

(Multi-)resistente Pseudomonaden in Lebensmitteln

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

Dr. rer. nat.

Universität Hamburg

Fakultät Mathematik, Informatik, Naturwissenschaften

Fachbereich der Chemie

Institut für Biochemie und Molekularbiologie

&

Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg)

vorgelegt von

Merle Volkmer
(geb. Herrmann)

Hamburg

2023

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Dezember 2019 bis Januar 2022 am Institut für Hygiene und Umwelt der Freien und Hansestadt Hamburg unter der praktischen Leitung von Herrn Dr. Anselm Lehmacher angefertigt und wissenschaftlich von Herrn Prof. Dr. Peter Heisig des Fachbereichs Chemie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Universität Hamburg betreut.

Gutachter der Dissertation: Prof. Dr. Peter Heisig
Dr. Anselm Lehmacher

Gutachter der Disputation: Prof. Dr. Peter Heisig
Prof. Dr. Dipl. Ing. Agnes Weiß
Prof. Dr. Stephan Seifert
Prof. Dr. Sebastian Wicha
Dr. Anselm Lehmacher

Datum der Disputation: 17.11.2023

Datum der Druckfreigabe: 26.11.2023

„If you don't like bacteria you're on the wrong planet.”

Stewart Brandt

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Zusammenfassung	1
2. Abstract	3
3. Einleitung	5
3.1 Pseudomonaden	7
3.2 Resistenzmechanismen in Pseudomonaden	10
3.2.1 Intrinsische Resistenzmechanismen	11
3.2.2 Extrinsische Resistenzmechanismen	11
3.3 Antibiotikagruppen	12
3.3.1 Cefpodoxim	13
3.3.2 Imipenem	13
3.3.3 Ciprofloxacin	14
3.3.4 Netilmicin	15
4. Material und Methoden	17
4.1 Nachweismethoden von Pseudomonaden	17
4.2 Validierung mikrobiologischer Verfahren	17
4.3 Untersuchung von überwiegend verzehrfertigen Lebensmitteln auf (multi-)resistente Pseudomonaden	22
4.4 Bestimmung des Keimgehaltes	23
4.5 MALDI-TOF-MS	23
4.6 Warenkunde der untersuchten Lebensmittelgruppen	24
4.6.1 Hackfleisch	25
4.6.2 Sahne	25
4.6.3 Lachs	27
4.6.4 Weitere Fischarten	27
4.6.4.1 Garnelen	27
4.6.4.2 Thunfisch	27
4.6.4.3 Forelle und Lachsforelle	28
4.6.4.4 Sprotten	28
4.6.5 pflanzliche Lebensmittel: Gemüse und Kräuter	28
4.6.6 weitere Lebensmittelgruppen	30
4.7 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration	30
4.8 Next Generation Sequencing (NGS)	31
4.8.1 PacBio®	32
4.8.2 Illumina MiSeq®	34

4.8.3 DNA-Isolation	35
4.9 Sequenzierung der eigenen Isolate.....	36
4.10 MLST.....	37
4.11 Verwendete Nährmedien.....	37
4.12 Pseudomonaden-Stammsammlung.....	37
4.13 Zielsetzung der Arbeit	37
5. Ergebnisse	39
5.1 Entwicklung und Validierung eines kulturellen Nachweis- und Zählverfahrens für (multi-)resistente Pseudomonaden	39
5.1.1 Anwendungsbereich.....	40
5.1.2 Bestimmung der Inklusivität	43
5.1.3 Bestimmung der Exklusivität.....	46
5.1.4 Bestimmung der Spezifität	48
5.1.5 Bestimmung der Selektivität	49
5.1.6 Bestimmung der Produktivität	50
5.1.7 Bestimmung der Sensitivität	52
5.1.8 Bestimmung des eLOD ₅₀	52
5.1.9 Bestimmung der Falsch-Positiv-Rate.....	54
5.1.10 Bestimmung der Falsch-Negativ-Rate.....	55
5.1.11 Bestimmung der relativen Richtigkeit.....	55
5.1.12 Bestimmung der statistischen Übereinstimmung.....	55
5.2 Untersuchungen von Lebensmitteln auf das Vorkommen (multi-) resistenter Pseudomonaden	55
5.2.1 Qualitative Untersuchung	56
5.2.2 Warengruppe Hackfleisch	61
5.2.3 Warengruppe Sahne	62
5.2.4 Warengruppe Lachs	64
5.2.5 Warengruppe weitere Fischproben	65
5.2.6 Warengruppe pflanzliche Lebensmittel	66
5.2.7 Warengruppe „diverse weitere Lebensmittel“	67
5.3 Quantitative Bestimmungen	69
5.3.1 Hackfleisch.....	69
5.3.2 Sahne	71
5.3.3 Lachs.....	74
5.3.4 weitere Fischproben.....	76
5.3.5 pflanzliche Lebensmittel	78
5.3.6 Diverse weitere Lebensmittel	80

5.4 Bestimmung der minimalen-Hemmkonzentrationen	83
5.5 Ergebnisse des Next Generation Sequencing.....	85
5.5.1 Ergebnisse PacBio® SMRT.....	86
5.5.2 Ergebnisse Illumina MiSeq®	89
5.5.3 Vergleich phänotypische und genotypische Resistenz der 34 <i>Pseudomonas</i> - Lebensmittelisolate	93
5.5.4 Nachweis der einzelnen Resistenzgene	95
5.5.4.1 Aminoglykosidresistenz.....	96
5.5.4.2 β -Laktamasen	96
5.5.4.3 Effluxpumpen	97
5.5.4.4 Vorhandensein von Plasmiden.....	97
5.6 Phylogenetik.....	98
5.6.1 MLST	98
5.6.2 Phylogenetische Stammbäume auf Basis des cgMLST und des SNP.....	100
6. Diskussion.....	107
6.1 Validierung des eigenen kulturellen Nachweis- und Zählverfahren für präsumtiv (multi-)resistente Pseudomonaden	107
6.1.1 Anwendungsbereich.....	108
6.1.2 Inklusivität	109
6.1.3 Exklusivität.....	109
6.1.4 Spezifität und Falsch-Positiv-Rate	110
6.1.5 Selektivität.....	110
6.1.6 Produktivität.....	111
6.1.7 Sensitivität und Falsch-Negativ-Rate.....	111
6.1.8 eLOD ₅₀	111
6.1.9 relative Richtigkeit und Konkordanzindex.....	112
6.2 Vorkommen der isolierten Spezies in den jeweiligen Lebensmitteln	112
6.2.1 Hackfleisch.....	113
6.2.2 Sahne	114
6.2.3 Lachs und weitere Fischproben.....	115
6.2.4 pflanzliche Lebensmittel.....	116
6.2.5 Diverse weitere Lebensmittel.....	117
6.3 Minimale Hemmkonzentration	118
6.4 Next Generation Sequencing.....	121
6.4.1 Nachweis einzelner Resistenzgene.....	121
6.4.2 Phylogenetik und Klone.....	124
6.4.3 Herkunftsfrage.....	128

6.4.4 Vergleich der Ergebnisse des MLST mit der Datenbank PubMLST	130
6.4.5 Antiseptikaresistenzen	132
6.4.6 Zusammenhänge zwischen den <i>mex</i> -Genen und dem Außenmembran-protein OprD	133
6.4.7 Vorkommen von Plasmiden	134
7. Ausblick	136
7.1 Anmerkung der Autorin	138
8. Literatur.....	139
9. Anhang	154
9.1 Chemikalienliste inkl. GHS.....	154
9.2 Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	154
9.3 Verwendete Nährmedien und Reagenzien	156
9.4 Zusammensetzung und Herstellung der Nährmedien	157
9.5 Pseudomonadenstammsammlung	158
9.6 Liste der analysierten Lebensmittel	160
9.7 <i>Pseudomonas</i> -Lebensmittelisolate	172
9.8 Ergebnisse der MHK-Bestimmungen	180
9.9 Verwendete Software	189
9.10 Zusammenfassung Qualitätsparameter der Sequenzierungen	190
10. Abbildungsverzeichnis.....	207
11. Tabellenverzeichnis.....	209
12. Danksagung	211
13. Eidesstaatliche Erklärung	212

Abkürzungsverzeichnis

®	Registriert-Zeichen; eingetragenes Warenzeichen
™	engl.: trademark
ΣKG	Summe der Kolonien aller Petrischalen, die zur Berechnung herangezogen werden
a	Anzahl der bei beiden Methoden positiven Analysenergebnisse
Abb.	Abbildung
Art.	Artikel
ATCC	American Type Culture Collection
a _w -Wert	Wasseraktivität
b	Anzahl der falsch negativen Analysenergebnisse bezüglich der Referenzmethode
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
bzw.	beziehungsweise
c	Anzahl der falsch positiven Analysenergebnisse bezüglich Referenzmethode
ca.	ungefähr (lat.: circa)
CAMHB	Kationen-supplementierte Müller-Hinton Bouillon (engl.: Cation-Adjusted Mueller Hinton Broth)
CCUG	Culture Collection University of Gothenburg
CFC-Agar	Cephalothin-Natriumfusidat-Cetrimid-Agar
cgMLST	engl.: core genome Multi Locus Sequence Typing
CIP	Ciprofloxacin
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
Contigs	Reihe von überlappenden DNA-Sequenzen, die zur Repräsentation einer Genomregion dienen (von engl. contiguous: angrenzend, zusammenhängend)
Coverage	Anzahl der einzelnen Sequenzen, die mit einer definierten Referenzsequenz übereinstimmen (engl.: Abdeckung)
d	Anzahl der bei beiden Methoden negativen Analysenergebnisse
d _n	Faktor der niedrigsten ausgewerteten Verdünnungsstufe
D ₀	Höchste Verdünnung, in log ₁₀ -Einheiten angegeben, die auf einem nicht selektiven Referenzmedium ein Wachstum aufweist
D _s	Höchste Verdünnung, in log ₁₀ -Einheiten angegeben, die auf dem zu prüfenden selektiven Medium ein vergleichbares Wachstum zeigt
DART	Deutsche Antibiotika Resistenzstrategie des Bundesministeriums für Gesundheit
DIN	Deutsches Institut für Normung e.V.
div.	diverse
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: deoxyribonucleic acid)
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
ECOFF	engl.: Epidemiological cut-off value
EG	Europäische Gemeinschaft
eLOD	erwartbare Nachweisgrenze (engl.: estimated Level of Detection)
EN	Europäische Norm
engl.	englisch
ESKAPE	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> und <i>Enterobacter</i> spp.
ESL	engl.: Extended Shelf Life
et al.	und andere (lat.: et alia (Neutrum))
EU	Europäische Union
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
gem.	gemischt
ger.	geräuchert
ggf.	gegebenenfalls

GHS	Global harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien
HCCA	α -Cyano-4-hydroxymethylsäure
IMP	Imipenem
ISO	International Organization for Standardization
Kappa	Konkordanzindex
kW	kein Wachstum
lat.	lateinisch
LMG	Belgian Coordinated Collection of Microorganisms/ Laboratory of Microbiology, Department of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Sciences of Ghent University
MALDI-TOF-MS	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation-Flugzeit-Massenspektrometrie (engl.: Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization- Time of Flight- Mass Spectrometry)
MDR	Mehrfachresistenz (engl.: multi drug resistance)
<i>mex</i>	Multi-Efflux
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MIC	engl.: minimum inhibitory concentration
MLST	Multi Locus Sequence Typing
MPN	wahrscheinlichste Keimzahl (engl.: Most Probable Number)
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
n	Gesamtzahl der Analysenergebnisse
NET	Netilmicin
N _s	die auf dem zu prüfenden Testmedium erhaltene Gesamtzahl von Kolonien
N _o	die auf dem festgelegten Referenzmedium erhaltene Gesamtzahl von Kolonien
n.a.	nicht auswertbar
NCTC	National Collection of Type Cultures, Central Public Health Laboratory
NGS	Next Generation Sequencing
Nr.	Nummer
OD	optische Dichte
OPR	Außenmembranprotein (engl.: outer membrane protein)
P	Produktivität
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
pfl.	pflanzlich
pH	pH-Wert
PubMLST	Datenbank für molekulare Typisierung und mikrobielle Genomvielfalt (engl.: Public Databases for Molecular Typing and Microbial Genome Diversity)
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid)
RND	engl.: Resistance Nodulation Division
S _F	Selektivitätsfaktor in log ₁₀ -Einheiten angegeben
SAS	Schweizerische Akkreditierungsstelle
SMRT	engl.: Single Molecule Real-Time Sequencing
SNP	engl.: Single Nucleotide Polymorphism
spp.	lat.: species pluralis
ST	Sequenztyp
Tab.	Tabelle
TE-Puffer	Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Ethylendiamintetraessigsäure-Puffer
TSA	engl.: Tryptic Soy Agar
TSB	engl.: Tryptic Soy Broth
u. a.	unter anderem

UHT	Ultrahocherhitzung (engl.: ultra-high temperature)
USA	Vereinigte Staaten von Amerika (engl.: United States of America)
UV	Ultraviolett
VIS	visueller Bereich im elektromagnetischen Spektrum
VO	Verordnung
W	Wachstum
WGS	vollständige Genomsequenzierung (engl.: Whole Genome Sequencing)
WHO	World Health Organization

Maßeinheiten und Größen

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
bp	Basenpaar
CFU	koloniebildende Einheit (engl.: Colony Forming Unit)
cm	Zentimeter
<i>g</i>	Fallbeschleunigung in Deutschland 9,81 m/s ²
g	Gramm
h	Stunde (lat.: hora)
KbE	koloniebildende Einheiten
kg	Kilogramm
l	Liter
m/z	Masse/Ladungsverhältnis
Mbp	Megabasenpaare
mg	Milligramm
ml	Milliliter
nm	Nanometer
s	Sekunde
V	Volumen

Gene/ Proteine und ihre Bezeichnungen

AAC	Aminoglykosid-N-Acetyltransferase
<i>acsA</i>	kodiert die Acetyl-Coenzym A-Synthase
AME	Aminoglykosid Modifizierende Enzyme
<i>ampC</i>	kodiert die AmpC- β -Laktamase
ANT	Aminoglykosid- Adenylyltransferase
APH	Aminoglykosid-Phosphotransferase
<i>aph(3')-IIb</i>	kodiert die Aminoglykosid-3'-phosphotransferase
<i>aroE</i>	kodiert die Shikimat-Dehydrogenase
<i>blaOXA₅₀</i>	kodiert ein β -Laktamase-Gen; Oxacillinase
<i>blaOXA₄₈₆</i>	kodiert ein β -Laktamase-Gen; Oxacillinase
<i>blaOXA₈₄₇</i>	kodiert ein β -Laktamase-Gen; Oxacillinase
<i>blaOXA₉₀₄</i>	kodiert ein β -Laktamase-Gen; Oxacillinase
<i>blaPDC₁</i>	kodiert ein β -Laktamase-Gen; Cephalosporinase
<i>blaPDC₃</i>	kodiert ein β -Laktamase-Gen; Cephalosporinase
<i>blaPDC₅</i>	kodiert ein β -Laktamase-Gen; Cephalosporinase
<i>blaPDC₈</i>	kodiert ein β -Laktamase-Gen; Cephalosporinase
<i>blaPDC₁₂₀</i>	kodiert ein β -Laktamase-Gen; Cephalosporinase
<i>catB7</i>	kodiert die Chloramphenicol-Acetyltransferase
<i>cprR</i>	Teil eines Zweikomponenten-Regulationssystems, zusammen mit <i>cprS</i>
<i>cprS</i>	Teil eines Zweikomponenten-Regulationssystems, zusammen mit <i>cprR</i>
<i>crpP</i>	kodiert ein Ciprofloxacin-modifizierendes Protein (Verweis auf Abschnitt 7.1)
ESBL	Extended Spectrum β -Lactamase
<i>fosA</i>	kodiert das Fosfomycin-Resistenzprotein
GES	Guiana Extended-Spectrum
<i>guaA</i>	kodiert eine GMP-Synthase
<i>gyrA</i>	kodiert die A-Untereinheit der Gyrase
<i>gyrB</i>	kodiert die B-Untereinheit der Gyrase
<i>mexA</i>	kodiert das Membranfusionsprotein des MexAB-OprM-Komplexes
<i>mexB</i>	kodiert den Membrantransporter des MexAB-OprM-Efflux-Komplexes
<i>mexC</i>	kodiert das Membranfusionsprotein des MexCD-OprJ-Efflux-Komplexes
<i>mexD</i>	kodiert den Membrantransporter des MexCD-OprJ-Efflux-Komplexes
<i>mexE</i>	kodiert das Membranfusionsprotein des MexEF-OprN-Efflux-Komplexes
<i>mexF</i>	kodiert den Membrantransporter des MexEF-OprN-Efflux-Komplexes
<i>mexX</i>	kodiert das Membranfusionsprotein des MexXY-OprM-Efflux-Komplexes
<i>mexY</i>	kodiert den Membrantransporter des MexXY-OprM-Efflux-Komplexes
<i>mutL</i>	kodiert ein DNA-Reperaturprotein
<i>nuoD</i>	kodiert die NADH-Dehydrogenase I, Kette C, D
OprD	Außenmembranprotein
OprJ	Außenmembranprotein des MexCD-OprJ-Efflux-Komplexes
OprM	Außenmembranprotein des MexAB-OprM- bzw. MexXY-OprM-Efflux-Komplexes
OprN	Außenmembranprotein des MexEF-OprN-Efflux-Komplexes
OXA	Oxacillinase
PEL	Pektat-Lyase
PER	<i>Pseudomonas</i> Extended-Resistance
PME	Pektin-Methylesterase
<i>ppsA</i>	kodiert die Phosphoenolpyruvat-Synthase
<i>trpE</i>	kodiert die Anthranilat-Synthase Komponente 1
<i>ttgA</i>	kodiert eine Putative Effluxpumpe
<i>ttgB</i>	kodiert eine Putative Effluxpumpe
VEB	Vietnamesische Extended-Spectrum Beta-Lactamase

1. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit hatte als Ziel neue Erkenntnisse zum Vorkommen (multi-)resistenter Pseudomonaden in handelsüblichen, überwiegend roh verzehrbaren, Lebensmitteln zu gewinnen. Hierzu wurde ein kulturelles Nachweis- und Zählverfahren entwickelt. Mit diesem Verfahren werden nur (multi-)resistente Pseudomonaden erfasst, was eine Unterscheidung zu dem bisher bekannten Verfahren der DIN EN ISO **13720:2010-12** für die Zählung von präsumtiven Pseudomonaden in Fleisch- und Fleischerzeugnissen darstellt. Der Anwendungsbereich konnte mittels Validierung für einen horizontalen Bereich bestätigt werden, sodass das in dieser Arbeit beschriebene Verfahren für jede Lebensmittelmatrix genutzt werden kann. Zudem zeichnet sich dieses kulturelle Nachweis- und Zählverfahren durch eine Inklusivität von 100 % sowie Exklusivität von 73 % aus: Unterschiedliche Spezies der Gattung *Pseudomonas* zeigen ein gutes Wachstum wohingegen grampositive Bakterien, Hefen und Schimmelpilze und die meisten gramnegativen Bakterien in ihrem Wachstum unterdrückt werden. Für die Spezifität und Sensitivität wurde jeweils ein Wert von 100 % bestimmt. Die Falsch-Negativ- und die Falsch-Positiv-Rate betragen folglich 0 %. Für die relative Richtigkeit konnte ein Wert von 100 % bestimmt werden. Die Produktivität lag zwischen 0,5 und 2 und der Selektivitätsfaktor betrug 7. Für den eLOD₅₀ wurden je nach Lebensmittelkategorie Werte zwischen 0,6 KbE/25 g und 1,7 KbE/25 g ermittelt. Die Anforderungen der DIN EN ISO **11133:2020-10**, DIN EN ISO **16140-2:2016-11** sowie DIN EN ISO **16140-3:2021-06** werden somit ganzheitlich erfüllt.

Zusammenfassend wurde das hier beschriebene Verfahren für die Untersuchung von 184 handelsüblichen Lebensmittelproben genutzt. Diese setzten sich aus den Warengruppen Fleisch, Fisch, Milchprodukte und pflanzliche Lebensmittel zusammen. Bezogen wurden alle Lebensmittel aus diversen Supermärkten in Schleswig-Holstein und Hamburg oder in Zusammenarbeit mit den Lebensmittelkontrolleuren und dem Institut für Hygiene und Umwelt aus unterschiedlichen Restaurants und Eiscafés der Stadt Hamburg. Dabei wurden aus der Hälfte der untersuchten Proben (92 Proben, entspricht 50 %) Pseudomonaden gewonnen. Insgesamt gelang es aus den genannten 92 Proben 211 präsumtiv (multi-)resistente Pseudomonaden nachzuweisen und zu isolieren. Dabei zeigten die Warengruppen rohes Hackfleisch und pflanzliche Lebensmittel mit teilweise mehr als 1000 KbE/g die höchsten quantitativen Keimgehalte. Werden die Ergebnisse der qualitativen Speziesbestimmungen betrachtet, wurde die Spezies *P. fulva* mit 68 von 211 Isolaten (entspricht 32 %) am häufigsten isoliert. Gefolgt von *P. aeruginosa* mit 32 Isolaten (entspricht 15%) und *P. putida* mit 26 Isolaten (entspricht 12 %). Zusammengefasst wurden 22 unterschiedliche Pseudomonaden-Spezies nachgewiesen. Hinsichtlich der einzelnen untersuchten Lebensmittelwarengruppen zeigten sich zudem, in Bezug auf den Anteil der Proben aus denen die

jeweiligen Spezies isoliert wurden, deutliche Unterschiede: In der Warengruppe Hackfleisch wurde die Spezies *P. fragi* mit einem Anteil von 18 % aus den meisten Proben gewonnen. In den Warengruppen Sahne und Lachs war es die Spezies *P. fulva* mit 17 % bzw. 16 %. *P. koreensis* wurde in den untersuchten pflanzlichen Lebensmitteln in 18 % und in der Kategorie „diverse weitere Lebensmittel“ in 13 % der untersuchten Proben nachgewiesen. Bei den untersuchten weiteren Fischproben (ohne Lachs) konnte *P. putida* mit 18 % der Proben am häufigsten isoliert werden.

Alle 211 Isolate sowie 26 Isolate einer für diese Arbeit zur Verfügung gestellten Sammlung aus weiteren Pseudomonaden wurden hinsichtlich ihrer minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) untersucht. Es wurden die Antibiotika Imipenem, Ciprofloxacin und Netilmicin gewählt. Diese waren bereits Teil der Nährmedien des kulturellen Nachweis- und Zählverfahrens und decken die Antibiotikagruppen Carbapeneme, Fluorchinolone und Aminoglykoside ab. Dadurch wurden MHKs einer großen Bandbreite von Pseudomonaden bestimmt, insbesondere aus Lebensmitteln. Die Stämme der Spezies *P. aeruginosa*, der *P. fluorescens*-Gruppe und ein Isolat der Spezies *P. putida* wiesen MHKs auf, welche den jeweiligen ECOFFs entsprachen bzw. über diesen Werten lagen. In der Warengruppe Hackfleisch waren die resistenten Pseudomonaden am häufigsten nachzuweisen.

Zur Sequenzanalyse der möglichen Resistenztypen und der Klonalität der Stämme, wurden alle 33 Isolate der Spezies *P. aeruginosa* und das resistente Isolat der Spezies *P. putida* dem Next Generation Sequencing unterworfen. Für zehn *P. aeruginosa* Isolate wurde das Gerät der Firma PacBio® für die Sequenzierung genutzt, die übrigen 23 Isolate der Spezies *P. aeruginosa* sowie das eine *P. putida*-Isolat wurden mit Hilfe des Gerätes MiSeq® der Firma Illumina® analysiert. Hierbei konnten auf Grundlage der Sequenzanalyseprogramme Bakcharak (Version 2.0), MultiQC (Version 1.9) und ABRicate (Version 1.0.1) die Resistenzgene ausgewertet werden. Es zeigten sich Gene, welche für die Resistenzen gegenüber Imipenem (Gruppe der Carbapeneme), Ciprofloxacin (Gruppe der Fluorchinolone) und Netilmicin (Gruppe der Aminoglykoside) verantwortlich sind. Die drei Resistenztypen traten jedoch nicht immer gleichzeitig bei den Isolaten auf. Mit Hilfe der durch MLST bestimmten Sequenztypen wurden Cluster eng verwandter Stämme ermittelt, insbesondere solcher aus denselben Lebensmittelproben oder aus demselben Betrieb. Zudem wurden durch weitere phylogenetische Sequenzanalyseprogramme Stammbäume auf Basis des cgMLST und der SNPs sowie Distanzmatrices erstellt und die engen Verwandtschaftsverhältnisse der Cluster bestätigt. Die Nukleotiddifferenzen lagen innerhalb der Cluster bei 0 bis 6.

2. Abstract

The aim of the present work was to gain new insights into the occurrence of (multi-)resistant pseudomonads in commercially available food. The focus was on samples which can be consumed mostly raw. For this purpose, a cultural detection and enumeration method was developed. Only presumptively (multi-)resistant pseudomonads are detected with this method, which is a difference to the previously known method DIN EN ISO **13720:2010-12** for counting pseudomonads in meat and meat products. The scope of application could be confirmed by horizontal validation. Therefore, the method can be used for any food matrix. In addition, the method described in this work is characterized by an inclusivity of 100 % and an exclusivity of 73 %. Different species of pseudomonads show good growth, whereas gram-positive bacteria, yeasts and mold as well as most gram-negative bacteria are suppressed in their growth. For the specificity and sensitivity, a value of 100 % was determined. In conclusion the false negative and false positive rates were 0 %. The relative accuracy was 100 %. The productivity lay between 0,5 and 2 and the selectivity factor was 7. Values between 0,6 CFU/25 g and 1,7 CFU/25 g were determined for the eLOD₅₀. The criteria of DIN EN ISO **11133:2020-10**, DIN EN ISO **16140-2:2016-11** and DIN EN ISO **16140-3:2021-06** are therefore fully met.

In summary the developed method was used to examine 184 food samples at consumer level. These consisted of the product groups: meat, fish, dairy products and plant-based foods. All food samples were obtained from various supermarkets in Schleswig-Holstein and Hamburg or (in cooperation with the food inspectors and the Institute for Hygiene and the Environment) from various restaurants and ice cream parlours in the city of Hamburg. Presumptively (multi-)resistant pseudomonads were detected and isolated from half of the samples (92 samples, corresponding to 50 %). A total of 211 presumptively (multi-)resistant pseudomonads were detected and isolated from the 92 samples mentioned. The raw ground meat and plant-based food product groups showed the highest numbers of the samples examined (up to 1000 CFU/g). From a qualitative point of view, the species *P. fulva* was isolated most frequently with 68 out of 211 isolates (corresponding to 32 %), followed by *P. aeruginosa* with 32 isolates (corresponds to 15 %) and *P. putida* with 26 isolates (corresponds to 12 %). In total, 22 different pseudomonad-species were detected. With regard to the individual food product groups examined, there were also distinct differences in the proportion of samples from which the respective species were isolated: In the ground meat samples, the species *P. fragi* was isolated from most samples (corresponds to 18 %). In the cream and salmon product groups, it was the species *P. fulva* with 17 % and 16 %. *P. koreensis* was detected in most plant-based samples (corresponds to 18 %) and various other foods (13 %) tested. In the additional fish samples (without salmon) the species *P. putida* could be isolated from 18 % of samples.

All 211 isolates and 26 isolates from a collection of other pseudomonads considered for this work were examined for their minimum inhibitory concentrations (MIC). The antibiotics imipenem, ciprofloxacin and netilmicin were chosen. The antibiotics mentioned were already ingredients of the culture media of the culture detection and enumeration procedure and cover the antibiotic groups carbapenems, fluoroquinolones and aminoglycosides. This enabled the determination of MICs of a broad spectrum of pseudomonads, especially from food. The strains of the species *P. aeruginosa*, the *P. fluorescens*-group and one isolate of the species *P. putida* showed MICs which corresponded or exceeded the respective ECOFF.

For the sequence analysis of the potential resistance gene types and the clonality of the strains, all 33 isolates of the *P. aeruginosa* species and the resistant isolate of the *P. putida* species were subjected to Next Generation Sequencing. For ten *P. aeruginosa* isolates the PacBio® device was used for sequencing. The remaining 23 isolates of the species *P. aeruginosa* and the resistant *P. putida* isolate were analysed using the MiSeq® device from Illumina®. The resistance gene types were determined on the basis of the sequence analysis programs Bakcharak (version 2.0), MultiQC (version 1.9) and ABRicate (version 1.0.1). Genes responsible for resistance to imipenem (carbapenem group), ciprofloxacin (fluoroquinolone group) and netilmicin (aminoglycoside group) were detected. The three types of resistance did not always occur simultaneously in the isolates.

Using the sequence types determined by MLST, clusters of closely related strains were identified, especially those from the same food samples or from the same company. In addition, phylogenetic trees based on cgMLST and SNPs as well as distance matrices were constructed by further phylogenetic sequence analysis software and the close relationships of the clusters were confirmed. The nucleotide differences within the clusters ranged from 0 to 6.

3. Einleitung

Antibiotikaresistenzen haben in den letzten Jahren global immer mehr an Bedeutung gewonnen [Wieler et Broich, **2018**]. So wurden weltweit ca. 4,95 Millionen Todesfälle allein für das Jahr 2019 auf antibiotikaresistente Mikroorganismen zurückgeführt [Murray et al., **2022**]. Bezogen auf die EU liegt die Zahl Schätzungen zufolge für das Jahr 2015 bei 33110 Todesfällen [Cassini et al., **2019**]. Krankheitserreger, die aus der Umwelt oder von Nutztieren stammen, finden laut Literaturangaben immer mehr Einzug in die Nahrungsmittelkette des Menschen [Wang et al., **2012**]. Besonderer Aufmerksamkeit bedürfen dabei die so genannten „ESKAPE“-Erreger. Dieser Begriff steht für die Mikroorganismen *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterobacter* spp.. Die aufgezählten Bakterien zeichnen sich dadurch aus, dass sie der bioziden Wirkung diverser Antibiotika „entkommen“ können [Pendleton et al., **2013**]. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit einem dieser „ESKAPE“-Erreger und der ihm zugehörigen Gattung: Den Pseudomonaden.

Bei Pseudomonaden handelt es sich um eine Gruppe verschiedener Bakterienspezies, die über eine Vielzahl von Resistenzmechanismen verfügen [Madigan et al., **2013**]. Bedingt durch die Tatsache, dass es sich bei diesen gramnegativen Mikroorganismen um ubiquitäre Bakterien handelt, ist ein Vorkommen in Böden, Wasser, in und auf Pflanzen sowie Tieren möglich [BfR, **2011**]. Somit kann auch die Aufnahme von Pseudomonaden durch den Verzehr von Lebensmitteln erfolgen. Die Übertragung von resistenten Bakterien auf den Menschen aufgrund des Konsums von Lebensmitteln wurde zudem schon für andere Mikroorganismen beobachtet und nimmt für diverse Erreger seit den 1990er Jahren stetig zu [Threlfall et al., **2000**; Tenhagen et al., **2018**]. Dies betrifft u. a. MRSA sowie multiresistente *Enterobacteriaceae* mit ESBL- und AmpC-Resistenzen [Reich et Klein, **2013**; Sergelidis et Angelidis, **2017**]. Das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) bewertet dabei vor allem die Aufnahme von ESBL-bildenden Bakterien über Lebensmittel als kritisch, da dies zu Behandlungsschwierigkeiten von Patienten führen kann [BfR, **2015**].

Von größter Bedeutung unter den Pseudomonaden, insbesondere in der Klinik, ist die Spezies *P. aeruginosa*, die sich durch bestimmte Krankheitsbilder, wie beispielsweise Harnwegsinfektionen und blau-eitrige Wunden auszeichnet [Al-Grawi et al., **2012**; Moradali et al., **2017**]. In den USA sind bereits 13 % der durch *P. aeruginosa* verursachten Infektionen auf multiresistente Stämme zurückzuführen, die Tendenz ist dabei steigend [Moradali et al., **2017**]. Für das Jahr 2015 wurden EU-weit 4155 Todesfälle auf Carbapenem-resistente, 572 auf multiresistente sowie 84,5 Todesfälle auf Colistin-resistente *P. aeruginosa* zurückgeführt [Cassini et al., **2019**]. Die WHO hat zudem Carbapenem-resistente *P. aeruginosa*-Stämme als eine von drei Bakterienspezies klassifiziert, bei der es eine kritische Notwendigkeit für die Entwicklung von neuen Antibiotika

gibt [Pang et al., **2019**]. Jedoch stehen auch andere Spezies der Gattung *Pseudomonas* im Fokus, wie beispielsweise *P. syringae* und *P. fulva*, die laut Studien ebenfalls als Pathogene für Pflanzen, Tiere und Menschen fungieren können [Almuzara et al., **2010**; Eissa et al., **2014**; Andreani et Fasolato, **2017**]. Des Weiteren zeichnen sich Pseudomonaden vielfach als bedeutende Lebensmittelverderber aus [Raposo et al., **2017**]. Dabei kann es unter anderem zu Verfärbungen der Lebensmittel aufgrund von Pigmentbildung, einem veränderten Geruch oder dem so genannten „off-flavour“, also Geschmacksveränderungen, kommen [Krämer, **2017**; Castañeda-Tamez et al., **2018**; Freund et al., **2018**]. Darüber hinaus spielt *P. aeruginosa* auch als Enteritiserreger eine Rolle. So wird von Übertragungen über Lebensmittel auf Kinder und zum Teil immunsupprimierte Menschen berichtet [Chuang et al., **2017**].

3.1 Pseudomonaden

Pseudomonaden sind morpho- und physiologisch gramnegative, aerob wachsende, bewegliche, polar mono- oder polytrich begeißelte Stäbchenbakterien [Frank, **1990**]. Sie bilden keine Sporen [Palleroni, **2010**]. Die Größe liegt in der Regel zwischen 0,5 und 1,0 µm. Sowohl im Katalase- als auch im Oxidase-Test zeigen die genannten Bakterien positive Reaktionen [Andreani et Fasolato, **2017**].

Mit Stand von Januar 2020 sind mehr als 220 unterschiedliche Spezies bekannt, welche zur Gattung der Pseudomonaden gezählt werden [Lalucat et al., **2020**]. Hierzu zählen u. a. *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida* und *P. fulva*. Dabei werden die Spezies basierend auf phylogenetischen DNA-Sequenzanalysen und verschiedener physiologischer und weiterer phänotypischer Merkmale definiert [Madigan et al., **2013**; Lalucat et al., **2020**]. Die Mitglieder der Gattung *Pseudomonas* zeigen allgemein geringe Ansprüche an ihre Umwelt und können nahezu in jedem Milieu wachsen. Das Vorkommen ist somit ubiquitär, sodass der Nachweis von Pseudomonaden schon in (Trink-)Wasser, Böden, auf Pflanzen und Tieren erfolgte. Zudem sind die Bakterien saprotroph, sodass sie auch von abgestorbenem organischem Material leben können [BfR, **2011**]. Die Fähigkeit Gas aus Glucose zu bilden ist nicht vorhanden, jedoch gelingt das Wachstum bei manchen Stämmen auch unter anoxischen Bedingungen in Anwesenheit von Nitrat, Fumarat oder anderen Elektronenakzeptoren statt Sauerstoff [Andreani et Fasolato, **2017**]. Einige Spezies nutzen zudem die Siderophore Pyoverdin und Pyochelin, um Eisen aus der Umgebung zu gewinnen. Dieses wird von den Bakterien für diverse zelluläre Vorgänge, wie die Energieproduktion, den Elektronentransport oder die DNA-Replikation benötigt [Pang et al., **2019**]. Da Pseudomonaden begeißelt sind, ist es ihnen möglich sich aktiv zu bewegen und auch zu schwärmen. Das Schwärmverhalten kann durch eine Verringerung von Stickstoff oder durch bestimmte Aminosäuren verstärkt werden [Overhage et al., **2008**].

Pseudomonaden zählen zu den mesophilen Bakterien und weisen ein Wachstumsoptimum zwischen +25 °C und +35 °C auf. Die meisten Vertreter der Gattung sind jedoch tendenziell psychrotroph und wachsen bei Kühltemperaturen zwischen +4 °C und +7 °C [Andreani et Fasolato, **2017**]. Diese Fähigkeit sich an niedrige Temperaturen anzupassen lässt sich u. a. mit der hohen Anzahl ungesättigter Lipide in der Zellmembran begründen. Zudem weisen die gramnegativen Bakterien eine Vielzahl weiterer Mechanismen (wie zum Beispiel Proteasen mit niedrigem Temperaturoptimum) auf, die ihnen die verstärkte Kältepersistenz ermöglichen [Moreno et Rojo, **2014**]. Die Toleranz gegenüber hohen Temperaturen ist dabei nur eingeschränkt

vorhanden. Das pH-Optimum der Pseudomonaden liegt bei 5,8. Niedrigere pH-Werte führen hingegen zu einem verminderten Wachstum [Hoshino et al., **1997**; Andreani et Fasolato, **2017**].

Das Genom von *P. aeruginosa* ist bereits vollständig sequenziert und zeichnet sich im Vergleich zu anderen Genomgrößen weiterer Bakterienarten durch seine hohe Zahl an Basenpaaren von bis zu 6,3 Mbp aus [Stover et al. **2000**].

Im Bereich der Umwelt spielen Pseudomonaden eine große Rolle, da sie Verbindungen geringen Molekulargewichts abbauen können. Diese entstehen üblicherweise beim Abbau von tierischem oder pflanzlichem Material in Sauerstoff enthaltender Umgebung. Zudem sind die gramnegativen Bakterien in der Lage viele xenobiotische Verbindungen zu katabolisieren. Hierzu gehören unter anderem Pestizide sowie weitere toxische Chemikalien. Für die Sanierung der Umwelt sind Pseudomonaden folglich unerlässlich [Madigan et al., **2013**].

Einige Spezies der Pseudomonaden sind nachgewiesenermaßen tierpathogen- insbesondere gegenüber Fischen und Vögeln: *P. anguilliseptica*, *P. chlororaphis* sowie *P. aeruginosa* sind hier zu nennen. Zu den pflanzenpathogenen Spezies zählen zudem *P. syringae*, *P. savastanoi* und *P. pseudoalcaligenes* [Eissa et al., **2014**; Andreani et Fasolato, **2017**].

Die Gruppe der Pseudomonaden beinhaltet zudem einige humanpathogene Vertreter. Hierzu zählen u. a. *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. acidovorans*, *P. paucimobilis* und insbesondere *P. aeruginosa* [Andreani et Fasolato, **2017**]. *P. aeruginosa* ist einer der bedeutendsten opportunistischen Krankheitserreger des Menschen. So gilt *P. aeruginosa* als wichtige Ursache bei lebensbedrohlichen Blutinfektionen (Sepsis). Insbesondere bereits immungeschwächte Personen sind hier gefährdet [Al- Grawi et al., **2012**]. Allgemein führen nosokomiale Infektionen, ausgelöst durch *P. aeruginosa*, zu hohen Mortalitätsraten in Krankenhäusern vor allem, da die Multiresistenzen dieser Spezies weiter zunehmen [Moosavian et Rahimzadeh, **2015**; Moradali et al., **2017**]. Es werden außerdem mit steigender Tendenz panresistente *P. aeruginosa*-Stämme im Umfeld von Krankenhäusern beschrieben, welche nur noch mit Colistin therapierbar sind [Poole, **2011**]. Des Weiteren ist *P. aeruginosa* in der Lage beim Menschen diverse weitere Infektionen hervorzurufen: Blau-eitrige Wundinfektionen der Haut (hauptsächlich nach Verbrennungen), Befall der Harnwege oder Lunge und Infektionen der Augen gehören dazu. Auch Operationen und Transplantationen können, je nach äußeren Umständen des behandelnden Krankenhauses, ein hohes Risiko für eine Infektion mit *P. aeruginosa* darstellen. Dies ist hauptsächlich durch die Tatsache bedingt, dass Pseudomonaden u. a. auch medizinische Geräte (z. B. Katheter und Schläuche) besiedeln können und es so zu einer Infektion innerhalb des Körpers kommen kann [Moradali et al., **2017**]. Das sogenannte „swimmer’s ear“, eine Mittelohrentzündung

bedingt durch den Kontakt von Badewasser mit dem Gehörgang, gehört ebenfalls zu den durch Pseudomonaden verursachten Erkrankungen [Reid et Porter, **1981**; Wang et al. **2005**]. Auch das Auftreten von Hautausschlägen nach Nutzung von mit *P. aeruginosa* kontaminierten Badestätten wurden bereits beschrieben [Washburn et al., **1976**]. Ebenfalls berichtet wurde von einem durch *P. fulva* ausgelösten Fall von Meningitis [Almuzara et al., **2010**]. In den meisten Fällen tödlich verläuft zudem eine Infektion mit *P. aeruginosa* bei an cystischer Fibrose (Mukoviszidose) erkrankten Personen, die mit einer zunehmenden Verschleimung der Lunge und Tod durch Ersticken endet [Pang et al., **2019**]. Da die gramnegativen Bakterien der Gattung *Pseudomonas* sich zudem durch eine hohe Antibiotikaresistenz auszeichnen, ist die Behandlung (insbesondere von *P. aeruginosa*) mit Antibiotika zunehmend mit Schwierigkeiten verbunden. Auch die Resistenz gegenüber diversen Desinfektionsmitteln ist ansteigend [Stover et al., **2000**; Lambert, **2002**]. Pseudomonaden sind außerdem in der Lage Biofilme zu bilden, was ihre Bekämpfung zusätzlich erschwert [Scales et al., **2014**].

Die Pseudomonaden spielen allerdings nicht nur im Bereich von Infektionen in Menschen, Tieren und Pflanzen eine wichtige Rolle, sondern auch in Lebensmitteln: So stellen die Mitglieder der Gattung *Pseudomonas* wichtige Verderbnisbakterien in Nahrungsmitteln dar. Hierbei sind der Verderb von (gefrorenen) Fisch-, Fleisch- und Milchprodukten hervorzuheben [Rajmohan et al., **2002**]. Dies liegt überwiegend in der Tatsache begründet, dass Pseudomonaden eine Reihe von Lipasen und Proteasen sezernieren, mit Hilfe derer die Hydrolyse fett- und proteinreicher Lebensmittel möglich ist [Dogan et Boor, **2003**]. Die Anwesenheit von *P. fluorescens* in Rahm und Butter kann so zum Beispiel zur Ranzigkeit führen [Frank, **1990**]. Aber auch die Fähigkeit der Pseudomonaden bei +4 bis +7 °C, also Temperaturen, die üblicherweise für die Kühlung von Lebensmitteln verwendet werden, optimal zu wachsen, macht sie zu häufigen Verderbnisbakterien. Dies gilt insbesondere für Nahrungsmittel, die zu der Kategorie „extended shelf life“ (ESL) zählen und länger gelagert werden [Nyati, **2000**; Reichler et al., **2018**]. Einige Lipasen und Proteasen können jedoch die hohen Temperaturen, die zum Beispiel während der Pasteurisation von Milchprodukten erreicht werden, unbeschadet überleben, sodass auch der Verderb von erhitzter Milch bzw. erhitzten Milcherzeugnissen durch diese Pseudomonaden-Enzyme möglich ist [Andreani et Fasolato, **2017**]. Neben einer verringerten Haltbarkeit der Lebensmittel, bewirkt das Vorhandensein von Pseudomonaden und der damit einhergehende Verderb der Nahrungsmittel weitere unerwünschte Effekte: Der Verdau des Caseins in Milch durch Proteasen führt so zum Beispiel zu einem bitteren Geschmack, einer Gelierung sowie der Verklumpung der Milch [Dogan et Boor, **2003**; De Jonghe et al., **2011**]. Der Verderb von Fleisch und Fleischerzeugnissen durch Pseudomonaden wird häufig durch eine schleimige, schmierige Oberfläche der Produkte sichtbar [Krämer, **2017**]. Beim Verzehr von mit Pseudomonaden

kontaminierten Lebensmitteln kann zudem- je nach vorliegendem Keimgehalt- auch in anderen Lebensmitteln ein bitterer Geschmack wahrgenommen werden [Freund et al., **2018**]. Jedoch wurde auch schon von einem fruchtigen off-flavour in pasteurisierter Milch, bedingt durch *P. putida*, berichtet [Whitfield et al., **2000**]. Des Weiteren weisen die Stämme der Spezies *P. aeruginosa* die Fähigkeit auf einen wasserlöslichen blaugrünen Farbstoff zu synthetisieren: Das Pyocyanin. Dies führt zu einer optischen Verfärbung der Lebensmittel und ist unerwünscht. Üblicherweise wird dieses Pigment von den Pseudomonaden in Stresssituationen gebildet [Castañeda-Tamez et al., **2018**]. Aber auch in verzehrfertigem Gemüse herrschen für die gramnegativen Bakterien der Gattung *Pseudomonas* aufgrund der Fähigkeit Pektine abzubauen optimale Wachstumsbedingungen. In der Literatur wird vor allem der Nachweis von *P. fluorescens*, *P. putida* und *P. chichorii* in wenig oder unverarbeitetem Gemüse beschrieben [Andreani et Fasolato, **2017**].

Neben dem Lebensmittelverderb durch *Pseudomonas* spp. wurden auch mehrfach Fälle von durch *P. aeruginosa* ausgelöster Diarrhö publiziert [Hunter et Ensign, **1947**; Adlard et al., **1998**; Chuang et al., **2017**]. Obwohl *P. aeruginosa*-Stämme den gesamten Gastrointestinaltrakt besiedeln können, wird der Anwesenheit dieser Spezies im Stuhl in einigen Studien kaum klinische Relevanz zugesprochen. So beträgt der nachgewiesene Anteil von *P. aeruginosa* im Stuhl bei gesunden Kindern ca. 2 %, bei hospitalisierten Personen ungefähr 1 % [Chuang et al., **2017**]. Im Gegensatz dazu stehen jedoch mehrere Studien, die von Fällen durch *P. aeruginosa*-assoziiertes Diarrhö berichten. Als prädisponierender Faktor für eine durch *P. aeruginosa* ausgelöste Diarrhö gilt vor allem das Alter: So wurde neben dem Vorkommen in Neugeborenen und Kindern ebenfalls von Fällen bei Menschen mit einem Alter über 60 berichtet [Hunter et Ensign, **1947**; Adlard et al., **1998**; Chuang et al., **2017**]. Auch eine Immunschwäche scheint die gastrointestinale Vermehrung von *P. aeruginosa* zu begünstigen [Adlard et al., **1998**]. Zudem wurde beobachtet, dass es bei längerer Einnahme von Antibiotika ebenfalls zu Diarrhö, ausgelöst durch die orale Aufnahme von Lebensmitteln, welche *P. aeruginosa* enthalten, in zuvor gesunden Menschen kommen kann [Hoff et al., **2020**]. Das so genannte „Shanghai-Fieber“, welches mit Diarrhö, Fieber, Sepsis und multiplem Organversagen einhergehen und tödlich enden kann, ist ebenfalls auf eine Infektion mit *P. aeruginosa* zurückführbar. Das Auftreten wurde bereits in zuvor gesunden Kindern beschrieben [Halder et al., **2015**; Chuang et al., **2017**].

3.2 Resistenzmechanismen in Pseudomonaden

Pseudomonaden zeichnet das Vorhandensein diverser, unterschiedlicher Resistenzmechanismen aus. Diese sind sowohl intrinsischer als auch extrinsischer Natur [Antão et Wagner-Ahlf, **2018**].

3.2.1 Intrinsische Resistenzmechanismen

Bei den intrinsischen Resistenzmechanismen handelt es sich überwiegend um eine geringe Permeabilität der Zellwand, die dazu führt, dass einige Antibiotika nicht zu ihrem Wirkungsort im Inneren der Zelle gelangen können [Lambert, **2002**; Antão et Wagner-Ahlf, **2018**]. Weitere intrinsische Mechanismen, die zu Antibiotikaresistenzen führen, sind das Vorhandensein von so genannten Effluxpumpen und die Synthese bestimmter Enzyme.

Mit Hilfe der Effluxpumpen gelingt es den Pseudomonaden antibiotische Substanzen, die bereits in die Zelle gelangt sind, aktiv wieder hinauszubefördern. Die gramnegativen Bakterien der Gattung *Pseudomonas* weisen so genannte MDR-Effluxpumpen auf, wobei MDR für „Multi Drug Resistance“ (Mehrfachresistenz) steht [Moore et Flaws, **2011**]. Übergeordnet gehören diese MDR-Effluxpumpen zur RND-Familie (engl.: Resistance Nodulation Division) [Islam et. al. **2004**; Murugan et. al. **2018**]. Der Aufbau ist in drei Protein-Bausteine gegliedert: Das Exportprotein, welches in der Cytoplasmamembran verankert ist, das Außenmembranprotein Opr (engl.: Outer membrane protein) sowie ein Membranfusionsprotein, welches das Exportprotein mit dem Außenmembranprotein im Periplasma verbindet [Moore et Flaws, **2011**]. Die Namensgebung der Effluxpumpen erfolgt mit „mex“ (engl.: multi efflux) gefolgt von einem Buchstaben. Im Folgenden sind die bisher in *P. aeruginosa* charakterisierten Efflux-Systeme und die Antibiotikaklassen, gegenüber derer sie wirksam sind, aufgeführt [Pang et al., **2019**].

Tab. 1: In *P. aeruginosa* charakterisierte Efflux-Systeme nach Pang et al., 2019.

Efflux-System	Efflux folgender Antibiotikaklassen:
MexAB-OprM	Fluorchinolone, β -Laktame
MexCD-OprJ	Fluorchinolone, β -Laktame
MexEF-OprN	Fluorchinolone
MexXY-OprM	Aminoglykoside

Bei den ebenfalls in Pseudomonaden vorliegenden Enzymen handelt es sich unter anderem um Metallo- β -Laktamasen, welche dazu in der Lage sind eine Resistenz gegenüber der Gruppe der Carbapeneme hervorzurufen [Moosavian et. Rahimzadeh, **2015**]. Der Verlust des Außenmembranporins OprD wird zudem mit einer Resistenz gegenüber dem zur Antibiotikagruppe der Carbapeneme zählenden Imipenem in Verbindung gebracht [Livermore, **2002**].

3.2.2 Extrinsische Resistenzmechanismen

Die extrinsischen, also erworbenen, Resistenzmechanismen sind im Gegensatz zu den intrinsischen stammspezifisch [Antão et Wagner-Ahlf, **2018**]. So besteht die Möglichkeit durch chromosomale

oder plasmidale Mutationen weitere Resistenzen zu entwickeln [Livermore, **2002**]. Des Weiteren kann es auch zu einem Gentransfer zwischen zwei Bakterien kommen, bei denen Erbinformationen ausgetauscht werden können. Besonders kritisch zu betrachten ist hierbei der Transfer auf plasmidaler Ebene, da dieser auch zwischen unterschiedlichen Bakterienspezies erfolgen kann [Antão et Wagner- Ahlfs, **2018**].

Plasmide spielen ebenfalls eine Rolle bei der Resistenz gegenüber Aminoglykosiden und antibiotisch wirksamen Substanzen mit einem β -Laktamring. So können Pseudomonaden Plasmide erwerben auf denen bestimmte Enzyme codiert werden [Moore et Flaws, **2011**]. Hierzu gehören die ESBL (engl.: Extended Spectrum β -Lactamase) und die AME (Aminoglykosid modifizierende Enzyme) [Witte et Mielke, **2003**; Moore et Flaws, **2011**]. Im Folgenden sind die häufigsten ESBL und AME in Pseudomonaden und die Substanzgruppe, gegenüber derer sie wirksam sind, aufgeführt [Witte et Mielke, **2003**; Moore et Flaws, **2011**, Laudy et al., **2017**; Pang et al., **2019**].

Tab. 2: Enzymgruppen und antibiotische Substanzen gegenüber derer sie wirksam sind nach Witte et Mielke (2003), Moore et Flaws (2011), Laudy et al. (2017) und Pang et al. (2019).

Enzymgruppe	Enzyme	Resistenz gegenüber:
Aminoglykosid-Phosphoryltransferasen (APH)	APH(3')	Amikacin, Isepamicin
Aminoglykosid-Acetyltransferase (AAC)	AAC(6')-I	Netilmicin, Tobramycin, Amikacin
	AAC(6')-II	Netilmicin, Gentamicin, Tobramycin
Aminoglykosid-Nucleotidyltransferasen (ANT)	ANT(2')-I	Gentamicin, Tobramycin
Extended Spectrum β -Laktamasen (ESBL)	PER, GES, VEB, PEL, PME und OXA	Cephalosporinen (u. a. Cefpodoxim); mit Ausnahme von Cephamycinen

3.3 Antibiotikagruppen

Im Rahmen dieser Dissertation werden die Antibiotika Cefpodoxim, Imipenem, Ciprofloxacin und Netilmicin für die eigenen Analysen verwendet, da gegenüber diesen Antibiotika in der Literatur häufig Resistenzen von Pseudomonaden beschrieben werden [Pang et al., **2019**]. Zudem decken diese Antibiotika die Klassen Cephalosporine, Carbapeneme, Fluorchinolone und Aminoglykoside ab [Campoli-Richards et al., **1989**; Davis et al., **1996**; Staub, **1997**; Knapp et English, **2001**].

3.3.1 Cefpodoxim

Cefpodoxim, ein Cephalosporin der 3. Generation, entsteht durch Spaltung des Esters aus Cefpodoxim-Proxetil [Wiedemann et al., 1991; Reisdorf, 2015].

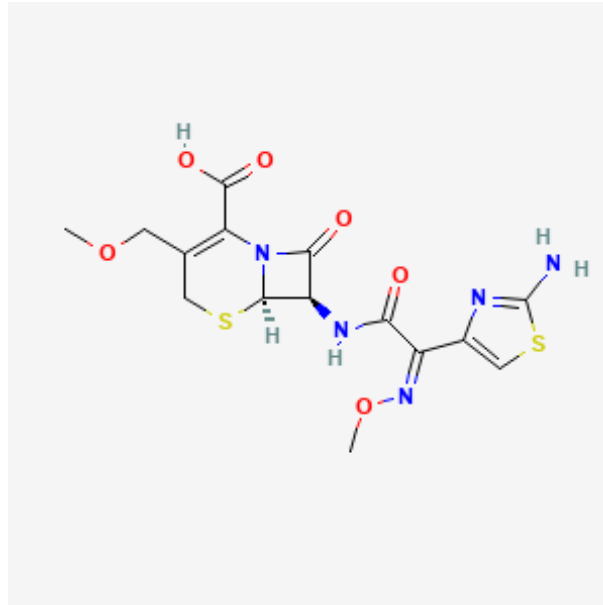


Abb. 1: Strukturformel von Cefpodoxim nach PubChem, 2022.

Cefpodoxim wird häufig zur Heilung von Atemwegserkrankungen eingesetzt. Zusätzlich empfiehlt die Paul-Ehrlich-Gesellschaft die Behandlung von Harnwegsinfektionen und Erkrankungen des Hals-Nasen-Ohren-Bereichs mit Cefpodoxim [Bodmann et al., 2019]. Die Bakterien der Gattung *Pseudomonas*, welche für die genannten Erkrankungen ursächlich sein können, weisen jedoch häufig eine natürliche Resistenz gegenüber Cefpodoxim auf. Dies beruht unter anderem auf dem Vorhandensein von β -Laktamasen, welche das Cefpodoxim hydrolysieren und so im Mikroorganismus wirkungslos machen können [RKI, 2007; Sacha et al., 2008]. Hierfür sind insbesondere die so genannten extended spectrum β -lactamases (kurz: ESBL) verantwortlich, die ein erweitertes Wirkspektrum aufweisen und jegliche Cephalosporine der 3. Generation hydrolysieren können [Domhan et al., 2018].

3.3.2. Imipenem

Bei Imipenem handelt es sich um ein β -Laktam-Breitbandantibiotikum, welches zu der Gruppe der Carbapeneme zählt [Troillet et al., 1997]. Üblicherweise wird Imipenem zur Behandlung von Infektionen der Atem- oder Harnwege, welche durch *P. aeruginosa* verursacht werden können, eingesetzt. [Clissold et al., 1987]. Aufgrund der über die Jahrzehnte andauernden breiten Anwendung dieses Antibiotikums haben jedoch auch die Resistenzen gegenüber Imipenem in den letzten Jahren zugenommen. Hiervon ist insbesondere die Wirksamkeit gegenüber gramnegativen

Bakterien, zu denen *P. aeruginosa* zählt, betroffen [Troillet et al, **1997**]. Der Resistenzmechanismus gegenüber Carbapenemen zeichnet sich durch das Vorhandensein von β -Laktamasen aus. In der Literatur werden zwei mögliche Resistenzvarianten bei *P. aeruginosa* beschrieben: Bei der ersten Variante sind die Aktivität der chromosomalen β -Laktamase in Kombination mit einer verringerten Permeabilität aufgrund des Verlusts von OprD (engl.: Outer membrane protein D), einem Außenmembranporin, für die Resistenz gegenüber Imipenem verantwortlich. Die zweite Möglichkeit ist eine Expression von Metallo- β -Laktamasen, welche plasmidkodiert vorliegen [Troillet et al., **1997**].

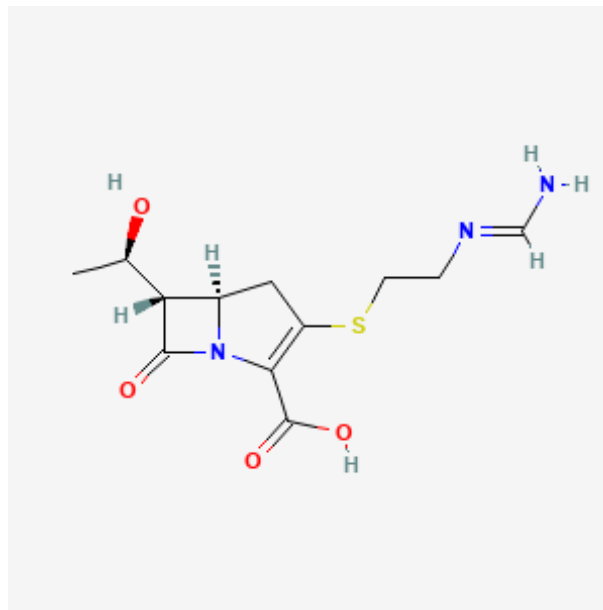


Abb. 2: Strukturformel Imipenem nach PubChem, 2022a.

3.3.3 Ciprofloxacin

Ciprofloxacin ist ein strukturell mit der Nalidixinsäure verwandtes Antibiotikum der Gruppe der Fluorchinolone [Campoli-Richards et al., **1988**]. Das breite Wirkspektrum richtet sich u. a. gegen gramnegative Bakterien, zu denen *P. aeruginosa* gehört [Davis et al., **1996**]. Üblicherweise findet Ciprofloxacin Anwendung bei der Behandlung von Lungenentzündungen und Harnwegsinfektionen [Thai et al., **2021**].

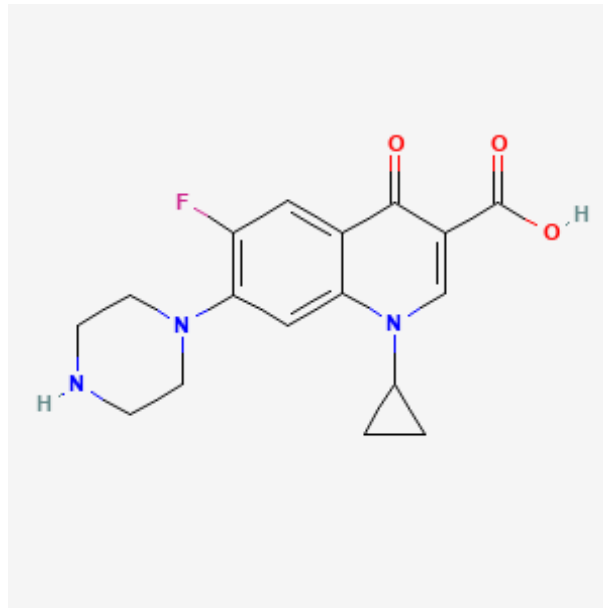


Abb. 3: Strukturformel von Ciprofloxacin nach PubChem, 2022b.

Eine Resistenz gegenüber Ciprofloxacin, bzw. allgemein der Antibiotikagruppe der Fluorchinolone, kann auf drei Wegen erfolgen: Eine Mutation in den beiden Genen der DNA-Gyrase *gyrA* oder *gyrB*, einer verringerten Außenmembranpermeabilität oder einem gesteigerten Efflux. Dabei stellen die Mutationen der Gene *gyrA* und *gyrB* den häufigsten Resistenzmechanismus gegenüber Ciprofloxacin, insbesondere in klinischen *P. aeruginosa*-Stämmen, dar [Cambau et al., 1995].

3.3.4 Netilmicin

Das Antibiotikum Netilmicin zählt zur Klasse der so genannten Aminoglykosid-Antibiotika. Es handelt sich bei Netilmicin um ein semisynthetisches Derivat von Sisomicin. Der Anwendungsbereich umfasst gramnegative Bakterien, wie Pseudomonaden [Miller et al., 1976]. Netilmicin wird üblicherweise für die Behandlung von Harnwegsinfektionen, welche durch *P. aeruginosa* ausgelöst werden können, eingesetzt [Campoli-Richards et al., 1989].

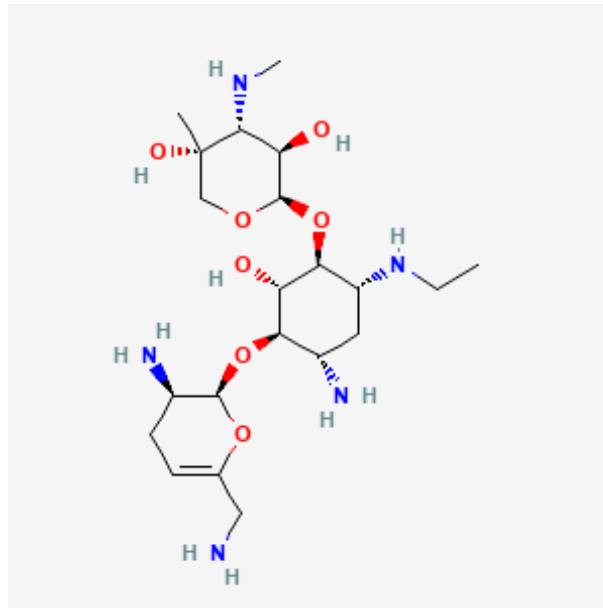


Abb. 4: Strukturformel von Netilmicin nach PubChem, 2022c.

Die Resistenz von *Pseudomonas* spp. gegenüber Netilmicin, bzw. der Klasse der Aminoglykoside im Allgemeinen, ist auf die Anwesenheit diverser Enzyme zurückzuführen. Diese können sowohl auf den Chromosomen als auch Plasmiden kodiert sein. Es handelt sich hierbei um Aminoglykosid-Phosphotransferasen (APHs), Aminoglykosid-Adenylyltransferasen (ANTs) und Aminoglykosid-N-Acetyltransferasen (AACs). Des Weiteren führt in vielen netilmicinresistenten Stämmen eine geringe Außenmembranpermeabilität zu einer verringerten Aufnahme des Aminoglykosids. Ebenfalls wurde bei Anwesenheit höherer Aminoglykosidkonzentrationen eine induzierte Netilmicinresistenz von *P. aeruginosa*-Stämmen beobachtet. Nach Entfernung der Aminoglykoside aus der Bakteriumgebung, kam es dann wieder zum Verlust der Resistenz [Poole, 2005]. Zusätzlich kann auch die Anwesenheit des Efflux-Systems MexXY-OprM eine Resistenz gegenüber Netilmicin bzw. Aminoglykosiden verursachen [Mao et al., 2001].

4. Material und Methoden

4.1 Nachweismethoden von Pseudomonaden

Auf Ebene der Nachweismethoden von Pseudomonaden im Lebensmittelbereich sind mit Stand des Verfassens dieser Arbeit nur zwei Normen bekannt: Zum einen die DIN EN ISO **16266:2008-05** für Trinkwasser, deren Geltungsbereich jedoch ausschließlich den Nachweis und die Zählung von *P. aeruginosa* in diesem Lebensmittel umfasst. Zum anderen ist die Quantifizierung von präsumtiven Pseudomonaden in Fleisch- und Fleischerzeugnissen nach DIN EN ISO **13720:2010-12** geregelt.

In der DIN EN ISO **13720:2010-12** wird der Arbeitsablauf wie folgt beschrieben: 1 Teil der zu untersuchenden Fleisch-/ Fleischerzeugnisprobe wird in 9 Teilen Verdünnungsflüssigkeit eingewogen, durch Walken homogenisiert und nach zu erwartendem Keimgehalt entsprechend seriell dezimal verdünnt. Jeweils 0,1 ml dieser seriellen Zehnfachverdünnungen werden auf Cephalothin-Natriumfusidat-Cetrimid-Agar (CFC-Agar) ausplattiert. Die anschließende Bebrütung geschieht für 44 ± 4 h bei 25 °C. Im Anschluss kann die Quantifizierung durch Zählen der gewachsenen Kolonien erfolgen. Hierbei sind nur Platten mit Koloniezahlen von 20 bis 150 zur Auswertung heranzuziehen. Die Bestätigung, dass es sich bei den entsprechenden Kolonien um Bakterien der Gattung *Pseudomonas* handelt, hat mittels Oxidase-Test zu erfolgen. Hierzu werden randomisiert fünf Kolonien pro Platte gewählt und auf ein mit Oxidase-Reagens befeuchtetes Filterpapier gebracht. Für das Oxidase-Reagens werden 1 g *N,N,N',N'*-Tetramethyl-*p*-phenylendiamindihydrochlorid in 100 ml Wasser gelöst. Zeigt das Filterpapier eine positive Reaktion durch eine violette bis purpurrote Farbänderung, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem untersuchten Zellmaterial um präsumtive *Pseudomonas* spp.-Kolonien handelt [DIN EN ISO **13720:2010-12**].

Für den kulturellen Nachweis und/oder die quantitative Bestimmung der Pseudomonaden in anderen Lebensmittelkategorien musste diese Norm bisher durch Validierung in der entsprechenden Lebensmittelmatrix geprüft werden. Ein Verfahren, das sich explizit nur mit dem Nachweis (multi-)resistenter Pseudomonaden in mehreren Lebensmittelgruppen befasst, ist zudem bisher nicht bekannt.

4.2 Validierung mikrobiologischer Verfahren

Experimentell erzeugte Messwerte sind gemäß Leitfaden zur Validierung mikrobiologischer Prüfverfahren und zur Abschätzung der Messunsicherheit im Bereich Lebensmittel- und Umweltmikrobiologie immer mit Unsicherheiten behaftet. Um zu prüfen inwieweit eine Methode

für die jeweiligen Untersuchungen geeignet ist, wird daher das Instrument der Validierung genutzt [SAS, 2017]. Auch, wenn ein bereits bestehendes Verfahren (Referenzverfahren genannt) bekannt ist, welches durch Anpassung diverser (Einzel-)Schritte modifiziert wird, ist eine Validierung der neuen Methode notwendig [DIN EN ISO 16140-2:2016-11]. Dies gilt ebenfalls, wenn der Anwendungsbereich einer Methode auf neue (Lebensmittel-) Matrices erweitert werden soll [SAS, 2017].

In der Regel wird bei Untersuchungsmethoden unterschieden, ob es sich um eine qualitatives (Ja/Nein Entscheid) oder ein quantitatives Verfahren handelt. Bei Letzterem steht in der Regel die Frage nach der Einhaltung von Grenzwerten im Fokus. Je nach Methode sind die Anforderungen an die Validierungskriterien unterschiedlich [SAS, 2017].

Als Auswerteschema für einen qualitativen Methodenvergleich ist der so genannte „Vierfeldertest“, welcher im Folgenden dargestellt ist, geeignet.

Tab. 3: Auswerteschema des Vierfeldertests nach SAS, 2017.

