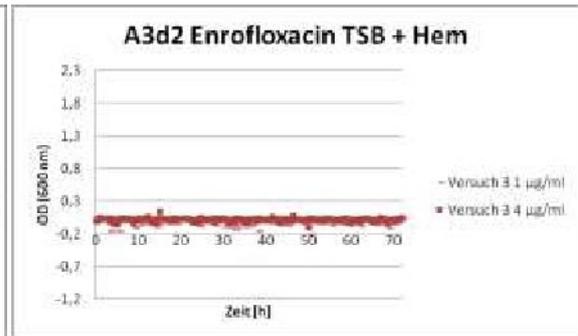


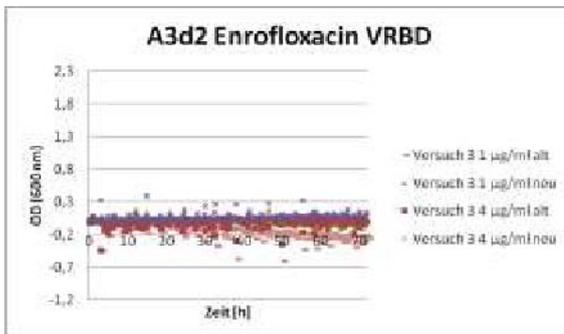
Abbildung 192: Wachstumskurven des Isolates A3d2 bei verschiedenen Konzentrationen von Enrofloxacin im Nährmedium TSB



**Abbildung 193: Wachstumskurven des Isolates A3d2 bei verschiedenen Konzentrationen von Enrofloxacin im Nährmedium MHB**



**Abbildung 194: Wachstumskurven des Isolates A3d2 bei verschiedenen Konzentrationen von Enrofloxacin im Nährmedium TSB+Hem**



**Abbildung 195: Wachstumskurven des Isolates A3d2 bei verschiedenen Konzentrationen von Enrofloxacin im Nährmedium VRBD**

## 5 Diskussion

### 5.1 Agardiffusionstest

Aus dem Agardiffusionstest geht hervor, dass die mit dem auf Säuren basierenden Futtermittel gefütterte Broilergruppe zum ersten Zeitpunkt (Beprobung der Hühner 17 Tage nach der Einnistung) resistente *E. coli* Isolate aufwies, die jedoch im Verlauf der Fütterung fast zur Gänze eliminiert wurden. Im Vergleich zur Gruppe, die zusätzlich zum Standardfutter Enrofloxacin prophylaktisch über das Wasser erhielt, traten zum ersten Zeitpunkt mehr resistente Isolate auf. Zum zweiten Zeitpunkt (Ende der Mastperiode: 38 Tage nach der Einnistung) konnten diese jedoch nur partiell nachgewiesen werden. Vor allem die Antibiotikumgruppe wies viele resistente *E. coli* gegenüber Cipro- und Enrofloxacin auf. Die beiden anderen Gruppen zeigten hingegen nur wenige. Dasselbe galt für Ampicillin, Tetracyclin, Streptomycin und Sulfonamid. Das Multiresistenzprofil Ciprofloxacin + Tetracyclin + Streptomycin + Sulfonamid trat am häufigsten auf und die meisten Isolate mit diesem Profil stammten aus der Antibiotikumgruppe des ersten Zeitpunktes. Bei der Fluoroquinolon-Resistenz handelt es sich um eine Mutation von Genen. Der Resistenzursprung ist vermutlich auf die Elterntiere der Küken zurückzuführen. So stellten Nilsson et al. (2014) fest, dass ein *E. coli* Klon mit dem Resistenzgen  $bla_{CMY-2}$  in Herden von Großelterntieren sowie in allen Niveaus der Produktionspyramide vorgekommen ist.

### 5.2 Molekularbiologie

Aufgrund der schlechten Wiederholbarkeit der Ergebnisse, die einige Isolate betraf, wurde die DNA-Isolation anstatt mittels Hitze mit einem DNA-Isolationskit durchgeführt, um DNA in höherer Reinheit und Quantität zu gewinnen. Von 36 gesuchten Literaturstellen, in denen RAPD und rep-PCR zur Typisierung von *E. coli* durchgeführt wurden, wurde das Primersystem ERIC1R + ERIC2 neun Mal eingesetzt. BOXA1R wurde genauso oft verwendet. Folgende Autoren verwendeten ERIC1R + ERIC2: Bandyopadhyay et al. (2011); Bandyopadhyay et al. (2012); Agostinho et al. (2014); Markovska et al. (2013); Lyautey et al. (2014); Blyton et al. (2013); Mohapatra et al. (2007); Tramuta et al. (2010) und Askari et al. (2014). Das Primersystem ERIC1R + ERIC2 wurde als geeignet betrachtet, weil dieses System eine hohe Differenzierung der Isolate ermöglichte und bei der Auswertung der Profile mittels BioNumerics die Makierung der unterschiedlichen Amplifikate gut möglich war.

### 5.3 Bandenmuster kombiniert mit Antibiotikaresistenzprofilen

Die Antibiotikaresistenzprofile wurden mit jenen des Typings kombiniert, um aus den daraus resultierenden Clustern geeignete Isolate für den Microarray auszuwählen. Auffällig war, dass

der Cluster mit dem Isolat 18e (Umweltprobe) eine große Gruppe darstellt. Zahlenmäßig sind die Isolate der Antibiotikumgruppe vom ersten Zeitpunkt (Tag 17) am meisten in diesem Cluster vertreten. Isolate dieses Clusters sind gegen Ciprofloxacin, Enrofloxacin, Tetracyclin, Streptomycin und Sulfonamid resistent. Ein weiterer großer Cluster mit einem markanten Bandenmuster aus Isolaten von der Kontroll-, Zusatzstoff-, und Antibiotikumgruppe zum Zeitpunkt 2 besteht. Isolate dieses Clusters verhalten sich vor allem gegenüber Cipro- und Enrofloxacin intermediär. Dieses Resistenzmuster wurde auch bei einem anderen Cluster mit einem unterschiedlichen Bandenmuster gefunden. Dieser Cluster besteht aus Isolaten der Zusatzstoff- und Kontrollgruppe, die zu beiden Zeitpunkten gezogen worden sind.

#### 5.4 Microarray - Untersuchung genomischer DNA

Alle gegen Sulphonamid resistenten Isolate besitzen auch ein *sul2*- oder *sul3*-Resistenzgen. Diese Resistenzgene kodieren für das Enzym Dihydropteroat-Synthetase Typ 2 und 3. Alle phänotypisch resistenten Isolate besitzen dieses Resistenzgen, wobei das Isolat A4c1 das Resistenzgen *sul2* hat, jedoch phänotypisch gegen Sulfonamid sensibel ist. Alle phänotypisch gegen Tetracyclin resistenten Isolate haben auch Resistenzgene (*tetA*, *tetB*), mit Ausnahme des Isolates C7d2. Das Resistenzgen *tetA* kodiert für das Tetracyclinresistenzprotein A (Efflux-Protein) und *tetB* für das Tetracyclinresistenzprotein A der Klasse B. Bei Streptomycin konnten bei allen resistenten Isolaten die Resistenzgene (*strA*, *strB*) gefunden werden. Die Resistenzgene *strA* und *strB* kodieren für Enzyme (Aminoglycosid-3"-phosphotransferase und Aminoglycosid-6"-phosphotransferase), die für die Inaktivierung von Streptomycin verantwortlich sind. Bei dem Isolat A4c1 wurde zusätzlich ein Gen, das für eine Aminoglycosidresistenz kodiert (*aadA4*), gefunden, aber keine Resistenz beim Agardiffusionstest festgestellt. Alle phänotypisch gegenüber Ampicillin resistenten Isolate weisen auch ein dafür verantwortliches Resistenzgen auf. Die Isolate C8a2 und C7d2 haben wiederum ein  $\beta$ -Lactamase-Resistenzgen, obwohl keine Ampicillin-Resistenz beim Agardiffusionstest detektiert wurde. Das *qnrS*-Gen für die Quinolonresistenz wurde nur bei dem Isolat A3d2 gefunden, das bei der phänotypischen Untersuchung nur ein intermediäres Verhalten gegenüber Cipro- und Enrofloxacin zeigte. Ein Gen für die Quinolonresistenz wurde jedoch nicht bei den Isolaten mit einer ausgeprägten Enro- und Ciprofloxacinresistenz festgestellt. Fluoroquinolon-Resistenzen basieren auf Plasmiden, Mutationen oder auf einer verminderten intrazellulären Ansammlung des Antibiotikums. Enzymatische Inaktivierung wurde noch nicht beobachtet. Mutationen betreffen vor allem Gene der Topoisomerase IV (*parC* und *parE*) und der DNA-Gyrase (*gyrA* und *gyrB*), welche auf der chromosomalen DNA lokalisiert sind. Plasmide können aber auch eine Quinolone-Resistenz hervorrufen, welche ein Qnr-Protein produzieren, das die Angriffsziele von Quinolone vor Inhibition schützt. *AcrAB* und *tolC* sind Resistenzgene, welche auf der chromosomalen DNA lokalisiert sind und für den Efflux von Fluoroquinolone verantwortlich sind (Jacoby, 2015).

## 5.5 Wachstumsverhalten

Es wurde festgestellt, dass ein Unterschied im Wachstumsverhalten zwischen sensiblen und resistenten Isolaten nicht eindeutig war. Bei dem Nährmedium VRBD mit Pepton aus Fleisch war generell ein schlechteres Wachstum als bei MHB und TSB festzustellen. Eine Differenzierung der Isolate war bei einer Zusatzstoffkonzentration von 0,05% im VRBD-Medium nicht möglich, jedoch bei 0,1%. Bei Isolat 18e (resistent) beginnt die exponentielle Wachstumsphase erst nach ca. 50 h. Die Isolate B8a1 (sensibel), A4c1 (resistent), A1d1 (sensibel) und A3d2 (resistent, intermediär) weisen ein exponentielles Wachstum nach etwa 25 h auf. Im Nährmedium MHB trat bei den Konzentrationen 0,3% und 0,4% kein Wachstum auf. Bei 0,1% sind die Isolate kaum zu unterscheiden. Jedoch wuchs bei einer Konzentration von 0,2% 18e am schnellsten an, gefolgt von A1d1 und A4c1.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass es kein unterschiedliches Verhalten der Isolate im VRBD Nährmedium mit verschiedenen Peptonquellen gibt. Dieses Nährmedium beinhaltet als Hemmstoffe Gallensalze und Kristallviolett. Als geeignete Nährmedien wurden schließlich MHB und TSB ausgewählt. TSB wurde gewählt, weil es zur Anzucht von *E. coli* verwendet wird und damit die beste Wachstumsperformance möglich war. Das Nährmedium MHB, das sehr nährstoffarm ist, erlaubt am ehesten eine Differenzierung der Wachstumsperformance der Isolate unter Einfluss des Zusatzstoffes.

Im fünften Versuch mit dem Nährmedium MHB bei einer Konzentration von 0,2% des Zusatzstoffes ist zu beobachten, dass resistente Isolate eine schlechtere Fitness aufweisen. Die resistenten Isolate 18e, A3d2 und A4c1 haben hier eine schlechtere Wachstumsperformance als die sensiblen Isolate (B8a1, A1d1). Unter anderem stellte auch Gaesboll et al. (2014) fest, dass in den meisten Fällen eine Antibiotikaresistenz mit einer verminderten Wachstumsrate und Fitness, die von den Wachstumsbedingungen und Mutationsart abhängig ist, verbunden ist. Es ist aber auch möglich, dass die Aufnahme von Resistenzelementen sich auch positiv auf die Fitness auswirken kann (Enne, et al., 2005).

## 5.6 Schlussfolgerung

Im Rahmen dieser Masterarbeit wurde ersichtlich, dass durch den Einsatz eines auf organischen Säuren basierenden Futtermittelzusatzstoffes eine Reduktion der Anzahl resistenter *E. coli* Isolate bewirkt wird. Um jedoch eine genauere Aussage bezüglich der direkten Wirkung des Futtermittelzusatzstoffes auf das Wachstumsverhalten unterschiedlich empfindlicher *E. coli* tätigen zu können, sind weiterführende Analysen notwendig.

## 6 Literaturverzeichnis

Abraham, S. et al., 2012. Molecular characterization of commensal *Escherichia coli* adapted to different compartments of the porcine gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiolog.*; Vol. 78, pp. 6799-6803.

Agostinho, J. M. A. et al., 2014. *Escherichia coli* strains isolated from the uteria horn, mouth, and rectum of bitches suffering from pyometra virulence factors, antimicrobial susceptibilities, and clonal relationships among strains. *International Journal of Microbiology*: Vol. 2014, pp. 1-8.

Alere Technologies GmbH, Online im Internet: <http://alere-technologies.com/en/products/lab-solutions/platforms/arraytube-at.html>, Stand: 25 Juni 2015.

Ansaruzzaman, M. et al., 2007. Characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* from diarrhoeal patients in Bangladesh using phenotyping and genetic profiling. *Journal of Medical Microbiology*: Vol. 56, pp. 217-222.

Applied Maths NV. Online im Internet: <http://www.applied-maths.com>, Stand: 3 Juni 2015.

Askari, B. M. et al., 2014. Molecular characterization, genetic diversity and antibacterial susceptibility of *Escherichia coli* encoding shiga toxin 2f in domestic pigeons. *Applied Microbiology*: Vol. 59, pp. 370-376.

Ateba, C. N. & Mbewe, M., 2013. Determination of the genetic similarities of fingerprints from *Escherichia coli* O157:H7 isolated from different sources in the North West Province, South Africa using ISR, BOXAIR and REP-PCR analysis. *Microbiological Research*: Vol. 168, pp. 438--446.

Bailey, M. J., 2007 . *Macrolide and ketolide-based induction of erythromycin resistance methylase type-C in Escherichia coli*, Chicago, Illinois: College of the University at Chicago.

Bandyopadhyay, S. et al., 2012. Characterization of shiga toxin producing (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) in raw yak (*Poephagus grunniens*) milk and milk products. *Research in Veterinary Science*: Vol. 93, pp. 604-610.

Bandyopadhyay, S. et al., 2011. Prevalence, molecular fingerprinting and drug resistance profile of enterovirulent *Escherichia coli* isolates from free-ranging yaks of Tawang district, Arunachal Pradesh, India. *Springer+Business Media*: Vol. 44, pp. 1063-1072.

Blyton, M. D., et al., 2013. High temporal variability in commensal *Escherichia coli* strain communities of a herbivorous marsupial. *Environmental Microbiology*: Vol. 15, pp. 2162-2172.

Bryskier, A., 2005. *Antimicrobial Agents: Antibacterials and Antifungals*. 1. Auflage. Washington, DC: ASM Press (American Society for Microbiology).

Brodt, H.-R., 2013. *Antibiotika-Therapie*. 12. Auflage: Schattauer: Stuttgart.

- Busch, U., 2010. *Molekularbiologische Methoden in der Lebensmittelanalytik*. 1. Auflage, ISBN 978-3-642-10715-3, Springer-Verlag: Heidelberg.
- Carlos, C. et al., 2011. Use of *Escherichia coli* BOX-PCR fingerprints to identify sources of fecal contamination of water bodies in the State of Sao Paulo, Brazil. *Journal of Environmental Management*: Vol. 19, pp. 38-43.
- Chandran, A. & Mazumder, A., 2014. Occurrence of Diarrheagenic Virulence Genes and Genetic Diversity in *Escherichia coli* Isolates from Fecal Material of Various Avian Hosts in British Columbia, Canada. *Applied and Environmental Microbiology*: Vol. 80, pp. 1933-1940.
- Chmiel, H., 2011. *Bioprozesstechnik*. 3. Auflage, ISBN 978-3-8274-2477-8, Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg.
- Clark, D. P. & Pazdernik, N. J., 2009. *Molekulare Biotechnologie*. 1. Auflage, ISBN 978-3-8274-2189-0, Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg.
- Coates, A. R. M., 2012. *Antibiotic Resistance*. 1. Auflage, ISBN 978-3-642-28950-7, Springer-Verlag: London.
- de Lastours, V. et al., 2012. Diversity of Individual Dynamic Patterns of Emergence of Resistance to Quinolones in *Escherichia coli* From the Fecal Flora of Healthy Volunteers Exposed to Ciprofloxacin. *The Journal of Infectious Diseases*: Vol. 206, pp. 1399-1406.
- Drews, G., 2010. *Mikrobiologie Die Entdeckung der unsichtbaren Welt*. 1. Auflage, ISBN 978-3642107566, Springer-Verlag: Berlin Heidelberg.
- Enne, V. I. et al., 2005. Assessment of the fitness impacts on *Escherichia coli* of acquisition of antibiotic resistance genes encoded by different types of genetic element. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*: Vol. 56, pp. 544-551.
- European Food Safety Authority, EFSA, 2015. Antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in the European Union. *EFSA Journal*: Vol. 13, pp. 1-178.
- European Food Safety Authority, EFSA, 2014. Die EFSA erklärt Zoonosen. *EFSA Journal*: Vol. , pp. 1-2.
- European Medicines Agency, 2014. Sales of veterinary antimicrobial agents in 26 EU/EEA countries in 2012: Vol. 4
- Fluit, A. C. et al., 2001. Molecular Detection of Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*: Vol. 14, pp. 836-871.
- Gaeboll, K. et al., 2014. How Fitness Reduced, Antimicrobial Resistant Bacteria Survive and Spread: A Multiple Pig - Multiple Bacterial Strain Model. *PLoS One*: Vol. 10.1371.
- Goodsell, D. S., 2009. *The Machinery of Life*. 2. Auflage, ISBN 978-0-387-84925-6, Springer-Verlag: New York.

- Graw, J., 2006. *Genetik*. 4. Auflage, ISBN 978-3-540-24096-6, Springer-Verlag: Berlin Heidelberg.
- Gressner, A. M. & Arndt, T., 2013. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. 2. Auflage, ISBN 978-3-642-12921-6, Springer-Verlag: Heidelberg.
- Hirsch-Kauffmann, M. et al., 2009. *Biologie und molekulare Medizin*. 7. Auflage, ISBN 978-3-137-06507-4, Georg Thime Verlag KG: Stuttgart.
- Jacoby, G. A., 2015. Mechanisms of Resistance to Quinolones. *Oxford Journals*: Vol. 41, pp. 120-126.
- Jadhav, S. et al., 2011. Virulence Characteristics and Genetic Affinities of Multiple Drug Resistant Uropathogenic *Escherichia coli* from a Semi Urban Locality in India. *PLoS ONE*: Vol. 0018063.
- Jansohn, M. & Rothhämel, S., 2012. *Gentechnische Methoden*. 5. Auflage, ISBN 978-3-8274-2430-3, Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg.
- Koeuth, T. et al., 1995. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. *Genome Research*: Vol. 5, pp. 408-418.
- Kronthaler, F. X., 2009. *Untersuchung zur in-vitro-Antibiotikaempfindlichkeit aerober Bakterien beim Wirtschaftsgeflügel mittels Agardiffusionstest und Bouillon-Mikrodilutionsmethode*, Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München
- Lentze, M. J. et al., 2001. *Pädiatrie*. 1. Auflage, ISBN 978-3-540-76460-1, Springer-Verlag: Heidelberg.
- Lindgren, P. K. et al., 2003. Mutation Rate and Evolution of Fluoroquinolone Resistance in *Escherichia coli* Isolates from Patients with Urinary Tract Infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Oktober: Vol. 47, pp. 3222-3232.
- Lyautey, E. et al., 2014. Distribution and Diversity of *Escherichia coli* Populations in the South Nation River Drainage Basin, Eastern Ontario, Canada. *Applied and Environmental Microbiology*: Vol. 76, pp. 1486-1496.
- Madigan, M. T. et al., 2013. *Brock Mikrobiologie*. 13., aktualisierte Auflage. ISBN 978-386894-144-9. Pearson Deutschland GmbH: Hallbergmoos / Deutschland.
- Ma, H.-J. et al., 2011. Differentiation of Fecal *Escherichia coli* from Human, Livestock and Poultry Sources by rep-PCR DNA Fingerprinting on the Shellfish Culture Area of East China Sea. *Curr Microbiol*: Vol. 62, pp. 1423-1430.
- Malathum, K. et al., 1998. Repetitive sequence-based PCR versus pulsed-field gel electrophoresis for typing of *Enterococcus faecalis* at the subspecies level. *Journal of Clinical Microbiology*: Vol. 36, pp. 211-215.

- Markovska, R. et al., 2013. Predominance of IncL/M and Incf plasmid types among CTX-M-ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Bulgarian hospitals. *APMIS*: Vol. 122, pp. 608-615.
- Meyer, W. et al., 1993. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinical Microbiology*: Vol. 31, pp. 2274-2280.
- Mohapatra, B. R. et al., 2007. Comparison of five rep-PCR genomic fingerprinting methods for differentiation of fecal *Escherichia coli* from humans, poultry and wild birds. *Federation of European Microbiological Societies*: Vol. 277, pp. 98-106.
- Nelson, D. & Cox, M., 2009. *Lehninger Biochemie*. 4. Auflage, ISBN 978-3-540-6837-8, Springer-Verlag: Berlin Heidelberg.
- Nielson, K. L. et al., 2014. Selection of unique *Escherichia coli* clones by random amplified polymorphic DNA (RAPD): Evaluation by whole genome sequencing. *Journal of Microbiological Methods*: Vol. 103, pp. 101-103.
- Nilsson, O. et al., 2014. Vertical transmission of *Escherichia coli* carrying plasmid-mediated AmpC (pAmpC) through the broiler production pyramid. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Vol. 69, pp. 1497-1500.
- Nollet, L. M. L. & De Gelder, L. S. P., 2013. *Handbook of Water Analysis*. 3, ISBN 978-1-439-88964-0, CRC Press New York, Basel.
- Ouyang-Latimer, J. et al., 2010. Biochemical and Genetic Diversity of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Associated with Diarrhea in United States Students in Cuernavaca and Guadalajara, Mexico, 2004-2007. *The Journal of Infectious Diseases*: Vol. 201, pp. 1831-1838.
- Oy Growth Curves Ab Ltd. Online im Internet: <http://www.bioscreen.fi/bioscreen.html>, Stand: 2 Juni 2015.
- Pathak, A. et al., 2013. Frequency and factors associated with carriage of multi-drug resistant commensal *Escherichia coli* among women attending antenatal clinics in Central India. *BioMed Central*: Vol. 13, pp. 1-19.
- Pereira, A. et al., 2013. Genetic diversity and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* from Tagus estuary (Portugal). *Science of the Total Environment*: Vol. 461-462, pp. 65-71.
- Perreten, V. et al., 2005. Microarray-Based Detection of 90 Antibiotic Resistance Genes of Gram-Positive Bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*: Vol. 43, pp. 2291-2302.
- Pope, C. F., et al., 2010. Methods to Determine Fitness in Bacteria. *Antibiotic Resistance Protocols*: Vol. 642, pp. 113-121.
- Porm, M., 2013. Begünstigende Faktoren für Resistenzbildungen. *Bildungs- und Wissenszentrum Boxberg*, Juni, Bericht, pp. 1-2.

- Rodriguez-Bano, J. et al., 2004. Epidemiology and Clinical Features of Infections Caused by Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Nonhospitalized Patients. *Journal of Clinical Microbiology*: Vol. 42, pp. 1089-1094.
- Sahm, H. et al., 2013. *Industrielle Mikrobiologie*. 1. Auflage, ISBN 978-3-8274-3040-3, Springer Spektrum: Heidelberg.
- Schmitz, S., 2011. *Der Experimentator Zellkultur*. 3. Auflage, ISBN 978-3-8274-2573-7, Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg.
- Suerbaum, S. et al., 2012. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 7. Auflage, ISBN 978-3-642-24167-3, Springer-Verlag: Heidelberg.
- Tomás-Callejas, A. et al., 2011. Survival and distribution of *Escherichia coli* on diverse fresh-cut baby leafy greens under preharvest through postharvest conditions. *International Journal of Food Microbiology*: Vol. 151, pp. 216-222.
- Tramuta, C. et al., 2010. Virulence factors and genetic variability of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Italy. *Journal of Veterinary Science*: Vol. 12, pp. 49-55.
- Versalovic, J. et al., 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*: Vol. 19, pp. 6823-6831.

## **7 Erklärung**

Ich erkläre eidesstattlich, dass ich die Arbeit selbständig angefertigt, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt und alle aus ungedruckten Quellen, gedruckter Literatur oder aus dem Internet im Wortlaut oder im wesentlichen Inhalt übernommenen Formulierungen und Konzepte gemäß den Richtlinien wissenschaftlicher Arbeiten zitiert, durch Fußnoten gekennzeichnet bzw. mit genauer Quellenangabe kenntlich gemacht habe.

Wien, Jänner 2016

Andreas Weiß

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <i>E. coli</i> .....	3
Abbildung 2: Wirkmechanismen von Antibiotika .....	6
Abbildung 3: Streptomycin .....	7
Abbildung 4: Erythromycin .....	7
Abbildung 5: Tetracyclin.....	8
Abbildung 6: Sulfanilamid, p-Aminobenzoesäure, Folsäure .....	9
Abbildung 7: Ciprofloxacin .....	9
Abbildung 8: Penicilline.....	11
Abbildung 9: Cephalosporine .....	11
Abbildung 10: Cefotaxim.....	12
Abbildung 11: Ein Reaktionszyklus bei der PCR .....	17
Abbildung 12: Prinzip Microarray .....	20
Abbildung 13: Mikrotiterplatte mit <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	21
Abbildung 14: Wachstumskurve .....	23
Abbildung 15: Häufigkeitsverteilung Ampicillin (10) - alle Isolate .....	45
Abbildung 16: Gruppenvergleich - Ampicillin (10).....	45
Abbildung 17: Zeitpunktvergleich Kontrollgruppe - Ampicillin (10) .....	45
Abbildung 18: Zeitpunktvergleich Zusatzstoffgruppe - Ampicillin (10) .....	45
Abbildung 19: Zeitpunktvergleich Antibiotikumgruppe - Ampicillin (10) .....	46
Abbildung 20: Häufigkeitsverteilung Cefotaxim (5) - alle Isolate .....	46
Abbildung 21: Gruppenvergleich - Cefotaxim (5) .....	46
Abbildung 22: Zeitpunktvergleich Kontrollgruppe - Cefotaxim (5).....	47
Abbildung 23: Zeitpunktvergleich Zusatzstoffgruppe - Cefotaxim (5).....	47
Abbildung 24: Zeitpunktvergleich Antibiotikumgruppe - Cefotaxim (5).....	47
Abbildung 25: Häufigkeitsverteilung - Cefotaxim (30).....	47
Abbildung 26: Gruppenvergleich - Cefotaxim (30) .....	48
Abbildung 27: Zeitpunktvergleich Kontrollgruppe - Cefotaxim (30).....	48
Abbildung 28: Zeitpunktvergleich Zusatzstoffgruppe - Cefotaxim (30).....	48
Abbildung 29: Zeitpunktvergleich Antibiotikumgruppe - Cefotaxim (30).....	48
Abbildung 30: Häufigkeitsverteilung Ceftiofur (30) - alle Isolate.....	49
Abbildung 31: Gruppenvergleich - Ceftiofur (30).....	49
Abbildung 32: Zeitpunktvergleich Kontrollgruppe - Ceftiofur (30).....	49
Abbildung 33: Zeitpunktvergleich Zusatzstoffgruppe - Ceftiofur (30) .....	49
Abbildung 34: Zeitpunktvergleich Antibiotikumgruppe - Ceftiofur (30).....	50
Abbildung 35: Häufigkeitsverteilung Meropenem (10) - alle Isolate.....	50
Abbildung 36: Gruppenvergleich Meropenem - (10).....	50
Abbildung 37: Zeitpunktvergleich Kontrollgruppe - Meropenem (10) .....	51
Abbildung 38: Zeitpunktvergleich Zusatzstoffgruppe - Meropenem (10) .....	51
Abbildung 39: Zeitpunktvergleich Antibiotikumgruppe - Meropenem (10).....	51

Abbildung 40: Häufigkeitsverteilung Ciprofloxacin (5) - alle Isolate .....	51
Abbildung 41: Gruppenvergleich - Ciprofloxacin (5).....	52
Abbildung 42: Zeitpunktvergleich Kontrollgruppe - Ciprofloxacin (5) .....	52
Abbildung 43: Zeitpunktvergleich Zusatzstoffgruppe - Ciprofloxacin (5) .....	52
Abbildung 44: Zeitpunktvergleich Antibiotikumgruppe - Ciprofloxacin (5).....	52
Abbildung 45: Häufigkeitsverteilung Enrofloxacin (5) - alle Isolate .....	53
Abbildung 46: Gruppenvergleich - Enrofloxacin (5).....	53
Abbildung 47: Zeitpunktvergleich Kontrollgruppe - Enrofloxacin (5) .....	53
Abbildung 48: Zeitpunktvergleich Zusatzstoffgruppe - Enrofloxacin (5) .....	54
Abbildung 49: Zeitpunktvergleich Antibiotikumgruppe - Enrofloxacin (5) .....	54
Abbildung 50: Häufigkeitsverteilung Tetracyclin (30) - alle Isolate .....	54
Abbildung 51: Gruppenvergleich - Tetracyclin (30) .....	55
Abbildung 52: Zeitpunktvergleich Kontrollgruppe - Tetracyclin (30).....	55
Abbildung 53: Zeitpunktvergleich Zusatzstoffgruppe - Tetracyclin (30).....	55
Abbildung 54: Zeitpunktvergleich Antibiotikumgruppe - Tetracyclin (30) .....	55
Abbildung 55: Häufigkeitsverteilung Streptomycin (10) - alle Isolate .....	56
Abbildung 56: Gruppenvergleich - Streptomycin (10) .....	56
Abbildung 57: Zeitpunktvergleich Kontrollgruppe - Streptomycin (10).....	56
Abbildung 58: Zeitpunktvergleich Zusatzstoffgruppe - Streptomycin (10).....	56
Abbildung 59: Zeitpunktvergleich Antibiotikumgruppe - Streptomycin (10) .....	57
Abbildung 60: Häufigkeitsverteilung Sulfonamid (300) - alle Isolate.....	57
Abbildung 61: Gruppenvergleich - Sulfonamid (300).....	57
Abbildung 62: Zeitpunktvergleich Kontrollgruppe - Sulfonamid (300).....	58
Abbildung 63: Zeitpunktvergleich Zusatzstoffgruppe - Sulfonamid (300) .....	58
Abbildung 64: Zeitpunktvergleich Antibiotikumgruppe - Sulfonamid (300).....	58
Abbildung 65: BioNumerics Auswertung .....	63
Abbildung 66: BioNumerics Auswertung Comparison Typing+Antibiotics.....	67
Abbildung 67: Wachstumskurven des Isolates 18e bei 0,1% Zusatzstoff in verschiedenen Nährmedien.....	74
Abbildung 68: Wachstumskurven des Isolates A1d1 bei 0,1% Zusatzstoff in verschiedenen Nährmedien.....	74
Abbildung 69: Wachstumskurven des Isolates 18e bei 0,1% Zusatzstoff im Nährmedium TSB.....	74
Abbildung 70: Wachstumskurven des Isolates 18e bei 0,2% Zusatzstoff im Nährmedium TSB.....	74
Abbildung 71: Wachstumskurven des Isolates 18e bei 0,3% Zusatzstoff im Nährmedium TSB.....	75
Abbildung 72: Wachstumskurven des Isolates A4c1 bei 0,1% Zusatzstoff im Nährmedium TSB.....	75
Abbildung 73: Wachstumskurven des Isolates A4c1 bei 0,3% Zusatzstoff im Nährmedium TSB.....	75
Abbildung 74: Wachstumskurven des Isolates A1d1 bei 0,1% Zusatzstoff im Nährmedium TSB.....	75
Abbildung 75: Wachstumskurven des Isolates 18e bei 0,4% Zusatzstoff im Nährmedium TSB.....	75

Abbildung 76: Wachstumskurven des Isolates A4c1 bei 0,2% Zusatzstoff im Nährmedium TSB.....	75
Abbildung 77: Wachstumskurven des Isolates A4c1 bei 0,4% Zusatzstoff im Nährmedium TSB.....	75
Abbildung 78: Wachstumskurven des Isolates A1d1 bei 0,2% Zusatzstoff im Nährmedium TSB.....	75
Abbildung 79: Wachstumskurven des Isolates A1d1 bei 0,3% Zusatzstoff im Nährmedium TSB.....	76
Abbildung 80: Wachstumskurven des Isolates A1d1 bei 0,4% Zusatzstoff im Nährmedium TSB.....	76
Abbildung 81: Wachstumskurven des Isolates 18e bei 0,1% Zusatzstoff im Nährmedium MHB.....	76
Abbildung 82: Wachstumskurven des Isolates 18e bei 0,2% Zusatzstoff im Nährmedium MHB.....	76
Abbildung 83: Wachstumskurven des Isolates 18e bei 0,3% Zusatzstoff im Nährmedium MHB.....	77
Abbildung 84: Wachstumskurven des Isolates A4c1 bei 0,1% Zusatzstoff im Nährmedium MHB.....	77
Abbildung 85: Wachstumskurven des Isolates A4c1 bei 0,13% Zusatzstoff im Nährmedium MHB.....	77
Abbildung 86: Wachstumskurven des Isolates A1d1 bei 0,1% Zusatzstoff im Nährmedium MHB.....	77
Abbildung 87: Wachstumskurven des Isolates 18e bei 0,4% Zusatzstoff im Nährmedium MHB.....	77
Abbildung 88: Wachstumskurven des Isolates A4c1 bei 0,2% Zusatzstoff im Nährmedium MHB.....	77
Abbildung 89: Wachstumskurven des Isolates A4c1 bei 0,4% Zusatzstoff im Nährmedium MHB.....	77
Abbildung 90: Wachstumskurven des Isolates A1d1 bei 0,2% Zusatzstoff im Nährmedium MHB.....	77
Abbildung 91: Wachstumskurven des Isolates A1d1 bei 0,3% Zusatzstoff im Nährmedium MHB.....	78
Abbildung 92: Wachstumskurven des Isolates A1d1 bei 0,4% Zusatzstoff im Nährmedium MHB.....	78
Abbildung 93: Wachstumskurven des Isolates 18e bei 0,1% Zusatzstoff im Nährmedium TSB+Hem .....	78
Abbildung 94: Wachstumskurven des Isolates 18e bei 0,3% Zusatzstoff im Nährmedium TSB+Hem .....	78
Abbildung 95: Wachstumskurven des Isolates 18e bei 0,2% Zusatzstoff im Nährmedium TSB+Hem .....	78
Abbildung 96: Wachstumskurven des Isolates 18e bei 0,4% Zusatzstoff im Nährmedium TSB+Hem .....	78
Abbildung 97: Wachstumskurven des Isolates A4c1 bei 0,1% Zusatzstoff im Nährmedium TSB+Hem .....	79
Abbildung 98: Wachstumskurven des Isolates A4c1 bei 0,3% Zusatzstoff im Nährmedium TSB+Hem .....	79

Abbildung 99: Wachstumskurven des Isolates A1d1 bei 0,1% Zusatzstoff im Nährmedium TSB+Hem .....	79
Abbildung 100: Wachstumskurven des Isolates A1d1 bei 0,3% Zusatzstoff im Nährmedium TSB+Hem .....	79
Abbildung 101: Wachstumskurven des Isolates A4c1 bei 0,2% Zusatzstoff im Nährmedium TSB+Hem .....	79
Abbildung 102: Wachstumskurven des Isolates A1c1 bei 0,4% Zusatzstoff im Nährmedium TSB+Hem .....	79
Abbildung 103: Wachstumskurven des Isolates A1d1 bei 0,2% Zusatzstoff im Nährmedium TSB+Hem .....	79
Abbildung 104: Wachstumskurven des Isolates A1d1 bei 0,4% Zusatzstoff im Nährmedium TSB+Hem .....	79
Abbildung 105: Wachstumskurven des Isolates 18e bei 0,1% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD alt.....	80
Abbildung 106: Wachstumskurven des Isolates 18e bei 0,3% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD alt.....	80
Abbildung 107: Wachstumskurven des Isolates 18e bei 0,2% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD alt.....	80
Abbildung 108: Wachstumskurven des Isolates 18e bei 0,4% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD alt.....	80
Abbildung 109: Wachstumskurven des Isolates A4c1 bei 0,1% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD alt.....	80
Abbildung 110: Wachstumskurven des Isolates A4c1 bei 0,3% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD alt.....	80
Abbildung 111: Wachstumskurven des Isolates A1d1 bei 0,1% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD alt.....	81
Abbildung 112: Wachstumskurven des Isolates A4c1 bei 0,2% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD alt.....	81
Abbildung 113: Wachstumskurven des Isolates A4c1 bei 0,4% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD alt.....	81
Abbildung 114: Wachstumskurven des Isolates A1d1 bei 0,2% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD alt.....	81
Abbildung 115: Wachstumskurven des Isolates A1d1 bei 0,3% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD alt.....	81
Abbildung 116: Wachstumskurven des Isolates A1d1 bei 0,4% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD alt.....	81
Abbildung 117: Wachstumskurven des Isolates 18e bei 0,1% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD neu.....	82
Abbildung 118: Wachstumskurven des Isolates 18e bei 0,3% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD neu.....	82
Abbildung 119: Wachstumskurven des Isolates 18e bei 0,2% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD neu.....	82
Abbildung 120: Wachstumskurven des Isolates 18e bei 0,4% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD neu.....	82
Abbildung 121: Wachstumskurven des Isolates A4c1 bei 0,1% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD neu.....	82

Abbildung 122: Wachstumskurven des Isolates A4c1 bei 0,3% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD neu.....	82
Abbildung 123: Wachstumskurven des Isolates A1d1 bei 0,1% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD neu.....	82
Abbildung 124: Wachstumskurven des Isolates A4c1 bei 0,2% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD neu.....	82
Abbildung 125: Wachstumskurven des Isolates A4c1 bei 0,4% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD neu.....	83
Abbildung 126: Wachstumskurven des Isolates A1d1 bei 0,2% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD neu.....	83
Abbildung 127: Wachstumskurven des Isolates A1d1 bei 0,3% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD neu.....	83
Abbildung 128: Wachstumskurven des Isolates A1d1 bei 0,4% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD neu.....	83
Abbildung 129: Wachstumskurven des 4. Versuches bei 0,1% Zusatzstoff im Nährmedium TSB.....	84
Abbildung 130: Wachstumskurven des 4. Versuches bei 0,2% Zusatzstoff im Nährmedium TSB.....	84
Abbildung 131: Wachstumskurven des 4. Versuches bei 0,3% Zusatzstoff im Nährmedium TSB.....	84
Abbildung 132: Wachstumskurven des 4. Versuches bei 0,1% Zusatzstoff im Nährmedium MHB.....	84
Abbildung 133: Wachstumskurven des 4. Versuches bei 0,3% Zusatzstoff im Nährmedium MHB.....	84
Abbildung 134: Wachstumskurven des 4. Versuches bei 0,1% Zusatzstoff im Nährmedium TSB+Hem .....	84
Abbildung 135: Wachstumskurven des 4. Versuches bei 0,4% Zusatzstoff im Nährmedium TSB.....	84
Abbildung 136: Wachstumskurven des 4. Versuches bei 0,2% Zusatzstoff im Nährmedium MHB.....	84
Abbildung 137: Wachstumskurven des 4. Versuches bei 0,4% Zusatzstoff im Nährmedium MHB.....	85
Abbildung 138: Wachstumskurven des 4. Versuches bei 0,2% Zusatzstoff im Nährmedium TSB+Hem .....	85
Abbildung 139: Wachstumskurven des 4. Versuches bei 0,3% Zusatzstoff im Nährmedium TSB+Hem .....	85
Abbildung 140: Wachstumskurven des 4. Versuches bei 0,1% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD alt.....	85
Abbildung 141: Wachstumskurven des 4. Versuches bei 0,3% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD alt.....	85
Abbildung 142: Wachstumskurven des 4. Versuches bei 0,1% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD neu.....	85
Abbildung 143: Wachstumskurven des 4. Versuches bei 0,4% Zusatzstoff im Nährmedium TSB+Hem .....	85
Abbildung 144: Wachstumskurven des 4. Versuches bei 0,2% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD alt.....	85

Abbildung 145: Wachstumskurven des 4. Versuches bei 0,4% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD alt.....	86
Abbildung 146: Wachstumskurven des 4. Versuches bei 0,2% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD neu.....	86
Abbildung 147: Wachstumskurven des 4. Versuches bei 0,3% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD neu.....	86
Abbildung 148: Wachstumskurven des 4. Versuches bei 0,4% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD neu.....	86
Abbildung 149: Wachstumskurven des 5. Versuches bei 0,05% Zusatzstoff im Nährmedium TSB.....	87
Abbildung 150: Wachstumskurven des 5. Versuches bei 0,2% Zusatzstoff im Nährmedium TSB.....	87
Abbildung 151: Wachstumskurven des 5. Versuches bei 0,4% Zusatzstoff im Nährmedium TSB.....	87
Abbildung 152: Wachstumskurven des 5. Versuches bei 0,05% Zusatzstoff im Nährmedium MHB.....	87
Abbildung 153: Wachstumskurven des 5. Versuches bei 0,1% Zusatzstoff im Nährmedium TSB.....	87
Abbildung 154: Wachstumskurven des 5. Versuches bei 0,3% Zusatzstoff im Nährmedium TSB.....	87
Abbildung 155: Wachstumskurven des 5. Versuches bei 0,5% Zusatzstoff im Nährmedium TSB.....	87
Abbildung 156: Wachstumskurven des 5. Versuches bei 0,1% Zusatzstoff im Nährmedium MHB.....	87
Abbildung 157: Wachstumskurven des 5. Versuches bei 0,2% Zusatzstoff im Nährmedium MHB.....	88
Abbildung 158: Wachstumskurven des 5. Versuches bei 0,4% Zusatzstoff im Nährmedium MHB.....	88
Abbildung 159: Wachstumskurven des 5. Versuches bei 0,05% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD alt.....	88
Abbildung 160: Wachstumskurven des 5. Versuches bei 0,2% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD alt.....	88
Abbildung 161: Wachstumskurven des 5. Versuches bei 0,3% Zusatzstoff im Nährmedium MHB.....	88
Abbildung 162: Wachstumskurven des 5. Versuches bei 0,5% Zusatzstoff im Nährmedium MHB.....	88
Abbildung 163: Wachstumskurven des 5. Versuches bei 0,1% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD alt.....	88
Abbildung 164: Wachstumskurven des 5. Versuches bei 0,3% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD alt.....	88
Abbildung 165: Wachstumskurven des 5. Versuches bei 0,4% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD alt.....	89
Abbildung 166: Wachstumskurven des 5. Versuches bei 0,5% Zusatzstoff im Nährmedium VRBD alt.....	89
Abbildung 167: Wachstumskurven des Isolates 18e bei verschiedenen Konzentrationen von Ciprofloxacin im Nährmedium TSB .....	89

Abbildung 168: Wachstumskurven des Isolates 18e bei verschiedenen Konzentrationen von Ciprofloxacin im Nährmedium MHB .....	89
Abbildung 169: Wachstumskurven des Isolates 18e bei verschiedenen Konzentrationen von Ciprofloxacin im Nährmedium TSB+Hem .....	90
Abbildung 170: Wachstumskurven des Isolates 18e bei verschiedenen Konzentrationen von Ciprofloxacin im Nährmedium VRBD .....	90
Abbildung 171: Wachstumskurven des Isolates 18e bei verschiedenen Konzentrationen von Enrofloxacin im Nährmedium TSB.....	90
Abbildung 172: Wachstumskurven des Isolates 18e bei verschiedenen Konzentrationen von Enrofloxacin im Nährmedium MHB .....	90
Abbildung 173: Wachstumskurven des Isolates 18e bei verschiedenen Konzentrationen von Enrofloxacin im Nährmedium TSB+Hem .....	90
Abbildung 174: Wachstumskurven des Isolates 18e bei verschiedenen Konzentrationen von Enrofloxacin im Nährmedium VRBD .....	90
Abbildung 175: Wachstumskurven des Isolates 18e bei verschiedenen Konzentrationen von Cipro- und Enrofloxacin im Nährmedium TSB.....	91
Abbildung 176: Wachstumskurven des Isolates 18e bei verschiedenen Konzentrationen von Cipro- und Enrofloxacin im Nährmedium MHB.....	91
Abbildung 177: Wachstumskurven des Isolates 18e bei verschiedenen Konzentrationen von Cipro- und Enrofloxacin im Nährmedium TSB+Hem .....	91
Abbildung 178: Wachstumskurven des Isolates 18e bei verschiedenen Konzentrationen von Cipro- und Enrofloxacin im Nährmedium VRBD neu .....	91
Abbildung 179: Wachstumskurven des Isolates 18e bei verschiedenen Konzentrationen von Cipro- und Enrofloxacin im Nährmedium VRBD alt .....	91
Abbildung 180: Wachstumskurven des Isolates A4c1 bei verschiedenen Konzentrationen von Ciprofloxacin im Nährmedium TSB .....	91
Abbildung 181: Wachstumskurven des Isolates A4c1 bei verschiedenen Konzentrationen von Ciprofloxacin im Nährmedium MHB .....	92
Abbildung 182: Wachstumskurven des Isolates A4c1 bei verschiedenen Konzentrationen von Ciprofloxacin im Nährmedium TSB+Hem .....	92
Abbildung 183: Wachstumskurven des Isolates A4c1 bei verschiedenen Konzentrationen von Ciprofloxacin im Nährmedium VRBD .....	93
Abbildung 184: Wachstumskurven des Isolates A4c1 bei verschiedenen Konzentrationen von Enrofloxacin im Nährmedium TSB.....	93
Abbildung 185: Wachstumskurven des Isolates A4c1 bei verschiedenen Konzentrationen von Enrofloxacin im Nährmedium MHB .....	93
Abbildung 186: Wachstumskurven des Isolates A4c1 bei verschiedenen Konzentrationen von Enrofloxacin im Nährmedium TSB+Hem .....	93
Abbildung 187: Wachstumskurven des Isolates A4c1 bei verschiedenen Konzentrationen von Enrofloxacin im Nährmedium VRBD .....	92
Abbildung 188: Wachstumskurven des Isolates A3d2 bei verschiedenen Konzentrationen von Ciprofloxacin im Nährmedium TSB .....	93
Abbildung 189: Wachstumskurven des Isolates A3d2 bei verschiedenen Konzentrationen von Ciprofloxacin im Nährmedium MHB .....	93
Abbildung 190: Wachstumskurven des Isolates A3d2 bei verschiedenen Konzentrationen von Ciprofloxacin im Nährmedium TSB+Hem .....	93

Abbildung 191: Wachstumskurven des Isolates A3d2 bei verschiedenen Konzentrationen von Ciprofloxacin im Nährmedium VRBD .....	93
Abbildung 192: Wachstumskurven des Isolates A3d2 bei verschiedenen Konzentrationen von Enrofloxacin im Nährmedium TSB.....	93
Abbildung 193: Wachstumskurven des Isolates A3d2 bei verschiedenen Konzentrationen von Enrofloxacin im Nährmedium MHB .....	94
Abbildung 194: Wachstumskurven des Isolates A3d2 bei verschiedenen Konzentrationen von Enrofloxacin im Nährmedium TSB+Hem.....	94
Abbildung 195: Wachstumskurven des Isolates A3d2 bei verschiedenen Konzentrationen von Enrofloxacin im Nährmedium VRBD .....	94
Abbildung 196: Microarray 18a .....	129
Abbildung 197: Microarray 18d .....	129
Abbildung 198: Microarray 18b .....	129
Abbildung 199: Microarray 18e .....	129
Abbildung 200: Microarray 18c.....	129
Abbildung 201: Microarray A1d1.....	129
Abbildung 202: Microarray A2c1 .....	130
Abbildung 203: Microarray A4c1 .....	130
Abbildung 204: Microarray A3d2 .....	130
Abbildung 205: Microarray A4e1 .....	130
Abbildung 206: Microarray A4b2 .....	130
Abbildung 207: Microarray A5d1 .....	130
Abbildung 208: Microarray A5d2 .....	131
Abbildung 209: Microarray A8a1 .....	131
Abbildung 210: Microarray A5e1 .....	131
Abbildung 211: Microarray A8c1 .....	131
Abbildung 212: Microarray A6e2 .....	131
Abbildung 213: Microarray B1a1 .....	131
Abbildung 214: Microarray B2c1 .....	132
Abbildung 215: Microarray B5a2 .....	132
Abbildung 216: Microarray B3e2 .....	132
Abbildung 217: Microarray B7d2 .....	132
Abbildung 218: Microarray B4d1 .....	132
Abbildung 219: Microarray B8a1 .....	132
Abbildung 220: Microarray B8e2 .....	133
Abbildung 221: Microarray C3b1 .....	133
Abbildung 222: Microarray C1b2 .....	133
Abbildung 223: Microarray C3b1 .....	133
Abbildung 224: Microarray C2a1 .....	133
Abbildung 225: Microarray C3c2 .....	133
Abbildung 226: Microarray C3e1 .....	134
Abbildung 227: Microarray C6e1 .....	134
Abbildung 228: Microarray C4e2 .....	134
Abbildung 229: Microarray C7d2 .....	134

Abbildung 230: Microarray C6a1 .....	134
Abbildung 231: Microarray C8a2 .....	134
Abbildung 232: Microarray Control Material.....	135
Abbildung 233: Microarray A1 (ursprüngliche Probe).....	135
Abbildung 234: Microarray Ec16.....	135
Abbildung 235: 100 bp DNA-Leiter, extended .....	136
Abbildung 236: Agarosegel - RAPD4 - A1a1-C7a2.....	137
Abbildung 237: Agarosegel - RAPD13 A1a1-C7a2.....	137
Abbildung 238: Agarosegel - Torriani - A1a1-C7a2 .....	138
Abbildung 239: Agarosegel - Torriani WH A1a1-C7a2 .....	138
Abbildung 240: Agarosegel - Torriani C4e2-A2c2 - RAPD13 B1a1-A2c2.....	139
Abbildung 241: Agarosegel - REP1R-I + REP2I - Beladung A1a1-C7a2 .....	139
Abbildung 242: Agarosegel - (GTG) <sub>5</sub> A1a1-C7a2 .....	140
Abbildung 243: Agarosegel - (GTG) <sub>5</sub> 25 Zyklen - Beladung A1a1-C7a2.....	140
Abbildung 244: Agarosegel - REP1R + REP 2I - Beladung A1a1-C7a2 .....	141
Abbildung 245: Agarosegel - (GTG) <sub>5</sub> - Beladung A1a1-C7a2 .....	141
Abbildung 246: Agarosegel - ERIC1 + ERIC2R - Beladung A1a1-C7a2 .....	142
Abbildung 247: Agarosegel - BOXA1R - Beladung A1a1-C7a2 .....	142
Abbildung 248: Agarosegel - ERIC1R + ERIC2 - A1a1-A7e1 .....	143
Abbildung 249: Agarosegel - ERIC1R + ERIC2 - B6b1-B3d1 .....	143
Abbildung 250: Agarosegel - ERIC1R + ERIC2 -C4b1-B4a1 .....	144
Abbildung 251: Agarosegel - ERIC1R +ERIC2 -A6a1-C1e1 .....	144
Abbildung 252: Agarosegel - ERIC1R +ERIC2 - C2c1-C7a1.....	145
Abbildung 253: Agarosegel - ERIC1R + ERIC2 -A1c2-C5b1 .....	145
Abbildung 254: Agarosegel - ERIC1R + ERIC2 - C7d1-A6c2 .....	146
Abbildung 255: Agarosegel - ERIC1R + ERIC2 - C5e1-C4d2 .....	146
Abbildung 256: Agarosegel - ERIC1R +ERIC2 - A7a2-B6b2.....	147
Abbildung 257: Agarosegel - ERIC1R + ERIC2 - B8d2-A8d2.....	147
Abbildung 258: Agarosegel - ERIC1R + ERIC2 - B7a2-C8d2 .....	148
Abbildung 259: Agarosegel - ERIC1R + ERIC2 - Ec18-A1c1.....	148
Abbildung 260: Agarosegel - ERIC1R + ERIC2 - A3e1-A1a2 .....	149
Abbildung 261: Agarosegel - ERIC1R + ERIC2 - B8c1-A5e1 .....	149
Abbildung 262: Agarosegel - ERIC1R + ERIC2 - A5b1-B5d2.....	150

## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und Nährmedien - Agardiffusionstest .....	24
Tabelle 2: Verwendete Geräte und Materialien - Agardiffusionstest.....	25
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Nährmedien - Vorbereitung Molekularbiologie .....	26
Tabelle 4: Verwendete Geräte und Materialien - Vorbereitung Molekularbiologie .....	27
Tabelle 5: Verwendete Chemikalien - DNA-Isolation.....	28
Tabelle 6: Verwendete Geräte und Materialien - DNA-Isolation.....	28
Tabelle 7: Verwendete Chemikalien - DNA-Konzentration-Messung .....	30
Tabelle 8 Verwendete Geräte und Materialien - DNA-Konzentration-Messung.....	30
Tabelle 9: Verwendete Primer - PCR.....	31
Tabelle 10: Verwendete Chemikalien - PCR.....	31
Tabelle 11: Verwendete Geräte und Materialien - PCR.....	31
Tabelle 12: PCR-Programm - RAPD-PCR (RAPD4, RAPD13, Torriani) .....	32
Tabelle 13: PCR-Programm - ERIC1R + ERIC2; BOXA1R .....	33
Tabelle 14: PCR-Programm - REP-1R + REP-2I .....	33
Tabelle 15: PCR-Programm - (GTG) <sub>5</sub> .....	33
Tabelle 16: Verwendete Chemikalien - Agarose-Gelelektrophorese.....	34
Tabelle 17: Verwendete Geräte und Materialien - Agarose-Gelelektrophorese.....	34
Tabelle 18: Verwendete Geräte und Programme: Auswertung Agardiffusionstest und Fingerprint-Daten .....	36
Tabelle 19: Verwendete Chemikalien - DNA-Microarray.....	37
Tabelle 20: Verwendete Geräte und Materialien - DNA-Microarray.....	37
Tabelle 21: PCR-Programm - DNA-Microarray.....	38
Tabelle 22: Verwendete Chemikalien - Test des Wachstumsverhaltens.....	39
Tabelle 23: Verwendete Geräte und Materialien - Test des Wachstumsverhaltens.....	40
Tabelle 24: Verwendete Breakpoints/cut-off - CLSI, EUCAST und aufgrund der Häufigkeitsverteilung .....	43
Tabelle 25: Breakpoints - EUCAST.....	44
Tabelle 26: Breakpoints - CLSI .....	44
Tabelle 27: Resistenzverteilung auf die einzelnen Gruppen.....	59
Tabelle 28: Resistenzprofile .....	59
Tabelle 29: Ergebnisse DNA-Konzentrationsmessung .....	61
Tabelle 30: Microarray-Kontrolle .....	71
Tabelle 31: Resistenzprofile und Resistenzgene ausgewählter Isolate .....	72
Tabelle 32: Agardiffusionstest Durchmesser [mm] .....	114
Tabelle 33: Genliste Microarray .....	120
Tabelle 34: Microarray Genanordnung.....	128

# 10 Anhang

## 10.1 Agardiffusionstest

Tabelle 32: Agardiffusionstest Durchmesser [mm]