Zu validierende Methode		+	-	Σ
Referenzmethode	+	a	b	a+b
	-	c	d	c+d
	Σ	a+c	b+d	a+b+c+d = n

Dabei entspricht:

+: positiver Nachweis respektive positive Beurteilung

-: negativer Nachweis respektive negative Beurteilung

a: Anzahl der bei beiden Methoden positiven Analyseergebnisse

b: Anzahl der falsch negativen Analyseergebnisse bezüglich Referenzmethode

c: Anzahl der falsch positiven Analyseergebnisse bezüglich Referenzmethode

d: Anzahl der bei beiden Methoden negativen Analyseergebnisse

n: Gesamtzahl der Analyseergebnisse

Σ : Summe

Je nach Umfang der Validierung einer neuen bzw. Zweitmethode gilt es diverse Parameter zu überprüfen. Die für die Validierung des neuen kulturellen Nachweis- und Zählverfahrens (multi-)resistenter Pseudomonaden genutzten Parameter sind im Folgenden aufgeführt:

Anwendungsbereich

Im Bereich der Lebensmittelmikrobiologie gilt für ein Verfahren, welches horizontal (sprich: für alle Lebensmittelwarengruppen) angewendet werden soll, dass für die Validierung mindestens fünf Lebensmittelkategorien untersucht werden müssen [DIN EN ISO **16140-3:2021-06**]. In der DIN EN ISO **16140-2:2016-11** ist angegeben, welche Lebensmittelgruppen für die jeweiligen Anwendungsbereiche Verwendung finden können.

Inklusivität

Die Inklusivität ist als die Fähigkeit der Methode definiert einen Zielanalyten aus einem weiten Spektrum weiterer Mikroorganismen sicher zu detektieren [Feldsine et al., **2002**].

Exklusivität

Bei der Exklusivität handelt es sich um den Einfluss von möglichen, störenden Nichtzielkeimen auf das zu validierende Verfahren [Feldsine et al., **2002**]. Sowohl für die Bestimmung der Inklusivität als auch der Exklusivität werden keine Lebensmittelproben verwendet [DIN EN ISO **16140-2:2016-11**].

Spezifität

Das Maß der Beeinflussung der Methode durch weitere Nichtzielkeime wird im Vierfeldertest Spezifität genannt.

Berechnet wird die Spezifität mittels folgender Gleichung:

$$\text{Spezifität [\%]} = \frac{d}{c+d} \cdot 100 \quad (1)$$

Ist der Zielorganismus sowohl mit der zu validierenden Methode als auch der Referenzmethode nicht nachweisbar, so wird von der gleichen Spezifität ausgegangen [SAS, **2017**].

Selektivität

Der Grad der Hemmung eines Nicht-Zielmikroorganismus auf oder in einem selektiven Nährmedium unter definierten Bedingungen wird nach DIN EN ISO **11133:2020-10** als Selektivität bezeichnet. Mit Hilfe folgender Gleichung wird der Selektivitätsfaktor (S_F) berechnet:

$$S_F = D_0 - D_S \quad (2)$$

Dabei entspricht:

D_0 = Höchste Verdünnung, die auf einem nicht selektiven Referenzmedium ein Wachstum aufweist

D_S = Höchste Verdünnung, die auf dem zu prüfenden selektiven Medium ein vergleichbares Wachstum zeigt; S_F , D_0 und D_S werden in \log_{10} -Einheiten angegeben [DIN EN ISO **11133:2020-10**].

Produktivität

Die Produktivität beschreibt den Wiederfindungsgrad eines Zielmikroorganismus vom Nährmedium unter definierten Bedingungen [DIN EN ISO **11133:2020-10**]. Dabei soll ein zufriedenstellendes Wachstum des Zielstammes nachgewiesen werden. Die Berechnung wird folgendermaßen durchgeführt:

$$P = \frac{N_s}{N_o} \quad (3)$$

Dabei entspricht:

N_s = Die auf dem zu prüfenden Testmedium erhaltene Gesamtzahl von Kolonien

N_o = Die auf dem festgelegten Referenzmedium erhaltene Gesamtzahl von Kolonien

Die Produktivität eines quantitativen Verfahrens gilt als zufriedenstellend, wenn ein Wert von 0,5 nicht unterschritten wird [DIN EN ISO **11133:2020-10**].

Sensitivität

Die Angabe, wie viel Prozent aller sicher positiven Proben mit einer Methode auch sicher als positiv erkannt werden, ist im Vierfeldertest als Sensitivität definiert. Daher bezeichnet die Sensitivität auch die Fähigkeit der Methode innerhalb einer Matrix Änderungen der Anzahl der zu untersuchenden Mikroorganismen nachzuweisen. Mit Hilfe folgender Gleichung wird die Sensitivität berechnet:

$$\text{Sensitivität [\%]} = \frac{a}{a+b} \cdot 100 \quad (4)$$

Von einer gleichen Sensitivität wird ausgegangen, wenn der Zielkeim sowohl mit der zu validierenden Methode als auch mit dem Referenzverfahren nachgewiesen wird [SAS, **2017**].

eLOD₅₀

Die kleinste Anzahl Zielkeime, welche mit einer definierten statistischen Sicherheit bestimmt werden kann, wird als Nachweisgrenze (auch LOD₅₀ bzw. engl.: Level Of Detection) bezeichnet [SAS, **2017**]. Da eine genaue Bestimmung der Nachweisgrenze (LOD₅₀) mit der gemäß DIN EN ISO **16140-2:2016-11** geforderten Anzahl an zu testenden Proben häufig nicht möglich ist, kann für die Validierung einer Methode auch der so genannte „eLOD₅₀-Wert“ herangezogen werden. Dieser Begriff steht für engl.: „estimated Level Of Detection“ und beschreibt die zu erwartende Nachweisgrenze bei einer Wahrscheinlichkeit von 50 %. Bestimmt wird der eLOD₅₀ mittels MPN-Verfahren [DIN EN ISO **16140- 3:2021-06**].

Falsch-Positiv-Rate

Die Falsch-Positiv-Rate berechnet sich mittels Vierfeldertest (siehe Gleichung (5)) und gibt an, wie viel Prozent der Proben mit dem alternativen Prüfverfahren als falsch positive Befunde gewertet wurden.

$$\text{Falsch-Positiv-Rate [\%]} = \frac{c}{c+d} \cdot 100 \quad (5)$$

Falsch positive Befunde sind als solche durch weitere Charakterisierung der Keime zu bestätigen [SAS, 2017].

Falsch-Negativ-Rate

Wie viel Prozent der Proben mit dem alternativen Prüfverfahren als falsch negative Befunde gewertet wurden, wird als Falsch-Negativ-Rate bezeichnet. Berechnen lässt sich die Falsch-Negativ-Rate mit Hilfe der folgenden Gleichung [SAS, 2017]:

$$\text{Falsch-Negativ-Rate [\%]} = \frac{b}{a+b} \cdot 100 \quad (6)$$

Relative Richtigkeit

Als relative Richtigkeit wird das Ausmaß der Abweichung des Messergebnisses vom „richtigen Wert“ bezeichnet. Dabei wird der systematische Fehler miteinbezogen. Berechnet werden kann die relative Richtigkeit mittels Gleichung (7):

$$\text{relative Richtigkeit [\%]} = \frac{a+d}{n} \cdot 100 \quad (7)$$

Die relative Richtigkeit gibt die geschätzte Wahrscheinlichkeit (in Prozent) an, dass die beiden Methoden des Methodenvergleichs die gleichen Resultate ergeben [SAS, 2017].

Konkordanzindex

Das Maß der Übereinstimmung zweier Prüfverfahren bezüglich eines Analysenmerkmals wird als Konkordanzindex Kappa bezeichnet. Die Berechnung erfolgt mittels folgender Gleichung:

$$\text{Kappa} = 2 \cdot \frac{ad - bc}{(a+c)(c+d) + (a+b)(b+d)} \quad (8)$$

Die Bewertung von Kappa erfolgt mit der in Tab. 4 gezeigten Werten [SAS, 2017].

Tab. 4: Bewertung des Konkordanzindex Kappa nach SAS, 2017.

Kappa	Übereinstimmung
<0,10	keine
0,10-0,40	schwache
0,41-0,60	deutliche
0,61-0,80	starke
0,81-1,00	fast vollständige

4.3 Untersuchung von überwiegend verzehrfertigen Lebensmitteln auf (multi-)resistente Pseudomonaden

Für den Nachweis und die Quantifizierung (multi-)resistenter Pseudomonaden aus überwiegend verzehrfertigen Lebensmitteln, wurde das im Rahmen dieser Arbeit validierte Verfahren verwendet. Dazu wurde ausgehend von der DIN EN ISO **13720:2010-12** vorgegangen. Um nur die Pseudomonaden nachzuweisen bzw. zu isolieren, welche (mehrere) Resistenzen aufweisen, wurden die Antibiotika Imipenem, Ciprofloxacin und Netilmicin verwendet. Durch den Einsatz von Cefpodoxim im Anreicherungsmedium konnte des Weiteren das Wachstum der in den zu untersuchenden Lebensmitteln vorhandenen Begleitflora weitestgehend unterdrückt werden.

Für die Durchführung wurden jeweils 25 g Lebensmittel in einen BagFilter® (Interscience, Saint Nom, Frankreich) eingewogen und mit 225 ml Tryptischer Soja-Bouillon (TSB; Oxoid, Wesel) mit 8 mg Cefpodoxim (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) pro Liter versetzt. Die Ansätze wurden anschließend für 1 Minute gewalkt (Smasher AES Laboratoire, Bruz, Frankreich). Je zweimal 0,5 ml aus dieser Suspension wurden auf CFC-Agar (Oxoid, Wesel), CFC-Agar mit 4 mg Imipenem/l, CFC-Agar mit 0,5 mg Ciprofloxacin/l und CFC-Agar mit 4 mg Netilmicin/l ausplattiert und bei 25 °C für 44 ± 4 h inkubiert. Die in TSB mit Cefpodoxim gewalkten Proben wurden in den BagFiltern® bei 37 °C über Nacht bebrütet. Anschließend wurden Verdünnungsausstriche aus diesen inkubierten Ansätzen ausgestrichen. Dies erfolgte für jedes zu untersuchende Lebensmittel erneut auf CFC-Agar, CFC-Agar mit 4 mg Imipenem/l, CFC-Agar mit 0,5 mg Ciprofloxacin/l und CFC-Agar mit 4 mg Netilmicin/l. Die Bebrütung dieser Agarplatten geschah bei 25 °C für 44 ± 4 h. Im Anschluss wurden pro Platte randomisiert bis zu fünf Kolonien ausgewählt und Zellmaterial von diesen auf Blutagar (Columbia Blood Agar, Oxoid, Wesel) überimpft. Nach der Inkubation über Nacht bei 37 °C erfolgte die Identifizierung der aus den untersuchten Lebensmitteln gewonnenen Bakterien mittels MALDI-TOF-MS (siehe Abschnitt 4.5).

4.4 Bestimmung des Keimgehaltes

Der Keimgehalt einer Probe lässt sich mit Gleichung (9) berechnen. Hierzu wird vom gewichteten arithmetischen Mittel Gebrauch gemacht. Für die Auswertung werden nur Platten herangezogen, deren Koloniezahl zwischen 10 und 300 liegt [DIN EN ISO **7218:2014-09**].

$$\text{Keimgehalt [KbE/g oder ml]} = \frac{\sum \text{KG}}{V \cdot (n_1 \cdot 1 + n_2 \cdot 0,1)} \cdot d_n \quad (9)$$

Bedeutung der verwendeten Größen:

Größe	Bedeutung
KbE	Anzahl der koloniebildenden Einheiten je g oder ml
$\sum \text{KG}$	Summe der Kolonien aller Petrischalen, die zur Berechnung herangezogen werden
V	Volumen des auf der Platte aufgebrauchten Inokulums in ml
n_1	Anzahl der Petrischalen, der niedrigsten, auswertbaren Verdünnungsstufe, die zur Berechnung herangezogen werden
n_2	Anzahl der Petrischalen der nächsthöheren Verdünnungsstufe, die zur Berechnung herangezogen werden
d_n	Faktor der niedrigsten ausgewerteten Verdünnungsstufe, hierbei handelt es sich um die auf n_1 bezogene Verdünnungsstufe

4.5 MALDI-TOF-MS

Bei der Matrix-unterstützten Laserdesorption/Ionisierung-Flugzeit-Massenspektrometrie (engl.: Matrix-assisted Laser-Desorption/Ionization-Time-Of-Flight- Mass Spectrometry, abgekürzt: MALDI-TOF-MS) handelt es sich um eine Messmethode, die im Bereich der Mikrobiologie zur Identifizierung von Bakterien und Pilzen angewandt wird [Hosseini et Martinez-Chapa, **2017**]. Hierbei wird die zu untersuchende Substanz mit niedermolekularen Matrixmolekülen, wie z. B. HCCA (α -Cyano-4-hydroxymizsäure) auf einem Träger (engl: Target) getrocknet. Mit Hilfe eines gepulsten Lasers, welcher auf eine Wellenlänge von 337 nm eingestellt ist, erfolgt dann die Ionisierung. Die Strahlungsenergie wird hierbei zunächst von den Matrixmolekülen aufgenommen. Hierbei kommt es zu einem Mitreißen der zu untersuchenden Probenmoleküle in die Gasphase. In diesem Prozess entstehen positiv geladene Molekülionen, welche in einem elektrischen Feld beschleunigt und anschließend an einem Detektor (MS) analysiert werden. Die Flugzeit (TOF) der Molekülionen ist hierbei proportional zum Verhältnis aus Masse und Ladung (m/z) [Matissek et al., **2020**]. Der schematische Aufbau eines MALDI-TOF-MS ist im Folgenden dargestellt.

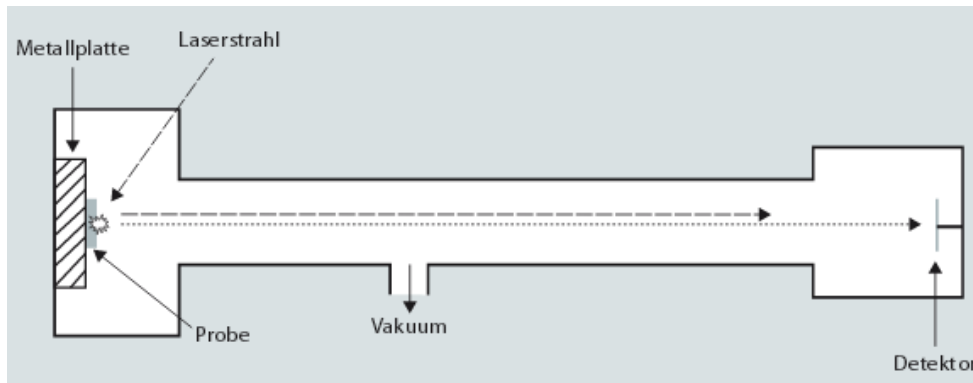


Abb. 5: Schematische Darstellung des Aufbaus eines MALDI-TOF-MS nach Matissek et al., 2020.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde das MALDI-TOF-MS zur Speziesidentifizierung für die aus den untersuchten Lebensmitteln gewonnenen Isolate genutzt. Hierzu wurde die Direkttransfermethode der Firma Bruker angewendet [Bruker, 2013]. Dabei wird Zellmaterial aus einer Einzelkolonie des zu untersuchenden Isolates zunächst als dünner Film auf eine Stelle der Targetplatte aufgetragen und anschließend mit 1 µl HCCA-Matrix (beides Bruker, Corporation, Bremen) überzogen. Nach Trocknen bei Raumtemperatur erfolgt dann die Messung und Auswertung im MALDI-TOF-MS (Bruker Corporation, Massachusetts, USA; Microflex LT MALDI-TOF-MS Biotyper; Datenbankversion: BDAL-10.0.0.0.-RUO) [Bruker, 2013].

4.6 Warekunde der untersuchten Lebensmittelgruppen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 184 Lebensmittel auf die Anwesenheit von (multi-)resistenten Pseudomonaden untersucht. Bei den Lebensmittelgruppen handelt es sich um überwiegend roh verzehrfertiges Hackfleisch, Sahne, verzehrfertigen Lachs bzw. weitere Fischarten, pflanzliche Lebensmittel, verarbeitete Fleischprodukte, Rohmilchkäse und Desserts mit hohem Sahneanteil. Die untersuchten Proben gliedern sich dabei im Einzelnen in 64 Lebensmittel der Warengruppe Hackfleisch, 23 Sahneprouben, 19 Lachs bzw. elf weitere Fischproben (u. a. Thunfisch), 51 pflanzliche Lebensmittel und insgesamt 16 Proben aus den Gruppen Rohmilchkäse, Desserts mit hohem Sahneanteil und (verarbeitete) Fleischprodukte. In den Lebensmitteln der aufgezählten Gruppen wurden und werden häufig Pseudomonaden nachgewiesen. So zählen diese gramnegativen Bakterien insbesondere in Fischen und Hackfleisch zur Begleitflora [Raposo et al., 2017]. Einer der Gründe ist die Fähigkeit der Pseudomonaden auch bei niedrigen Temperaturen zu wachsen [Andreani et Fasolato, 2017]. Zudem werden nicht alle dieser genannten Lebensmittel vor dem Verzehr einer Wärmebehandlung unterzogen, sondern auch roh verzehrt. Dies stellt ein Risiko dar, ggf. hohe Keimgehalte an Pseudomonaden aufzunehmen.

Die Proben wurden in diversen Lebensmittelgeschäften in Hamburg und Schleswig-Holstein gekauft oder in Zusammenarbeit mit den Lebensmittelkontrolleuren der Freien und Hansestadt Hamburg sowie dem Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg) aus Bäckereien, Restaurants und (Eis-) Cafés entnommen. Dabei lassen sich diese Proben in so genannte Plan- und Anlassproben gliedern. Die Anlassproben lassen sich ferner in u. a. Verdachts- und Verfolgsproben unterteilen. Bei Verdachtsproben führt ein entsprechender Verdacht (z. B. eine unzureichende Betriebshygiene oder erkennbare optische Mängel der Lebensmittel) zu einer Probenahme. Von einer Verfolgsprobe ist die Rede, wenn eine vorherige Untersuchung einer Probe des Betriebs bereits Auffälligkeiten ergeben haben. Die Aufarbeitung der untersuchten Proben erfolgte wie in Abschnitt 4.3 beschrieben. Weitere Angaben zu den einzelnen Lebensmitteln sind Tab. 32 (siehe Anhang 9.6) zu entnehmen.

4.6.1 Hackfleisch

Bei Hackfleisch handelt es sich gemäß der **Verordnung (EG) Nr. 853/2004** mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs um „entbeintes Fleisch, das durch Hacken/ Faschieren zerkleinert wurde und weniger als 1 % Salz enthält“. Neben der vergrößerten Oberfläche des gewolften Hackfleisches sorgen auch der hohe Proteinanteil, der hohe a_w -Wert sowie die übliche Lagerung bei Temperaturen bis maximal +4 °C für optimale Wachstumsbedingungen für Bakterien der Gattung *Pseudomonas* [Gonçalves et al., 2017; Andreani et Fasolato, 2017]. Der Verderbnisprozess wird vorwiegend von gramnegativen, psychrotrophen Stäbchenbakterien, wie Pseudomonaden, dominiert. Insbesondere die Spezies *P. fragi* und *P. fluorescens* werden häufig in Hackfleisch nachgewiesen [Krämer, 2017]. Aber auch *P. lundensis* zählt zu einer gelegentlich aus Hackfleisch isolierten Spezies. [Raposo et al., 2017]. Der Verderb von Hackfleisch durch Pseudomonaden äußert sich durch eine schmierige bis schleimige Oberfläche sowie Geruchsabweichungen (ab höheren Keimgehalten von 10^7 KbE/g) [Krämer, 2017].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zusammengefasst 64 Hackfleischproben auf die Anwesenheit von (multi-)resistenten Pseudomonaden untersucht. Die Proben gliedern sich in 23 Proben Rinderhackfleisch, 14 Mettproben (zum Rohverzehr), zwölf Proben gemischtes Hackfleisch (Rind/Schwein), neun Proben Rindertatar (zum Rohverzehr), vier Proben gemischtes Hack (Rind/ Lamm) sowie zwei Schweinehackfleischproben. Es handelte sich ausnahmslos um Planproben.

4.6.2 Sahne

Rechtlich gesehen wird Sahne laut Milcherzeugnisverordnung [**MilchErzV**] aus Milch durch das Abscheiden von Magermilch oder Einstellung des Fettgehaltes auf mindestens 10 % (Kaffeesahne)

bzw. mindestens 30 % (Schlagsahne) gewonnen. Üblicherweise wird Sahne einer Wärmebehandlung unterzogen, bevor diese in den Verkauf gelangt. Zweck dieser Behandlung ist es die Keimzahl zu reduzieren und etwaige übertragbare Krankheitserreger abzutöten [Krämer, 2017]. Zudem verlängert sich dadurch die Haltbarkeit der Produkte [Rimbach et al., 2015]. Es wird zwischen folgenden Arten der Wärmebehandlung unterschieden:

Tab. 5: Arten der Wärmebehandlung von Sahne (Eigene Darstellung; Anlehnung an Krämer, 2017).

Art der Wärmebehandlung	Beschreibung
Wärmebehandelte Sahne: Haltbarkeit bis zu 21 Tage	
1. Erhitzung	>85 °C; einige Sekunden
2. Erhitzung	100 °C; 1 – 2 Sekunden
H-Sahne: Haltbarkeit bis zu acht Wochen	
Ultrahoherhitzung (UHT)	135 – 150 °C; 1 – 3 Sekunden, anschließende regenerative Abkühlung
Sterilisierte Sahne: Haltbarkeit bis zu 1 Jahr	
Sterilisation	mind. 110 °C; 10 – 20 Minuten; anschließende regenerative Abkühlung

Im Handel finden sich überwiegend zwei Varianten der Sahne: Zum einen die wärmebehandelte und zum anderen H-Sahne, welche einer Ultrahoherhitzung unterzogen wurde. Zudem kann Sahne noch Stabilisatoren wie Carageen zugesetzt werden.

Pseudomonaden, die bisher häufig in Milch- und Milcherzeugnissen nachgewiesen werden konnten, sind die Spezies: *P. fluorescens*, *P. fragi*, *P. lundensis*, *P. gessardii* und *P. taetrolens*. [Quintieri et al., 2019]. Psychrotrophe Mikroorganismen, zu denen Pseudomonaden zählen, gelangen üblicherweise nach der Wärmebehandlung als Kontamination während der Abfüllung in die Milcherzeugnisse. Dabei stellen sie zu Beginn nur einen kleinen Anteil der Flora im Produkt dar. Mit andauernder Lagerung bei Kühltemperaturen können sich die Pseudomonaden jedoch zur Hauptursache für den Verderb entwickeln [Dogan et Boor, 2003]. Auch aufgeschlagene Sahne aus Sahneaufschlagmaschinen weist häufig einen hohen Keimgehalt an Pseudomonaden auf [Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt, 2016]. Dabei ist vielfach eine nicht ausreichende Reinigung und Desinfektion der Geräte ursächlich. Erschwert wird die Reinigung zusätzlich durch den kleinteiligen Aufbau der Maschinen [Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt, 2016; Hamburg, 2018].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 22 bereits aufgeschlagene Sahneprouben aus unterschiedlichen Hamburger Eiscafé's untersucht. Bei einer Probe handelte es sich um noch flüssige Sahne, ebenfalls aus einem Eiscafé. Eine aufgeschlagene Sahneproube lässt sich zudem der Kategorie Anlassproben (genauer: Verfolgsprouben) zuordnen.

4.6.3 Lachs

Bei Lachsen handelt es sich um anadrome Fische, die in Salzwasser leben und sich nur zur Geburt und zum Laichen im Rahmen der Fischwanderung in Süßwassergewässern aufhalten. In Europa ist üblicherweise der atlantische Lachs (*Salmo salar*) von Bedeutung [Asche et al., 2011]. Die Gattung *Pseudomonas* zählt nicht nur zum Teil des normalen Mikrobioms von Lachs, sondern des Weiteren zu den wichtigsten Verderbnisbakterien von Lachs bzw. Fisch im Allgemeinen [Hatje et al., 2014; Xie et al., 2018]. An erster Stelle ist hier *P. fluorescens* zu nennen [Xie et al., 2018]. Aber auch *P. fragi* konnte schon nachweislich für den Verderb von Lachsfleisch verantwortlich gemacht werden [Hatje et al., 2014]. Allerdings sind auch Spezies der Gattung *Pseudomonas* bekannt, die als Fischpathogene auftreten. *P. anguilliseptica* ist so zum Beispiel die Ursache für die so genannte „red spot disease“ in Lachsen [Wiklund et al., 1990]. Der Verderb von Lachs aufgrund von Pseudomonaden zeigt sich überwiegend durch die Entstehung flüchtiger Verbindungen, wie Aldehyde, Ketone und Ester, welche als „off-flavour“ wahrgenommen werden können [Franzetti et al., 2007].

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 19 Lachsproben untersucht. Diese gliedern sich in elf kaltgeräucherte Lachs-, eine Graved Lachs- sowie eine Stremellachsprobe. Bei sechs untersuchten rohen Lachsstücken, welche aus unterschiedlichen Hamburger Restaurants stammten, lagen keine Informationen zum Räucherungsprozess vor. Es handelte sich ausnahmslos um Planproben.

4.6.4 Weitere Fischarten

Die Gruppe „weitere Fischarten“ beinhaltet neben Fischen mit den Garnelen auch Krebstiere. Zur Vereinfachung wird im Folgenden jedoch von „Fischarten“ bzw. „weitere Fischproben“ geschrieben. Bei allen untersuchten Proben dieser Kategorie handelte es sich um Planproben.

4.6.4.1 Garnelen

Das Fleisch der zu den Langschwanzkrebsen gehörenden Garnelen ist aufgrund des hohen Gehalts an freien Aminosäuren und anderen niedermolekularen Stickstoffverbindungen besonders anfällig für den Verderb durch Pseudomonaden [Krämer, 2017; FIZ, 2021].

Es wurden in der vorliegenden Arbeit insgesamt zwei Garnelenproben untersucht: Die Garnelen gehörten zu den Arten *Pandalus borealis* und *Litopenaeus vannamei*.

4.6.4.2 Thunfisch

Die Familie der Thunfische (*Thunnus*) kommt in allen Meeren der tropischen und gemäßigten Breiten vor. Bekannte Arten sind der Gelbflossenthun (*Thunnus albacans*) und der Echte Bonito (*Katsuwonus pelamis*). [FIZ, 2021a]. Auch bei Fleisch des Thunfisches steht die Problematik des

hohen Gehaltes freier Aminosäuren, die einen Verderb durch Pseudomonaden begünstigen können, im Vordergrund [Krämer, **2017**].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei rohe Thunfischproben untersucht. Diese stammten aus unterschiedlichen Sushi-Restaurants in Hamburg. Die Proben wurden als Stückware ohne Kennzeichnung zur Untersuchung gebracht, sodass keine Informationen zur Art vorliegen.

4.6.4.3 Forelle und Lachsforelle

In Deutschland beheimatet sind die zu den Salmoniden (lachsartigen Fischen) zählende Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) und die Bachforelle (*Salmo trutta*). Die Handelsbezeichnung für große, rotfleischige Forellen mit einem Gewicht bis zu 1,5 kg ist „Lachsforelle“ [FIZ, **2021b**].

Es wurden in der vorliegenden Arbeit zusammengefasst drei Forellen- und eine Lachsforellenprobe untersucht. Alle Proben waren kaltgeräuchert. Es handelte sich bei den Forellenproben um *Oncorhynchus mykiss*. In der Literatur wird der Nachweis von Pseudomonaden (insbesondere *P. fluorescens* und *P. putida*) in der genannten Forellenart beschrieben [Sakai et al. **1989**; Altinok et al., **2006**]. Die aufgeführten Spezies der Gattung *Pseudomonas* fungieren dabei u. a. als Fischpathogene [Altinok et al., **2006**].

4.6.4.4 Sprotten

Sprotten (*Sprattus sprattus*) sind als kleine in Schwärmen lebende Fische definiert [FAO, **2021**]. Es wurde in der vorliegenden Arbeit eine Sprottenprobe auf das Vorkommen (multi-)resistenter Pseudomonaden untersucht. Es handelte sich um bereits verarbeitete und geräucherte Sprotten. Auch für geräucherten Fisch gibt es in der Literatur Berichte über den Nachweis von (multi-)resistenten Pseudomonaden [Laniewska-Trokenheim et al., **2006**].

4.6.5 pflanzliche Lebensmittel: Gemüse und Kräuter

Der Begriff Gemüse umfasst alle Pflanzenteile, welche frisch und nicht luftgetrocknet sind, sowie ohne Entzug wesentlicher Bestandteile roh, gekocht, konserviert oder anderweitig zubereitet der menschlichen Ernährung dienen [Belitz, **2008**]. Pseudomonaden sind vielfach für den Verderb von Gemüse verantwortlich. Dabei kann eine Kontamination mit diesen Bakterien während des Wachstums, der Ernte oder der Verarbeitung erfolgen [Raposo et al., **2017**]. Der Nachweis von Pseudomonaden in Gemüse wurde in der Literatur unter anderem bereits für Salatpflanzen und Tomaten beschrieben [Kominos et al., **1972**].

Zusammengefasst wurden in dieser Arbeit 20 Salat- und elf Tomatenproben untersucht. Bei den Salatproben handelte es sich sowohl um einzelne Sorten als auch im Supermarkt erhältliche fertige Mischungen. Es handelte sich bei allen Proben um Planproben.

Gemäß den **Leitsätzen für Gewürze** und andere würzende Zutaten sind Kräuter Pflanzenteile, die wegen ihres Gehaltes an natürlichen Inhaltsstoffen als geschmack- und/oder geruchgebende Zutaten zu Lebensmitteln bestimmt sind. Kräuter sind ferner als frische oder getrocknete Blätter, Sprosse, Blüten oder Teile davon definiert. Im Folgenden sind die Definitionen der im Rahmen dieser Dissertation auf die Anwesenheit (multi-)resistenter Pseudomonaden untersuchten 20 Kräuter, bei denen es sich um Planproben handelte, aufgeführt:

Basilikum sind die getrockneten, gerebelten Kelch- und Laubblätter, gelegentlich mit Blüten- und Fruchtteilen von *Ocimum basilicum* aus der Familie der Lippenblütler [**Leitsätze für Gewürze**]. Es wurde eine Basilikumprobe im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

Dillsaat sind die getrockneten Spaltfrüchte von *Anethum graveolens* aus der Familie der Doldengewächse. Bei Dillspitzen handelt es sich um getrocknete Laubblattspitzen [**Leitsätze für Gewürze**]. Es wurde eine Dillprobe untersucht.

Koriander bezeichnet die getrockneten, gelben bis braunen, runden Früchte von *Coriandrum sativum* aus der Familie der Doldengewächse [**Leitsätze für Gewürze**]. Insgesamt wurden zwei Korianderproben untersucht.

Kresse, auch Gartenkresse genannt, sind die essbaren Blätter, Blüten und Sprossachsen von *Lepidium sativum* aus der Familie der Kreuzblütler [Sharma et Agarwal, **2011**]. Es wurde eine Kresseprobe zur Untersuchung herangezogen.

Majoran sind die getrockneten, gerebelten Laubblätter und Blütenstände von *Origanum majorana* aus der Familie der Lippenblütler [**Leitsätze für Gewürze**]. Eine Majoranprobe wurde untersucht.

Minze sind die frischen oder getrockneten Blätter der Gattung *Mentha* aus der Familie der Lippenblütler [Lawrence, **2006**]. Eine Minzprobe wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

Oregano, auch wilder Majoran genannt, sind die getrockneten, meist gerebelten Laubblätter sowie die Blüten und obersten Sprosssteile von *Origanum vulgare* aus der Familie der Lippenblütler [**Leitsätze für Gewürze**]. Es wurde eine Oreganoprobe untersucht.

Petersilie umfasst getrocknete, meist zerkleinerte Laubblätter der glattblättrigen oder krausblättrigen Form von *Petroselinum crispum* aus der Familie der Doldengewächse [**Leitsätze für Gewürze**]. Zusammengefasst wurden fünf Petersilieproben untersucht.

Rosmarin sind die während und nach der Blüte geernteten, getrockneten Laubblätter von *Rosmarinus officinalis* aus der Familie der Lippenblütler [Leitsätze für Gewürze]. Zwei Rosmarinproben wurden für die Untersuchungen herangezogen.

Schnittlauch beschreibt die geschnittenen, auch getrockneten Laubblätter von *Allium schoenoprasum* aus der Familie der Liliengewächse [Leitsätze für Gewürze]. Insgesamt wurden vier Schnittlauchproben untersucht.

Thymian sind die getrockneten, gerebelten Laubblätter und Blüten von *Thymus vulgaris* und *Thymus zygis* aus der Familie der Lippenblütler [Leitsätze für Gewürze]. Es wurde eine Thymianprobe untersucht.

4.6.6 weitere Lebensmittelgruppen

Für die Warengruppe „weitere diverse Lebensmittel“ wurde sich für Desserts mit hohem Sahneanteil, Rohmilchkäse und (rohe) verarbeitete Fleischprodukte entschieden. Der Verderb von Käse durch Pseudomonaden wurde bereits in der Vergangenheit beschrieben [Martin et al., 2011; Hammad, 2015]. In einigen der verarbeiteten Fleischprodukte sowie den Desserts mit hohem Sahneanteil wurden bei Untersuchungen im Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg) bzw. der Probenahme Auffälligkeiten (u. a. sensorische Abweichungen) festgestellt. Insgesamt wurden 16 Proben untersucht, von denen es sich bei sieben um Anlassproben (genauer: sechs Verdachtsproben und eine Verfolgungsprobe) handelte. Jedoch wurde hierbei nicht zwingend auf die Anwesenheit (multi-)resistenter Pseudomonaden geprüft, sodass diese Proben mit dem hier beschriebenen Nachweis- und Zählverfahren erneut untersucht wurden.

4.7 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration

Die minimale Hemmkonzentration (MHK) beschreibt die Konzentration eines Antibiotikums bei der das Wachstum eines bestimmten Testmikroorganismus als erstes gehemmt wird. [Bébéar et Robertson, 1996]. Das Wachstum des Mikroorganismus im Rahmen der Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration wird dabei mit bloßem Auge als Trübung beurteilt [Wiegand et al., 2008]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die minimalen Hemmkonzentrationen mittels Mikrodilutionsverfahren in Mikrotitrationsplatten gemäß den Empfehlungen des Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) bestimmt [CLSI, 2013]. Hierfür wurde Zellmaterial des jeweils zu testenden Mikroorganismus für 18 ± 2 h bei 37°C in je 5 ml mit Kationen supplementierter Müller-Hinton-Bouillon (CAMHB; Oxoid, Wesel) inkubiert. Bei einer Wellenlänge von 560 nm wurde dann am Photometer (GENESYS™ 10S UV-VIS-Spektrophotometer, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) durch Zugabe von CAMHB eine optische Dichte von $\text{OD}_{560\text{nm}} = 0,1 \pm 0,02$

eingestellt. Dies entsprach einem Keimgehalt von 10^8 KbE/ml. Um den vorgegebenen Bakteriengehalt von $5 \cdot 10^5$ KbE/ml Testbouillon zu erreichen, wurden zunächst 10 μ l der Bakteriensuspension in 990 μ l CAMHB verdünnt. In der Mikrotiterplatte (Thermo-Fisher, Wesel) wurde dann für das zu testende Antibiotikum pro Reihe eine serielle Verdünnungsreihe erstellt, bei welcher der Gehalt pro Kavität seriell um den Faktor zwei verringert wurde. Dadurch konnte der Bereich zwischen 0,25 und 256 mg Antibiotikum/ml abgedeckt werden. Die Inokulation erfolgte durch Zugabe von je 50 μ l Bakteriensuspension in jeder dieser mit ebenfalls 50 μ l des Antibiotikums befüllten Kavitäten. Zudem wurde für jeden zu testenden Stamm eine Kavität nur mit 50 μ l Bakteriensuspension versetzt, um als Wachstumskontrolle zu fungieren. Im Anschluss erfolgte die Inkubation der abgedeckten Mikrotitrationsplatte bei 37 °C für 18 h \pm 2 h. Nach der Bebrütung wurde die entsprechende minimale Hemmkonzentration für den jeweiligen Bakterienstamm optisch anhand der Trübung abgelesen [CLSI, **2013**].

Es wurden für jeden Stamm der Stammsammlung und den eigens aus den untersuchten Lebensmitteln nachgewiesenen Isolaten die MHKs für die Antibiotika Imipenem, Ciprofloxacin und Netilmicin (alle Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) bestimmt. Um die korrekte Durchführung des Verfahrens zu überprüfen, wurde zudem *P. aeruginosa* ATCC 27853 als Teststamm bei jeder Bestimmung mitgeführt.

4.8 Next Generation Sequencing (NGS)

Unter Nukleotidsequenzierung versteht man die Bestimmung der exakten Reihenfolge von vorhandenen Nukleotiden in einem vorliegenden DNA bzw. RNA-Molekül [Grada et Weinbrecht, **2013**]. Bereits 1977 publizierte Frederick Sanger eine Methode zur Entschlüsselung des Genoms von Mikroorganismen, die so genannte Sanger-Sequenzierung, welche auf einem Kettenabbruch der DNA-Polymerisation basiert [Liu et al., **2012**]. Diese Methode galt jahrzehntelang als Goldstandard unter den Sequenzierungsmethoden [Vincent et al., **2017**]. Im Laufe der Zeit gelang es jedoch durch die rasante Weiterentwicklung dieser Ursprungsmethode bereits Anfang des 21. Jahrhunderts im Rahmen des Human Genome Projects ein gesamtes menschliches Genom zu entschlüsseln [Moraes et Góes, **2016**]. Die kommerzielle Veröffentlichung einer Pyrosequenzierungsplattform im Jahr 2005 läutete dann ein neues Kapitel der Genomanalytik ein: Das Next Generation Sequencing (NGS) [Voelkerding et al., **2009**].

Heutzutage ist die Genomsequenzierung aus verschiedensten naturwissenschaftlichen Bereichen nicht mehr wegzudenken: Mit Hilfe des NGS können so zum Beispiel komplette Genome oder auch nur spezifische Bereiche individueller Gene sequenziert werden. Genutzt werden kann das NGS daher unter anderem für die Aufklärung von Ausbruchsgeschehen oder zur Auskunft über das

Vorhandensein bestimmter Resistenzgene in verschiedenen Mikroorganismen [Behjati et Tarpey, **2013**]. Dabei zeichnen sich die neuen NGS-Methoden vor allem durch ihren hohen möglichen Durchsatz an parallel sequenzierten Proben, der Geschwindigkeit, der Genauigkeit der bestimmten Daten und ihrer vergleichsweise niedrigen Kosten pro analysierter Base aus [Liu et al., **2012**; Van Dijk et al., **2014**].

Im Bereich des Next Generation Sequencing kann zwischen verschiedenen Anbietern und unterschiedlichen Durchführungen entschieden werden. Im Rahmen dieser Dissertation wurde Gebrauch von den zwei folgenden Varianten gemacht:

4.8.1 PacBio®

Diese Art der Sequenzierung von PacBio® wird „Single Molecule Read-Time Sequencing“ (SMRT) genannt und ist in die folgenden Schritte gegliedert: Nach Isolation, Aufreinigung und mechanischer Fragmentierung der zu untersuchenden DNA, wird diese an jedem Ende mit speziellen schlaufenförmigen Adaptern versehen. Dadurch, dass sich die DNA zu diesem Zeitpunkt noch in Form eines Doppelstranges befindet, entsteht ein zirkuläres Templat, welches auch SMRTbell genannt wird. Für die Sequenzierung wird die SMRTbell in eine mit mehreren tiefen Kanälen versehene Zelle gegeben, die SMRT Cell. In jeder dieser Vertiefungen, auch als Zero-Move-Waveguides bezeichnet, befindet sich neben genau einem zirkulären DNA-Templat eine am Boden immobilisierte DNA-Polymerase, welche an den Adapter des DNA-Templates binden kann [Rhoads et Au, **2015**; PacBio, **2021**].

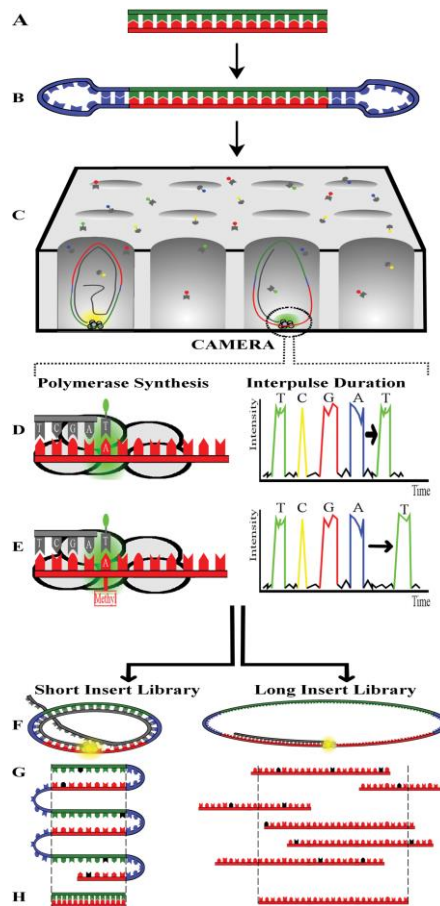


Abb. 6: Schematische Darstellung der Sequenzierung mittels „SMRT“-Verfahrens nach PacBio®, nach Ardui et al., 2018.

Durch Zugabe von markierten Nucleotiden kann die Replikation erfolgen. Jedes der vier Nucleotide ist dabei mit einem unterschiedlichen Fluorophor markiert. Beim Einbau eines passenden Nucleotids an die entsprechende Stelle des DNA-Strangs, wird ein für das jeweilige Nucleotid charakteristisches Lichtsignal emittiert, welches mit Hilfe einer Kamera aufgezeichnet werden kann. Aufgrund der Tatsache, dass die Markierung am Phosphat des Nucleotids befestigt ist, werden die folgenden Messungen nicht beeinträchtigt, da durch die Abspaltung des Pyrophosphats auch der Fluoreszenzmarker entfernt wird. Der Einbau der jeweiligen Nucleotide erfolgt in allen Zero-Move-Waveguides und wird parallel von einer Kamera aufgenommen. Dieser Prozess ähnelt einem „Film“ an Lichtimpulsen. Sofern die DNA-Polymerase stabil genug ist, kann zudem nach erfolgreicher Sequenzierung des DNA-Fragments auch der schlaufenförmige Adapter sequenziert werden. Durch die zirkuläre Form des vorliegenden DNA-Templats kommt es dann zu einer erneuten, zweiten Sequenzierung. Dies bietet den Vorteil, dass mehrere Runden derselben DNA analysiert werden können [Rhoads et Au, 2015; PacBio, 2021].

4.8.2 Illumina MiSeq®

Bei dieser Variante wird für die Sequenzierung des gesamten Genoms (auch Whole Genome Sequencing oder WGS) auf das so genannte „Sequence by Synthesis“ zurückgegriffen. Dabei werden nach Isolation, Aufreinigung und mechanischer Fragmentierung der DNA an jedem Ende eines DNA-Fragments spezifische Adapter gebunden. Im zweiten Schritt, auch Brücken-PCR genannt, werden die vorbereiteten DNA-Fragmente auf die Fließzelle gebracht. Letztere ist eine kleine aus Glas bestehende Platte, die mehrere schmale, vertiefte Spuren aufweist [Illumina, 2010; Illumina 2021].

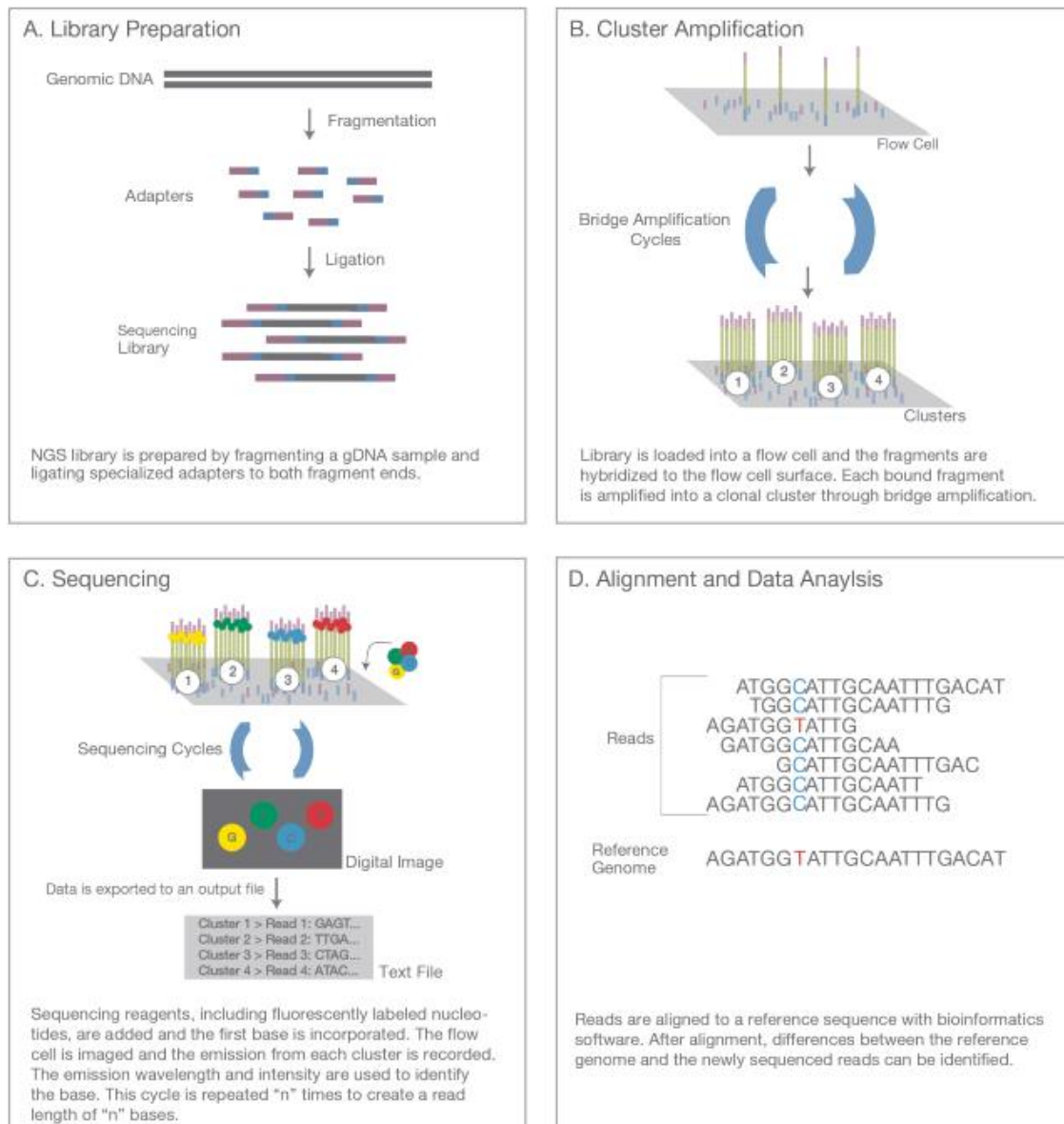


Abb. 7: Schematische Darstellung des Verfahrens „Sequence by Synthesis“ nach Illumina®, Illumina, 2017.

Am Boden jeder dieser Spuren befindet sich ein Rasen aus zwei Arten von Oligonukleotidsträngen: Die Primer. Wenn nun ein mit Adaptern präpariertes DNA-Fragment auf einen komplementären

Primer trifft, kommt es zu einer Bindung. Dieser Vorgang erfolgt rein zufällig. Die ebenfalls in der Fließzelle vorhandene DNA-Polymerase beginnt dann damit einen Komplementärstrang des hybridisierten Fragments zu erstellen. Nach erfolgreicher Fertigstellung dieses Prozesses erfolgt eine Denaturierung dieses Doppelstrangs und der Originalstrang wird in einem Waschschrift entfernt. Die nun folgende Brückensynthese wird durch das Umklappen des verlängerten DNA-Strangs und Bindung an die zweite Art des komplementären Primers am Boden der Fließzelle erreicht. Auch in diesem Schritt wird durch den Einsatz von DNA-Polymerasen und Nukleotiden die Synthese eines komplementären DNA-Doppelstranges, diesmal in Form einer Brücke, bewirkt. Durch eine sich daran anschließende erneute Denaturierung entstehen zwei verlängerte DNA-Stränge, welche beide jeweils an einer der Primervarianten auf der Fließzelloberfläche gebunden sind. Durch mehrfache, simultane Wiederholung dieser Schritte kommt es zu einer millionenfachen Amplifizierung der hinzugegebenen DNA-Fragmente. Ist dieser Ablauf erfolgreich beendet, wird erneut ein Waschschrift durchgeführt, sodass nur die Vorwärtsstränge der amplifizierten DNA verbleiben. Diese sind aufgrund der Brückensynthese in mehreren Millionen Gruppen, den Clustern, an der Fließzelloberfläche angeordnet. Jedes dieser Cluster besteht wiederum aus einer Vielzahl an DNA-Strängen. Der nun folgende dritte Schritt umfasst die eigentliche Sequenzierung: Hierzu werden Primer, die DNA-Polymerase und vier fluoreszenzmarkierte Nukleotide hinzugegeben. An die entsprechende Stelle des DNA-Stranges wird das jeweils passende Nukleotid eingebaut. Dabei wird ein für das jeweilige Nukleotid charakteristisches Lichtsignal ausgesandt, welches aufgezeichnet wird und anhand dessen eine genaue Reihenfolge des neu entstehenden DNA-Strangs (und somit auch dem vorliegenden Komplementärstrang) bestimmt werden kann. Anhand der Intensität des ausgesandten Lichtsignals kann zudem nachgewiesen werden wie häufig ein bestimmtes Nukleotid hintereinander eingebaut wurde. Das Einbauen des jeweils passenden Nukleotids mit anschließendem Aussenden des charakteristischen Lichtsignals erfolgt schrittweise während der Synthese des DNA-Doppelstranges, weshalb diese Variante der Sequenzierung auch „Sequence by Synthesis“ genannt wird. Mit Hilfe eines Enzyms wird das Fluoreszenz-Label abgespalten und der Ablauf erfolgt von neuem bis der gesamte DNA-Doppelstrang synthetisiert ist. Die Auswertung erfolgt dann unter Zuhilfenahme einer Software [Illumina, 2010; Illumina 2021].

4.8.3 DNA-Isolation

Für die Isolation der DNA zur Analyse der gewonnenen Pseudomonaden wurde das „MasterPure™ Gram Positive Purification Kit“ der Firma Lucigen (Biozym, Hess. Oldendorf) verwendet und für die Analytik der eigenen Isolate stellenweise, wie im folgenden Abschnitt beschrieben, modifiziert. Diese Aufarbeitung wurde sowohl für die Sequenzierung der Isolate mittels der Geräte der Firma PacBio® als auch das MiSeq® der Firma Illumina® verwendet.

Von dem zu sequenzierenden Isolat wurde reichlich Zellmaterial in TSB (Oxoid, Wesel) überführt und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Nach der Inkubation wurde 1 ml der Vorkultur zentrifugiert (10.000 x g, 3 min, 4 °C) und nach Abnahme des Überstandes mit 150 µl TE-Puffer versetzt. Diese Bakteriensuspension wurde mehrfach kräftig auf dem Reagenzglas-Schüttler (VWR International GmbH, Darmstadt) gemischt, bevor die Zugabe von 1 µl Ready-Lyse-Lysozyme (Biozym, Hess. Oldendorf) erfolgte. Im Anschluss wurde dieser Ansatz bei 37 °C für 90 Minuten inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Ansatz mit 150 µl einer Mischung, bestehend aus 1 µl Proteinase K (Biozym, Hess. Oldendorf) und 150 µl Gram Positive Lysis Solution (Biozym, Hess. Oldendorf), versetzt und die einzelnen Komponenten durch mehrfaches, schnelles Kippen des geschlossenen Reaktionsgefäßes homogen vermischt. Als nächster Schritt erfolgte die Bakterienlyse, welche für 15 Minuten bei 70 °C durchgeführt wurde. Hierbei wurde der Ansatz alle fünf Minuten auf dem Reagenzglas-Schüttler kurz geschüttelt. Danach wurde das Reaktionsgefäß für 15 Minuten auf 37 °C heruntergekühlt bevor dieses für fünf Minuten in Eis gestellt wurde.

Zum lysierten Probenansatz wurden 175 µl des MPC Protein Precipitation Reagent (Biozym, Hess. Oldendorf) gegeben und für 10 Sekunden kräftig auf dem Reagenzglas-Schüttler vermengt. Der dabei ausgefallene Niederschlag wurde durch Zentrifugation (10.000 x g; 10 Minuten; 4 °C) zu einem Pellet geformt und der so entstandene DNA-haltige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 1 µl RNase (Biozym, Hess. Oldendorf) zum Überstand und der Inkubation des Ansatzes bei 37 °C für 60 Minuten, erfolgte die Zugabe von 500 µl -15 °C kaltem 2-Propanol (Merck KGaA, Darmstadt). Durch ca. 40-faches, schnelles gegenseitiges Kippen des Reaktionsgefäßes wurde die DNA ausgefällt. Um die ausgefällte DNA vom verbliebenen Überstand zu trennen, erfolgte eine erneute Zentrifugation (>10.000 x g; 10 Minuten; 4 °C). Nach Entfernen des 2-Propanols wurde das DNA-Pellet mit 70 % Ethanol (Merck KGaA, Darmstadt) gespült. Dieser wies ebenfalls eine Temperatur von -15 °C auf. Abschließend wurde die DNA in 35 µl sterilem bidestilliertem Wasser gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

4.9 Sequenzierung der eigenen Isolate

Ein Teil der im Rahmen dieser Dissertation gewonnenen Isolate aus den untersuchten Lebensmitteln wurde sequenziert. Dies umfasste ausschließlich die Stämme der Spezies *P. aeruginosa* und ein Isolat der Spezies *P. putida*. Dabei wurden insgesamt zehn *P. aeruginosa*-Isolate in Kooperation mit dem Forschungszentrum Borstel (Schleswig-Holstein) am Gerät der Firma PacBio® sequenziert. Die weiteren 24 *P. aeruginosa*-Isolate wurden im Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg) mit Hilfe des Illumina MiSeq® analysiert. Die Ergebnisse aller Sequenzierungen sind in den Abschnitten 5.5 und 5.6 sowie in Anhang 9.10 aufgeführt.

4.10 MLST

Die Abkürzung MLST steht für Multi Locus Sequencing Typing und beschreibt eine Methode zur Typisierung von Bakterien [Johnson et al., **2007**]. Diese beruht dabei auf der Analyse von internen Nukleotidsequenzen in mehreren so genannten Haushaltsgenen, die charakteristisch für die jeweils zu untersuchenden Bakterien sind. Dadurch ist es möglich anhand der bei der Analyse entstehenden eindeutigen Allelmuster, denen eine zufällige ganze Zahl zugewiesen wird und durch Kombinationen von Allelen an jedem Ort den so genannten Sequenztypen (engl.: Sequencing Type, ST) zu erstellen. Anhand des Sequenztypen kann zudem ein Vergleich mit weiteren zu analysierenden Stämmen durchgeführt werden [Sullivan et al.,**2005**; Larsen et al., **2012**]. Die Ergebnisse des MLST können beispielsweise genutzt werden, um etwaige Ausbruchsgeschehen aufzudecken oder klonale Verwandtschaftsverhältnisse zwischen einzelnen Isolaten zu definieren [Maiden et al., **2013**]. Auch ein Vergleich der eigenen Daten mit weiteren Isolaten derselben Spezies anhand von Datenbanken ist möglich [PubMLST, **2022**]. Neben der Variante eine Amplifikation der DNA mittels PCR und anschließender Sanger-Sequenzierung für das MLST durchzuführen, ist es zudem möglich diese Daten durch die Durchführung einer Sequenzierung mittels Next Generation Sequencing zu gewinnen [Larsen et al., **2012**].

4.11 Verwendete Nährmedien

Die verwendeten Nährmedien sind in Anhang 9.3 aufgeführt.

4.12 Pseudomonaden-Stammsammlung

Für diese Arbeit stand eine aus 26 Stämmen bestehende Pseudomonaden-Stammsammlung zur Verfügung, die sowohl aus Referenzstämmen, Patientenisolaten als auch Isolaten aus Lebensmitteln bestand. Insgesamt beinhaltete diese Sammlung die Spezies *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. fulva* und *P. guariconensis*. Diese Stämme wurden allesamt für die Bestimmungen der MHKs miteinbezogen und charakterisiert. Zudem wurden die Stämme *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. fluorescens* ATCC 13525 und *P. putida* LMG 2257 für die Validierung des eigenen kulturellen Nachweis- und Zählverfahrens verwendet. Die Stammsammlung ist in Tab. 31 in Anhang 9.5 aufgelistet.

4.13 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel neue Erkenntnisse zum Vorkommen (multi-)resistenter Pseudomonaden in Lebensmitteln zu gewinnen. Dafür wird ein kulturelles Nachweis- und Zählverfahren für explizit (multi-)resistente Pseudomonaden entwickelt und validiert. Der Anwendungsbereich ist horizontal und somit auf jegliche Lebensmittelmatrices übertragbar. Im

Fokus der hier beschriebenen Untersuchungen stehen überwiegend roh verzehrbare Lebensmittel aus den Warengruppen Hackfleisch, Fisch, Sahne und pflanzliche Lebensmittel, da für diese in der Literatur das Vorkommen von Pseudomonaden beschrieben wird und sie durch die Tatsache, dass ein Rohverzehr stattfinden kann, eventuelle Risiken für den Verbraucher beherbergen können [Begum, 1985; Raposo et al., 2017]. Die mittels des hier beschriebenen Verfahrens gewonnenen Bakterien der Gattung *Pseudomonas* sowie einige Isolate aus anderen Sammlungen sollen anschließend hinsichtlich ihrer Resistenzeigenschaften charakterisiert werden. Hierzu werden die minimalen Hemmkonzentrationen der Antibiotika Imipenem, Ciprofloxacin und Netilmicin, stellvertretend für die Antibiotikagruppen Carbapeneme, Fluorchinolone und Aminoglykoside bestimmt. Des Weiteren wird basierend auf diesen Ergebnissen eine Auswahl von diesen, aus den Lebensmitteln isolierten Stämmen, welche Resistenzen gegenüber Imipenem, Ciprofloxacin und/oder Netilmicin zeigen, mittels Next Generation Sequencing untersucht, unter anderem, um mehr über die vorhandenen Resistenzgene und die Phylogenetik der Stämme zu erfahren. Zudem soll das Next Generation Sequencing für weitere Informationen bezüglich des Vorkommens von Plasmiden und Antiseptikaresistenzen genutzt werden.

5. Ergebnisse

5.1 Entwicklung und Validierung eines kulturellen Nachweis- und Zählverfahrens für (multi-)resistente Pseudomonaden

Ausgehend von der DIN EN ISO **13720:2010-12** für die Quantifizierung von präsumtiven Pseudomonaden in Fleisch und Fleischerzeugnissen, wurde der CFC-Agar für das hier beschriebene kulturelle Nachweis- und Zählverfahren gewählt. Um zu erreichen, dass nur (multi-)resistente Pseudomonaden wachsen, wurden die Antibiotika Imipenem (ein Carbapenem), Ciprofloxacin (zur Gruppe der Fluorchinolone zählend) und Netilmicin (ein Aminoglykosid) zum Agar gegeben. Es wurden die genannten Antibiotika genutzt, da in der Literatur vielfach Resistenzen der Pseudomonaden gegenüber diese drei Antibiotika bzw. -gruppen beschrieben werden [Troillet, **1997**; Chaudhry, **1999**; Poole, **2005**]. Bezüglich der im Agar eingestellten Antibiotikakonzentrationen, wurde sich an den von der European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) für die Spezies *P. aeruginosa* veröffentlichten Epidemiological cut-off values (ECOFFs) orientiert. Letztere werden auf Basis der normalen Verteilung der MHKs einer bestimmten Bakterienart definiert. Innerhalb dieser Verteilung werden die Isolate als Wildtyp angesehen. Der ECOFF bezeichnet die höchste MHK innerhalb dieser Verteilung. Bei Isolaten, deren minimalen Hemmkonzentrationen oberhalb des ECOFFs liegen, wird von einer Resistenz gesprochen [Sjölund et al., **2009**; Morrissey et al., **2014**]. Für die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Antibiotika ergaben sich folgende Gehalte: 4 mg Imipenem/l, 0,5 mg Ciprofloxacin/l und 4 mg Netilmicin/l [EUCAST, **2022**].

Das zu validierende Verfahren umfasst zudem einen Anreicherungsschritt in TSB. Um mögliche Begleitflora der Pseudomonaden aus den Lebensmitteln weitestgehend ausschließen zu können, wurde dem Anreicherungsmedium mit den Lebensmitteln in TSB das Antibiotikum Cefpodoxim in der finalen Konzentration von 8 mg/l hinzugegeben. Cefpodoxim weist eine gute Wirksamkeit gegenüber grampositiven Bakterien, wie Enterokokken, *Staphylococcus aureus* und *Enterobacteriaceae* auf. Die meisten Pseudomonaden sind jedoch bereits intrinsisch resistent, sodass deren Wachstum durch den Einsatz von Cefpodoxim nicht beeinflusst wird [Knothe et al., **1991**]. Neben der Verringerung des Wachstums der Begleitflora bot diese Vorgehensweise auch den Vorteil einer ersten Selektion der in den Lebensmitteln enthaltenen Pseudomonaden in Richtung resistenter Stämme.

Da das neu entwickelte Verfahren nicht nur für die Lebensmittelgruppe Fleisch und Fleischerzeugnisse genutzt werden soll, wurden ausgehend von den Vorgaben der

DIN EN ISO **16140-2:2016-11** auch weitere Warengruppen für die Validierung herangezogen: Neben Fleisch auch Fisch, pflanzliche Lebensmittel, Milchprodukte und Fertigprodukte. Stellvertretend für die aufgeführten Kategorien wurden Hackfleisch, Lachs, Tomaten, H-Sahne und Fertigsuppe gewählt und für die entsprechenden Validierungen eingesetzt. Die Inkubationsbedingungen wurden mit 25 °C für 48 h ± 4 h im Vergleich zur DIN EN ISO **13720:2010-12** nicht verändert, sondern übernommen. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Validierung für die einzelnen Parameter aufgeführt.

5.1.1 Anwendungsbereich

Das neue kulturelle Nachweis- und Zählverfahren für (multi-)resistente Pseudomonaden soll einen horizontalen Anwendungsbereich umfassen, daher wurden gemäß DIN EN ISO **16140-2:2016-11** fünf Lebensmittelkategorien für die Validierung verwendet. Diese sind je nach spezifischem Anwendungsbereich frei wählbar. Unter anderem gliedern sich diese in die Kategorien „rohes Fleisch und küchenfertige Fleischprodukte“, „wärmebehandelte Milch- und Milchprodukte“, „verzehrfertige, aufwärmfertige Fischprodukte“, „frisches Gemüse und Obst“ sowie „Lebensmittel aus mehreren Bestandteilen oder Zutaten für eine Mahlzeit“. Es wurden die genannten Kategorien gewählt, da die Lebensmittel in diesen Gruppen teilweise roh verzehrt werden (Tomate, Lachs sowie bestimmte Varianten Hackfleisch) und somit eine hohe Anfälligkeit für die Aufnahme von (multi-)resistenten Pseudomonaden durch ihren Verzehr bieten. In der Literatur werden zusätzlich häufig Nachweise von Pseudomonaden in diesen Lebensmitteln beschrieben [Raposo et al., **2017**]. Des Weiteren wird mit den ausgesuchten Lebensmittelkategorien eine große Bandbreite abgedeckt. Dies ist aufgrund der Tatsache, dass das Verfahren einen horizontalen Anwendungsbereich umfassen soll, notwendig. Für jede der ausgewählten Kategorien ist ein Lebensmittel auszusuchen. Für die Validierung des hier beschriebenen Verfahrens wurden stellvertretend für die genannten Kategorien folgende Lebensmittel genutzt: gemischtes Hackfleisch, H-Sahne, geräucherter Lachs, Tomaten und Fertigsuppe. Es wurde darauf geachtet für die Validierung Lebensmittelproben zu wählen, die keine präsumtiv resistenten Pseudomonaden enthalten. Dies wurde in Vorversuchen überprüft. Für die Validierung wurden die verwendeten Lebensmittel folglich künstlich mit verschiedenen *Pseudomonas*-Stämmen in jeweils drei unterschiedlichen Keimgehalten beimpft. Dabei wurde entsprechend der Norm darauf geachtet, dass je ein niedriger, mittlerer und hoher Keimgehalt verwendet wurde [DIN EN ISO **16140-2:2016-11**]. Dies entsprach einem Keimgehaltsbereich von 10² KbE/ml bis 10⁴ KbE/ml. Zudem wurde stets ein Blindwert mitgeführt, der bestätigte, dass die in Tab. 6 verwendeten Lebensmittel natürlicherweise keine präsumtiv resistenten Pseudomonaden enthielten. Die in den genutzten Lebensmitteln vorhandene Begleitflora entsprach zudem den Vorgaben der DIN EN ISO **16140-2:2016-11**, da sowohl Proben

mit einem hohen Anteil an Begleitflora (Hackfleisch) als auch niedrige Gehalte (H-Sahne, Fertigsuppe) inkludiert wurden. Des Weiteren wurden mit den Tomaten rohe, unverarbeitete Lebensmittel gewählt. Im Gegensatz dazu steht die Fertigsuppe mit einem hohen Grad an Verarbeitung der dort enthaltenen einzelnen Zutaten, sodass auch unterschiedliche Arten der Verarbeitung der Lebensmittel mit einbezogen werden konnten.

Die Stämme, mit denen die verschiedenen Lebensmittel künstlich kontaminiert wurden, wurden anhand mehrerer Kriterien frei ausgewählt: *P. aeruginosa* ATCC 27853 als häufig verwendeter Referenzstamm und aufgrund seiner klinischen Relevanz, *P. fluorescens* ATCC 13525 als bereits bekannter Lebensmittelverderber und *P. putida* LMG 2257 als möglicher Lebensmittelverderber [CLSI, 2013; Andreani et Fasolato, 2017]. Zudem sind die ausgewählten Stämme resistent gegenüber den Antibiotika Imipenem, Netilmicin und (mit Ausnahme von LMG 2257) Ciprofloxacin (siehe Tab. 34, Anhang 9.8).

Für den Vergleich mit dem Verfahren nach DIN EN ISO **13720:2010-12** und der späteren Berechnung der Parameter Spezifität und Sensitivität mittels Vierfeldertest (siehe Tab. 3, Abschnitt 4.2), wurde eine Verfahrensvergleichsuntersuchung durchgeführt. Dabei wurde für die Durchführung der Untersuchungen nach DIN EN ISO **13720:2010-12** keine Voranreicherung in TSB mit Cefpodoxim durchgeführt. Zudem wurde hier nur der CFC-Agar ohne zusätzliche Antibiotika verwendet. Tab. 6 gibt Aufschluss über diese Ergebnisse.

5. Ergebnisse

Tab. 6: Ergebnisse des Vergleichs des Verfahrens nach DIN EN ISO 13720:2010-12 und der zu validierenden Methode.

Matrix	gemischtes Hackfleisch			H-Sahne			Suppe			ger. Lachs			Tomate		
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853															
Zugegebener Keimgehalt <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 in KbE/ml	10²	10³	10⁴	10²	10³	10⁴	10²	10³	10⁴	10²	10³	10⁴	10²	10³	10⁴
DIN EN ISO 13720:2010-12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CFC-Agar mit 4 mg Imipenem /l	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CFC-Agar mit 0,5 mg Ciprofloxacin/l	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CFC-Agar mit 4 mg Netilmicin/l	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. fluorescens</i> ATCC 13525															
Zugegebener Keimgehalt <i>P. fluorescens</i> ATCC 13525 in KbE/ml	10²	10³	10⁴	10²	10³	10⁴	10²	10³	10⁴	10²	10³	10⁴	10²	10³	10⁴
DIN EN ISO 13720:2010-12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CFC-Agar mit 4 mg Imipenem/l	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CFC-Agar mit 0,5 mg Ciprofloxacin/l	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CFC-Agar mit 4 mg Netilmicin/l	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. putida</i> LMG 2257															
Zugegebener Keimgehalt <i>P. putida</i> LMG 2257 in KbE/ml	10²	10³	10⁴	10²	10³	10⁴	10²	10³	10⁴	10²	10³	10⁴	10²	10³	10⁴
DIN EN ISO 13720:2010-12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CFC-Agar mit 4 mg Imipenem/l	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CFC-Agar mit 0,5 mg Ciprofloxacin/l	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CFC-Agar mit 4 mg Netilmicin/l	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Legende zu Tab. 6 auf der Folgeseite.