Isolat	Behandlung	Zeitpunkt	AMP (10)		CTX (5)		CTX (30)		EFT (30)		MEM (10)		CIP (5)		ENR (5)		TE (30)		S (10)		S 3 (300)	
A1a1	Kontrollgruppe	1	21	S	30	S	36	S	28	S	36	S	41	S	35	S	25	S	17	S	25	S
A1a2	Kontrollgruppe	2	18	S	28	S	33	S	26	S	34	S	38	S	33	S	26	S	15	S	25	S
A1b1	Kontrollgruppe	1	21	S	30	S	36	S	28	S	33	S	40	S	35	S	26	S	18	S	24	S
A1b2	Kontrollgruppe	2	19	S	31	S	36	S	27	S	33	S	29	I	23	I	25	S	16	S	29	S
A1c1	Kontrollgruppe	1	21	S	31	S	36	S	29	S	35	S	42	S	35	S	25	S	17	S	26	S
A1c2	Kontrollgruppe	2	18	S	30	S	33	S	26	S	34	S	28	I	22	I	24	S	15	S	26	S
A1d1	Kontrollgruppe	1	22	S	31	S	36	S	29	S	35	S	40	S	34	S	26	S	17	S	26	S
A1d2	Kontrollgruppe	2	19	S	31	S	35	S	27	S	36	S	29	I	22	I	25	S	15	S	29	S
A1e1	Kontrollgruppe	1	21	S	29	S	36	S	27	S	34	S	44	S	35	S	25	S	17	S	25	S
A1e2	Kontrollgruppe	2	18	S	28	S	33	S	27	S	33	S	29	I	23	I	26	S	16	S	25	S
A2a1	Kontrollgruppe	1	16	I	29	S	35	S	27	S	32	S	29	I	23	I	28	S	18	S	26	S
A2a2	Kontrollgruppe	2	18	S	28	S	32	S	26	S	34	S	28	I	22	I	24	S	15	S	27	S
A2b1	Kontrollgruppe	1	15	I	29	S	35	S	28	S	34	S	29	I	26	I	28	S	17	S	27	S
A2b2	Kontrollgruppe	2	18	S	28	S	32	S	27	S	32	S	37	S	33	S	26	S	16	S	23	S
A2c1	Kontrollgruppe	1	19	S	29	S	35	S	23	S	33	S	13	R	10	R	6	R	6	R	6	R
A2c2	Kontrollgruppe	2	6	R	29	S	32	S	25	S	36	S	26	I	23	I	7	R	16	S	27	S
A2d1	Kontrollgruppe	1	22	S	30	S	36	S	27	S	35	S	31	S	25	I	26	S	15	S	27	S
A2d2	Kontrollgruppe	2	18	S	30	S	34	S	28	S	33	S	29	I	22	I	25	S	15	S	28	S
A2e1	Kontrollgruppe	1	22	S	29	S	35	S	28	S	35	S	31	S	25	I	25	S	15	S	26	S
A2e2	Kontrollgruppe	2	6	R	29	S	33	S	27	S	34	S	24	I	22	I	6	R	16	S	28	S
A3a1	Kontrollgruppe	1	18	S	30	S	29	S	23	S	36	S	28	I	23	I	28	S	16	S	27	S
A3a2	Kontrollgruppe	2	6	R	30	S	34	S	28	S	34	S	24	I	21	I	25	S	16	S	28	S
A3b1	Kontrollgruppe	1	21	S	28	S	33	S	26	S	35	S	29	I	23	I	24	S	14	I	25	S
A3b2	Kontrollgruppe	2	6	R	31	S	35	S	28	S	34	S	30	I	22	I	25	S	17	S	23	S
A3c1	Kontrollgruppe	1	22	S	31	S	36	S	28	S	35	S	30	I	25	I	25	S	16	S	28	S
A3c2	Kontrollgruppe	2	6	R	28	S	32	S	27	S	34	S	23	I	22	I	23	S	16	S	22	S
A3d1	Kontrollgruppe	1	19	S	29	S	37	S	22	S	34	S	40	S	33	S	28	S	17	S	25	S
A3d2	Kontrollgruppe	2	6	R	30	S	33	S	26	S	33	S	30	I	21	I	24	S	16	S	22	S
A3e1	Kontrollgruppe	1	6	R	30	S	33	S	23	S	36	S	22	I	23	I	6	R	16	S	28	S
A3e2	Kontrollgruppe	2	6	R	31	S	34	S	28	S	34	S	30	I	21	I	23	S	15	S	24	S
A4a1	Kontrollgruppe	1	6	R	30	S	33	S	27	S	36	S	30	I	33	S	25	S	16	S	25	S
A4a2	Kontrollgruppe	2	22	S	30	S	34	S	27	S	32	S	30	I	26	I	25	S	14	I	23	S

Isolat	Behandlung	Zeitpunkt	AMP (10)		CTX (5)		CTX (30)		EFT (30)		MEM (10)		CIP (5)		ENR (5)		TE (30)		S (10)		S 3 (300)	
A4b1	Kontrollgruppe	1	23	S	29	S	37	S	27	S	35	S	31	S	27	I	26	S	17	S	23	S
A4b2	Kontrollgruppe	2	21	S	30	S	33	S	28	S	32	S	29	I	25	I	22	S	15	S	25	S
A4c1	Kontrollgruppe	1	6	R	9	R	14	R	11	R	36	S	40	S	32	S	6	R	15	S	6	R
A4c2	Kontrollgruppe	2	21	S	30	S	35	S	28	S	33	S	30	I	25	I	25	S	16	S	22	S
A4d1	Kontrollgruppe	1	23	S	31	S	37	S	28	S	36	S	31	S	27	I	27	S	17	S	21	S
A4d2	Kontrollgruppe	2	22	S	30	S	33	S	28	S	33	S	29	I	25	I	24	S	15	S	23	S
A4e1	Kontrollgruppe	1	6	R	31	S	35	S	28	S	34	S	41	S	33	S	26	S	17	S	26	S
A4e2	Kontrollgruppe	2	21	S	30	S	33	S	27	S	32	S	30	I	25	I	23	S	15	S	23	S
A5a1	Kontrollgruppe	1	19	S	33	S	35	S	29	S	36	S	39	S	35	S	28	S	17	S	29	S
A5a2	Kontrollgruppe	2	20	S	32	S	36	S	30	S	35	S	40	S	31	S	28	S	15	S	30	S
A5b1	Kontrollgruppe	1	20	S	32	S	37	S	29	S	36	S	41	S	34	S	29	S	17	S	26	S
A5b2	Kontrollgruppe	2	20	S	30	S	32	S	29	S	35	S	37	S	30	S	29	S	15	S	27	S
A5c1	Kontrollgruppe	1	6	R	31	S	37	S	28	S	36	S	31	S	24	I	8	R	18	S	29	S
A5c2	Kontrollgruppe	2	20	S	31	S	37	S	30	S	36	S	43	S	33	S	27	S	15	S	31	S
A5d1	Kontrollgruppe	1	6	R	31	S	35	S	29	S	37	S	28	I	24	I	9	R	17	S	28	S
A5d2	Kontrollgruppe	2	24	S	33	S	38	S	31	S	38	S	35	S	30	S	28	S	15	S	28	S
A5e1	Kontrollgruppe	1	19	S	32	S	37	S	30	S	35	S	42	S	35	S	29	S	18	S	29	S
A5e2	Kontrollgruppe	2	19	S	30	S	33	S	26	S	35	S	40	S	31	S	26	S	16	S	28	S
A6a1	Kontrollgruppe	1	21	S	31	S	36	S	29	S	36	S	12	R	10	R	8	R	6	R	6	R
A6a2	Kontrollgruppe	2	18	S	31	S	34	S	27	S	35	S	32	S	31	S	26	S	15	S	31	S
A6b1	Kontrollgruppe	1	19	S	30	S	36	S	28	S	34	S	30	I	24	I	28	S	17	S	25	S
A6b2	Kontrollgruppe	2	17	S	28	S	35	S	28	S	36	S	32	S	24	I	26	S	15	S	27	S
A6c1	Kontrollgruppe	1	22	S	31	S	37	S	28	S	35	S	41	S	34	S	25	S	16	S	25	S
A6c2	Kontrollgruppe	2	16	I	28	S	34	S	28	S	33	S	43	S	29	S	25	S	16	S	27	S
A6d1	Kontrollgruppe	1	20	S	30	S	37	S	28	S	35	S	42	S	33	S	26	S	17	S	27	S
A6d2	Kontrollgruppe	2	19	S	31	S	35	S	29	S	34	S	42	S	33	S	25	S	17	S	29	S
A6e1	Kontrollgruppe	1	19	S	31	S	35	S	29	S	35	S	41	S	35	S	29	S	17	S	28	S
A6e2	Kontrollgruppe	2	18	S	29	S	35	S	27	S	34	S	42	S	30	S	28	S	15	S	29	S
A7a1	Kontrollgruppe	1	20	S	34	S	40	S	30	S	37	S	31	S	25	I	27	S	17	S	33	S
A7a2	Kontrollgruppe	2	19	S	29	S	34	S	28	S	32	S	41	S	32	S	26	S	16	S	28	S
A7b1	Kontrollgruppe	1	20	S	33	S	39	S	30	S	38	S	31	S	25	I	27	S	17	S	34	S
A7b2	Kontrollgruppe	2	19	S	29	S	34	S	29	S	34	S	40	S	32	S	26	S	15	S	28	S
A7c1	Kontrollgruppe	1	21	S	34	S	38	S	31	S	38	S	31	S	25	I	27	S	17	S	34	S
A7c2	Kontrollgruppe	2	19	S	30	S	35	S	31	S	35	S	43	S	33	S	26	S	15	S	28	S
A7d1	Kontrollgruppe	1	6	R	31	S	37	S	29	S	37	S	28	I	23	I	8	R	18	S	30	S
A7d2	Kontrollgruppe	2	19	S	29	S	34	S	26	S	33	S	41	S	29	S	29	S	15	S	25	S
A7e1	Kontrollgruppe	1	20	S	32	S	38	S	30	S	37	S	30	I	25	I	27	S	17	S	33	S
A7e2	Kontrollgruppe	2	19	S	30	S	33	S	28	S	34	S	41	S	32	S	28	S	15	S	25	S
A8a1	Kontrollgruppe	1	19	S	32	S	36	S	29	S	36	S	42	S	35	S	29	S	17	S	30	S
A8a2	Kontrollgruppe	2	17	S	27	S	32	S	25	S	32	S	30	I	21	I	23	S	15	S	23	S

Isolat	Behandlung	Zeitpunkt	AMP (10)		CTX (5)		CTX (30)		EFT (30)		MEM (10)		CIP (5)		ENR (5)		TE (30)		S (10)		S 3 (300)	
A8b1	Kontrollgruppe	1	23	S	32	S	37	S	30	S	35	S	33	S	27	I	27	S	17	S	27	S
A8b2	Kontrollgruppe	2	6	R	30	S	35	S	28	S	33	S	30	I	23	I	24	S	16	S	25	S
A8c1	Kontrollgruppe	1	6	R	31	S	37	S	30	S	37	S	6	R	6	R	6	R	15	S	34	S
A8c2	Kontrollgruppe	2	18	S	29	S	35	S	25	S	34	S	33	S	24	I	25	S	16	S	27	S
A8d1	Kontrollgruppe	1	20	S	31	S	36	S	29	S	36	S	41	S	33	S	26	S	17	S	28	S
A8d2	Kontrollgruppe	2	18	S	30	S	33	S	26	S	34	S	31	S	22	I	25	S	15	S	25	S
A8e1	Kontrollgruppe	1	18	S	30	S	34	S	28	S	36	S	30	I	24	I	29	S	16	S	26	S
A8e2	Kontrollgruppe	2	17	S	27	S	30	S	25	S	31	S	27	I	21	I	23	S	15	S	23	S
B1a1	Zusatzstoffgruppe	1	16	I	30	S	36	S	27	S	34	S	40	S	34	S	29	S	17	S	26	S
B1a2	Zusatzstoffgruppe	2	19	S	29	S	36	S	26	S	32	S	30	I	22	I	26	S	14	I	27	S
B1b1	Zusatzstoffgruppe	1	6	R	32	S	36	S	30	S	37	S	32	S	22	I	24	S	16	S	26	S
B1b2	Zusatzstoffgruppe	2	19	S	30	S	33	S	27	S	32	S	30	I	22	I	25	S	15	S	26	S
B1c1	Zusatzstoffgruppe	1	6	R	34	S	35	S	29	S	34	S	32	S	23	I	25	S	18	S	27	S
B1c2	Zusatzstoffgruppe	2	19	S	30	S	34	S	27	S	34	S	31	S	22	I	25	S	16	S	27	S
B1d1	Zusatzstoffgruppe	1	19	S	29	S	34	S	27	S	35	S	28	I	23	I	28	S	17	S	26	S
B1d2	Zusatzstoffgruppe	2	18	S	29	S	34	S	25	S	34	S	33	S	22	I	25	S	16	S	26	S
B1e1	Zusatzstoffgruppe	1	18	S	30	S	32	S	27	S	34	S	42	S	31	S	24	S	14	I	26	S
B1e2	Zusatzstoffgruppe	2	17	S	26	S	32	S	24	S	30	S	28	I	21	I	27	S	14	I	19	S
B2a1	Zusatzstoffgruppe	1	20	S	28	S	42	S	29	S	35	S	11	R	10	R	6	R	6	R	6	R
B2a2	Zusatzstoffgruppe	2	18	S	30	S	32	S	27	S	34	S	33	S	23	I	26	S	16	S	28	S
B2b1	Zusatzstoffgruppe	1	17	S	30	S	33	S	27	S	36	S	36	S	32	S	25	S	15	S	25	S
B2b2	Zusatzstoffgruppe	2	16	I	28	S	32	S	25	S	30	S	28	I	22	I	26	S	13	I	23	S
B2c1	Zusatzstoffgruppe	1	17	S	29	S	34	S	27	S	36	S	40	S	32	S	25	S	16	S	26	S
B2c2	Zusatzstoffgruppe	2	18	S	30	S	33	S	26	S	33	S	32	S	22	I	25	S	14	I	27	S
B2d1	Zusatzstoffgruppe	1	18	S	29	S	35	S	26	S	35	S	38	S	33	S	28	S	16	S	27	S
B2d2	Zusatzstoffgruppe	2	20	S	34	S	30	S	30	S	33	S	29	I	22	I	24	S	13	I	30	S
B2e1	Zusatzstoffgruppe	1	19	S	28	S	34	S	28	S	36	S	40	S	32	S	26	S	16	S	27	S
B2e2	Zusatzstoffgruppe	2	18	S	28	S	32	S	27	S	31	S	38	S	28	S	27	S	14	I	25	S
B3a1	Zusatzstoffgruppe	1	19	S	30	S	37	S	29	S	35	S	40	S	34	S	29	S	17	S	30	S
B3a2	Zusatzstoffgruppe	2	18	S	30	S	33	S	27	S	36	S	33	S	24	I	26	S	15	S	25	S
B3b1	Zusatzstoffgruppe	1	6	R	30	S	35	S	26	S	34	S	42	S	33	S	25	S	16	S	26	S
B3b2	Zusatzstoffgruppe	2	19	S	33	S	35	S	29	S	36	S	33	S	22	I	27	S	14	I	30	S
B3c1	Zusatzstoffgruppe	1	18	S	30	S	35	S	27	S	34	S	31	S	24	I	28	S	17	S	26	S
B3c2	Zusatzstoffgruppe	2	19	S	29	S	37	S	29	S	36	S	31	S	23	I	27	S	13	I	31	S
B3d1	Zusatzstoffgruppe	1	18	S	30	S	33	S	27	S	33	S	29	I	23	I	27	S	16	S	25	S
B3d2	Zusatzstoffgruppe	2	19	S	34	S	37	S	29	S	36	S	32	S	22	I	27	S	15	S	31	S
B3e1	Zusatzstoffgruppe	1	6	R	30	S	35	S	29	S	35	S	41	S	32	S	28	S	17	S	28	S
B3e2	Zusatzstoffgruppe	2	19	S	28	S	37	S	29	S	36	S	31	S	29	S	26	S	15	S	27	S
B4a1	Zusatzstoffgruppe	1	23	S	31	S	37	S	28	S	34	S	31	S	26	I	26	S	16	S	25	S
B4a2	Zusatzstoffgruppe	2	19	S	31	S	37	S	27	S	36	S	32	S	22	I	27	S	15	S	28	S

Isolat	Behandlung	Zeitpunkt	AMP (10)		CTX (5)		CTX (30)		EFT (30)		MEM (10)		CIP (5)		ENR (5)		TE (30)		S (10)		S 3 (300)	
B4b1	Zusatzstoffgruppe	1	20	S	30	S	32	S	29	S	33	S	13	R	10	R	6	R	6	R	6	R
B4b2	Zusatzstoffgruppe	2	18	S	30	S	37	S	27	S	36	S	32	S	24	I	26	S	13	I	26	S
B4c1	Zusatzstoffgruppe	1	20	S	30	S	35	S	28	S	35	S	12	R	9	R	6	R	6	R	6	R
B4c2	Zusatzstoffgruppe	2	19	S	30	S	36	S	29	S	35	S	30	I	22	I	27	S	14	I	30	S
B4d1	Zusatzstoffgruppe	1	6	R	31	S	35	S	27	S	34	S	41	S	33	S	26	S	16	S	26	S
B4d2	Zusatzstoffgruppe	2	17	S	28	S	34	S	25	S	34	S	32	S	22	I	26	S	14	I	25	S
B4e1	Zusatzstoffgruppe	1	6	R	30	S	36	S	28	S	35	S	6	R	6	R	25	S	12	I	6	R
B4e2	Zusatzstoffgruppe	2	17	S	29	S	36	S	26	S	32	S	39	S	31	S	27	S	14	I	26	S
B5a1	Zusatzstoffgruppe	1	18	S	30	S	35	S	26	S	34	S	29	I	23	I	28	S	15	S	27	S
B5a2	Zusatzstoffgruppe	2	17	S	28	S	31	S	26	S	30	S	27	I	21	I	26	S	14	I	28	S
B5b1	Zusatzstoffgruppe	1	19	S	30	S	35	S	28	S	36	S	28	I	24	I	28	S	16	S	25	S
B5b2	Zusatzstoffgruppe	2	18	S	28	S	31	S	26	S	31	S	29	I	22	I	27	S	15	S	24	S
B5c1	Zusatzstoffgruppe	1	19	S	30	S	36	S	28	S	36	S	30	I	25	I	28	S	18	S	26	S
B5c2	Zusatzstoffgruppe	2	19	S	29	S	32	S	27	S	32	S	28	I	23	I	22	S	14	I	22	S
B5d1	Zusatzstoffgruppe	1	18	S	31	S	37	S	30	S	35	S	30	I	24	I	29	S	18	S	28	S
B5d2	Zusatzstoffgruppe	2	19	S	29	S	33	S	26	S	32	S	28	I	22	I	24	S	14	I	21	S
B5e1	Zusatzstoffgruppe	1	21	S	31	S	37	S	30	S	40	S	13	R	11	R	9	R	6	R	6	R
B5e2	Zusatzstoffgruppe	2	18	S	28	S	33	S	26	S	32	S	31	S	22	I	22	S	15	S	20	S
B6a1	Zusatzstoffgruppe	1	6	R	33	S	38	S	30	S	38	S	27	I	24	I	9	R	16	S	31	S
B6a2	Zusatzstoffgruppe	2	18	S	32	S	35	S	28	S	34	S	32	S	22	I	26	S	15	S	25	S
B6b1	Zusatzstoffgruppe	1	21	S	31	S	36	S	30	S	37	S	13	R	10	R	8	R	6	R	6	R
B6b2	Zusatzstoffgruppe	2	18	S	29	S	34	S	26	S	33	S	30	I	22	I	25	S	14	I	26	S
B6c1	Zusatzstoffgruppe	1	20	S	32	S	36	S	30	S	37	S	40	S	35	S	28	S	16	S	28	S
B6c2	Zusatzstoffgruppe	2	19	S	30	S	35	S	27	S	35	S	32	S	23	I	25	S	15	S	28	S
B6d1	Zusatzstoffgruppe	1	21	S	32	S	36	S	30	S	37	S	12	R	10	R	7	R	6	R	6	R
B6d2	Zusatzstoffgruppe	2	18	S	30	S	32	S	26	S	35	S	33	S	23	I	27	S	14	I	26	S
B6e1	Zusatzstoffgruppe	1	21	S	31	S	36	S	31	S	40	S	12	R	11	R	8	R	6	R	6	R
B6e2	Zusatzstoffgruppe	2	19	S	31	S	34	S	28	S	35	S	32	S	22	I	25	S	15	S	28	S
B7a1	Zusatzstoffgruppe	1	20	S	32	S	36	S	30	S	34	S	41	S	35	S	28	S	16	S	27	S
B7a2	Zusatzstoffgruppe	2	19	S	31	S	34	S	26	S	34	S	31	S	22	I	27	S	14	I	28	S
B7b1	Zusatzstoffgruppe	1	21	S	32	S	35	S	29	S	35	S	12	R	10	R	8	R	6	R	6	R
B7b2	Zusatzstoffgruppe	2	19	S	30	S	34	S	26	S	33	S	33	S	23	I	26	S	15	S	27	S
B7c1	Zusatzstoffgruppe	1	22	S	31	S	36	S	31	S	37	S	12	R	10	R	8	R	6	R	6	R
B7c2	Zusatzstoffgruppe	2	6	R	29	S	34	S	28	S	33	S	31	S	21	I	26	S	14	I	24	S
B7d1	Zusatzstoffgruppe	1	21	S	32	S	35	S	30	S	38	S	12	R	10	R	8	R	6	R	6	R
B7d2	Zusatzstoffgruppe	2	18	S	30	S	35	S	28	S	34	S	33	S	22	I	25	S	14	I	28	S
B7e1	Zusatzstoffgruppe	1	19	S	31	S	35	S	30	S	35	S	41	S	34	S	28	S	18	S	30	S
B7e2	Zusatzstoffgruppe	2	19	S	30	S	34	S	26	S	33	S	31	S	23	I	25	S	14	I	26	S
B8a1	Zusatzstoffgruppe	1	20	S	33	S	33	S	29	S	35	S	40	S	36	S	30	S	17	S	28	S
B8a2	Zusatzstoffgruppe	2	19	S	30	S	34	S	26	S	34	S	30	I	23	I	25	S	15	S	24	S

Isolat	Behandlung	Zeitpunkt	AMP (10)		CTX (5)		CTX (30)		EFT (30)		MEM (10)		CIP (5)		ENR (5)		TE (30)		S (10)		S 3 (300)	
B8b1	Zusatzstoffgruppe	1	18	S	31	S	35	S	29	S	38	S	30	I	25	I	29	S	17	S	28	S
B8b2	Zusatzstoffgruppe	2	18	S	30	S	35	S	28	S	33	S	30	I	23	I	27	S	15	S	25	S
B8c1	Zusatzstoffgruppe	1	19	S	32	S	37	S	30	S	35	S	40	S	35	S	30	S	17	S	30	S
B8c2	Zusatzstoffgruppe	2	19	S	31	S	34	S	28	S	35	S	31	S	25	I	26	S	16	S	28	S
B8d1	Zusatzstoffgruppe	1	18	S	30	S	36	S	28	S	36	S	30	I	25	I	28	S	16	S	27	S
B8d2	Zusatzstoffgruppe	2	18	S	29	S	34	S	27	S	34	S	28	I	23	I	26	S	16	S	25	S
B8e1	Zusatzstoffgruppe	1	6	R	30	S	35	S	28	S	36	S	28	I	24	I	9	R	17	S	27	S
B8e2	Zusatzstoffgruppe	2	18	S	29	S	36	S	27	S	33	S	30	I	24	I	27	S	15	S	24	S
C1a1	Antibiotikum	1	6	R	30	S	35	S	28	S	34	S	6	R	6	R	6	R	15	S	31	S
C1a2	Antibiotikum	2	17	S	28	S	34	S	26	S	33	S	29	I	22	I	25	S	12	I	25	S
C1b1	Antibiotikum	1	20	S	30	S	34	S	30	S	36	S	12	R	9	R	6	R	6	R	6	R
C1b2	Antibiotikum	2	18	S	30	S	34	S	26	S	32	S	31	S	21	I	24	S	14	I	27	S
C1c1	Antibiotikum	1	22	S	31	S	35	S	29	S	34	S	12	R	10	R	6	R	6	R	6	R
C1c2	Antibiotikum	2	20	S	31	S	36	S	28	S	31	S	31	S	21	I	25	S	14	I	31	S
C1d1	Antibiotikum	1	21	S	29	S	34	S	30	S	36	S	12	R	9	R	6	R	6	R	6	R
C1d2	Antibiotikum	2	18	S	30	S	38	S	27	S	35	S	33	S	23	I	27	S	14	I	27	S
C1e1	Antibiotikum	1	20	S	30	S	35	S	29	S	36	S	12	R	10	R	6	R	6	R	6	R
C1e2	Antibiotikum	2	18	S	28	S	34	S	26	S	30	S	29	I	30	S	27	S	14	I	24	S
C2a1	Antibiotikum	1	21	S	31	S	36	S	28	S	36	S	13	R	9	R	6	R	6	R	6	R
C2a2	Antibiotikum	2	20	S	31	S	36	S	28	S	36	S	32	S	25	I	26	S	15	S	28	S
C2b1	Antibiotikum	1	21	S	31	S	35	S	30	S	38	S	12	R	10	R	6	R	6	R	6	R
C2b2	Antibiotikum	2	20	S	34	S	36	S	30	S	36	S	34	S	22	I	28	S	17	S	34	S
C2c1	Antibiotikum	1	21	S	31	S	36	S	30	S	38	S	14	R	10	R	6	R	6	R	6	R
C2c2	Antibiotikum	2	20	S	32	S	38	S	30	S	37	S	32	S	24	I	27	S	16	S	32	S
C2d1	Antibiotikum	1	22	S	31	S	35	S	28	S	35	S	12	R	9	R	6	R	6	R	6	R
C2d2	Antibiotikum	2	18	S	30	S	37	S	28	S	36	S	30	I	23	I	27	S	15	S	28	S
C2e1	Antibiotikum	1	20	S	31	S	36	S	30	S	38	S	13	R	9	R	6	R	6	R	6	R
C2e2	Antibiotikum	2	19	S	33	S	38	S	30	S	37	S	33	S	25	I	27	S	16	S	32	S
C3a1	Antibiotikum	1	6	R	30	S	35	S	28	S	34	S	6	R	6	R	6	R	15	S	30	S
C3a2	Antibiotikum	2	19	S	31	S	38	S	29	S	37	S	33	S	24	I	28	S	16	S	31	S
C3b1	Antibiotikum	1	6	R	31	S	34	S	29	S	37	S	6	R	6	R	6	R	17	S	31	S
C3b2	Antibiotikum	2	6	R	30	S	32	S	27	S	34	S	6	R	6	R	6	R	13	I	30	S
C3c1	Antibiotikum	1	21	S	31	S	35	S	30	S	37	S	12	R	10	R	6	R	6	R	6	R
C3c2	Antibiotikum	2	6	R	29	S	35	S	28	S	34	S	6	R	6	R	6	R	14	I	29	S
C3d1	Antibiotikum	1	21	S	31	S	34	S	29	S	37	S	13	R	10	R	8	R	6	R	6	R
C3d2	Antibiotikum	2	19	S	34	S	34	S	29	S	35	S	32	S	23	I	25	S	15	S	30	S
C3e1	Antibiotikum	1	6	R	32	S	39	S	30	S	36	S	18	R	13	R	28	S	18	S	30	S
C3e2	Antibiotikum	2	18	S	31	S	36	S	29	S	37	S	31	S	24	I	26	S	16	S	30	S
C4a1	Antibiotikum	1	6	R	30	S	35	S	28	S	36	S	6	R	6	R	6	R	15	S	29	S
C4a2	Antibiotikum	2	19	S	30	S	37	S	28	S	37	S	31	S	24	I	27	S	15	S	30	S

Isolat	Behandlung	Zeitpunkt	AMP (10)		CTX (5)		CTX (30)		EFT (30)		MEM (10)		CIP (5)		ENR (5)		TE (30)		S (10)		S 3 (300)	
C4b1	Antibiotikum	1	20	S	31	S	37	S	29	S	36	S	13	R	10	R	8	R	6	R	6	R
C4b2	Antibiotikum	2	21	S	30	S	35	S	29	S	35	S	12	R	9	R	8	R	6	R	6	R
C4c1	Antibiotikum	1	21	S	32	S	34	S	30	S	37	S	13	R	10	R	8	R	6	R	6	R
C4c2	Antibiotikum	2	21	S	31	S	36	S	28	S	35	S	12	R	9	R	8	R	6	R	6	R
C4d1	Antibiotikum	1	21	S	33	S	35	S	29	S	37	S	13	R	10	R	8	R	6	R	6	R
C4d2	Antibiotikum	2	6	R	30	S	36	S	30	S	36	S	6	R	6	R	6	R	13	I	32	S
C4e1	Antibiotikum	1	6	R	33	S	36	S	30	S	35	S	6	R	6	R	26	S	9	R	6	R
C4e2	Antibiotikum	2	22	S	29	S	38	S	31	S	36	S	10	R	8	R	8	R	6	R	6	R
C5a1	Antibiotikum	1	21	S	32	S	36	S	29	S	38	S	13	R	10	R	6	R	6	R	6	R
C5a2	Antibiotikum	2	6	R	29	S	32	S	28	S	35	S	6	R	6	R	6	R	15	S	30	S
C5b1	Antibiotikum	1	20	S	31	S	36	S	29	S	40	S	12	R	10	R	6	R	6	R	6	R
C5b2	Antibiotikum	2	6	R	29	S	35	S	27	S	35	S	6	R	6	R	6	R	15	S	28	S
C5c1	Antibiotikum	1	6	R	30	S	34	S	27	S	36	S	6	R	6	R	6	R	15	S	30	S
C5c2	Antibiotikum	2	6	R	28	S	32	S	26	S	33	S	6	R	6	R	6	R	15	S	29	S
C5d1	Antibiotikum	1	6	R	30	S	36	S	29	S	37	S	6	R	6	R	26	S	11	R	6	R
C5d2	Antibiotikum	2	6	R	27	S	32	S	27	S	35	S	6	R	6	R	6	R	15	S	26	S
C5e1	Antibiotikum	1	21	S	30	S	34	S	30	S	36	S	13	R	10	R	6	R	6	R	6	R
C5e2	Antibiotikum	2	6	R	28	S	33	S	26	S	36	S	6	R	6	R	6	R	14	I	28	S
C6a1	Antibiotikum	1	6	R	32	S	36	S	28	S	34	S	6	R	6	R	26	S	11	R	6	R
C6a2	Antibiotikum	2	19	S	29	S	33	S	27	S	33	S	33	S	22	I	25	S	14	I	28	S
C6b1	Antibiotikum	1	6	R	31	S	35	S	29	S	34	S	6	R	6	R	26	S	12	I	6	R
C6b2	Antibiotikum	2	18	S	30	S	34	S	27	S	34	S	33	S	23	I	25	S	15	S	27	S
C6c1	Antibiotikum	1	21	S	30	S	35	S	28	S	35	S	12	R	10	R	6	R	6	R	6	R
C6c2	Antibiotikum	2	18	S	31	S	37	S	28	S	37	S	34	S	25	I	26	S	15	S	30	S
C6d1	Antibiotikum	1	21	S	29	S	34	S	29	S	35	S	12	R	6	R	6	R	6	R	6	R
C6d2	Antibiotikum	2	19	S	30	S	36	S	28	S	36	S	35	S	23	I	26	S	14	I	30	S
C6e1	Antibiotikum	1	6	R	30	S	35	S	29	S	34	S	6	R	6	R	28	S	12	I	6	R
C6e2	Antibiotikum	2	6	R	29	S	33	S	27	S	36	S	6	R	6	R	6	R	14	I	28	S
C7a1	Antibiotikum	1	21	S	30	S	36	S	28	S	36	S	13	R	9	R	6	R	6	R	6	R
C7a2	Antibiotikum	2	18	S	29	S	33	S	27	S	33	S	6	R	6	R	25	S	15	S	26	S
C7b1	Antibiotikum	1	21	S	30	S	36	S	29	S	36	S	12	R	10	R	6	R	6	R	6	R
C7b2	Antibiotikum	2	19	S	31	S	35	S	28	S	38	S	31	S	24	I	26	S	14	I	28	S
C7c1	Antibiotikum	1	20	S	30	S	35	S	29	S	36	S	11	R	9	R	6	R	6	R	6	R
C7c2	Antibiotikum	2	20	S	31	S	36	S	28	S	35	S	32	S	23	I	26	S	15	S	31	S
C7d1	Antibiotikum	1	21	S	29	S	34	S	29	S	35	S	13	R	9	R	6	R	6	R	6	R
C7d2	Antibiotikum	2	19	S	29	S	33	S	28	S	33	S	6	R	6	R	25	S	15	S	26	S
C7e1	Antibiotikum	1	19	S	31	S	33	S	28	S	35	S	11	R	10	R	6	R	6	R	6	R
C7e2	Antibiotikum	2	19	S	31	S	35	S	27	S	33	S	32	S	23	I	25	S	15	S	28	S
C8a1	Antibiotikum	1	20	S	30	S	34	S	28	S	36	S	12	R	10	R	6	R	6	R	6	R
C8a2	Antibiotikum	2	18	S	30	S	34	S	26	S	33	S	6	R	6	R	24	S	15	S	27	S

Isolat	Behandlung	Zeitpunkt	AMP (10)		CTX (5)		CTX (30)		EFT (30)		MEM (10)		CIP (5)		ENR (5)		TE (30)		S (10)		S 3 (300)	
C8b1	Antibiotikum	1	20	S	30	S	33	S	27	S	35	S	12	R	10	R	6	R	6	R	6	R
C8b2	Antibiotikum	2	19	S	31	S	33	S	28	S	34	S	32	S	22	I	25	S	15	S	28	S
C8c1	Antibiotikum	1	6	R	30	S	33	S	26	S	34	S	6	R	6	R	6	R	14	I	30	S
C8c2	Antibiotikum	2	19	S	30	S	34	S	28	S	33	S	32	S	23	I	25	S	15	S	28	S
C8d1	Antibiotikum	1	20	S	29	S	32	S	29	S	35	S	12	R	10	R	6	R	6	R	6	R
C8d2	Antibiotikum	2	18	S	30	S	32	S	27	S	34	S	32	S	23	I	24	S	15	S	28	S
C8e1	Antibiotikum	1	19	S	30	S	35	S	29	S	35	S	12	R	9	R	6	R	6	R	6	R
C8e2	Antibiotikum	2	18	S	29	S	34	S	27	S	35	S	33	S	23	I	25	S	15	S	27	S
18a	Umwelt	0	6	R	29	S	32	S	26	S	34	S	6	R	6	R	6	R	15	S	27	S
18b	Umwelt	0	21	S	29	S	35	S	28	S	35	S	41	S	34	S	25	S	16	S	27	S
18c	Umwelt	0	6	R	30	S	34	S	27	S	34	S	6	R	6	R	23	S	8	R	6	R
18d	Umwelt	0	21	S	29	S	32	S	27	S	34	S	30	I	24	I	24	S	15	S	25	S
18e	Umwelt	0	19	S	28	S	33	S	27	S	33	S	12	R	9	R	6	R	6	R	6	R
Ec2	Stammsammlung	0	17	S	28	S	36	S	26	S	35	S	40	S	36	S	24	S	15	S	24	S
Ec4	Stammsammlung	0	16	I	30	S	32	S	26	S	33	S	41	S	36	S	25	S	13	I	23	S
Ec7	Stammsammlung	0	6	R	32	S	33	S	27	S	35	S	40	S	29	S	24	S	6	R	6	R
Ec11	Stammsammlung	0	17	S	24	S	29	S	24	S	36	S	13	R	18	R	17	S	13	I	28	S
Ec12	Stammsammlung	0	6	R	25	S	31	S	27	S	36	S	44	S	31	S	26	S	6	R	32	S
Ec13	Stammsammlung	0	17	S	28	S	37	S	27	S	35	S	43	S	37	S	25	S	15	S	27	S
Ec14	Stammsammlung	0	21	S	14	R	20	R	20	I	40	S	45	S	40	S	26	S	18	S	35	S
Ec15	Stammsammlung	0	6	R	12	R	19	R	17	R	38	S	45	S	40	S	28	S	6	R	6	R
Ec16	Stammsammlung	0	6	R	29	S	35	S	29	S	31	S	45	S	38	S	8	R	6	R	6	R
Ec17	Stammsammlung	0	21	S	32	S	35	S	28	S	35	S	39	S	35	S	26	S	14	I	28	S
Ec18	Stammsammlung	0	6	R	29	S	35	S	26	S	34	S	36	S	28	S	6	R	11	R	6	R
Ec19	Stammsammlung	0	6	R	14	R	24	I	21	I	36	S	45	S	40	S	6	R	14	I	38	S
Ec21	Stammsammlung	0	20	S	32	S	38	S	30	S	34	S	40	S	32	S	29	S	16	I	31	S

## 10.2 Microarray

Tabelle 33: Genliste Microarray

AMR Familie	Gen	Probe	Beschreibung
Acetyltransferase	vatE	hp_vatE_611	Acetyltransferase; streptogramin A
			Acetyltransferase; assoziiert mit Streptogramin A-Resistenz
Acetyltransferase	vatE	hp_vatE_612	Acetyltransferase; streptogramin A

			Acetyltransferase; assoziiert mit Streptogramin A-Resistenz
Aminoaminoglycosid-Resistenz	aac	prob_aac3Ia_1	3-N-Aminoglycosid acetyltransferase; associiert mit Astromicin-; Gentamicin-; Sisomicin-Resistenz
Aminoaminoglycosid-Resistenz	aac	prob_aac3IVa_1	3-N-Aminoglycosid acetyltransferase; associiert mit Apramycin-; Dibekacin-; Gentamicin-; Netilmicin-; Sisomicin-; Tobramycin-Resistenz
Aminoaminoglycosid-Resistenz	aac	prob_aac6Ia_1	Aminoglycoside 6'-N-Acetyltransferase; assoziiert mit Streptomycin-; Spectinomycin-Resistenz
Aminoaminoglycosid-Resistenz	aadA	prob_aacA1_1	Aminoglycoside Adenyltransferase; assoziiert mit Streptomycin-; Spectinomycin-Resistenz
Aminoaminoglycosid-Resistenz	aadA	prob_aacA2_1	Aminoglycoside Adenyltransferase; assoziiert mit Streptomycin-; Spectinomycin-Resistenz
Aminoaminoglycosid-Resistenz	aadA	prob_aacA4_1	Aminoglycoside Adenyltransferase; assoziiert mit Streptomycin-; Spectinomycin-Resistenz
Aminoaminoglycosid-Resistenz	ant2	prob_ant2Ia_1	Aminoglycoside (2'') Adenyltransferase; assoziiert mit Dibekacin-; Gentamicin-; Kanamycin-; Sisomicin-; Tobramycin-Resistenz
Aminoaminoglycosid-Resistenz	strA	prob_strA_611	Aminoglycoside-3''-phosphotransferase (Locus A); assoziiert mit Streptomycin-Resistenz

Aminoaminoglycosid-Resistenz	strB	prob_strB_611	Aminoglycoside-6''-phosphotransferase; assoziiert mit Streptomycin-Resistenz
Betalactam-Resistenz	acc	prob_acc2_11	Klasse C Betalactamase
Betalactam-Resistenz	acc	prob_acc1_11	Klasse C Betalactamase
Betalactam-Resistenz	act1	prob_act1_11	Klasse C Betalactamase
Betalactam-Resistenz	cmy	prob_cmy_11	Konsens Sequenz blaCMY-13, blaCMY-2, blaCMY-24, blaCMY-35, blaCMY-CFE1, blaCMY-CFE2 ( <i>Citrobacter spp.</i> ), blaCMY-Cmur ( <i>Citrobacter murliniae</i> ), blaCMY-Cwer ( <i>Citrobacter werkmanii</i> ), blaCMY-Cyou ( <i>Citrobacter youngae</i> ), blaCMY-HG3, blaCMY-HG4
Betalactam-Resistenz	cmy	prob_blaCMY_611	Konsens Sequenz blaCMY-13, blaCMY-2, blaCMY-24, blaCMY-35, blaCMY-CFE1, blaCMY-CFE2 ( <i>Citrobacter spp.</i> ), blaCMY-Cmur ( <i>Citrobacter murliniae</i> ), blaCMY-Cwer ( <i>Citrobacter werkmanii</i> ), blaCMY-Cyou ( <i>Citrobacter youngae</i> ), blaCMY-HG3, blaCMY-HG4
Betalactam-Resistenz	cmy	prob_blaCMY_612	Übereinstimmende Sequenz blaCMY-13, blaCMY-2, blaCMY-24, blaCMY-35, blaCMY-CFE1, blaCMY-CFE2 ( <i>Citrobacter spp.</i> ), blaCMY-Cmur ( <i>Citrobacter murliniae</i> ), blaCMY-Cwer ( <i>Citrobacter werkmanii</i> ), blaCMY-Cyou ( <i>Citrobacter youngae</i> ), blaCMY-HG3, blaCMY-HG4
Betalactam-Resistenz	ctx	prob_ctXM1_11	Erweitertes Spektrum Betalactamase, Klasse A Betalactamase, einschließlich ctxM15

Betalactam-Resistenz	ctx	prob_ctXM1_12	Erweitertes Spektrum Betalactamase, Klasse A Betalactamase, einschließlich ctxM15
Betalactam-Resistenz	ctx	prob_ctXM9_11	Klasse A Betalactamase
Betalactam-Resistenz	ctx	prob_ctXM2_11	Erweitertes Spektrum Betalactamase CTX-M2, Klasse A Betalactamase
Betalactam-Resistenz	ctx	prob_ctXM26_11	Erweitertes Spektrum Betalactamase, Klasse A Betalactamase
Betalactam-Resistenz	ctx	prob_ctXM8_11	Erweitertes Spektrum Betalactamase, Klasse A Betalactamase
Betalactam-Resistenz	dha	prob_dha1_1	Klasse C Betalactamase
Betalactam-Resistenz	fox	prob_fox_11	Übereinstimmende Sequenz für blaFOX Gene
Betalactam-Resistenz	len	prob_len1_11	Klasse A Betalactamase
Betalactam-Resistenz	fox	prob_mox_1pm	Übereinstimmende Sequenz für blaFOX Gene
Betalactam-Resistenz	mox	prob_mox_1mm	Übereinstimmende Sequenz für alle blaMOX Gene
Betalactam-Resistenz	mox	hp_blaMOX-CMY9_611	Klasse C Betalactamase, erweitertes Spektrum Betalactamase Precursor, assoziiert mit Cephalosporin-Resistenz
Betalactam-Resistenz	mox	hp_blaMOX-CMY9_612	Klasse C Betalactamase, erweitertes Spektrum Betalactamase Precursor, assoziiert mit Cephalosporin-Resistenz
Betalactam-Resistenz	mox	hp_blaMOX-CMY9_613	Klasse C Betalactamase, erweitertes Spektrum Betalactamase Precursor, assoziiert mit Cephalosporin-Resistenz
Betalactam-Resistenz	oxa	prob_oxa1_21	Betalactamase Klasse D Beta-

			lactamase OXA1
Betalactam-Resistenz	oxa	prob_oxa2_11	Betalactamase OXA-2; Oxacillinase
Betalactam-Resistenz	oxa	prob_oxa7_11	Klasse D Betalactamase OXA-7
Betalactam-Resistenz	oxa	prob_oxa9_11	Betalactamase OXA-9
Betalactam-Resistenz	per	prob_per2_1	Klasse A Betalactamase PER-2; erweitertes Spektrum Betalactamase
Betalactam-Resistenz	pse	prob_pse1_1pm	Carbenicillinase
Betalactam-Resistenz	pse	prob_pse1_1mm	Carbenicillinase
Betalactam-Resistenz	shv	prob_shv1_11	Klasse A Betalactamase - übereinstimmende Sequenz für blaSHV Gene, einschließlich erweitertem Spektrum Betalactamase
Betalactam-Resistenz	tem	prob_tem1_1	Klasse A Betalactamase - übereinstimmende Sequenz für blaSHV Gene, einschließlich erweitertem Spektrum Betalactamase
Chloramphenicol-Resistenz	cat	prob_catA1_11	Chloramphenicol Acetyltransferase (Gruppe A)
Chloramphenicol-Resistenz	cat	prob_catIII_1	Chloramphenicol Acetyltransferase (Typ III)
Chloramphenicol-Resistenz	cat	prob_catB3_11	Chloramphenicol Acetyltransferase (Gruppe B)
Chloramphenicol-Resistenz	cat	prob_catB8_12	Chloramphenicol Acetyltransferase
Chloramphenicol-Resistenz	cml	prob_cmlA1_11	Chloramphenicol Transporter
Chloramphenicol-Resistenz	flo	prob_floR_11	Florfenicol Export Protein
Erythromycin-Resistenz	ereA	hp_ereA_611	Typ I Erythromycin Resistenz
Erythromycin-Resistenz	ereA	hp_ereA_612	Typ I Erythromycin Resistenz

Erythromycin-Resistenz	ereB	hp_ereA_611	Typ II Erythromycin Resistenz
Erythromycin-Resistenz	ereB	hp_ereA_612	Typ II Erythromycin Resistenz
Familien-Marker	gapA	prob_gapA_611	Glycerinaldehyd 3-phosphat Dehydrogenase A (Marker für <i>Enterobacteriaceae</i> )
Familien-Marker	ihfA	prob_ihfA_611	Integration Gastfaktor Unter-einheit Alpha (Marker für <i>Enterobacteriaceae</i> )
Genus-Marker	dnaE	prob_dnaE_611	DNA-Polymerase III Untereinheit Alpha (Species Marker für <i>Salmonella spec.</i> , <i>Escherichia spec.</i> und <i>Shigella spec.</i> )
Genus-Marker	dnaE	prob_dnaE_612	DNA-Polymerase III Untereinheit Alpha (Species Marker für <i>Salmonella spec.</i> , <i>Escherichia spec.</i> und <i>Shigella spec.</i> )
Genus-Marker	dnaE	prob_dnaE_613	DNA-Polymerase III Untereinheit Alpha (Species Marker für <i>Salmonella spec.</i> , <i>Escherichia spec.</i> und <i>Shigella spec.</i> )
Genus-Marker	hemL	prob_hemL_611	Glutamat-1-semialdehyd Aminotransferase (Species Marker für <i>Salmonella spec.</i> , <i>Escherichia spec.</i> und <i>Shigella spec.</i> )
Genus-Marker	hemL	prob_hemL_612	Glutamat-1-semialdehyd Aminotransferase (Species Marker für <i>Salmonella spec.</i> , <i>Escherichia spec.</i> und <i>Shigella spec.</i> )
Genus-Marker	hemL	prob_hemL_613	Glutamat-1-semialdehyd Aminotransferase (Species Marker für <i>Salmonella spec.</i> , <i>Escherichia spec.</i> und <i>Shigella spec.</i> )
Genus-Marker	hemL	prob_hemL_614	Glutamat-1-semialdehyd Aminotransferase (Species Marker für <i>Salmonella spec.</i> , <i>Escheri-</i>

			<i>chia spec.</i> und <i>Shigella spec.</i> )
Integrase	int	prob_intl1_1	Klasse 1 Integrase
Integrase	int	prob_intl2_11	Klasse 1 Integrase
Macrolide	ermB	hp_ermB_611	rRNA Adenin N-methyltransferase, Lincosamide und Streptogram B Resistenz Protein
Macrolide	ermB	hp_ermB_612	rRNA Adenin N-methyltransferase, Lincosamide und Streptogram B Resistenz Protein
Quinolon-Resistenz	qnr	prob_qnr_11	Quinolone oder Fluoroquinolon Resistenz Protein
Quinolon-Resistenz	qnr	prob_qnrB_11	Quinolone oder Fluoroquinolon Resistenz Protein
Quinolon-Resistenz	qnr	prob_qnrB_12	Quinolone oder Fluoroquinolon Resistenz Protein
Quinolon-Resistenz	qnr	prob_qnrS_11	Quinolone oder Fluoroquinolon Resistenz Protein
Quinolon-Resistenz	qnr	prob_qnr_12	Quinolone oder Fluoroquinolon Resistenz Protein
Sulfphonamid-Resistenz	sul	prob_sul2_11	Dihydropteroate Synthetase Type 2
Sulfphonamid-Resistenz	sul	prob_sul3_11	Dihydropteroate Synthetase Type 3
Sulfphonamid-Resistenz	sul	prob_sul1_11	Dihydropteroate Synthetase Type 1
Tetracyclin-Resistenz	tet	prob_tetA_11	Tetracyclin Resistenz Protein A, Tetracyclin Efflux Protein
Tetracyclin-Resistenz	tet	prob_tetB_11	Tetracyclin Resistenz Protein A, Klasse B
Tetracyclin-Resistenz	tet	prob_tetC_11	Tetracyclin Resistenz Protein A, Klasse C

Tetracyclin-Resistenz	tet	prob_tetD_1	Tetracyclin Resistenz Protein A, Klasse D
Tetracyclin-Resistenz	tet	prob_tetE_11	Tetracyclin Resistenz Protein A, Klasse E
Tetracyclin-Resistenz	tet	prob_tetG_11	Tetracyclin Resistenz Protein A, Klasse G
Tetracyclin-Resistenz	tet	prob_tetG_12	Tetracyclin Resistenz Protein A, Klasse G
Trimethoprim-Resistenz	dfr	prob_dfrA1_21	Dihydrofolate Reduktase Type I
Trimethoprim-Resistenz	dfr	prob_dfrA1_22	Dihydrofolate Reduktase Type I
Trimethoprim-Resistenz	dfr	prob_dfrA7_11	Dihydrofolate Reduktase Type 7
Trimethoprim-Resistenz	dfr	prob_dfrA7_12	Dihydrofolate Reduktase Type 7
Trimethoprim-Resistenz	dfr	prob_dfrA12_11	Dihydrofolate Reduktase Type 12
Trimethoprim-Resistenz	dfr	prob_dfrA13_11	Dihydrofolate Reduktase Type 13; Dihydrofolate Reduktase Typ 21
Trimethoprim-Resistenz	dfr	prob_dfrA14_21	Dihydrofolate Reduktase Type 14
Trimethoprim-Resistenz	dfr	prob_dfrA15_1	Dihydrofolate Reduktase Type 15
Trimethoprim-Resistenz	dfr	prob_dfrA17_11	Dihydrofolate Reduktase Type 17
Trimethoprim-Resistenz	dfr	prob_dfrA19_1	Dihydrofolate Reduktase Type 19
Trimethoprim-Resistenz	dfr	prob_dfrV_21	Dihydrofolate Reduktase Type 5

**Tabelle 34: Microarray Genanordnung**

ereA 612			ereB 611	ereB 612	ermB 611	ermB 612	hemL 611	hemL 612	hemL 613	hemL 614	vatE 611	vatE 612	NaPP Stan- dard	Biotin
strA 611			strB 611	blaC- MY 611	blaC- MY 612	bla- MOX CMY9 611	bla- MOX CMY9 612	bla- MOX CMY9 613	dnaE 611	dnaE 612	dnaE 613	ereA 611		
pse1 1pm			pse1 1mm	catB8 12	ctxM 26 11	ctXM8 11	qnrB 11	qnrB 12	qnrS 11	qnr 12	gapA 611	ihfA 611		
oxa2 11			oxa7 11	ctxM9 11	shv1 11	oxa9 11	len1 11	acc1 11	ctxM2 11	per2 1	dfrv 21	sul1 11		
dfrA1 7 11	dfrA 19 1	aac3 la 1	aac3 IVa 1	aac6 lb 1	ant2la 1	act1 11	dha1 11	acc2 11	mox 1pm	mox 1mm	cmy 11	fox 11	tem1 1	oxa1 21
ctxM 1 11	ctxM 1 12	cmlA 1 11	catA 1 11	catIII 1	catB 3 11	flor 11	dfrA1 21	dfrA1 22	dfrA7 11	dfrA7 12	dfr12 11	dfr13 11	dfrA 14 21	dfrA 15 1
qnr 11	sul2 11	sul3 11	tetA 11	tetB 11	tetC 11	tetD 1	tetE 11	tetG 11	tetG 12	intl1 1	intl2 11	aadA 1 1	aadA 2 1	aadA4 1
dnaE 613	ereA 611	ereA 612	ereB 611	ereB 612	ermB 611	ermB 612	hemL 611	hemL 612	hemL 613	hemL 614	vatE 611	vatE 612	NaPP Stan- dard	Biotin
qnrB 11	qnrB 12	qnrS 11	qnr 12	gapA 611	ihfA 611	strA 611	strB 611	blaC- MY 611	blaC- MY 612	bla- MOX CMY9 611	bla- MOX CMY9 613	bla- MOX CMY9 613	dnaE 611	dnaE 612
oxa7 11	ctxM9 11	shv1 11	oxa9 11	len1 11	acc1 11	ctxM2 11	per2 1	dfrv 21	sul1 11	pse1 1pm	pse1 1mm	catB8 12	ctxM 26 11	ctXM8 11
dfrA 19 1	aac3 la 1	aac3 IVa 1	aac6 lb 1	ant2la 1	act1 11	dha1 11	acc2 11	mox 1pm	mox 1mm	cmy 11	fox 11	tem1 1	oxa1 21	oxa2 11
catB 3 11			flor 11	dfrA 1 21	dfrA 1 22	dfrA 7 11	dfrA 7 12	dfr12 11	dfr13 11	dfrA 14 21	dfrA 15 21			dfrA 17 11
			intl1 1	intl2 11	aadA 1 1	aadA 2 1	aadA 4 1	CtxM 1 11	ctxM 1 12	cmlA 1 11	catA 1 11			catIII 1
			qnr 11	sul2 11	sul3 11	tetA 11	tetB 11	tetC 11	tetD 1	tetE 11	tetG 11			tetG 12