Dabei entspricht:

+ = positiver Nachweis des aufgeführten zugegebenen *Pseudomonas*-Stamms

- = negativer Nachweis des aufgeführten zugegebenen *Pseudomonas*-Stamms

Für die Verfahrensvergleichsuntersuchung der DIN EN ISO **13720:2010-12** mit dem hier vorgestellten kulturellen Nachweis- und Zählverfahren konnten für *P. aeruginosa* ATCC 27853 sowie *P. fluorescens* ATCC 13525 für die Lebensmittelmatrices gemischtes Hackfleisch, H-Sahne, Fertigsuppe, geräucherter Lachs und Tomate keine Unterschiede festgestellt werden. Es war möglich, auf jedem der verwendeten Nährböden die jeweils zugegebenen Stämme nachzuweisen. Für den Vergleich der Verfahren mit *P. putida* LMG 2257, konnte kein Nachweis auf dem Nährmedium CFC-Agar mit 0,5 mg Ciprofloxacin/l beobachtet werden. Dies liegt in der Tatsache begründet, dass *P. putida* LMG 2257 gegenüber Ciprofloxacin sensibel ist und daher in Anwesenheit dieses Antibiotikums in dem vorliegenden Gehalt von 0,5 mg/l kein Wachstum erfolgen kann.

5.1.2 Bestimmung der Inklusivität

Ausgehend von der DIN EN ISO **16140-3:2021-06** wurde die Bestimmung der Inklusivität für den jeweils nachzuweisenden Zielkeim aus der Gattung *Pseudomonas* durchgeführt. Da im Rahmen dieses Verfahrens nicht nur eine bestimmte Spezies der Gattung *Pseudomonas*, sondern möglichst alle (multi-)resistenten Pseudomonaden erfasst werden sollten, wurden für die Bestimmung mehrere Spezies herangezogen. Hierzu wurden Vorkulturen in TSB (Oxoid, Wesel; Bebrütung bei 37 °C für 18 h ± 2 h) angesetzt und im Anschluss eine serielle dekadische Verdünnungsreihe in maximaler Wiederbelebungslösung bis Verdünnungsstufe 10⁻⁷ erstellt. Um zu zeigen, dass auch niedrige Keimgehalte von *Pseudomonas* mit dem eigenen Verfahren nachgewiesen werden können, wurden je zweimal 0,5 ml der Verdünnungsstufen 10⁻⁵, 10⁻⁶ und 10⁻⁷ auf die vier verschiedenen Nährböden (CFC-Agar, CFC-Agar mit 4 mg Imipenem/l, CFC-Agar mit 0,5 mg Ciprofloxacin/l und CFC-Agar mit 4 mg Netilmicin/l) ausplattiert und bei 25 °C für 44 h ± 4 h bebrütet. Als Referenzmedium wurde TSA gewählt und mit diesem, wie bereits für die anderen Nährböden beschrieben, verfahren. Es wurden keine Lebensmittelproben für die Bestimmung der Inklusivität verwendet. Die Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt.

Tab. 7: Inklusivität des Zählverfahrens präsumtiv resistenter Pseudomonaden.

Nährmedium	Erwartetes Ergebnis			Tatsächliches Ergebnis		
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853						
Zugegebene Verdünnungsstufe	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
CFC-Agar	Wachstum			Wachstum		
CFC-Agar mit 4 mg Imipenem/l	Wachstum			Wachstum		
CFC-Agar mit 0,5 mg Ciprofloxacin/l	Wachstum			Wachstum		
CFC-Agar mit 4 mg Netilmicin/l	Wachstum			Wachstum		
TSA	Wachstum			Wachstum		
<i>P. fluorescens</i> ATCC 13525						
Zugegebene Verdünnungsstufe	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
CFC-Agar	Wachstum			Wachstum		
CFC-Agar mit 4 mg Imipenem/l	Wachstum			Wachstum		
CFC-Agar mit 0,5 mg Ciprofloxacin/l	Wachstum			Wachstum		
CFC-Agar mit 4 mg Netilmicin/l	Wachstum			Wachstum		
TSA	Wachstum			Wachstum		
<i>P. putida</i> LMG 2257						
Zugegebene Verdünnungsstufe	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
CFC-Agar	Wachstum			Wachstum		
CFC-Agar mit 4 mg Imipenem/l	Wachstum			Wachstum		
CFC-Agar mit 0,5 mg Ciprofloxacin/l	Kein Wachstum			Kein Wachstum		
CFC-Agar mit 4 mg Netilmicin/l	Wachstum			Wachstum		
TSA	Wachstum			Wachstum		

5. Ergebnisse

Nährmedium	Erwartetes Ergebnis			Tatsächliches Ergebnis		
<i>P. fulva</i> S007.A						
Zugegebene Verdünnungsstufe	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
CFC-Agar	Wachstum			Wachstum		
CFC-Agar mit 4 mg Imipenem/l	Wachstum			Wachstum		
CFC-Agar mit 0,5 mg Ciprofloxacin/l	Wachstum			Wachstum		
CFC-Agar mit 4 mg Netilmicin/l	Wachstum			Wachstum		
TSA	Wachstum			Wachstum		
<i>P. fragi</i> H060.A						
Zugegebene Verdünnungsstufe	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
CFC-Agar	Wachstum			Wachstum		
CFC-Agar mit 4 mg Imipenem/l	Wachstum			Wachstum		
CFC-Agar mit 0,5 mg Ciprofloxacin/l	Kein Wachstum			Kein Wachstum		
CFC-Agar mit 4 mg Netilmicin/l	Wachstum			Wachstum		
TSA	Wachstum			Wachstum		

Wie in Tab. 7 zu erkennen ist, konnten die ausgewählten Stämme der getesteten Spezies in allen Verdünnungsstufen ohne Hemmung gezählt werden. Lediglich *P. putida* LMG 2257 sowie *P. fragi* H060.A konnten nicht auf CFC-Agar mit 0,5 mg Ciprofloxacin/l nachgewiesen werden. Dies war jedoch zu erwarten, da diese Stämme gegenüber Ciprofloxacin sensibel sind (siehe Tab. 34, Anhang 9.8). Es konnte zusammengefasst gezeigt werden, dass das hier beschriebene Nachweis- und Zählverfahren für verschiedene Spezies (multi-)resistenter Pseudomonaden geeignet ist.

5.1.3 Bestimmung der Exklusivität

Die Bestimmung der Exklusivität des zu validierenden Verfahrens wurde ausgehend von DIN EN ISO 16140-3:2021-06 durchgeführt. Hierzu wurde eine Stammsammlung verschiedener grampositiver und gramnegativer Bakterien sowie Hefen und Schimmelpilze herangezogen. Dabei wurden auch insbesondere solche Mikroorganismen für die Bestimmung gewählt, die als evtl. störende Begleitflora der Zielkeime in den zu testenden Lebensmitteln vorkommen können. Insgesamt wurden 22 Stämme, welche in Tab. 8 aufgeführt sind, getestet. Für die zu testenden Mikroorganismen wurden Vorkulturen erstellt: Grampositive sowie gramnegative Bakterien (mit Ausnahme von *Campylobacter jejuni*) wurden in TSB (Oxoid, Wesel) überimpft und bei 37 °C für 18 h ± 2 h bebrütet. Für Hefen und Schimmelpilze wurde Sabouraud-Bouillon (eigene Herstellung) gewählt. Die Bebrütung erfolgte bei 25 °C für 44 h ± 4 h. Die Bolton-Bouillon (Oxoid, Wesel) mit anschließender mikroaerophiler Bebrütung bei 37 °C für 18 h ± 2 h wurde für die *Campylobacter*-Vorkultur genutzt. Ausgehend von jeder so erstellten Vorkultur wurde eine serielle dekadische Verdünnungsreihe in physiologischer Kochsalzlösung angefertigt. Von der Verdünnungsstufe 10⁻⁵ wurden je zweimal 0,5 ml auf die vier verschiedenen Nährböden (CFC-Agar, CFC-Agar mit 4 mg Imipenem/l, CFC-Agar mit 0,5 mg Ciprofloxacin/l und CFC-Agar mit 4 mg Netilmicin/l) ausplattiert. Es wurde die Verdünnungsstufe 10⁻⁵ als Verdünnung repräsentativ für eine hohe Keimbelastung gewählt. Als Referenzmedium wurde TSA genutzt und mit diesem, wie bereits für die anderen Nährböden beschrieben, verfahren. Lebensmittelproben wurden für die Bestimmung der Exklusivität nicht verwendet. Es wird der Mittelwert der Koloniezahlen aus zwei Untersuchungen der ausgewerteten Platten angegeben. Die Ergebnisse sind in Tab. 8 aufgeführt.

Tab. 8: Exklusivität des Zählverfahrens präsumtiv resistenter Pseudomonaden.

Mikroorganismus	Erwartetes Typisierungsergebnis					Ergebnis des zu verifizierenden Typisierungsverfahrens				
	CFC	CFC-IMP	CFC-CIP	CFC-NET	TSA	CFC	CFC-IMP	CFC-CIP	CFC-NET	TSA
Gramnegative Bakterien										
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	kW	kW	kW	kW	W	kW	kW	kW	kW	>300
<i>Escherichia coli</i> DSM 5695	kW	kW	kW	kW	W	kW	kW	kW	kW	>300
<i>Escherichia coli</i> CCUG 59343	kW	kW	kW	kW	W	>300	>300	12	63	>300
<i>Escherichia coli</i> CCUG 62975	kW	kW	kW	kW	W	>300	>300	>300	>300	>300

5. Ergebnisse

Mikroorganismus	Erwartetes Typisierungsergebnis					Ergebnis des zu verifizierenden Typisierungsverfahrens				
	CFC	CFC-IMP	CFC-CIP	CFC-NET	TSA	CFC	CFC-IMP	CFC-CIP	CFC-NET	TSA
<i>Escherichia coli</i> 16874	kW	kW	kW	kW	W	6	8	kW	kW	>300
<i>Escherichia coli</i> 106-1	kW	kW	kW	kW	W	kW	kW	kW	kW	>300
<i>Escherichia coli</i> esco ehly	kW	kW	kW	kW	W	kW	kW	kW	kW	>300
<i>Enterobacter roggenkampii</i> CCUG 59573	kW	kW	kW	kW	W	>300	252	kW	kW	>300
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC 13438	kW	kW	kW	kW	W	>300	>300	>300	>300	>300
<i>Salmonella typhimurium</i> LMG 149371b	kW	kW	kW	kW	W	kW	kW	kW	kW	168
<i>Yersinia enterocolitica</i> DSM 13030	kW	kW	kW	kW	W	178	189	kW	191	>300
<i>Acetobacter cerevisiae</i> DSM 14362	kW	kW	kW	kW	W	kW	kW	kW	kW	159
<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33291	kW	kW	kW	kW	W	kW	kW	kW	kW	201
Grampositive Bakterien										
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 9139	kW	kW	kW	kW	W	kW	kW	kW	kW	134
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124	kW	kW	kW	kW	W	kW	kW	kW	kW	>300
<i>Lactobacillus gasseri</i> DSM 20077	kW	kW	kW	kW	W	kW	kW	kW	kW	>300
<i>Listeria monocytogenes</i> NCTC 10527	kW	kW	kW	kW	W	kW	kW	kW	kW	>300
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	kW	kW	kW	kW	W	kW	kW	kW	kW	>300
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	kW	kW	kW	kW	W	kW	kW	kW	kW	>300

Mikroorganismus	Erwartetes Typisierungsergebnis					Ergebnis des zu verifizierenden Typisierungsverfahrens				
	CFC	CFC-IMP	CFC-CIP	CFC-NET	TSA	CFC	CFC-IMP	CFC-CIP	CFC-NET	TSA
Hefen und Schimmelpilze										
<i>Candida albicans</i> ATCC 10213	kW	kW	kW	kW	W	kW	kW	kW	kW	>300
<i>Penicillium cyclopium</i> ATCC 16025	kW	kW	kW	kW	W	kW	kW	kW	kW	>300
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9673	kW	kW	kW	kW	W	kW	kW	kW	kW	>300

Dabei entspricht:

CFC-IMP = CFC-Agar mit 4 mg Imipenem/l

CFC-CIP = CFC-Agar mit 0,5 mg Ciprofloxacin/l

CFC-NET = CFC-Agar mit 4 mg Netilmicin/l

kW = kein Wachstum

W = Wachstum

Wie in Tab. 8 zu erkennen ist, erfolgte kein Wachstum bei den getesteten grampositiven Bakterien sowie den geprüften Hefen und Schimmelpilzen. Die Exklusivität kann für diese Gruppen folglich mit einem Wert von 100 % angegeben werden. Auch das Wachstum der meisten gramnegativen Mikroorganismen wird unterdrückt. Lediglich bei den Stämmen *K. pneumoniae* NCTC 13438 mit einer KPC-3-Carbapenemase, *E. roggenkampii* CCUG 59573 mit einer ACT-1- β -Laktamase, *Y. enterocolitica* DSM 13030 und den *E. coli*-Stämmen 16874 mit einer OXA-48-Carbapenemase, CCUG 62975 mit einer CIT- und einer CTX-M-1- β -Laktamase und CCUG 59343 mit einer CMY-2- β -Laktamase konnte Wachstum auf mindestens einer der getesteten Platten beobachtet werden. Die genannten Stämme werden folglich nicht durch die gewählten Nährmedienzusammensetzungen vollständig in ihrem Wachstum gehemmt. Es ergibt sich folglich für die Exklusivität ein Wert von 73 %.

5.1.4 Bestimmung der Spezifität

Die Spezifität ist ein rein rechnerisch zu bestimmender Wert, der den Nachweis angibt, dass Nicht-Zielorganismen, wenn sie auf dem zu prüfenden Nährmedium wachsen können, nicht dieselben visuellen Merkmale wie die Zielkeime aufweisen [DIN EN ISO 11133:2020-10]. Die Berechnung

erfolgte analog zu Gleichung (1) und der in Tab. 6 und Abschnitt 5.1.1 aufgeführten Ergebnisse der Verfahrensvergleichsuntersuchung. Es ergibt sich:

$$\text{Spezifität [\%]} = \frac{d}{c+d} \cdot 100 = \frac{1}{0+1} \cdot 100 = 100 \% \quad (10)$$

Dabei entspricht c der Anzahl der falsch positiven Analysenergebnissen (Tab. 6, Abschnitt 5.1.1) bezüglich der Referenzmethode und d der Anzahl bei beiden Methoden negativen Analysenergebnisse (entspricht den Blindwerten).

Somit beträgt die berechnete Spezifität für das hier beschriebene Verfahren 100 %.

5.1.5 Bestimmung der Selektivität

Der Zweck der Bestimmung der Selektivität ist es zu zeigen, dass bei dem eingesetzten Verfahren störende (Nicht-Ziel-)Keime durch das verwendete Nährmedium entweder teilweise oder vollständig gehemmt werden [DIN EN ISO **11133:2020-10**]. Für die Bestimmung der Selektivität wurde unter anderem *E. coli* ATCC 25922 als Referenzkeim herangezogen. Diese Spezies ist häufig Teil der Begleitflora der zu testenden Lebensmittelgruppen Fleisch, Fisch, Milchprodukte und pflanzliche Lebensmittel [Vincent et al., **2010**; Costa, **2013**; Rasheed et al., **2014**]. Des Weiteren führt die DIN EN ISO **11133:2020-10** den Stamm *E. coli* ATCC 25922 als Prüfkeim für die Bestimmung der Selektivität für CFC-Agar (ohne Zugabe von zusätzlichen Antibiotika) auf. Zudem wurden, wie in 5.1.3 aufgeführt, exemplarisch für die Gruppe „Hefen und Schimmelpilze“ *S. cerevisiae* ATCC 9673 sowie *B. cereus* ATCC 9139 für die Gruppe „grampositive Bakterien“ für die Bestimmung der Selektivität gewählt. Es wurde für jeden der drei Stämme eine serielle dekadische Verdünnungsreihe in physiologischer Kochsalzlösung bis 10^{-8} erstellt. Jeweils 100 µl der Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-8} wurden auf die vier Nährböden (CFC-Agar, CFC-Agar mit 4 mg Imipenem/l, CFC-Agar mit 0,5 mg Ciprofloxacin/l und CFC-Agar mit 4 mg Netilmicin/l) sowie TSA als Referenzmedium ausplattiert und bei 25 °C für 44 h ± 4 h bebrütet. Die Auswertung der Platten erfolgte durch Zählen der Kolonien und die Berechnung der Selektivität nach Gleichung (2). Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tab. 9: Ergebnisse der Bestimmung der Selektivität.

Medium	Stufe 10 ⁻¹	Stufe 10 ⁻²	Stufe 10 ⁻³	Stufe 10 ⁻⁴	Stufe 10 ⁻⁵	Stufe 10 ⁻⁶	Stufe 10 ⁻⁷	Stufe 10 ⁻⁸	Berechnete Selektivität
<i>E. coli</i> ATCC 25922									
TSA	>300	>300	>300	>300	>300	34	1	0	-
CFC	0	0	0	0	0	0	0	0	7
CFC-IMP	0	0	0	0	0	0	0	0	7
CFC-CIP	0	0	0	0	0	0	0	0	7
CFC-NET	0	0	0	0	0	0	0	0	7
<i>S. cerevisiae</i> ATCC 9673									
TSA	>300	>300	>300	38	3	0	0	0	-
CFC	0	0	0	0	0	0	0	0	5
CFC-IMP	0	0	0	0	0	0	0	0	5
CFC-CIP	0	0	0	0	0	0	0	0	5
CFC-NET	0	0	0	0	0	0	0	0	5
<i>B. cereus</i> ATCC 9139									
TSA	>300	>300	>300	103	12	3	0	0	-
CFC	0	0	0	0	0	0	0	0	6
CFC-IMP	0	0	0	0	0	0	0	0	6
CFC-CIP	0	0	0	0	0	0	0	0	6
CFC-NET	0	0	0	0	0	0	0	0	6

Dabei entspricht:

CFC-IMP = CFC-Agar mit 4 mg Imipenem/l

CFC-CIP = CFC-Agar mit 0,5 mg Ciprofloxacin/l

CFC-NET = CFC-Agar mit 4 mg Netilmicin/l

Bei allen getesteten Nährmedien, abgeleitet von CFC-Agar, wurden Selektivitätsfaktoren von 5 bis 7 berechnet. Dies zeigt, dass *E. coli* ATCC 25922, *S. cerevisiae* ATCC 9673 und *B. cereus* ATCC 9139 durch das verwendete Nährmedium und die Antibiotika vollständig gehemmt werden.

5.1.6 Bestimmung der Produktivität

Die Produktivität beschreibt den Wiederfindungsgrad eines Zielkeims vom Nährmedium unter definierten Bedingungen [DIN EN ISO 11133:2020-10]. Hierzu wurden für die zu testenden Stämme der Gattung *Pseudomonas* serielle dekadische Verdünnungsreihen bis 10⁻⁶ in physiologischer

Kochsalzlösung erstellt. Von der Verdünnungsstufe 10^{-6} wurden je zweimal 100 μ l auf die vier Nährböden (CFC-Agar, CFC-Agar mit 4 mg Imipenem/l, CFC-Agar mit 0,5 mg Ciprofloxacin/l und CFC-Agar mit 4 mg Netilmicin/l) sowie TSA als Referenzmedium ausplattiert. Die Bebrütung erfolgte bei 25 °C für 44 h \pm 4 h. Durch Zählen der Kolonien und Bildung des Quotienten aus der Koloniezahl auf dem jeweiligen Testmedium und der Koloniezahl auf dem Referenzmedium (siehe Gleichung (3)) wurde das Maß der Produktivität berechnet. Für die Bestimmung der Produktivität wurden die Stämme *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. fluorescens* ATCC 13525 und *P. putida* LMG 2257 verwendet. Um zu zeigen, dass das Verfahren nicht nur für eine Lebensmittelkategorie herangezogen werden kann, wurde für jeden der genannten *Pseudomonas*-Stämme die Validierung für die Warengruppen Fleisch (hier: gemischtes Hackfleisch), Sahne (hier: H-Sahne), Fertiggerichte (hier: Suppe), Fisch (hier: Räucherlachs) und pflanzliche Lebensmittel (hier: Tomate) durchgeführt. Die Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt. Es wird der Mittelwert der Koloniezahlen aus zwei Untersuchungen der ausgewerteten Platten angegeben.

Tab. 10: Ergebnisse der Bestimmung der Produktivität durch Vergleich der Koloniezahlen der Pseudomonaden auf Selektivnährböden mit TSA.

Medium	gem. Hack	P ^a	H-Sahne	P ^b	Suppe	P ^c	ger. Lachs	P ^d	Tomate	P ^e
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 (Koloniezahl)										
CFC	38	0,8	99	1,2	59	1,4	85	1,1	83	1,2
CFC-IMP	24	0,5	75	0,9	65	1,5	87	1,1	77	1,1
CFC-CIP	48	1,0	83	1,1	73	2,0	88	1,1	61	0,8
CFC-NET	42	0,9	65	0,8	63	1,5	76	0,9	60	0,8
TSA	47	-	79	-	42	-	80	-	72	-
<i>P. fluorescens</i> ATCC 13525 (Koloniezahl)										
CFC	59	1,2	59	1,1	60	1,2	65	0,9	57	1,1
CFC-IMP	64	1,3	49	0,9	57	1,1	61	0,8	62	1,2
CFC-CIP	39	0,9	47	0,9	34	0,8	62	0,9	49	1,0
CFC-NET	71	1,4	65	1,2	60	1,2	75	1,0	69	1,4
TSA	50	-	54	-	52	-	72	-	51	-
<i>P. putida</i> LMG 2257 (Koloniezahl)										
CFC	40	1,3	35	0,8	44	1,0	20	0,9	30	1,3
CFC-IMP	38	1,2	41	0,9	61	1,4	16	0,7	27	1,1
CFC-CIP	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
CFC-NET	27	0,8	33	0,8	40	0,9	24	1,1	26	1,1
TSA	32	-	45	-	45	-	22	-	24	-

Legende zu Tab. 10 auf der Folgeseite

Dabei entspricht:

P^a = berechnete Produktivität der Proben von gemischtem Hack

P^b = berechnete Produktivität der H-Sahneproben

P^c = berechnete Produktivität der Fertigsuppenproben

P^d = berechnete Produktivität der Räucherlachsproben

P^e = berechnete Produktivität der Tomatenproben

CFC-IMP = CFC-Agar mit 4 mg Imipenem/l

CFC-CIP = CFC-Agar mit 0,5 mg Ciprofloxacin/l

CFC-NET = CFC-Agar mit 4 mg Netilmicin/l

Es konnte für alle der drei getesteten *Pseudomonas*-Stämme für die Nährmedien CFC-Agar, CFC-Agar mit 4 mg Imipenem/l und CFC-Agar mit 4 mg Netilmicin/l eine Produktivität von 0,5 bis 1,5 bestimmt werden. Für das Nährmedium CFC-Agar mit 0,5 mg Ciprofloxacin/l konnte eine Produktivität von 0,8 bis 2,0 berechnet werden - mit Ausnahme der Validierungen mit *P. putida* LMG 2257, da dieser Stamm sensibel gegenüber Ciprofloxacin ist. Gemäß DIN EN ISO **11133:2020-10** soll der Wert der Produktivität bei der Verwendung eines selektiven Mediums (hier: CFC) und eines nicht- selektiven Nährmediums (hier: TSA) einen Wert von 0,5 nicht unterschreiten. Mit den bestimmten Werten von 0,5 bis 2,0 erfüllt das zu validierende kulturelle Nachweis- und Zählverfahren für (multi-)resistente Pseudomonaden diese Anforderungen.

5.1.7 Bestimmung der Sensitivität

Die Sensitivität gibt an wie viel Prozent der untersuchten Proben sowohl mit der Referenzmethode als auch mit der zu validierenden Alternativmethode als positiv erkannt werden [SAS, **2017**]. Die Berechnung erfolgt analog zu Gleichung (4). Da mit beiden Methoden insgesamt alle Proben als positiv erkannt wurden und kein Nachweis eines falsch negativen Analyseergebnisses bezüglich der Referenzmethode erfolgt ist, ergibt sich:

$$\text{Sensitivität [\%]} = \frac{a}{a+b} \cdot 100 = \frac{10}{10+0} \cdot 100 = 100 \% \quad (11)$$

Die für das hier beschriebene kulturelle Nachweis- und Zählverfahren bestimmte Sensitivität beträgt somit 100 %.

5.1.8 Bestimmung des eLOD₅₀

Die Berechnung des estimated Level Of Detection (eLOD₅₀) wurde, wie in DIN EN ISO **16140-3:2021-06** beschrieben, durchgeführt. Dazu wurde der qualitative Teil des zu

validierenden kulturellen Nachweis- und Zählverfahrens, ausgehend von Protokoll 1 der genannten Norm, hinzugezogen. Um zunächst das so genannte „Low Inoculation Level“ mittels Most-Probable-Number (MPN)-Verfahren zu bestimmen, wurden erneut die bereits zuvor verwendeten Lebensmittel gemischtes Hackfleisch, Räucherlachs, H-Sahne, Fertigsuppe und Tomate herangezogen und künstlich mit je drei unterschiedlichen Keimgehalten der *Pseudomonas*-Stämme *P. aeruginosa* ATCC 27853 und *P. fluorescens* ATCC 13525 kontaminiert. Diese drei Inokula wurden „High“, „Intermediate“ und „Low“ genannt und stehen für einen hohen, mittleren und niedrigen Keimgehalt. Um diese Keimgehalte herzustellen, wurden für die jeweiligen Stämme serielle dekadische Verdünnungsreihen in steriler maximaler Wiederbelebungslösung bis Verdünnungsstufe 10^{-6} erstellt. Ausgehend von Verdünnungsstufe 10^{-6} wurden dann die Verdünnungen „High“, „Intermediate“ und „Low“ angefertigt, indem jede Verdünnungsstufe, ausgehend von der vorherigen, jeweils um den Faktor 3 verdünnt wurde.

Um nachvollziehen zu können, wie hoch der tatsächliche Keimgehalt in den Verdünnungsstufen „High“, „Intermediate“ und „Low“ zum Zeitpunkt der Kontamination war, wurden von den genannten Verdünnungsstufen je 100 µl auf TSA ausplattiert, bei 25 °C für 44 h \pm 4 h bebrütet und anschließend ausgewertet. Die folgende Tab. 11 listet die Ergebnisse auf.

Tab. 11: Koloniezahlbestimmung von Pseudomonaden auf TSA in Abhängigkeit von der Lebensmittelmatrix.

Verdünnungsstufe	Koloniezahl auf TSA in jeweiliger Lebensmittelmatrix				
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853					
	gem. Hack	Sahne	Suppe	ger. Lachs	Tomate
High (6 x Low = 10^{-6})	18	19	23	35	19
Intermediate (3 x Low = $3,3 \times 10^{-5}$)	2	6	6	12	6
Low (= $1,1 \times 10^{-5}$)	0	1	1	2	1
<i>P. fluorescens</i> ATCC 13525					
High (6 x Low = 10^{-6})	16	12	10	41	15
Intermediate (3 x Low = $3,3 \times 10^{-5}$)	6	3	5	16	6
Low (= $1,1 \times 10^{-5}$)	1	0	2	2	0

Ausgehend von Protokoll 1 der DIN EN ISO **16140-3:2021-06** wurden dann die Analysen für die Verdünnungsstufe „High“ einmal und für die Verdünnungsstufen „Intermediate“ und „Low“ je viermal durchgeführt. Das bedeutet, dass je 100 µl der entsprechenden Verdünnungsstufe in der genannten Anzahl an Ansätzen und für jedes der zuvor aufgeführten Lebensmittel ausplattiert wurden. Zusätzlich wurde für jede Bestimmung ein Blindwert mitgeführt. Anhand der Anzahl der positiven Nachweise und der in DIN EN ISO **16140-3:2021-06** aufgeführten Tabelle, konnte der eLOD₅₀ abgelesen werden. Die Ergebnisse für das Nachweisverfahren nach Anreicherung in TSB mit Cefpodoxim und nachfolgender CFC-Platte mit zusätzlichen Antibiotika sind im Folgenden aufgeführt.

Tab. 12: eLOD₅₀ in KbE/25 g Probe von resistenten Pseudomonaden im selektiven Nachweisverfahren.

	gem. Hack	Sahne	Suppe	ger. Lachs	Tomate
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7
<i>P. fluorescens</i> ATCC 13525	0,6	0,9	1,2	0,9	1,7

Auf die Verwendung des Stammes *P. putida* LMG 2257 wurde für die Bestimmung des eLOD₅₀ verzichtet, da dieser bei der Verdünnungsstufe 10⁻⁶ kein Wachstum mehr auf den verwendeten Nährmedien CFC-Agar mit Imipenem und CFC-Agar mit Netilmicin (je 4 mg/l) zeigte. Zusätzlich weist der genannte Stamm eine Sensitivität gegenüber Ciprofloxacin in der verwendeten Konzentration von 0,5 mg/l auf und zeigt somit auch auf diesem Nährmedium kein Wachstum.

5.1.9 Bestimmung der Falsch-Positiv-Rate

Die Falsch-Positiv-Rate, welche sich nach Gleichung (5) berechnen lässt, gibt an, wie viel Prozent der Proben mit dem alternativen Prüfverfahren als falsch positive Befunde gewertet wurden [SAS, 2017].

$$\text{Falsch-Positiv-Rate [\%]} = \frac{c}{c+d} \cdot 100 = \frac{0}{0+1} \cdot 100 = 0 \% \quad (12)$$

Die Falsch-Positiv-Rate beträgt somit 0 %.

5.1.10 Bestimmung der Falsch-Negativ-Rate

Wie viel Prozent der Proben mit dem alternativen Prüfverfahren als falsch negative Befunde gewertet wurden, wird als Falsch-Negativ-Rate bezeichnet und analog zu Gleichung (6) berechnet [SAS, 2017].

$$\text{Falsch-Negativ-Rate [\%]} = \frac{b}{a+b} \cdot 100 = \frac{0}{10+0} \cdot 100 = 0 \% \quad (13)$$

Die für das hier beschriebene Verfahren beträgt die Falsch-Negativ-Rate folglich 0 %.

5.1.11 Bestimmung der relativen Richtigkeit

Bei der relativen Richtigkeit handelt es sich um das Ausmaß des Messergebnisses vom „richtigen Wert“. Es wird die geschätzte Wahrscheinlichkeit angegeben, dass die beiden Methoden des Methodenvergleichs auch die gleichen Resultate ergeben. Die Berechnung erfolgt mit Hilfe von Gleichung (7) [SAS, 2017].

$$\text{relative Richtigkeit [\%]} = \frac{a+d}{n} \cdot 100 \frac{10+1}{11} \cdot 100 = 100 \% \quad (14)$$

Für das hier beschriebene Nachweis- und Zählverfahren wurde eine relative Richtigkeit von 100 % bestimmt.

5.1.12 Bestimmung der statistischen Übereinstimmung

Die statistische Übereinstimmung oder auch das Konkordanzindex Kappa, welches mittels Gleichung (8) berechnet werden kann, beschreibt das Maß der Übereinstimmung zweier Prüfverfahren bezüglich eines Analysenmerkmals. Für das hier beschriebene Verfahren konnte ein Konkordanzindex von 1 bestimmt werden. Zwischen der in DIN EN ISO **13720:2010-12** benannten Methode und dem hier beschriebenen Verfahren liegt folglich eine fast vollständige Übereinstimmung vor.

5.2 Untersuchungen von Lebensmitteln auf das Vorkommen (multi-) resistenter Pseudomonaden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 184 Lebensmittel auf das Vorkommen von (multi-)resistenten Pseudomonaden untersucht. Dazu wurde das zuvor validierte kulturelle Nachweis- und Zählverfahren verwendet. Die analysierten Lebensmittel setzten sich wie folgt zusammen: 64 Proben (roh) verzehrbare Hackfleisch, 19 Lachsproben, elf weitere Fischproben (Thunfisch, Forelle, Garnelen und Seelachs), 51 Proben pflanzliche Lebensmittel (darunter Tomaten, diverse Blattsalate, und frische Kräuter), 23 aufgeschlagene Sahneproben aus Eiscafé und 16 weitere Proben, wie Rohmilchkäse, Sahnedesserts und verarbeitete Fleischgerichte (u. a. Rindergulasch sowie Lammfleisch).

131 der untersuchten 184 Lebensmittelproben waren bereits verzehrfertig. Diese gliedern sich in 23 Hackfleisch-, 22 aufgeschlagene Sahne-, 19 Lachs- und zehn weitere Fischproben. Sechs Lebensmittel der Kategorie „diverse weitere Lebensmittel“ waren ebenfalls zum sofortigen Verzehr geeignet. Zudem waren alle der 51 untersuchten pflanzlichen Lebensmittel in einem verzehrfertigen Zustand.

Ferner stammten 81 Planproben aus dem Einzelhandel (alle 51 untersuchten pflanzlichen Lebensmittel, sowie neun Hackfleisch-, 13 Lachs- und acht Fischproben) und 103 Proben aus gastronomischen Betrieben. Letztere wurden im Rahmen von Lebensmittelkontrollen entnommen und gliedern sich in 95 so genannte Planproben und acht Anlassproben amtlicher Hygienekontrollen.

Die Identifizierung der präsumtiv (multi-)resistenten *Pseudomonas*-Spezies erfolgte wie unter Abschnitt 4.5 beschrieben mittels MALDI-TOF-MS. Die Liste der untersuchten Lebensmittel ist in Tab. 32 in Anhang 9.6 aufgeführt. Tab. 33 (siehe Anhang 9.7) listet zudem alle isolierten Spezies auf und gibt Auskunft darüber, aus welchen Lebensmitteln diese jeweils isoliert wurden.

5.2.1 Qualitative Untersuchung

Von den 184 untersuchten Lebensmitteln wurden aus insgesamt 92 Proben (entspricht 50 %) á 25 g Vertreter der Gattung *Pseudomonas* isoliert. Kein Nachweis von Pseudomonaden erfolgte in 92 Lebensmitteln (entspricht ebenfalls 50 %). Von den 184 untersuchten Lebensmitteln handelte es sich insgesamt um 176 Planproben, von denen aus zusammengefasst 91 Proben Pseudomonaden isoliert wurden. Dies entspricht einem prozentualen Anteil von 52 %. Folglich wurden in 85 Proben (entspricht 48 %) keine Pseudomonaden nachgewiesen. Die getrennte Betrachtung der Anlassproben ergab, dass nur aus einer dieser Proben Pseudomonaden isoliert wurden (entspricht 13 %). Sieben der acht Anlassproben (entspricht 88 %) enthielten nachweislich keine Bakterien der Gattung *Pseudomonas*. Abb. 8 stellt diese Zusammenhänge graphisch dar.

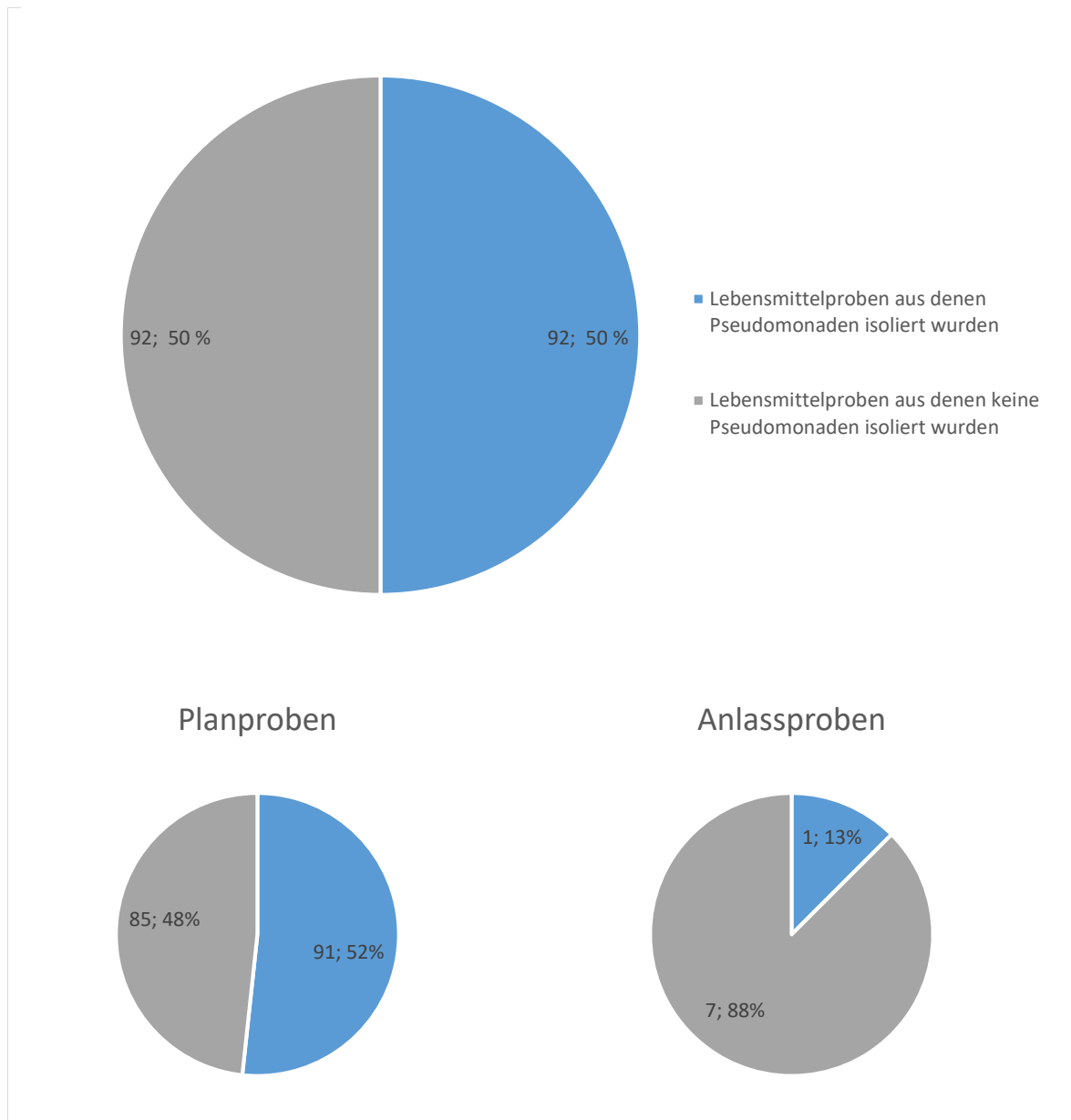


Abb. 8: Prozentuale Verteilung der 184 Lebensmittelproben hinsichtlich der Isolation von Pseudomonaden (oben) sowie Aufteilung nach 176 Plan- und acht Anlassproben (unten).

Von den 92 Proben aus denen Pseudomonaden isoliert werden konnten, zeigte sich nach Durchführung der Resistenztestungen (siehe Abschnitt 5.4), dass in 14 Proben Pseudomonaden nachgewiesen und isoliert wurden, die nicht gegen eines der getesteten Antibiotika in den entsprechend verwendeten Nährböden resistent waren. Somit enthielten 78 der analysierten Lebensmittelproben (davon eine Anlassprobe) jeweils mindestens ein Isolat der Gattung *Pseudomonas*, welches eine oder mehrere Resistenzen gegenüber den Antibiotika der verwendeten Nährböden aufwies. Dies entspricht 85 % der untersuchten Proben mit Pseudomonaden und 42 % aller untersuchten Lebensmittelproben. Diese Proben werden im folgenden Teil der vorliegenden Arbeit zusammengefasst als „präsumtiv (multi-)resistente Pseudomonaden“ bezeichnet.

In Bezug auf die einzelnen Warengruppen zeigt Abb. 9 eine Gegenüberstellung der jeweiligen Anzahl der untersuchten Proben von 25 g, der Anzahl Proben aus denen (keine) Pseudomonaden isoliert wurden sowie die Summe der Proben, aus denen präsumtiv (multi-)resistente Pseudomonaden nachgewiesen werden konnten.

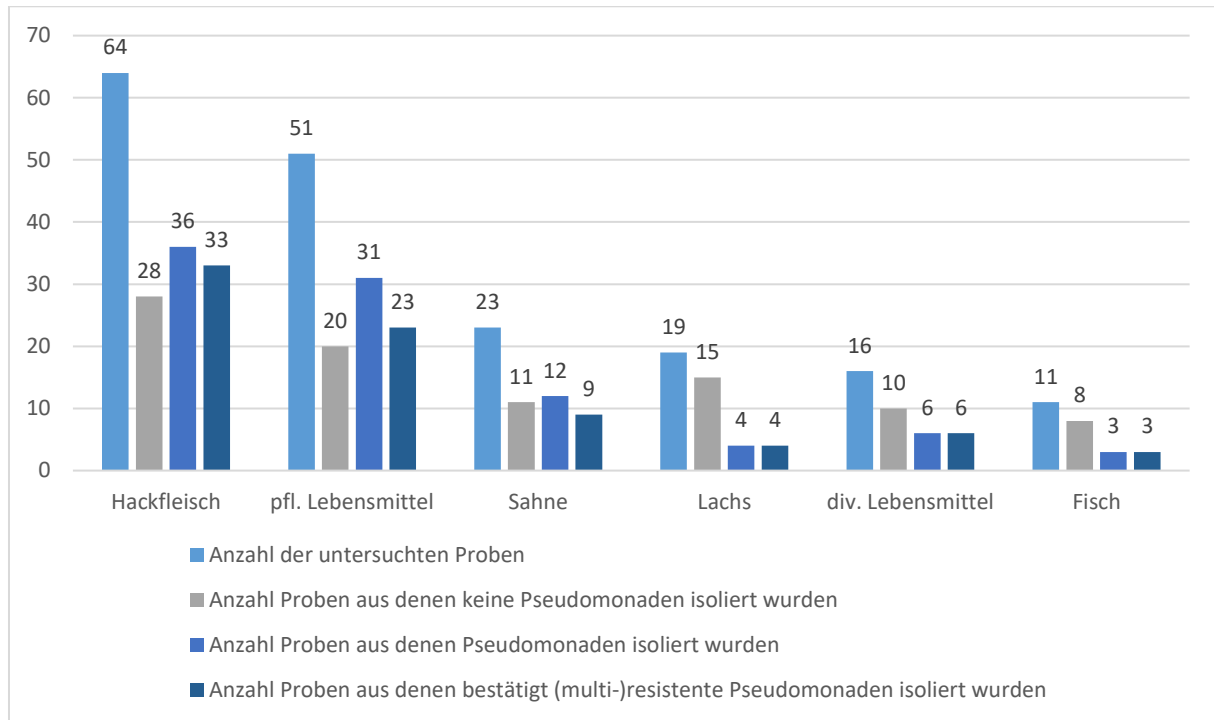


Abb. 9: Anzahl der untersuchten Proben der jeweiligen Lebensmittelkategorie und jeweiliger Anteil der Proben aus denen keine Pseudomonaden, Pseudomonaden und (multi-) resistente Pseudomonaden isoliert wurden.

Zusammengefasst wurden aus den 184 untersuchten Lebensmittelproben (davon 176 randomisierte Proben) 211 Isolate (davon elf Isolate aus einer nicht-randomisierten Sahneprobe, genauer: einer Verfolgsprobe) der Gattung *Pseudomonas* gewonnen, welche mindestens gegenüber eines der getesteten Antibiotika in der verwendeten Nährbodenkonzentration resistent waren.

Dabei konnten 22 verschiedene *Pseudomonas*-Spezies nachgewiesen werden. Die Identifikation erfolgte, wie in Abschnitt 4.5 beschrieben, mittels MALDI-TOF-MS. Am häufigsten wurde hierbei die Spezies *P. fulva* mit 68 Isolaten (entspricht 32 % bzw. 34 % bezogen auf die 200 Isolate) gewonnen. 32-mal bzw. 21-mal unter Berücksichtigung der nicht-randomisierten Anlassprobe (entspricht 15 % bzw. 11 %) wurde *P. aeruginosa* isoliert, gefolgt von *P. putida* mit 26 Isolaten (12 % bzw. 13 % von 200 Isolaten). Die Spezies *P. fragi* und *P. koreensis* wurden insgesamt je 18-mal bzw. 15-mal (entspricht je 9% bzw. jeweils 8 %) nachgewiesen. Sieben (entspricht 3 % bzw. 4 %) der Isolate zählten zur Spezies *P. monteilii* und ebenfalls sieben (3 % bzw. 4 %) zur Spezies *P. lundensis*. Sechs (je 3 %) Isolate gehörten zu der Spezies *P. corrugata* und fünf (entspricht 2 % bzw. 3 %) zu

P. rhodesiae. Je vier Isolate (entspricht jeweils 2 %) zu den Spezies *P. gessardii* bzw. *P. flavescens* und je drei Isolate (1 % bzw. 2 %) zu den Spezies *P. fluorescens*, *P. chlororaphis* und nicht näher definierbar „*Pseudomonas* spp.“. Die Spezies *P. libanensis* und *P. guariconensis* wurden je zweimal (jeweils 1 %) bestimmt. Jeweils ein Isolat (entspricht je 0,5 %) der Spezies *P. brassicacearum*, *P. oleovorans*, *P. synxantha*, *P. frederiksbergensis*, *P. plecoglossicida* und der Gattung *Pseudomonas* wurden ebenfalls in den untersuchten Lebensmitteln nachgewiesen und isoliert. Abb. 10 zeigt die Verteilung der isolierten Pseudomonaden aus allen 184 Proben graphisch. Abb. 11 stellt die Verteilung für die 200 Isolate aus den randomisierten 176 Proben dar.

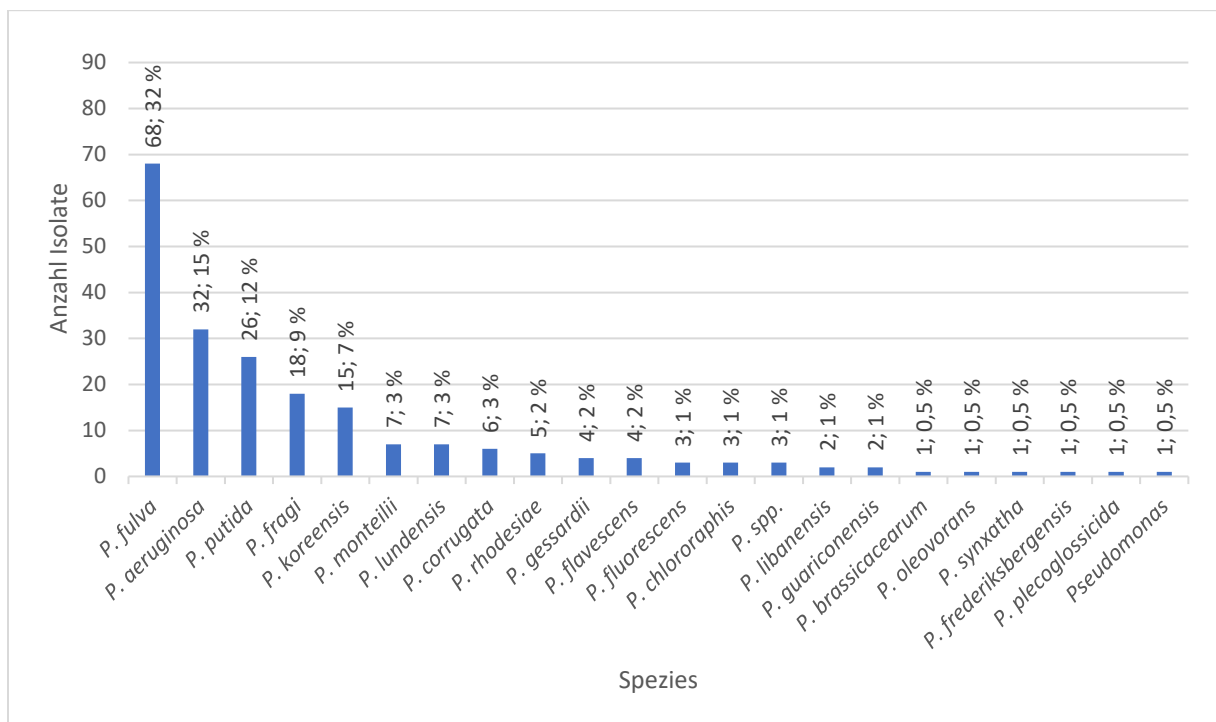


Abb. 10: Verteilung der aus den untersuchten 184 Lebensmittelproben isolierten präsumtiv (multi-)resistenten Pseudomonaden, sortiert nach Spezies.

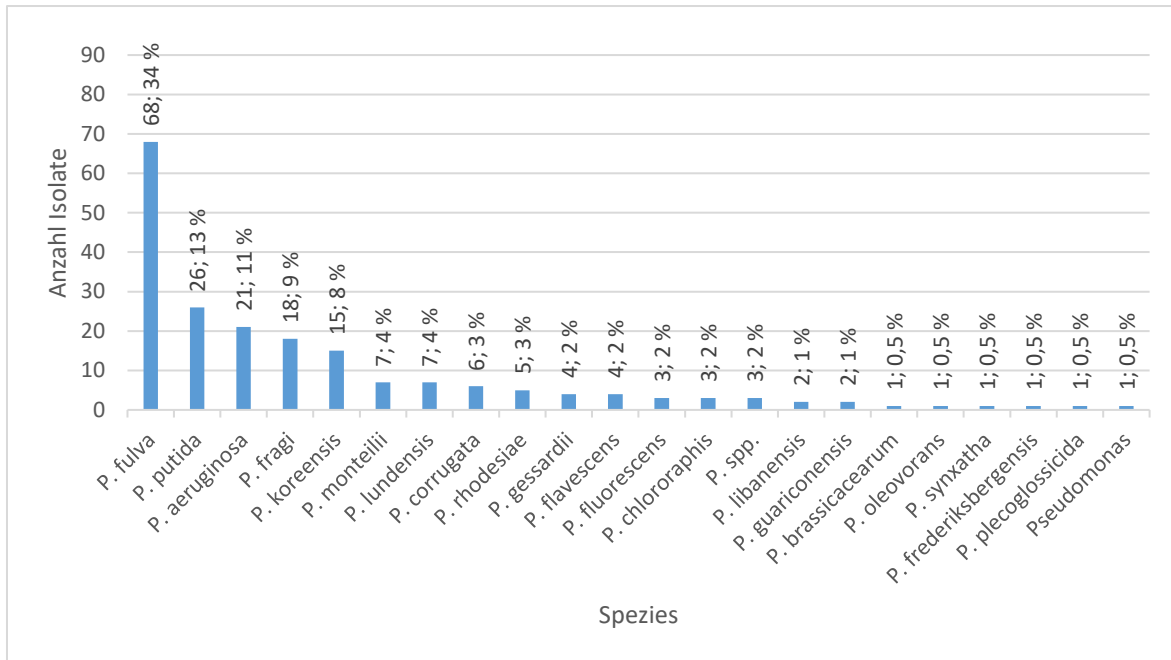


Abb. 11: Verteilung der aus den 176 untersuchten randomisierten Lebensmittelproben isolierten präsumtiv (multi-)resistenten Pseudomonaden, sortiert nach Spezies.

Bezogen auf den Anteil der untersuchten 184 Proben bzw. 176 randomisierten Proben aus denen die jeweiligen Pseudomonaden einer Spezies isoliert wurden, ergeben sich folgende Werte:

Die Isolate der Spezies *P. fulva* wurden aus 25 der untersuchten 184 bzw. 176 Lebensmittelproben isoliert. Dies entspricht einem Anteil von je 14 %. Aus 15 Proben stammt die Spezies *P. fragi* (entspricht 8 % bzw. 9 %). Aus 13 Proben (je 7 %) stammen die Isolate der Spezies *P. koreensis* und *P. putida* wohingegen *P. aeruginosa* aus neun bzw. acht randomisierten Proben (jeweils 5 %) isoliert werden konnte. *P. corrugata* wurde aus sechs bzw. je 3 % der Proben, *P. monteilli* aus fünf (entspricht je 3 %) und *P. rhodesiae* aus vier Proben (je 2 %) gewonnen. Aus je drei Proben (je 2 %) stammen die Isolate der Spezies *P. gessardii*, *P. flavescens*, *P. fluorescens* und *P. chlororaphis*. *P. libanensis* und *P. lundensis* sowie „*Pseudomonas* spp.“ stammen aus jeweils zwei Proben. Dies entspricht einem prozentualen Anteil von jeweils 1 %. *P. guariconensis*, *P. oleovorans*, *P. synxantha*, *P. frederiksbergensis*, *P. plecoglossicida*, *P. brassicacearum* und ein Isolat der Gattung *Pseudomonas* wurden aus je aus einer (entspricht 0,5 % bzw. 1 %) der untersuchten Lebensmittelproben isoliert.

5. Ergebnisse

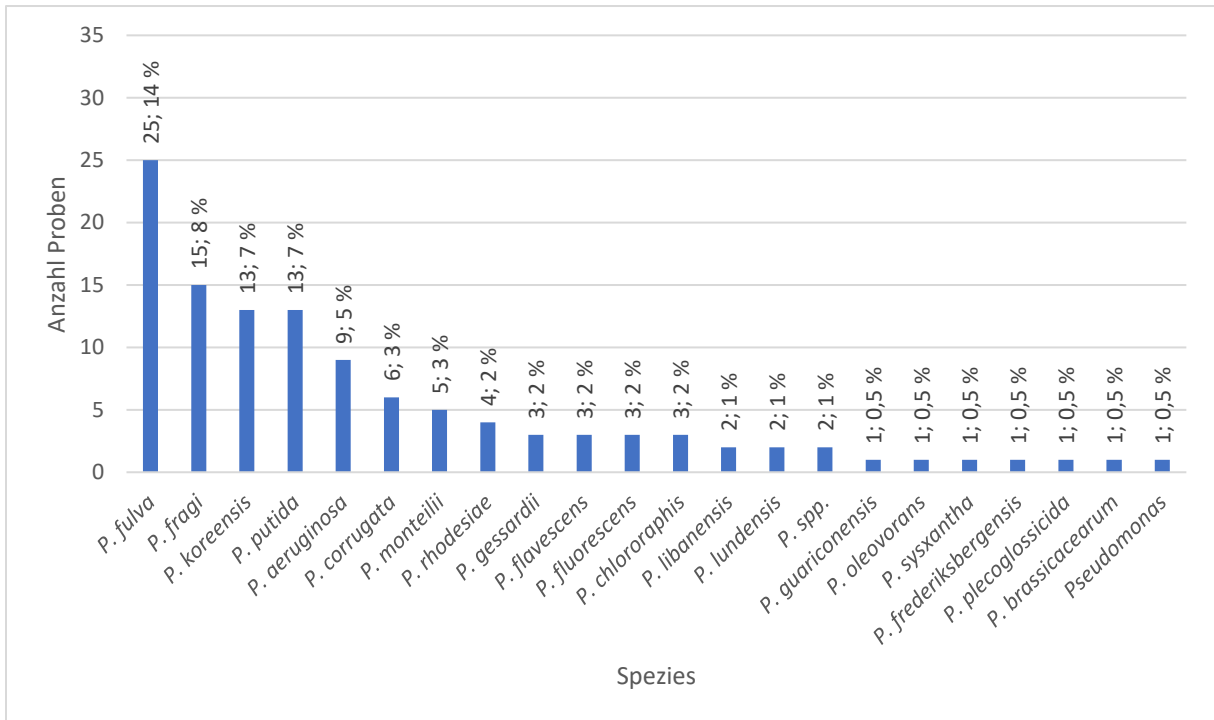


Abb. 12: Anzahl und prozentualer Anteil der 184 Proben aus denen die jeweilige Spezies isoliert wurde.

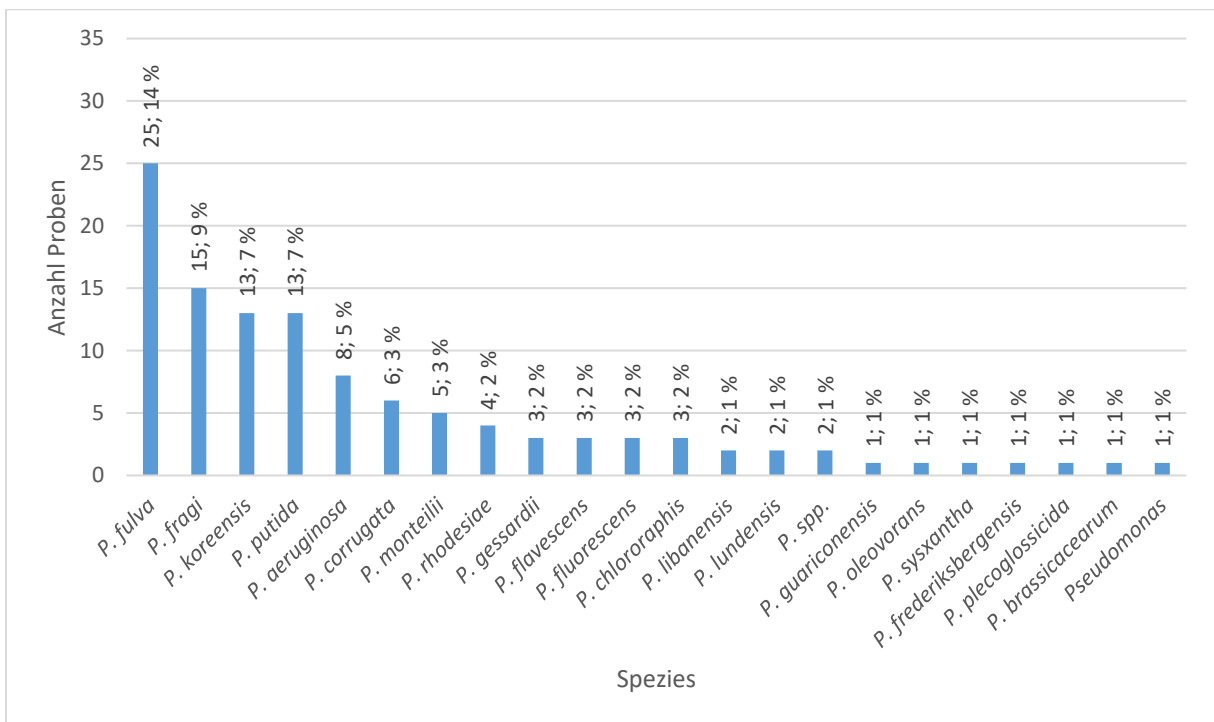


Abb. 13: Anzahl und prozentualer Anteil der 176 randomisierten Proben aus denen die jeweilige Spezies isoliert wurde.

5.2.2 Warengruppe Hackfleisch

Im Folgenden sind die Ergebnisse der qualitativen Untersuchungen der Warengruppe Hackfleisch aufgeführt. Aus 36 der 64 untersuchten Hackfleischproben wurden Bakterien der Gattung *Pseudomonas* isoliert. Nach Resistenztestung zeigte sich, dass von diesen 36 Proben nur in 33

Proben präsumtiv (multi-)resistente Pseudomonaden vorhanden waren. Dies entspricht einem Anteil von 52 %. Abb. 14 zeigt das Vorkommen der einzelnen isolierten Spezies der Gattung *Pseudomonas* in den untersuchten Hackfleischproben, in Bezug auf die Anzahl der Proben, aus denen diese isoliert werden konnten. Aus jeder der analysierten Proben der Warengruppe wurden pro Nährmedium bis zu fünf Kolonien isoliert und mittels MALDI-TOF-MS identifiziert. In 28 Proben wurden keine Bakterien der Gattung *Pseudomonas* nachgewiesen. Von 33 der 64 untersuchten Hackfleischproben, aus denen präsumtiv (multi-)resistente Pseudomonaden isoliert werden konnten, wurde die Spezies *P. fragi* aus 13 Proben gewonnen. Dies entspricht einem Anteil von 20 % der Proben. Die Spezies *P. fulva* wurde aus zwölf Proben (entspricht 19 %) isoliert. *P. putida* und *P. aeruginosa* konnten aus je vier (entspricht 6 %) der untersuchten Hackfleischproben isoliert werden. Jeweils aus zwei Proben (entspricht 3 %) wurden *P. libanensis* und *P. gessardii* gewonnen. *P. monteilii*, *P. lundensis*, *P. fluorescens*, *P. plecoglossicida*, *P. rhodesiae* und *P. koreensis* wurden in je einer Probe nachgewiesen. Dies entspricht einem Anteil von 1 %. Ein Isolat (entspricht 1 %) konnte mittels MALDI-TOF-MS nur als „*Pseudomonas* spp.“ identifiziert werden.

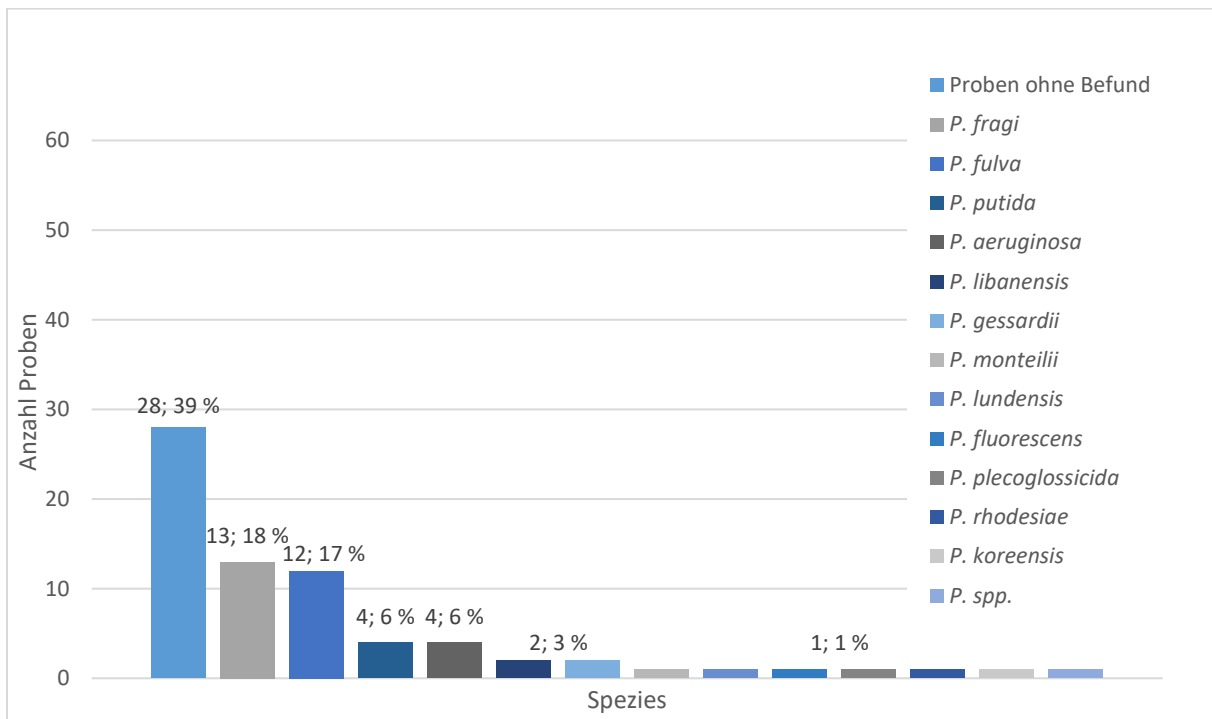


Abb. 14: Anzahl und prozentualer Anteil der 64 untersuchten Hackfleischproben aus denen die jeweilige Spezies der Gattung *Pseudomonas* isoliert wurde.

5.2.3 Warengruppe Sahne

Aus zwölf der 23 untersuchten Sahneprouben wurden Pseudomonaden isoliert. Nach den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Resistenztestungen konnte nur für neun dieser zwölf Proben die Anwesenheit präsumtiv (multi-)resistenter Pseudomonaden bestätigt werden. Bei einer dieser neun Proben handelte es sich um eine Anlassprobe (genauer: eine Verfolgsproube). Der Nachweis

präsumtiv (multi-)resistenter Pseudomonaden entspricht einem Anteil von 39 % bezogen auf die Gesamtzahl der analysierten 23 Sahneprouben bzw. 36 % ohne Berücksichtigung der nicht-randomisierten Anlassprobe. In Bezug auf die Anzahl der Proben aus denen die jeweilige Spezies isoliert wurde, geben Abb. 15 sowie Abb. 16 Auskunft. In elf der untersuchten 23 Proben bzw. 22 randomisierten Proben der Warengruppe Sahne wurden keine Mitglieder der Gattung *Pseudomonas* nachgewiesen. Dies macht einen prozentualen Anteil von 48 % bzw. 50 % aus. *P. fulva* wurde aus vier Proben (entspricht 17 % bzw. 18 %) isoliert, wohingegen die Spezies *P. rhodesiae* aus jeweils zwei Proben (entspricht jeweils 9 %) gewonnen wurden. Die beiden Proben, aus denen *P. aeruginosa* isoliert wurde, stammen aus demselben Betrieb. Es handelt sich um eine Plan- sowie eine Verfolgsprobe. Es ergibt sich somit in der Gesamtbetrachtung ein prozentualer Anteil von 9 %. Unter Beachtung der randomisierten Proben entspricht dies 5 %. Die Identifikation von *P. frederiksbergensis*, *P. monteilii* und *P. putida* erfolgte jeweils in einer der 23 bzw. 22 Sahneprouben. Dies entspricht einem Anteil von je 4 % bzw. 5 %.

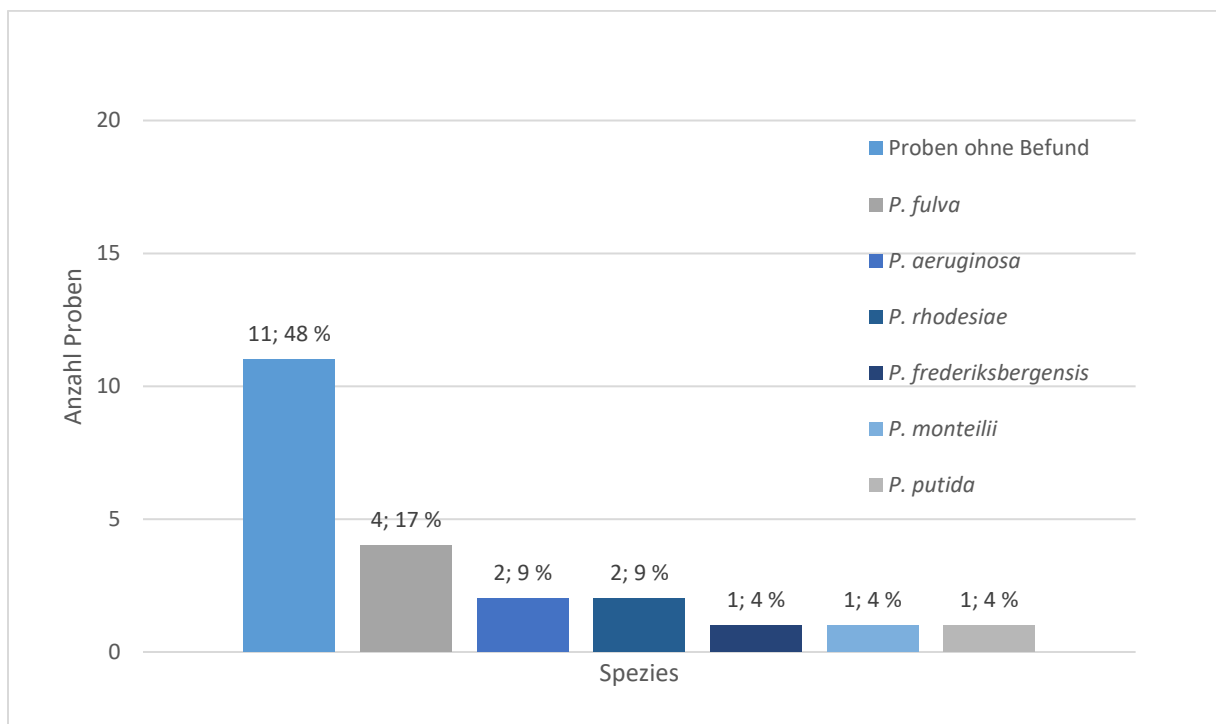


Abb. 15: Anzahl und prozentualer Anteil der 23 Sahneprouben aus denen die jeweilige Spezies der Gattung *Pseudomonas* isoliert wurde.

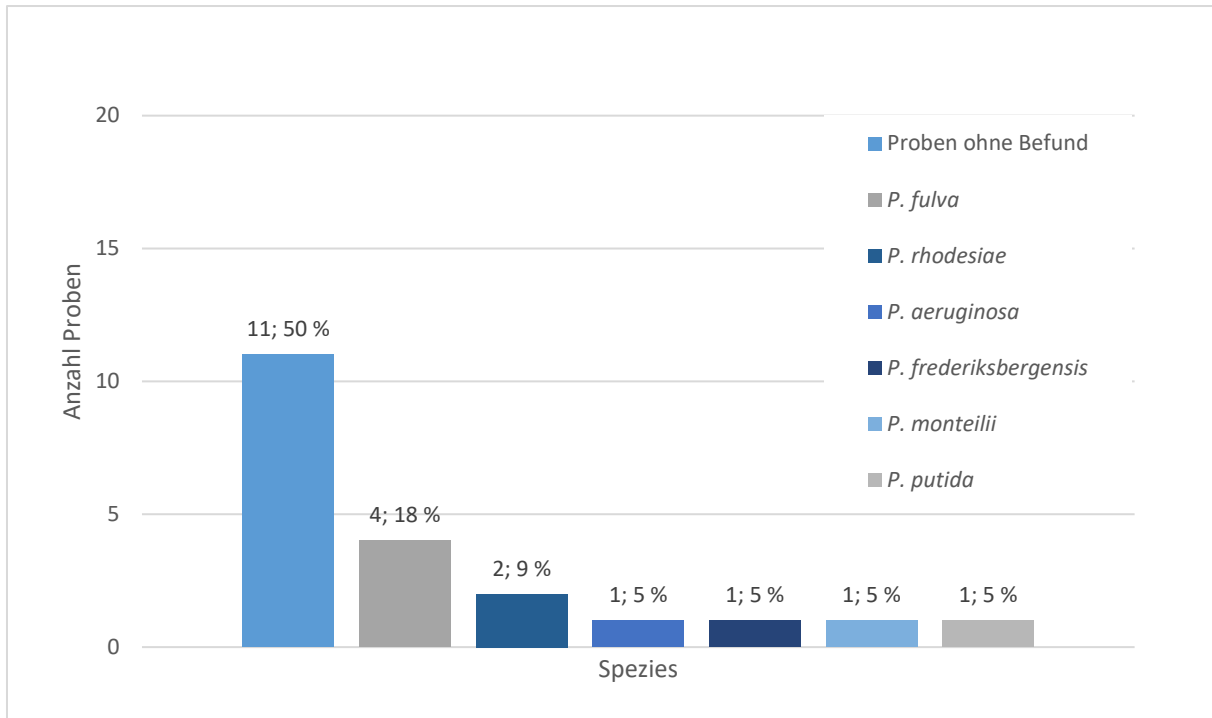


Abb. 16: Anzahl und prozentualer Anteil der 22 randomisierten Sahneproben aus denen die jeweilige Spezies der Gattung *Pseudomonas* isoliert wurde.

5.2.4 Warengruppe Lachs

Die Ergebnisse der Untersuchungen für die Warengruppe Lachs werden im Folgenden erläutert. Zusammengefasst wurden 19 Lachsproben auf das Vorhandensein von präsumtiv (multi-)resistenten Vertretern der Gattung *Pseudomonas* analysiert. In 15 der untersuchten Lachsproben wurden keine Pseudomonaden nachgewiesen. Dies entspricht einem Anteil von 79 %. Der Nachweis der genannten Bakterien erfolgte in insgesamt vier Proben. Abb. 17 zeigt den Zusammenhang zwischen den einzelnen Spezies und der Anzahl der Proben aus denen diese gewonnen wurden. Aus drei Proben (entspricht 16 %) wurde *P. fulva* und aus zwei Proben (entspricht 10 %) *P. putida* isoliert. *P. monteilii*, *P. fragi* und *P. korensis* wurden aus je einer Probe (entspricht jeweils 5 %) gewonnen.

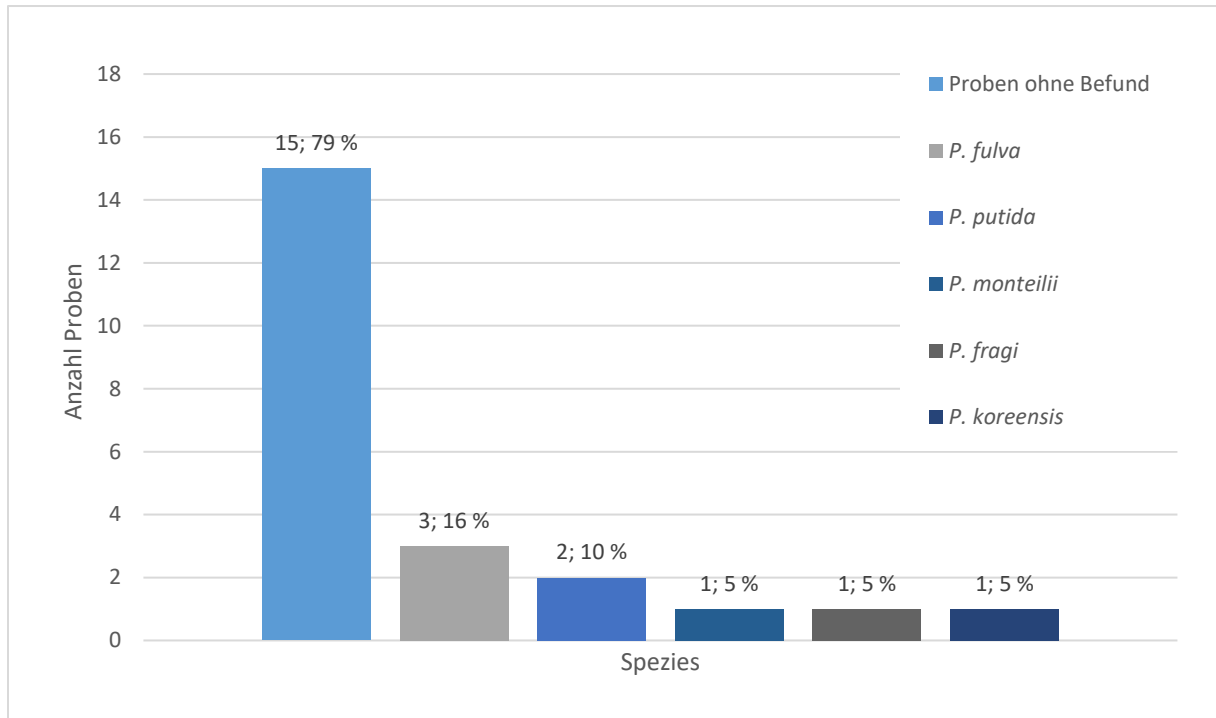


Abb. 17: Anzahl und prozentualer Anteil der 19 Lachsproben aus denen die jeweilige Spezies der Gattung *Pseudomonas* isoliert wurde.

5.2.5 Warengruppe weitere Fischproben

Neben den im vorherigen Abschnitt aufgeführten Lachsproben, wurden auch weitere Proben der Warengruppe Fisch untersucht. Der Nachweis von präsumentiv (multi-)resistenten Pseudomonaden erfolgte in drei der untersuchten elf Proben. Folglich konnten aus acht der untersuchten Proben keine Bakterien der Gattung *Pseudomonas* isoliert werden. Dies entspricht einem Anteil von 73 %. In Bezug auf den Anteil der Proben aus denen die jeweilige Spezies isoliert wurde, gibt Abb. 18 Auskunft. In jeweils zwei Proben (entspricht je 18 %) wurden *P. putida* bzw. *P. fulva* nachgewiesen. Aus einer Probe (entspricht 9 %) wurde *P. monteilii* isoliert.

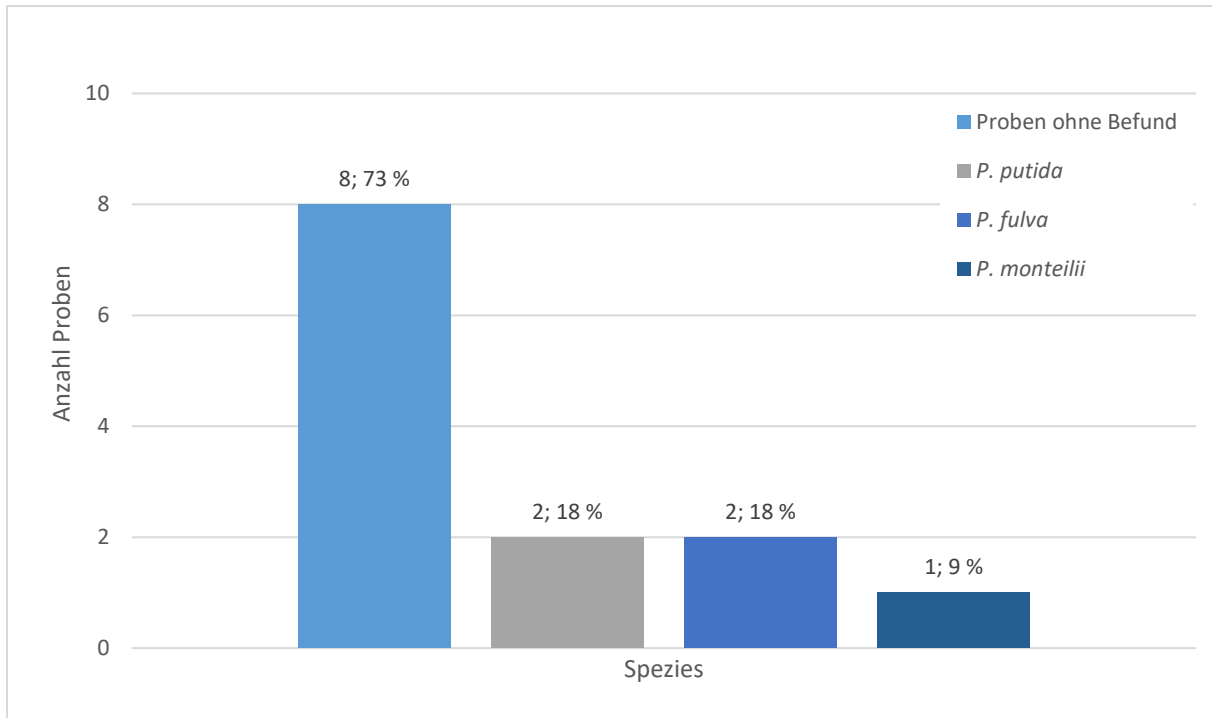


Abb. 18: Anzahl und prozentualer Anteil der elf Fischproben aus denen die jeweilige Spezies der Gattung *Pseudomonas* isoliert wurde.

5.2.6 Warengruppe pflanzliche Lebensmittel

Die Warengruppe der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten pflanzlichen Lebensmittel umfasste insgesamt 51 Proben welche mittels des hier beschriebenen Nachweis- und Zählverfahrens untersucht wurden. Es konnten aus 31 der 51 Proben Pseudomonaden isoliert werden. Mittels Resistenztestungen konnten von diesen 31 Proben in 23 untersuchten pflanzlichen Lebensmitteln die Anwesenheit präsumtiv (multi-)resistenter Pseudomonaden bestätigt werden. 20 der untersuchten Proben enthielten keine Pseudomonaden. Dies entspricht einem Anteil von 39 %. Die Anzahl der Proben aus denen die jeweiligen Isolate gewonnen wurden, ist in Abb. 19 aufgeführt. *P. koreensis* wurde in neun Proben (entspricht 18 %) nachgewiesen. Die Spezies *P. corrugata* wurde insgesamt in sechs (entspricht 12 %) und die Spezies *P. flavescens* in drei (6 %) der untersuchten Proben identifiziert. *P. putida*, *P. fulva*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* und *P. chlororaphis* konnten je zweimal (entspricht jeweils 4 %) in den untersuchten pflanzlichen Lebensmitteln nachgewiesen werden. Aus je einer der untersuchten Proben wurden *P. synxantha*, *P. gessardii*, *P. oleovorans* und, nicht näher mittels MALDI-TOF-MS identifizierbar, die Isolate „*Pseudomonas* spp.“ und „*Pseudomonas*“ gewonnen. Dies entspricht jeweils einem Anteil von 2 %.

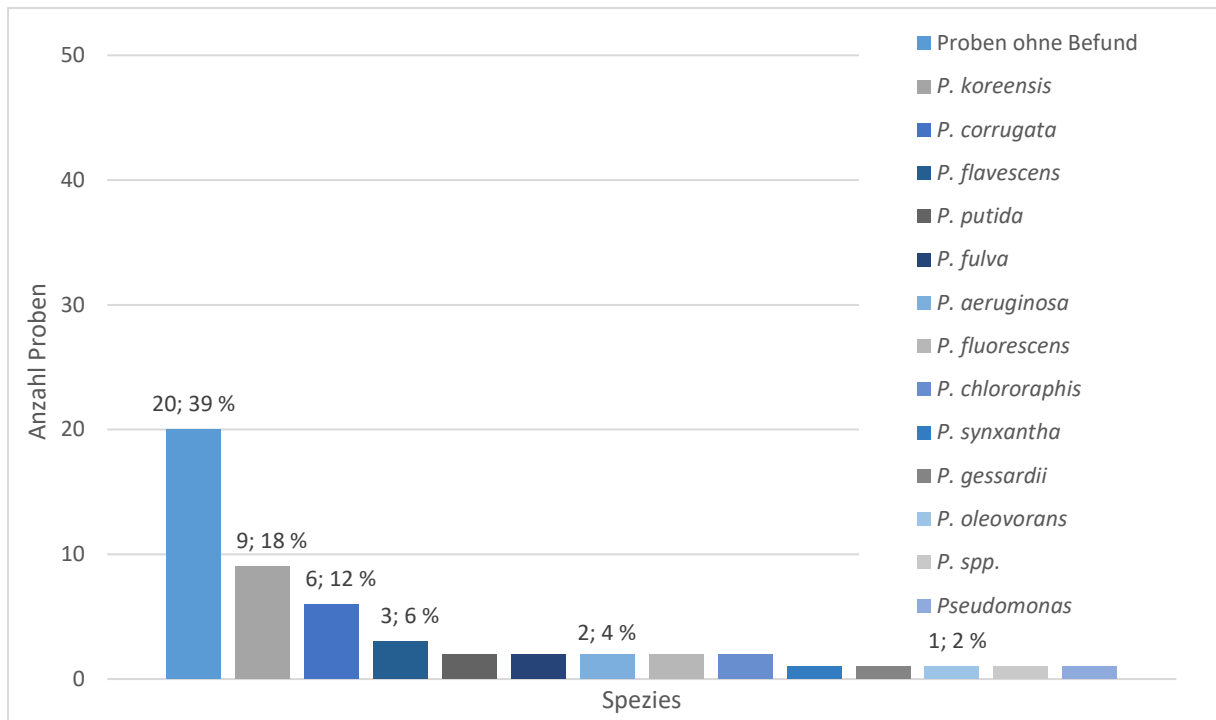


Abb. 19: Anzahl und prozentualer Anteil der 51 untersuchten pflanzlichen Lebensmittel aus denen die jeweilige Spezies isoliert wurde.

5.2.7 Warengruppe „diverse weitere Lebensmittel“

Die Warengruppe „diverse weitere Lebensmittel“ umfasst vorrangig Lebensmittel, welche bei Routineuntersuchungen im Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg) auffällig waren. Dies bezieht insbesondere sensorische Abweichungen (u. a. Geruch und Aussehen) mit ein. Zudem handelt es sich zum Teil um Verdachtsproben, bei denen zum Beispiel Auffälligkeiten im Lebensmittelbetrieb zu einer Probenahme geführt haben. Sieben der acht im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Anlassproben entfallen auf die hier beschriebene Kategorie. Insgesamt umfasst diese Warengruppe „diverse weitere Lebensmittel“ 16 Proben. Es handelte sich hier um neun Planproben und sechs Verdachtsproben sowie eine Verfolgungsprobe. Aus sechs der 16 untersuchten Proben bzw. sechs der neun randomisierten Planproben konnten präsumtiv (multi-)resistente Bakterien der Gattung *Pseudomonas* nachgewiesen werden. In zehn bzw. drei randomisierten Proben der Warengruppe „diverse weitere Lebensmittel“ konnten keine Pseudomonaden nachgewiesen werden. Dies entspricht einem Anteil von 63 % bzw. 33 %. Folglich wurden in keiner der sieben untersuchten Anlassproben präsumtiv (multi-)resistente Pseudomonaden nachgewiesen. In zwei Proben (entspricht 13 % bzw. 22 %) wurde *P. koreensis* und in jeweils einer Probe (je 6 % bzw. 11 %) wurden die Spezies *P. putida*, *P. fulva*, *P. aeruginosa*, *P. fragi*, *P. monteilii*, *P. guariconensis*, *P. chlororaphis* und *P. rhodesiae* identifiziert. Abb. 20 und Abb. 21 geben hierüber Auskunft.

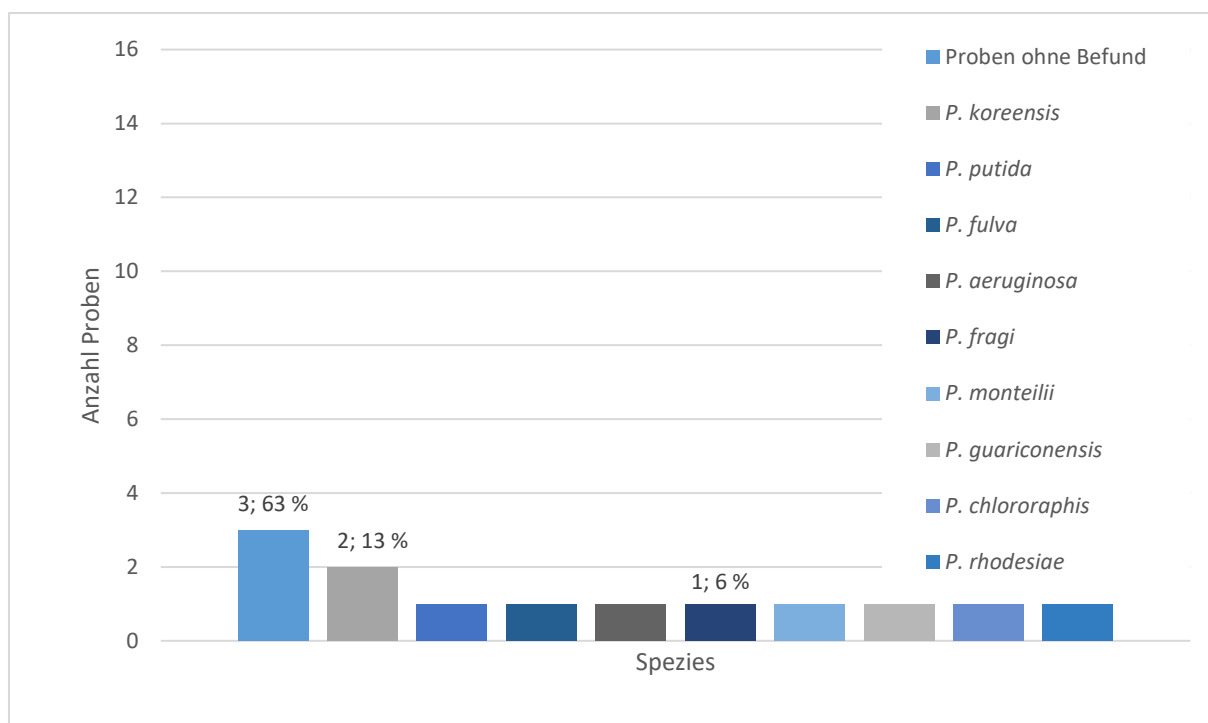


Abb. 20: Anzahl und prozentuale Verteilung der 16 untersuchten Proben der Warengruppe „diverse weitere Lebensmittel“ aus denen die jeweilige Spezies isoliert wurde.

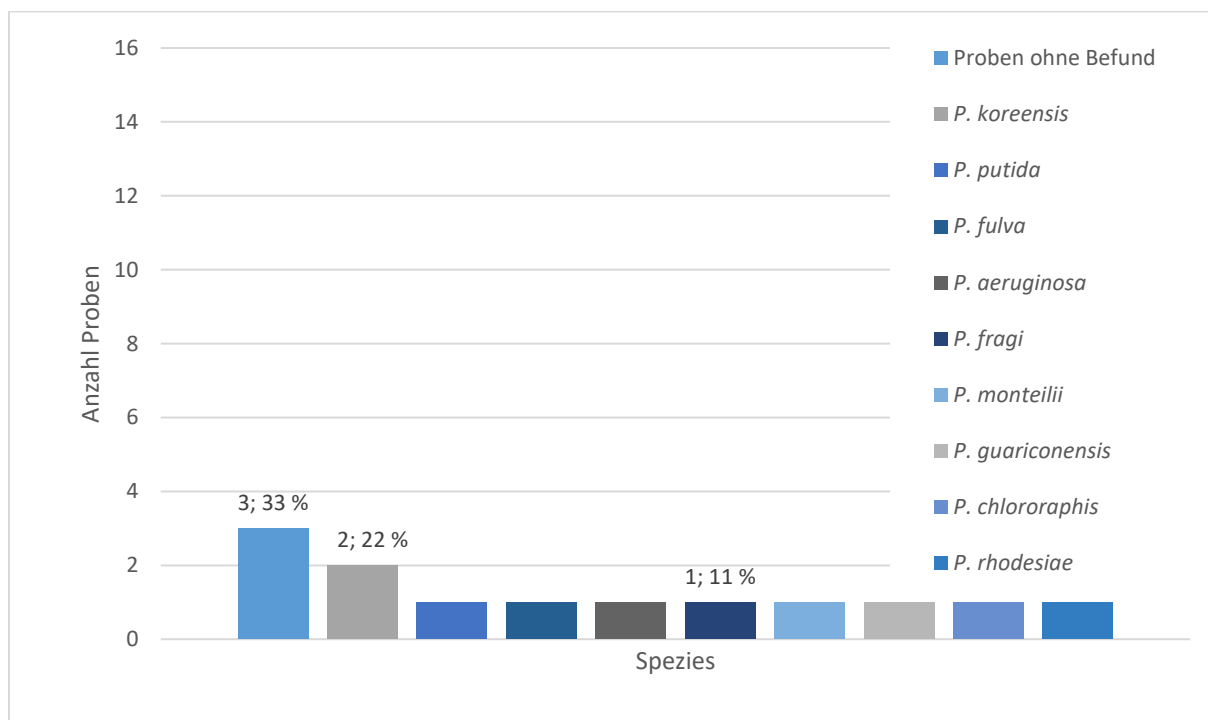


Abb. 21: Anzahl und prozentuale Verteilung der neun untersuchten randomisierten Proben der Warengruppe „diverse weitere Lebensmittel“ aus denen die jeweilige Spezies isoliert wurde.

5.3 Quantitative Bestimmungen

Neben dem qualitativen Nachweis präsumtiv resistenter *Pseudomonas*-Isolate in 25 g der jeweiligen Probe, wurde für jedes Lebensmittel auch eine quantitative Analyse durchgeführt. Hierzu wurden, wie in Abschnitt 4.3 beschrieben, je zweimal 0,5 ml der 1:10-Verdünnung jeden Lebensmittels auf CFC-Agar, CFC-Agar mit 4 mg Imipenem/l, CFC-Agar mit 0,5 mg Ciprofloxacin/l und CFC-Agar mit 4 mg Netilmicin/l ausplattiert, bei 25 °C für 44 h ± 4 h inkubiert und anschließend ausgewertet. Die Ergebnisse der quantitativen Analyse der Einzelproben sind in Tab. 33 (siehe Anhang 9.7) zusammen mit den Ergebnissen der qualitativen Bestimmung aufgeführt. Es ist deutlich sichtbar, dass von den sechs untersuchten Warengruppen die Lebensmittelkategorien „Hackfleisch“ und „pflanzliche Lebensmittel“ die höchsten Keimgehalte der präsumtiv (multi-)resistenten Pseudomonaden aufwiesen.

5.3.1 Hackfleisch

Die prozentuale Verteilung, der aus den einzelnen Hackfleischproben gewonnenen Pseudomonaden, ist in Abb. 22 dargestellt. Es ist zu sehen, dass aus den analysierten Proben der Warengruppe Hackfleisch am häufigsten die Spezies *P. fulva* (40 Isolate, entspricht 43 % der insgesamt 93 präsumtiv resistenten Hackfleischisolate) gewonnen wurde. 16 Isolate (17 %) zählen zur Spezies *P. fragi*, 14 (entspricht 15 %) zur Spezies *P. aeruginosa* und zehn (entspricht 8 %) zur Spezies *P. putida*. Die Spezies *P. lundensis* (vier Isolate; 5 %), *P. gessardii* (drei Isolate; 3 %), *P. libanensis* (zwei Isolate; 2 %) sowie *P. monteilii* (zwei Isolate; 2 %) wurden ebenfalls nachgewiesen. Jeweils ein Isolat (entspricht 1 %) zählte zu den Spezies *P. fluorescens*, *P. plecoglossicida*, *P. rhodesiae* und *P. koreensis*. Ein Isolat (entspricht 1 %) konnte mittels MALDI-TOF-MS nur als „*Pseudomonas* spp.“ bestimmt werden.

5. Ergebnisse

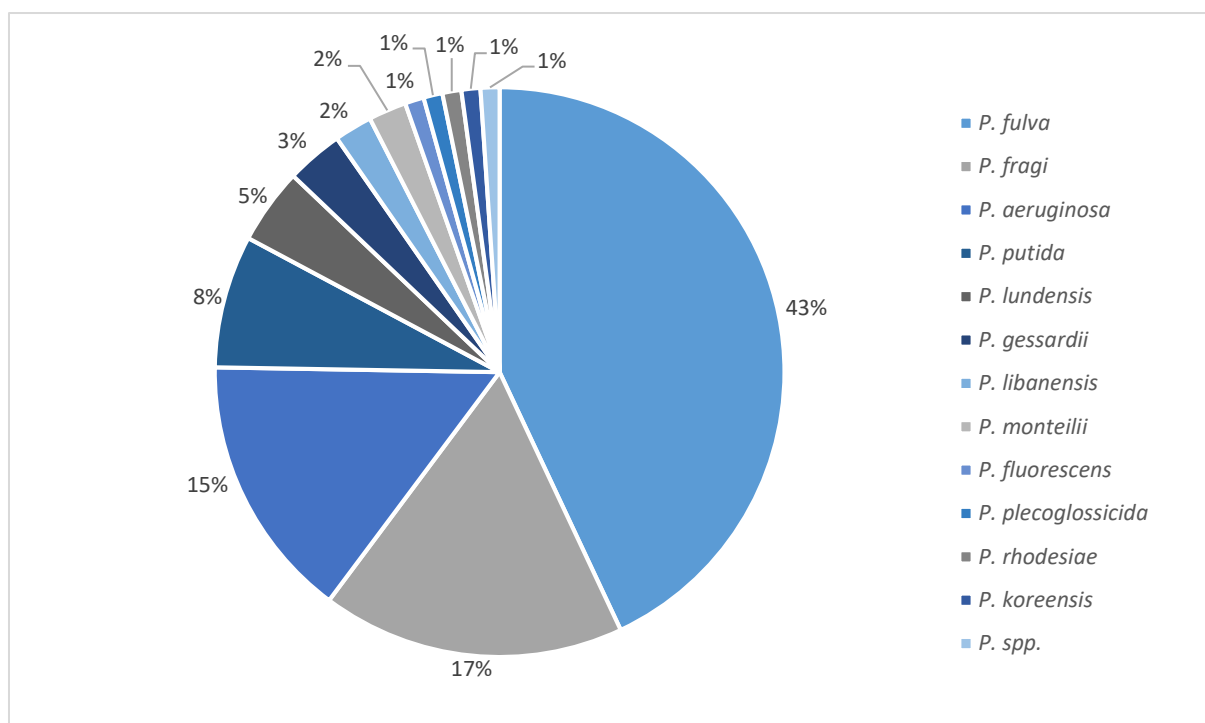


Abb. 22: Prozentuale Verteilung der 93 isolierten präsumtiv (multi-)resistenten Pseudomonaden aus den untersuchten 35 Hackfleischproben.

Die verschiedenen in den Hackfleischproben bestimmten Spezies und ihre jeweilige Anzahl in Bezug auf das Nährmedium, von dem sie gewonnen wurden, sind in Tab. 13 aufgelistet.

Tab. 13: Anzahl der jeweiligen Spezies im Hinblick auf das Nährmedium von welchem sie aus den Hackfleischproben isoliert wurden.

Isolierte Spezies	Anzahl der isolierten Pseudomonaden auf CFC-Agar mit 4 mg Imipenem/l	Anzahl der isolierten Pseudomonaden auf CFC-Agar mit 0,5 mg Ciprofloxacin/l	Anzahl der isolierten Pseudomonaden auf CFC-Agar mit 4 mg Netilmicin/l
<i>P. fulva</i>	19	13	8
<i>P. fragi</i>	9	0	7
<i>P. aeruginosa</i>	3	1	9
<i>P. putida</i>	2	0	5
<i>P. lundensis</i>	4	0	0
<i>P. gessardii</i>	3	0	0
<i>P. libanensis</i>	2	0	0
<i>P. monteilii</i>	2	0	0
<i>P. fluorescens</i>	1	0	0
<i>P. plecoglossicida</i>	0	0	1
<i>P. rhodesiae</i>	1	0	0
<i>P. koreensis</i>	1	0	0

Isolierte Spezies	Anzahl der isolierten Pseudomonaden auf CFC-Agar mit 4 mg Imipenem/l	Anzahl der isolierten Pseudomonaden auf CFC-Agar mit 0,5 mg Ciprofloxacin/l	Anzahl der isolierten Pseudomonaden auf CFC-Agar mit 4 mg Netilmicin/l
<i>P. spp.</i>	0	0	1

Zudem wurden für die quantitativen Untersuchungen Keimgehalte gemäß Gleichung (9) bestimmt. Die Ergebnisse dieser Bestimmungen sind für die Nährmedien CFC-Agar ohne zusätzliches Antibiotikum, CFC-Agar mit 4 mg Imipenem/l, CFC-Agar mit 0,5 mg Ciprofloxacin/l und CFC-Agar mit 4 mg Netilmicin/l in Abb. 23 aufgeführt.

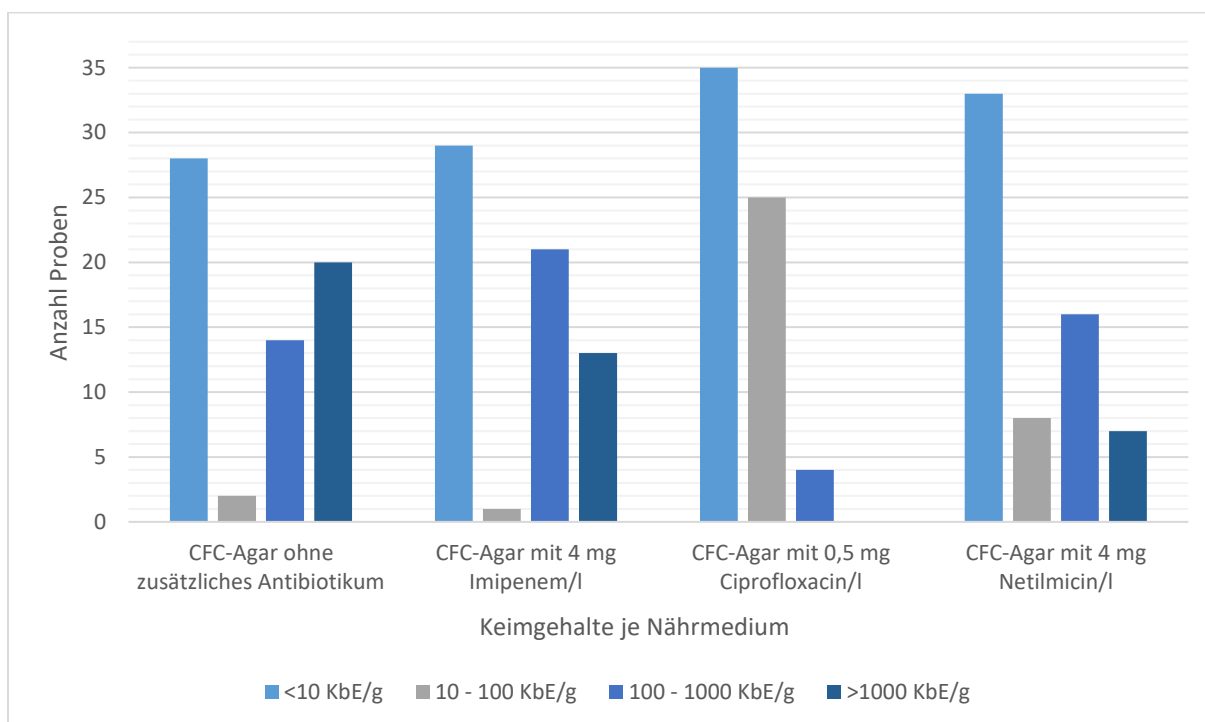


Abb. 23: Bestimmte Pseudomonaden-Keimgehalte und Anzahl Proben je Nährmedium für die untersuchten 64 Hackfleischproben.

5.3.2 Sahne

Von 23 untersuchten Sahneproben konnten in neun Proben Pseudomonaden, welche präsumtiv gegenüber mindestens eines der in den CFC-Nährböden verwendeten Antibiotika eine Resistenz aufwiesen, nachgewiesen werden. Zusammengefasst wurden 26 präsumtiv (multi-)resistente Pseudomonaden isoliert. Es handelte sich dabei um sieben unterschiedliche Spezies: Bei 50 % Prozent aller Sahneisolate (insgesamt 13) handelte es sich um *P. aeruginosa*. Davon stammen elf Isolate aus einer nicht-randomisierten Verfolgsprobe. Unter Nicht-Berücksichtigung dieser Probe ergibt sich ein Anteil von 13 %. Sieben Isolate wurden als *P. fulva* (entspricht 27 % bzw. 46 %) identifiziert. Jeweils dreimal (entspricht 11 % bzw. 20 %) wurde *P. rhodesiae* in den analysierten Proben der Warengruppe Sahne nachgewiesen. *P. frederiksbergensis*, *P. monteilii* und *P. putida*

wurden je einmal isoliert (entspricht einem Anteil von je 4 % bzw. 7 %). Die prozentualen Verteilungen sind in Abb. 24 und Abb. 25 graphisch dargestellt.

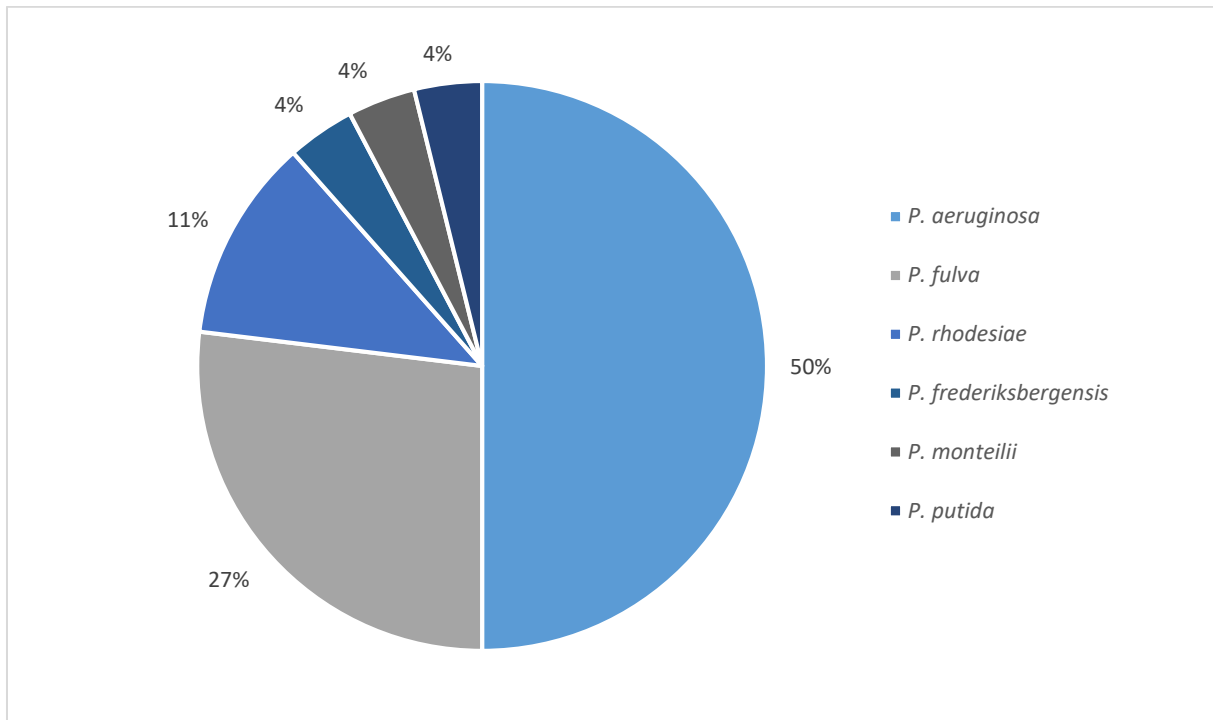


Abb. 24: Prozentuale Verteilung der 26 isolierten präsumtiv (multi-)resistenten Pseudomonaden aus den untersuchten neun Sahneprobe.

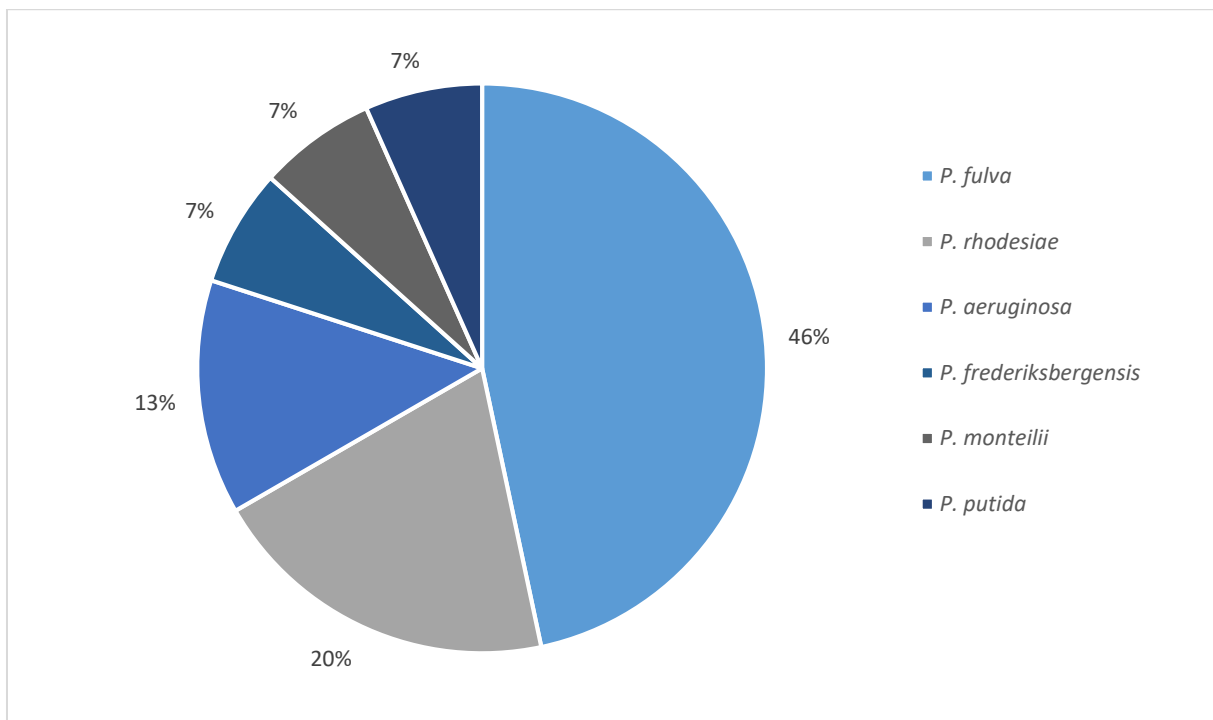


Abb. 25: Prozentuale Verteilung der 15 isolierten präsumtiv (multi-)resistenten Pseudomonaden aus den untersuchten acht randomisierten Sahneprobe.

Die aus den untersuchten Sahneproben isolierten Spezies und die Anzahl, mit der sie vom jeweiligen Nährmedium gewonnen werden konnten, sind in Tab. 14 aufgelistet.

Tab. 14: Anzahl der jeweiligen Spezies im Hinblick auf die Nährmedien von welchen sie aus den Sahneproben isoliert wurden.

Isolierte Spezies	Anzahl der isolierten Pseudomonaden auf CFC-Agar mit 4 mg Imipenem/l	Anzahl der isolierten Pseudomonaden auf CFC-Agar mit 0,5 mg Ciprofloxacin/l	Anzahl der isolierten Pseudomonaden auf CFC-Agar mit 4 mg Netilmicin/l
<i>P. aeruginosa</i>	5 (davon 5 aus der Verfolgsprobe)	2 (davon 2 aus der Verfolgsprobe)	6 (davon 4 aus der Verfolgsprobe)
<i>P. fulva</i>	1	3	3
<i>P. rhodesiae</i>	2	0	1
<i>P. frederiksbergensis</i>	1	0	0
<i>P. monteilii</i>	0	0	1
<i>P. putida</i>	0	0	1

Zudem wurden für die quantitativen Bestimmungen die Keimgehalte für jede untersuchte Probe und die Nährmedien CFC-Agar ohne zusätzliches Antibiotikum, CFC-Agar mit 4 mg Imipenem/l, CFC-Agar mit 0,5 mg Ciprofloxacin/l und CFC-Agar mit 4 mg Netilmicin/l gemäß Gleichung (9) berechnet. Dies ist für die 23 untersuchten Sahneproben in Abb. 26 sowie für die randomisierten 22 untersuchten Sahneproben in Abb. 27 graphisch dargestellt.

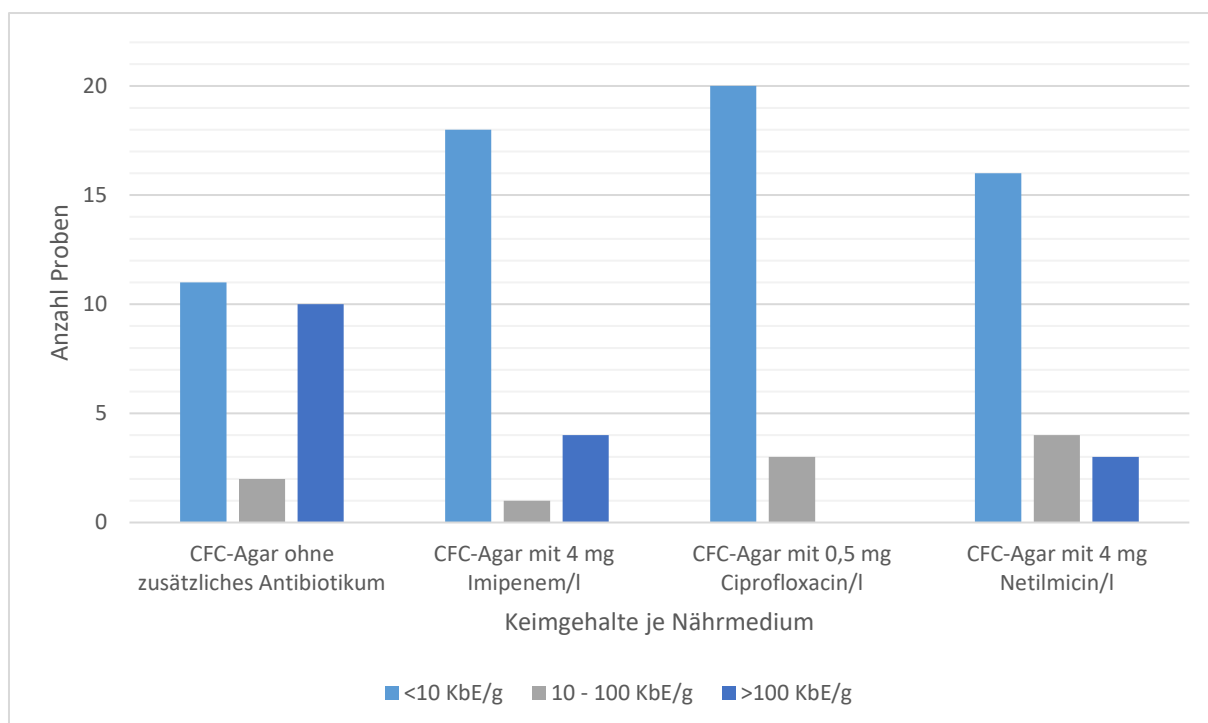


Abb. 26: Anzahl der Proben und ihre bestimmten Pseudomonaden-Keimgehalte je Nährmedium für die untersuchten 23 Sahneproben.

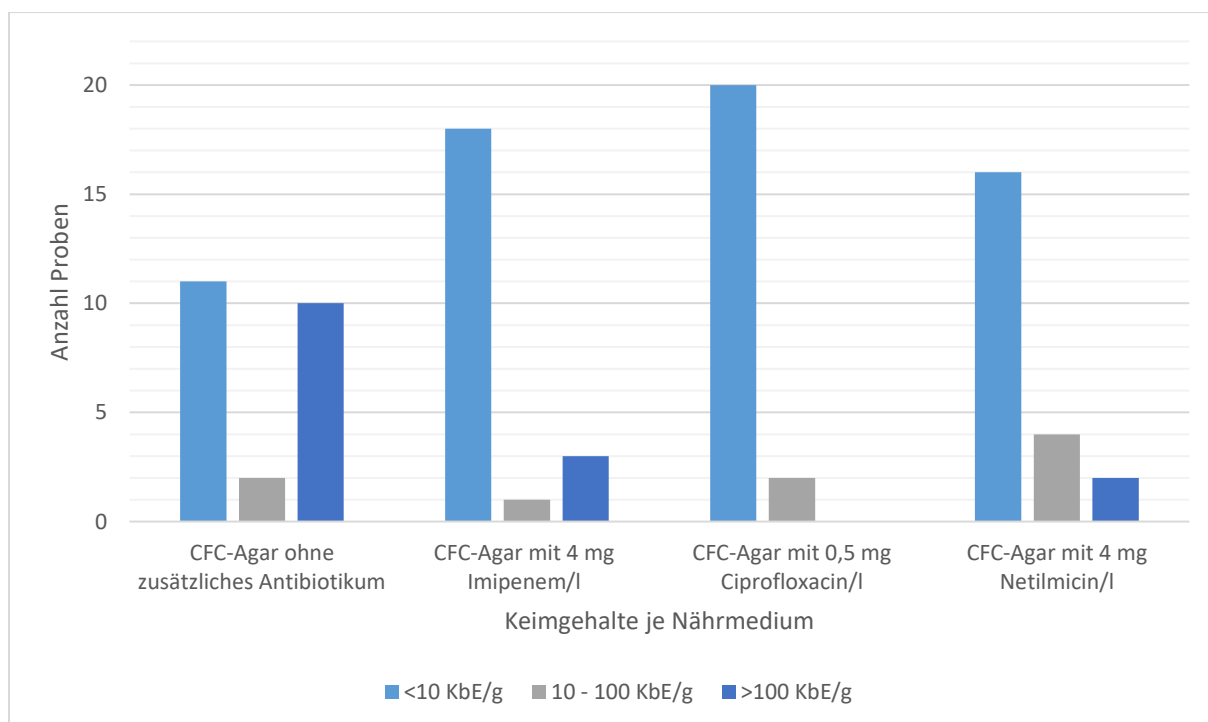


Abb. 27: Anzahl der Proben und ihre bestimmten Pseudomonaden-Keimgehalte je Nährmedium für die untersuchten 22 randomisierten Sahneproben.

5.3.3 Lachs

Mit neun Isolaten (entspricht 53 % von insgesamt 17 Pseudomonaden) aus 19 Lachsproben wurde *P. fulva* am häufigsten nachgewiesen. Der Nachweis von *P. putida* erfolgte viermal (entspricht 23 %).

P. monteilii wurde zweimal (entspricht 12 %) isoliert. *P. fragi* bzw. *P. koreensis* wurden je einmal (entspricht 6 %) gewonnen. Diese Verteilung ist in Abb. 28 graphisch dargestellt.

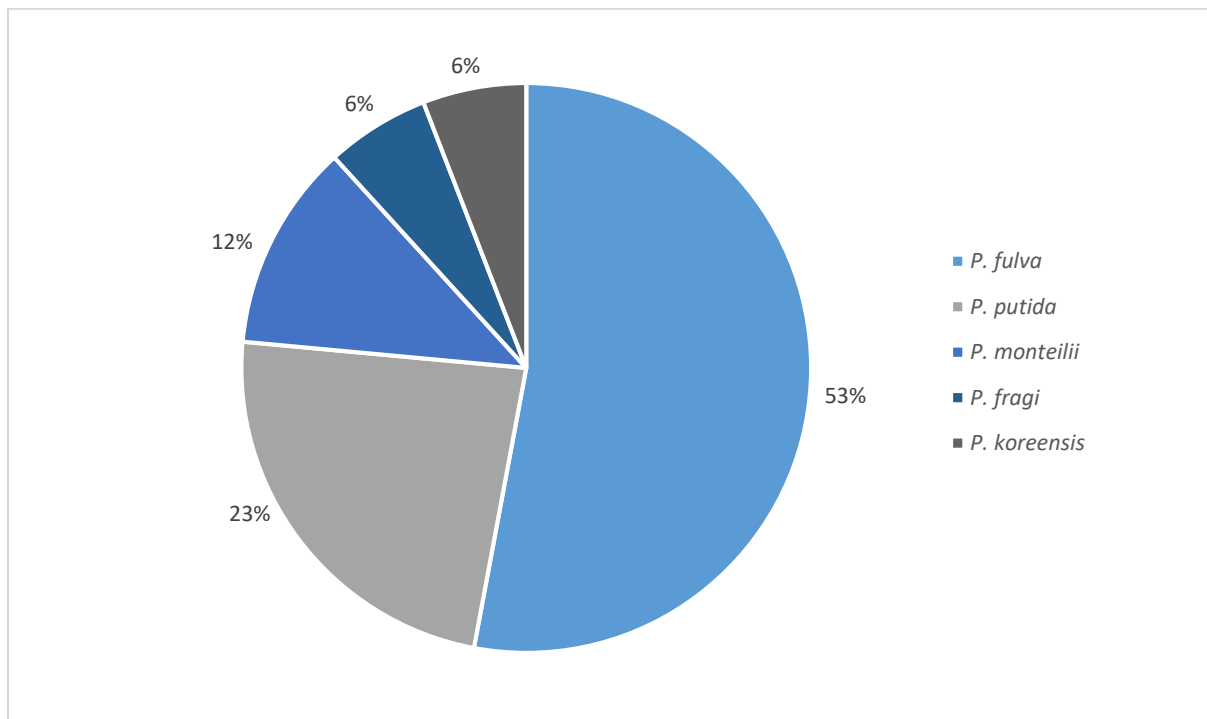


Abb. 28: Prozentuale Verteilung der 17 isolierten präsumtiv (multi-)resistenten Pseudomonaden aus den untersuchten 19 Lachsproben.

Die aus den untersuchten Lachsproben isolierten Spezies und die Anzahl, mit der sie vom jeweiligen Nährmedium gewonnen werden konnten, sind in Tab. 15 aufgelistet.

Tab. 15: Anzahl der jeweiligen Spezies im Hinblick auf die Nährmedien von welchen sie aus den Lachsproben isoliert wurden.

Isolierte Spezies	Anzahl der isolierten Pseudomonaden auf CFC-Agar mit 4 mg Imipenem/l	Anzahl der isolierten Pseudomonaden auf CFC-Agar mit 0,5 mg Ciprofloxacin/l	Anzahl der isolierten Pseudomonaden auf CFC-Agar mit 4 mg Netilmicin/l
<i>P. fulva</i>	4	2	3
<i>P. putida</i>	0	1	3
<i>P. monteilii</i>	1	0	1
<i>P. fragi</i>	0	0	1
<i>P. koreensis</i>	1	0	0

Die für die quantitativen Untersuchung der 19 Lachsproben gemäß Gleichung (9) bestimmten Keimgehalte für jede untersuchte Probe und die Nährmedien CFC-Agar ohne zusätzliches Antibiotikum, CFC-Agar mit 4 mg Imipenem/l, CFC-Agar mit 0,5 mg Ciprofloxacin/l und CFC-Agar mit 4 mg Netilmicin/l sind in Abb. 29 gezeigt.

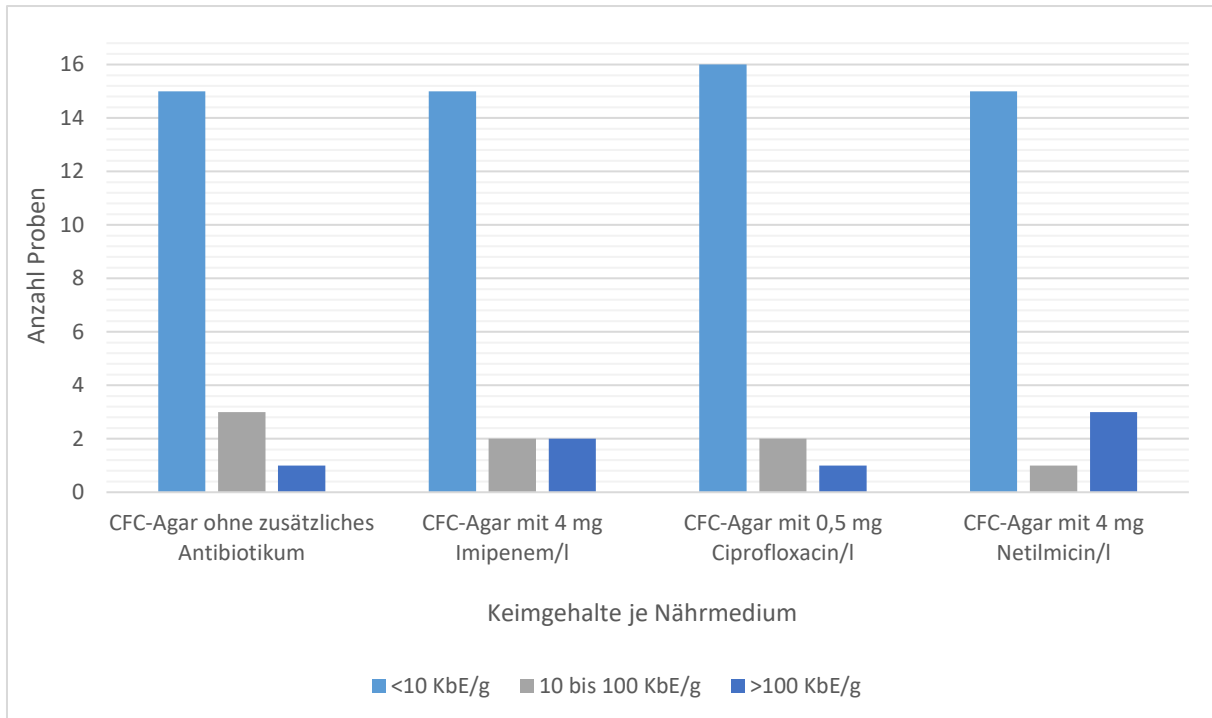


Abb. 29: Anzahl der Proben und ihre bestimmten Pseudomonaden-Keimgehalte je Nährmedium für die 19 untersuchten Lachsproben.

5.3.4 weitere Fischproben

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt elf weitere Fischproben untersucht. In zusammengefasst acht dieser Proben konnten keine Pseudomonaden nachgewiesen werden. Dies entspricht einem Anteil von 73 %. Aus drei der analysierten Proben (entspricht 27 %) wurden präsumtiv resistente Pseudomonaden isoliert: Sechsmal (entspricht 50 % aller Isolate dieser Matrixgruppe) wurde die Spezies *P. putida*, fünfmal (entspricht 42 %) die Spezies *P. fulva* und einmal die Spezies *P. monteilii* (entspricht 8 %) identifiziert. Dies ist in Abb. 30 dargestellt.

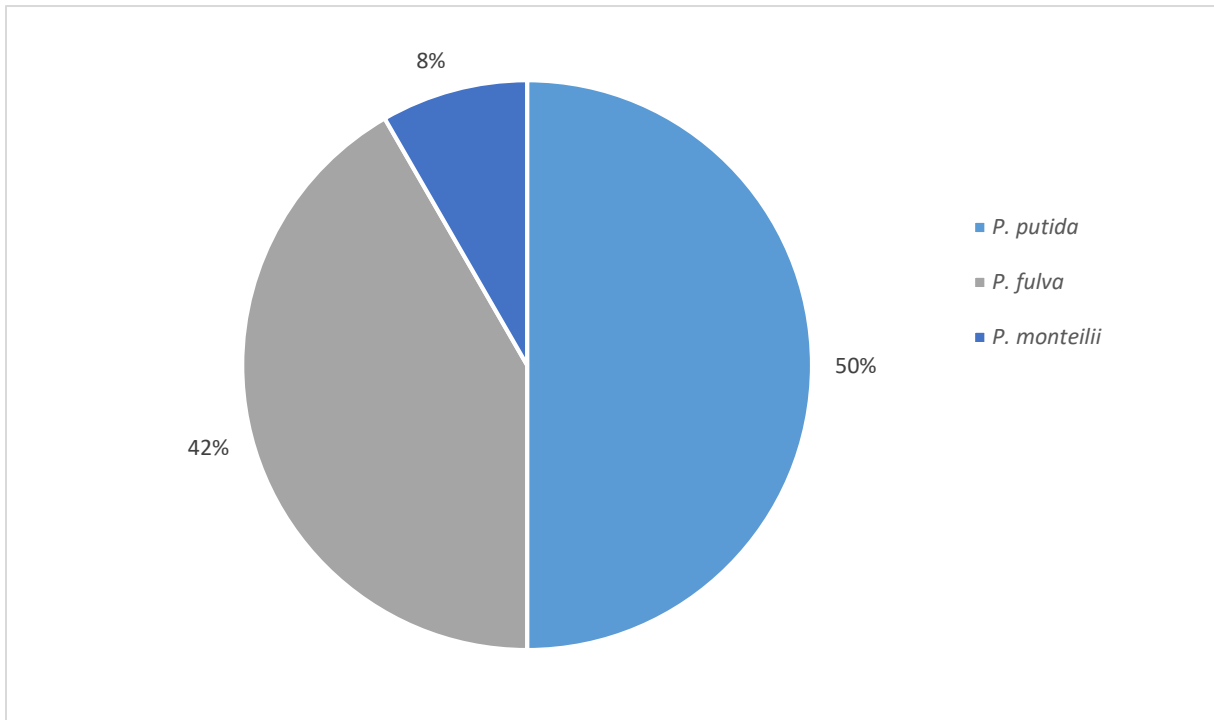


Abb. 30: Prozentuale Verteilung der zwölf isolierten präsumtiv (multi-)resistenten Pseudomonaden aus den untersuchten elf weiteren Fischproben.

Bezogen auf das jeweilige Nährmedium von dem die entsprechende Spezies gewonnen wurden, ergibt sich die in Tab. 16 gezeigte Verteilung.

Tab. 16: Anzahl der jeweiligen Spezies im Hinblick auf die Nährmedien von welchen sie gewonnen wurden.

Isolierte Spezies	Anzahl der isolierten Pseudomonaden auf CFC-Agar mit 4 mg Imipenem /l	Anzahl der isolierten Pseudomonaden auf CFC-Agar mit 0,5 mg Ciprofloxacin/l	Anzahl der isolierten Pseudomonaden auf CFC-Agar mit 4 mg Netilmicin/l
<i>P. putida</i>	4	2	0
<i>P. fulva</i>	0	2	3
<i>P. monteilii</i>	0	0	1

Des Weiteren wurden für die quantitativen Bestimmungen die Keimgehalte für jede untersuchte Probe der Lebensmittelkategorie „weitere Fischproben“ und die Nährmedien CFC-Agar ohne zusätzliches Antibiotikum, CFC-Agar mit 4 mg Imipenem/l, CFC-Agar mit 0,5 mg Ciprofloxacin/l und CFC-Agar mit 4 mg Netilmicin/l gemäß Gleichung (9) berechnet. Dies ist in Abb. 31 graphisch dargestellt.

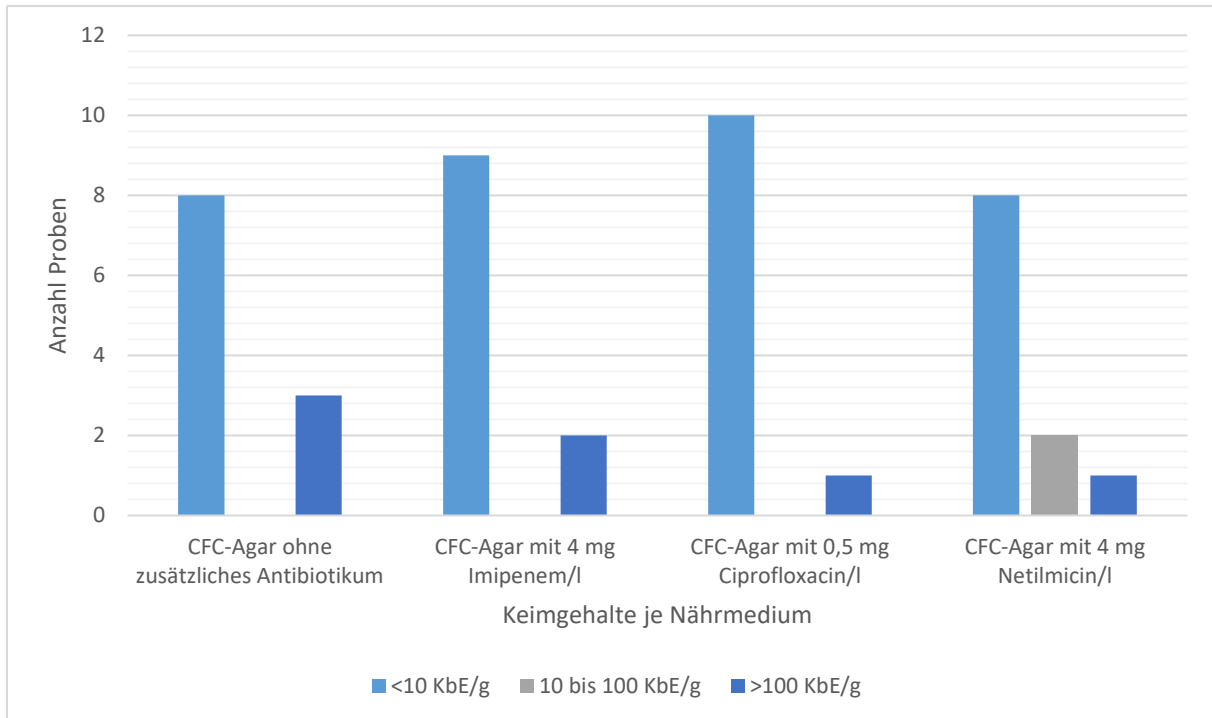


Abb. 31: Anzahl der Proben und ihre jeweils bestimmten *Pseudomonas*-Keimgehalte je Nährmedium für die elf untersuchten Proben der Lebensmittelkategorie „weiterer Fischproben“.

5.3.5 pflanzliche Lebensmittel

Mit elf Isolaten (entspricht 27 % der insgesamt 40 *Pseudomonas*-Isolate) aus 51 Proben dieser Lebensmittelmatrix wurde *P. koreensis* am häufigsten nachgewiesen. Die Spezies *P. corrugata* wurde sechsmal (entspricht 15 %) identifiziert und die Spezies *P. fulva* sowie *P. flavescens* jeweils viermal (entspricht je 10 %). *P. aeruginosa* konnte dreimal (7 %) nachgewiesen werden. Die Spezies *P. putida*, *P. fluorescens*, und *P. chlororaphis* wurden je zweimal (entspricht 5 %) mittels MALDI-TOF-MS identifiziert. Zwei Isolate (ebenfalls 5 %) konnten dabei nur als „*Pseudomonas* spp.“ bestimmt werden. *P. synxantha*, *P. gessardii*, *P. brassicacearum*, *P. oleovorans* und nicht näher definiert „*Pseudomonas*“ wurden jeweils einmal (entspricht 2 %) nachgewiesen. Diese Zusammenhänge sind in Abb. 32 graphisch dargestellt.

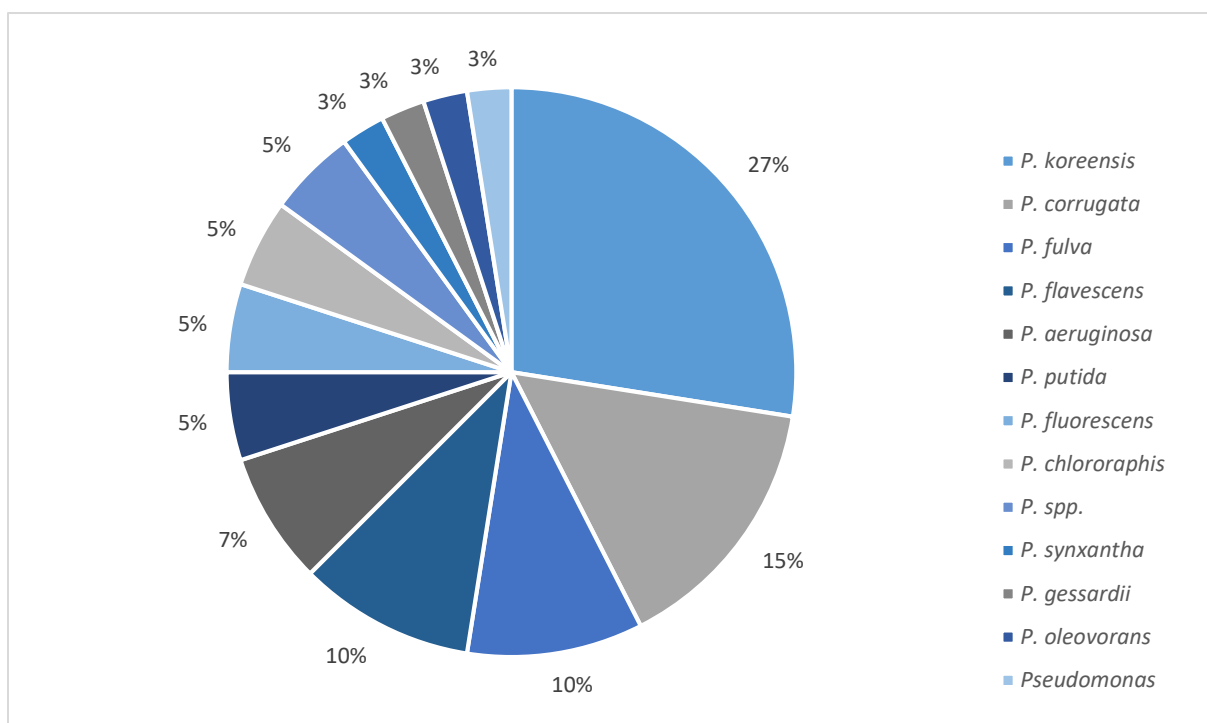


Abb. 32: Prozentuale Verteilung der 40 isolierten präsumtiv (multi-)resistenten Pseudomonaden aus den untersuchten 51 Proben der Warengruppe „pflanzliche Lebensmittel“.

Bezogen auf das jeweilige Nährmedium, von dem sie gewonnen wurden, ergibt sich die in Tab. 17 gezeigte Verteilung.

Tab. 17: Anzahl der jeweils isolierten Spezies aus der Lebensmittelkategorie „pflanzliche Lebensmittel“ im Hinblick auf die Nährmedien von welchen sie gewonnen wurden.

Isolierte Spezies	Anzahl der isolierten Pseudomonaden auf CFC-Agar mit 4 mg Imipenem /l	Anzahl der isolierten Pseudomonaden auf CFC-Agar mit 0,5 mg Ciprofloxacin/l	Anzahl der isolierten Pseudomonaden auf CFC-Agar mit 4 mg Netilmicin/l
<i>P. koreensis</i>	8	1	2
<i>P. corrugata</i>	4	0	2
<i>P. fulva</i>	1	2	1
<i>P. flavescens</i>	2	1	1
<i>P. aeruginosa</i>	1	2	0
<i>P. putida</i>	1	1	0
<i>P. fluorescens</i>	1	0	0
<i>P. chlororaphis</i>	0	0	2
<i>Pseudomonas spp.</i>	1	1	0
<i>P. synxantha</i>	0	1	0
<i>P. gessardii</i>	1	0	0
<i>P. oleovorans</i>	1	0	0
<i>Pseudomonas</i>	1	0	0

Die für die quantitative Untersuchung der 51 pflanzlichen Lebensmittelproben gemäß Gleichung (9) bestimmten Keimgehalte für jede untersuchte Probe und die Nährmedien CFC-Agar ohne zusätzliches Antibiotikum, CFC-Agar mit 4 mg Imipenem/l, CFC-Agar mit 0,5 mg Ciprofloxacin/l und CFC-Agar mit 4 mg Netilmicin/l sind in Abb. 33 gezeigt.