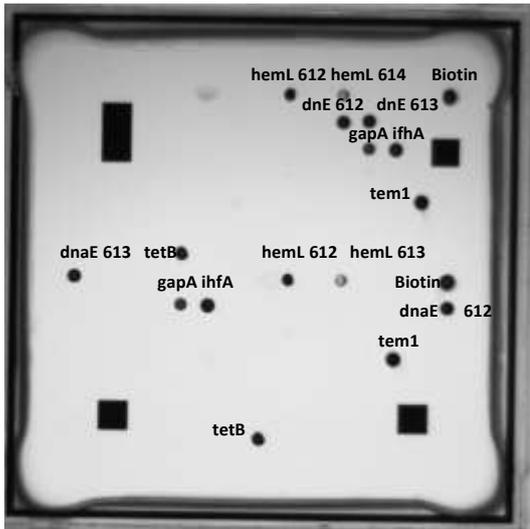


Abbildung 196: Microarray 18a

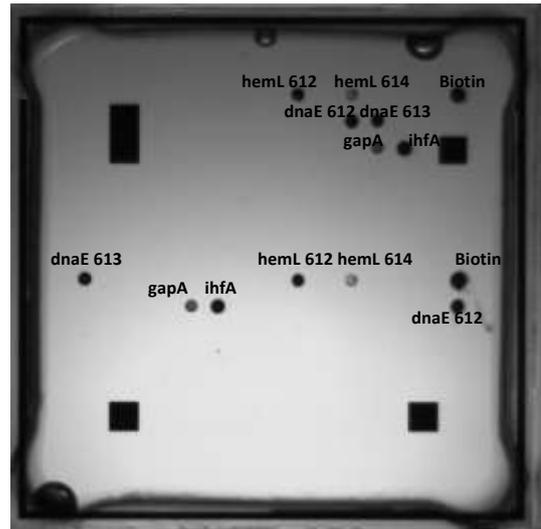


Abbildung 197: Microarray 18d

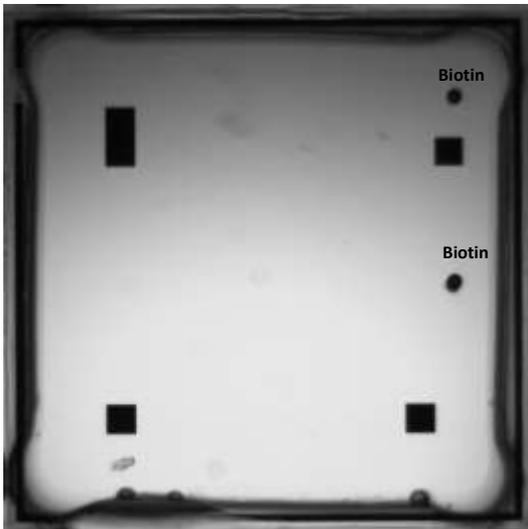


Abbildung 198: Microarray 18b

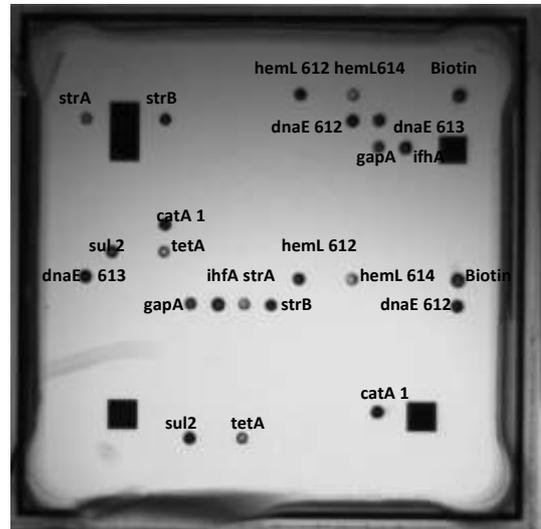


Abbildung 199: Microarray 18e

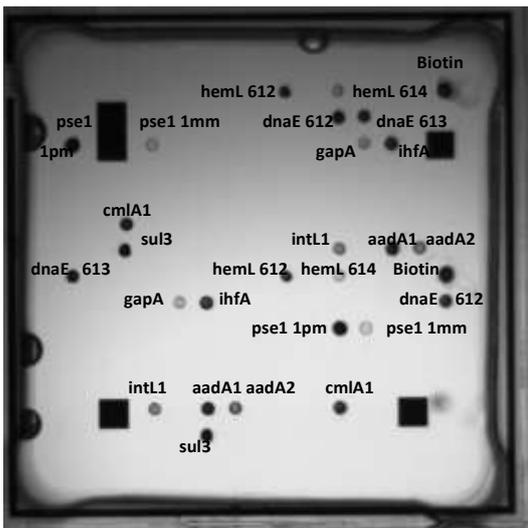


Abbildung 200: Microarray 18c

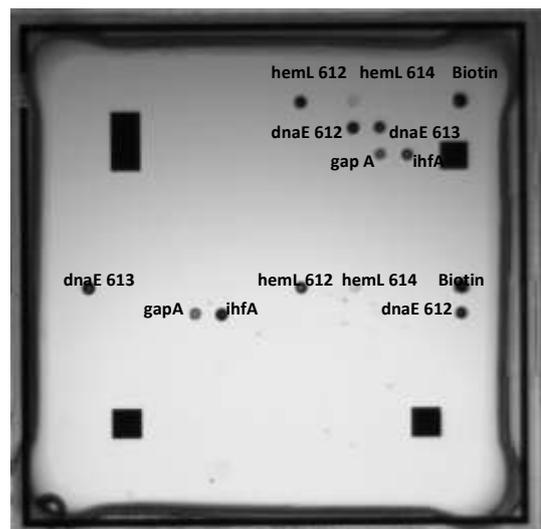


Abbildung 201: Microarray A1d1

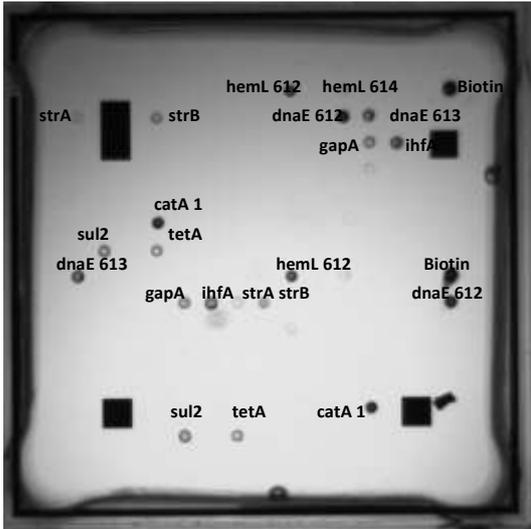


Abbildung 202: Microarray A2c1

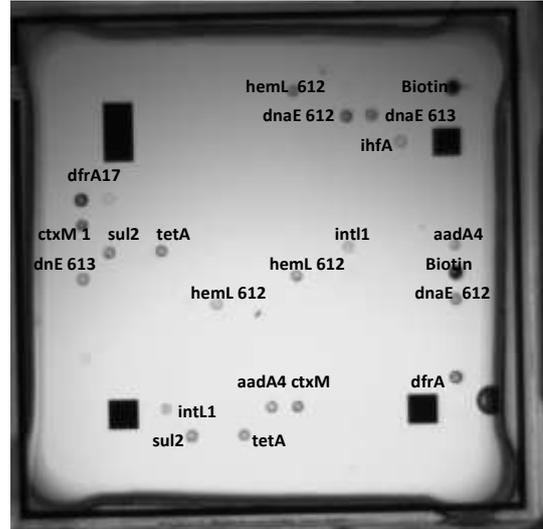


Abbildung 203: Microarray A4c1

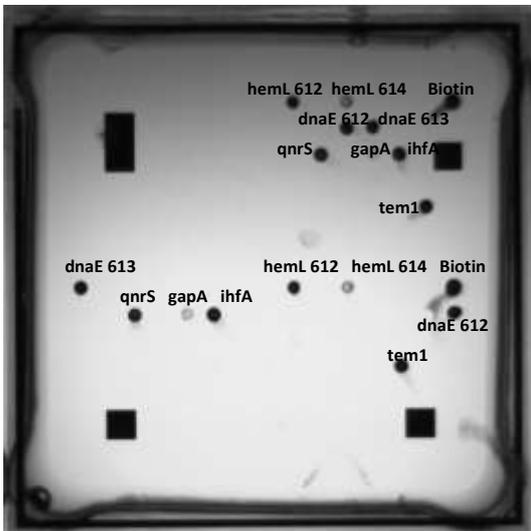


Abbildung 204: Microarray A3d2

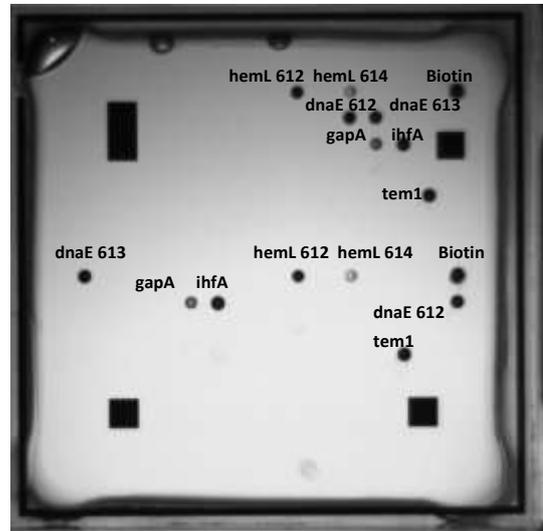


Abbildung 205: Microarray A4e1

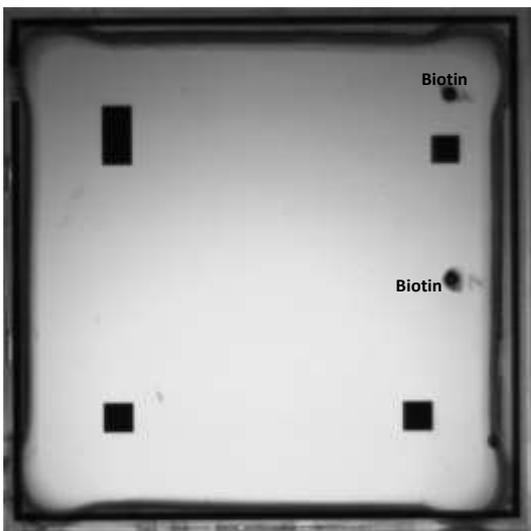


Abbildung 206: Microarray A4b2

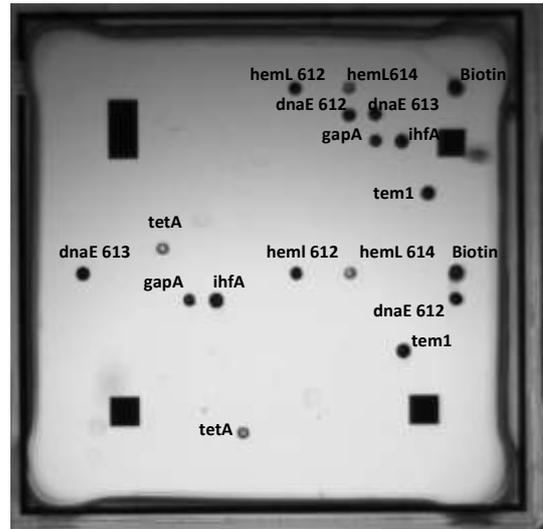


Abbildung 207: Microarray A5d1

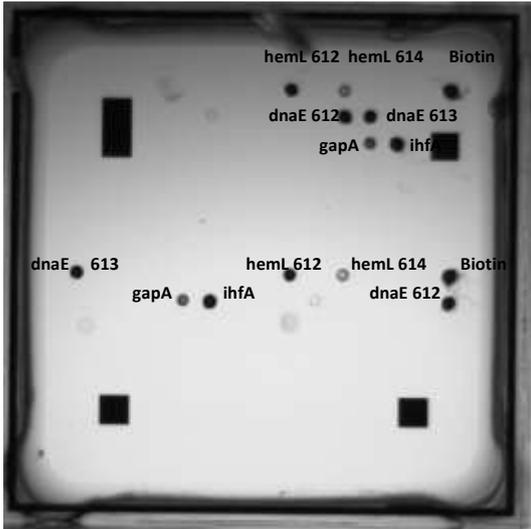


Abbildung 208: Microarray A5d2

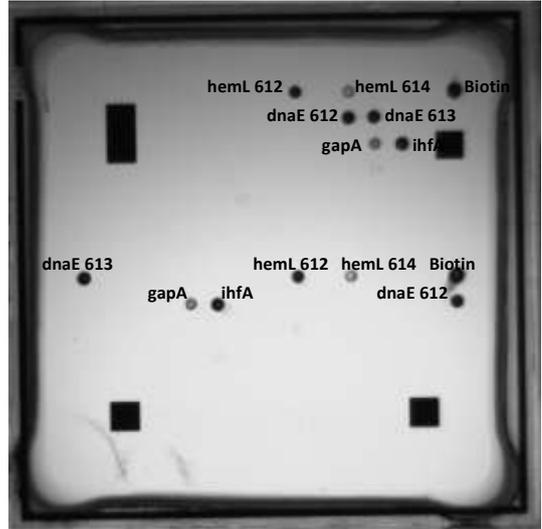


Abbildung 209: Microarray A8a1

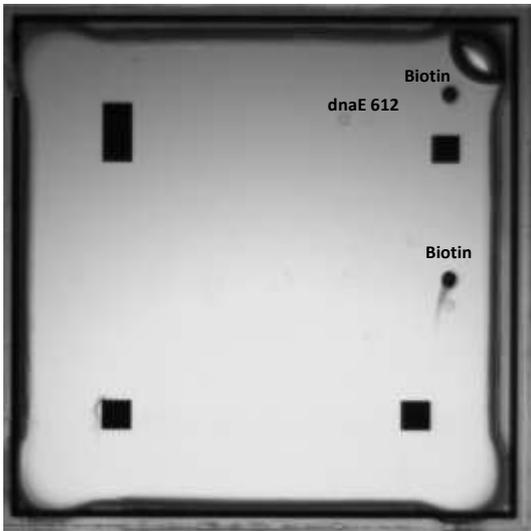


Abbildung 210: Microarray A5e1

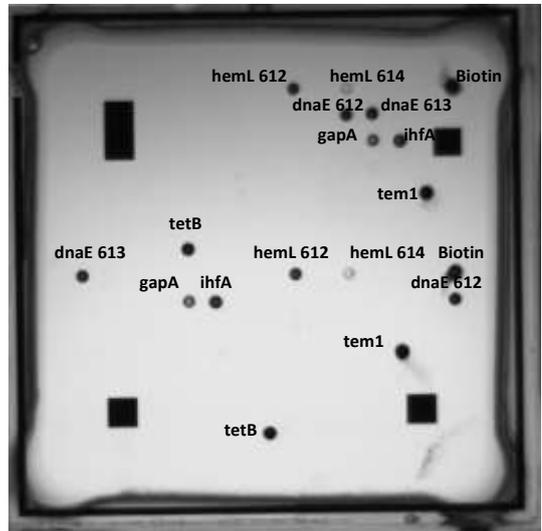


Abbildung 211: Microarray A8c1

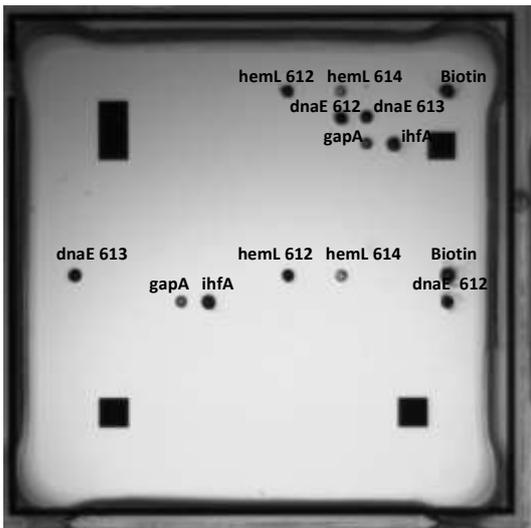


Abbildung 212: Microarray A6e2

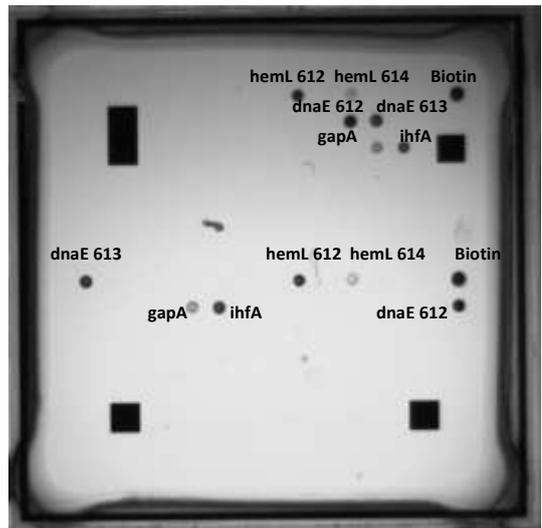


Abbildung 213: Microarray B1a1

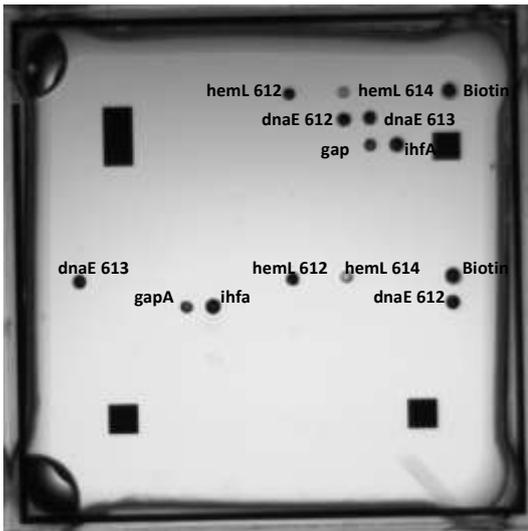


Abbildung 214: Microarray B2c1

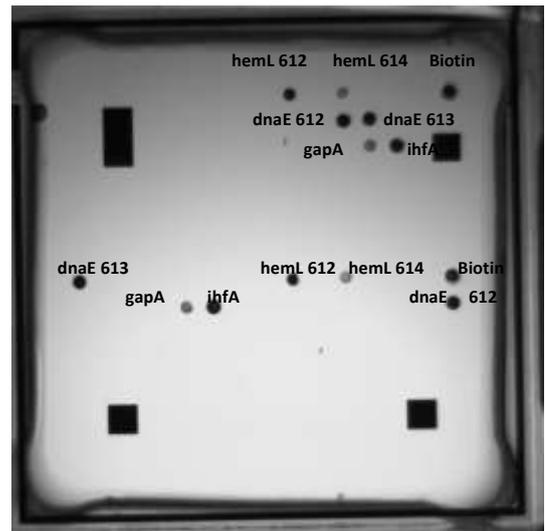


Abbildung 215: Microarray B5a2

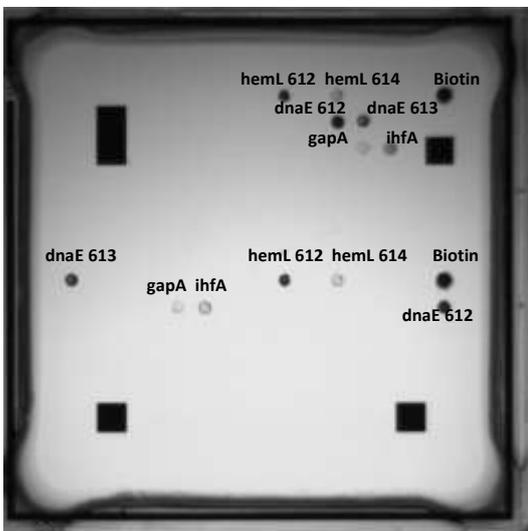


Abbildung 216: Microarray B3e2

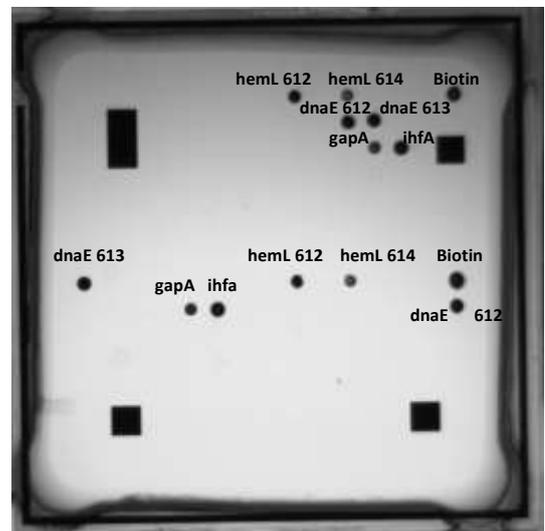


Abbildung 217: Microarray B7d2

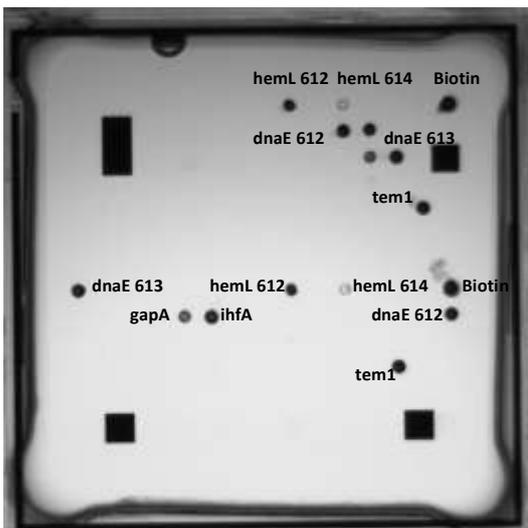


Abbildung 218: Microarray B4d1

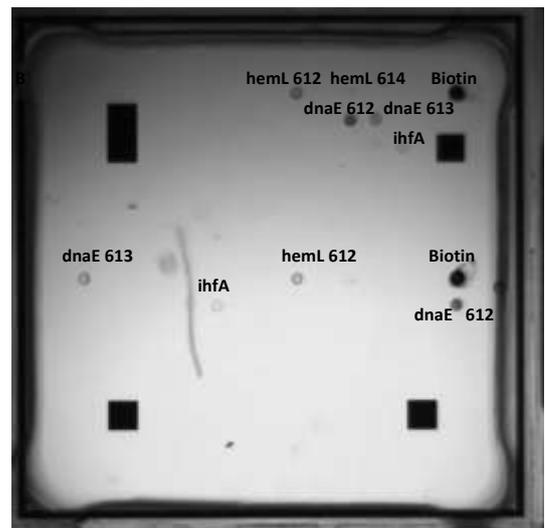


Abbildung 219: Microarray B8a1

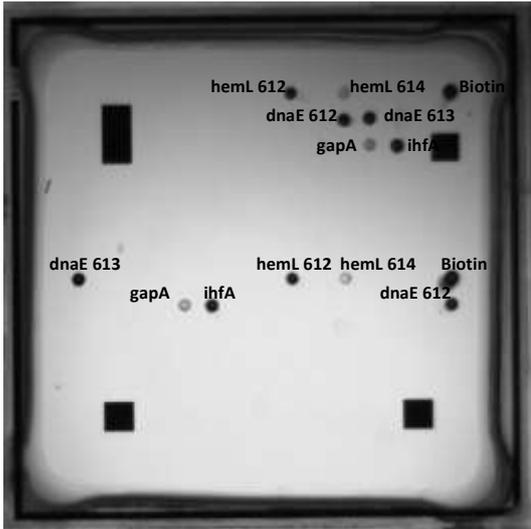


Abbildung 220: Microarray B8e2

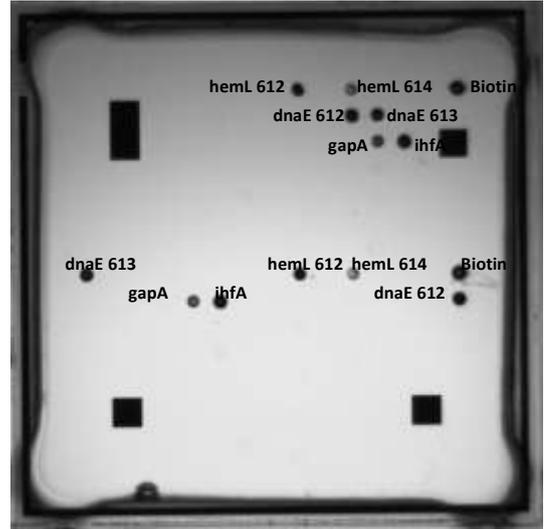


Abbildung 221: Microarray C2a2

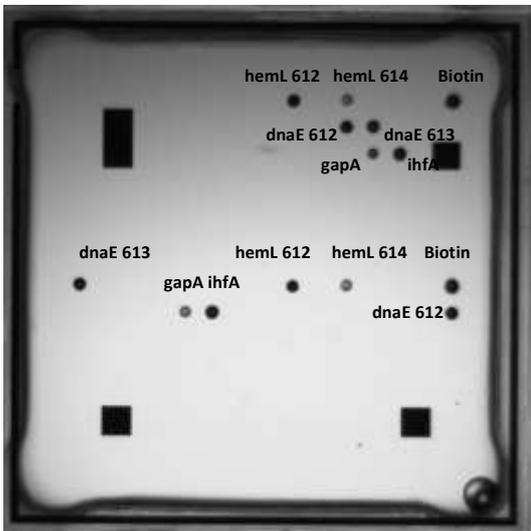


Abbildung 222: Microarray C1b2

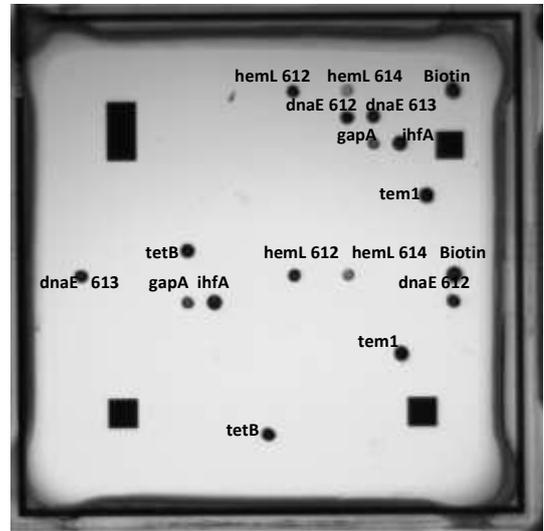


Abbildung 223: Microarray C3b1

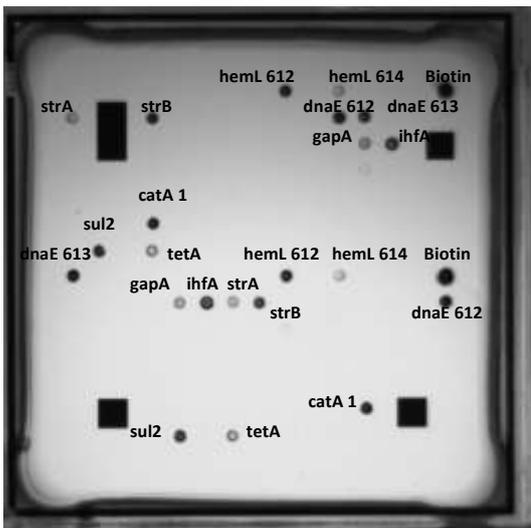


Abbildung 224: Microarray C2a1

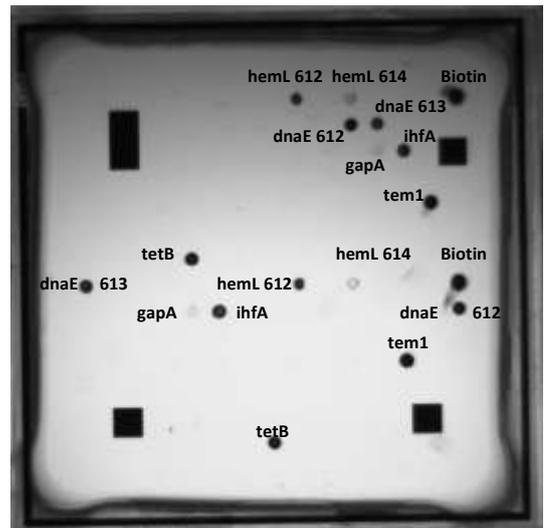


Abbildung 225: Microarray C3c2

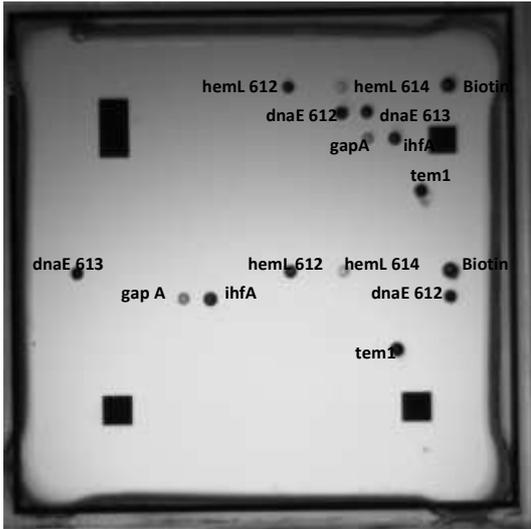


Abbildung 226: Microarray C3e1

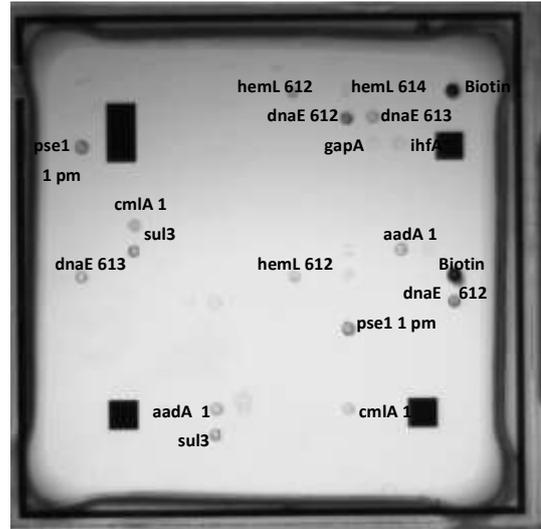


Abbildung 227: Microarray C6e1

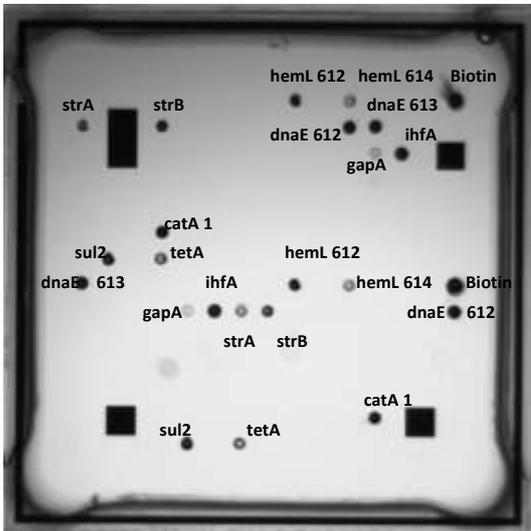


Abbildung 228: Microarray C4e2

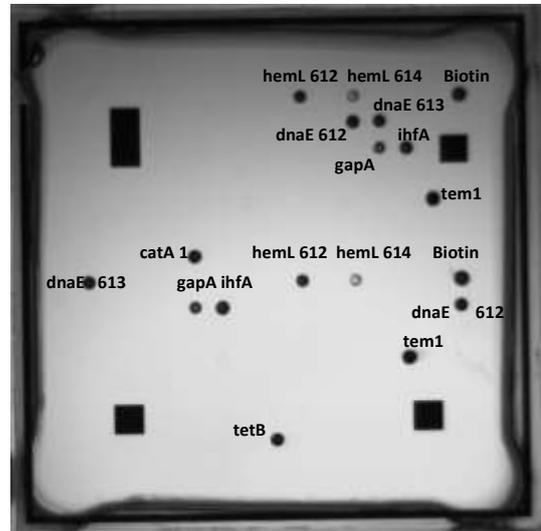


Abbildung 229: Microarray C7d2

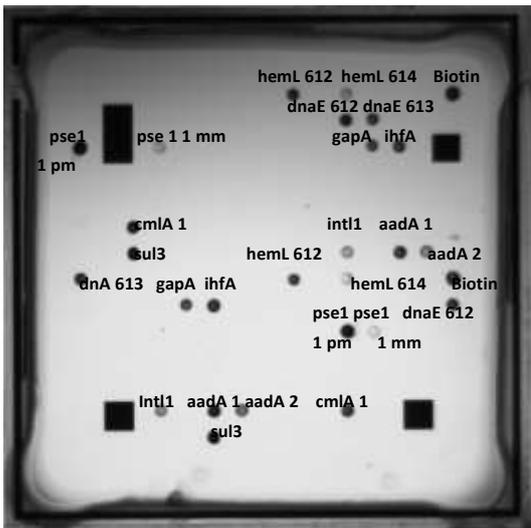


Abbildung 230: Microarray C6a1

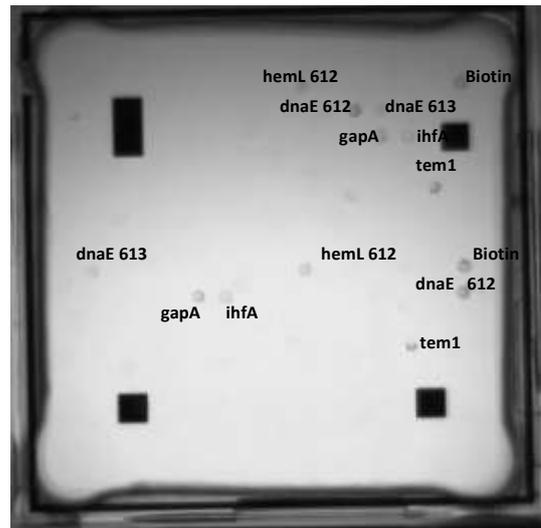


Abbildung 231: Microarray C8a2

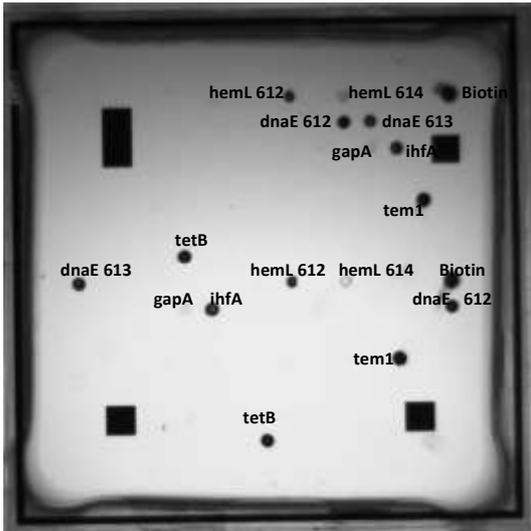


Abbildung 232: Microarray Control Material

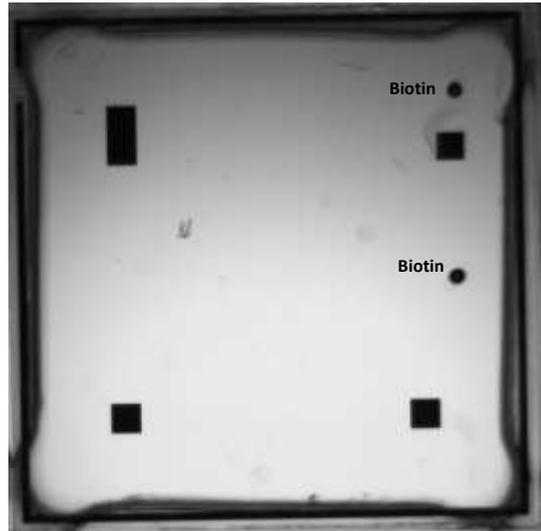


Abbildung 233: Microarray A1 (ursprüngliche Probe)