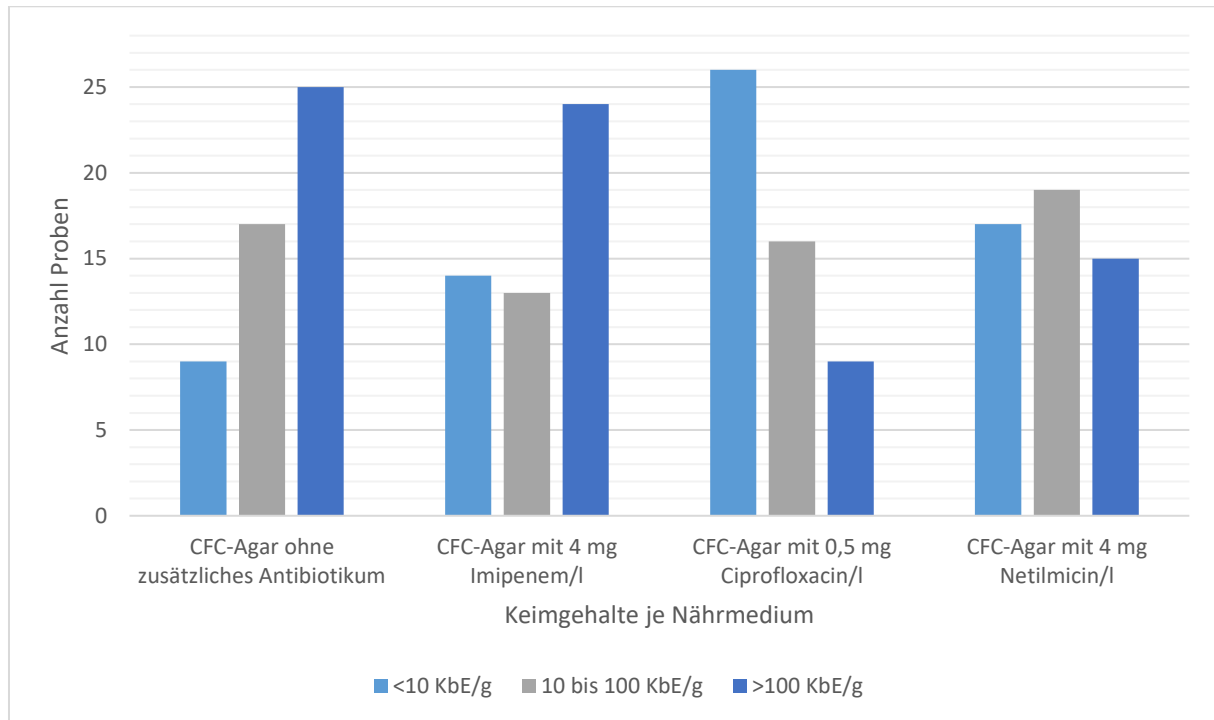


Abb. 33: Anzahl der Proben und ihre jeweils bestimmten Pseudomonaden-Keimgehalte je Nährmedium für die 51 pflanzlichen Lebensmittelproben.

5.3.6 Diverse weitere Lebensmittel

Die Spezies *P. putida* wurde dreimal (entspricht 20 % der *Pseudomonas*-Isolate) in 16 Proben bzw. neun randomisierten Proben dieser Matrixgruppe isoliert. *P. aeruginosa*, *P. fulva*, *P. guariconensis* und *P. koreensis* wurden je zweimal (13 %) isoliert. Jeweils einmal (je 7 %) wurden die Spezies *P. rhodesiae*, *P. chlororaphis*, *P. monteilii* und *P. fragi* aus den Lebensmitteln gewonnen. Diese Zusammenhänge sind in Abb. 34 graphisch aufgeführt.

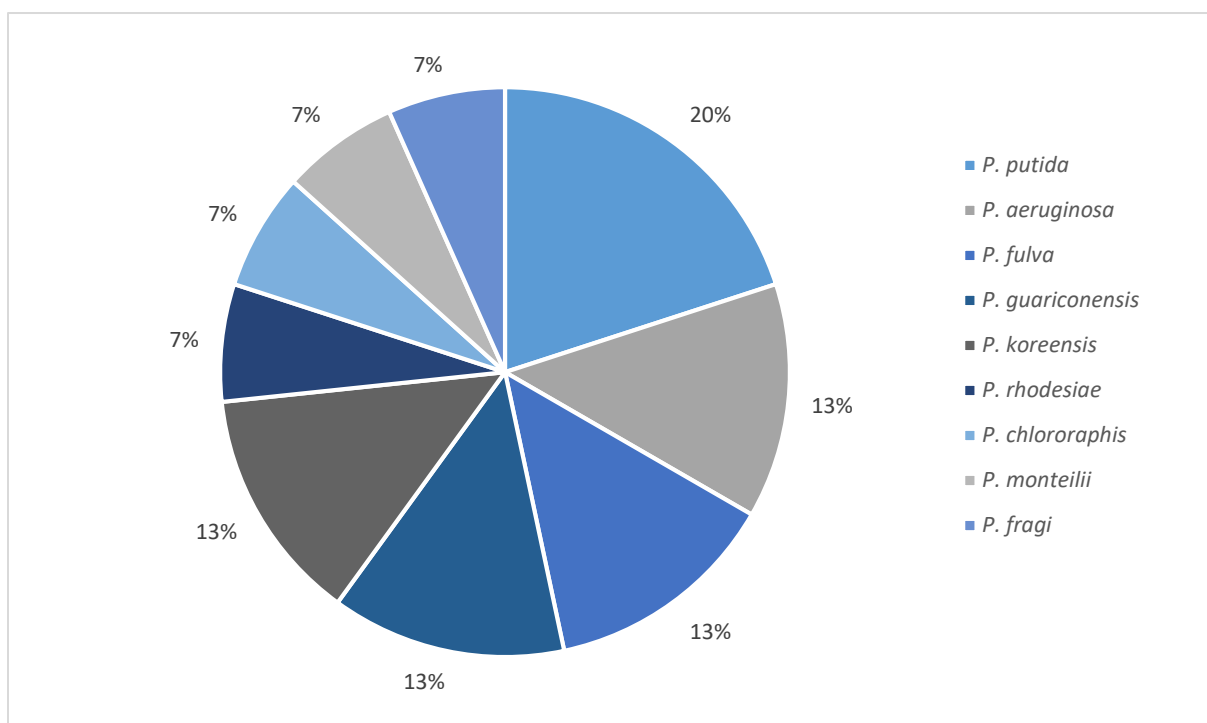


Abb. 34: Prozentuale Verteilung der 15 isolierten präsumtiv (multi-)resistenten Pseudomonaden aus den untersuchten sechs Proben der Warengruppe „diverse weitere Lebensmittel“.

Tab. 18 führt die isolierten Spezies in Zusammenhang mit dem jeweiligen Nährmedium, von welchem sie isoliert wurden, auf.

Tab. 18: Anzahl der jeweils isolierten Spezies der pflanzlichen Lebensmittelproben in Bezug auf die Nährmedien von welchen sie gewonnen wurden.

Isolierte Spezies	Anzahl der isolierten Pseudomonaden auf CFC-Agar mit 4 mg Imipenem/l	Anzahl der isolierten Pseudomonaden auf CFC-Agar mit 0,5 mg Ciprofloxacin/l	Anzahl der isolierten Pseudomonaden auf CFC-Agar mit 4 mg Netilmicin/l
<i>P. putida</i>	2	0	1
<i>P. aeruginosa</i>	1	0	1
<i>P. fulva</i>	1	1	0
<i>P. guariconensis</i>	0	1	1
<i>P. koreensis</i>	1	0	1
<i>P. rhodesiae</i>	0	0	1
<i>P. chlororaphis</i>	1	0	0
<i>P. monteilii</i>	1	0	0
<i>P. fragi</i>	1	0	0

Im Rahmen der quantitativen Untersuchung der 16 bzw. neun randomisierte Proben der Kategorie „diverse weitere Lebensmittel“ wurden die Keimgehalte für jede untersuchte Probe und die Nährmedien CFC ohne zusätzliches Antibiotikum, CFC-Agar mit 4 mg Imipenem/l, CFC-Agar mit

5. Ergebnisse

0,5 mg Ciprofloxacin/l und CFC-Agar mit 4 mg Netilmicin/l gemäß Gleichung (9) bestimmt. Sie sind nachfolgend in Abb. 35 und Abb. 36 graphisch dargestellt.

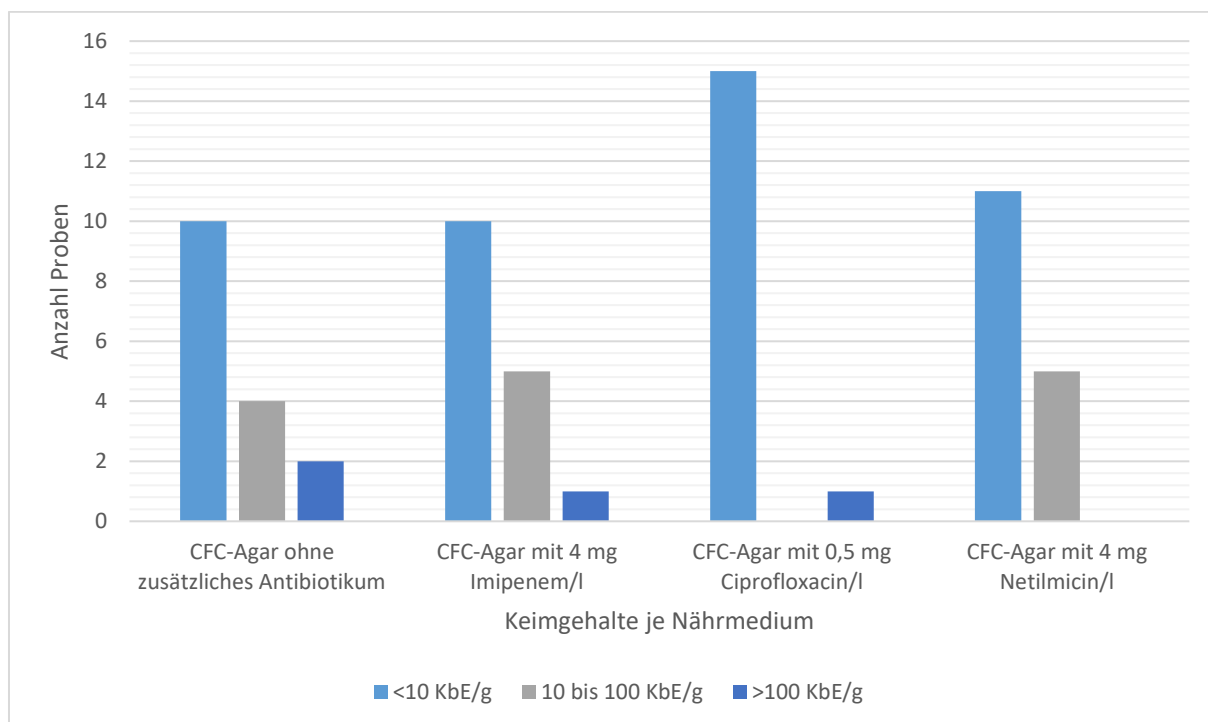


Abb. 35: Anzahl der Proben und ihre jeweils bestimmten Pseudomonaden-Keimgehalte je Nährmedium für die 16 Proben der Lebensmittelkategorie „diverse weitere Lebensmittel“.

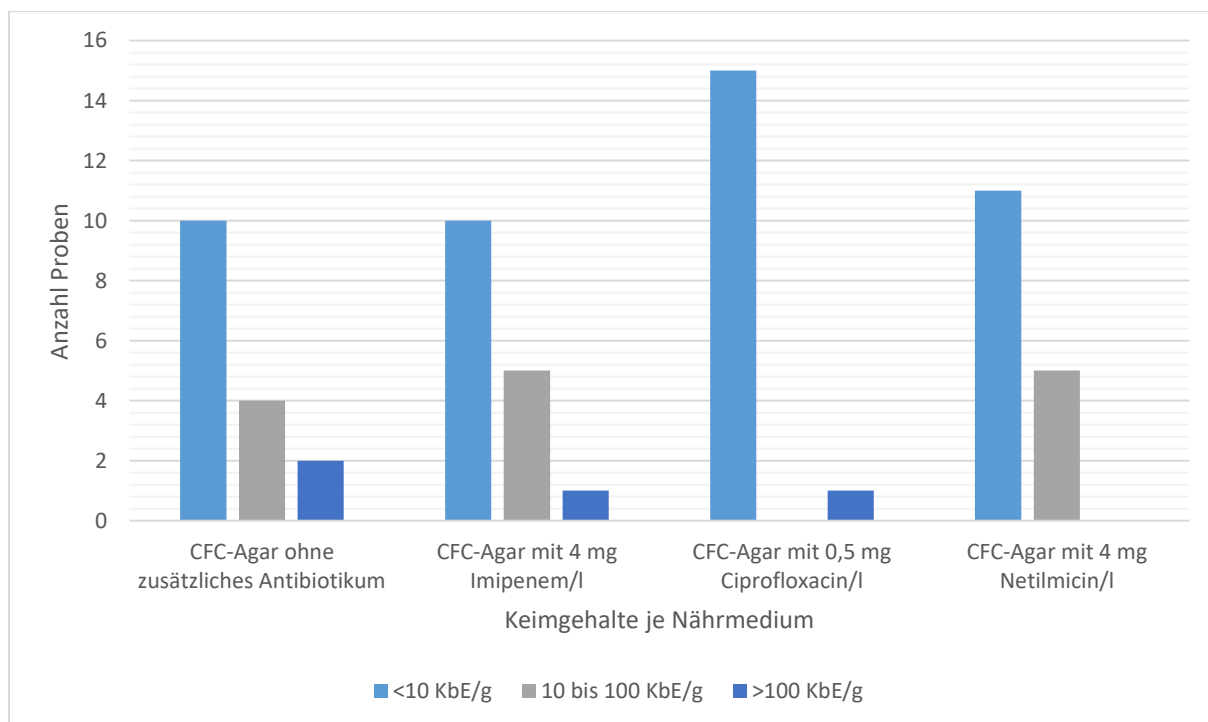


Abb. 36: Anzahl der Proben und ihre jeweils bestimmten Pseudomonaden-Keimgehalte je Nährmedium für die randomisierten neun Proben der Lebensmittelkategorie „diverse weitere Lebensmittel“.

5.4 Bestimmung der minimalen-Hemmkonzentrationen

Die minimale Hemmkonzentration (MHK) wurde für alle 26 Stämme der vorliegenden Stammsammlung sowie alle 211 aus den 184 untersuchten Lebensmitteln gewonnenen Isolate bestimmt. Dies erfolgte wie in Abschnitt 4.7 beschrieben. Für jedes Isolat wurde die MHK für die Antibiotika Imipenem, Ciprofloxacin und Netilmicin bestimmt. Die Ergebnisse der MHK-Bestimmungen für alle 237 untersuchten Stämme sind in Tab. 34 (siehe Abschnitt 9.8) aufgeführt. Dabei wird ersichtlich, dass die getesteten Stämme der Spezies *P. aeruginosa* höhere MHKs aufweisen als die anderen Spezies. Für die Spezies *P. aeruginosa* liegen die ECOFFS bei 4 mg/l (sowohl Imipenem als auch Netilmicin) bzw. 0,5 mg/l (Ciprofloxacin) [EUCAST, 2022]. Ebenfalls besonders auffällig war ein Isolat der Spezies *P. putida*. Die bestimmten MHK-Werte der drei getesteten Antibiotika sind für jeden *P. aeruginosa*- und den einen *P. putida*-Stamm in Tab. 19 aufgeführt. Dabei sind die Isolate, bei denen die jeweils bestimmte MHK den ECOFF übersteigt mit einem „*“ markiert.

Tab. 19: Minimale Hemmkonzentration der aus den Lebensmittelproben isolierten resistenten *Pseudomonas*-Stämme.

Isolat	Spezies	Lebensmittel, aus denen das Isolat gewonnen wurde	MHK Imipenem [mg/l]	MHK Ciprofloxacin [mg/l]	MHK Netilmicin [mg/l]
D009.A	<i>P. aeruginosa</i>	Putenfleisch mit Gewürz	32*	0,5	32*
D009.B	<i>P. aeruginosa</i>		16*	0,5	32*
D014.A	<i>P. putida</i>	Hähnchenbrust, mariniert	64*	1*	>256*
H032.A	<i>P. aeruginosa</i>	Rinderhack	16*	1*	64*
H032.B	<i>P. aeruginosa</i>		16*	1*	64*
H032.C	<i>P. aeruginosa</i>		16*	1*	64*
H034.A	<i>P. aeruginosa</i>	Tatar	32*	1*	64*
H034.B	<i>P. aeruginosa</i>		8*	0,5	16*
H034.C	<i>P. aeruginosa</i>		8*	0,5	16*
H043.D	<i>P. aeruginosa</i>	Rinderhack	64*	0,5	64*
H043.E	<i>P. aeruginosa</i>		16*	0,5	64*
H043.F	<i>P. aeruginosa</i>		16*	0,5	64*
P002.A	<i>P. aeruginosa</i>	Tomate	>256*	0,5	8*
P002.B	<i>P. aeruginosa</i>		>256*	2*	16*
P025.A	<i>P. aeruginosa</i>	Salatmix	128*	0,5	32*
S018.A	<i>P. aeruginosa</i>	Aufgeschlagene Sahne	32*	0,5	32*
S018.B	<i>P. aeruginosa</i>		32*	0,5	32*
H057.B	<i>P. aeruginosa</i>	Schweinehack	8*	0,5	8*
H057.C	<i>P. aeruginosa</i>		8*	0,5	8*
H057.D	<i>P. aeruginosa</i>		8*	1*	8*
H057.E	<i>P. aeruginosa</i>		8*	0,5	8*
H057.F	<i>P. aeruginosa</i>		8*	0,5	16*
20-L-01597	<i>P. aeruginosa</i>		Aufgeschäumte Milch	8*	0,5
S023.A	<i>P. aeruginosa</i>	Aufgeschlagene Sahne	8*	0,5	4
S023.B	<i>P. aeruginosa</i>		8*	0,5	4
S023.C	<i>P. aeruginosa</i>		8*	0,5	4
S023.D	<i>P. aeruginosa</i>		8*	0,5	4
S023.E	<i>P. aeruginosa</i>		8*	0,5	4
S023.F	<i>P. aeruginosa</i>		8*	0,5	8*
S023.G	<i>P. aeruginosa</i>		8*	0,5	4

Isolat	Spezies	Lebensmittel, aus denen das Isolat gewonnen wurde	MHK Imipenem [mg/l]	MHK Ciprofloxacin [mg/l]	MHK Netilmicin [mg/l]
S023.H	<i>P. aeruginosa</i>		8*	0,5	8*
S023.I	<i>P. aeruginosa</i>		8*	0,5	8*
S023.J	<i>P. aeruginosa</i>		8*	0,5	16*
S023.K	<i>P. aeruginosa</i>		8*	0,5	16*

Es wird ersichtlich, dass die MHKs für das Antibiotikum Imipenem bei jedem der getesteten Stämme über dem ECOFF von 4 mg/l liegen [EUCAST, 2022]. Bei den MHKs für das Antibiotikum Ciprofloxacin liegen nur sieben der 34 aufgeführten Isolate über dem ECOFF von 0,5 mg/l. Die MHKs der aufgeführten Isolate für Netilmicin wurden mit Werten bestimmt, die dem ECOFF von 4 mg/l entsprachen oder übertrafen.

Gemäß EUCAST liegen zudem für die *P. fluorescens*-Gruppe, zu denen u. a. *P. koreensis*, *P. corrugata*, *P. rhodesiae*, *P. gessardii*, *P. libanensis*, *P. synxantha* und *P. fluorescens* zählen, die ECOFFs für Ciprofloxacin bei 0,125 mg/l und für Netilmicin bei 0,5 mg/l [EUCAST, 2022]. Wie in Tab. 34 (siehe Abschnitt 9.8) zu erkennen ist, sind somit auch weitere im Rahmen dieser Arbeit aus den untersuchten Lebensmittelproben gewonnene Isolate als möglicherweise resistent einzuordnen. In der Literatur werden die Bakterien der *P. fluorescens*-Gruppe überwiegend in Zusammenhang mit dem Wachstum von Pflanzen oder dem Lebensmittelverderb beschrieben [Andreani et al., 2014; Raposo et al., 2017]. Hinweise auf eine Humanpathogenität von Mitgliedern der *P. fluorescens*-Gruppe finden sich jedoch nur selten, sodass der Fokus für die hier beschriebenen folgenden Untersuchungen auf die Spezies *P. aeruginosa* gelegt wurde [Scales et al., 2014].

5.5 Ergebnisse des Next Generation Sequencing

Ausgehend von den Ergebnissen der MHK-Bestimmungen wurden nur die 33 Isolate der Spezies *P. aeruginosa* sowie ein *P. putida*-Isolat zur Genomsequenzierung ausgewählt, da für diese durchschnittlich höhere MHK-Werte bestimmt wurden als für Isolate der übrigen Spezies und zudem insbesondere die Spezies *P. aeruginosa* die größere (klinische) Relevanz aufweist [Al-Grawi et al., 2012; Moradali et al., 2017]. Die Ergebnisse der MHK-Bestimmungen sind in Tab. 19 aufgeführt. Die Isolierung der DNA der jeweiligen Stämme erfolgte wie in Abschnitt 4.8.3 beschrieben.

Für die Analyse der ausgewählten 34 Stämme wurden zwei Sequenzierverfahren eingesetzt: Für einen Teil der Isolate wurde die Sequenzanalyse mit einem Gerät der Firma PacBio® durchgeführt. Für die übrigen Stämme erfolgte die Sequenzierung mit dem Gerät MiSeq® der Firma Illumina®.

Für die Stämme, welche mittels Sequenziergerät der Firma PacBio® gemessen wurden, ergab sich eine Gesamtzahl bestimmter Basen zwischen 4,6 und 7,1 Mbp. Das Referenzgenom für die Annotierung war *P. aeruginosa* PAO1. Die Anzahl der Contigs lag zwischen 2 und 7. Die Coverage betrug gemittelt 63 % (45-81 %). Je nach sequenziertem Stamm wurden, unter Bezugnahme auf das Referenzgenom 0 bis 2278 SNPs bestimmt. Der Anteil nicht zuzuordnender Sequenzen lag bei gerundet 0,3 bis 0,9 Mbp. Die für die Auswertungen genutzten Programme sind in den betreffenden Abschnitten und in Anhang 9.9 angegeben.

Bei den Lebensmittelisolaten, welche mit Hilfe des Geräts MiSeq® der Firma Illumina® sequenziert wurden, wurde als Sequenziermethode die paired-end reads (2x 300 bp) gewählt. Die Genomgröße lag für die 24 sequenzierten Lebensmittelisolate zwischen 6,1 und 6,8 Mbp. Für die Annotierung wurde als Referenzgenom ebenfalls *P. aeruginosa* PAO1 verwendet. Die Anzahl der Contigs lag zwischen 54 und 733. Die Coverage betrug gemittelt 62 % (52-71%). Bezogen auf das Referenzgenom wurden je nach sequenziertem Stamm 0 bis 17712 SNPs ermittelt. Der Anteil nicht zuzuordnender Sequenzen lag bei gerundet 0,3 bis 0,9 Mbp. Da das Vorkommen von Plasmiden in Bakterien der Gattung *Pseudomonas* in der Literatur als ubiquitär beschrieben wird, wurde auch das Vorhandensein von Plasmiden untersucht [Boronin, 1992]. Mit Hilfe der Software „ABRicate Plasmid Finder“ (Version 1.0.1) wurden für einige der 24 Lebensmittelisolate, welche mittels MiSeq® sequenziert wurden, Bruchstücke plasmidalen Ursprungs detektiert. Weitere für die Auswertungen genutzte Programme sind in den jeweiligen Abschnitten und in Anhang 9.9 aufgeführt.

Die Aufteilung der 34 *Pseudomonas*-Lebensmittelisolate auf die beiden Sequenziergeräte, die Analytik einzelner Referenzgene, Plasmide und Phylogenetik der jeweiligen Stämme wird im Folgenden näher beschrieben. Die jeweiligen Qualitätsparameter für jedes sequenzierte Isolat sind in Anhang 9.10 aufgeführt.

5.5.1 Ergebnisse PacBio® SMRT

Die Isolate P002.A, P025.A, S018.A, S018.B, D009.A, H032.A, H032.B, H034.A, H034.B und H043.D (alle *P. aeruginosa*) wurden am Forschungszentrum Borstel (Schleswig-Holstein) mittels PacBio® sequenziert. Für die Auswertung wurde die Software „SMRT Link“ (Version 9.0) des Geräteherstellers sowie die Pipeline Bakcharak (Version 2.0) des Bundesinstituts für Risikobewertung verwendet [PacBio, 2021a; BfR, 2021]. Die einzelnen Resistenzgene wurden mit

Hilfe der in der Pipeline Bakcharak integrierten Software ABRicate (Version 1.0.1) bestimmt [BfR, **2021**]. Die folgende Tabelle listet die in den Stämmen nachgewiesenen Resistenzgene, ihre verursachte Resistenz und die jeweiligen Isolate, welche das entsprechende Resistenzgen beinhalten, auf [Poole, **2005**; Poole **2011**; Papp - Wallace et al., **2020**; Lin et al., **2022**].

Tab. 20: Nachgewiesene Resistenzgene von zehn *P. aeruginosa*-Lebensmittelisolaten nach Sequenzierung mittels PacBio®.

Resistenzgen	Isolat	Verursachte Resistenz gegenüber
<i>aph(3')-IIb</i>	P002.A; P025.A; S018.A, S018.B; D009.A, H032.A; H032.B; H034.A; H034.B, H043.D	Aminoglykosiden (u. a. Kanamycin, Neomycin, Streptomycin)
<i>blaOXA₄₈₆</i>	P002.A; P025.A; H043.D	β-Laktamen (Klasse D)
<i>blaOXA₅₀</i>	S018.A; S018.B; D009.A; H032.A; H032.B; H034.A	β-Laktamen (Klasse D)
<i>blaOXA₈₄₇</i>	P002.A	β-Laktamen (Klasse D)
<i>blaOXA₉₀₄</i>	H034.B	β-Laktamen (Klasse D)
<i>blaPDC₁</i>	P002.A	β-Laktamen (Klasse C)
<i>blaPDC₃</i>	P025.A; D009.A	β-Laktamen (Klasse C)
<i>blaPDC₅</i>	H034.B; H043.D	β-Laktamen (Klasse C)
<i>blaPDC₈</i>	S018.A; S018.B; H032.A; H032.B; H034.A	β-Laktamen (Klasse C)
<i>catB7</i>	P002.A; P025.A; S018.B; H032.A; H032.B; H034.A; H034.B	Chloramphenicol (Chloramphenicol-Acetyltransferase)
<i>cprR</i>	P002.A; P025.A; S018.B; H032.B; H034.A; H034.B	(zusammen mit <i>cprS</i>)
<i>cprS</i>	P002.A; P025.A; S018.B; H032.B; H034.A; H034.B	Polymyxin
<i>crpP⁺</i>	P002.A; P002.B; P025.A; S018.A; S018.B; D009.A	Ciprofloxacin ⁺ ; plasmidkodiert; Phosphorylierung
<i>fosA</i>	P002.A; P025.A; S018.B; H032.A; H032.B; H034.A; H034.B	Fosfomycin-Resistenzprotein (bindet Glutathion an Fosfomycin)
<i>mexA</i>	P002.A; P025.A; S018.A; S018.B; D009.A; H032.A; H032.B; H034.A; H034.B; H043.D	Efflux von β-Laktamen und Fluorchinolonen
<i>mexE</i>	P002.A; P025.A; S018.A; S018.B; D009.A; H032.A; H032.B; H034.A; H034.B; H043.D	Efflux von Chinolonen (u. a. Ciprofloxacin)
<i>mexX</i>	P002.A; P025.A; S018.A; S018.B; D009.A; H032.A; H032.B; H034.A; H034.B; H043.D	Efflux von Aminoglykosiden

+ Verweis auf Abschnitt 7.1

5.5.2 Ergebnisse Illumina MiSeq®

Die Isolate 20-L-01597, D009.B, H032.C, H034.C, H043.E, H043.F, H057.B, H057.C, H057.D, H057.E, H057.F, P002.B, S023.A, S023.B, S023.C, S023.D, S023.E, S023.F, S023.G, S023.H, S023.I, S023.J, S023.K (alle *P. aeruginosa*) und D014.A (*P. putida*) wurden im Labor von Dr. Christian Schäfers am Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg) mittels Illumina MiSeq® sequenziert. Es wurde die Pipeline Bakcharak (Version 2.0), welche für die Analyse der Resistenzgene auf die Software ABRicate (Version 1.0.1) zurückgreift, für die Auswertung verwendet [BfR, 2021]. Zudem wurde Gebrauch von der Software MultiQC gemacht (Version 1.9) [Ewels et al., 2016]. In der folgenden Tabelle sind die nachgewiesenen Resistenzgene der Sequenzierung, die Isolate, welche das jeweilige Resistenzgen beinhalten, sowie die verursachte Resistenz aufgelistet [Poole, 2005; Poole 2011; Papp-Wallace et al., 2020; Lin et al., 2022]. Die ausschließlich mit Hilfe der Software MultiQC gewonnenen Daten sind mit einem „*“ markiert.

Tab. 21: Nachgewiesene Resistenzgene von 24 *P. aeruginosa*-Lebensmittelisolaten nach Sequenzierung mittels Illumina MiSeq®.

Resistenzgen	Isolat	Verursachte Resistenz gegenüber
<i>aph(3')-IIb</i>	20-L-1597-1-1; D009.B; H032.C; H034.C; H043.E; H043.F; H057.B; H057.C; H057.D; H057.E; H057.F; P002.B; S023.A; S023.B; S023.C; S023.D; S023.E; S023.F; S023.G; S023.H; S023.I; S023.J; S023.K	Aminoglykosiden (u. a. Kanamycin, Neomycin, Streptomycin)
<i>blaOXA₅₀</i>	20-L-1597-1-1; D009.B; H032.C; H034.C; H057.F; S023.A; S023.B; S023.C; S023.D; S023.E; S023.F; S023.G; S023.H; S023.I; S023.J; S023.K	β-Laktamen (Klasse D)
<i>blaOXA₄₈₆</i>	H043.E; H043.F; H057.B; H057.C; H057.D; H057.E; P002.B	β-Laktamen (Klasse D)
<i>blaOXA₈₄₇</i>	20-L-1597-1-1; H057.B; H057.C; H057.D; H057.E; H057.F; P002.B	β-Laktamen (Klasse D)
<i>blaOXA₉₀₄</i>	H043.D; H043.E; H043.F	β-Laktamen (Klasse D)
<i>blaPDC₁</i>	20-L-1597-1-1; H057.B; H057.C; H057.D; H057.E; H057.F; P002.B	β-Laktamen (Klasse C)
<i>blaPDC₁₂₀</i>	20-L-1597-1-1; H057.F	β-Laktamen (Klasse C)

5. Ergebnisse

Resistenzgen	Isolat	Verursachte Resistenz gegenüber
<i>blaPDC₃</i>	20-L-1597-1-1; D009.B; H057.F	β-Laktamen (Klasse C)
<i>blaPDC₅</i>	H043.E; H043.F	β-Laktamen (Klasse C)
<i>blaPDC₈</i>	H032.C; H034.C; S023.A; S023.B; S023.C; S023.D; S023.E; S023.F; S023.G; S023.H; S023.I; S023.J; S023.K	β-Laktamen (Klasse C)
<i>catB7</i>	20-L-1597-1-1; D009.B; H032.C; H034.C; H043.E; H043.F; H057.B; H057.C; H057.D; H057.E; H057.F; P002.B; S023.A; S023.B; S023.C; S023.D; S023.E; S023.F; S023.G; S023.H; S023.I; S023.J; S023.K	Chloramphenicol (Chloramphenicol- Acetyltransferase)
<i>cprR</i>	20-L-1597-1-1; D009.B; H032.C; H034.C; H043.E; H043.F; H057.B; H057.C; H057.D; H057.E; H057.F; P002.B; S023.A; S023.B; S023.C; S023.D; S023.E; S023.F; S023.G; S023.H; S023.I; S023.J; S023.K	(zusammen mit <i>cprS</i>)
<i>cprS</i>	20-L-1597-1-1; D009.B; H032.C; H034.C; H043.E; H043.F; H057.B; H057.C; H057.D; H057.E; H057.F; P002.B; S023.A; S023.B; S023.C; S023.D; S023.E; S023.F; S023.G; S023.H; S023.I; S023.J; S023.K	Polymyxin
<i>crpP⁺</i>	20-L-1597-1-1; H057.B; H057.C; H057.D; H057.E; H057.F; P002.B; S023.A; S023.B; S023.C; S023.D; S023.E; S023.F; S023.G; S023.H; S023.I; S023.J; S023.K	Ciprofloxacin ⁺ ; plasmidkodiert; Phosphorylierung

⁺ Verweis auf Abschnitt 7.1

5. Ergebnisse

Resistenzgen	Isolat	Verursachte Resistenz gegenüber
<i>fosA</i>	20-L-1597-1-1; D009.B; H032.C; H034.C; H043.E; H043.F; H057.B; H057.C; H057.D; H057.E; H057.F; P002.B; S023.A; S023.B; S023.C; S023.D; S023.E; S023.F; S023.G; S023.H; S023.I; S023.J; S023.K	Fosfomycin-Resistenzprotein (bindet Glutathion an Fosfomycin)
<i>mexA</i>	20-L-1597-1-1; D009.B; H032.C; H034.C; H043.E; H043.F; H057.B; H057.C; H057.D; H057.E; H057.F; P002.B; S023.A; S023.B; S023.C; S023.D; S023.E; S023.F; S023.G; S023.H; S023.I; S023.J; S023.K	Membranfusionsprotein; Teil des Efflux-Systems MexAB-OprM; Efflux von β -Laktamen und Fluorchinolonen
<i>mexB*</i>	20-L-1597-1-1; D009.B; H032.C; H034.C; H043.E; H043.F; H057.B; H057.C; H057.D; H057.E; H057.F; P002.B; S023.A; S023.B; S023.C; S023.D; S023.E; S023.F; S023.G; S023.H; S023.I; S023.J; S023.K	RND-Komponente; Teil des Efflux-Systems MexAB-OprM; Efflux von β -Laktamen und Fluorchinolonen
<i>mexC*</i>	20-L-1597-1-1; D009.B; H032.C; H034.C; H043.E; H043.F; H057.B; H057.C; H057.D; H057.E; H057.F; P002.B; S023.A; S023.B; S023.C; S023.D; S023.E; S023.F; S023.G; S023.H; S023.I; S023.J; S023.K	Membranfusionsprotein; Teil des Efflux-Systems MexCD-OprJ; Efflux von β -Laktamen
<i>mexD*</i>	20-L-1597-1-1; D009.B; H032.C; H034.C; H043.E; H043.F; H057.B; H057.C; H057.D; H057.E; H057.F; P002.B; S023.A; S023.B; S023.C; S023.D; S023.E; S023.F; S023.G; S023.H; S023.I; S023.J; S023.K	RND-Komponente; Teil des Efflux-Systems MexCD-OprJ; Efflux von β -Laktamen

5. Ergebnisse

Resistenzgen	Isolat	Verursachte Resistenz gegenüber
<i>mexE</i>	20-L-1597-1-1; D009.B; D014.A; H032.C; H034.C; H043.E; H043.F; H057.B; H057.C; H057.D; H057.E; H057.F; P002.B; S023.A; S023.B; S023.C; S023.D; S023.E; S023.F; S023.G; S023.H; S023.I; S023.J; S023.K	Membranfusionsprotein; Teil des Efflux-Systems MexEF-OprN; Efflux von Chinolonen
<i>mexF*</i>	20-L-1597-1-1; D009.B; H032.C; H034.C; H043.E; H043.F; H057.B; H057.C; H057.D; H057.E; H057.F; P002.B; S023.A; S023.B; S023.C; S023.D; S023.E; S023.F; S023.G; S023.H; S023.I; S023.J; S023.K	RND-Komponente; Teil des Efflux-Systems MexEF-OprN; Efflux von Chinolonen
<i>mexX</i>	20-L-1597-1-1; D009.B; H032.C; H034.C; H043.E; H043.F; H057.B; H057.C; H057.D; H057.E; H057.F; P002.B; S023.A; S023.B; S023.C; S023.D; S023.E; S023.F; S023.G; S023.H; S023.I; S023.J; S023.K	Membranfusionsprotein; Teil des Efflux-Systems MexXY-OprM; Efflux von Aminoglykosiden
<i>mexY*</i>	20-L-1597-1-1; D009.B; H032.C; H034.C; H043.E; H043.F; H057.B; H057.C; H057.D; H057.E; H057.F; P002.B; S023.A; S023.B; S023.C; S023.D; S023.E; S023.F; S023.G; S023.H; S023.I; S023.J; S023.K	RND-Komponente; Teil des Efflux-Systems MexXY-OprM; Efflux von Aminoglykosiden
<i>oprJ*</i>	20-L-1597-1-1; D009.B; H032.C; H034.C; H043.E; H043.F; H057.B; H057.C; H057.D; H057.E; H057.F; P002.B; S023.A; S023.B; S023.C; S023.D; S023.E; S023.F; S023.G; S023.H; S023.I; S023.J; S023.K	Außenmembranprotein; Teil der Efflux-Systems MexCD-OprJ; Efflux von β -Laktamen

Resistenzgen	Isolat	Verursachte Resistenz gegenüber
<i>oprM</i> *	20-L-1597-1-1; D009.B; H032.C; H034.C; H043.E; H043.F; H057.B; H057.C; H057.D; H057.E; H057.F; P002.B; S023.A; S023.B; S023.C; S023.D; S023.E; S023.F; S023.G; S023.H; S023.I; S023.J; S023.K	Außenmembranprotein; Teil der Efflux-Systeme MexAB-OprM und MexXY-OprM; Efflux von β -Laktamen und Fluorchinolonen bzw. Aminoglykosiden
<i>oprN</i> *	20-L-1597-1-1; D009.B; H032.C; H034.C; H043.E; H043.F; H057.B; H057.C; H057.D; H057.E; H057.F; P002.B; S023.A; S023.B; S023.C; S023.D; S023.E; S023.F; S023.G; S023.H; S023.I; S023.J; S023.K	Außenmembranprotein; Teil der Efflux-Systems MexEF-OprN; Efflux von Chinolonen
<i>ttgA</i>	D014.A	Putative Effluxpumpe
<i>ttgB</i>	D014.A	Putative Effluxpumpe

5.5.3 Vergleich phänotypische und genotypische Resistenz der 34 *Pseudomonas*-Lebensmittelisolate

Der Vergleich der Ergebnisse der phänotypischen Analytik, welche mittels MHK-Bestimmungen erhoben wurden, mit denen der genotypischen Bestimmungen ist in Tab. 22 aufgeführt.

Tab. 22: Vergleich der phänotypischen und genotypischen Resistenzen der analysierten *P. aeruginosa*-Lebensmittelisolate.

Lebensmittelisolat	genotypische Resistenz (bezogen auf Ergebnisse der Sequenzierung)	phänotypische Resistenz (bezogen auf Bestimmung der MHKs)
D009.A	Imipenem, Ciprofloxacin, Netilmicin	Imipenem, Ciprofloxacin ¹ , Netilmicin
D009.B	Imipenem, Ciprofloxacin, Netilmicin	Imipenem, Ciprofloxacin ¹ , Netilmicin
D014.A (<i>P. putida</i>)	Imipenem, Ciprofloxacin, Netilmicin	Imipenem, Ciprofloxacin, Netilmicin
H032.A	Imipenem, Ciprofloxacin, Netilmicin	Imipenem, Ciprofloxacin, Netilmicin
H032.B	Imipenem, Ciprofloxacin, Netilmicin	Imipenem, Ciprofloxacin, Netilmicin
H032.C	Imipenem, Ciprofloxacin, Netilmicin	Imipenem, Ciprofloxacin, Netilmicin

5. Ergebnisse

Lebensmittelisolat	genotypische Resistenz (bezogen auf Ergebnisse der Sequenzierung)	phänotypische Resistenz (bezogen auf Bestimmung der MHKs)
H034.A	Imipenem, Ciprofloxacin, Netilmicin	Imipenem, Ciprofloxacin, Netilmicin
H034.B	Imipenem, Ciprofloxacin, Netilmicin	Imipenem, Ciprofloxacin ¹ , Netilmicin
H034.C	Imipenem, Ciprofloxacin, Netilmicin	Imipenem, Ciprofloxacin ¹ , Netilmicin
H043.D	Imipenem, Ciprofloxacin, Netilmicin	Imipenem, Ciprofloxacin ¹ , Netilmicin
H043.E	Imipenem, Ciprofloxacin, Netilmicin	Imipenem, Ciprofloxacin ¹ , Netilmicin
H043.F	Imipenem, Ciprofloxacin, Netilmicin	Imipenem, Ciprofloxacin ¹ , Netilmicin
P002.A	Imipenem, Ciprofloxacin, Netilmicin	Imipenem, Ciprofloxacin ¹ , Netilmicin
P002.B	Imipenem, Ciprofloxacin, Netilmicin	Imipenem, Ciprofloxacin, Netilmicin
P025.A	Imipenem, Ciprofloxacin, Netilmicin	Imipenem, Ciprofloxacin ¹ , Netilmicin
S018.A	Imipenem, Ciprofloxacin, Netilmicin	Imipenem, Ciprofloxacin ¹ , Netilmicin
S018.B	Imipenem, Ciprofloxacin, Netilmicin	Imipenem, Ciprofloxacin ¹ , Netilmicin
H057.B	Imipenem, Ciprofloxacin, Netilmicin	Imipenem, Ciprofloxacin ¹ , Netilmicin
H057.C	Imipenem, Ciprofloxacin, Netilmicin	Imipenem, Ciprofloxacin ¹ , Netilmicin
H057.D	Imipenem, Ciprofloxacin, Netilmicin	Imipenem, Ciprofloxacin, Netilmicin
H057.E	Imipenem, Ciprofloxacin, Netilmicin	Imipenem, Ciprofloxacin ¹ , Netilmicin
H057.F	Imipenem, Ciprofloxacin, Netilmicin	Imipenem, Ciprofloxacin ¹ , Netilmicin
20-L-01597	Imipenem, Ciprofloxacin, Netilmicin	Imipenem, Ciprofloxacin ¹ , Netilmicin ²
S023.A	Imipenem, Ciprofloxacin, Netilmicin	Imipenem, Ciprofloxacin ¹ , Netilmicin ²
S023.B	Imipenem, Ciprofloxacin, Netilmicin	Imipenem, Ciprofloxacin ¹ , Netilmicin ²

Lebensmittelisolat	genotypische Resistenz (bezogen auf Ergebnisse der Sequenzierung)	phänotypische Resistenz (bezogen auf Bestimmung der MHKs)
S023.C	Imipenem, Ciprofloxacin, Netilmicin	Imipenem, Ciprofloxacin ¹ , Netilmicin ²
S023.D	Imipenem, Ciprofloxacin, Netilmicin	Imipenem, Ciprofloxacin ¹ , Netilmicin ²
S023.E	Imipenem, Ciprofloxacin, Netilmicin	Imipenem, Ciprofloxacin ¹ , Netilmicin ²
S023.F	Imipenem, Ciprofloxacin, Netilmicin	Imipenem, Ciprofloxacin ¹ , Netilmicin
S023.G	Imipenem, Ciprofloxacin, Netilmicin	Imipenem, Ciprofloxacin ¹ , Netilmicin ²
S023.H	Imipenem, Ciprofloxacin, Netilmicin	Imipenem, Ciprofloxacin ¹ , Netilmicin
S023.I	Imipenem, Ciprofloxacin, Netilmicin	Imipenem, Ciprofloxacin ¹ , Netilmicin
S023.J	Imipenem, Ciprofloxacin, Netilmicin	Imipenem, Ciprofloxacin ¹ , Netilmicin
S023.K	Imipenem, Ciprofloxacin, Netilmicin	Imipenem, Ciprofloxacin ¹ , Netilmicin

¹ Es wurde der ECOFF von 0,5 mg Ciprofloxacin/l bestimmt.

² Es wurde der ECOFF von 4 mg Netilmicin/l bestimmt.

Wie zu erkennen ist, unterscheiden sich die Ergebnisse der phänotypischen und genotypischen Analyse im Bezug auf die Resistenzen folglich nur dadurch, dass für einige Isolate die bestimmte MHK dem jeweiligen ECOFF entspricht und nicht übersteigt. Diese MHKs können im Bereich der Standardabweichung liegen, da mutmaßlich nicht immer die gleichen Geräte, wie zur Bestimmung der jeweiligen ECOFFs, verwendet wurden (siehe Anhang 9.2) [Sartorius, 2013].

5.5.4 Nachweis der einzelnen Resistenzgene

Die Berechnung der prozentualen Anteile der jeweiligen Resistenzgene in den folgenden Abschnitten bezieht sich auf die MLST-Sequenztypen, welche in den entsprechenden untersuchten Lebensmitteln nachgewiesen werden konnten. Insgesamt lassen sich die 34 untersuchten Lebensmittelisolate anhand des jeweiligen MLST-Sequenztyps in acht Gruppen einteilen, die denselben Sequenztyp aufweisen (siehe Abschnitt 5.6.1). Das *P. putida*-Isolat D014.A steht dabei für einen der acht Sequenztypen. Zur besseren Vergleichbarkeit werden im Folgenden jedoch nur die *P. aeruginosa*-Isolate und die zugehörigen sieben MLST-Sequenztypen in die Berechnungen der

prozentualen Anteile der Resistenzgene einbezogen. Die Bestimmung der einzelnen Sequenztypen wird genauer in Abschnitt 5.6.1 beschrieben.

5.5.4.1 Aminoglykosidresistenz

Das Resistenzgen *aph(3')-IIb*, welches für eine Aminoglykosidresistenz verantwortlich ist, wurde in allen 33 *P. aeruginosa*-Isolaten der 34 untersuchten *Pseudomonas*-Stämme nachgewiesen. Lediglich das Isolat D014.A wies das Gen *aph(3')-IIb* nicht auf. Isolat D014.A gehört zur Spezies *P. putida* und wurde mit Hilfe des Illumina MiSeq® analysiert.

5.5.4.2 β -Laktamasen

Werden die mittels PacBio® und Illumina MiSeq® erhobenen Daten der Resistenzgene hinsichtlich des Vorhandenseins von β -Laktamasen zusammengeführt, dann wurde das Gen *blaOXA₅₀* mit vier (entspricht 57 %) der sieben nachgewiesenen multiresistenten *P. aeruginosa*-MLST-Sequenztypen am häufigsten identifiziert. Das Vorhandensein von *blaOXA₄₈₆* bzw. *blaPDC₃*, wurde in je drei (43 %) dieser *P. aeruginosa*-Isolatgruppen bestätigt.

blaOXA₈₄₇, *blaPDC₁* bzw. *blaPDC₈* wurde in je zwei (29 %) der sieben Lebensmittelisolatgruppen nachgewiesen. Die Resistenzgene *blaOXA₉₀₄*, *blaPDC₅* und *blaPDC₁₂₀* wurden in je 14 % (entspricht einer von sieben MLST-Sequenztypen) der Isolatgruppen identifiziert. Abb. 37 stellt dies graphisch dar.

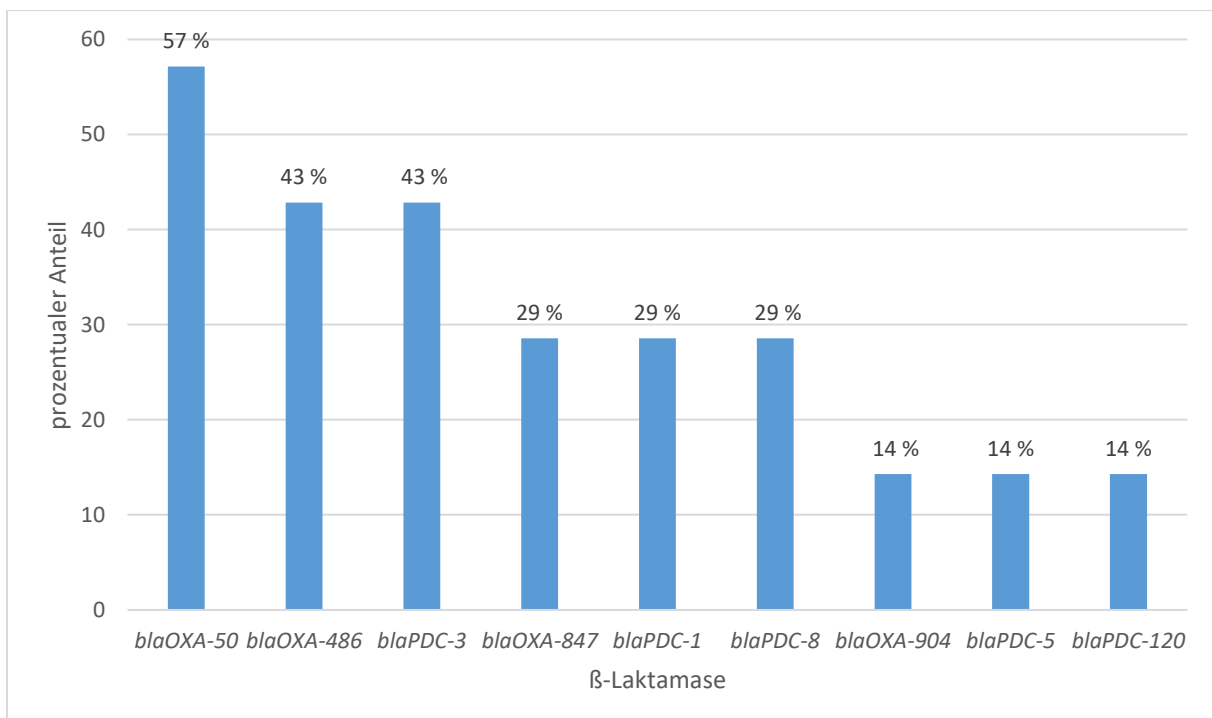


Abb. 37: Prozentuale Verteilung von β -Laktamasengenen der 33 *P. aeruginosa*-Lebensmittelisolate in sieben MLST-Sequenztypen.

5.5.4.3 Effluxpumpen

Zusätzlich konnten mit Hilfe der NGS-Analysen die Effluxpumpen-Gene *mexA*, *mexB*, *mexC*, *mexD*, *mexE*, *mexF*, *mexX* und *mexY* nachgewiesen werden. Hierbei zeigten sich jedoch starke Unterschiede bei der Wahl des Sequenziergerätes in Verbindung mit der anschließenden Auswertung: Für alle 24 *P. aeruginosa*-Lebensmittelisolate, welche mittels Illumina MiSeq® sequenziert und der Software ABRicate (Version 1.0.1) ausgewertet wurden, wurde das Vorhandensein der aufgeführten acht Effluxpumpen-Gene bestätigt. Der prozentuale Anteil des jeweiligen Gens beträgt hier für jedes Isolat bzw. jeden MLST-Sequenztyp folglich 100 %. Mit Hilfe des Sequenziergerätes der Firma PacBio® und anschließender Auswertung mittels der Software ABRicate (Version 1.0.1) wurden für die zehn sequenzierten *P. aeruginosa*-Isolate jedoch nur die Gene *mexA*, *mexB* sowie *mexX* nachgewiesen. Auch dies entspricht einem prozentualen Anteil von 100 %. Die Gene *mexB*, *mexC*, *mexD*, *mexF* und *mexY* konnten jedoch für keines der zehn mittels Gerät der Firma PacBio® sequenzierten Isolate der Spezies *P. aeruginosa* bestätigt werden. Da es sich bei den Isolaten jedoch überwiegend um Klone aus denselben Proben handelt (siehe Abschnitt 5.6.1) und der Nachweis der übrigen Effluxpumpen-Gene mittels Illumina MiSeq® gelang, verwundert dies und soll in Abschnitt 6.4.1 diskutiert werden.

5.5.4.4 Vorhandensein von Plasmiden

Des Weiteren wurde das Augenmerk auf das Vorhandensein möglicher Plasmide gelegt. In der Auflistung der Resistenzgene findet sich für die 23 Stämme P002.A, P002.B, P025.A, D009.A, S018.A, S018.B, 20-L-1597; H057.B, H057.C, H057.D, H057.E, H057.F, S023.A, S023.B, S023.C, S023.D, S023.E, S023.F, S023.G, S023.H, S023.I, S023.J und S023.K das Gen *crpP*. Dies entspricht, unter Berücksichtigung der sieben *P. aeruginosa*-MLST-Sequenztypen, einem Anteil von fünf Sequenztypen (71 %) (siehe Abschnitt 5.6.1). Das Gen *crpP* ist für eine Ciprofloxacinresistenz verantwortlich und wird auf einem Plasmid kodiert (Verweis auf Abschnitt 7.1) [Chávez-Jacobo et al., 2018]. Mit Hilfe der Pipeline Bakcharak (Version 2.0) sowie des „ABRicate Plasmid Finders“, welche in der Software MultiQC (Version 1.9) integriert ist, konnten jedoch keine vollständigen Plasmide zweifelsfrei nachgewiesen werden [Ewels et al., 2016; BfR, 2021]. Es kann jedoch für die aufgeführten Stämme auf Grundlage des Resistenzgens *crpP* angenommen werden, dass zumindest Bruchstücke von Plasmiden mit bei der DNA-Isolation gewonnen und anschließend sequenziert wurden.

5.6 Phylogenetik

Die Verwandtschaft der einzelnen Isolate lässt sich mit Hilfe der Phylogenetik bestimmen. Hierzu eignen sich das MLST sowie die Erstellung phylogenetischer Stammbäume.

5.6.1 MLST

Mit Hilfe des Multi Locus Sequencing Typing (MLST) wurden sieben charakteristische so genannte „Housekeeping“ Gene einiger der sequenzierten Isolate analysiert. Dies sind im Fall von *P. aeruginosa* die Gene *acsA* (Acetyl-Coenzym A-Synthase), *aroE* (Shikimat-Dehydrogenase), *guaA* (GMP-Synthase), *mutL* (DNA-Reperaturprotein), *nuoD* (NADH-Dehydrogenase I, Kette C, D), *ppsA* (Phosphoenolpyruvat-Synthase) und *trpE* (Anthranilat-Synthase Komponente 1). Das dabei entstandene charakteristische Muster, welches englisch „Sequence Type“ (ST) genannt wird, wurde anschließend zum Vergleich der sequenzierten Stämme genutzt. Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse der MLST-Analyse für die *P. aeruginosa*-Stämme 20-L-01597, P002.B, D009.B, H032.C, H034.C, H043.E, H043.F, H057.B, H057.C, H057.D, H057.E, H057.F, S023.A, S023.B, S023.C, S023.D, S023.E, S023.F, S023.G, S023.H, S023.I, S023.J und S023.K, welche alle mittels Illumina MiSeq® sequenziert wurden. Ebenfalls aufgeführt sind die Ergebnisse der Stämme P002.A, P025.A, S018.A, S018.B, D009.A, H032.A, H032.B, H034.A, H034.B und H043.D (alle *P. aeruginosa*) bei denen die Sequenzierung mittels Gerät der Firma PacBio® erfolgte. Das *P. putida* Isolat D014.A ist aufgrund seiner Spezies nicht mit in die Tabelle aufgenommen worden. Die Erstellung des MLST wurde auf Grundlage der Rohdaten, welche mittels Sequenzierung gewonnen werden konnten, durchgeführt. Die Bestimmung des Allelprofils sowie des Sequenztyps erfolgte nach dem MLST-Modul der MultiQC-Software [Version 1.9; Ewels et al., 2016].

Tab. 23: Ergebnisse des MLST für 33 *P. aeruginosa*-Lebensmittelisolate.

Klongruppe	Isolat	Housekeeping Gene (Allelprofil)							ST
		<i>acsA</i>	<i>aroE</i>	<i>guaA</i>	<i>mutL</i>	<i>nuoD</i>	<i>ppsA</i>	<i>trpE</i>	
1	P002.A	17	5	12	3	14	4	7	244
	P002.B	17	5	12	3	14	4	7	244
2	P025.A	40	5	36	153	3	7	19	3090
3	D009.A	17	5	1	3	4	6	215	2505
	D009.B	17	5	1	3	4	6	215	2505
4	H032.A	6	5	4	3	4	6	25	1232
	H032.B	6	5	4	3	4	6	25	1232
	H032.C	6	5	4	3	4	6	25	1232
	H034.A	6	5	4	3	4	6	25	1232

5. Ergebnisse

Klongruppe	Isolat	Housekeeping Gene (Allelprofil)							ST
		<i>acsA</i>	<i>aroE</i>	<i>guaA</i>	<i>mutL</i>	<i>nuoD</i>	<i>ppsA</i>	<i>trpE</i>	
5	H034.B	22	5	91	3	4	4	7	1129
4	H034.C	6	5	4	3	4	6	25	1232
5	H043.D	22	5	91	3	4	4	7	1129
	H043.E	22	5	91	3	4	4	7	1129
	H043.F	22	5	91	3	4	4	7	1129
1	H057.B	17	5	12	3	14	4	7	244
	H057.C	17	5	12	3	14	4	7	244
	H057.D	17	5	12	3	14	4	7	244
	H057.E	17	5	12	3	14	4	7	244
6	H057.F	6	5	11	5	2	42	7	2545
	20-L-15097	6	5	11	5	2	42	7	2545
7	S018.A	11	5	1	7	9	4	7	17
	S018.B	11	5	1	7	9	4	7	17
	S023.A	11	5	1	7	9	4	7	17
	S023.B	11	5	1	7	9	4	7	17
	S023.C	11	5	1	7	9	4	7	17
	S023.D	11	5	1	7	9	4	7	17
	S023.E	11	5	1	7	9	4	7	17
	S023.F	11	5	1	7	9	4	7	17
	S023.G	11	5	1	7	9	4	7	17
	S023.H	11	5	1	7	9	4	7	17
	S023.I	11	5	1	7	9	4	7	17
	S023.J	11	5	1	7	9	4	7	17
S023.K	11	5	1	7	9	4	7	17	

Es ist zu sehen, dass vereinzelt mehrere Stämme denselben Sequenztyp bzw. dasselbe Allelprofil aufweisen. Dies betrifft beispielsweise die Isolate S023.A bis S023.K, welche alle aus derselben aufgeschlagenen Sahneprobe isoliert wurden und insgesamt von drei verschiedenen Nährböden (CFC-Agar mit 4 mg Imipenem/l, CFC-Agar mit 0,5 mg Ciprofloxacin/l und CFC-Agar mit 4 mg Netilmicin/l) entnommen wurden. Die Isolate S018.A und S018.B, die auch aus einer Sahneprobe stammen, zeigen ebenfalls dasselbe Allelprofil wie die Isolate S023.A bis S023.K. Es handelte sich hierbei um Proben aus demselben Entnahmebetrieb. Des Weiteren weisen die Proben H032.A, H032.B, H032.C (alle aus einer Probe Rinderhack), H034.A und H034.C (beide Isolate aus einer

Tatarprobe) bzw. H057.B, H057.C, H057.D, H057.E (aus einer Probe Schweinehack), P002.A und P002.B (aus einer Tomatenprobe) dieselben Muster auf. Diese Beobachtung gilt ebenso für die Isolate H034.B, H043.D, H043.E und H043.F (aus einer Probe Rinderhack) bzw. 20-L-01597 (aus einer aufgeschäumten Milch) und H057.F (aus Schweinehack). Die Isolate D009.A und D009.B, aus einer Probe gewürztem Putenfleisch, zeigen ebenfalls eine Übereinstimmung. Anhand der Sequenztypen lassen sich zudem alle Isolate mit einer Übereinstimmung in sieben MLST-Sequenztypen zusammenfassen. Diese Sequenztypen wurden für die Berechnungen in Abschnitt 5.5.4 herangezogen.

5.6.2 Phylogenetische Stammbäume auf Basis des cgMLST und des SNP

Neben dem Nachweis der in den Isolaten vorhandenen Resistenzgene und der Durchführung einer MLST-Analyse auf Grundlage der NGS-Daten, wurden zusätzlich anhand der Ergebnisse für die 24 mittels Illumina MiSeq® sequenzierten Isolate drei phylogenetische Stammbäume erstellt. Zum einen zwei Stammbäume auf Basis des cgMLST (core genome Multi Locus Sequencing Typing) zum anderen einer auf Grundlage des SNP (Single Nucleotide Polymorphism). Für letzteren wurde das Programm „IQ-Tree“ verwendet [Version 1.6.12; Ngyuen et al., **2015**]. Die Stammbäume auf Grundlage des cgMLST wurden mit Hilfe der Auswertesoftware ChewieSnake, welche für die eigentliche Erstellung der phylogenetischen Bäume auf das Programm GrapeTree zurückgreift, erstellt [Version 3.0.0; Zhou et al., **2018**; Deneke et al., **2021**]. Als Referenzstamm wurde *P. aeruginosa* PAO1 verwendet. Dieser ist mit der Bezeichnung „Reference“ gekennzeichnet. Die Alleldifferenzen zwischen den jeweiligen Isolaten sind in rot aufgeführt.

Zudem wurden je zwei Distanzmatrices mittels der Programme ChewieSnake und snippySnake [Version 1.0.0; Deneke, **2019**] erstellt. Auch hier wurde *P. aeruginosa* PAO1 als Referenzstamm verwendet. Die Stammbäume und Distanzmatrices sind in den folgenden Abbildungen aufgeführt.

Das *P. putida*-Isolat D014.A konnte im Gegensatz zu allen anderen sequenzierten *P. aeruginosa*-Isolaten aufgrund einer stetigen Fehlermeldung nur für die Erstellung der cgMLST-Stammbäume bzw. Distanzmatrix hinzugezogen werden.

5. Ergebnisse

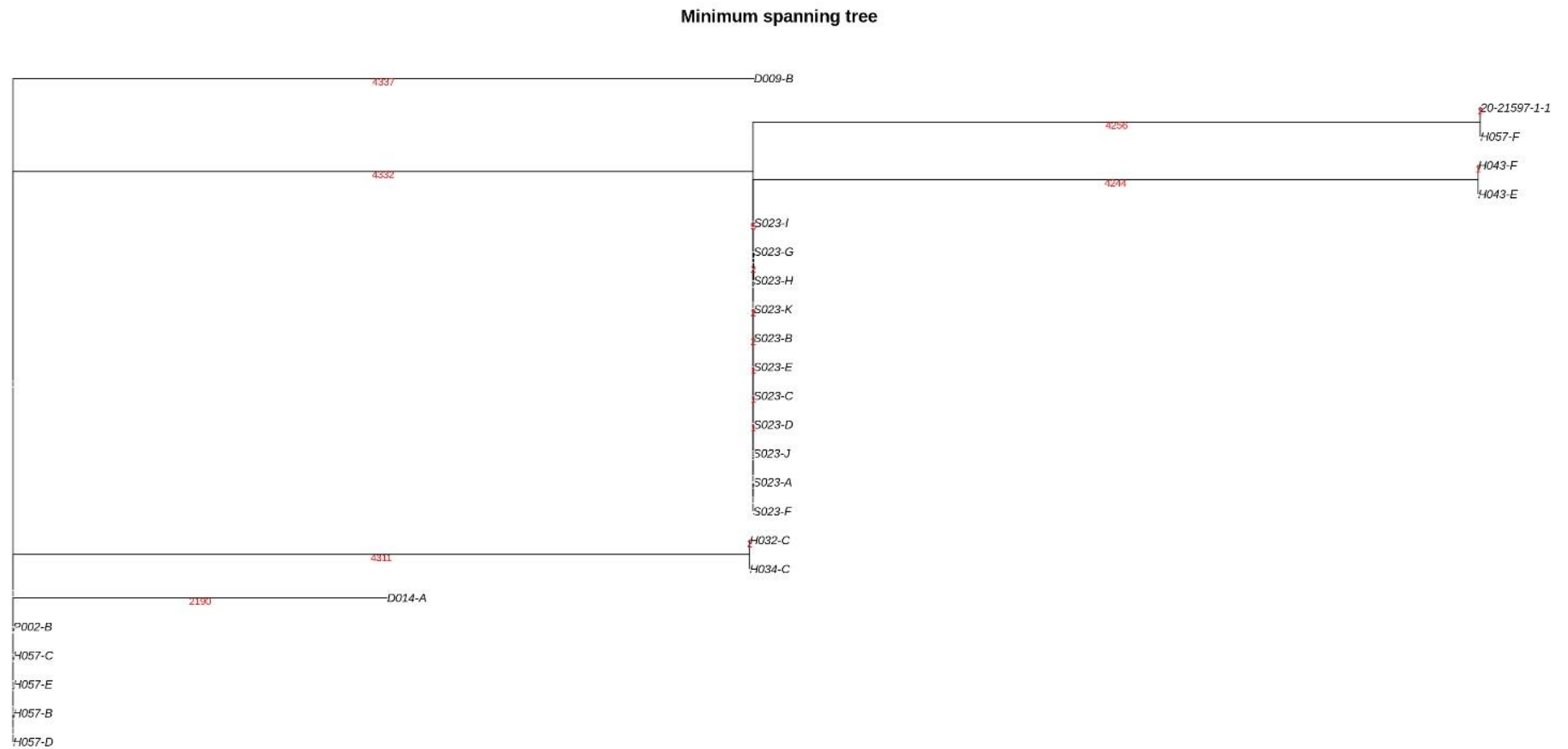


Abb. 38: Phylogenetischer Stammbaum der mittels Illumina MiSeq® sequenzierten *Pseudomonas*-Isolate auf Basis des cgMLST (Auswertung mittels ChewieSnake/ GrapeTree, Version 3.0.0; die Alleldifferenzen sind in rot dargestellt).

Minimum spanning tree

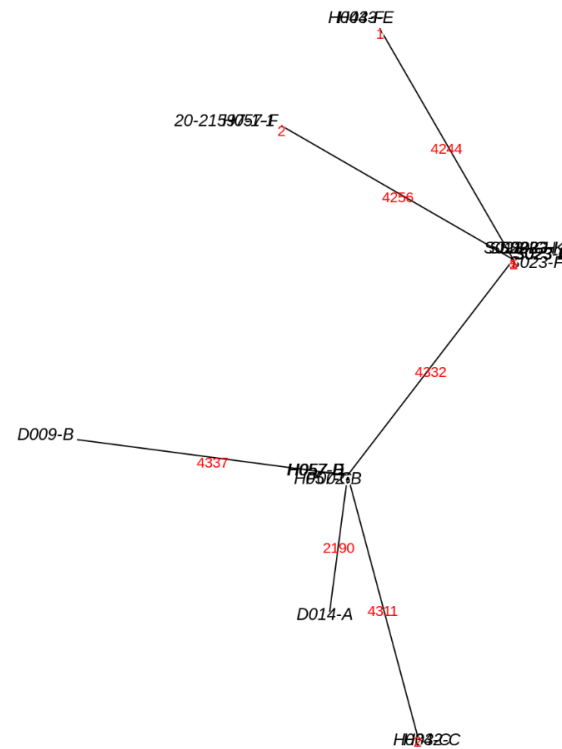


Abb. 39: Phylogenetischer Stammbaum der mittels Illumina MiSeq® sequenzierten Isolate auf Basis des cgMLST, andere Darstellung zu Abb. 38 (Auswertung mittels Chewiesnake/ GrapeTree, Version 3.0.0; die Alleldifferenzen sind in rot dargestellt).

5. Ergebnisse

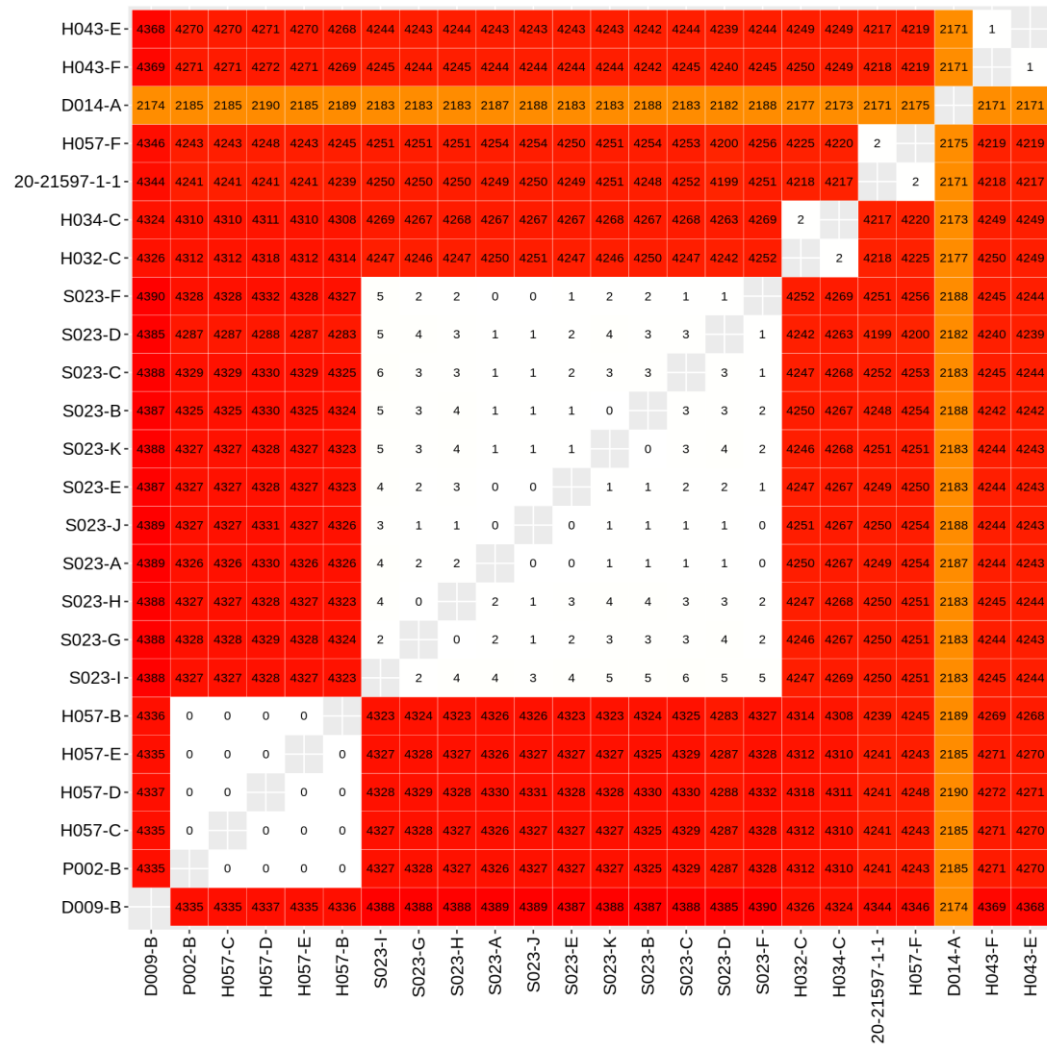


Abb. 40: Allele-Distanzmatrix der mittels Illumina MiSeq® sequenzierten Isolate (Auswertung mittels ChewieSnake, Version 3.0.0).

5. Ergebnisse

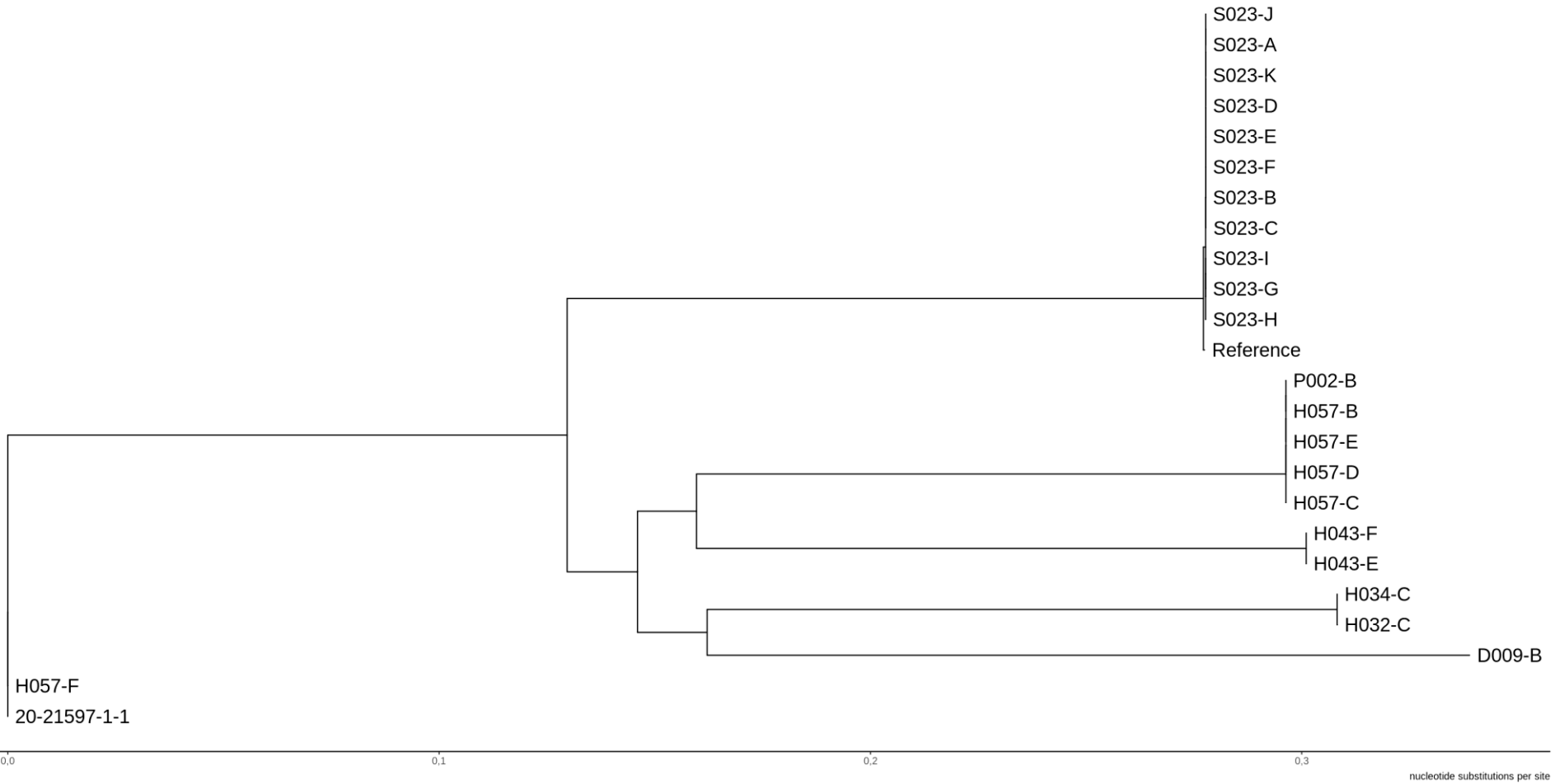


Abb. 41: Phylogenetischer Stammbaum der mittels Illumina MiSeq® sequenzierten Isolate auf Basis der SNPs (Auswertung mittels IQ-Tree, Version 1.6.12; der abgebildete Maßstab gibt die Nukleotidaustauschrate an).

5. Ergebnisse

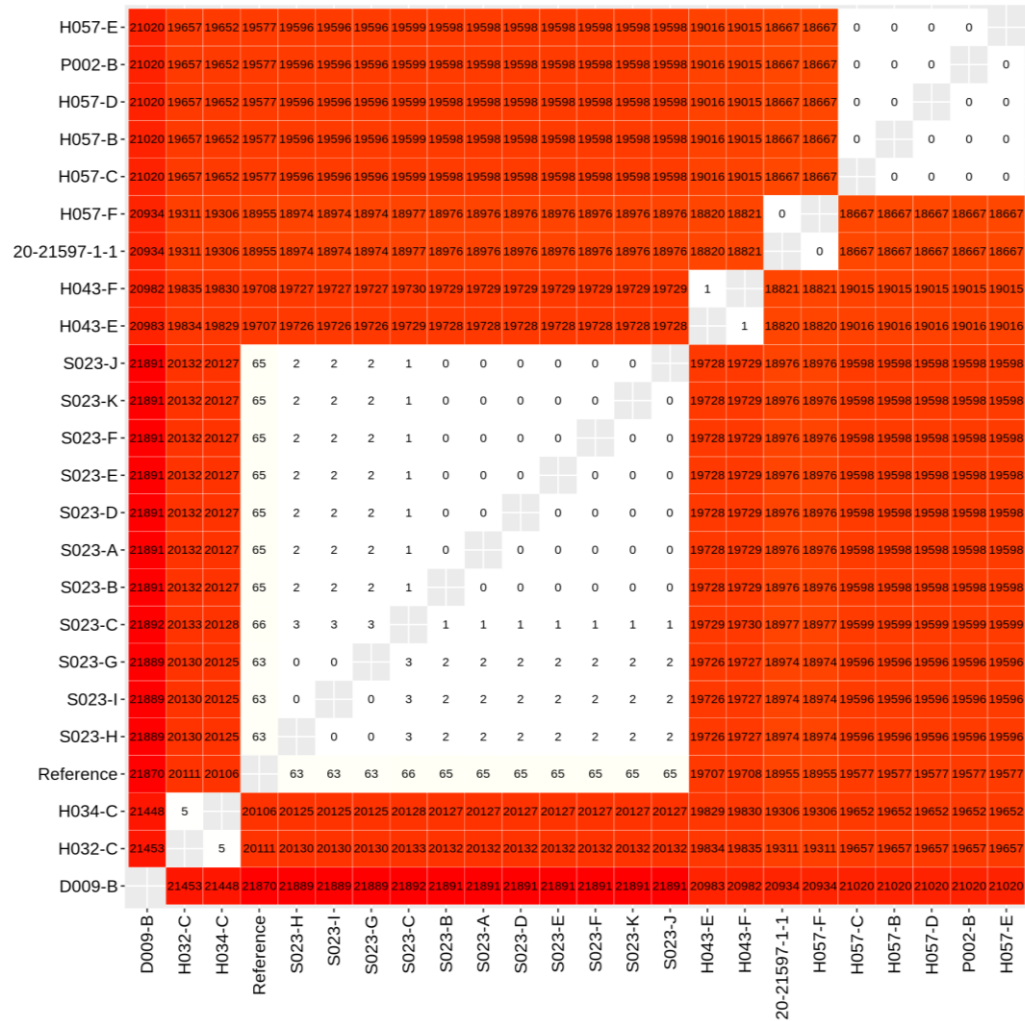


Abb. 42: SNP-Distanzmatrix für die mittels Illumina MiSeq® sequenzierten Isolate (Auswertung mittels snippySnake, Version 1.0.0).

Sowohl in Abb. 38 bzw. Abb. 39, die einen phylogenetischen Stammbaum auf Grundlage des cgMLST zeigt, als auch Abb. 41 (auf Basis des SNPs) konnten mehrere Stämme unterschiedlichen Clustern zugeordnet werden. So zeigen die Stämme S023.A bis S023.K einen hohen Verwandtschaftsgrad. Dies konnte auch für die Isolate H057.B, H057.C, H057.D, H057.E und P002.B bzw. H043.E und H043.F bzw. H032.C und H034.C beobachtet werden. Die Isolate D014.A, das einzige *P. putida*-Isolat in diesen Abbildungen mit *P. aeruginosa*-Stämmen, und D009.B konnten keinem Cluster der genannten Gruppen zugeordnet werden.

Die Alleldifferenzen beim phylogenetischen Stammbaum auf Basis des cgMLST sowie der Distanzmatrix (siehe Abb. 38 bis Abb. 40) betragen für das Cluster S023.A bis S023.K 1 bis 2, bei den Stämmen H032.C und H034.C 2. Ebenso wurde die Alleldifferenz mit einem Wert von 2 für die Isolate 20-L-01597 und H057.F bestimmt. Die Stämme H043.E und H043.F weisen eine Differenz der Allele von 1 auf, wohingegen die Alleldifferenz bei den Stämmen H057.B, H057.C, H057.D, H057.E und P002.B 0 beträgt.

Für den phylogenetischen Stammbaum auf Grundlage des SNP (siehe Abb. 41) sowie die Distanzmatrix (siehe Abb. 42) zeigen sich die Differenzen der einzelnen Isolate in den jeweiligen Clustern ähnlich: Die Stämme S023.A bis S023.K weisen Nukleotidunterschiede von 0 bis 3 auf. Die Differenz zwischen den Isolaten H057.F und 20-L-01597 beträgt 0 ebenso wie für alle Stämme des Clusters H057.B, H057.C, H057.D, H057.E und P002.B. Für die Alleldifferenz der Stämme H034.C und H032.C wurde ein Wert von 5 bestimmt und für die Isolate H043.E und H043.F zeigte die Analyse einen Wert von 1.

Es lässt sich somit aufgrund der geringen Alleldifferenz des cgMLST und Nukleotidunterschiede der SNPs von 0 bis 5 begründet davon ausgehen, dass es sich um Klone desselben jeweiligen Stammes handelt. Diese Ergebnisse werden zusätzlich durch den Vergleich mit den Sequenztypen (siehe Abschnitt 5.6.1) der jeweiligen Gruppen an Isolaten deutlich.

6. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein kulturelles Nachweis- und Zählverfahren für (multi-)resistente Pseudomonaden entwickelt. Damit konnten mehr Informationen über das Vorkommen dieser Bakterien in handelsüblichen, überwiegend roh verzehrbaren, Lebensmitteln erlangt werden.

Zudem wurden die so gewonnenen Isolate hinsichtlich ihrer Antibiotikaresistenzen mittels MHK-Bestimmungen charakterisiert. Die Anwendung des Next Generation Sequencing für ausgewählte Isolate wurde zudem genutzt, um mehr Einblick über das Vorhandensein bestimmter Resistenzgene zu erlangen.

6.1 Validierung des eigenen kulturellen Nachweis- und Zählverfahren für präsumtiv (multi-)resistente Pseudomonaden

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein kulturelles Nachweis- und Zählverfahren für präsumtiv (multi-)resistente Pseudomonaden für den horizontalen Anwendungsbereich in Lebensmitteln entwickelt. Hierzu bot es sich an ausgehend von der DIN EN ISO **13720:2010-12** für die Zählung präsumtiver *Pseudomonas* spp. in Fleisch- und Fleischerzeugnissen vorzugehen.

Als Nährmedium für die Voranreicherung wurde TSB genutzt. Es handelt sich hierbei um ein Universalmedium, welches sich für eine Vielzahl Aerobier und Anaerobier eignet. Dadurch konnte gewährleistet werden, dass alle Pseudomonaden miterfasst wurden [Thermo Fisher, **2022**]. Da die Untersuchungen nur den Nachweis präsumtiv (multi-)resistenter Pseudomonaden zum Ziel hatten, wurde sich für den Einsatz eines Antibiotikums bereits in der Voranreicherung entschieden. Hierzu wurde Cefpodoxim genutzt. Durch die Eigenschaften der (multi-)resistenten Bakterien der Gattung *Pseudomonas* blieben diese aufgrund ihrer Resistenzeigenschaften in ihrem Wachstum ungehemmt. Begleitflora, wie beispielsweise *Salmonella* spp., *Klebsiella* spp. und einige *E. coli*-Stämme werden jedoch gehemmt [Knothe et al., **1991**]. Es wurde eine Konzentration von 8 mg Cefpodoxim/l für die Voranreicherung gewählt. Wie schon in der DIN EN ISO **13720:2010-12** wurde auch für das hier entwickelte kulturelle Nachweis- und Zählverfahren der CFC-Agar als Nährmedium genutzt. Der Zusatz der Antibiotika Imipenem, Ciprofloxacin und Netilmicin erfolgte, da mit Hilfe dieser nicht nur die drei Antibiotikagruppen Carbapeneme, Fluorchinolone und Aminoglykoside abgedeckt werden konnten, sondern auch explizit nach resistenten Pseudomonaden selektiert wurde. Als Konzentrationen für die Nährmedien wurden 4 mg/l für Imipenem und Netilmicin sowie 0,5 mg/l für Ciprofloxacin gewählt. Dies entspricht den ECOFF-Werten für die Spezies *P. aeruginosa* nach EUCAST [EUCAST, **2022**].

Die Validierung des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten kulturellen Nachweis- und Zählverfahrens umfasste die Untersuchungen zum Anwendungsbereich, der Inklusivität, Exklusivität, Spezifität, Selektivität, Falsch-Positiv bzw. Falsch-Negativ-Rate, Produktivität, Sensitivität, der relativen Richtigkeit, dem Konkordanzindex Kappa und dem eLOD₅₀.

6.1.1 Anwendungsbereich

Da das hier beschriebene Verfahren für den horizontalen Anwendungsbereich (das heißt für alle Lebensmittelwarengruppen) Verwendung finden sollte, wurden für die Validierung des Anwendungsbereiches gemäß DIN EN ISO **16140-2:2016-11** fünf Lebensmittelkategorien untersucht. Es wurde sich für die Gruppen „rohes Fleisch und küchenfertige Fleischprodukte“, „wärmebehandelte Milch- und Milchprodukte“, „verzehrfertige, aufwärmfertige Fischprodukte“, „frisches Gemüse und Obst“ sowie „Lebensmittel aus mehreren Bestandteilen oder Zutaten für eine Mahlzeit“ entschieden. Somit wurden auch Warengruppen gewählt, in denen die einzelnen Lebensmittel überwiegend roh verzehrt werden (wie „frisches Obst und Gemüse“ oder „rohes Fleisch und küchenfertige Fleischprodukte“) und daher ein besonderes Risiko für die Aufnahme von (multi-)resistenten Pseudomonaden durch den Verzehr besteht. Des Weiteren werden für diese Lebensmittel und ihre dazugehörigen Warengruppen auch in der Literatur Nachweise von (multi-)resistenten Pseudomonaden beschrieben [Raposo et al., **2017**]. Hinsichtlich der in den verschiedenen Warengruppen vorhandenen Begleitflora konnten die Vorgaben der DIN EN ISO **16140-2:2016-11** erfüllt werden, da neben Proben mit einem hohen Keimgehalt an Begleitflora (z. B. Hackfleisch) auch solche mit niedrigen Gehalten (H-Sahne, Fertigsuppe) inkludiert werden konnten. Ebenso wurde darauf geachtet, dass unterschiedliche Verarbeitungsstufen der Lebensmittel für die Validierungen verwendet wurden: So wurden beispielsweise mit den Tomaten (welche stellvertretend für die Kategorie „frisches Obst und Gemüse“ standen) rohe, unverarbeitete Lebensmittel und mit der Fertigsuppe (zugehörig zu „Lebensmittel aus mehreren Bestandteilen oder Zutaten für eine Mahlzeit“) ein Produkt mit hohem Verarbeitungsgrad genutzt.

Die anschließend durchgeführte Verfahrensvergleichsuntersuchung der DIN EN ISO **13720:2010-12** mit dem eigenen zu validierenden Verfahren zeigte keine Unterschiede für die Stämme *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. fluorescens* ATCC 13525 und *P. putida* LMG 2257 für die Lebensmittelmatrices Fleisch (hier: Hackfleisch), Milchprodukte (hier: H-Sahne), Fisch (hier: Lachs), Fertiggerichte (hier: Suppe) und pflanzliche Lebensmittel (hier: Tomate). Es konnte auf jedem der zu testenden Nährmedien (CFC-Agar, CFC-Agar mit 4 mg Imipenem/l, CFC-Agar mit 0,5 mg Ciprofloxacin/l, CFC-Agar mit 4 mg Netilmicin/l sowie TSA als Referenzmedium) ein Nachweis der zugegebenen Stämme erfolgen. Lediglich beim Vergleich der Verfahren mit *P. putida* LMG 2257

wurde kein Wachstum des genannten Stammes auf CFC-Agar mit 0,5 mg Ciprofloxacin/l beobachtet, da dieser gegenüber Ciprofloxacin in der genannten Konzentration eine Sensibilität zeigt und daher in Anwesenheit dieses Antibiotikums kein Wachstum erfolgt. Zusammengefasst konnte jedoch durch die weite Bandbreite der untersuchten unterschiedlichen Lebensmittelkategorien sichergestellt werden, dass das eigene Verfahren für den horizontalen Anwendungsbereich geeignet ist und für den Nachweis und die Quantifizierung von (multi-)resistenten Pseudomonaden eingesetzt werden kann. Dabei konnte zusätzlich mit Hilfe von *P. putida* LMG 2257 gezeigt werden, dass nicht resistente Pseudomonaden auf dem entsprechenden Nährmedium nicht erfasst werden.

6.1.2 Inklusivität

Im Rahmen der Untersuchungen für die Inklusivität sollte die Eignung des neuen Verfahrens resistente Vertreter unterschiedlicher Spezies der Gattung *Pseudomonas* aus einem Bereich weiterer Mikroorganismen sicher nachzuweisen belegt werden. Hierzu wurde ausgehend von der DIN EN ISO **16140-3:2021-06** gearbeitet. Da nicht nur eine Spezies der Gattung *Pseudomonas* mit dem hier beschriebenen Verfahren sicher detektiert werden sollte, sondern alle etwaig in Lebensmitteln vorhandene (multi-)resistente Pseudomonaden, wurde die Stämme *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. fluorescens* ATCC 13525, *P. putida* LMG 2257, *P. fulva* S007.A und *P. fragi* H061.A verwendet. Die Stämme weisen u. a. Resistenzen gegenüber den Antibiotika Imipenem, Ciprofloxacin und Netilmicin auf [EUCAST, **2022**; siehe auch Tab. 34, Anhang 9.8]. Mit den gewählten Stämmen wurden regelmäßig in diversen Lebensmitteln vorkommende Spezies dieser gramnegativen Bakterien verwendet. Die fünf Stämme konnten auf allen vier verschiedenen Nährmedien (CFC-Agar, CFC-Agar mit 4 mg Imipenem/l, CFC-Agar mit 0,5 mg Ciprofloxacin/l und CFC-Agar mit 4 mg Netilmicin/l) mit niedrigsten Keimgehalten, aufgrund der experimentell erforderlichen hundertfachen Verdünnung, von 10^2 KbE/g nachgewiesen werden. Somit konnte belegt werden, dass das genannte kulturelle Nachweis- und Zählverfahren für den Nachweis verschiedener Spezies präsumtiv (multi-)resistenter Pseudomonaden geeignet ist.

6.1.3 Exklusivität

Um zu belegen, dass das eigene kulturelle Nachweis- und Zählverfahren nicht durch den Einfluss möglicher weiterer Nichtzielkeime negativ beeinflusst wird, wurde die Exklusivität bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die getesteten grampositiven Bakterien sowie die Hefen und Schimmelpilze nicht auf den verwendeten CFC-Nährmedien wuchsen. Ebenfalls wurde das Wachstum der meisten gramnegativen Bakterien unterdrückt. Lediglich die multiresistenten Stämme *K. pneumoniae* NCTC 13438, *E. roggkampii* CCUG 59573, *Y. enterocolitica* DSM 13030 und die *E. coli*-Stämme 16874, CCUG 92975 und CCUG 59343 zeigten bei einigen der getesteten

Verdünnungsstufen Wachstum. Dies ist insbesondere im Hinblick auf die Lebensmittelmatrices Fleisch, Milchprodukte und pflanzliche Lebensmittel in denen *E. coli* als Begleitflora zu erwarten ist, als kritisch zu betrachten. Jedoch sei an dieser Stelle angebracht, dass *E. coli* auf den verwendeten Nährmedien anhand von olfaktorischen Auffälligkeiten sowie optischen Besonderheiten von Bakterien der Gattung *Pseudomonas* unterschieden werden kann. So zeigt *E. coli* auf CFC-Agar kleine, runde, erhabene und farblose glänzende Kolonien wohingegen die Kolonien der Gattung *Pseudomonas* (mit Ausnahme der Spezies *P. aeruginosa* und *P. fulva*) auf CFC-Agar größere Kolonien, welche eine weiß bis gelbliche Färbung aufweisen, zeigen. Zudem zeichnen sich die meisten Spezies der genannten Gattung durch nicht scharf abgegrenzte Konturen aus. Die Kolonien der Spezies *P. aeruginosa* sind mitunter von einer gelb-grünlichen Färbung geprägt. Die Spezies *P. fulva* unterscheidet sich des Weiteren, insbesondere bei längerer Lagerung der bebrüteten Nährmedien, aufgrund einer gelblich bis orangefarbene Färbung von den anderen Spezies. Auch die Bakterien der Gattungen *Enterobacter*, *Yersinia* und *Klebsiella* zeigen auf dem verwendeten Nährmedium runde, erhabene und farblose, glänzende bis trübe Kolonien. In der Größe der Kolonien sind sie variabel. Die Unterscheidung zu Kolonien der Pseudomonaden ist jedoch auch hier anhand der genannten optischen Merkmale gegeben.

6.1.4 Spezifität und Falsch-Positiv-Rate

Mit dem Begriff der Spezifität wird das Maß der Beeinflussung der Methode durch weitere Nichtzielmikroorganismen beschrieben. Für das eigene Nachweis- und Zählverfahren konnte ein Wert von 100 % bestimmt werden. Dementsprechend betrug die Falsch-Positiv-Rate 0 %. Somit ist das Maß der Beeinflussung von Nichtzielkeimen im Hinblick auf die Methode nicht vorhanden.

6.1.5 Selektivität

Der Begriff der Selektivität bezeichnet die Hemmung eines Nichtzielkeims auf oder in einem selektiven Nährmedium unter definierten Bedingungen und war ebenfalls Teil der Verfahrensvalidierung. Als Referenzkeim wurde u. a. *E. coli* ATCC 25922 verwendet. Der genannte Stamm wurde genutzt, da er zum einen in der DIN EN ISO **11133:2020-10** als Prüfkeim für die Bestimmung der Selektivität für CFC-Agar (ohne Zugabe von zusätzlichen Antibiotika) aufgeführt wird und zum anderen in der Literatur diese Spezies häufig als Teil der Begleitflora der Lebensmittelmatrices Fleisch, Fisch, Milchprodukte und pflanzliche Lebensmittel genannt wird [Vincent et al., **2010**; Costa, **2013**; Rasheed et al., **2014**].

Es konnte für die Nährmedien CFC-Agar ohne zusätzliches Antibiotikum, CFC-Agar mit 4 mg Imipenem/l, CFC-Agar mit 0,5 mg Ciprofloxacin/l und CFC-Agar mit 4 mg Netilmicin/l eine Selektivität von 7 bestimmt werden. Dadurch wird ersichtlich, dass *E. coli* ATCC 25922 durch die

verwendeten Nährmedien vollständig gehemmt wird. Zusätzlich wurde die Selektivität für *S. cerevisiae* ATCC 9673 (stellvertretend für die Gruppe Hefen und Schimmelpilze) und *B. cereus* ATCC 9139 (stellvertretend für grampositive Bakterien) bestimmt. Es konnten Selektivitätsfaktoren von 5 bzw. 6 berechnet werden. Auch dies entspricht den Anforderungen der DIN EN ISO **11133:2020-10**.

6.1.6 Produktivität

Mit Hilfe der Produktivität kann der Wiederfindungsgrad eines Zielkeims vom Nährmedium unter definierten Bedingungen beschrieben werden. Die DIN EN ISO **11133:2020-10** besagt, dass bei der Bestimmung der Produktivität unter der Verwendung eines selektiven Mediums (hier: CFC) und eines nicht-selektiven Nährmediums (hier: TSA) ein Wert von 0,5 nicht unterschritten werden soll. Die für das hier beschriebene Verfahren verwendeten Nährmedien erfüllen mit den bestimmten Werten von 0,5 bis 2 dieses Kriterium. Somit entspricht das in der vorliegenden Arbeit beschriebene kulturelle Nachweis- und Zählverfahren hinsichtlich der Produktivität den genannten Anforderungen.

6.1.7 Sensitivität und Falsch-Negativ-Rate

Wie viel Prozent aller sicher positiven Proben mit der eigenen Methode auch als sicher positiv mit der Vergleichsmethode (DIN EN ISO **13720:2010-12**) erkannt werden, wird Sensitivität genannt. Da mit beiden Methoden insgesamt alle Proben als positiv erkannt wurden und kein Nachweis eines falsch negativen Analyseergebnisses erfolgte, konnte für die Sensitivität ein Wert von 100 % bestimmt werden. Dementsprechend wurde für die Falsch-Negativ-Rate ein Wert von 0 % berechnet. Folglich ist das hier beschriebene kulturelle Nachweis- und Zählverfahren vollständig geeignet positive Proben auch sicher als solche zu detektieren.

6.1.8 eLOD₅₀

Beim eLOD₅₀ handelt es sich um die zu erwartende Nachweisgrenze mit einer Wahrscheinlichkeit von 50 %. Für das zu validierende kulturelle Nachweis- und Zählverfahren wurde der eLOD₅₀ mittels MPN-Verfahren bestimmt. Dabei wurde sich an den Bestimmungen der DIN EN ISO **16140-3:2021-06** orientiert. Anhand der Anzahl der positiven Nachweise je Verdünnungsstufe und der in der DIN EN ISO **16140-3:2021-06** aufgeführten Tabelle konnte der eLOD₅₀ abgelesen werden. Für den Stamm *P. aeruginosa* ATCC 27853 wurde für alle Lebensmittelgruppen ein eLOD₅₀ von 1,7 KbE in 25 g Probe bestimmt. Für die Lebensmittelgruppen Sahne und Lachs wurde für *P. fluorescens* ATCC 13525 ein eLOD₅₀ von 0,9 KbE in 25 g Probe ermittelt, für die Matrix Tomate ein Wert von 1,7 KbE in 25 g und für das Hackfleisch ein Wert von

0,6 KbE in 25 g berechnet. Der eLOD₅₀ für die Fertigsuppe in Kombination mit *P. fluorescens* ATCC 13525 ergab einen Wert von 1,2 KbE in 25 g.

Auf die Verwendung des Stammes *P. putida* LMG 2257 wurde für die Bestimmung des eLOD₅₀ verzichtet, da dieser bei der Verdünnungsstufe 10⁻⁶ kein Wachstum mehr auf den verwendeten Nährmedien CFC-Agar mit Imipenem und CFC-Agar mit Netilmicin (je 4 mg/l) zeigte. Zusätzlich weist der genannte Stamm eine Resistenz gegenüber Ciprofloxacin in der verwendeten Konzentration von 0,5 mg/l auf. Diese Werte zeigen, dass die zu validierende Methode sehr geeignet für den Nachweis von (multi-)resistenten Pseudomonaden ist und diese auch bei geringem Vorhandensein in verschiedenen Lebensmittelmatrices sicher detektieren kann.

6.1.9 relative Richtigkeit und Konkordanzindex.

Die relative Richtigkeit gibt die geschätzte Wahrscheinlichkeit an, dass die beiden Methoden des Methodenvergleichs die gleichen Resultate ergeben. Der Konkordanzindex Kappa zeigt das Maß der Übereinstimmung zweier Prüfverfahren bezüglich eines Analysenmerkmals [SAS, 2017]. Für die relative Richtigkeit wurde ein Wert von 100 % berechnet. Für Kappa wurde ein Wert von 1 bestimmt, was eine nahezu vollständige Übereinstimmung zwischen den beiden Prüfverfahren bedeutet.

Zusammengefasst konnte anhand der Durchführung der zuvor beschriebenen einzelnen Validierungsparameter erfolgreich gezeigt werden, dass das im Rahmen dieser Arbeit entstandene Verfahren für den Nachweis- und die Quantifizierung (multi-)resistenter Pseudomonaden geeignet ist. Nach eigenem Kenntnisstand handelt es sich bei dem hier validierten Nachweis- und Zählverfahren um das erste publizierte Verfahren, welches sich auf den Nachweis resistenter Bakterien der Gattung *Pseudomonas* fokussiert und dabei einen horizontalen Anwendungsbereich abdeckt.

6.2 Vorkommen der isolierten Spezies in den jeweiligen Lebensmitteln

Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte kulturelle Nachweis- und Zählverfahren für (multi-)resistente Pseudomonaden wurde für die Analytik von 184 Lebensmitteln (bzw. 176 randomisierten Lebensmittelproben) genutzt. Dabei konnten insgesamt 211 (bzw. 200) Bakterienstämme der Gattung *Pseudomonas* isoliert werden. Diese gliedern sich in 22 verschiedene Spezies. Am häufigsten wurden dabei die Spezies *P. fulva*, *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fragi* und *P. koreensis* isoliert. Bezogen auf die Anzahl der Proben aus denen die jeweilige Spezies isoliert wurden, ergibt sich folgende Reihenfolge: *P. fulva*, *P. fragi*, *P. koreensis*, *P. putida* und *P. aeruginosa*.

P. fulva, *P. putida*, *P. fragi* und *P. koreensis* zählen zu klassischen Lebensmittelverderbern verschiedener Warengruppen im Bereich der Lebensmittel [Raposo et al., 2017]. Daher verwundert deren Nachweis bei den hier aufgeführten Untersuchungen nicht: Die Spezies *P. fulva* wurde mit dem hier beschriebenen Verfahren am häufigsten nachgewiesen. In der Literatur wurde bereits von einem durch *P. fulva* ausgelösten Fall von Meningitis berichtet [Almuzara et al., 2010]. Jedoch handelt es sich hierbei mutmaßlich um eine Seltenheit, da nach eigenem Kenntnisstand keine weiteren Fälle hierzu publiziert wurden. Bei *P. aeruginosa* handelt es sich zudem nicht nur um einen Lebensmittelverderber, sondern auch obligat pathogenen Krankheitserreger, der geschwächte Menschen schädigen kann [Al-Grawi et al., 2012]. Auch vor dem Hintergrund weltweit zunehmender Antibiotikaresistenzen und den damit verbundenen Schwierigkeiten der Behandlung ist die nachgewiesene Anzahl von isolierten (multi-)resistenten Pseudomonaden im Rahmen dieser Arbeit als kritisch zu betrachten [Navon – Venezia et al., 2005]. Bestärkt wird diese Problematik insbesondere in den Lebensmittelwarengruppen, bei denen die Produkte roh verzehrt werden können bzw. bereits im verzehrfertigen Zustand untersucht worden sind. Auffällig bei der Untersuchung der jeweiligen Lebensmittelkategorien ist außerdem, dass manche Spezies in einigen Lebensmitteln besonders häufig nachgewiesen werden konnten, dies soll im Folgenden einmal für jede der untersuchten Lebensmittelwarengruppen dargestellt werden.

6.2.1 Hackfleisch

Die Lebensmittelgruppe Hackfleisch zählt, neben den ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit untersuchten pflanzlichen Lebensmitteln, zu der Kategorie in der die meisten Nachweise von präsumtiv (multi-)resistenten Pseudomonaden erfolgten und die höchsten Keimgehalte bestimmt wurden. Dabei spielt die Oberfläche von Hackfleisch diesbezüglich eine entscheidende Rolle. Durch die vergrößerte Oberfläche liegen optimale Wachstumsbedingungen für u. a. die Bakterien der Gattung *Pseudomonas* vor [Krämer, 2017]. Auch der hohe Proteinanteil, sowie a_w -Wert und die übliche Lagerungstemperatur bis maximal +4 °C sorgen für ein gesteigertes Wachstum der aufgeführten gramnegativen Bakterien [Gonçalves et al., 2017; Andreani et Fasolato, 2017]. In den eigens untersuchten Hackfleischproben konnten überwiegend die Spezies *P. fulva* (40 Isolate, in 19 % aller Proben), *P. fragi* (16 Isolate in 20 % aller Proben) und *P. aeruginosa* (14 Isolate, in 6 % der Proben) nachgewiesen werden. Bereits in der Literatur wurde *P. fragi* als dominierende Spezies der Gattung *Pseudomonas* in Hackfleisch beschrieben [Kleeberger et Busse, 1975; Motoyama et al., 2010]. Auch konnte ein Zusammenhang zwischen einem steigenden Keimgehalt an *P. fragi* und der Veränderung der Farbe von Hackfleisch beobachtet werden [Bala et al., 1977; Motoyama et al., 2010]. In der Publikation von Ercolini et al. [2020] wurde Hackfleisch, bzw. Fleisch im Allgemeinen, zudem als ökologische Nische für die Spezies *P. fragi* beschrieben. Maßgeblich sei

dafür der Gehalt an Eisen im Fleisch [Ercolini et al., **2010**]. Die Spezies, die gemäß Literatur ebenfalls häufig in Hackfleisch nachgewiesen werden, sind *P. fluorescens* und *P. lundensis* [Krämer, **2017**; Raposo et al., **2017**]. In den mit dem beschriebenen Verfahren untersuchten Hackfleischproben wurden die beiden Spezies jedoch jeweils nur in einer der Proben (entspricht 1 %) nachgewiesen. Das Vorkommen von *P. fulva* als eine der dominierenden Spezies in Hackfleisch wurde in der Literatur bisher nach eigenem Kenntnisstand nicht beschrieben, jedoch in den eigenen Untersuchungen beobachtet. An dieser Stelle sei darauf verwiesen, dass mit dem hier verwendeten kulturellen Nachweis- und Zählverfahren der Fokus auf der Isolation von (multi-)resistenten Pseudomonaden lag. In den angegebenen publizierten Untersuchungen finden sich keine Hinweise über ein spezielles Augenmerk auf (multi-)resistente Stämme bzw. das etwaige Vorhandensein mehrerer Resistenzen der isolierten Stämme. Dies könnte die Diskrepanz zwischen den isolierten Spezies erklären. Bezüglich einer möglichen Gesundheitsgefahr für den Verbraucher, die durch den Verzehr der genannten Hackfleischproben und den darin nachgewiesenen präsumtiven (multi-)resistenten Pseudomonaden, entstehen kann, sollte den Durckerhitzungshinweisen, welche für rohes Hackfleisch gemäß Art. 6 VO (EG) Nr. **2073/2005** bezogen auf das mögliche Vorhandensein von Salmonellen, vorgeschrieben sind, Beachtung geschenkt werden. Durch das Erhitzen von Hackfleisch bzw. Lebensmitteln im Allgemeinen kann es zu einem Minimieren der vorliegenden Keimgehalte an Pseudomonaden kommen [Krämer, **2017**]. Da jedoch auch der Verzehr von beispielsweise Tatar oder Thüringer Mett üblicherweise roh erfolgt und besonders auch aus diesen Proben vielfach Pseudomonaden isoliert wurden, kann eine Kolonisierung des menschlichen Intestinaltraktes mit diesen Bakterien, ausgelöst durch den Verzehr der aufgeführten Lebensmittel, jedoch nicht ausgeschlossen werden [Kominos et al., **1972**].

6.2.2 Sahne

Die untersuchten 23 (bzw. 22 randomisierten) Sahneprouben enthielten nachweislich am häufigsten die Spezies *P. aeruginosa* (13 Isolate aus 9 % der Proben), *P. fulva* (sieben Isolate aus 17 % der Proben) und *P. rhodesiae* (drei Isolate aus 9 % der untersuchten Proben). Die isolierten Stämme der Spezies *P. aeruginosa* stammen allerdings aus lediglich zwei (entspricht 9 %) der untersuchten Proben. Unter Berücksichtigung der einen Anlassprobe ergibt sich somit für die Spezies *P. aeruginosa*, dass nur zwei Isolate aus 5 % der untersuchten 22 Sahneprouben stammen. In der Literatur finden sich keine Angaben über das explizite Vorkommen von *P. aeruginosa* in (aufgeschlagener) Sahne. Die betreffenden Proben stammen aus einem Eiscafé in Hamburg. Durch eine nach Beendigung der Untersuchung dort eigens durchgeführte Betriebsbegehung und Beproubung der Rohware, kann gemutmaßt werden, dass es sich hier um eine Kontamination der dort verwendeten Sahneaufschlagmaschine gehandelt haben könnte. Auch zum Vorkommen von

P. fulva in Sahne finden sich in der Literatur keine Angaben. Das häufige Vorkommen von *P. fluorescens*, *P. fragi*, *P. lundensis*, *P. gessardii* und *P. taetrolens* in Milch- und Milchprodukten, wie durch Quintieri et al., **2019** beschrieben, konnte im Rahmen der eigenen Untersuchungen nicht bestätigt werden. Bei allen untersuchten Proben- mit Ausnahme von einer Probe, einer original verpackten, flüssigen Sahne, handelte es sich um bereits aufgeschlagene Sahne aus verschiedenen Eiscafés in Hamburg. Üblicherweise werden Pseudomonaden durch die Wärmebehandlung, wie sie beispielsweise bei H-Sahne durchgeführt wird, in ihrer Keimzahl stark reduziert oder abgetötet, sodass ein Nachweis dieser Bakterien in der Regel unwahrscheinlich ist [Krämer, **2017**]. Es ist daher zu mutmaßen, dass es sich entweder bei den verwendeten Ausgangsprodukten um lediglich pasteurisierte Sahne (und keine H-Sahne) gehandelt haben könnte, die verwendete Sahne bereits einen längeren Zeitraum geöffnet war oder es eine Kontamination der verwendeten Sahneaufschlagautomaten mit Bakterien der Gattung *Pseudomonas*, durch Kreuzkontamination oder mangelnde Betriebshygiene gegeben hat. Eine Kontamination von Sahneaufschlagmaschinen wird insbesondere durch eine unzureichende Reinigung und den Anteil vieler kleiner Bauelemente der Automaten begünstigt [Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt, **2016**].

6.2.3 Lachs und weitere Fischproben

In den insgesamt 19 untersuchten Lachsproben konnten nur in vier Proben Bakterien der Gattung *Pseudomonas* nachgewiesen werden. Dies entspricht somit einem Anteil von 79 % der Proben in denen keine Pseudomonaden enthalten waren. Von den isolierten Spezies wurde *P. fulva* (9 Isolate aus 16 % der Proben) am häufigsten gewonnen, gefolgt von *P. putida* (vier Isolate aus 10 % der Proben). Auch hierbei handelt es sich bei den genannten Spezies zunächst einmal um klassische Lebensmittelverderber in Lebensmitteln [Raposo et al., **2017**]. Das Vorkommen der Spezies *P. fluorescens* und *P. fragi* als Bakterien, wie sie in der Literatur für den hauptsächlichen Verderb von Lachsfleisch verantwortlich gemacht werden [Hatje et al., **2014**; Xie et al., **2018**], konnte in den hier beschriebenen Untersuchungen nicht bestätigt werden. Interessant sind diese Ergebnisse auch hinsichtlich der Proben aus denen sie stammen: Es handelt sich hierbei um vier Lachsproben aus diversen Sushi-Restaurants in Hamburg. Alle Lachsproben wurden als rohe Stückware zur Untersuchung eingeliefert. Sowohl das Alter als auch die Herkunft der Proben konnten nicht nachvollzogen werden. Die anderen 15 untersuchten Proben der Warengruppe Lachs, in denen keine Pseudomonaden nachgewiesen wurden, waren abgepackte Lachsscheiben von unterschiedlichen Herstellern aus diversen Supermärkten. Überwiegend wurden diese Lachsproben auch einem kalten Räucherprozess unterzogen (siehe Tab. 32, Anhang 9.6). Auf Grundlage dieser Ergebnisse kann vermutet werden, dass die Wahrscheinlichkeit Pseudomonaden zu isolieren in diesen Produkten eher gering ist.

Bei der Untersuchung der weiteren Fischproben wurden in acht von elf untersuchten Lebensmitteln keine Pseudomonaden nachgewiesen. Aus den übrigen drei Fischproben, bei denen es sich ausnahmslos um rohen Thunfisch handelte, wurden die Spezies *P. putida* (sechs Isolate aus 18 % der weiteren Fischproben), *P. fulva* (fünf Isolate aus ebenfalls 18 % der weiteren Fischproben) sowie *P. monteilii* (ein Isolat aus 9 % der weiteren Fischproben) gewonnen. In einer Studie wird berichtet, dass es sich bei *P. fluorescens*, *P. lundensis* und *P. fragi* um klassische Verderbniserreger der Gattung *Pseudomonas* in Fischen handelt [El-Aziz, 2015]. Keine der aufgeführten Spezies wurde in den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Fischproben nachgewiesen. Jedoch ist mit drei Proben, aus denen Pseudomonaden isoliert wurden, die Stichprobengröße auch sehr klein. Dennoch ist auffällig, dass es sich bei den beschriebenen drei Proben um Thunfischproben aus diversen Sushi-Restaurants in Hamburg handelte. Dies stellt eine Parallele zu den Ergebnissen der Lachsproben dar: Auch bei den untersuchten Thunfischproben handelte es sich um rohe Stückware, bei denen weder das Alter, noch die Herkunft nachvollzogen werden konnten. Die Restaurants aus denen die Lachs- und Thunfischproben entnommen wurden, waren jedoch überwiegend unterschiedlich. Nur aus einem Restaurant wurde sowohl eine Lachs- als auch eine Thunfischprobe entnommen, aus denen dann Pseudomonaden isoliert wurden. Es handelte sich in diesem Fall jedoch um unterschiedliche Spezies. Nachgewiesenermaßen gehören Pseudomonaden zur natürlichen Flora von Fisch [Hatje et al., 2014; Xie et al., 2018]. Des Weiteren entwickeln sich Pseudomonaden bei der Lagerung von Fisch schnell zur dominierenden Spezies [Gram, 1993].

6.2.4 pflanzliche Lebensmittel

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten pflanzlichen Lebensmittel zählen, neben der Warengruppe Hackfleisch (siehe Abschnitt 5.3.1), zu der Kategorie in der die meisten Pseudomonaden und deren höchste Keimgehalte nachgewiesen wurden. So wurden aus 31 der 51 untersuchten Lebensmittel insgesamt 40 Pseudomonaden gewonnen. Die Spezies *P. koreensis* (elf Isolate aus 18 % der Proben) wurde dabei am häufigsten isoliert. *P. corrugata* (6 Isolate aus 12 % der Proben) sowie *P. flavescens* (vier Isolate aus 6 % der Proben) wurden ebenfalls nachgewiesen. Auf die Spezies *P. aeruginosa* entfallen drei Isolate mit einem Probenanteil von 4 %. In der Literatur wird der Nachweis von *P. aeruginosa* in Salat und Tomaten beschrieben [Kominos et al., 1972]. Diese Spezies wurde im Rahmen der hier beschriebenen Untersuchungen tatsächlich nur in einer Tomaten- sowie einer Salatprobe nachgewiesen. Jedoch gab es mehr Tomaten- und Salatproben aus denen die Spezies *P. aeruginosa* nicht isoliert wurde (nur insgesamt zwei von 31 Salat- bzw. Tomatenproben enthielten nachweislich die Spezies *P. aeruginosa*). Anstelle dessen wurde die Spezies *P. koreensis* am häufigsten in allen untersuchten pflanzlichen Lebensmitteln bestimmt. Dies unterscheidet sich von den Ergebnissen der anderen analysierten Warengruppen Hackfleisch oder

Lachs, bei denen bezogen auf die Probenanzahl die Spezies *P. fragi* bzw. *P. fulva* dominierten. *P. koreensis* wurde bei den eigenen Untersuchungen überwiegend in Salatproben und Kräutern nachgewiesen. Jedoch enthielten diese, neben den bereits erwähnten Spezies *P. aeruginosa* und *P. koreensis*, unter anderem auch *P. oleovorans*, *P. chlororaphis*, *P. fulva*, *P. flavescens* sowie *P. synxantha*. Die Spezies *P. syringae* und *P. cichorii*, zwei typische Pflanzenpathogene, wurden in den untersuchten Lebensmitteln jedoch nicht nachgewiesen [Pauwelyn et al., 2011; Andreani et Fasolato, 2017]. Aufgrund der Tatsache, dass die untersuchten Proben der Warengruppe „pflanzliche Lebensmittel“ allesamt roh verzehrt werden können, sollte das Potenzial, dass die genannten Lebensmittel durch Verzehr als Vektor für eine mögliche Kolonisierung des menschlichen Intestinaltraktes mit (multi-)resistenten Pseudomonaden fungieren können, nicht unterschätzt werden [Kominos et al., 1972].

6.2.5 Diverse weitere Lebensmittel

Die Warengruppe „diverse weitere Lebensmittel“ bestand vorrangig aus Lebensmittelproben, die im Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg) zur Untersuchung eingegangen sind und bei denen teilweise Auffälligkeiten festgestellt wurden. Dies bezieht insbesondere sensorische Abweichungen (u. a. Geruch, Aussehen) mit ein. Zudem handelt es sich zum Teil um Verdachtsproben, bei denen zum Beispiel Auffälligkeiten im Lebensmittelbetrieb zu einer Probenahme geführt haben. Sieben der acht im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Anlassproben entfallen auf die hier beschriebene Kategorie. Es wurden u. a. unbehandelte und behandelte Fleischerzeugnisse sowie rohe Fleischstücke, Rohmilchkäse, Soßen und Desserts mit hohem Sahneanteil untersucht. Zusammengefasst wurden aus sechs der 16 analysierten Lebensmittel Pseudomonaden isoliert. Es handelte sich bei diesen sechs Proben ausnahmslos um randomisierte Planproben. Dabei wurde die Spezies *P. putida* (drei Isolate in 6 % der Proben bzw. 11 % der neun randomisierten Proben) am häufigsten gewonnen. *P. koreensis* wurde zweimal in 13 % bzw. 22 % der Proben nachgewiesen. Ebenfalls gewonnen wurden die Spezies *P. aeruginosa*, *P. fulva* und *P. guariconensis* (je zwei Isolate aus 6 % der Proben bzw. 11 % der neun randomisierten Proben). Insgesamt zeigen diese Untersuchungen eine Vielfalt der isolierten Spezies, die auch mit der Heterogenität der untersuchten Warengruppen zusammenhängen dürfte. Bei vier der sechs Proben, aus denen Pseudomonaden gewonnen wurden, handelte es sich um unterschiedliche Fleischzubereitungen aus Restaurants in Hamburg, die jedoch vor dem Verzehr noch einer Hitzebehandlung unterzogen werden müssen. Eine mögliche Gefahr für den Verbraucher sollte daher nicht anhand der aufgeführten Ergebnisse bestehen. Die übrigen zwei der sechs Proben mit einem Nachweis von Pseudomonaden waren jedoch Desserts mit einem hohen Anteil an Sahne (eine Nuss-Schnitte und ein Tiramisu; siehe Tab. 33, Anhang 9.7). Diese wurden im Gegensatz zu den bereits erwähnten

Fleischzubereitungen in einem verzehrfertigen Zustand für die hier beschriebenen Untersuchungen verwendet. Es wird vermutet, dass die verwendete Sahne ausschlaggebend für die Nachweise der Pseudomonaden in diesen Proben war. Bei den aus den genannten Proben isolierten Spezies handelt es sich um *P. koreensis* (zweimal), *P. rhodesiae* und *P. chlororaphis* (je einmal). In den ebenfalls untersuchten Sahneproben (siehe Abschnitt 5.2.3) wurden diese Spezies, bis auf *P. rhodesiae*, jedoch nicht isoliert.

6.3 Minimale Hemmkonzentration

Wie in Abschnitt 5.4 beschrieben, wurde für alle vorliegenden Stämme die minimale Hemmkonzentration bestimmt. Dies schließt die 26 Stämme der Stammsammlung sowie die 211 Isolate mit dem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten kulturellen Nachweis- und Zählverfahren für präsumtiv (multi-)resistente Pseudomonaden-Stämme ein. Es wurden die minimalen Hemmkonzentrationen für die Antibiotika Imipenem, Ciprofloxacin und Netilmicin bestimmt. Diese drei Antibiotika wurden auch für das beschriebene Verfahren zum Nachweis präsumtiv (multi-)resistenter Pseudomonaden verwendet (siehe Abschnitt 4.3). Die Ergebnisse sind in vielerlei Hinsicht interessant:

So weisen die gewonnenen Stämme der Spezies *P. aeruginosa* insgesamt etwas höhere MHKs auf als die anderen Spezies. Dies betrifft insbesondere die ausgewählten multiresistenten Referenzstämme NCTC 13437 und NCTC 13921 aus der für diese Arbeit vorliegenden Stammsammlung. Im Vergleich zu allen weiteren analysierten Stämmen zeigten diese durchgehend die höchsten MHKs. So wurden für Imipenem und Netilmicin MHKs von >256 mg/l und für Ciprofloxacin eine minimale Hemmkonzentration von 128 mg/l bestimmt. Es handelt sich bei diesen beiden Stämmen um Isolate, die nachgewiesenermaßen Metallo- β -Laktamasen aufweisen [PHE, 2022; PHE 2022a]. *P. aeruginosa* NCTC 13921 wurde als Auswurf aus dem Rachenbereich eines hospitalisierten Patienten isoliert [PHE, 2022a].

Hier zeigt sich eine Parallele zu den *P. aeruginosa* Isolaten aus den Lebensmitteln: Auch diese weisen im Vergleich zu anderen nachgewiesenen Spezies höhere MHKs auf, was den Daten nach EUCAST, 2022 entspricht. Jedoch lagen diese Werte im Vergleich zu den klinischen Isolaten NCTC 13437 und NCTC 13921 zusammengefasst deutlich niedriger. Im Schnitt weisen die *P. aeruginosa*-Isolate aus den Lebensmitteln minimale Hemmkonzentrationen von 8 bis >256 mg/l für Imipenem, 0,25 bis 1 mg/l für Ciprofloxacin und 4 bis >256 mg/l für Netilmicin auf.

Ebenfalls interessant sind die Stämme K14 und K7b, welche aus einer Diplomarbeit aus dem Jahr 2020 stammen und die für diese Arbeit freundlicherweise genutzt werden durften [Hasani, 2020]. Die genannten Stämme sind Teil der in Tab. 31, Anhang 9.5, aufgeführten Stammsammlung. Es

handelt sich um die Spezies *P. putida* und *P. guariconensis*. Beide Isolate stammen aus frischen Kräutern. K14 wurde aus Dill und K7b aus Basilikum isoliert. Die Isolate K14 und K7b weisen eine Resistenz gegenüber dem Reserveantibiotikum Colistin mit minimalen Hemmkonzentrationen von >512 mg/l auf und zeigen auch in den eigenen Untersuchungen der MHKs Auffälligkeiten. So liegt die MHK für Imipenem bei beiden Isolaten bei >256 mg/l. Für Ciprofloxacin wurde im Fall des Isolates K14 eine MHK von 0,25 mg/l und für K7b von 1 mg/l bestimmt. Die minimale Hemmkonzentration für Netilmicin lag bei beiden Stämmen bei 2 mg/l. Somit liegen die MHKs sowohl für Ciprofloxacin als auch Netilmicin unter den ECOFFs, welche durch EUCAST für *Pseudomonas aeruginosa* festgelegt werden [EUCAST, 2022]. Die Resistenz gegenüber Colistin, einem Antibiotikum aus der Gruppe der Polymyxine, wird überwiegend durch das Gen *mcr-1* vermittelt, welches auf einem Plasmid lokalisiert ist [Liu et al., 2016]. Auch die β -Laktamasen, die zu einer Imipenemresistenz führen können, sind plasmidvermittelt [Troillet et al., 1997]. Diese Co-Resistenz von Imipenem und Colistin wurde bereits für das Bakterium *E. coli* beschrieben. Auch die Übertragung des *mcr-1*-Genes mit Hilfe des Plasmides auf andere gramnegative Bakterienarten, wie *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., *Enterobacter* spp. und *Shigella* spp. wurde ebenfalls beobachtet [RKI, 2016]. Von daher scheinen die hier gemachten Beobachtungen nicht verwunderlich, dass die *Pseudomonas*-Stämme sowohl eine hohe Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Imipenem als auch eine Colistinresistenz aufweisen. Ob die verbliebenen 24 Stämme der Stammsammlung oder die 211 Isolate aus den Lebensmitteln ebenfalls eine Colistinresistenz zeigen, wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht weiter getestet.

Bei einigen weiteren Stämmen, die aus den 184 untersuchten Lebensmittelproben gewonnen wurden, wurde eine minimale Hemmkonzentration für Imipenem >256 mg/l bestimmt. Dazu zählen die Isolate P002.A, P002.B (beides *P. aeruginosa*), P004.A (*P. oleovorans*), H047.D, H047.E, H049.A, H049.B, H049.C, H049.D und H051.A (alle *P. fulva*). Interessant ist hierbei die Verteilung der Lebensmittel aus denen die aufgeführten Pseudomonaden stammen: Die *P. aeruginosa*-Isolate stammen aus einer Tomatenprobe, das Isolat P004.A aus Dill, die Isolate H047.D und H047.E aus gemischtem Hack und die Isolate H049.A bis H049.D sowie H051.A aus Thüringer Mett. Besonders kritisch zu betrachten ist die Tatsache, dass Tomaten, Dill und Thüringer Mett in der Regel roh verzehrt werden. Zudem ist die Spezies *P. fulva* in der Aufzählung dieser Isolate besonders häufig genannt. Jedoch ist zu beachten, dass die Stämme nur aus insgesamt drei Hackproben (H047, H049 und H051) isoliert wurden. Ein Zusammenhang zwischen hohen MHKs gegenüber Imipenem bei Stämmen der Spezies *P. fulva* wurde nach eigenem Kenntnisstand bisher nicht publiziert.

Das Isolat D014.A, welches zur Spezies *P. putida* zählt, zeigte in den Untersuchungen der minimalen Hemmkonzentration ebenfalls eine Auffälligkeit. So wurden MHKs für Imipenem von 64 mg/l, für

Ciprofloxacin von 1 mg/l und für Netilmicin von >256 mg/l bestimmt. Diese Ergebnisse sind besonders im Hinblick auf den bestimmten Wert für das Antibiotikum Netilmicin interessant. Eine MHK für das Antibiotikum Netilmicin mit einem Wert von >256 mg/l wurde im Rahmen dieser Arbeit lediglich für die klinischen *P. aeruginosa* Stämme NCTC 13437 und NCTC 13921 und das Isolat D014.A der Spezies *P. putida* bestimmt. Auch liegen die Werte für Imipenem und Ciprofloxacin höher als die durchschnittlich bei allen anderen untersuchten Isolaten bestimmten minimalen Hemmkonzentrationen. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde sich dazu entschlossen das Isolat D014.A, welches aus einer marinierten Hähnchenbrust stammt, zu sequenzieren. Warum gerade dieses Isolat im Vergleich zu anderen aus rohen Fleischproben isolierten Stämme so hohe MHKs aufweist, konnte jedoch nicht geklärt werden, da keine entsprechenden Resistenzgene mittels NGS nachgewiesen wurden.

Bezüglich der bestimmten minimalen Hemmkonzentrationen für die getesteten Isolate der Spezies *P. fluorescens* wurden folgende Beobachtungen gemacht: Die aus der Stammsammlung stammenden *P. fluorescens*-Stämme 17-L-06238-1-1, 17-L-06549-2-1, 17-L-08128-3-1, 17-L-08580-1-1, 17-L-08580-2-1, 17-L-08582-1-1, 17-L-08880-2-1 und 17-L-10564-1-1 wurden im Jahr 2017 im Rahmen von Routineuntersuchungen im Institut für Hygiene und Umwelt aus verschiedenen Lebensmittelproben isoliert (siehe Tab. 31, Anhang 9.5). Dazu zählten Thüringer Mett, geschlagene Sahne und Desserts mit hohem Sahneanteil, rohes Seelachsfilet, eine rohe Forelle sowie eine ebenfalls nicht durchgegarnte Hähnchenpfanne. Dabei ist interessant, dass die minimalen Hemmkonzentrationen mit 2 mg/l für Imipenem und Netilmicin sowie 0,25 mg/l für Ciprofloxacin im Durchschnitt niedriger liegen als die MHKs der Spezies *P. fluorescens* aus den eigens im Jahr 2020 untersuchten Lebensmitteln. Mit dem kulturellen Nachweis- und Zählverfahren für präsumtiv (multi-)resistente Pseudomonaden wurde insgesamt dreimal die Spezies *P. fluorescens* nachgewiesen. Die für die genannten Stämme bestimmten MHKs sowie die Lebensmittel, aus denen sie stammen, sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tab. 24: Minimale Hemmkonzentrationen der *P. fluorescens*-Isolate aus den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Lebensmitteln.

<i>P. fluorescens</i> -Isolat	MHK Imipenem [mg/l]	MHK Ciprofloxacin [mg/l]	MHK Netilmicin [mg/l]
H041.A (gem. Hack aus Rind + Lamm)	8	0,25	1
P022.A (Majoran)	2	0,5	4
P029.A (Tomaten)	16	1	8

Es wird offensichtlich, dass die minimalen Hemmkonzentrationen für die im Jahr 2020 isolierten Stämme der Spezies *P. fluorescens* insgesamt höhere Werte aufweisen, als die Stämme aus dem Jahr 2017. Es könnte im Laufe der Jahre zu einer Verstärkung des Resistenzproblems gekommen sein. Jedoch sind mit sieben Isolaten aus dem Jahr 2017 und drei Isolaten aus dem Jahr 2020 der Umfang der Untersuchung zu gering um dies aussagekräftig beurteilen zu können, sodass diesbezüglich weitere Untersuchungen durchgeführt werden müssten.

Bei genauerer Betrachtung der Isolate, welche zur *P. fluorescens*-Gruppe zählen, fällt zudem Folgendes auf: Auf Basis der von EUCAST publizierten MHKs lassen sich ECOFFs für Ciprofloxacin und Netilmicin von 0,125 mg/l bzw. 0,5 mg/l vermuten. Daten für das Antibiotikum Imipenem liegen nicht vor [EUCAST, 2022]. Für die Isolate der Spezies *P. koreensis*, *P. corrugata*, *P. rhodesiae*, *P. gessardii*, *P. fluorescens*, *P. libanensis* und *P. synxantha* entsprechen bzw. übertreffen die bestimmten MHKs dementsprechend den jeweiligen ECOFF-Werten. Dies lässt die begründete Annahme zu, dass es sich hier um resistente Isolate handelt. Dies betrifft zudem auch die Isolate 17-L-06238-1-1, 17-L-06549-2-1, 17-L-08128-3-1, 17-L-08580-1-1, 17-L-08580-2-1, 17-L-08582-1-1, 17-L-08880-2-1 und 17-L-10564-1-1, welche zur Spezies *P. fluorescens* und somit der *P. fluorescens*-Gruppe zählen. In der Literatur finden sich jedoch kaum Hinweise auf eine klinische Relevanz der *P. fluorescens*-Gruppe, sodass der Fokus für das Next Generation Sequencing auf die Isolate der Spezies *P. aeruginosa* gelegt wurde [Scales et al., 2014].

6.4 Next Generation Sequencing

Von den 211 mit dem hier beschriebenen kulturellen Nachweis- und Zählverfahren isolierten präsumtiv (multi-)resistenten Pseudomonaden wurden 34 sequenziert. Diese gliedern sich in zwei Gruppen: Die Isolate P002.A, P025.A, S018.A, S018.B, D009.A, H032.A, H032.B, H034.A, H034.B und H043.D (alle *P. aeruginosa*) wurden mittels Sequenziergerät der Firma PacBio® untersucht. Für die Isolate 20-L-01579, D009.B, H032.C, H034.C, H043.E, H043.F, H057.B, H057.C, H057.D, H057.E, H057.F, P002.B, S023.A, S023.B, S023.C, S023.D, S023.E, S023.F, S023.G, S023.H, S023.I, S023.J, S023.K (alle *P. aeruginosa*) und D014.A (*P. putida*) wurde das MiSeq® der Firma Illumina® verwendet.

6.4.1 Nachweis einzelner Resistenzgene

Im Rahmen dieser Arbeit standen unter anderem die möglichen Carbapenemresistenzen der aus den Lebensmitteln isolierten Stämme im Fokus. Hierzu wurde stellvertretend Imipenem gewählt und bereits im Nährmedium des hier beschriebenen kulturellen Nachweis- und Zählverfahren für die Selektion der präsumtiv (multi-)resistenten Pseudomonaden verwendet. Daher war es zu

erwarten auch Stämme aus den zu untersuchenden Lebensmitteln zu isolieren, die Resistenzen gegenüber Imipenem bzw. die Antibiotikagruppe der Carbapeneme aufweisen. Auf Genebene konnte dies mit Hilfe des Next Generation Sequencing ebenfalls bestätigt werden, da Resistenzgene, welche für eine Unempfindlichkeit gegenüber Carbapenemen verantwortlich sind, nachgewiesen wurden. Es handelt sich hierbei um die Gene der Gruppe „*bla*“, welche β -Laktamasen codieren. Es wurden die Gene *blaOXA₅₀*, *blaOXA₄₈₆*, *blaOXA₈₄₇*, *blaOXA₉₀₄*, *blaPDC₁*, *blaPDC₃*, *blaPDC₅*, *blaPDC₈* und *blaPDC₁₂₀* in den sequenzierten Stämmen nachgewiesen. Im prozentualen Vergleich wurde *blaOXA₅₀* mit einem Anteil von 57 % am häufigsten nachgewiesen. So wiesen die Isolate in vier der sieben *P. aeruginosa*-Klongruppen dieses Gen auf. Die Gene *blaOXA₄₈₆* und *blaPDC₃* wurden in je drei der sieben Gruppen nachgewiesen. Es handelte sich dabei jedoch nicht um dieselben drei Klongruppen an Isolaten. Die Gene *blaOXA₈₄₇*, *blaPDC₁* und *blaPDC₈* waren in je zwei unterschiedlichen Klongruppen vorhanden. Auch hier ergab sich jedoch keine Übereinstimmung in den Klongruppen. In nur je einer Klongruppe wurden die Gene *blaOXA₉₀₄*, *blaPDC₅* und *blaPDC₁₂₀* nachgewiesen.

Bei *blaOXA₄₈₆* handelt es sich laut Literaturangaben um ein vielfach in *P. aeruginosa* anzutreffendes Resistenzgen [Madaha et al., 2020]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Anwesenheit dieses Gens für nahezu die Hälfte der Klongruppen bestätigt werden. Auffällig hingegen sind die *P. aeruginosa*-Isolate 20-L-01597 und H057.F und das nachgewiesene Gen *blaPDC₁₂₀*. Diese Repräsentanten zweier Klone sind die einzigen der 33 sequenzierten *P. aeruginosa*-Lebensmittelisolate, welche dieses Gen zeigen. In der Literatur finden sich hierzu jedoch keinerlei Hinweise auf die Besonderheit des Vorkommens dieses Gens in Pseudomonaden.

Die Anwesenheit von Efflux-Systemen konnte ebenfalls mittels NGS-Analysen bestätigt werden. Für die zehn *P. aeruginosa*-Lebensmittelisolate, welche mit Hilfe des Gerätes der Firma PacBio® sequenziert und mittels der Software Bakcharak (Version 2.0) ausgewertet wurden, konnte die Anwesenheit der Effluxpumpen-Gene *mexA*, *mexE* und *mexX* nachgewiesen werden. Alle der zehn sequenzierten *P. aeruginosa*-Isolate wiesen die genannten Gene auf. Folglich ergab sich ein prozentualer Anteil von 100 % für das jeweilige Gen. Die Analyse der mittels Illumina MiSeq® erhobenen Rohdaten mit dem Programm MultiQC (Version 1.9) lieferte zudem noch die Erkenntnis, dass alle 24 untersuchten Isolate mit Ausnahme von D014.A (*P. putida*) neben den Genen *mexA*, *mexE* und *mexX* auch die Gene der Efflux-Systeme MexB, MexC, MexD, MexF und MexY aufweisen. Des Weiteren konnten die Gene der Außenmembranproteine OprJ, OprM und OprN detektiert werden. Dies bedeutet, dass die Anwesenheit verschiedener Efflux-Systeme in den untersuchten Isolaten bestätigt werden konnte. Es handelt sich hierbei zusammengesetzt um MexAB-OprM

(Efflux von β -Laktamen und Fluorchinolonen), MexCD-OprJ (Efflux von β -Laktamen) MexEF-OprN (Efflux von Fluorchinolonen) und MexXY-OprM (Efflux von Aminoglykosiden) [Pang et al., 2019].