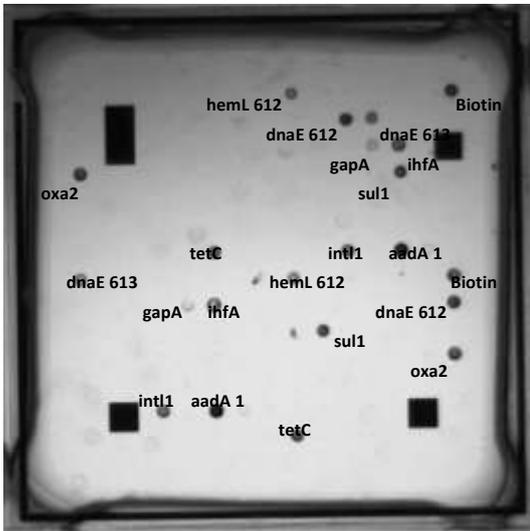


Abbildung 234: Microarray Ec16

## 10.3 Typing

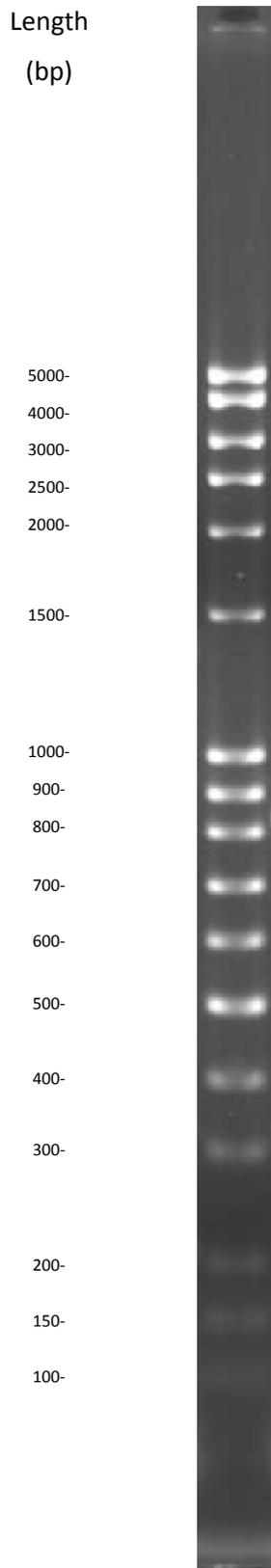


Abbildung 235: 100 bp DNA-Leiter, extended

### 10.3.1 Getestete RAPD- und rep-Primer - DNA-Isolation mittels Hitze

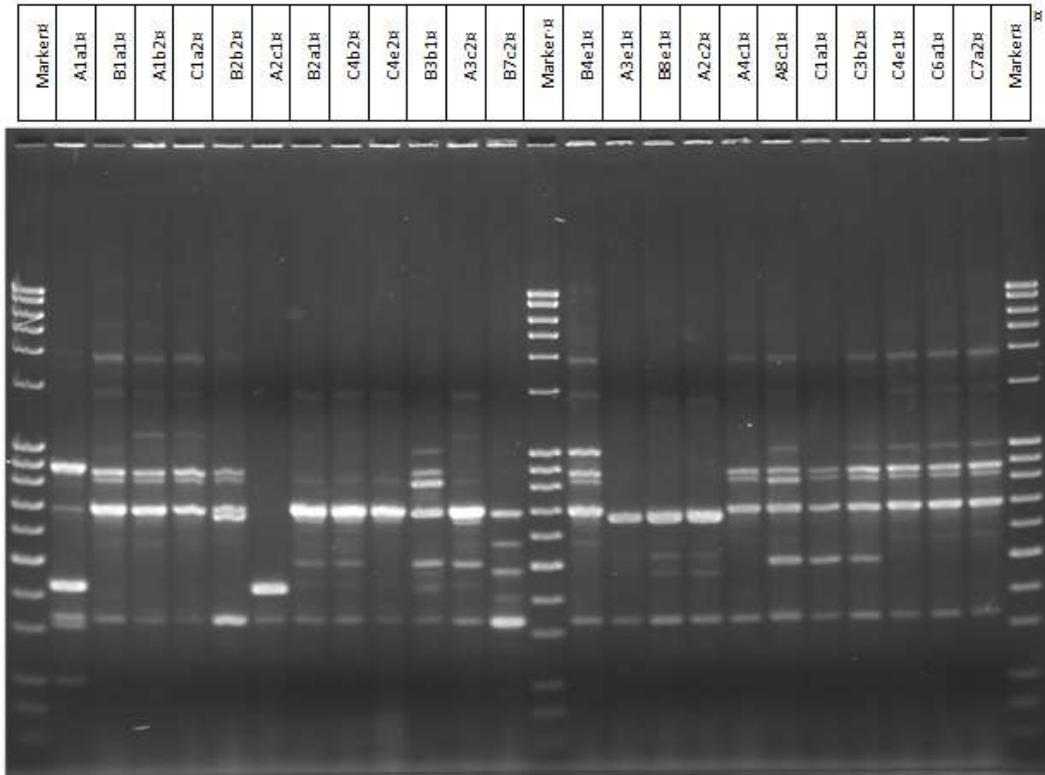


Abbildung 236: Agarosegel - RAPD4 - A1a1-C7a2

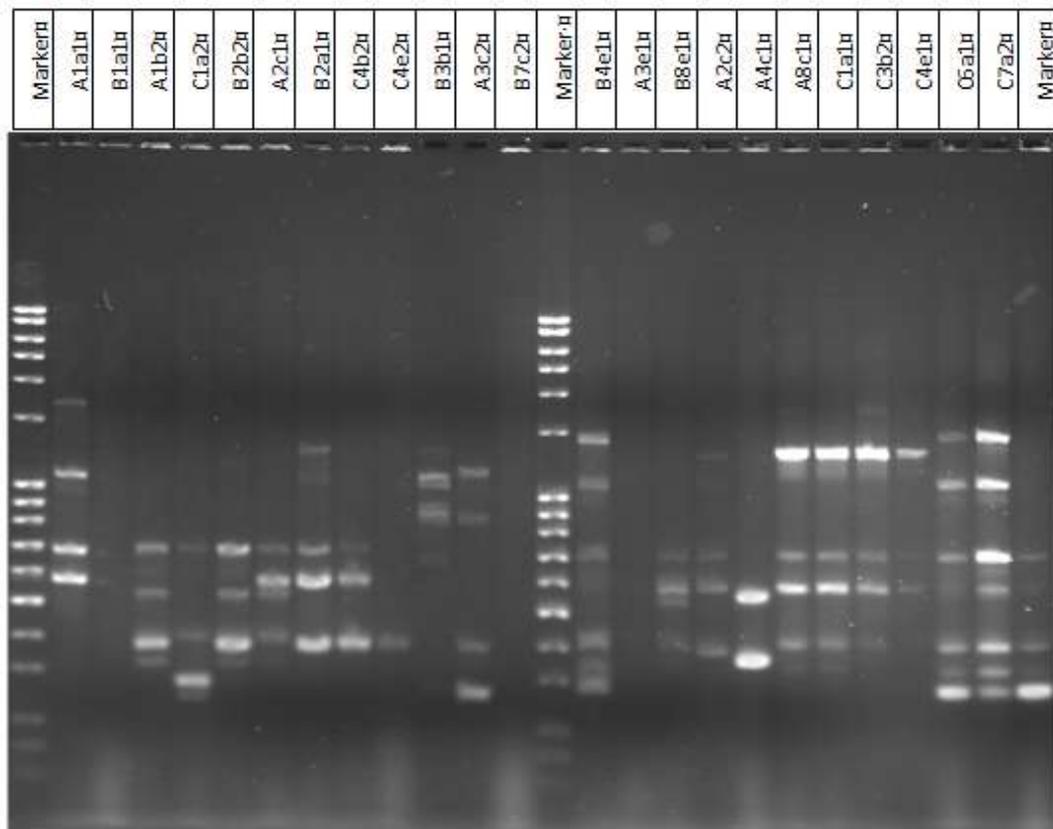


Abbildung 237: Agarosegel - RAPD13 A1a1-C7a2

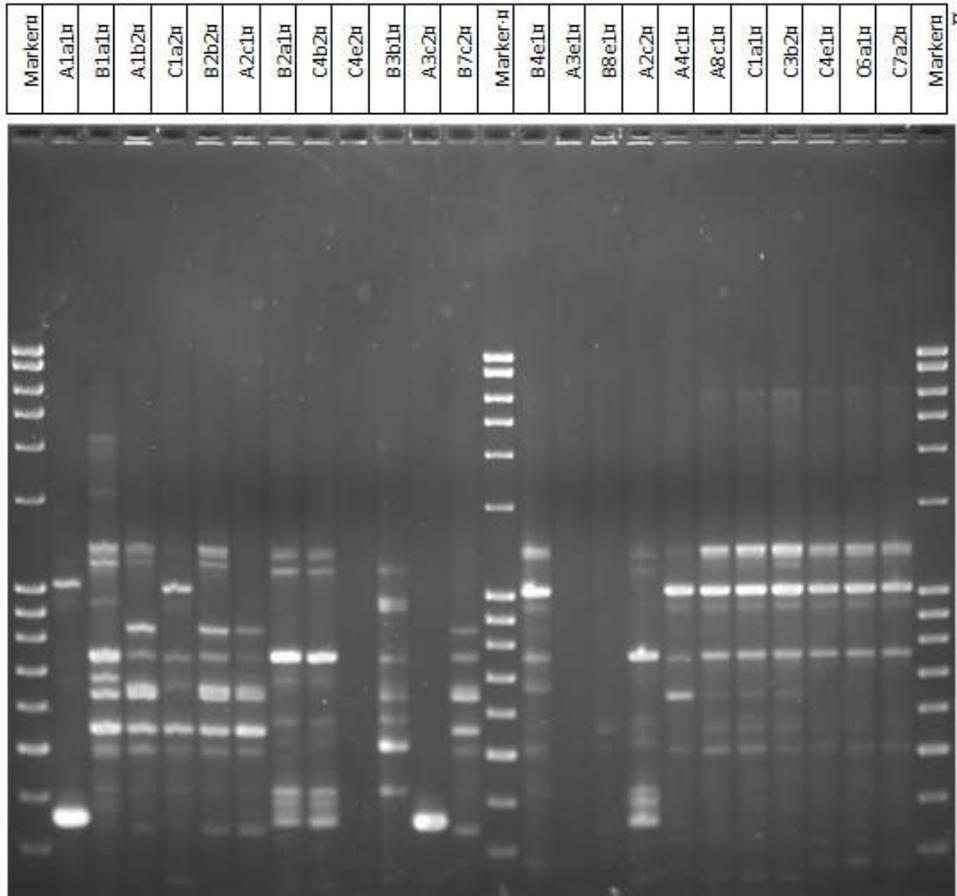


Abbildung 238: Agarosegel - Torriani - A1a1-C7a2

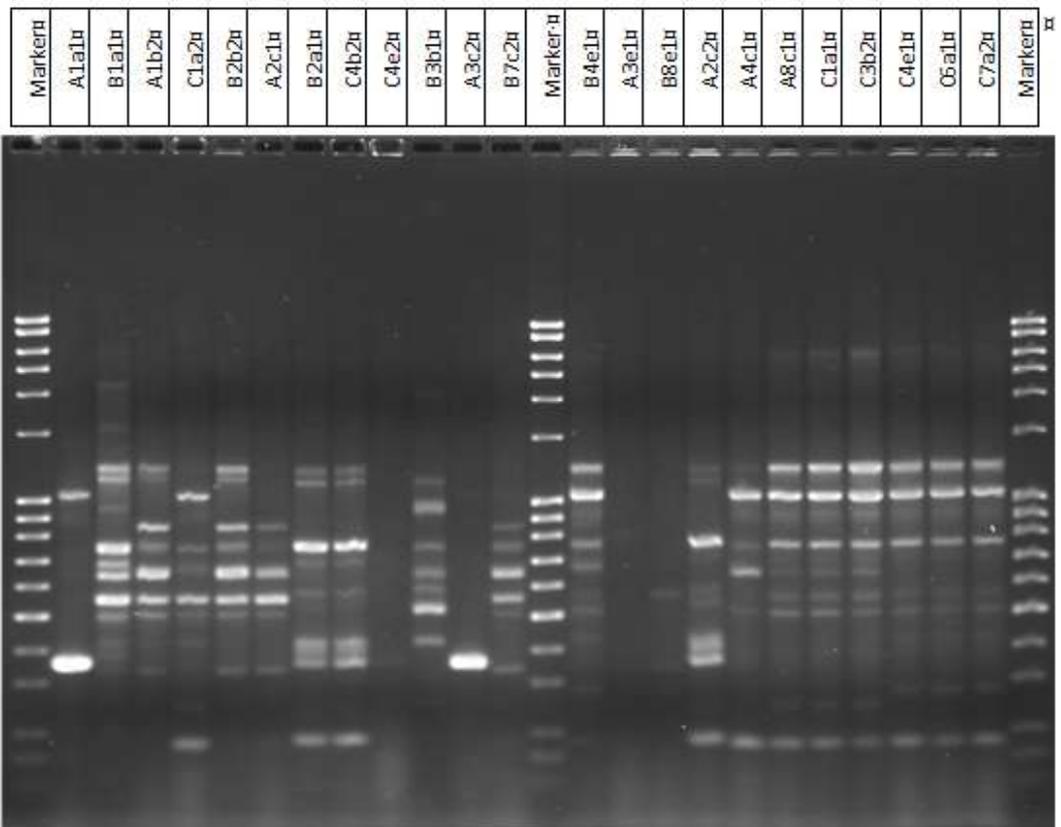


Abbildung 239: Agarosegel - Torriani WH A1a1-C7a2

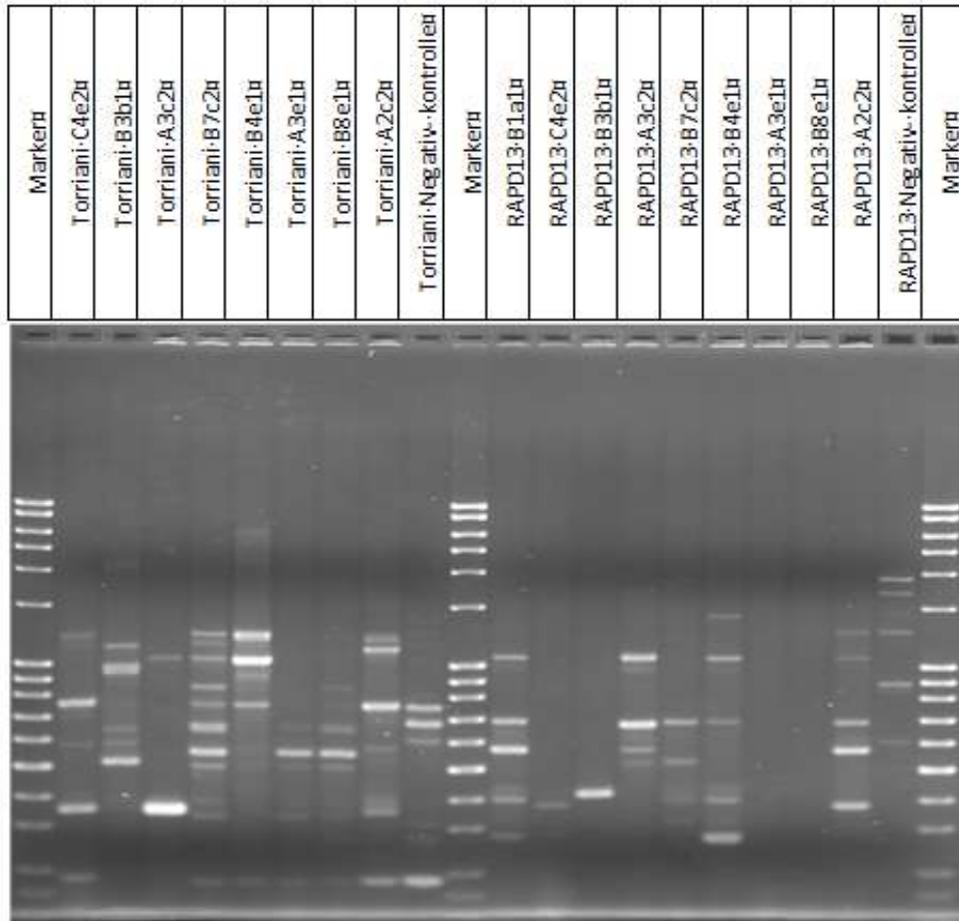


Abbildung 240: Agarosegel - Torriani C4e2-A2c2 - RAPD13 B1a1-A2c2

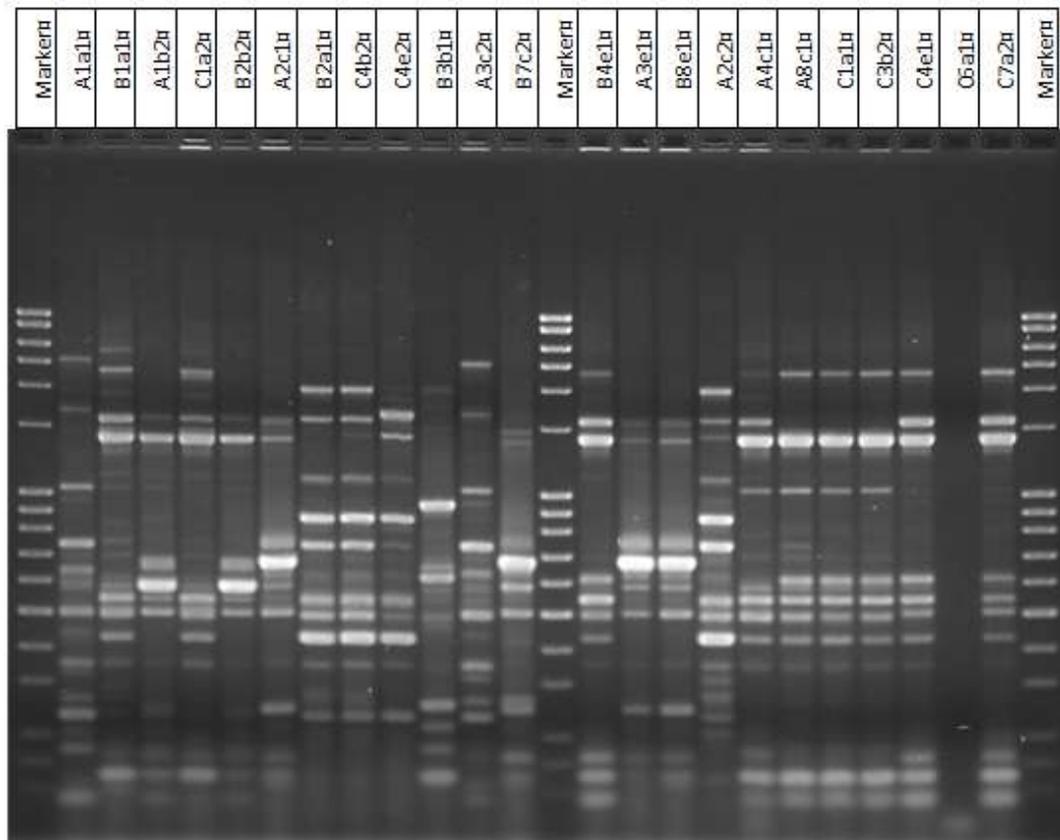


Abbildung 241: Agarosegel - REP1R-I + REP2I - Beladung A1a1-C7a2

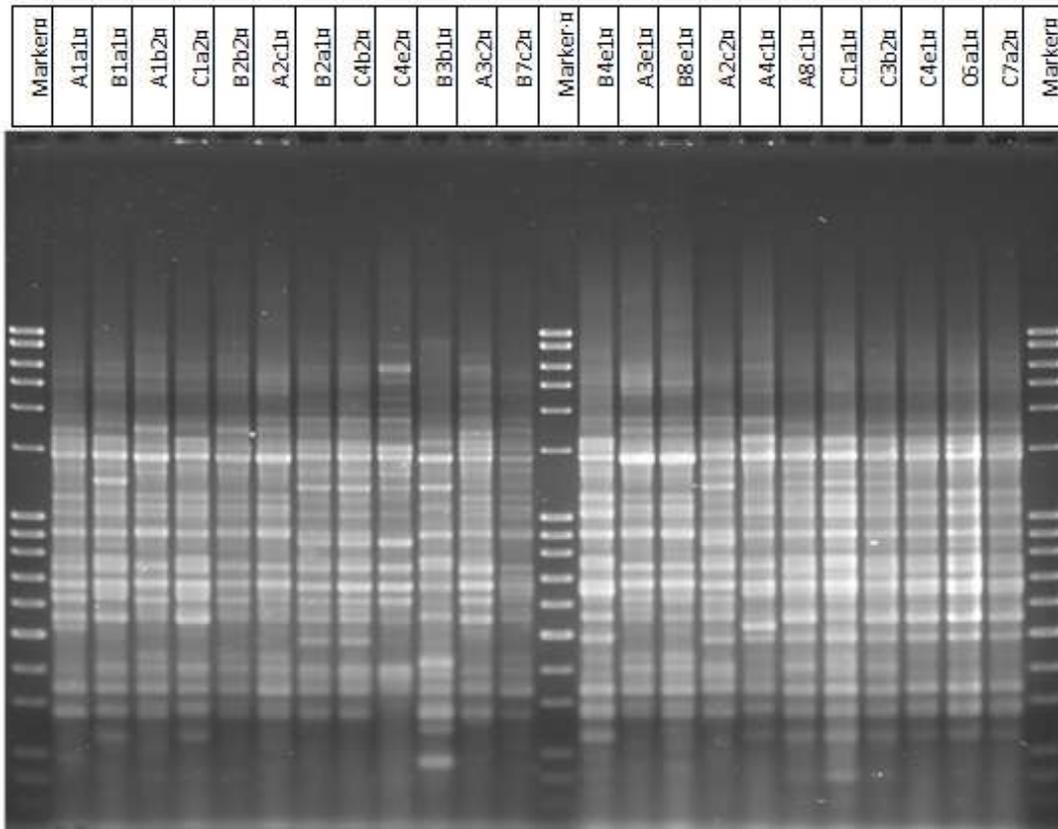


Abbildung 242: Agarosegel - (GTG)5 A1a1-C7a2

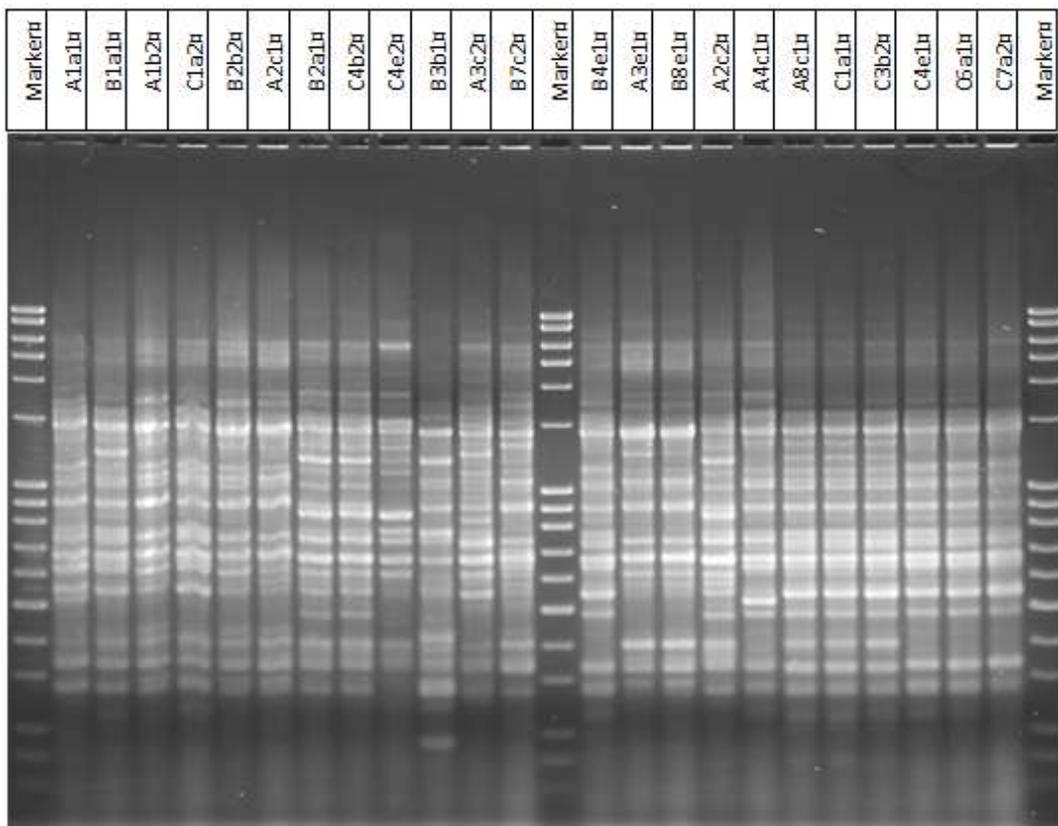


Abbildung 243: Agarosegel - (GTG)5 25 Zyklen - Beladung A1a1-C7a2