Zusammengefasst zeigten alle *P. aeruginosa*-Isolate, welche mittels Illumina MiSeq[®] untersucht wurden, die Gene *mexA*, *mexB*, *mexC*, *mexD*, *mexE*, *mexF*, *mexX* und *mexY*. Die einzige Ausnahme bildet hier das Isolat *P. putida* D014.A, welches laut Analysen nur die Gene für das Efflux-System MexEF aufweist. Die Auswertung der Untersuchungen mit Hilfe des Gerätes der Firma PacBio[®] in Kombination mit der Pipeline Bakcharak (Version 2.0) ergab jedoch, dass für *P. aeruginosa*-Isolate die Effluxpumpen-Gene *mexB*, *mexC*, *mexD*, *mexF* und *mexY* nicht nachgewiesen werden konnten. Dies überrascht in mehrerer Hinsicht:

Zum einen sind zum Beispiel die Gene *mexB*, *mexF* und *mexY* Teil der Efflux-Systeme MexAB, MexEF und MexXY und die Anwesenheit der Gene *mexA*, *mexE* und *mexX* konnte für diese Stämme mit der genannten Auswertung nachgewiesen werden. Zum anderen handelt es sich bei den aufgeführten Isolaten überwiegend um Klone (zum Beispiel P002.A und P002.B oder D009.A und D009.B) (siehe Abschnitt 5.6). Die einzige Ausnahme bildet hier das *P. aeruginosa*-Lebensmittelisolat P025.A, welches einen Sequenztyp aufweist, der keinem der weiteren, nachgewiesenen entspricht (siehe Abschnitt 5.6.1). Zusätzlich handelt es sich bei Effluxpumpen der Gattung *Pseudomonas* um intrinsische Resistenzen, sodass das Vorhandensein dieser Gene in den geprüften Isolaten bereits vermutet wurde [Poole, 2001]. Es verwundert daher, dass die Gene für die Effluxpumpen MexA, MexE und MexX mittels PacBio[®] nicht in allen sequenzierten Stämmen nachgewiesen wurden. Da sowohl die Isolation der einzelnen Stämme sowie die Gewinnung der DNA für alle Isolate analog erfolgte und sich nur die Art der Sequenzierung und Auswertung unterschied, kann die Ursache für die Diskrepanzen in dieser Tatsache vermutet werden. Im Vergleich der Auswertesysteme Bakcharak (Version 2.0) und MultiQC (Version 1.9) ist zudem auffällig, dass es mit der Sequenzierung mittels PacBio[®] und Auswertung mit Hilfe der Pipeline Bakcharak (Version 2.0) nur gelang die Membranfusionsproteine MexA, MexE und MexX zu detektieren, wohingegen es mit dem Programm MultiQC (Version 1.9) in Kombination mit der Sequenzierung am Illumina MiSeq[®] möglich war die vollständigen Efflux-Systeme inklusive Außenmembranproteinen nachzuweisen.

Neben den Genen für β -Laktamasen und Effluxpumpen wurde in einigen Stämmen außerdem das Resistenzgen *crpP* nachgewiesen, welches eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Ciprofloxacin verursacht (Verweis auf Abschnitt 7.1). Das genannte Gen wird plasmidkodiert [Chávez-Jacobo et al., 2018]. 23 der insgesamt 34 sequenzierten Isolate wiesen dieses Resistenzgen auf. Dies sind die *P. aeruginosa*-Stämme P002.A, P025.A, S018.A, S018.B, D009.A (Sequenzierung erfolgte mittels Gerät der Firma PacBio[®]) sowie 20-L-1597, H057.B, H057.C, H057.D, H057.E, H057.F, P002.B, S023.A, S023.B, S023.C, S023.D, S023.E, S023.F, S023.G, S023.H, S023.I, S023.J und S023.K.

Letztere zählen ebenfalls zur Spezies *P. aeruginosa* und wurden mit Hilfe des Illumina MiSeq® analysiert. Prozentual gesehen beträgt der Anteil an Stämmen, welche nachgewiesenermaßen das Gen *crpP* unter Berücksichtigung der sieben Klongruppen zu denen die einzelnen Isolate zählen, somit 71 %. Auch hier fallen die Unterschiede zwischen den verwendeten Sequenziermethoden PacBio® und Illumina MiSeq®, wie sie bereits für den Nachweis der „*mex*“-Resistenzgene beschrieben wurden, auf. Dies betrifft die Klone D009.A (sequenziert mittels PacBio®) und D009.B (sequenziert mittels Illumina MiSeq®). Für das Isolat D009.A konnte das Gen *crpP* nachgewiesen werden, für Isolat D009.B aus derselben Probe nicht. Jedoch sei an dieser Stelle auf die Problematik mit dem Nachweis von Plasmiden, welche weiter in Abschnitt 6.4.7 ausgeführt wird, hingewiesen. Daher können diese Unterschiede an dieser Stelle nicht zweifelsfrei auf mögliche Diskrepanzen der verschiedenen Sequenziermethoden zurückgeführt werden. Vergleicht man die Stämme, bei denen das Resistenzgen *crpP* nachgewiesen wurde zusätzlich mit den hierfür jeweils bestimmten minimalen Hemmkonzentrationen für Ciprofloxacin, so fällt auf, dass die für die *P. aeruginosa*-Isolate bestimmten MHKs zwischen 0,5 und 1 mg/l liegen. Der für die Spezies *P. aeruginosa* angegebene ECOFF liegt bei 0,5 mg/l [EUCAST, 2022]. Eine Korrelation zwischen höheren MHKs gegenüber Ciprofloxacin und dem Vorhandensein des Resistenzgens *crpP* konnte nicht beobachtet werden. Dies mag jedoch auch in der Tatsache begründet liegen, dass eine Ciprofloxacinresistenz nicht ausschließlich durch das Gen *crpP* verursacht wird, sondern zusätzlich in einer Mutation in der DNA-Gyrase (genauer in den Genen *gyrA* oder *gyrB*), einer verringerten Außenmembranpermeabilität oder einem gesteigerten Efflux begründet liegen kann [Cambau et al., 1995].

Das Gen *aph(3')-IIB*, welches für eine Aminoglykosidresistenz verantwortlich ist, wurde in 33 der 34 sequenzierten Isolate nachgewiesen. Der Nachweis erfolgte nur für den Stamm D014.A (*P. putida*) nicht. Bei *aph(3')-IIB* handelt es sich um ein in *P. aeruginosa* chromosomal kodiertes Resistenzgen, welches zur Gruppe der Aminoglykosid modifizierenden Enzyme gehört [Zeng et Jin, 2003]. Das kein Nachweis in Isolat D014.A erfolgte, welches zur Spezies *P. putida* zählt, ist daher wenig verwunderlich.

6.4.2 Phylogenetik und Klone

Ebenfalls von Interesse im Rahmen der Untersuchungen mittels Next Generation Sequencing war die Phylogenetik. Mit Hilfe der Phylogenetik lassen sich Rückschlüsse auf die Verwandtschaftsverhältnisse der einzelnen Stämme schließen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Stämme 20-L-01597, D009.B, H032.C, H034.C, H043.E, H043.F, H057.B, H057.C, H057.D, H057.E, H057.F, P002.B, S023.A, S023.B, S023.C, S023.D, S023.E, S023.F, S023.G, S023.H, S023.I, S023.J, S023.K (alle *P. aeruginosa*) und D014.A (*P. putida*) welche mit dem Illumina MiSeq® sequenziert

wurden, drei phylogenetische Stammbäume erstellt. Zwei Stammbäume auf Grundlage des cgMLST und einer auf Basis des SNP. Aufgrund der unterschiedlichen Spezies von Isolat D014.A (*P. putida*) wurde letzterer jedoch ohne ebendieses Isolat erstellt. Als Referenzgenom wurde in allen Untersuchungen *P. aeruginosa* PAO1 verwendet. Zudem wurden mit Hilfe der MLST Nukleotidprofile und Sequenztypen zum Vergleich aller 33 *P. aeruginosa*-Lebensmittelisolate bestimmt.

Bei den in dieser Arbeit vorliegenden sequenzierten Isolaten sind bei den phylogenetischen Stammbäumen Nukleotidunterschiede von 0 bis 2 (bzw. 0 bis 6 im Falle des SNP) zwischen den jeweiligen Isolaten, welche insbesondere auch aus denselben Lebensmittelproben isoliert wurden, bestimmt worden. Es lassen sich folglich eindeutige Verwandtschaften zwischen den Isolaten aus den jeweiligen Lebensmitteln erkennen. Ein Vergleich der verschiedenen Muster der MLST zeigte zudem naheliegende Übereinstimmungen bei exakt den Stämmen, die auch anhand des cgMLST und der SNP-Analyse denselben Clustern zugeordnet wurden. Darüber hinaus sind die MLST-Profile der Stämme innerhalb eines Clusters identisch. Aufgrund der Tatsache, dass ein zufälliges Auftreten eines identischen MLST-Musters bei zwei Isolaten als unwahrscheinlich eingestuft werden kann, können diese Stämme, welche ein identisches Allelprofil der getesteten sieben Haushaltsgene aufweisen, einem gleichen Klon zugeordnet werden [Spratt, 2004; Gessner, 2018]. Dies ist im Falle der hier sequenzierten Stämme für alle Cluster der Fall, sodass von Klonen ausgegangen werden kann.

Bei einzelner Betrachtung der sequenzierten Isolate sind insbesondere die Stämme H032.C und H034.C, welche ein Cluster bilden, interessant. Bei beiden handelt es sich um *P. aeruginosa*-Stämme, die jeweils von dem Agar CFC mit 4 mg Netilmicin/l entnommen wurden. Isolat H032.C stammt aus einer Probe Rinderhackfleisch, Isolat H034.C aus Beeftatar. Die Alleldifferenz beider Isolate beträgt laut phylogenetischem Stammbaum 2. Laut Literaturangaben kann bei einem Unterschied von ca. 0 bis 20 Allelen davon ausgegangen werden, dass die zwei miteinander verglichenen Isolate eine enge Verwandtschaft aufweisen [Jagadeesan et al., 2019]. Ferner kann angenommen werden, dass die entsprechenden Erreger einen jüngeren gemeinsamen Vorfahren aufweisen, der von einem gemeinsamen Ursprung stammt. [BfR, 2019]. Eine nahe Verwandtschaft bzw. Klonalität der beiden Isolate H032.C und H034.C kann also, auch aufgrund der Tatsache, dass beide Isolate den Sequenztyp 1232 aufweisen, angenommen werden. Erklärt werden kann dies mit der Tatsache, dass beide Proben aus demselben Betrieb entnommen wurden. Ob es sich hierbei um eine Kreuzkontamination während der Verarbeitung im Betrieb (z. B. über den Fleischwolf, Schneidegeräte, Mitarbeiter) handelte oder die beiden Proben aus dem gleichen Ausgangsfleisch hergestellt wurden, konnte nicht nachvollzogen werden. Basierend auf den erstellten Daten

erscheint es als sehr wahrscheinlich, dass sich der gleiche Stamm innerhalb der Produktion ausgebreitet hat. Hier zeigt sich das Next Generation Sequencing als wirksames Mittel, um Kontaminationswege über Verwandtschaftsgrade verschiedener Isolate festzustellen.

Ähnlich verhält es sich mit den Isolaten S023.A bis S023.K, die alle aus derselben aufgeschlagenen Sahneprobe, jedoch von drei unterschiedlichen Nährmedien stammen. Die Isolate S023.A bis S023.E wurden von CFC-Agar mit 4 mg Imipenem/l, die Isolate S023.F und S023.G vom Nährmedium CFC-Agar mit 0,5 mg Ciprofloxacin/l und die Isolate S023.H bis S023.K vom Nährboden CFC-Agar mit 4 mg Netilmicin/l isoliert. Die Distanzen der jeweiligen Isolate zueinander betragen im Schnitt 1 bzw. 2 (siehe Abb. 38). Auch hier lässt sich eine nahe Verwandtschaft erkennen. Da alle Isolate aus derselben Probe stammen, verwundert dieses Ergebnis nicht. Die isolierten *P. aeruginosa*-Stämme S018.A und S018.B wurden bereits Monate zuvor aus einer ebenfalls aufgeschlagenen Sahneprobe desselben Eiscafés wie die Isolate der Probe S023 gewonnen und zeigen mit ST17 auch dasselbe Allelprofil. In Abschnitt 4.6.2 wurde bereits auf das Vorhandensein hoher Keimzahlen an Pseudomonaden in Sahne aus Sahneaufschlagautomaten verwiesen [Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt, 2016]. Bedingt wird dies durch den kleinteiligen Aufbau und die somit verbundene erschwerte Reinigung und Desinfektion der Maschinen [Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt, 2016; Hamburg, 2018]. Anhand der im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse lässt sich vermuten, dass es zu einer Besiedelung des verwendeten Sahneaufschlagautomaten des Eiscafés mit dem aufgeführten *P. aeruginosa*-Stamm ST17 gekommen ist, was im Anschluss zu einer stetigen Kontamination der dort aufgeschlagenen Sahne geführt hat.

Eine Verwandtschaft konnte auch für die Isolate H043.E und H043.F nachgewiesen werden. Beide Isolate stammen aus derselben Rinderhackprobe und wurden von demselben Nährmedium (CFC-Agar mit 4 mg Netilmicin/l) isoliert. Die Alleldifferenz beträgt für diese zwei Isolate 1. Zudem zeigen sie, zusammen mit dem Isolat H043.D, dasselbe Nukleotidprofil und weisen den Sequenztypen 1129 auf. Es kann also begründet davon ausgegangen werden, dass es sich bei den jeweiligen Isolaten um Klone handelt. Das Isolat H034.B nimmt hier eine Sonderstellung ein. Es wurde am Gerät der Firma PacBio® sequenziert und zeigt mit ST1129 dasselbe Nukleotidprofil und Resistenzgene wie die Isolate H043.D bis H043.F. Jedoch wurde es aus einer Probe Beeftatar des Betriebs gewonnen, aus dem die Proben H032 und H034 entnommen wurden. Dieses stimmt allerdings nicht mit den Ergebnissen der Isolate H034.A, H034.C oder H032.A bis H032.C überein. Wie es hierzu gekommen sein könnte, konnte nicht nachvollzogen werden.

Interessant wird es auch bei den Clustern 20-L-01597 und H057.F (die Differenz der Allele beträgt 2) sowie P002.B und H057.B bis H057.D (die Alleldifferenz wurde mit einem Wert von 0 bestimmt).

Isolat 20-L-01597 wurde im Rahmen einer Routineuntersuchung im Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg) aus aufgeschäumter Milch isoliert. Das Isolat H057.F stammt aus einer explizit für das eigene Verfahren verwendeten Probe Schweinehackfleisch. Es handelt sich bei beiden Isolaten um *P. aeruginosa* mit dem ST2545, jedoch wurden keine Ähnlichkeiten zwischen den Probeentnahmeorten festgestellt. Zudem ist auffällig, dass die ebenfalls aus der genannten Schweinehackfleischprobe entnommenen Isolate H057.B bis H057.D ein eigenes Cluster bilden. Jedoch beinhaltet dieses Cluster zusätzlich noch Isolat P002.B. Letzteres wurde aus einer Tomate gewonnen. Die angegebenen Unterschiede in den Allelen von 2 bzw. 0 lassen auf eine nahe Verwandtschaft der Isolate innerhalb der aufgeführten Cluster schließen. Bestätigt wird dies durch die Ergebnisse der MLST, welche die Isolate P002.A und H057.E miteinschließt. Es konnte für die *P. aeruginosa*-Lebensmittelisolate P002.A, P002.B, H057.B, H057.C, H057.D und H057.E dasselbe Allelprofil mit dem Sequenztyp 244 bestimmt werden. Wie es jedoch zu einem gemeinsamen Vorfahren der entsprechenden Isolate gekommen sein könnte, konnte in diesen Untersuchungen nicht rekonstruiert werden.

Für die Isolate D009.A und D009.B (*P. aeruginosa* aus Putenfleisch) wurden dieselben Nukleotidprofile und Resistenzgene nachgewiesen. Des Weiteren stammen die Isolate aus derselben Probe, sodass von Klonen ausgegangen werden kann.

Das Isolat D014.A (*P. putida* aus mariniertem Hähnchenfleisch) zählt laut dem erstellten phylogenetischen Stammbaum zu keinem der aufgeführten Cluster und steht für sich. Es konnten hier keine nahen Verwandtschaften zu weiteren Isolaten nachgewiesen werden. Dies überrascht jedoch wenig, da es sich bei diesem Isolat im Gegensatz zu den übrigen sequenzierten *P. aeruginosa*-Lebensmittelisolaten um einen Stamm der Spezies *P. putida* handelt.

Beim cgMLST werden, im Gegensatz zu den SNPs nur Allelunterschiede ohne Unterscheidung der Anzahl und Art der Mutation zwischen den zu vergleichenden Isolaten berücksichtigt. Dies kann dazu führen, dass die SNP-Untersuchung ein höheres Auflösungsvermögen liefern kann [BfR, 2020]. Im Vergleich zu dem phylogenetischen Stammbaum, der auf Grundlage des cgMLST erstellt wurde, zeigt der Stammbaum auf Basis der SNPs keine nennenswerten Unterschiede. Auch hier sind die bereits genannten Cluster sichtbar. Beide Methoden der Erstellung der phylogenetischen Stammbäume haben sich im Rahmen dieser Arbeit daher als gleichwertig erwiesen.

Eine Übereinstimmung mit den in der Literatur als „Hochrisiko-Klonen“ beschriebenen ST235, ST111 und ST175 [Oliver et al., 2015] konnte für die untersuchten Lebensmittelisolate nicht nachgewiesen werden. Jedoch wurde der Klon ST244 (einer von zehn Klonen, die weltweit als Klone mit hohem Risikopotenzial angesehen werden [del Barrio-Tofiño et al., 2020]) fünfmal im Rahmen

dieser Arbeit nachgewiesen. Das Risikopotenzial wird dabei anhand von sechs Kriterien beurteilt. Dazu zählt die weltweite Verbreitung, das Vorhandensein mehrerer antimikrobieller Merkmale, die Fähigkeit den Wirt zu kolonisieren, die Übertragbarkeit und ob eine gesteigerte Pathogenität sowie die Fähigkeit eine erneute Infektion auszulösen, vorliegen [de Lagarde et al., **2021**]. ST244 wurde für die Isolate H057.B, H057.C, H057.D und H057.E sowie P002.A und P002.B bestimmt. Die Isolate stammten aus einer Schweinehackfleisch- (H057.B, H057.C, H057.D und H057.E) bzw. einer Tomatenprobe (P002.A, P002.B). Insbesondere vor dem Hintergrund, dass Tomaten auch roh verzehrt werden können, ist dieser Fund als kritisch zu betrachten [Chelaghma et al., **2021**]. Klon ST17, wie es die Isolate S018.A, S018.B sowie S023.A bis S023.K aufweisen, wird in der Literatur mit gegensätzlichen Informationen beschrieben: Zum einen wird ST17 als nicht näher kritisch angesehen, zum anderen gibt es aber auch eine Publikation, in der von einem nosokomialen Ausbruch aufgrund der Kontamination von medizinischen Geräten mit ST17 Klonen die Rede ist [Lee et al., **2020**; Fernández-Cuenca et al., **2020**]. Bezogen auf die Ergebnisse der eigenen Arbeit zeigen die ST17-Isolate MHKs von 8 mg/l (Imipenem), 0,5 mg/l (Ciprofloxacin) sowie 4 bis 16 mg/l (Netilmicin) und liegen damit zwar über den jeweiligen ECOFFs allerdings konnten keine weiteren Auffälligkeiten der Stämme hinsichtlich ihres Resistenzverhaltens beobachtet werden [EUCAST, **2022**]. Für die ebenfalls mittels eigener Untersuchung nachgewiesenen Klone ST2545 (Isolate 20-L-01597 und H057.F), ST2505 (Isolat D009.A und D009.B), ST1232 (Isolate H032.A, H032.B, H032.C, H034.A und H034.C) sowie ST1129 (H034.B, H043.D, H043.E und H043.F) konnten in der Literatur zudem keine Publikationen zu besonderen Auffälligkeiten gefunden werden.

6.4.3 Herkunftsfrage

Von Interesse bei dem Vorkommen (multi-)resistenter Bakterien in Lebensmitteln war im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch die Frage woher die nachgewiesenen Pseudomonaden ursprünglich stammen. Im Fall der Pseudomonaden wird dies durch ihr ubiquitäres Vorkommen erschwert [Peix et al., **2018**]. So ist denkbar, dass die Bakterien der Gattung *Pseudomonas* entweder über den Boden, Tierkot (insbesondere Freilandpflanzen) und/oder das (Gieß-)Wasser (z. B. bei den pflanzlichen Lebensmitteln), die Tiere (z. B. bei den Fisch- und (Hack-)Fleischproben), Verarbeitungsgegenstände (u. a. bei der Sahne, den Fleisch- oder den Fischproben) oder den Menschen (z. B. bei der Ernte diverser pflanzlicher Lebensmittel, der Verarbeitung im Betrieb- beispielsweise bei Hackfleisch- oder der Reinigung der Verarbeitungsgegenstände z. B. der Sahneaufschlagmaschine, Fleischwolf und Messer für Fleisch und Fisch) auf die untersuchten Lebensmittel gelangt sein könnten [Spiers et al., **2000**; Sørensen et Nybroe, **2004**; Mena et Gerba, **2009**; Raposo et al., **2017**]. Auch eine Kreuzkontamination in Betrieben durch andere Lebensmittel oder für die Verarbeitung mehrerer Nahrungsmittel genutzte Gegenstände

wie Schneidebretter, Messer, Arbeitsflächen usw. erscheint als plausible Möglichkeit [Raposo et al., 2017].

Um ebendiese Herkunftsfrage der aus den untersuchten Lebensmitteln isolierten Stämme zu klären, sollte das Next Generation Sequencing helfen und Auskünfte liefern. Die Suche nach spezifischen Markergenen, die auf eine eindeutige Herkunft deuten könnten, verlief jedoch erfolglos. Nach eigenem Kenntnisstand gibt es zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit keine Publikationen zu Unterschieden in den Genen von Pseudomonaden zum Beispiel zwischen Bakterien mit ursprünglich tierischer Herkunft oder denen aus dem Bereich der Umwelt.

Im Feld der Humanmedizin, in der insbesondere *P. aeruginosa* eine Rolle spielt, gibt es jedoch Publikationen, die nach einem Ausbruch mit Pseudomonaden auf einer Station eines Krankenhauses, diesen auf die dort genutzte Patientenverpflegung zurückführen konnten. Dies konnte mit Hilfe von Abklatschproben an Verarbeitungsgegenständen (wie Messern oder Schneidebrettern) in der Krankenhausküche und den Händen der dort tätigen Mitarbeiter sowie der Untersuchung der dort zu verarbeitenden Lebensmittel aufgedeckt werden. Jedoch wurde hierbei nicht die Frage geklärt, wie die Pseudomonaden in die Lebensmittel gelangten [Kominos et al., 1972]. Auf die eigene Arbeit bezogen lässt sich dieses Vorgehen nicht anwenden, da die untersuchten Lebensmittelproben aus diversen Supermärkten oder Speisegaststätten stammten und dort bereits in unterschiedlichen Verarbeitungsstufen vorlagen und entnommen wurden. Im Falle der abgepackten Lachsproben werden zwar die Verarbeitungsbetriebe angegeben, jedoch liegen diese im europäischen Ausland. Auch die dort herrschenden Produktionsbedingungen sind nicht bekannt. Bei der für diese Arbeit verwendeten losen Ware wurde außerdem teilweise nur das Herkunftsland angegeben, sodass ein Rückschluss auf den Betrieb erschwert bzw. teilweise unmöglich ist.

Theoretisch könnte jedoch im Fall der bereits verzehrfertigen aufgeschlagenen Sahneproben aus den Hamburger Eiscafés oder direkt im Betrieb hergestellten Hackfleischproben Abklatschproben der Hände der Mitarbeiter entnommen werden und die Rohware sowie wichtige Verarbeitungsgegenstände beprobt werden. Bei einer Übereinstimmung der Spezies und genetischen Resistenzgene, sowie einer übereinstimmenden Phylogenetik könnte dies erste Hinweise liefern. Dennoch ist anzumerken, dass für diesen Fall nicht sicher ermittelt werden kann, ob das Lebensmittel zuerst die Pseudomonaden enthielt und diese dann auf den Mitarbeiter/Verarbeitungsgegenstände gelangt sind oder andersherum. Auch die ursprüngliche Herkunft (Mensch, Tier, Umwelt) könnte nicht bestimmt werden. Zudem ist zu bedenken, dass eine Kontamination möglicher Verarbeitungsgegenstände mit den gesuchten Bakterien aufgrund der Fähigkeit der Pseudomonaden Biofilme zu bilden auch in der Vergangenheit erfolgt sein könnte

[Mah et al., 2003]. Des Weiteren erscheint dieses Vorgehen als sehr zeit- und kostenintensiv und wenig aussagekräftig. Darüber hinaus, müssten auch die Mitarbeiter einer Probeentnahme von ihren Händen zustimmen. Ob dieser Aufwand bei jeder Probenahme durch die entsprechenden Probenehmer geleistet werden kann, ist fraglich.

Als denkbare Möglichkeit sich der Herkunft der einzelnen Isolate anzunähern, könnte jedoch die Erweiterung der Anzahl untersuchter Stämme dienen. Möglicherweise werden so phylogenetische Ähnlichkeiten zwischen zwei Stämmen unterschiedlicher Herkunft erkannt. Auch die Zusammenhänge möglicher Ausbruchsgeschehen könnten so detektiert werden. Durch eine Erweiterung der untersuchten und abgeglichenen Stämme könnte man sich so der Antwort auf die Herkunftsfrage zumindest annähern. Eine Variante wäre zudem der Vergleich von Daten mittels Datenbanken. Dies wird im folgenden Abschnitt beschrieben.

6.4.4 Vergleich der Ergebnisse des MLST mit der Datenbank PubMLST

Ein weiterer Ansatz sich den phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnissen sowie der Herkunftsfrage anzunähern, war es die Daten der MLST der eigenen Isolate mit bereits bekannten Daten aus der Datenbank PubMLST zu vergleichen [PubMLST, 2022]. Hierbei zeigten sich Übereinstimmungen der Sequenztypen (ST) mit den dort eingereichten Stämmen. Dies ist der Übersicht halber in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tab. 25: Vergleich der ST der eigenen analysierten Isolate mit den bekannten Daten in PubMLST, nach PubMLST, 2022.

Eigene Isolate	ST	Vergleich mit der Datenbank PubMLST
P025.A	3090	Ein übereinstimmendes Isolat, Isolation im Jahr 2017
		Herkunftsland: USA
		Quelle: Blut
D009.A, D009.B	2505	Ein übereinstimmendes Isolat; Isolation im Jahr 2013
		Herkunftsland: Frankreich
		Quelle: unbekannt
H032.A, H032.B, H032.C, H034.A, H034.C	1232	Übereinstimmung mit ATCC 33988
		Herkunftsland: USA
		Quelle: Öltank

Eigene Isolate	ST	Vergleich mit der Datenbank PubMLST
H034.B, H043.D, H043.E, H043.F	1129	Vier übereinstimmende Isolate
		Herkunftsländer: Kanada und unbekannt
		Quellen: Keine Angaben
H057.B, H057.C, H057.D, H057.E, P002.A, P002.B	244	106 übereinstimmende Isolate
		Herkunftsländer: Großbritannien, Polen, Australien, China, Russland, Spanien, Frankreich, Elfenbeinküste, Südafrika, Brasilien, Nigeria und unbekannt
		Quellen: Speichel, Blut, Elutionsmittel, Boden, Harnwegsinfektionen, Lungenflüssigkeit, Gewebeeinfektionen sowie keine Angabe
20-L-01597, H057.F	2545	Zwei übereinstimmende Isolate; Isolation im Jahr 2016
		Herkunftsland: Spanien
		Quelle: Wasser
S018.A, S018.B und S023.A bis S023.K	17	89 übereinstimmende Isolate; Isolation in den Jahren 1986 bis 2014
		Herkunftsländer: Großbritannien, Kanada, Australien, Spanien, Frankreich, Polen sowie unbekannt;
		Quellen: Blut, Lungenflüssigkeit, Harnwegsinfektion, Speichel sowie keine Angaben

Wie in der Tab. 25 zu sehen ist, gibt es für jeden im Rahmen dieser Arbeit sequenzierten Stamm mindestens eine Übereinstimmung bereits bekannter Daten in der Datenbank PubMLST. Auffällig ist, dass die dort angegebenen Herkunftsländer und Quellen, aus denen die *P. aeruginosa*-Stämme jeweils isoliert wurden (sofern bekannt), breit gefächert sind. Eine eindeutige ursprüngliche

Herkunft der Isolate lässt sich nicht ableiten. Dazu sind die in der Datenbank eingepflegten Informationen zu divers und stellenweise unvollständig. Jedoch bestätigen die Funde einmal mehr, dass ubiquitäre Vorkommen und die enorme Anpassungsfähigkeit der Pseudomonaden an ihre Umwelt und die jeweiligen Bedingungen [Klockgether et Tümmler, **2017**].

Des Weiteren ist auffällig, dass die hier bestimmten Sequenztypen teilweise mit Stämmen übereinstimmen, die offenbar aus klinischen Bereichen isoliert wurden. Dies wird anhand der angegebenen Quellen „Blut“, „Lungenflüssigkeit“, „Harnwegsinfektionen“, „Speichel“ und „Gewebeinfektionen“ deutlich. Dass die eigenen Stämme ursprünglich aus verschiedenen handelsüblichen Lebensmitteln gewonnen wurden und zum Teil hohe minimale Hemmkonzentrationen gegenüber drei verschiedenen Antibiotikagruppen aufweisen, zeigt die starke Verbreitung von antibiotikaresistenten Bakterien in verschiedensten Bereichen, darunter auch Lebensmittel. Dies betrifft insbesondere die im Rahmen dieser Arbeit isolierten Stämme H057.B, H057.C, H057.D, H057.E, P002.A und P002.B, welche dem ST244 zugeordnet werden konnten und zu Klonen mit hohem Risikopotenzial zählen [del Barrio-Tofiño et al., **2020**]. Ebenfalls bedenklich ist der Nachweis der ST17-Klone S018.A, S018.B und S023.A bis S023.K in zwei aufgeschlagenen Sahneprouben. Hierüber wird in der Literatur von einem nosokomialen Ausbruch aufgrund eines ST17 Klons berichtet [Fernández-Cuenca et al., **2020**]. Und auch die Angaben in der Datenbank PubMLST bezüglich der Quellen der dort eingepflegten Stämme (Blut, Harnwegsinfektionen, Speichel, Lungenflüssigkeit) sprechen dafür, dass es eine weite Verbreitung dieses Klons auch im klinischen Bereich mit entsprechender Relevanz geben könnte.

6.4.5 Antiseptikaresistenzen

Des Weiteren war es im Rahmen dieser Arbeit von Interesse mit Hilfe des NGS Informationen zu der Resistenz der Pseudomonaden (genauer: *P. aeruginosa*) gegenüber antiseptischen Stoffen zu bestimmen. In der Literatur wird immer wieder über die Unempfindlichkeit der Pseudomonaden gegenüber Desinfektionsmitteln berichtet [Langsrud et al., **2003**]. Dieser Resistenz liegt unter anderem das Vorhandensein der *qac*-Gene zugrunde [Mc Carlie et al., **2020**]. Diese Gene lösen eine Resistenz gegenüber quartären Ammoniumverbindungen, wie sie häufig in Desinfektions- und Reinigungsmitteln enthalten sind, aus, was folglich zu einer Resistenz gegenüber den verwendeten Mitteln führt [Mahzounieh et al., **2014**]. Ferner wird in der Literatur von einem Zusammenhang zwischen den *qac*-Genen und dem Außenmembranprotein OprR berichtet. So sollen *P. aeruginosa*-Isolate, welche das Protein OprR aufweisen auch resistent gegenüber quartären Ammoniumverbindungen sein [Tabata et al., **2003**]. Ein Nachweis von OprR bzw. den *qac*-Genen mittels NGS gelang im Rahmen dieser Arbeit für die getesteten Stämme jedoch nicht. Wenn die *qac*-Gene, wie in mancher Literatur beschrieben, jedoch auf Plasmiden kodiert sind und der

Nachweis vollständiger Plasmide für die hier sequenzierten Stämme nicht gelang, kann folglich nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass keine *qac*-Gene vorhanden sind [Jaglic et Cervinkova, **2012**]. Ein weiterer Ansatz, der jedoch in der Literatur bezüglich des Vorhandenseins von Resistenzen gegenüber Desinfektions- und Reinigungsmittel beschrieben wird, ist der Beitrag der Efflux-Systeme. So führt das Gen *armR* zu einer Überregulierung des Efflux-Systems MexAB-OprM [*Pseudomonas* Genome DB, **2022**]. Dies geschieht zunächst dadurch, dass ArmR den Repressor des genannten Efflux-Systems MexR blockiert [Wilke et al., **2008**]. Jegliche Mutation in MexR führt dann zu einer Überexpression des Efflux-Systems MexAB-OprM, was wiederum eine Resistenz gegenüber diversen Desinfektionsmitteln bewirken bzw. verstärken kann [Adewoye et al., **2002**; Choudhury et al., **2016**]. Das Gen *armR* konnte für alle 33 sequenzierten Stämme der Spezies *P. aeruginosa* nachgewiesen werden. Ebenso wurden das Membranfusionsprotein MexA, die RND-Komponente MexB sowie das Außenmembranprotein OprM in den sequenzierten Isolaten detektiert. Es erfolgte jedoch kein Nachweis des Repressorgens *mexR*. Dies liefert einen Hinweis auf die mögliche Resistenz gegenüber Desinfektions- und Reinigungsmitteln der getesteten Pseudomonaden.

Um genau zu prüfen, in wie weit die sequenzierten Stämme auch resistent gegenüber dem Einsatz der entsprechenden Mittel sind, müssten weitere Tests durchgeführt werden. Hierzu zählt die entsprechende Anwendung diverser lebensmittelrelevanter Desinfektions- und Reinigungsmittel, im besten Fall sogar die Mittel, welche auch in den jeweiligen Betrieben verwendet werden, aus denen die untersuchten Lebensmittel stammen. Zudem könnte der Einsatz der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) für einen expliziten Nachweis einzelner *qac*-Gene erfolgen. Da aber Resistenzen bei den Bakterien der Gattung *Pseudomonas* insbesondere auch aufgrund der Fähigkeit Biofilme zu bilden, entstehen bzw. verstärkt werden können, sollten im Zweifel mehrere Ansätze geprüft werden.

6.4.6 Zusammenhänge zwischen den *mex*-Genen und dem Außenmembranprotein OprD

Mutationen in dem Außenmembranprotein OprD führen häufig zu einem Verlust dieses Proteins, wodurch die Aufnahme von Carbapenemen eingeschränkt wird. Schlussendlich kommt es so zu einer Resistenz gegenüber dieser Gruppe von Antibiotika [Kos et al., **2015**]. Folglich kann OprD von großer Bedeutung für die Resistenz von *P. aeruginosa* gegenüber Carbapenemen sein. In der Literatur wird häufig von einer Korrelation des OprD-Verlusts und einer Meropenemresistenz berichtet [Bonomo et Szabo, **2006**].

Das Next Generation Sequencing sollte hier als geeignetes Werkzeug für die Detektion möglicher Zusammenhänge zwischen den Mex-Efflux-Genen und dem Außenmembranprotein OprD dienen. Für die sequenzierten 33 *P. aeruginosa*-Isolate konnte bei allen 33 Stämmen das Gen *mexX* nachgewiesen werden. Das Gen *mexY* sowie das Außenmembranprotein OprN wurden mit Hilfe der Software ABRicate (Version 1.0.1) jedoch nur in 23 Isolaten nachgewiesen. Der einzige Unterschied zwischen den 23 Stämmen mit nachgewiesenem Gen *mexY* und den zehn Stämmen ohne Nachweis dieses Gens liegt darin, dass letztere mittels PacBio® sequenziert wurden (siehe Abschnitt 5.5.1).

Diese Angaben lassen jedoch zusammengefasst auf das Vorhandensein des Efflux-Systems MexXY-OprN der entsprechenden Isolate schließen. Das genannte Efflux-System ist mit dem OprD koreguliert und führt zu einer Resistenz gegenüber Imipenem [Bonomo et Szabo, 2006]. Für die 23 *P. aeruginosa*-Isolate, welche mutmaßlich das Efflux-System MexXY-OprN aufweisen, liegen die minimalen Hemmkonzentrationen für Imipenem in einer großen Spanne zwischen 8 und >256 mg/l. Es erscheint daher möglich, dass dieses Efflux-System einen Anteil in der Resistenz gegenüber Imipenem hat. Zudem wurden laut der Auswertesoftware ABRicate (Version 1.0.1) die Außenmembranproteine OprM, OprN und OprJ detektiert, was dafürspricht, dass der Nachweis dieser Proteine unter den gegebenen Bedingungen technisch möglich ist. Die Tatsache, dass OprD nicht nachgewiesen wurde, trägt daher zu der Vermutung bei, dass es in den genannten Isolaten zu einem Verlust von OprD gekommen ist, was zu einer Resistenz der Isolate gegenüber Imipenem beiträgt.

6.4.7 Vorkommen von Plasmiden

Da Pseudomonaden sich auch durch das Vorkommen von Plasmiden auszeichnen, war es ebenfalls Bestandteil dieser Arbeit nähere Erkenntnisse zum Vorkommen dieser bzw. dem Vorhandensein einzelner Resistenzgene auf den Plasmiden der entsprechenden Isolate zu gewinnen. In der Literatur konnte bereits beobachtet werden, dass sich viele Resistenzgene der Pseudomonaden auf den Plasmiden befinden [Jacoby, 1986]. Dies ist besonders vor dem Hintergrund der vereinfachten Weitergabe von Resistenzgenen zwischen unterschiedlichen *Pseudomonas*-Stämmen sowie Bakterien anderer Gattungen als kritisch zu betrachten [Watanabe et al., 1991; Barlow, 2009]. Für die Suche nach Plasmiden wurden zum einen die Pipeline Bakcharak (Version 2.0) als auch die Funktion des „ABRicate Plasmid Finders“ (Version 1.0.1), welche in der Software MultiQC (Version 1.9) integriert ist, genutzt [Ewels et al., 2016; BfR, 2021]. Diese Analysen ergaben, dass mittels der angewandten Methode der DNA-Isolation zumindest Bruchstücke von Plasmiden isoliert und analysiert wurden. Jedoch waren die Sequenzen plasmidalen Ursprungs in ihrer Gesamtheit nicht vollständig genug, um das Vorhandensein eines oder mehrerer Plasmide final bestätigen zu können. Interessanterweise konnte jedoch für 23 der insgesamt 34 sequenzierten Stämme das Gen

crpP, welches für eine Resistenz gegenüber Ciprofloxacin verantwortlich ist, nachgewiesen werden (Verweis auf Abschnitt 7.1, siehe auch Abschnitte 5.5.1 und 5.5.2). Das Gen *crpP* ist plasmidkodiert, sodass zumindest für die 23 *P. aeruginosa*-Isolate begründet angenommen werden kann, dass diese Plasmide in ihrem Genom enthalten (Verweis auf Abschnitt 7.1) [Chávez-Jacobo et al., 2018]. Ob die weiteren elf sequenzierten *Pseudomonas*-Isolate ebenfalls Plasmide aufweisen, kann nur vermutet werden, erscheint jedoch als sehr wahrscheinlich, da das Vorkommen von Plasmiden in Bakterien der Gattung *Pseudomonas* in der Literatur als ubiquitär beschrieben wird [Boronin, 1992]. Daher kann der exakte Einfluss möglicher Plasmide auf die Resistenz der untersuchten Stämme gegenüber diverser antimikrobiell wirksamer Stoffe, auf Grundlage der hier erhobenen Daten, nur Bestandteil von Spekulationen sein.

7. Ausblick

Vor dem Hintergrund, dass weltweit ca. 4,95 Millionen Todesfälle allein für das Jahr 2019 auf antibiotikaresistente Mikroorganismen zurückgeführt werden und die Vorhersage für die Zukunft lautet, dass sich diese Zahl der Todesfälle bis zum Jahr 2050 auf 10 Millionen jährlich erhöhen könnte, wird die Notwendigkeit deutlich, mehr Informationen über das Vorkommen bereits resistenter Bakterien (auch in Lebensmitteln) zu gewinnen [Murray et al., **2022**]. Das Vorkommen von Pseudomonaden (bzw. insbesondere *P. aeruginosa*) wurde bereits in mehreren Studien als kritisch beurteilt [Rossolini et al., **2014**]. Auch das BfR sowie das Bundesministerium für Gesundheit im Rahmen der deutschen Antibiotika Resistenzstrategie (DART) betonen zunehmend die Gefahren, die durch den Verzehr mit antibiotikaresistenten Bakterien kontaminierten Lebensmitteln ausgehen [BfR, **2012**; BfR, **2019a**; DART, **2020**].

Die vorliegende Arbeit konnte weitere Einblicke über das Vorkommen (multi-)resistenter Pseudomonaden in handelsüblichen Lebensmitteln gewinnen. Für zukünftige Forschungen könnte das Verfahren für andere Antibiotika(-gruppen) übernommen werden. Mit Imipenem, Ciprofloxacin und Netilmicin wurden zunächst Antibiotika gewählt, die vielfach Anwendung in der Therapie diverser Krankheitsbilder finden [Clissold et al., **1987**; Campoli-Richards et al., **1989**; Thai et al., **2021**]. Seit einiger Zeit steht insbesondere auch das Reserveantibiotikum Colistin im Fokus verschiedener Untersuchungen zu Antibiotikaresistenzen [Lee et al., **2016**]. In der hier vorliegenden Arbeit zeigten bereits zwei *Pseudomonas*-Stämme eine minimale Hemmkonzentration >512 mg/l für Colistin. Dies könnte sowohl für die im Rahmen dieser Arbeit als auch bereits andere bestehende Pseudomonaden aus Lebensmitteln überprüft werden, um einen Überblick über die Verbreitung colistinresistenter Pseudomonaden in Lebensmitteln zu gewinnen.

Zudem ist die Frage nach der Herkunft der Pseudomonaden in den einzelnen Lebensmitteln aufgrund ihres ubiquitären Vorkommens schwierig nachzuvollziehen. In Einzelfällen, wie dem Hamburger Eiscafé, in welchem *P. aeruginosa* in den aufgeschlagenen Sahneproben nachgewiesen wurden, konnten auf Grundlage einer Betriebsbegehung begründete Hypothesen über die Herkunft aufgestellt werden. Dies kann jedoch nicht auf die Gesamtheit aller Isolate angewendet werden. Die Suche nach spezifischen Markergenen im Rahmen des Next Generation Sequencing für Pseudomonaden zeigte sich ohne Ergebnisse. Hier ist ebenfalls noch Forschungspotenzial zu sehen. Auch gelang es im Rahmen dieser Arbeit nicht, nähere Informationen zu Resistenzgenen auf mobilen Elementen, wie Plasmiden, zu gewinnen. Mit Hilfe des Verfahrens zur Isolation der DNA konnten mutmaßlich Bruchstücke von Plasmiden isoliert werden. Dies wurde in der verwendeten Software durch die Angabe „plasmid contigs“ deutlich. Das bedeutet, dass vereinzelt Sequenzen plasmidalen Ursprungs durch die Auswertesoftware identifiziert wurden, diese aber in der

Gesamtheit nicht vollständig waren, um ein Plasmid final bestätigen zu können. Gestützt wurde diese These dadurch, dass zusätzlich das plasmidkodierte Resistenzgen *crpP* in einigen Isolaten nachgewiesen werden konnte (Verweis auf Abschnitt 7.1). Als zukünftigen Ansatz könnte man durch weitere Sequenzierungen versuchen die Contigs zu vervollständigen oder eine andere Art der DNA-Isolation wählen, um so eine gesicherte Aussage über das mutmaßliche Vorhandensein eines Plasmids beschreiben zu können. Auch sollten weitere plasmidkodierte Resistenzgene unterschiedlicher *Pseudomonas*-Speziesgruppen (z. B. *P. aeruginosa* oder der *P. fluorescens*-Gruppe) sequenziert werden, um weitere Informationen zu Übertragungswegen von Resistenzen zu bestimmen.

7.1 Anmerkung der Autorin

Nach Abschluss des Verfassens der hier vorliegenden schriftlichen Dissertation, hat sich ein neuer Erkenntnisstand bezüglich der Funktionsweise des Gens *crpP* in Zusammenhang mit einer Ciprofloxacinresistenz ergeben. So konnten u. a. Zubyk et Wright, **2021** nachweisen, dass CrpP nicht, wie in dieser Dissertation geschrieben und aus der entsprechenden Literatur [Chávez-Jacobo et al., **2018**] zitiert, für eine Resistenz gegenüber Ciprofloxacin verantwortlich ist.

In der genannten Publikation konnte anhand des Beispielbakteriums *E. coli* und Anwendung hochauflösender Massenspektrometrie sowie der Bestimmung minimaler Hemmkonzentrationen mittels Etests gezeigt werden, dass es sich bei CrpP alleine nicht um eine Ciprofloxacinase handelt und CrpP zudem nicht zu einer Resistenz gegenüber Ciprofloxacin führt. Es konnte in keiner der Versuche eine Steigerung der MHKs gegenüber Fluorchinolonen (insbesondere Ciprofloxacin) in Zusammenhang mit CrpP beobachtet werden. Die beiden Autoren können zwar nicht ausschließen, dass CrpP in Kombination mit anderen Genprodukten zu einer geringen Fluorchinolonresistenz führen könnte, konnten jedoch zusammengefasst zeigen, dass es nicht zu einer klinisch relevanten Fluorchinolonresistenz kommt [Zubyk et Wright, **2021**].

8. Literatur

Adewoye, L., Sutherland, A., Srikumar, R., Poole, K. The MexR repressor of the mexAB-oprM multidrug efflux operon in *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of mutations compromising activity, *J. Bacteriol.*, 15, 4308-4312, 2002.

Adlard, P. A., Kirov, S. M., Sanderson, K., Cox, G. E., *Pseudomonas aeruginosa* as a cause of infectious diarrhoea, *Epidemiol. Infect.*, 1, 237-241, 1998.

Al-Grawi, I. G. A., Khdir Al-Absali, A., Kareem, N. H., Belal, S. A. L., Occurrence of MexAB-OprM efflux pump operon on septicemic *Pseudomonas aeruginosa* chromosome, *Iraqi Postgraduate Med J*, 1, 97-102, 2012.

Almuzara, M. N., Vazquez, M., Tanaka, N., Turco, M., Ramirez, M. S., Lopez, E. L., Vay, C. A., First case of human infection due to *Pseudomonas fulva*, an environmental bacterium isolated from cerebrospinal fluid, *J. Clin. Microbiol.*, 2, 660-664, 2010.

Altinok, I., Kayis, S., Capkin, E., *Pseudomonas putida* infection in rainbow trout, *Aquac.*, 3, 850-855, 2006.

Andreani, N. A., Martino, M. E., Fasolato, L., Carraro, L., Montemurro, F., Mioni, R., Cardazzo, B., Tracking the blue: a MLST approach to characterise the *Pseudomonas fluorescens* group, *Food Microbiol.*, 39, 116-126, 2014.

Andreani, N. A., Fasolato, L., *The Microbiological Quality of Food, Chapter 2 - Pseudomonas and Related Genera*, Woodhead Publishing, Elsevier, Amsterdam, Boston, Heidelberg, 2017.

Antão, E. M., Wagner-Ahlf, C., Antibiotikaresistenz Eine gesellschaftliche Herausforderung, *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz*, 61, 499-506, 2018.

Ardui, S., Ameer, A., Vermeesch, J. R., Hestand, M. S., Single molecule real-time (SMRT) sequencing comes of age: applications and utilities for medical diagnostics, *Nucleic Acids Res.*, 5, 2159-2168, 2018.

Asche, F., Bjørndal, T., *The economics of salmon aquaculture*, Vol. 10, 2nd Edition, John Wiley & Sons, 2011.

Bala, K., Marshall, R. T., Stringer, W. C., Naumann, H. D., Changes of color of aqueous beef extract caused by *Pseudomonas fragi*, *J. Food Prot.*, 12, 824-827, 1977.

Barlow, M., What antimicrobial resistance has taught us about horizontal gene transfer, HGT, 397-411, 2009.

Bébéar, C., Robertson, J. A., Determination of minimal inhibitory concentration, *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology Vol. 2*, Academic Press, San Diego, 189-199, 1996.

Begum, M., Bacteriological analysis of different foods to determine the fitness for human consumption, *JPMA*, 35, 79, 1985.

Behjati, S., Tarpey, P. S., What is next generation sequencing?, *Arch. Dis. Child. Educ. Pract.*, 6, 236-238, 2013.

Belitz, H.-D., Grosch, W., Schieberle, P., Lehrbuch der Lebensmittelchemie, 6. Auflage, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 2008.

BfR, 2011- Bundesinstitut für Risikobewertung, Pseudomonaden führten zum Verderb von Mozzarella-Käse, aktualisierte Stellungnahme Nr. 010/2011 vom 14.03.2011, URL: www.bfr.bund.de/cm/343/pseudomonaden_fuehrten_zum_verderb_von_mozzarella_kaese, letzter Zugriff am 15.11.2021.

BfR, 2012- Bundesinstitut für Risikobewertung, ESBL-bildende Bakterien in Lebensmitteln und deren Übertragbarkeit auf den Menschen, Stellungnahme Nr. 002/2012 vom 5. Dezember 2011, URL: www.bfr.bund.de/cm/343/esbl-bildende-bakterien-in-lebensmitteln-und-deren-uebertragbarkeit-auf-den-menschen.pdf; letzter Zugriff am 29.03.2022.

BfR, 2015- Bundesinstitut für Risikobewertung, Antibiotikaresistenz in Nutztierbeständen und Lebensmitteln- Ihre Bedeutung für die Humanmedizin und Handlungsoptionen für das Risikomanagement, BfR-Mitteilung Nr. 003/2005 vom 22. Januar 2015, URL: https://www.lallf.de/fileadmin/media/PDF/lebensm/LHD/150210BfR_risikomanagem.pdf, letzter Zugriff am 24.02.2022.

BfR, 2019- Bundesinstitut für Risikobewertung, Resistente Keime: Rohkost und Salat gut waschen und frisch selbst zu bereiten; Stellungnahme Nr. 013/2019 vom 12. April 2019; URL: www.bfr.bund.de/cm/343/resistente-keime-rohkost-und-salat-gut-waschen-und-frisch-selbst-zubereiten; letzter Zugriff am 29.03.2022.

BfR, 2019a- Bundesinstitut für Risikobewertung, erbmaterial von Erregern vergleichen, um Krankheitsausbrüche aufzuklären, Stellungnahme Nr. 047/2019 vom 28. November 2019, URL: mobil.bfr.bund.de/cm/343/erbmaterial-von-erregern-vergleichen-um-krankheitsausbrueche-aufzuklaeren, letzter Zugriff am 29.03.2022.

BfR, 2020- Bundesinstitut für Risikobewertung, Anwendung des Whole Genome Sequencing zur Aufklärung von lebensmittelbedingten Krankheitsausbrüchen, 2020, URL: www.bfr.bund.de/cm/350/anwendung-des-whole-genome-sequencing-zur-aufklaerung-von-lebensmittelbedingten-krankheitsausbruechen.pdf, letzter Zugriff am 1.03.2022.

BfR, 2021- Bundesinstitut für Risikobewertung, Pipeline BakCharak, URL: www.gitlab.com/bfr_bioinformatics/bakcharak, letzter Zugriff am 14.12.2022.

Bodmann, K. F., Grabbein B., Kresken M., Kalkulierte parenterale Initialtherapie bakterieller Erkrankungen bei Erwachsenen–Update 2018, *DMW*, 11, 729-733, 2019.

Bonomo, R. A., & Szabo, D., Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*, *Clin. Infect. Dis.*, 43, 49-56, 2006.

Boronin, A. M., Diversity of *Pseudomonas* plasmids: to what extent?, *FEMS Microbiol. Lett.*, 100, 461-467, 1992.

Bruker, 2013, Bruker Daltonik GmbH, MALDI Biotyper Standardarbeitsanweisung Direkttransfermethode (DT), 2013.

Cambau, E., Perani, E., Dib, C., Petinon, C., Trias, J., & Jarlier, V., Role of mutations in DNA gyrase genes in ciprofloxacin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* susceptible or resistant to imipenem, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 10, 2248-2252, 1995.

- Campoli-Richards, D. M., Monk, J.P., Price, A., Benfield, P., Todd, P. A., Ward, A., Ciprofloxacin, *Drugs*, 35, 373–447 1988.
- Campoli-Richards, D. M., Chaplin, S., Sayce, R.H., Goa, K. L., Netilmicin, *Drugs*, 38, 703–756, 1989.
- Cassini, A., Högberg, L. D., Plachouras, D., Quattrocchi, A., Hoxha, A., Simonsen, G. S., Colomb-Cotinat, M., Kretzschmar, M. E., Devleeschauwer, B., Cecchini, M., Ouakrim, D. A., Oliveira, T. C., Struelens, M. J., Suetens, C., Monnet, D. L., the Burden of AMR Collaborative Group, Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis, *Lancet Infect. Dis.*, 1, 56-66, 2019.
- Castañeda-Tamez, P., Ramírez-Peris, J., Pérez-Velázquez, J., Kuttler, C., Jalalimanesh, A., Saucedo-Mora, M. Á., Jiménez-Cortés, J. G., Maeda, T., González, Y., Tomás, M., Wood, T. K., García-Contreras, R., Pyocyanin restricts social cheating in *Pseudomonas aeruginosa*, *Front. Microbiol.*, 9, 1- 10, 2018.
- Chávez-Jacobo, V. M., Hernández-Ramírez, K. C., Romo-Rodríguez, P., Pérez-Gallardo, R. V., Campos-García, J., Gutiérrez-Corona, J. F., García-Merinos, J. P., Meza-Carmen, V., Silva-Sánchez, Ramírez-Díaz, M. I., CrpP is a novel ciprofloxacin-modifying enzyme encoded by the *Pseudomonas aeruginosa* pUM505 plasmid, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 6, 2018.
- Chaudhry, N. A., Flynn Jr, H. W., Murray, T. G., Tabandeh, H., Mello Jr, M. O., Miller, D., Emerging ciprofloxacin-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, *Am. J. Ophthalmol.*, 4, 509-510, 1999.
- Chelaghma, W., Loucif, L., Bendahou, M., Rolain, J. M., Vegetables and fruit as a reservoir of β -lactam and colistin-resistant Gram-negative bacteria: A Review, *Microorganisms*, 12, 2534, 2021.
- Choudhury, D., Ghosh, A., Dhar Chanda, D., Das Talukdar, A., Dutta Choudhury, M., Paul, D., Prakash Maurya, A., Chakravorty, A., Bhattacharjee, A., Premature termination of MexR leads to overexpression of MexAB-OprM efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary referral hospital in India, *PloS one*, 2, 2016.
- Chuang, C. H., Janapatla, R. P., Wang, Y. H., Chang, H. J., Huang, Y. C., Lin, T. Y., Chiu, C. H., *Pseudomonas aeruginosa*-associated diarrheal diseases in children, *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 12, 1119-1123, 2017.
- Clissold, S. P., Todd, P. A., Campoli-Richards, D. M. Imipenem/Cilastatin, *Drugs*, 33, 183–241, 1987.
- CLSI, 2013, Clinical and Laboratory Standards Institute, VET01-A4, Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals, Approved Standard- Fourth Edition, 2013.
- Costa, R. A., *Escherichia coli* in seafood: A brief overview, *J. Adv. Biol. Biotechnol.*, 4, 450-454, 2013.
- DART, 2020; Antibiotika-Resistenzen bekämpfen zum Wohl von Mensch und Tier, erstellt vom Bundesministerium für Gesundheit, das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft sowie das Bundesministerium für Bildung und Forschung, URL: www.bundesgesundheitsministerium.de/fileadmin/Dateien/5_Publikationen/Gesundheit/Berichte/BMG_DART_2020_Bericht, letzter Zugriff am 29.03.2022.
- Davis, R., Markham, A., Balfour, J. A., Ciprofloxacin, *Drugs* 51, 1019–1074, 1996.

De Jonghe, V., Coorevits, A., Van Hoorde, K., Messens, W., Van Landschoot, A., De Vos, P., Heyndrickx, M., Influence of storage conditions on the growth of *Pseudomonas* species in refrigerated raw milk, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2, 460-470, 2011.

de Lagarde, M., Vanier, G., Arsenault, J., Fairbrother, J. M., High Risk Clone: A proposal of criteria adapted to the one health context with application to enterotoxigenic *Escherichia coli* in the pig population, *Antibiotics*, 3, 244, 2021.

del Barrio-Tofiño, E., López-Causapé, C., Oliver, A., *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones and their association with horizontally-acquired β -lactamases: 2020 update, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 6, 106196, 2020.

Deneke, C., snippySnake - variant calling pipeline with Snippy, URL: https://gitlab.com/bfr_bioinformatics/snippy-snake, letzter Zugriff am 23.04.2022.

Deneke, C., Uelze, L., Brendebach, H., Tausch, S. H., Malorny, B., Decentralized investigation of bacterial outbreaks based on hashed cgMLST, *Front. Microbiol.*, 12, 649517, 2021.

DIN EN ISO 7218:2014-09, DIN EN ISO 7218:2014-09, Deutsches Institut für Normung e.V., DIN EN ISO 7218:2014-09: Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln - Allgemeine Anforderungen und Leitlinien für mikrobiologische Untersuchungen (ISO 7218:2007 + Amd 1:2013, korrigierte Fassung 2014-04-15); Deutsche Fassung EN ISO 7218:2007 + A1:2013.

DIN EN ISO 11133:2020, Deutsches Institut für Normung e.V., DIN EN ISO 11133:2020-10: Mikrobiologie von Lebensmitteln, Futtermitteln und Wasser - Vorbereitung, Herstellung, Lagerung und Leistungsprüfung von Nährmedien (ISO 11133:2014, korrigierte Fassung 2014-11-01 + Amd. 1:2018 + Amd. 2:2020); Deutsche Fassung EN ISO 11133:2014 + A1:2018 + A2:2020.

DIN EN ISO 13720:2010, Deutsches Institut für Normung e.V., DIN EN ISO 13720:2010-12: Fleisch und Fleischerzeugnisse - Zählung von präsumtiven *Pseudomonas* spp. (ISO 13720:2010); Deutsche Fassung: EN ISO 13720:2010.

DIN EN ISO 16140-2:2016, Deutsches Institut für Normung e.V., DIN EN ISO 16140-2:2016-11: Mikrobiologie der Lebensmittelkette - Verfahrensvalidierung - Teil 2: Arbeitsvorschrift für die Validierung von alternativen (urheberrechtlich geschützten) Verfahren anhand eines Referenzverfahrens (ISO 16140-2:2016); Deutsche Fassung EN ISO 16140-2:2016.

DIN EN ISO 16140-3:2021, Deutsches Institut für Normung e.V., DIN EN ISO 16140-3:2021-06: Mikrobiologie der Lebensmittelkette - Verfahrensvalidierung - Teil 3: Arbeitsvorschrift für die Verifizierung von Referenz- und validierten alternativen Verfahren in einem Einzel-Labor (ISO 16140-3:2021); Deutsche Fassung EN ISO 16140-3:2021.

DIN EN ISO 16266:2008, Deutsches Institut für Normung e.V., DIN EN ISO 16266:2008-05: Wasserbeschaffenheit - Nachweis und Zählung von *Pseudomonas aeruginosa* - Membranfiltrationsverfahren (ISO 16266:2006); Deutsche Fassung EN ISO 16266:2008.

Dogan, B., Boor, K. J., Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1, 130-138, 2003.

Domhan, C., Wink, M., Zimmermann, S., Gefährlich resistent: Wenn Bakterien antimikrobiellen Substanzen trotzen, *Dtsch. Apoth. Ztg.*, 22, 32, 2018.

Eissa, N., Abou El-Gheit, N., Shaheen, A. A., Protective effect of *Pseudomonas fluorescens* as a probiotic in controlling fish pathogens, *AJBIO*, 5, 175-181, 2014.

El-Aziz, A., Detection of *Pseudomonas* spp. in chicken and fish sold in markets of assiut city, Egypt, *J. Food Qual. Hazards Control*, 3, 86-89, 2015.

Ercolini, D., Casaburi, A., Nasi, A., Ferrocino, I., Di Monaco, R., Ferranti, P., Mauriello, G., Villani, F., Different molecular types of *Pseudomonas fragi* have the same overall behaviour as meat spoilers, *Int. J. Food Microbiol.*, 1-2, 120-131, 2010.

EUCAST, 2022; European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Clinical breakpoints-breakpoints and guidance, URL: www.eucast.org/clinical_breakpoints; letzter Zugriff am 22. Juli 2022.

Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., Källner, M., MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report, *Bioinformatics*, 19, 3047-3048, 2016.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Aquatic Spezies: *Sprattus sprattus*, URL: www.fao.org/fishery/en/aqspecies/2102, letzter Zugriff am 29.12.2021.

Feldsine, P., Abeyta, C., Andrews, W. H., AOAC International methods committee guidelines for validation of qualitative and quantitative food microbiological official methods of analysis, *J. AOAC Int.*, 5, 1187-1200, 2002.

Fernández-Cuenca, F., López-Cerero, L., Cabot, G., Oliver, A., López-Méndez, J., Recacha, E., Portillo, I., Rodríguez-Baño <https://scholar.google.com/citations?user=4aWKID4AAAAJ&hl=en>, J., Pascual, Á., Nosocomial outbreak linked to a flexible gastrointestinal endoscope contaminated with an amikacin-resistant ST17 clone of *Pseudomonas aeruginosa*, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 10, 1837-1844, 2020.

FIZ 2021, Fisch-Informationszentrum e.V., Lexikon Fisch und Meeresfrüchte: Garnelen, URL: www.fischinfo.de/images/Lexikon/Garnelen, letzter Zugriff am 29.12.2021.

FIZ 2021a, Fisch-Informationszentrum e.V., Lexikon Fisch und Meeresfrüchte: Thunfisch, URL: www.fischinfo.de/images/Lexikon/Thunfisch, letzter Zugriff am 29.12.2021.

FIZ 2021b, Fisch-Informationszentrum e.V., Lexikon Fisch und Meeresfrüchte: Forelle, URL: www.fischinfo.de/images/Lexikon/Forelle, letzter Zugriff am 29.12.2021.

Frank, H. K., Lexikon der Lebensmittelmikrobiologie, 1. Auflage, Behr's Verlag, Hamburg, 1990

Franzetti, L., Scarpellini, M., Characterisation of *Pseudomonas* spp. isolated from foods, *Ann. Microbiol.*, 1, 39-47, 2007.

Freund, J. R., Mansfield, C. J., Doghramji, L. J., Adappa, N. D., Palmer, J. N., Kennedy, D. W., Lee, R. J., Activation of airway epithelial bitter taste receptors by *Pseudomonas aeruginosa* quinolones modulates calcium, cyclic-AMP, and nitric oxide signalling, *J. Biol. Chem.*, 25, 9824-9840, 2018.

Gessner, A., Epidemiologische Typisierung mittels Multi Locus Sequenz Typisierung, URL: imhr.de/wp-content/uploads/2020/11/Epidemiologische-Typisierung-mittels-Multi-Locus-Sequenz-Typisierung, letzter Zugriff am 21.03.2022.

Gestis Stoffdatenbank, URL: gestis.dguv.de, letzter Zugriff am 13.02.2023.

Gonçalves, L. D. D. A., Piccoli, R. H., Peres, A. D. P., Predictive modeling of *Pseudomonas fluorescens* growth under different temperature and pH values, *Braz. J. Microbiol.*, 48, 352-358, 2017.

Grada, A., Weinbrecht, K., Next-generation sequencing: methodology and application, *J. Investig. Dermatol.*, 8, 2013.

Gram, L. O. N. E., Inhibitory effect against pathogenic and spoilage bacteria of *Pseudomonas* strains isolated from spoiled and fresh fish, *Appl. Environ. Microbiol.*, 7, 2197-2203, 1993.

Halder, P., Mandal, K. C., Mukhopadhyay, M., Debnath, B., Shanghai fever: a fatal form of *pseudomonas aeruginosa* enteric disease, *Indian Pediatr.*, 10, 896-898, 2015.

Hamburg, 2018; Freie und Hansestadt Hamburg/ Bezirksämter, Merkblatt Lebensmittel: Sachgemäße Verwendung von Sahneaufschlagmaschinen, URL: www.hamburg.de/contentblob/10711212/9f85530050c42ace27e3fbab71ad7abe/data/hygiene-sahneaufschlagmaschinen; letzter Zugriff am 31.05.2022.

Hammad, A. M., Spoilage potential of *Pseudomonas* spp. isolated from domiati cheese, *Assiut Vet. Med. J.*, 147, 18-23, 2015.

Hasani, D., Colistin-resistente Enterobakterien in verzehrfertigen Lebensmitteln, unveröffentlichte Diplomarbeit, Universität Hamburg, Fachbereich Chemie, 2020.

Hatje, E., Neuman, C., Stevenson, H., Bowman, J. P., & Katouli, M., Population dynamics of *Vibrio* and *Pseudomonas* species isolated from farmed Tasmanian Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): a seasonal study, *Microb. Ecol.*, 4, 679-687, 2014.

Hoff, R. T., Patel, A., Shapiro, A., *Pseudomonas aeruginosa*: An uncommon cause of antibiotic-associated diarrhea in an immunocompetent ambulatory adult., *Case Rep. Gastrointest. Med.*, 1-3, 2020.

Hoshino, T., Ishizaki, K., Sakamoto, T., Kumeta, H., Yumoto, I., Matsuyama, H., Ohgiya, S., Isolation of a *Pseudomonas* species from fish intestine that produces a protease active at low temperature, *Let. Appl. Microbiol.*, 25, 70-72, 1997.

Hosseini, S., Martinez-Chapa, S. O., Principles and mechanism of MALDI-ToF-MS analysis, *Fundamentals of MALDI-ToF-MS Analysis*, 1st Edition, Springer Verlag, Singapur, 2017.

Hunter, C. A., Ensign, P. R., An epidemic of diarrhea in a new-born nursery caused by *Pseudomonas aeruginosa*, *Am. J. Public Health Nations Health*, 9, 1166-1169, 1947.

Illumina, 2010, Illumina Inc., Technology Spotlight: Illumina Sequencing- Illumina Sequencing Technology,

URL: www.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight_sequencing, letzter Zugriff am 29.12.2021.

Illumina, 2017, Illumina Inc., An introduction to Next Generation Sequencing Technology, URL: An Introduction to Next-Generation Sequencing Technology (illumina.com); letzter Zugriff am 31.05.2022.

Illumina, 2021, Illumina Inc., Introduction to SBS technology, URL: www.emea.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/sequencing-technology, letzter Zugriff am 29.12.2021.