### 10.3.2 Getestete rep-Primer - DNA-Isolation mittels 5 Prime Kit

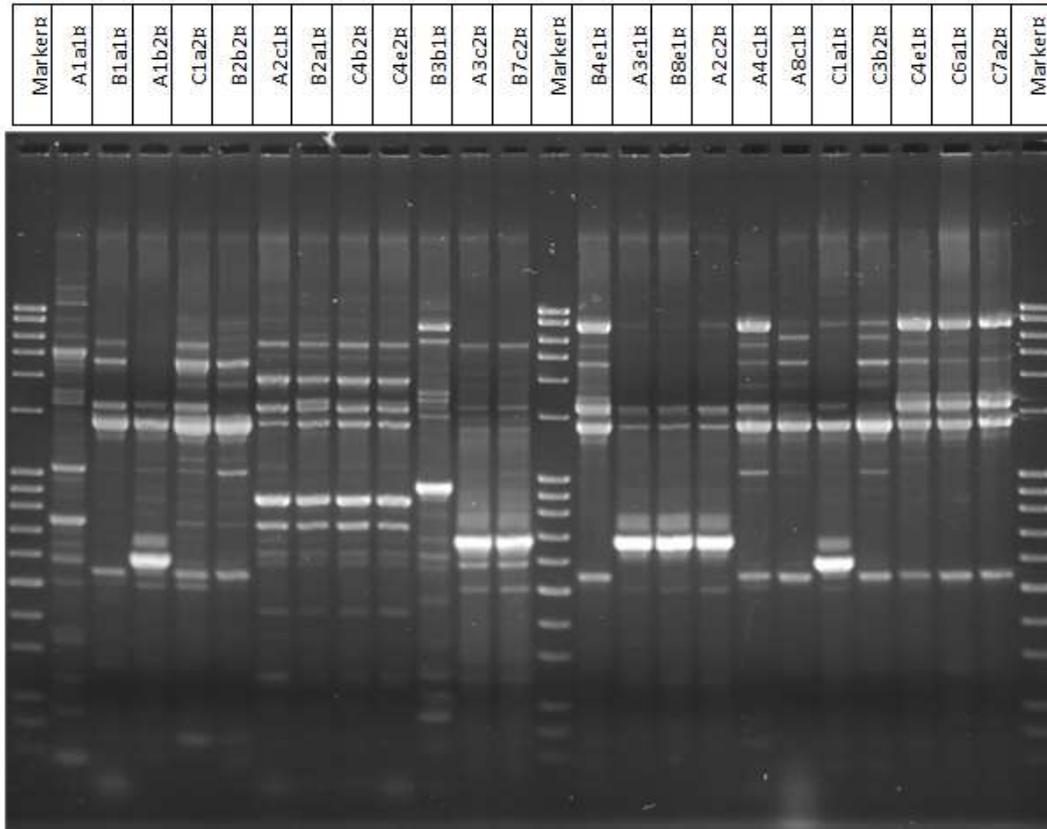


Abbildung 244: Agarosegel - REP1R + REP 2I - Beladung A1a1-C7a2

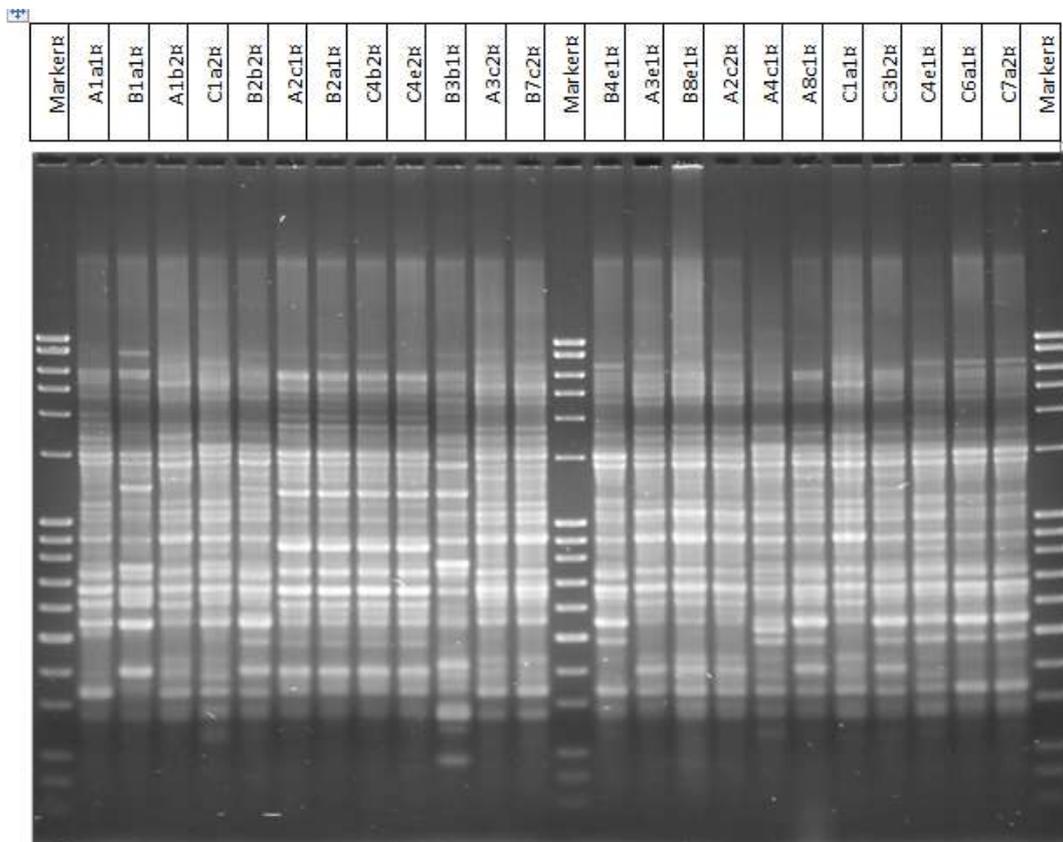


Abbildung 245: Agarosegel - (GTG)<sub>5</sub> - Beladung A1a1-C7a2

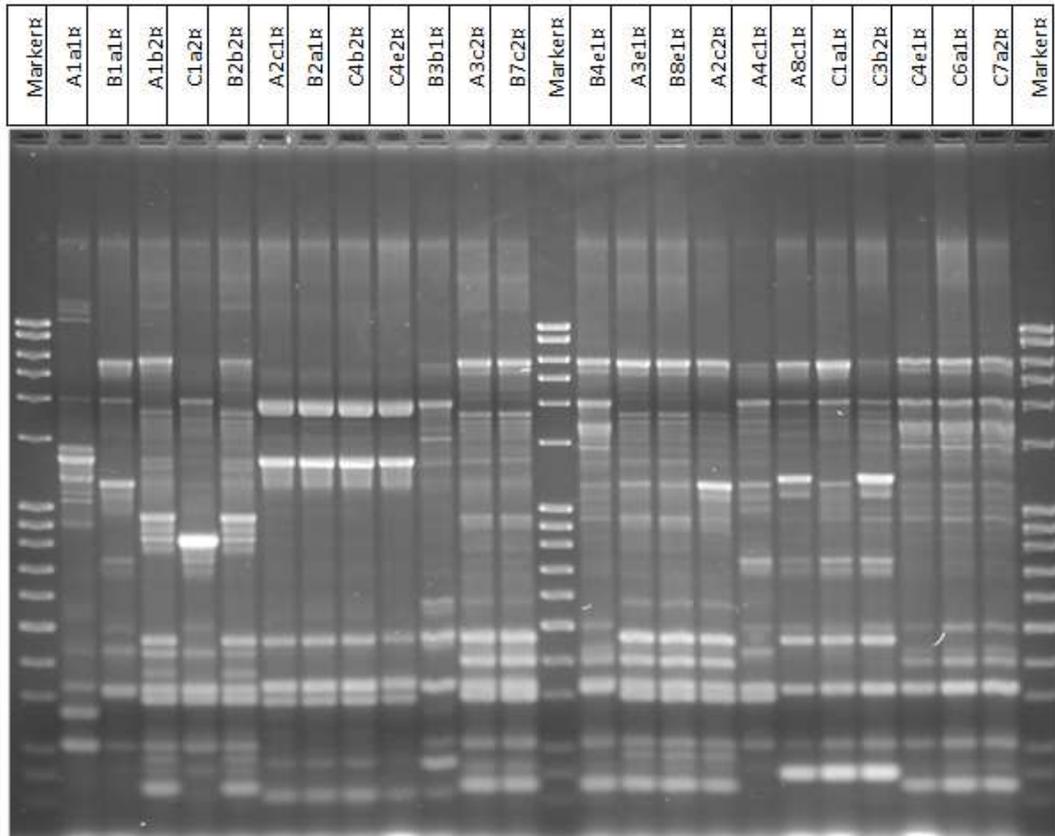


Abbildung 246: Agarosegel - ERIC1 + ERIC2R - Beladung A1a1-C7a2

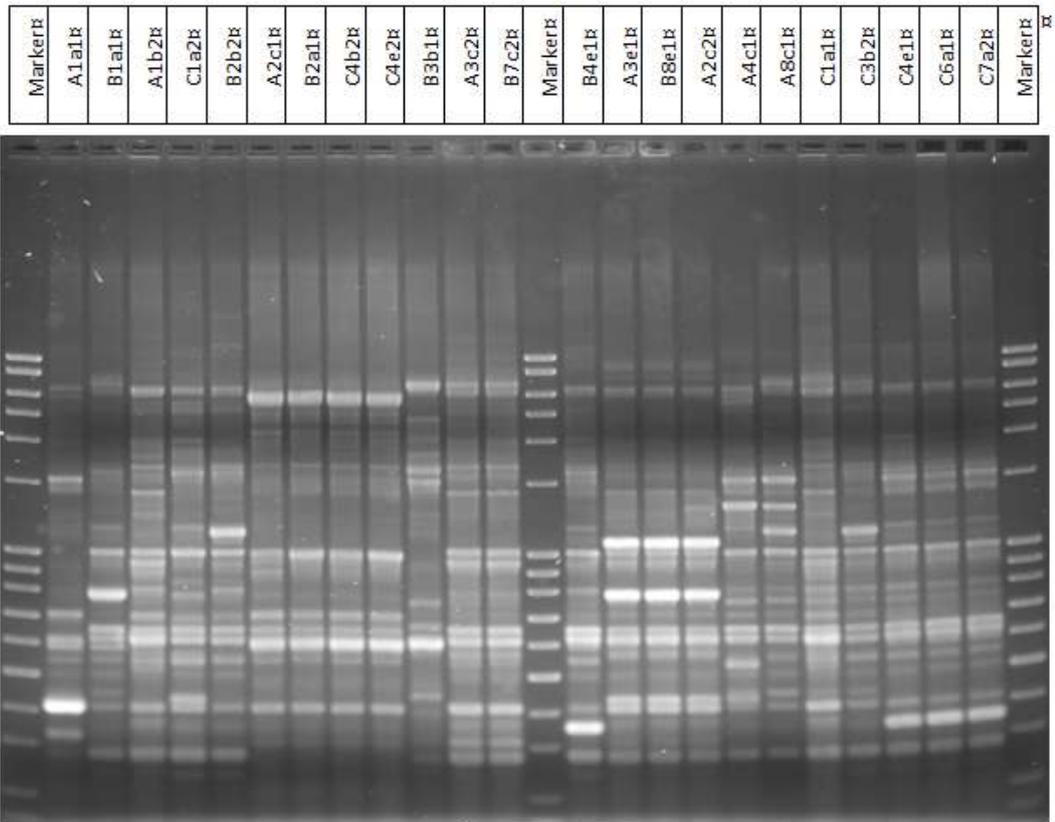


Abbildung 247: Agarosegel - BOXA1R - Beladung A1a1-C7a2

### 10.3.3 ERIC1R + ERIC2 Agarosegele

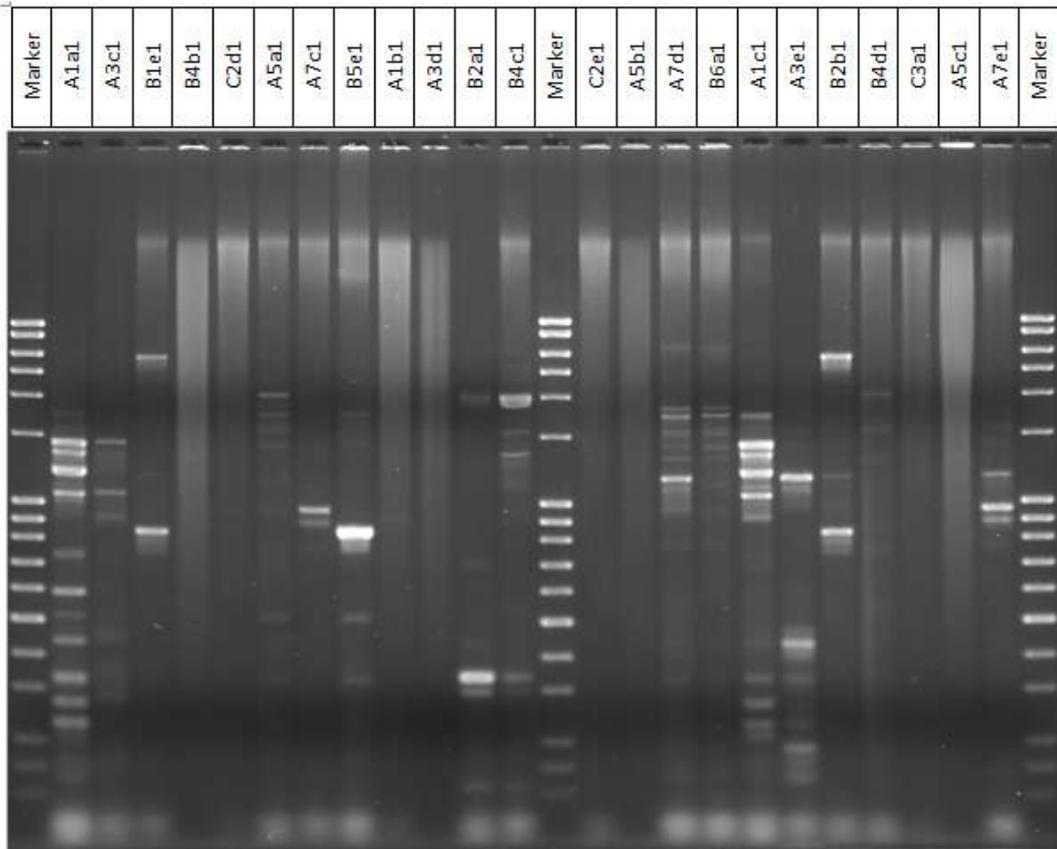


Abbildung 248: Agarosegel - ERIC1R + ERIC2 - A1a1-A7e1

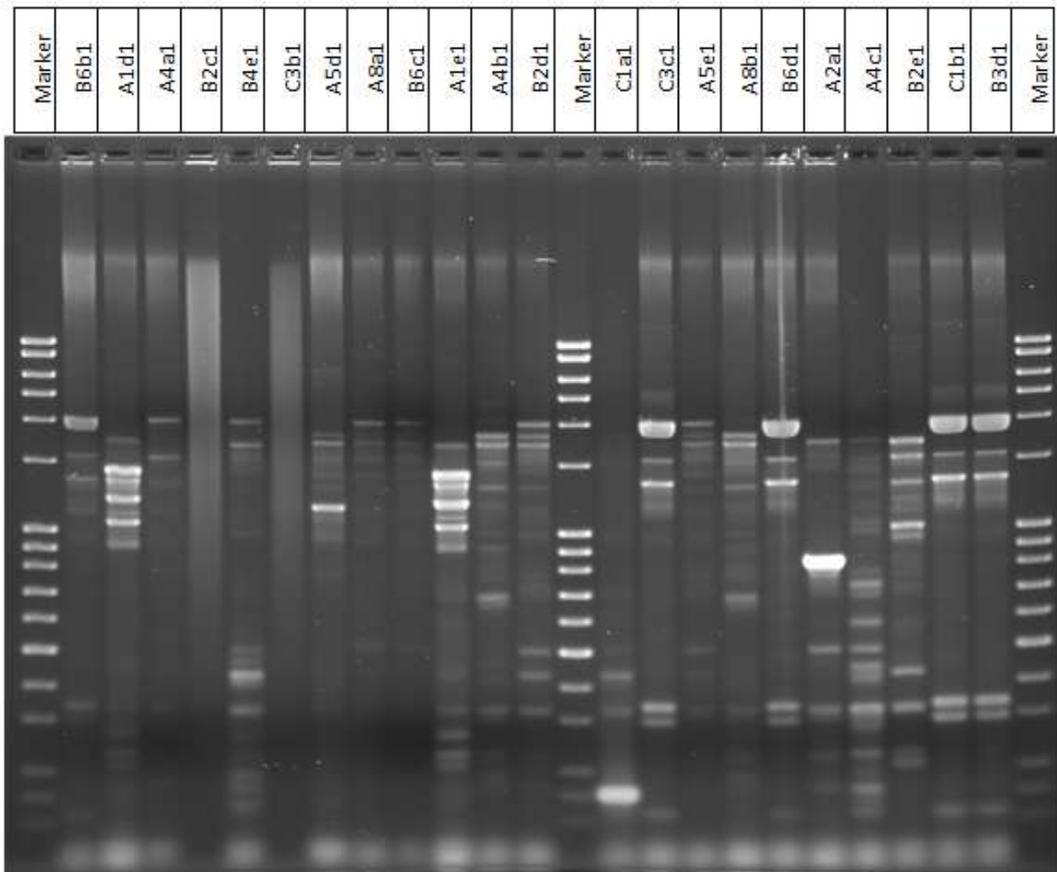


Abbildung 249: Agarosegel - ERIC1R + ERIC2 - B6b1-B3d1

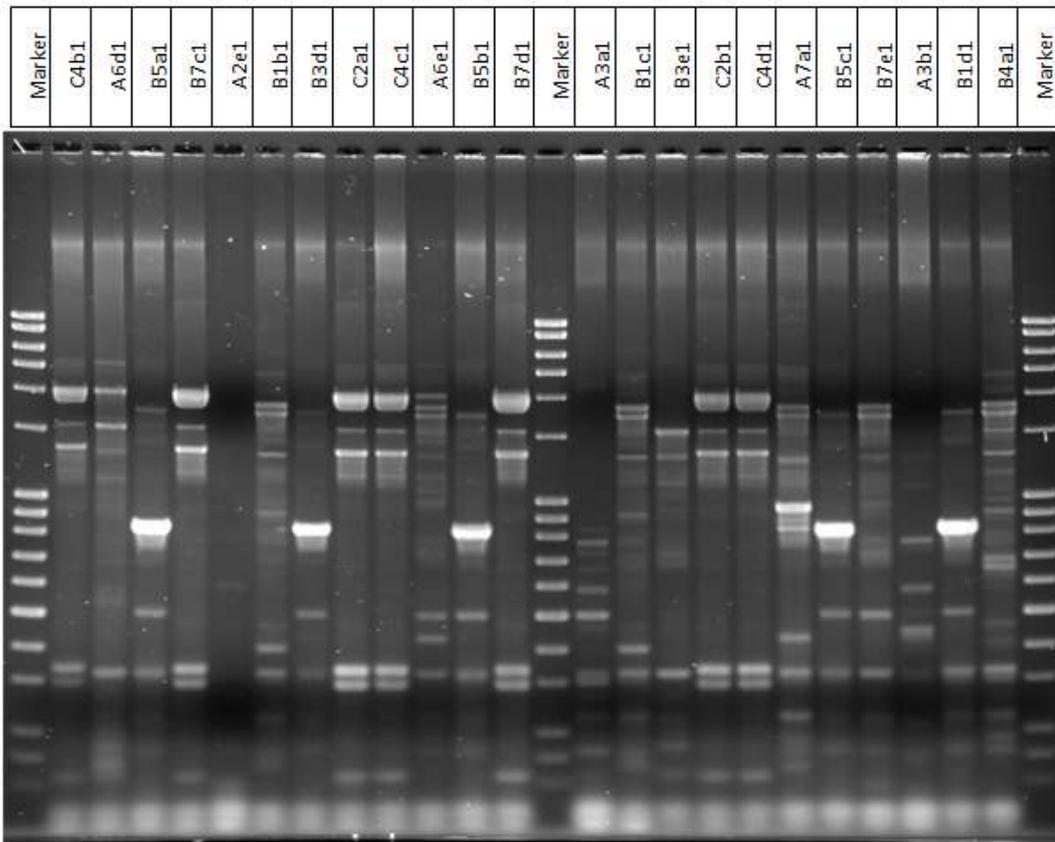


Abbildung 250: Agarosegel - ERIC1R + ERIC2 -C4b1-B4a1

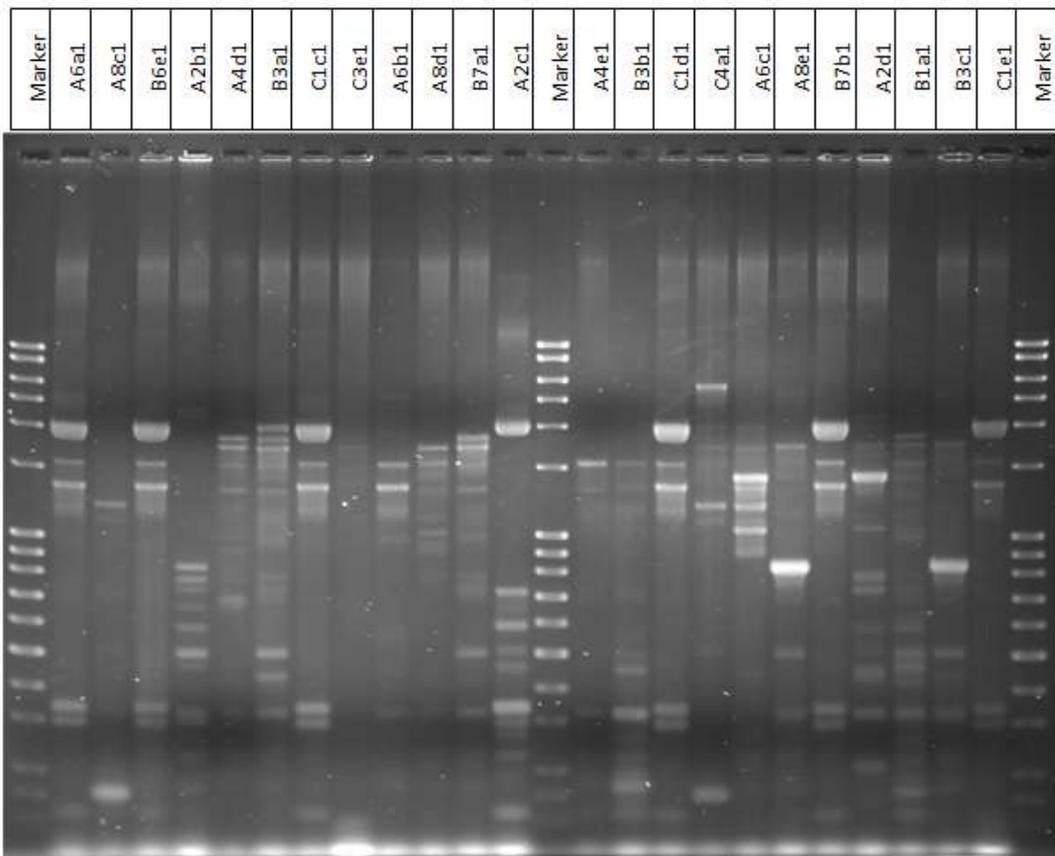


Abbildung 251: Agarosegel - ERIC1R +ERIC2 -A6a1-C1e1

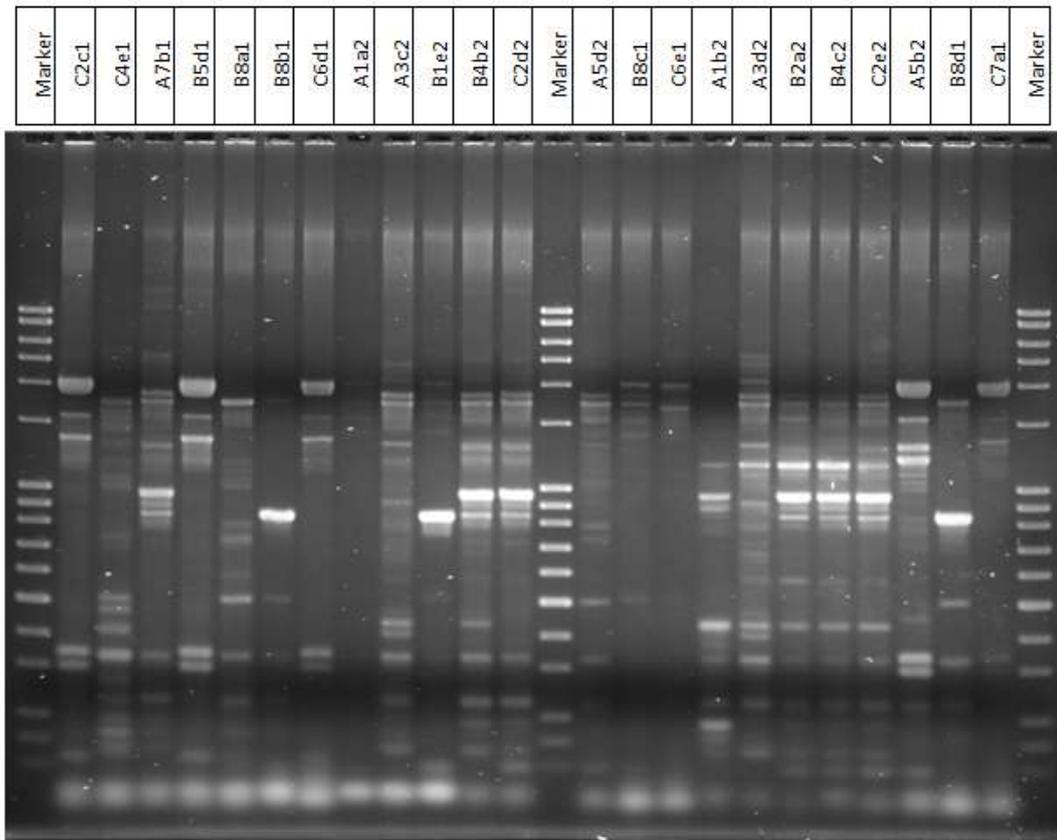


Abbildung 252: Agarosegel - ERIC1R +ERIC2 - C2c1-C7a1

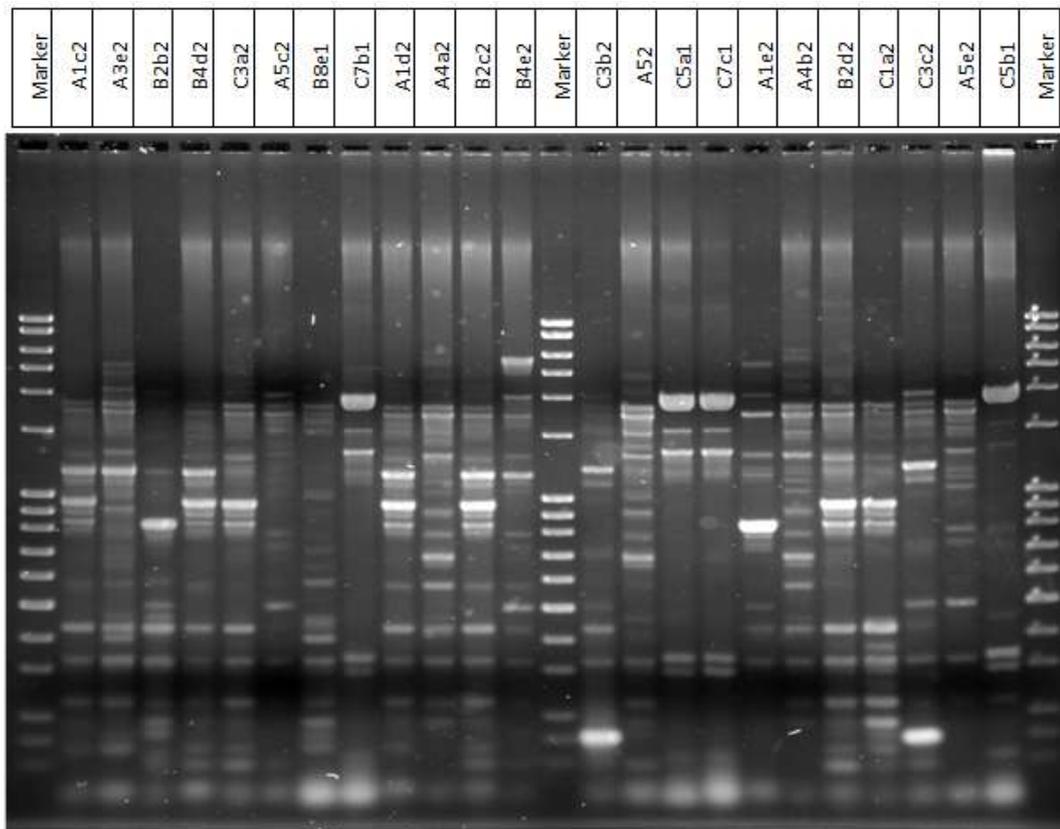


Abbildung 253: Agarosegel - ERIC1R + ERIC2 -A1c2-C5b1

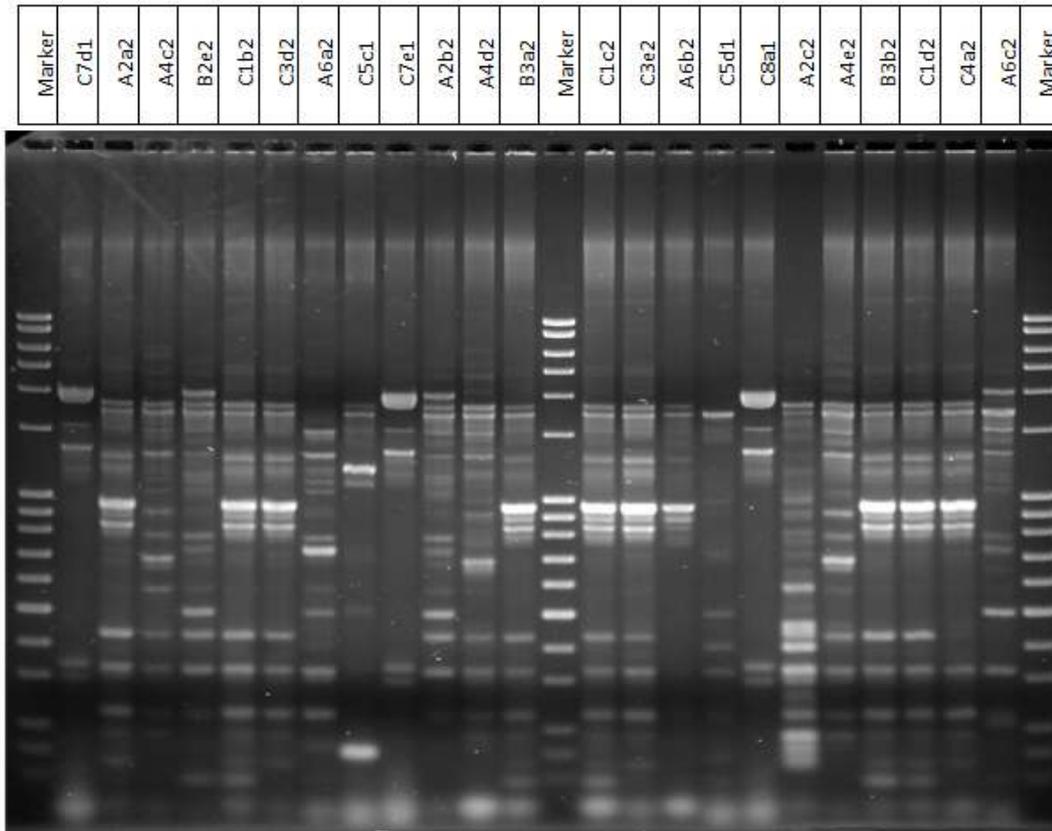


Abbildung 254: Agarosegel - ERIC1R + ERIC2 - C7d1-A6c2

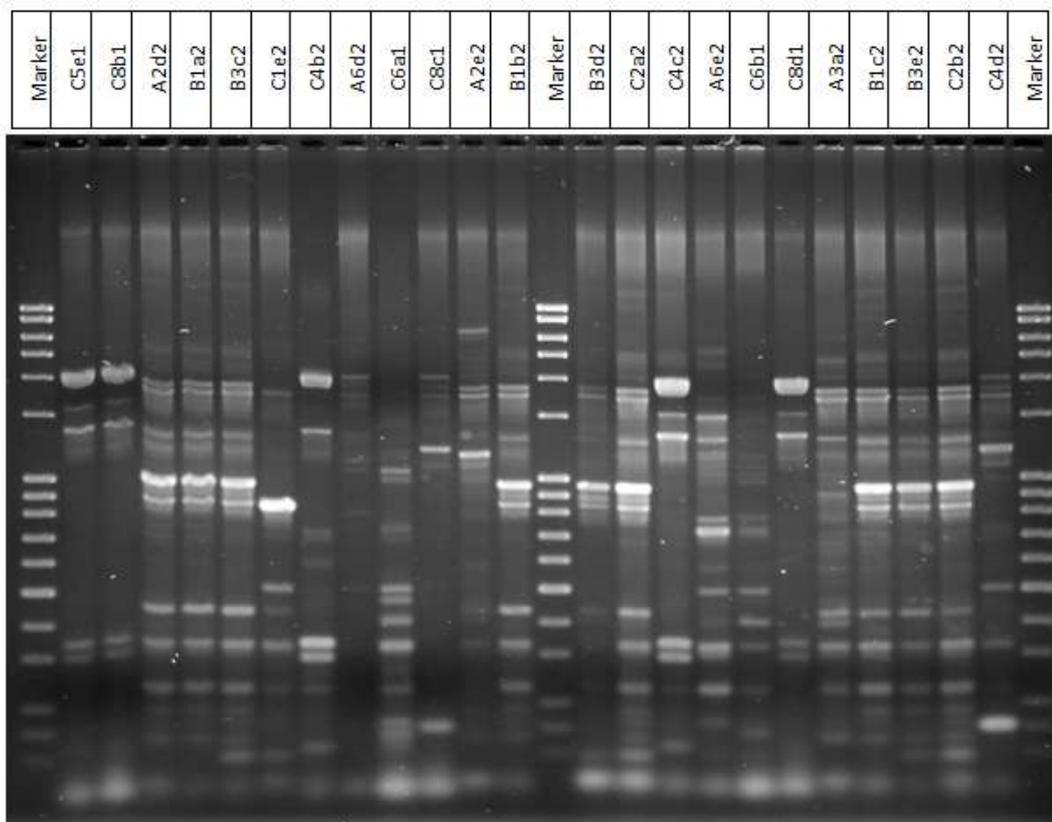


Abbildung 255: Agarosegel - ERIC1R + ERIC2 - C5e1-C4d2

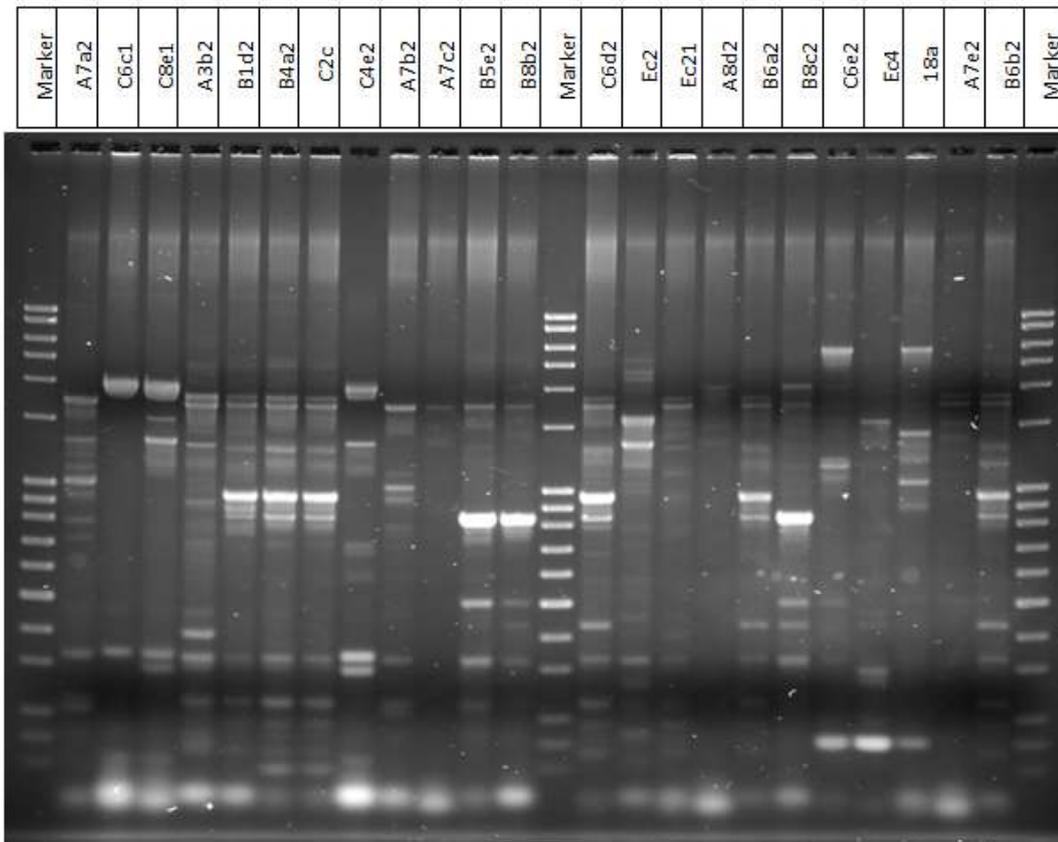


Abbildung 256: Agarosegel - ERIC1R +ERIC2 - A7a2-B6b2

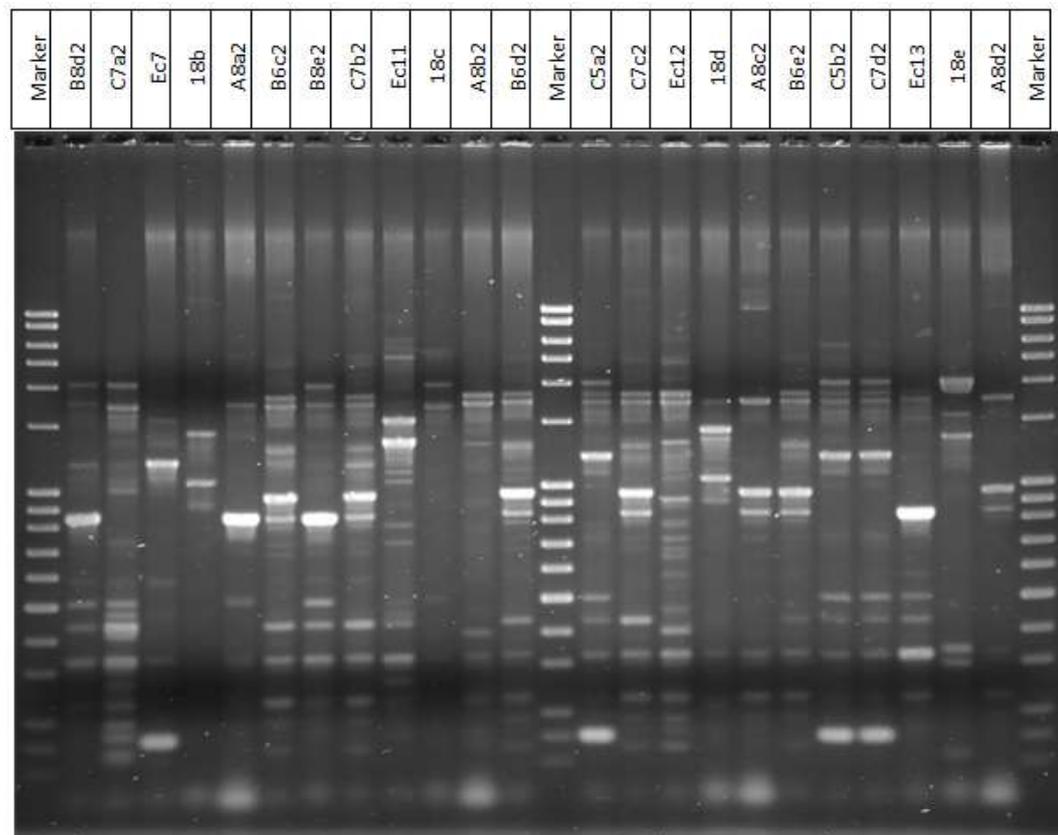


Abbildung 257: Agarosegel - ERIC1R + ERIC2 - B8d2-A8d2

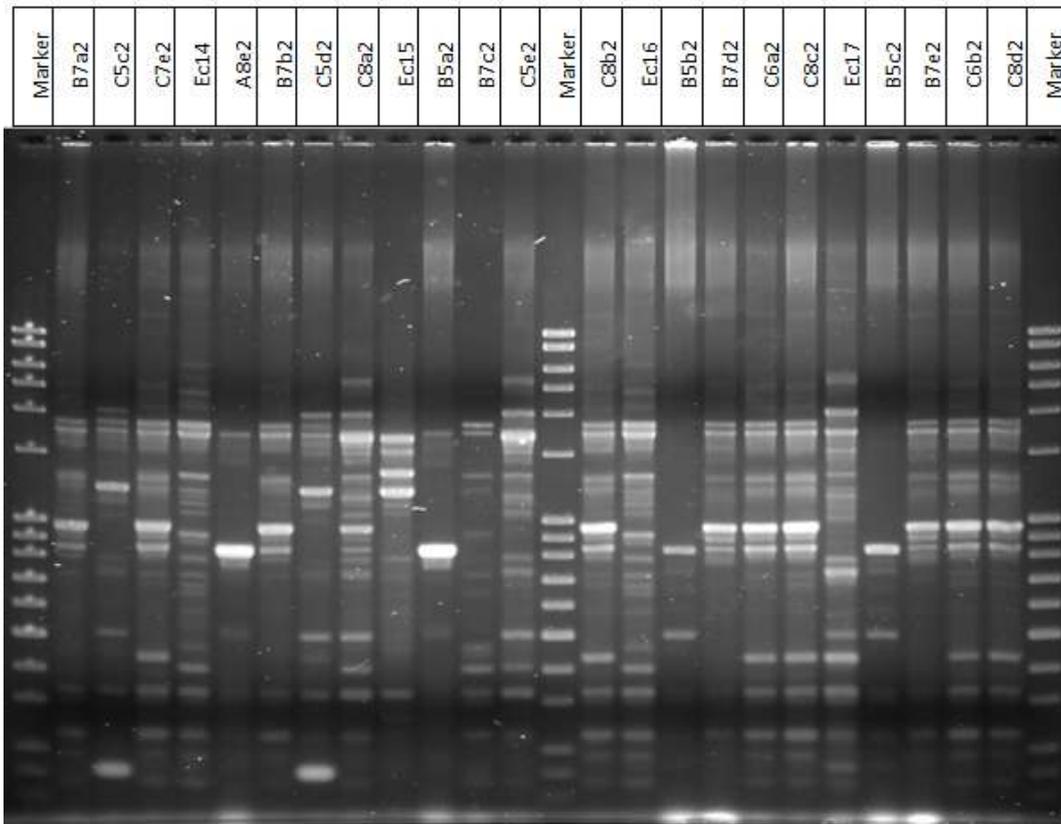


Abbildung 258: Agarosegel - ERIC1R + ERIC2 - B7a2-C8d2

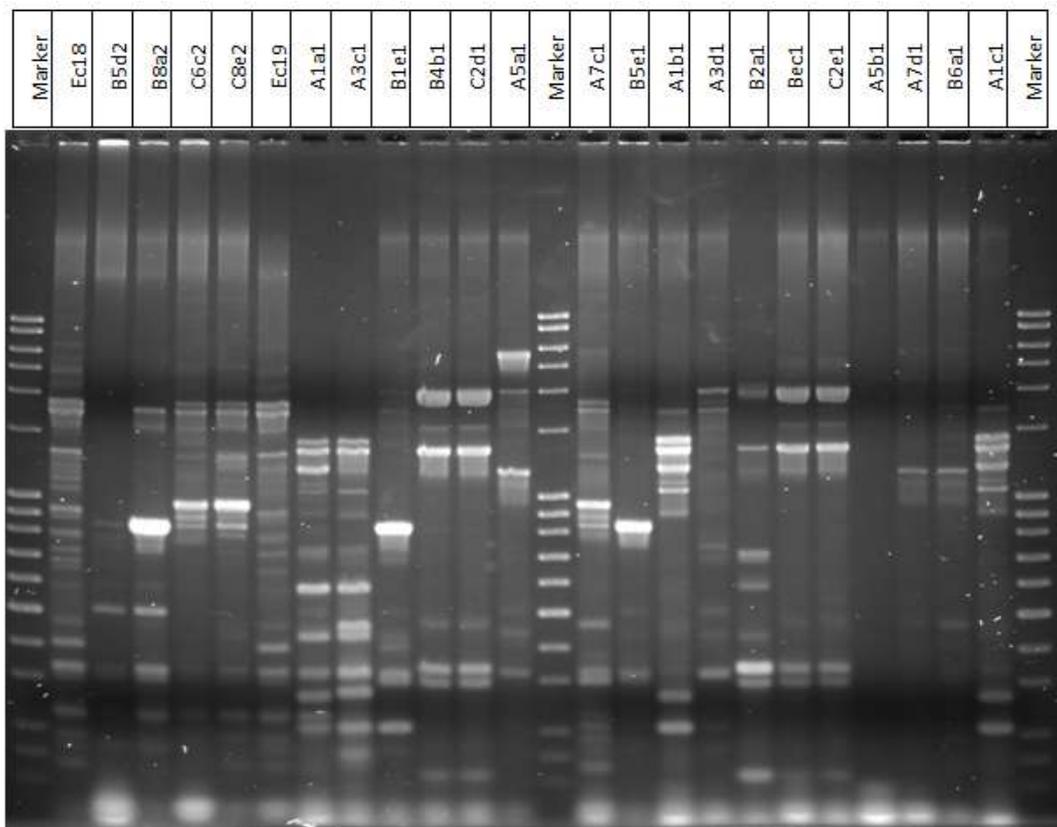


Abbildung 259: Agarosegel - ERIC1R + ERIC2 - Ec18-A1c1

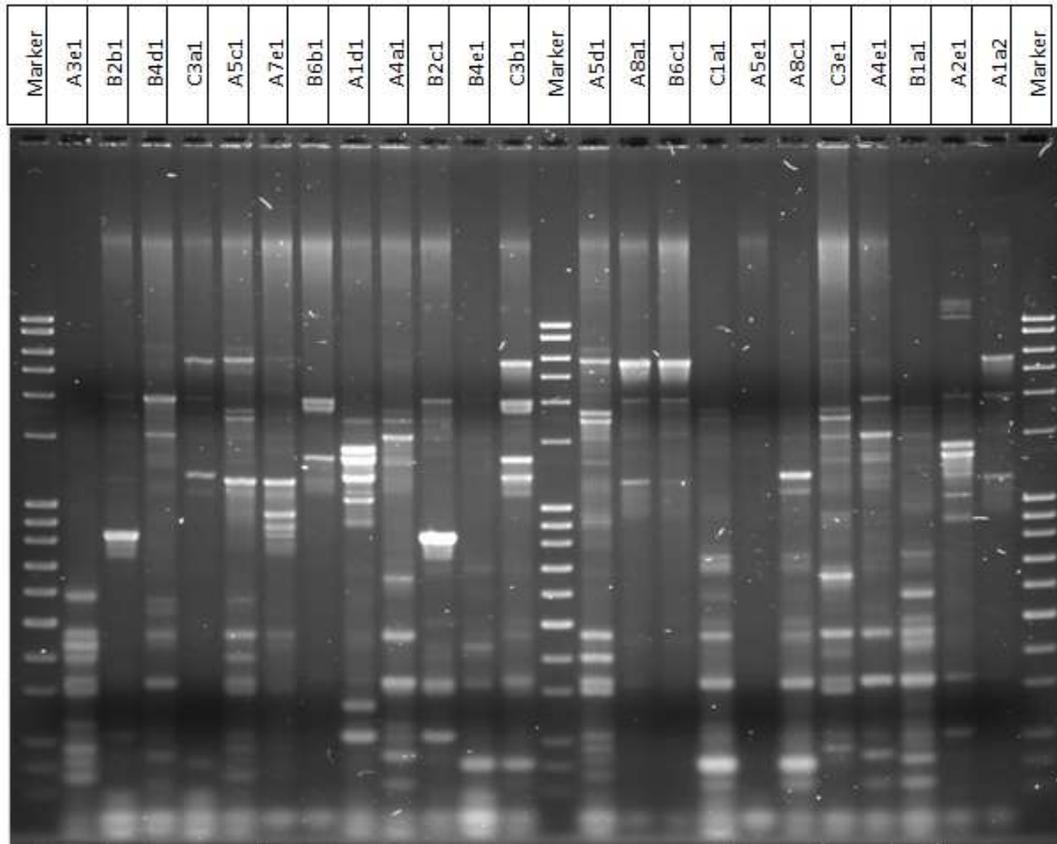


Abbildung 260: Agarosegel - ERIC1R + ERIC2 - A3e1-A1a2

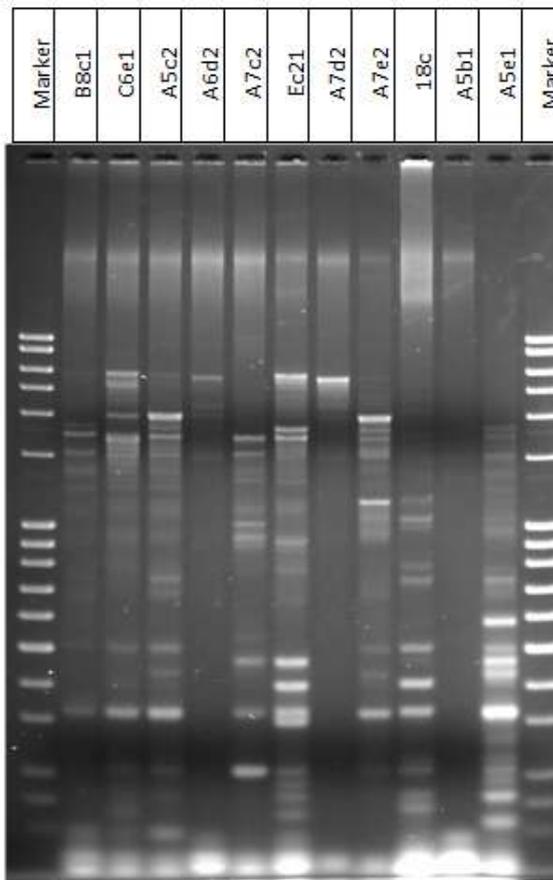


Abbildung 261: Agarosegel - ERIC1R + ERIC2 - B8c1-A5e1

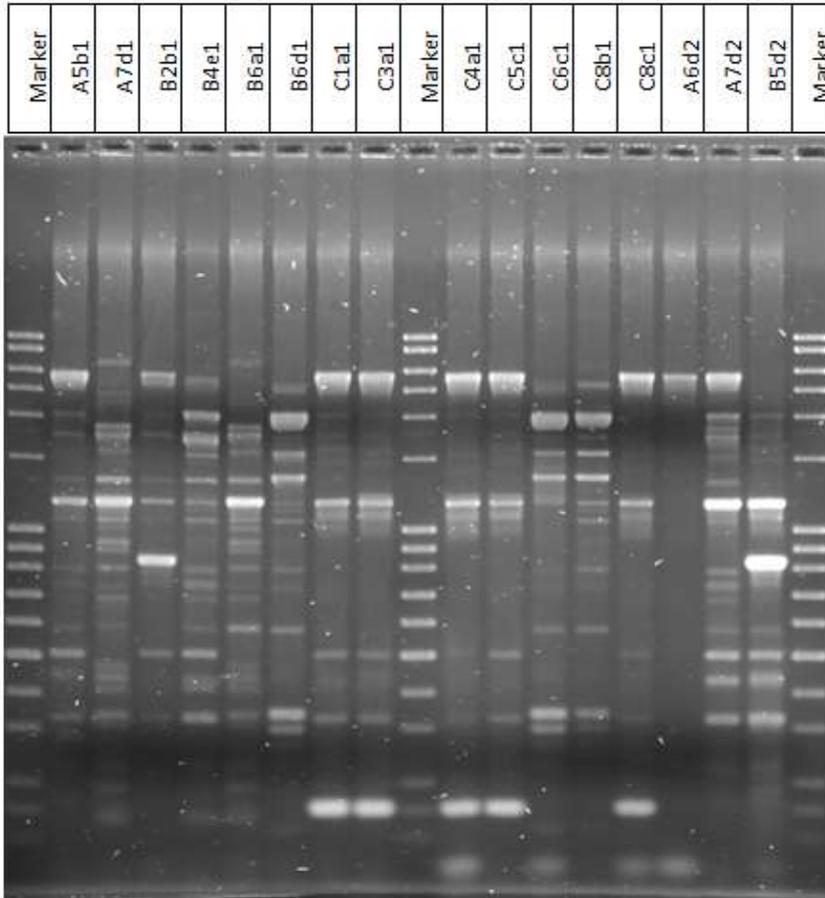


Abbildung 262: Agarosegel - ERIC1R + ERIC2 - A5b1-B5d2