- Islam, S., Jalal, S., Wretling, B., Expression of the MexXY efflux pump in amikacin-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Clin. Microbiol. Infect.*, 10, 877-883, 2004.
- Jacoby, G. A., Resistance plasmids of *Pseudomonas*, *The Bacteria*, 10, 265-293, 1986.
- Jagadeesan, B., Gerner-Smidt, P., Allard, M. W., Leuillet, S., Winkler, A., Xiao, Y., Chaffrong, S., Van Der Vossen, J., Tangi, S., Katasej, M., McClurek, P., Kimural, B., Ching Chaim, L., Chapman, J., Grant, K., The use of next generation sequencing for improving food safety: Translation into practice, *Food Microbiol.*, 79, 96-115, 2019.
- Jaglic, Z., Cervinkova, D., Genetic basis of resistance to quaternary ammonium compounds-the *qac* genes and their role: a review, *Vet. Med. (Praha)*, 6, 2012.
- Johnson, J. K., Arduino, S. M., Stine, O. C., Johnson, J. A., Harris, A. D. Multilocus sequence typing compared to pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Clin. Microbiol.*, 11, 3707-3712, 2007.
- Kleeberger, A., Busse, M., Keimzahl und Florazusammensetzung bei Hackfleisch unter besonderer Berücksichtigung von Enterobakterien und Pseudomonaden, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 6, 321-331, 1975.
- Klockgether, J., Tümmler, B. Recent advances in understanding *Pseudomonas aeruginosa* as a pathogen, *F1000Research*, 6, 2017.
- Knapp, K. M., English, B. K., Carbapenems, *Semin. Pediatr. Infect. Dis.*, 3, 175-185, 2001.
- Knothe, H., Shah, P. M., Eckardt, O., Cefpodoxime: comparative antibacterial activity, influence of growth conditions, and bactericidal activity, *Infection*, 5, 370-376, 1991.
- Kominos, S. D., Copeland, C. E., Grosiak, B., Postic, B., Introduction of *Pseudomonas aeruginosa* into a hospital via vegetables, *Appl. Microbiol.*, 4, 567-570, 1972.
- Kos, V. N., Déraspe, M., McLaughlin, R. E., Whiteaker, J. D., Roy, P. H., Alm, R. A., Corbeil, J., Gardner, H., The resistome of *Pseudomonas aeruginosa* in relationship to phenotypic susceptibility, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1, 427-436, 2015.
- Krämer, J., Prange, A., *Lebensmittelmikrobiologie*, 7. Auflage, UTB GmbH, 2017.
- Lalucat, J., Mulet, M., Gomila, M., & García-Valdés, E., Genomics in bacterial taxonomy: impact on the genus *Pseudomonas*, *Genes*, 2, 139- 156, 2020.
- Lambert, P., Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*, *J. R. Soc. Med.*, 41, 2002.
- Langsrud, S., Sundheim, G., Borgmann-Strahsen, R., Intrinsic and acquired resistance to quaternary ammonium compounds in food-related *Pseudomonas* spp, *J. Appl. Microbiol.*, 4, 874-882, 2003.
- Laniewska-Trokenheim, L., Sobota, M., Warminska-Radyko, I., Resistants to antibiotics of bacteria isolated from smoked fish, 13th World Congress of Food Science & Technology 2006, 721-721, 2006.
- Larsen, M. V., Cosentino, S., Rasmussen, S., Friis, C., Hasman, H., Marvig, R. L., Jelsbak, L., Sicheritz-Pontén, T., Ussery, D. W., Aarestrup, F., Lund, O., Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria, *J. Clin. Microbiol.*, 4, 1355-1361, 2012.

- Laudy, A. E., Róg, P., Smolińska-Król, K., Ćmiel, M., Słoczyńska, A., Patzer, J., Dzierżanowska, D., Wolinowska, R., Starościak, B., Tyski, S., Prevalence of ESBL-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Warsaw, Poland, detected by various phenotypic and genotypic methods, *PLoS ONE*, 6, 2017.
- Lawrence, B. M., *Mint: the genus Mentha*, 1st Edition, CRC Press, 2006.
- Lee, J. Y., Park, Y. K., Chung, E. S., Na, I. Y., & Ko, K. S., Evolved resistance to colistin and its loss due to genetic reversion in *Pseudomonas aeruginosa*, *Sci. Rep.*, 1, 1-13, 2016.
- Lee, C., Klockgether, J., Fischer, S., Trcek, J., Tümmler, B., & Römling, U., Why? – Successful *Pseudomonas aeruginosa* clones with a focus on clone C, *FEMS Microbiol. Rev.*, 6, 740-762, 2020.
- Leitsätze für Gewürze und andere würzende Zutaten, (Neufassung), vom 27. 5. 1998, BAnz. Nr. 183a vom 30. 9. 1998.
- Lin, H., Feng, C., Zhu, T., Li, A., Liu, S., Zhang, L., Li, Q., Zhang, X., Lin, L., Junwan, L., Lin, X., Lu, J., Lin, X., Li, K., Zhang, H., Xu, T., Li, C., Bao, Q., Molecular mechanism of the β -lactamase mediated β -lactam antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a Chinese teaching hospital, *Front. Microbiol.*, 1535, 2022.
- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Law, M., Comparison of next-generation sequencing systems, *J. Biomed. Biotechnol.*, 2012, 2012.
- Liu, Y. Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L. X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L.-F., Gu, D., Ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D., Zhou, H., Liang, Z., Liu, J.-H., Shen, J., Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study, *Lancet Infect. Dis.*, 2, 161-168, 2016.
- Livermore, D. M., Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare?, *Clin. Infect. Dis.*, 5, 634-640, 2002.
- Lyczak, J. B., Cannon, C. L., Pier, G. B., Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist, *Microbes Infect.*, 9, 1051-1060, 2000.
- Madaha, E. L., Mienie, C., Gonsu, H. K., Bughe, R. N., Fonkoua, M. C., Mbacham, W. F., Alayande, K. A., Bezuidenhout, C. C., Ateba, C. N., Whole-genome sequence of multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains UY1PSABAL and UY1PSABAL2 isolated from human broncho-alveolar lavage, Yaoundé, Cameroon, *PloS one*, 9, 2020.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A., Clark, D.P., *Brock Mikrobiologie*, 13. Auflage, Pearson, München, 2013.
- Mah, T. F., Pitts, B., Pellock, B., Walker, G. C., Stewart, P. S., O'Toole, G. A., A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance, *Nature*, 6964, 306-310, 2003.
- Mahzounieh, M., Khoshnood, S., Ebrahimi, A., Habibian, S., Yaghoubian, M., Detection of antiseptic-resistance genes in *Pseudomonas* and *Acinetobacter* spp. isolated from burn patients, *Jundishapur J. Nat. Pharm. Prod.*, 2, 2014.

- Maiden, M. C., Van Rensburg, M. J. J., Bray, J. E., Earle, S. G., Ford, S. A., Jolley, K. A., McCarthy, N. D., MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics, *Nat. Rev. Microbiol.*, 10, 728-736, 2013.
- Mao, W., Warren, M. S., Lee, A., Mistry, A., Lomovskaya, O., MexXY-OprM efflux pump is required for antagonism of aminoglycosides by divalent cations in *Pseudomonas aeruginosa*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 7, 2001-2007, 2001.
- Martin, N. H., Murphy, S. C., Ralyea, R. D., Wiedmann, M., Boor, K. J., When cheese gets the blues: *Pseudomonas fluorescens* as the causative agent of cheese spoilage, *J. Dairy Sci.*, 6, 3176-3183, 2011.
- Matissek, R., *Lebensmittelchemie*, 9. Auflage, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 2020.
- Mc Carlie, S., Boucher, C. E., Bragg, R. R., Molecular basis of bacterial disinfectant resistance, *Drug Resis. Updat.*, 48, 2020.
- Mena, K. D., Gerba, C. P., Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 201, 71-115, 2009.
- Miller, G. H., Arcieri, G., Weinstein, M. J., Waitz, J. A., Biological activity of Netilmicin, a broad-spectrum semisynthetic aminoglycoside antibiotic, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 5, 827-836, 1976.
- Moore, N. M., Flaws, M. L., Epidemiology and pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections, *Clin. Lab. Sci.*, 1, 43, 2011.
- Moosavian, M., Rahimzadeh, M., Molecular detection of metallo- β -lactamase genes, blaIMP-1, blaVIM-2 and blaSPM-1 in imipenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical specimens in teaching hospitals of Ahvaz, Iran, *Iran J. Microbiol.*, 1, 2-6, 2015.
- Moradali, M. F., Ghods, S., Rehm, B. H. A., *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 7, 39, 2017.
- Moraes, F., Góes, A., A decade of human genome project conclusion: Scientific diffusion about our genome knowledge, *Biochem. Mol. Biol. Educ.*, 3, 215-223, 2016.
- Moreno, R., Rojo, F., Features of pseudomonads growing at low temperatures: another facet of their versatility, *Environ. Microbiol. Rep.*, 5, 417-426, 2014.
- Morrissey, I., Oggioni, M. R., Knight, D., Curiao, T., Coque, T., Kalkanci, A., Martinez, J. L., BIOHYPO Consortium, Evaluation of epidemiological cut-off values indicates that biocide resistant subpopulations are uncommon in natural isolates of clinically-relevant microorganisms, *PLoS one*, 1, 2014.
- Motoyama, M., Kobayashi, M., Sasaki, K., Nomura, M., Mitsumoto, M., *Pseudomonas* spp. convert metmyoglobin into deoxymyoglobin, *Meat Sci.*, 1, 202-207, 2010.
- Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Aguilar, G. R., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., Achalapong, S., Agarwal, R., Akech, S., Albertson, S., Amuasi, J., Andrews, J., Aravkin, A., Ashley, E., Babin, F. J., Bailey, F., Baker, S., Basnyat, B., Bekker, A., Bender, R., Berkley, J. A., Bethou, A., Bielicki, J., Boonkasidecha, S., Bukosia, J., Carvalho, C., Castañeda-Orjuela, C., Chansamouth, V., Chaurasia, S., Chiurchiù, S.,

Chowdhury, F., Donatien, R. C., Cook, A. J., Cooper, B., Cressey, T. R., Criollo-Mora, E., Cunningham, M., Darboe, S., Day, N. P. J., De Luca, M., Dokova, K., Dramowski, A., Dunachie, S. J., Duong Bich, T., Eckmanns, T., Eibach, D., Emami, A., Feasey, N., Fisher-Pearson, N., Forrest, K., Garcia, C., Garrett, D., Gastmeier, P., Zergaw Giref, A., Claire Greer, R., Gupta, V., Haller, S., Haselbeck, A., Hay, S. I., Holm, M., Hopkins, S., Hsia, Y., Iregbu, K. C., Jacobs, J., Jarovsky, D., Javanmardi, F., Jenney, A. W. J., Khorana, M., Kisson, N., Kobeissi, E., Kostyanev, T., Phommasone, K., Khusuwan, S., Krapp, F., Krumkamp, R., Kumar, A., Kyu, H. H., Lim, C., Lim, K., Limmathurotsakul, D., Loftus, M. J., Lunn, M., Ma, J., Manoharan, A., Marks, F., May, J., Mayxay, M., Mturi, N., Munera-Huertas, T., Musicha, P., Musila, L. A., Mussi-Pinhata, M. M., Naidu, R. N., Nakamura, T., Nanavati, R., Nangia, S., Newton, P., Ngoun, C., Novotney, A., Nwakanma, D., Obiero, C. W., Ochoa, T. J., Olivas-Martinez, A., Olliaro, P., Ooko, E., Ortiz-Brizuela, E., Ounchanum, P., Pak, G. D., Paredes, J. L., Yariv Peleg, A., Perrone, C., Phe, T., Plakkal, N., Ponce-de-Leon, A., Raad, M., Ramdin, T., Rattanaovong, S., Riddell, A., Roberts, T., Robotham, J. V., Roca, A., Rosenthal, V. D., Rudd, K. E., Russell, N., Sader, H. S., Saengchan, W., Schnall, J., Scott, J. A. G., Seekaew, S., Sharland, M., Shivamallappa, M., Sifuentes-Osornio, Simpson, A. J., Steenkeste, N., Stewardson, A. J., Stoeva, T., Tasak, N., Thaiprakong, A., Thwaites, G., Tigoi, C., Turner, C., Turner, P., van Doorn, H. R., Velaphi, S., Vongpradith, A., Vongsouvath, M., Vu, H., Walsh, T., Walson, J. L., Waner, S., Wangrangsimakul, T., Wannapinij, P., Wozniak, T., Young-Sharma, T. E. M. W., Yu, K. C., Zheng, P., Sartorius, B., Lopez, A. D., Stergachis, A., Moore, C., Dolecek, C., Naghavi, M., Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis, *Lancet*, 2022.

Murugan, N., Malathi, J., Therese, K. L., Madhavan, H. N., Application of six multiplex PCR's among 200 clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* for the detection of 20 drug resistance encoding genes, *Kaohsiung J. Med. Sci.*, 2, 79-88, 2018.

Navon-Venezia, S., Ben-Ami, R., Carmeli, Y., Update on *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infections in the healthcare setting, *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 4, 306-313, 2005.

Nyati, H., An evaluation of the effect of storage and processing temperatures on the microbiological status of sous vide extended shelf-life products, *Food Control*, 6, 471- 476, 2000.

Nguyen, L.-T., Schmidt, H.A., von Haeseler, A., Minh, B.Q., IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies, *Mol. Biol. Evol.*, 32, 268-274, 2015.

Oliver, A., Mulet, X., López-Causapé, C., Juan, C., The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones, *Drug Resis. Updat.*, 21, 41-59, 2015.

Overhage, J., Bains, M., Brazas, M. D., Hancock, R. E. W., Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is a complex adaptation leading to increased production of virulence factors and antibiotic resistance, *J. Bacteriol.*, 8, 2671-2679, 2008.

PacBio, 2021, PACBIO, SMRT Sequencing- How It Works, URL: www.pacb.com/wp-content/uploads/Infographic_SMRT-Sequencing-How-it-Works.pdf, letzter Zugriff am 29.12.2021.

PacBio, 2021a, PACBIO, SMRT Analysis Software, URL: www.pacb.com/products-and-services/analytical-software/smrt-analysis, letzter Zugriff am 14.12.2022.

Palleroni, N.J., The *Pseudomonas* story, *Environ. Microbiol.*, 12, 1377-1383, 2010.

Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T.-J., Cheng, Z., Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies, *Biotechnol. Adv.*, 1, 177-192, 2019.

- Papp-Wallace, K. M., Mack, A. R., Taracila, M. A., Bonomo, R. A., Resistance to novel β -lactam- β -lactamase inhibitor combinations: The "Price of Progress", *Infect. Dis. Clin.*, 4, 773-819, 2020.
- Pauwelyn, E., Vanhouteghem, K., Cottyn, B., De Vos, P., Maes, M., Bleyaert, P., Höfte, M., Epidemiology of *Pseudomonas cichorii*, the cause of lettuce midrib rot, *J. Phytopathol.*, 4, 298-305, 2011.
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M. H., Velázquez, E., The current status on the taxonomy of *Pseudomonas* revisited: an update, *Infect. Genet. Evol.*, 57, 106-116, 2018.
- Pendleton, J. N., Gorman, S. P., Gilmore, B. F., Clinical relevance of the ESKAPE pathogens, *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, 3, 297-308, 2013.
- PHE, 2022, Public Health England, Culture Collection, Bacteria Collection *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 13437, URL: www.culturecollections.org.uk/products/bacteria/detail.jsp?refId=NCTC+13437, letzter Zugriff am 24.02.2022.
- PHE, 2022a, Public Health England, Culture Collection, Bacteria Collection *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 13921, URL: www.culturecollections.org.uk/products/bacteria/detail.jsp?refId=NCTC+13921, letzter Zugriff am 24.02.2022.
- Poole, K., Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 2, 255-264, 2001.
- Poole, K., Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2, 479-487, 2005.
- Poole, K., *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max, *Front. Microbiol.*, 2, 65, 2011.
- Pseudomonas*, 2022, *Pseudomonas* Genome DB, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, PA3719 (armR), URL: www.pseudomonas.com/feature/show?id=110256, letzter Zugriff am 21.03.2022.
- PubChem, 2022, National Center for Biotechnology Information, Cefpodoxim, URL: www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6335986, letzter Zugriff am 29.03.2022.
- PubChem, 2022a, National Center for Biotechnology Information, Imipenem, URL: www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/104838, letzter Zugriff am 29.03.2022.
- PubChem, 2022b, National Center for Biotechnology Information, Ciprofloxacin, URL: www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2764, letzter Zugriff am 29.03.2022.
- PubChem, 2022c, National Center for Biotechnology Information, Netilmicin, URL: www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/441306, letzter Zugriff am 29.03.2022.
- PubMLST, 2022, Public Databases for molecular typing and microbial genome diversity, *Pseudomonas aeruginosa*, URL: www.pubmlst.org/organisms/pseudomonas-aeruginosa, letzter Zugriff am 29.03.2022.
- Quintieri, L., Fanelli, F., Caputo, L., Antibiotic resistant *Pseudomonas* spp. spoilers in fresh dairy products: an underestimated risk and the control strategies, *Foods*, 9, 372, 2019.
- Rajmohan, S., Dodd, C. E. R., Waites, W. M., Enzymes from isolates of *Pseudomonas fluorescens* involved in food spoilage, *J. Appl. Microbiol.*, 2, 205-213, 2002.

Raposo, A., Pérez, E., Tinoco de Faria, C., Ferrús, M. A. Carrascosa, C., Food Borne Pathogens and Antibiotic Resistance- Chapter 3 Food Spoilage by *Pseudomonas* spp.- An Overview, 1 Edition, John Wiley & Sons, 2017.

Rasheed, M. U., Thajuddin, N., Ahamed, P., Teklemariam, Z., Jamil, K., Antimicrobial drug resistance in strains of *Escherichia coli* isolated from food sources, Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 56, 341-346, 2014.

Reich, F., Atanassova, V., Klein, G., Extended-spectrum β -lactamase – and AmpC-producing *enterobacteria* in healthy broiler chickens, Germany, Emerg. Infect. Dis., 8, 1253, 2013.

Reichler, S. J., Trmčić, A., Martin, N. H., Boor, K. J., Wiedmann, M., *Pseudomonas fluorescens* group bacterial strains are responsible for repeat and sporadic postpasteurization contamination and reduced fluid milk shelf life, J. Dairy Sci., 9, 7780-7800, 2018.

Reid, T. M. S., Porter, I. A., An outbreak of otitis externa in competitive swimmers due to *Pseudomonas aeruginosa*, Epidemiol. Infect., 3, 357-362, 1981.

Reisdorf, S., Antiinfektive Therapie: Antibiotika gegen Problemkeime, Dtsch. Ärztebl. Int. 51, 2212, 2015.

Rhoads, A., Au, K. F., PacBio sequencing and its applications, Genomics, Proteomics & Bioinformatics, 5, 278-289, 2015.

Rimbach, G., Möhring, J., Erbersdobler H.F., Lebensmittel- Warenkunde für Einsteiger, 2. Auflage, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 2015.

RKI, 2007, Robert Koch-Institut, ESBL und AmpC: β -Laktamasen als eine Hauptursache der Cephalosporin-Resistenz in Enterobakterien, Epid. Bull., 28, 2007.

RKI, 2016, Robert Koch-Institut, Colistin-Resistenz bei gramnegativen Bakterien- die Situation in Deutschland, Epid. Bull., 46, 2016.

Rossolini, G. M., Arena, F., Pecile, P., Pollini, S., Update on the antibiotic resistance crisis, Cur. Opin. Pharmacol., 18, 56-60, 2014.

Sacha, P., Wieczorek, P., Hauschild, T., Zórawski, M., Olszańska, D., Trynieszewska, E., Metallo-beta-lactamases of *Pseudomonas aeruginosa* - a novel mechanism resistance to beta-lactam antibiotics, Folia Histochem. Cytobiol., 2, 137-142, 2008.

Sakai, M., Atsuta, S., Kobayashi, M., *Pseudomonas fluorescens* isolated from the diseased rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, Kitasato Archi. Exp. Med., 4, 157-162, 1989.

Sartorius, Sartorius Biohit Liquid Handling Oy, Proline® Plus Pipette- Bedienungsanleitung, Seite 97, März 2013.

SAS, 2017, Schweizerische Eidgenossenschaft, Leitfaden zur Validierung mikrobiologischer Prüfverfahren und zur Abschätzung der Messunsicherheit im Bereich Lebensmittel- und Umweltmikrobiologie, Dokument Nr. 328.dw, 2017.

Scales, B. S., Dickson, R. P., LiPuma, J. J., Huffnagle, G. B., Microbiology, genomics, and clinical significance of the *Pseudomonas fluorescens* species complex, an unappreciated colonizer of humans, Clin. Microbiol. Rev., 4, 927-948, 2014.

- Sergelidis, D., Angelidis, A. S., Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a controversial food-borne pathogen, *Lett. Appl. Microbiol.*, 6, 409-418, 2017.
- Sharma, S., Agarwal, N., Nourishing and healing prowess of garden cress (*Lepidium sativum* Linn.)- A review, *Indian J. Nat. Prod. Resour.*, 3, 2011.
- Sjölund, M., Bengtsson, S., Bonnedahl, J., Hernandez, J., Olsen, B., Kahlmeter, G., Antimicrobial susceptibility in *Escherichia coli* of human and avian origin - a comparison of wild-type distributions, *Clin. Microbiol. Infect.*, 5, 461-465, 2009.
- Sørensen, J., Nybroe, O., *Pseudomonas* in the soil environment, *Pseudomonas*, 3rd Edition, 369-401, Springer, Boston, MA, 2004.
- Spiers, A. J., Buckling, A., Rainey, P. B., The causes of *Pseudomonas* diversity, *Microbiol.*, 10, 2345-2350, 2000.
- Spratt, B. G., Exploring the concept of clonality in bacteria, *Genomics, Proteomics, Clinical Bacteriology*, 323-352, 2004.
- Staub, B., Orale Cephalosporine, *Pharma-Krit.*, 17, 1997.
- Stover, C., Pham, X., Erwin, A., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S. L., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G. K. S., Wu, Z., Paulsen, I. T., Reizer, J., Saier, M. H., Hancock, R. E. W., Lory, S., Olson, M. V., Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen, *Nature*, 406, 959–964, 2000.
- Sullivan, C. B., Diggle, M. A., Clarke, S. C., Multilocus sequence typing, *Molec. Biotechnol.*, 3, 245-254, 2005.
- Tabata, A., Nagamune, H., Maeda, T., Murakami, K., Miyake, Y., Kourai, H., Correlation between resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to quaternary ammonium compounds and expression of outer membrane protein OprR, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 7, 2093-2099, 2003.
- Tenhagen, B. A., Werner, N., Käsbohrer, A., Kreienbrock, L., Übertragungswege resistenter Bakterien zwischen Tieren und Menschen und deren Bedeutung–Antibiotikaresistenz im One-Health-Kontext, *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz*, 5, 515-521, 2018.
- Thai, T., Salisbury, B. H., Zito, P. M., Ciprofloxacin, Zugriff über: www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535454, letzter Zugriff am 27.12.2021.
- Thermo Fisher, 2022, Trypton-Soja-Bouillon, Katalognummer: CM0129B, URL: www.thermofisher.com/order/catalog/product/CM0129B, letzter Zugriff am 29.03.2022.
- Threlfall, E. J., Ward, L. R., Frost, J. A., Willshaw, G. A., The emergence and spread of antibiotic resistance in food-borne bacteria, *Int. J. Food Microbiol.*, 62, 1-5, 2000.
- Troillet, N., Samore, M. H., Carmeli, Y., Imipenem Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Risk Factors and Antibiotic Susceptibility Patterns, *Clin. Infect. Dis.*, 5, 1094–1098, 1997.

Van Dijk, E. L., Auger, H., Jaszczyszyn, Y., Thermes, C., Ten years of next-generation sequencing technology, *Trends Genet.*, 9, 418-426, 2014.

Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt, 2016, Schwerpunktbericht 01-2015: Fortsetzung der Untersuchung der mikrobiologischen Beschaffenheit geschlagener Sahne aus Automaten vom 20.06.2016, URL: verbraucherschutz.sachsen-anhalt.de/fileadmin/Bibliothek/Politik_und_Verwaltung/MS/LAV_Verbraucherschutz/lebensmittelsicherheit/schwerpunktberichte/schwerpunktberichte2015/01_2015.pdf, letzter Zugriff am 29.03.2022.

Verordnung (EG) Nr. 853/2004 des europäischen Parlaments und des Rates, vom 29. April 2004, mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs, in der konsolidierten Fassung vom 28. Oktober 2021.

Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel, in der konsolidierten Fassung vom 08. März 2020.

Verordnung über Milcherzeugnisse (Milcherzeugnisverordnung- MilchErzV) vom 15. Juli 1970, (BGBl. I S. 1150), die zuletzt durch Artikel 4 der Verordnung vom 26. April 2023 (BGBl. 2023 I Nr. 115) geändert worden ist.

Vincent, C., Boerlin, P., Daignault, D., Dozois, C. M., Dutil, L., Galanakis, C., Reid-Smith, R. J., Tellier, P. P., Tellis, P. A., Ziebell, K., Manges, A. R., Food reservoir for *Escherichia coli* causing urinary tract infections, *Emerg. Infect. Dis.*, 1, 88, 2010.

Vincent, A. T., Derome, N., Boyle, B., Culley, A. I., Charette, S. J., Next-generation sequencing (NGS) in the microbiological world: How to make the most of your money, *J. Microbiol. Methods*, 138, 60-71, 2017.

Voelkerding, K. V., Dames, S. A., Durtschi, J. D., Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics, *Clin. Chem.*, 4, 641-658, 2009.

Wang, M. C., Liu, C. Y., Shiao, A. S., Wang, T., Ear problems in swimmers, *J. Chin. Med. Assoc.*, 8, 347-352, 2005.

Wang, H., McEntire, J. C., Zhang, L., Li, X., Doyle, M., The transfer of antibiotic resistance from food to humans: facts, implications and future directions, *Rev. Off. Int. Epizoot.*, 1, 249-260, 2012.

Washburn, J., Jacobson, J. A., Marston, E., Thorsen, B., *Pseudomonas aeruginosa* rash associated with a whirlpool, *JAMA*, 20, 2205-2207, 1976.

Watanabe, M., Iyobe, S., Inoue, M., Mitsuhashi, S., Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1, 147-151, 1991.

Whitfield, F. B., Jensen, N., Shaw, K. J., Role of *Yersinia intermedia* and *Pseudomonas putida* in the development of a fruity off-flavour in pasteurized milk, *J. Dairy Res.*, 4, 561-569, 2000.

Wiedemann, B., Luhmer, E., Zühlendorf, M. T., In vitro activity of cefpodoxime and ten other cephalosporins against gram-positive cocci, *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*, including β -lactamase producers, *Infection*, 5, 363-369, 1991.

Wiegand, I., Hilpert, K., Hancock, R. E., Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances, *Nat. Protoc.*, 2, 163-175, 2008.





- Wieler, L. H., Broich, K., Antibiotikaresistenzen: Große Herausforderungen erfordern komplexe Lösungen, Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 5, 495-498, 2018.
- Wiklund, T., Bylund, G., *Pseudomonas anguilliseptica* as a pathogen of salmonid fish in Finland, Dis. Aquat. Org., 1, 13-19, 1990.
- Wilke, M. S., Heller, M., Creagh, A. L., Haynes, C. A., McIntosh, L. P., Poole, K., Strynadka, N. C. The crystal structure of MexR from *Pseudomonas aeruginosa* in complex with its antirepressor ArmR, Proc. Nat. Acad. Sci., 39, 14832-14837, 2008.
- Witte, W., Mielke, M., β -Laktamasen mit breitem Wirkungsspektrum, Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz, 10, 881-890, 2003.
- Xie, J., Zhang, Z., Yang, S. P., Cheng, Y., Qian, Y. F., Study on the spoilage potential of *Pseudomonas fluorescens* on salmon stored at different temperatures, J. Food Sci. Technol., 1, 217-225, 2018.
- Zeng, L., Jin, S., *aph* (3')-IIb, a gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, is under the positive control of surrogate regulator HpaA, Antimicrobiol. Agents Chemother., 12, 3867-3876, 2003.
- Zhou, Z., Alikhan, N. F., Sergeant, M. J., Luhmann, N., Vaz, C., Francisco, A. P., Carrico, J. A., Achtman, M., GrapeTree: Visualization of core genomic relationships among 100,000 bacterial pathogens, Genome Res, 2018.
- Zubyk, H. L., Wright, G. D., CrpP is not a Fluorquinolone-inactivating enzyme, Antimicrob. Agents Chemother., 65, 10-1128, 2021.

9. Anhang

9.1 Chemikalienliste inkl. GHS

Tab. 26 listet die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Antibiotika und Chemikalien auf.

Tab. 26: Liste der verwendeten Antibiotika und Chemikalien nach GESTIS Stoffdatenbank, 2022.

Chemikalie	CAS-Nummer	GHS-Piktogramme und Signalwörter	H-Sätze	P-Sätze	Hersteller
2-Propanol	67-63-0	 Gefahr	225; 319; 336	210; 240; 305+ 351+ 338; 403+ 223	Merck, Darmstadt
Cefpodoxim	80210-62-4	 , Gefahr	317; 334	261; 280; 342+ 311-	Sigma-Aldrich, Hamburg
Ciprofloxacin	85721-33-1	-	-	-	Merck, Darmstadt
Ethanol, 70 %	64-17-5	 Gefahr	225; 319	210; 240; 305+ 351+ 338; 403+ 223	Merck, Darmstadt
Glyzerin	56-81-5	-	-	-	Roth, Karlsruhe
Imipenem	74431-23-5	-	-	-	Merck, Darmstadt
Netilmicin	56391-56-1	 , Gefahr -	360	201; 280; 308+ 313	Merck, Darmstadt

Entsorgung:

Die Entsorgung der aufgeführten Chemikalien erfolgt in gesonderten Autoklavierbehältern, da diese mit pathogenen Mikroorganismen in Kontakt kommen.

9.2 Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien

In Tab. 27 und Tab. 28 sind die verwendeten Geräte bzw. die für die vorliegende Arbeit genutzten Verbrauchsmaterialien aufgeführt.

Tab. 27: Verwendete Geräte.

Gerätebezeichnung	Modell, Spezifikation	Hersteller
Gravimetrischer Verdüner	Smart Dilutor W	IUL S.A., Barcelona, Spanien
Magnetrührer	IKAMAG RET-GS	IKA Labortechnik, Staufen
MALDI-TOF-MS	Microflex LT MALDI-TOF-MS Biotyper; Datenbankversion: BDAL-10.0.0.0.-RUO	Bruker Corporation, Massachusetts, USA;
pH-Meter	Schott CG 812	SI Analytics, Mainz
Photometer	GENESYS™ 10S UV-Vis- Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Pipette (10- 100 µl)	Sartorius Biohit Proline Plus (Unrichtigkeit: 0,8- 2 %, Unpräzision: 0,15- 1 %)	Sarstedt AG & CO, Nümbrecht
Pipette (100- 1000 µl)	Sartorius Biohit Proline Plus (Unrichtigkeit: 0,6- 1 %, Unpräzision: 0,2- 0,4 %)	Sarstedt AG & CO, Nümbrecht
Stomacher	Smasher™	AES Laboratore, Nürtingen
Vortex-Schüttler	Vortex-Schüttler	VWR International GmbH, Darmstadt
Waage (fein)	Sartorius 2004 MP, Genauigkeit: 0,01 mg	Sartorius AG, Göttingen
Waage (grob)	Sartorius BD ED 6202S, Genauigkeit: 0,1 g	Sartorius AG, Göttingen
Zentrifuge	Heraeus Fresco 21 Centrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Tab. 28: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterial	Hersteller
BagFilter®	Interscience, St. Nom la Bretèche, Frankreich
Desinfektionsmittel	Desomed, Freiburg
Einmalküvetten	BRAND GmbH + CO KG, Wertheim
Einweghandschuhe	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Impfnadel	Sarstedt AG & CO, Nümbrecht
Impfschlinge	Sarstedt AG & CO, Nümbrecht
Mikrotiterplatten	Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark
Petrischalen	Sarstedt AG & CO, Nümbrecht
Pipettenspitzen (10- 1000 µl)	Sarstedt AG & CO, Nümbrecht
Plattierungsspatel	Sarstedt AG & CO, Nümbrecht
Reaktionsgefäß (1,5 ml)	Sarstedt AG & CO, Nümbrecht

9.3 Verwendete Nährmedien und Reagenzien

Die nachfolgende Tabelle stellt eine Zusammenfassung aller verwendeten Nährmedien und Reagenzien sowie ihrer Hersteller dar.

Tab. 29: Verwendete Nährmedien und Reagenzien.

Nährmedium/ Reagenz	Hersteller
Bolton-Bouillon	Oxoid, Wesel
CAMHB	BD, Irland
Columbia-Blutagar	Oxoid, Wesel
Gram Positive Lysis Solution	Biozym, Hess. Oldendorf
HCCA-Matrix	SunChrom, Friedrichsdorf
Maximale Wiederbelebungslösung	Oxoid, Wesel
MPC Protein Precipitation Reagent	Biozym, Hess. Oldendorf
Proteinase K	Biozym, Hess. Oldendorf
<i>Pseudomonas</i> -Agarbasis	Oxoid, Wesel
<i>Pseudomonas</i> -CFC-Agar-Supplement	Oxoid, Wesel
Ready-Lyse-Lysozyme	Biozym, Hess. Oldendorf
RNase	Biozym, Hess. Oldendorf
Sabouraud-Bouillon	Eigene Herstellung
TE-Puffer	Biozym, Hess. Oldendorf
TSA	Oxoid, Wesel
TSB	Oxoid, Wesel

9.4 Zusammensetzung und Herstellung der Nährmedien

Die jeweilige Zusammensetzung und Herstellung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Nährmedien ist in Tab. 30 aufgeführt.

Tab. 30: Zusammensetzung und Herstellung der verwendeten Nährmedien.

Substanz	Einwaage
Bolton-Bouillon	
Pepton aus Fleisch	10,0 g
Lactalbuminhydrolysat	5,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
Natriumchlorid	5,0 g
α -Ketoglutar säure	1,0 g
Natriumpyruvat	0,5 g
Natriummetabisulfit	0,5 g
Natriumcarbonat	0,6 g
Hämin	0,01 g
pH= 7,4 \pm 0,2; 13,8 g Pulver in 500 ml demineralisiertes Wasser geben, mischen und autoklavieren. Abschließend steril in Reagenzröhrchen füllen.	
CAMHB	
Säurehydrolysat von Casein	17,5 g
Rindfleischextrakt	3,0 g
Stärke	1,5 g
pH= 7,3 \pm 0,2; 22 g Pulver in 1 l demineralisiertes Wasser geben, mischen und autoklavieren. Abschließend steril in Flaschen füllen.	
<i>Pseudomonas</i>-Agarbasis (für CFC-Agar)	
Pepton aus Gelatine	16 g
Agar	11 g
Caseinhydrolysat	10 g
Kaliumsulfat	10 g
Magnesiumchlorid	1,4 g
pH= 7,1 \pm 0,2; 24,2 g Pulver und 5 ml Glycerin in 500 ml demineralisiertes Wasser geben, mischen, erhitzen bis sich alle Bestandteile gelöst haben und autoklavieren. Nach dem Abkühlen auf 50 °C erfolgt die Zugabe von:	

Substanz	Einwaage
<i>Pseudomonas</i>-CFC-Selektiv-Agarsupplement (für CFC-Agar)	
Cetrimid	5,0 mg
Fucidin	5,0 mg
Cephalosporin	25,0 mg
Inhalt einer Flasche Agarsupplement zu 500 ml <i>Pseudomonas</i> -Agarbasis geben und gut mischen. Abschließend steril in Petrischalen füllen.	
Sabouraud-Bouillon	
Fleisch- und Caseinpepton	10 g
D-Glucose	20 g
pH= 5,6 ± 0,2; 30 g Pulver in 1 l demineralisiertes Wasser geben, mischen und autoklavieren. Abschließend steril in Reagenzröhrchen füllen.	
TSA	
Casein (enzymatisch verdaut)	15 g
Agar	15 g
Natriumchlorid	5 g
Sojabohne (enzymatisch verdaut)	5 g
pH= 7,3 ± 0,2; 40 g Pulver in 1 L demineralisiertes Wasser geben, mischen, für 1 Minute kochen und autoklavieren. Abschließend steril in Petrischalen füllen.	
TSB	
Casein (enzymatisch verdaut)	17 g
Natriumchlorid	5 g
Sojabohne (enzymatisch verdaut)	3 g
Dextrose	2,5 g
Dikaliumhydrogenphosphat	2,5 g
pH 7,3 ± 0,2; 30 g Pulver in 1 L demineralisiertes Wasser geben, mischen, für 1 Minute kochen und autoklavieren. Abschließend steril in Reagenzröhrchen füllen.	

9.5 Pseudomonadenstammsammlung

In der folgenden Tabelle ist die für diese Arbeit zur Verfügung gestellte Stammsammlung der Pseudomonaden aufgeführt, für welche die MHKs mitbestimmt wurden. Zudem wurden die Stämme ATCC 27853, ATCC 13525 und LMG 2257 für die Validierung des eigenen kulturellen Nachweis- und Zählverfahrens verwendet.

Tab. 31: Pseudomonadenstammsammlung.

Spezies	Stammbezeichnung	Interne lfd. Nr.	Herkunft
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 27853	1	Blutkultur, ATCC
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 15442	2	ATCC
<i>P. aeruginosa</i>	NCTC 13437	3	NCTC
<i>P. aeruginosa</i>	NCTC 13921	4	NCTC; Auswurf stationärer Patient
<i>P. aeruginosa</i>	Stamm 4	5	Katz; Institut für Hygiene und Umwelt Hamburg
<i>P. aeruginosa</i>	Stamm 5	6	Katz; Institut für Hygiene und Umwelt Hamburg
<i>P. aeruginosa</i>	Stamm 6	7	Katz; Institut für Hygiene und Umwelt Hamburg
<i>P. aeruginosa</i>	17-L-01034-1-1	8	Sahne aus Automaten, Verfolgsprobe
<i>P. aeruginosa</i>	18-L-08895-3-1	9	Pesto Verde (kleine Kolonie)
<i>P. aeruginosa</i>	18-L-08895-3-1	10	Pesto Verde (große Kolonie)
<i>P. fluorescens</i>	17-L-06238-1-1	11	Forelle, roh
<i>P. fluorescens</i>	17-L-06549-2-1	12	Seelachsfilet, roh
<i>P. fluorescens</i>	17-L-08128-3-1	13	Hähnchenpfanne, roh
<i>P. fluorescens</i>	17-L-08580-1-1	14	Sahne, geschlagen
<i>P. fluorescens</i>	17-L-08580-2-1	15	Schwarzwaldtorte
<i>P. fluorescens</i>	17-L-08582-1-1	16	Sahne, geschlagen
<i>P. fluorescens</i>	17-L-08880-2-1	17	Mettbrötchen
<i>P. fluorescens</i>	17-L-10564-1-1	18	Thüringer Mett
<i>P. fulva</i>	-	19	Diplomarbeit, Rudkowski 2015
<i>P. putida</i>	NPO148	20	HPA
<i>P. aeruginosa</i>	LMG 1242	21	Blutkultur, LMG
<i>P. fluorescens</i>	LMG 1794	22	Blutkultur, LMG
<i>P. putida</i>	LMG 2257	23	Blutkultur, LMG

Spezies	Stammbezeichnung	Interne lfd. Nr.	Herkunft
<i>P. putida</i>	K14	24	Diplomarbeit, Hasani 2020
<i>P. guariconensis</i>	K7b	25	Diplomarbeit, Hasani 2020
<i>P. aeruginosa</i>	20-L-01597	26	Aufgeschäumte Milch

9.6 Liste der analysierten Lebensmittel

Tab. 32 beinhaltet alle 184 im Rahmen dieser Arbeit auf die Anwesenheit (multi-)resistenter Pseudomonaden überprüfter Lebensmittel. Die Aufzählung erfolgt geordnet nach den Warengruppen Hackfleisch, Sahne, Lachs, weitere Fischproben, pflanzliche Lebensmittel und diverse weitere Lebensmittel.

Tab. 32: Liste der analysierten Lebensmittel.

Interne Probennummer	Produktbeschreibung	Herkunftsbeschreibung
Warengruppe Hackfleisch		
H001	Rinderhackfleisch	Frischetheke, Famila
H002	Hackfleisch, gemischt	Frischetheke, Famila
H003	Bratmett vom Schwein	Frischetheke, Famila
H004	Rinderhackfleisch, mager	Frischetheke, Famila
H005	Tatar	Frischetheke, Famila
H006	Rinderhackfleisch	Frischetheke, EDEKA
H007	Hackfleisch, gemischt	Frischetheke, EDEKA
H008	Rinderhackfleisch	Frischetheke, EDEKA
H009	Hackfleisch, gemischt	Frischetheke, EDEKA
H010	Mett	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe
H011	Hackfleisch, gemischt	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe
H012	Rinderhack	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe

Interne Probennummer	Produktbeschreibung	Herkunftsbeschreibung
H013	Mett ohne Zwiebeln	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe
H014	Hackfleisch, gemischt	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe
H015	Rinderhackfleisch	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe
H016	Rinderhackfleisch	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe
H017	Rinderhackfleisch	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe
H018	Tatar	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe
H019	Hackfleisch, gemischt	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe
H020	Tatar	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe
H021	Beefsteackhackfleisch	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Nord; Planprobe
H022	Hackfleisch, gemischt	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Nord; Planprobe
H023	Thüringer Mett	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Nord; Planprobe
H024	Hackfleisch, gemischt	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Nord; Planprobe
H025	Rinderhackfleisch	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Nord; Planprobe

Interne Probennummer	Produktbeschreibung	Herkunftsbeschreibung
H026	Hackfleisch, gemischt	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe
H027	Rinderhackfleisch	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Mitte; Planprobe
H028	Thüringer Mett	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Mitte; Planprobe
H029	Rinderhackfleisch	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe
H030	Tatar	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe
H031	Schweinemett	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe
H032	Rinderhackfleisch	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe
H033	Beefhack	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe
H034	Tatar	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe
H035	Mett, gewürzt	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Nord; Planprobe
H036	Hackfleisch, gemischt- Rind und Lamm	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Mitte; Planprobe
H037	Schweinehackfleisch	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Mitte; Planprobe
H038	Rinderhackfleisch	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Mitte; Planprobe

Interne Probennummer	Produktbeschreibung	Herkunftsbeschreibung
H039	Rinderhackfleisch	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Nord; Planprobe
H040	Rinderhackfleisch	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe
H041	Hackfleisch, gemischt- Rind und Lamm	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe
H042	Hackfleisch, gemischt	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe
H043	Rinderhackfleisch	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe
H044	Mett	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe
H045	Mett	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe
H046	Mett	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe
H047	Hackfleisch, gemischt	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe
H048	Rinderhackfleisch	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe
H049	Thüringer Mett	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe
H050	Rinderhackfleisch	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe
H051	Thüringer Mett ohne Zwiebel	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe

Interne Probennummer	Produktbeschreibung	Herkunftsbeschreibung
H052	Rinderhackfleisch	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe
H053	Beefhack	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe
H054	Rinderhackfleisch	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Nord; Planprobe
H055	Hackfleisch, gemischt	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Nord; Planprobe
H056	Tatar	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Nord; Planprobe
H057	Schweinehackfleisch	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Mitte; Planprobe
H058	Hackfleisch, gemischt, Rind und Lamm	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Mitte; Planprobe
H059	Rinderhackfleisch	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Mitte; Planprobe
H060	Rinderhackfleisch	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Mitte; Planprobe
H061	Hackfleisch, gemischt- Rind und Lamm	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Mitte; Planprobe
H062	Mett	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Nord; Planprobe
H063	Schweine-Schinkenmett	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Nord; Planprobe
H064	Rinderhackfleisch	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Mitte; Planprobe

Interne Probennummer	Produktbeschreibung	Herkunftsbeschreibung
Warengruppe Sahne		
S001	Sahne, aufgeschlagen	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe
S002	Sahne, aufgeschlagen	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe
S003	Sahne, aufgeschlagen	Institut für Hygiene und Umwelt (Altona); Bezirk Altona; Planprobe
S004	Sahne, aufgeschlagen	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe
S005	Sahne, aufgeschlagen	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe
S006	Sahne, aufgeschlagen	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe
S007	Sahne, aufgeschlagen	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe
S008	Sahne, aufgeschlagen	Institut für Hygiene und Umwelt (Altona); Bezirk Altona; Planprobe
S009	Sahne, aufgeschlagen	Institut für Hygiene und Umwelt (Altona); Bezirk Altona; Planprobe
S010	Sahne, aufgeschlagen	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe
S011	Sahne, aufgeschlagen	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe
S012	Sahne, aufgeschlagen	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe

Interne Probennummer	Produktbeschreibung	Herkunftsbeschreibung
S013	Sahne, aufgeschlagen	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe
S014	Sahne, Ausgangsprodukt	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe
S014	Sahne, aufgeschlagen	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe
S015	Sahne, aufgeschlagen	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe
S016	Sahne, aufgeschlagen	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe
S017	Sahne, aufgeschlagen	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe
S018	Sahne, aufgeschlagen	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe
S019	Sahne, aufgeschlagen	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe
S020	Sahne, aufgeschlagen	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe
S021	Sahne, aufgeschlagen	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe
S022	Sahne, aufgeschlagen	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe
S023	Sahne, aufgeschlagen	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Verfolgprobe
Warengruppe Lachs		
L001	Räucherlachs, Aquakultur Norwegen	Abgepackte Waren, EDEKA

Interne Probennummer	Produktbeschreibung	Herkunftsbeschreibung
L002	Lachs, Aquakultur Norwegen	Abgepackte Ware, EDEKA
L003	Stremellachs, Aquakultur Norwegen	Abgepackte Ware, EDEKA
L004	Lachs, lose Ware	Frischetheke, EDEKA
L005	Rauchlachs, Aquakultur Norwegen	Frischetheke, real
L006	Wildlachs, kaltgeräuchert	Abgepackte Ware, Penny
L007	Lachs, Aquakultur Norwegen	Abgepackte Ware, Penny
L008	Wildlachs, kaltgeräuchert	Abgepackte Ware, Netto
L009	Lachs, gesalzen	Frischetheke, Famila
L010	Räucherlachs, Aquakultur Norwegen	Abgepackte Ware, Famila
L011	Graved Lachs, Aquakultur Norwegen	Abgepackte Ware, Famila
L012	Wildlachs, Aquakultur Norwegen	Abgepackte Ware, Famila
L013	Räucherlachs, Aquakultur Norwegen	Abgepackte Ware, EDEKA
L014	Lachs	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Eimsbüttel; Planprobe
L015	Lachs	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe
L016	Lachs	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe
L017	Lachs	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Eimsbüttel; Planprobe
L018	Lachs	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Eimsbüttel; Planprobe
L019	Räucherlachs	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe

Interne Probennummer	Produktbeschreibung	Herkunftsbeschreibung
Warengruppe weitere Fischproben		
F001	Forellen Filets, Aquakultur Türkei	Abgepackte Ware, Penny
F002	Forellen-Filets, Aquakultur Türkei	Abgepackte Ware, Penny
F003	Garnelen, gekocht, Aquakultur Indonesien	Abgepackte Ware, Netto
F004	Eismeer Garnelen	Abgepackte Ware, Netto
F005	Forellen-Filets, Aquakultur Türkei	Abgepackte Ware, Netto
F006	Lachsforelle, Aquakultur Polen	Abgepackte Ware, Netto
F007	Sprotten	Abgepackte Ware, Netto
F008	Seelachsfilet	Institut für Hygiene und Umwelt; Serviceprobe; Planprobe
F009	Thunfisch	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Nord; Planprobe
F010	Thunfisch	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Eimsbüttel; Planprobe
F011	Thunfisch	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Eimsbüttel; Planprobe
Warengruppe pflanzliche Lebensmittel		
P001	Mini Tomaten, Ursprung Niederlande	Abgepackte Ware, real
P002	Rispen Tomaten, Ursprung Spanien	Abgepackte Ware, EDEKA
P003	Mini Romanotomaten, Ursprung Marokko	Abgepackte Ware, real
P004	Dill, Ursprung Italien	Abgepackte Ware, real
P005	Schnittlauch, Ursprung Marokko	Abgepackte Ware, real

Interne Probennummer	Produktbeschreibung	Herkunftsbeschreibung
P006	Feldsalat, Ursprung Italien	Abgepackte Ware, real
P007	Sweet Pearl Tomaten, Ursprung Niederlande	Abgepackte Ware, real
P008	Strauchtomaten, Ursprung Spanien	Abgepackte Ware, real
P009	Koriander, Ursprung unbekannt	Lose Ware, türkischer Supermarkt
P010	Petersilie, Ursprung Italien	Abgepackte Ware, real
P011	Rosmarin, Ursprung Marokko	Abgepackte Ware, real
P012	Thymian, Ursprung Deutschland	Abgepackte Ware, real
P013	Cherry Roma Tomaten, Ursprung Spanien	Abgepackte Ware, REWE
P014	Blattsalat Mix, Ursprung Italien	Abgepackte Ware, REWE
P015	Schnittlauch, Ursprung Deutschland	Abgepackte Ware, REWE
P016	Petersilie, glatt, Ursprung Italien	Abgepackte Ware, REWE
P017	Petersilie, kraus, Ursprung Italien	Abgepackte Ware, REWE
P018	Rucola, Ursprung Italien	Abgepackte Ware, Famila
P019	Mini Roma Rispentomaten, Ursprung Niederlande	Abgepackte Ware, Famila
P020	Cherrytomaten, Ursprung Niederlande	Abgepackte Ware, Famila
P021	Cherrytomaten, Ursprung Belgien	Abgepackte Ware, Famila
P022	Majoran, Ursprung Israel	Abgepackte Ware, Famila
P023	Schnittlauch im Topf, Ursprung Deutschland	Lose Ware, Famila
P024	Petersilie im Topf, Ursprung Deutschland	Lose Ware, Famila
P025	Salatmix, Ursprung Italien	Abgepackte Ware, Famila

Interne Probennummer	Produktbeschreibung	Herkunftsbeschreibung
P026	Oregano, Ursprung Israel	Abgepackte Ware, Famila
P027	Salatmischung, Ursprung unbekannt	Abgepackte Waren, Famila
P028	Wildkräutermischung, Ursprung unbekannt	Abgepackte Ware, Famila
P029	Mini Romanotomaten, Ursprung Spanien	Abgepackte Ware, EDEKA
P030	Gartenkresse, Ursprung Deutschland	Lose Ware, EDEKA
P031	Koriander, Ursprung: Deutschland	Lose Ware, EDEKA
P032	Rosmarin, Ursprung: Deutschland	Lose Ware, EDEKA
P033	Minze, Ursprung: Deutschland	Lose Ware, EDEKA
P034	Feldsalat; Ursprung: Deutschland	Abgepackte Ware, EDEKA
P035	Feldsalat; Ursprung: Deutschland	Abgepackte Ware, EDEKA
P036	Babyspinat; Ursprung: Deutschland	Abgepackte Ware, EDEKA
P037	Rucola, Ursprung: Deutschland	Abgepackte Ware, EDEKA
P038	Rispentomaten: Deutschland	Lose Ware, ALDI
P039	Blattsalat Mix; Ursprung: Unbekannt	Abgepackte Ware, ALDI
P040	Blattsalat Mischung; Ursprung: Unbekannt	Abgepackte Ware, ALDI
P041	Schnittlauch im Topf; Ursprung: Deutschland	Lose Ware, ALDI
P042	Basilikum im Topf; Ursprung: Deutschland	Lose Ware, ALDI
P043	Petersilie im Topf; Ursprung: Deutschland	Lose Ware, ALDI

Interne Probennummer	Produktbeschreibung	Herkunftsbeschreibung
P044	Pflücksalat-Mix, Ursprung: Italien	Abgepackte Ware, Penny
P045	Blattsalat-Mix; Ursprung: Unbekannt	Abgepackte Ware, Penny
P046	Blattsalat-Mix; Ursprung: Unbekannt	Abgepackte Ware, Penny
P047	Feldsalat-Mix; Ursprung: Unbekannt	Abgepackte Ware, Penny
P048	Rohkostsalat-Mix; Ursprung: Unbekannt	Abgepackte Ware, Penny
P049	Feldsalat; Ursprung: Deutschland	Abgepackte Ware, Penny
P050	Rucola; Ursprung: Deutschland	Abgepackte Ware, Penny
P051	Rispen Tomaten; Ursprung: Deutschland	Abgepackte Ware, Penny
Warengruppe diverse weitere Lebensmittel		
D001	Putengulasch, roh	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Mitte; Planprobe
D002	Brie de Nagis (Rohmilchkäse)	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe
D003	Reblochon (Rohmilchkäse)	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe
D004	Nusschnitte	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Mitte; Planprobe
D005	Tiramisu	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe
D006	Marinierte Hähnchenkeule ohne Knochen, roh	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Mitte; Planprobe
D007	Französischer Weichkäse (Rohmilchkäse)	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Bergedorf; Planprobe

Interne Probennummer	Produktbeschreibung	Herkunftsbeschreibung
D008	Putengulasch, roh	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Mitte; Verdachtsprobe
D009	Putenfleisch mit Gewürz	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Mitte; Planprobe
D010	Lammfleisch, roh	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Nord; Verdachtsprobe
D011	Puten-Schaschlik, mariniert	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Verdachtsprobe
D012	Rindergulasch	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Mitte; Verdachtsprobe
D013	Hähnchenleber	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Mitte; Verdachtsprobe
D014	Hähnchenbrust, mariniert	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Wandsbek; Planprobe
D015	Cocktailsoße	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Altona; Verfolgprobe
D016	Rindfleisch, gekocht	Institut für Hygiene und Umwelt (Hamburg); Bezirk Nord; Verdachtsprobe

9.7 *Pseudomonas*-Lebensmittelisolate

Tab. 33 fasst die Lebensmittelisolate der Gattung *Pseudomonas* inkl. ihrer internen Lebensmittelnummer, der Isolatbezeichnung und der mittels MALDI-TOF-MS bestimmten Spezies auf. Zusätzlich ist für jedes Isolat das Nährmedium, von welchem es isoliert wurde, aufgeführt.

Tab. 33: Aus den Lebensmitteln isolierte Stämme, deren Herkunft, Quantifizierung sowie Identifizierung.

Interne Lebensmittelnummer	Quantitative Bestimmung (KbE/g Probe)	Isolatbezeichnung	Dem CFC-Agar zugesetztes Antibiotikum von dem das Isolat stammt	Identifizierung des Isolates mittels MALDI-TOF-MS
Warengruppe Hackfleisch				
H001	160	H001.A	Netilmicin	<i>P. fragi</i>
H002	320	H002.A	Netilmicin	<i>P. fragi</i>
H006	570	H006.A	Imipenem	<i>P. fragi</i>
	800	H006.B	Netilmicin	<i>P. fragi</i>
H008	1030	H008.A	Imipenem	<i>P. koreensis</i>
		H008.B	Imipenem	<i>P. libanensis</i>
H009	480	H009.A	Netilmicin	<i>P. fragi</i>
H010	220	H010.A	Netilmicin	<i>P. fragi</i>
H014	700	H014.A	Imipenem	<i>P. fulva</i>
H015	290	H015.A	Imipenem	<i>P. fulva</i>
H016	655	H016.A	Netilmicin	<i>P. fragi</i>
H019	940	H019.A	Imipenem	<i>P. fragi</i>
H024	10	H024.A	Netilmicin	<i>P. spp.</i>
H027	150	H027.A	Ciprofloxacin	<i>P. fulva</i>
		H027.B	Ciprofloxacin	<i>P. fulva</i>
	3560	H027.C	Netilmicin	<i>P. putida</i>
		H027.D	Netilmicin	<i>P. fulva</i>
H029	4500	H029.A	Imipenem	<i>P. fulva</i>
		H029.B	Imipenem	<i>P. fulva</i>
	80	H029.C	Ciprofloxacin	<i>P. fulva</i>
	1300	H029.D	Netilmicin	<i>P. fulva</i>
H030	800	H030.A	Imipenem	<i>P. fragi</i>
H031	6500	H031.A	Imipenem	<i>P. fulva</i>
H032	3000	H032.A	Imipenem	<i>P. aeruginosa</i>
	65	H032.B	Ciprofloxacin	<i>P. aeruginosa</i>
	800	H032.C	Netilmicin	<i>P. aeruginosa</i>
H033	4020	H033.A	Imipenem	<i>P. fulva</i>
		H033.B	Imipenem	<i>P. fulva</i>
	255	H033.D	Ciprofloxacin	<i>P. fulva</i>

Interne Lebensmittelnummer	Quantitative Bestimmung (KbE/g Probe)	Isolatbezeichnung	Dem CFC-Agar zugesetztes Antibiotikum von dem das Isolat stammt	Identifizierung des Isolates mittels MALDI-TOF-MS
		H033.E	Ciprofloxacin	<i>P. fulva</i>
	3020	H033.F	Netilmicin	<i>P. fulva</i>
H034	45	H034.A	Ciprofloxacin	<i>P. aeruginosa</i>
	2000	H034.B	Netilmicin	<i>P. aeruginosa</i>
		H034.C	Netilmicin	<i>P. aeruginosa</i>
H038	80	H038.A	Netilmicin	<i>P. plecoglossicida</i>
H040	1000	H040.A	Imipenem	<i>P. fragi</i>
H041	8100	H041.A	Imipenem	<i>P. fluorescens</i>
		H041.B	Imipenem	<i>P. gessardii</i>
H043	3000	H043.B	Imipenem	<i>P. fulva</i>
		H043.C	Imipenem	<i>P. fulva</i>
	2050	H043.D	Netilmicin	<i>P. aeruginosa</i>
		H043.E	Netilmicin	<i>P. aeruginosa</i>
		H043.F	Netilmicin	<i>P. aeruginosa</i>
H046	4500	H046.A	Imipenem	<i>P. gessardii</i>
		H046.B	Imipenem	<i>P. gessardii</i>
	700	H046.C	Netilmicin	<i>P. putida</i>
H047	6050	H047.A	Imipenem	<i>P. rhodesiae</i>
		H047.B	Imipenem	<i>P. libanensis</i>
		H047.C	Imipenem	<i>P. fragi</i>
	595	H047.D	Ciprofloxacin	<i>P. fulva</i>
		H047.E	Ciprofloxacin	<i>P. fulva</i>
	650	H047.F	Netilmicin	<i>P. fragi</i>
H049	1300	H049.A	Imipenem	<i>P. fulva</i>
		H049.B	Imipenem	<i>P. fulva</i>
	50	H049.C	Ciprofloxacin	<i>P. fulva</i>
	800	H049.D	Netilmicin	<i>P. fulva</i>
H051	6700	H051.A	Imipenem	<i>P. fulva</i>
		H051.B	Imipenem	<i>P. fulva</i>
		H051.C	Imipenem	<i>P. fulva</i>
		H051.D	Imipenem	<i>P. monteilii</i>

Interne Lebensmittelnummer	Quantitative Bestimmung (KbE/g Probe)	Isolatbezeichnung	Dem CFC-Agar zugesetztes Antibiotikum von dem das Isolat stammt	Identifizierung des Isolates mittels MALDI-TOF-MS
	150	H051.E	Imipenem	<i>P. monteilii</i>
		H051.F	Ciprofloxacin	<i>P. fulva</i>
		H051.G	Ciprofloxacin	<i>P. fulva</i>
	850	H051.H	Netilmicin	<i>P. fulva</i>
		H051.I	Netilmicin	<i>P. fulva</i>
		H051.J	Netilmicin	<i>P. fulva</i>
H052	450	H052.A	Imipenem	<i>P. fragi</i>
H053	1050	H053.A	Imipenem	<i>P. fragi</i>
		H053.B	Imipenem	<i>P. fragi</i>
H055	500	H055.A	Netilmicin	<i>P. fulva</i>
H056	3550	H056.A	Imipenem	<i>P. fulva</i>
		H056.B	Imipenem	<i>P. fulva</i>
		H056.C	Imipenem	<i>P. fulva</i>
		H056.D	Imipenem	<i>P. fulva</i>
		H056.E	Imipenem	<i>P. fulva</i>
	45	H056.F	Ciprofloxacin	<i>P. fulva</i>
	800	H056.G	Netilmicin	<i>P. fulva</i>
H057	4805	H057.A	Imipenem	<i>P. putida</i>
		H057.B*	Imipenem	<i>P. aeruginosa</i>
		H057.C*	Imipenem	<i>P. aeruginosa</i>
	5000	H057.D*	Netilmicin	<i>P. aeruginosa</i>
		H057.E*	Netilmicin	<i>P. aeruginosa</i>
		H057.F*	Netilmicin	<i>P. aeruginosa</i>
H060	450	H060.A	Imipenem	<i>P. fragi</i>
H061	680	H061.A	Imipenem	<i>P. putida</i>
	400	H061.B	Ciprofloxacin	<i>P. fulva</i>
		H061.C	Ciprofloxacin	<i>P. fulva</i>
	1300	H061.D	Netilmicin	<i>P. putida</i>
		H061.E	Netilmicin	<i>P. putida</i>
		H061.F	Netilmicin	<i>P. putida</i>
H062	3800	H062.A	Imipenem	<i>P. lundensis</i>

Interne Lebensmittelnummer	Quantitative Bestimmung (KbE/g Probe)	Isolatbezeichnung	Dem CFC-Agar zugesetztes Antibiotikum von dem das Isolat stammt	Identifizierung des Isolates mittels MALDI-TOF-MS
		H062.B	Imipenem	<i>P. lundensis</i>
		H062.C	Imipenem	<i>P. lundensis</i>
		H062.D	Imipenem	<i>P. lundensis</i>
H064	6300	H064.A	Imipenem	<i>P. putida</i>
		H064.B	Imipenem	<i>P. putida</i>
	550	H064.C	Netilmicin	<i>P. putida</i>
Warengruppe Sahne				
S002	180	S002.A	Imipenem	<i>P. rhodesiae</i>
		S002.B	Imipenem	<i>P. rhodesiae</i>
S004	50	S004.A	Imipenem	<i>P. frederiksbergensis</i>
	48	S004.B	Netilmicin	<i>P. rhodesiae</i>
S005	30	S005.A	Netilmicin	<i>P. monteilii</i>
S007	160	S007.A	Imipenem	<i>P. fulva</i>
S009	70	S009.A	Ciprofloxacin	<i>P. fulva</i>
		S009.B	Ciprofloxacin	<i>P. fulva</i>
	40	S009.C	Netilmicin	<i>P. putida</i>
		S009.D	Netilmicin	<i>P. fulva</i>
S012	200	S012.A	Netilmicin	<i>P. fulva</i>
		S012.B	Netilmicin	<i>P. fulva</i>
S018	560	S018.A	Netilmicin	<i>P. aeruginosa</i>
		S018.B	Netilmicin	<i>P. aeruginosa</i>
S021	30	S021.A	Ciprofloxacin	<i>P. fulva</i>
S022	147	S022.A	Imipenem	<i>P. lundensis</i>
	80	S022.B	Netilmicin	<i>P. lundensis</i>
		S022.C	Netilmicin	<i>P. lundensis</i>
S023	560	S023.A	Imipenem	<i>P. aeruginosa</i>
		S023.B	Imipenem	<i>P. aeruginosa</i>
		S023.C	Imipenem	<i>P. aeruginosa</i>
		S023.D	Imipenem	<i>P. aeruginosa</i>
		S023.E	Imipenem	<i>P. aeruginosa</i>
	45	S023.F	Ciprofloxacin	<i>P. aeruginosa</i>

Interne Lebensmittelnummer	Quantitative Bestimmung (KbE/g Probe)	Isolatbezeichnung	Dem CFC-Agar zugesetztes Antibiotikum von dem das Isolat stammt	Identifizierung des Isolates mittels MALDI-TOF-MS
	350	S023.G	Ciprofloxacin	<i>P. aeruginosa</i>
		S023.H	Netilmicin	<i>P. aeruginosa</i>
		S023.I	Netilmicin	<i>P. aeruginosa</i>
		S023.J	Netilmicin	<i>P. aeruginosa</i>
		S023.K	Netilmicin	<i>P. aeruginosa</i>
Warengruppe Lachs				
L014	65	L014.A	Imipenem	<i>P. koreensis</i>
	49	L014.B	Ciprofloxacin	<i>P. fulva</i>
	60	L014.C	Netilmicin	<i>P. fragi</i>
L015	349	L015.A	Imipenem	<i>P. fulva</i>
		L015.B	Imipenem	<i>P. fulva</i>
	35	L015.C	Ciprofloxacin	<i>P. fulva</i>
	400	L015.D	Netilmicin	<i>P. putida</i>
		L015.E	Netilmicin	<i>P. fulva</i>
L017	255	L017.A	Imipenem	<i>P. fulva</i>
		L017.B	Imipenem	<i>P. fulva</i>
	250	L017.C	Netilmicin	<i>P. fulva</i>
		L017.D	Netilmicin	<i>P. fulva</i>
L018	30	L018.A	Imipenem	<i>P. monteilii</i>
	140	L018.B	Ciprofloxacin	<i>P. putida</i>
	600	L018.C	Netilmicin	<i>P. monteilii</i>
		L018.D	Netilmicin	<i>P. putida</i>
		L018.E	Netilmicin	<i>P. putida</i>
Warengruppe weitere Fischarten				
F009	130	F009.A	Imipenem	<i>P. putida</i>
		F009.B	Imipenem	<i>P. putida</i>
		F009.C	Imipenem	<i>P. putida</i>
	460	F009.D	Ciprofloxacin	<i>P. putida</i>
		F009.E	Ciprofloxacin	<i>P. fulva</i>
		F009.F	Ciprofloxacin	<i>P. putida</i>
		F009.G	Ciprofloxacin	<i>P. fulva</i>

Interne Lebensmittelnummer	Quantitative Bestimmung (KbE/g Probe)	Isolatbezeichnung	Dem CFC-Agar zugesetztes Antibiotikum von dem das Isolat stammt	Identifizierung des Isolates mittels MALDI-TOF-MS
	140	F009.H	Netilmicin	<i>P. fulva</i>
		F009.I	Netilmicin	<i>P. fulva</i>
F010	210	F010.A	Imipenem	<i>P. putida</i>
	80	F010.B	Netilmicin	<i>P. monteilii</i>
F011	25	F011.A	Netilmicin	<i>P. fulva</i>
Warengruppe pflanzliche Lebensmittel				
P002	128	P002.A	Imipenem	<i>P. aeruginosa</i>
	170	P002.B	Ciprofloxacin	<i>P. aeruginosa</i>
P004	25	P004.A	Imipenem	<i>P. oleovorans</i>
P009	200	P009.A	Imipenem	<i>P. fulva</i>
	180	P009.B	Ciprofloxacin	<i>P. fulva</i>
	347	P009.C	Netilmicin	<i>P. fulva</i>
		P009.D	Netilmicin	<i>P. chlororaphis</i>
P011	440	P011.A	Imipenem	<i>P. spp</i>
	360	P011.B	Ciprofloxacin	<i>P. spp</i>
P012	350	P012.A	Imipenem	<i>P. corrugata</i>
		P012.B	Imipenem	<i>P. flavescens</i>
	120	P012.C	Ciprofloxacin	<i>P. flavescens</i>
	75	P012.D	Netilmicin	<i>P. chlororaphis</i>
P022	60	P022.A	Imipenem	<i>P. fluorescens</i>
P024	680	P024.A	Imipenem	<i>P. koreensis</i>
		P024.B	Imipenem	<i>Pseudomonas</i>
	510	P024.C	Ciprofloxacin	<i>P. fulva</i>
	100	P024.D	Netilmicin	<i>P. corrugata</i>
P025	135	P025.A	Ciprofloxacin	<i>P. aeruginosa</i>
P026	260	P026.A	Imipenem	<i>P. flavescens</i>
	100	P026.B	Ciprofloxacin	<i>P. koreensis</i>
	235	P026.C	Netilmicin	<i>P. koreensis</i>
P028	500	P028.A	Imipenem	<i>P. koreensis</i>
	120	P028.B	Ciprofloxacin	<i>P. synxantha</i>
P029	80	P029.A	Imipenem	<i>P. fluorescens</i>

Interne Lebensmittelnummer	Quantitative Bestimmung (KbE/g Probe)	Isolatbezeichnung	Dem CFC-Agar zugesetztes Antibiotikum von dem das Isolat stammt	Identifizierung des Isolates mittels MALDI-TOF-MS
	140	P029.C	Netilmicin	<i>P. corrugata</i>
P030	25	P030.A	Imipenem	<i>P. brassicacearum</i>
P031	105	P031.A	Imipenem	<i>P. koreensis</i>
P032	225	P032.A	Ciprofloxacin	<i>P. putida</i>
P033	360	P033.A	Imipenem	<i>P. corrugata</i>
	50	P033.B	Netilmicin	<i>P. flavescens</i>
P035	48	P035.A	Imipenem	<i>P. koreensis</i>
P037	891	P037.A	Imipenem	<i>P. koreensis</i>
		P037.B	Imipenem	<i>P. koreensis</i>
P041	70	P041.A	Imipenem	<i>P. koreensis</i>
P043	120	P043.A	Netilmicin	<i>P. koreensis</i>
P044	470	P044.A	Imipenem	<i>P. putida</i>
P045	75	P045.A	Imipenem	<i>P. gessardii</i>
P047	150	P047.A	Imipenem	<i>P. corrugata</i>
P049	205	P049.A	Imipenem	<i>P. corrugata</i>
P050	730	P050.A	Imipenem	<i>P. koreensis</i>
Warengruppe diverse weitere Lebensmittel				
D001	60	D001.A	Imipenem	<i>P. fragi</i>
D004	20	D004.A	Imipenem	<i>P. koreensis</i>
	50	D004.B	Netilmicin	<i>P. rhodesiae</i>
D005	45	D005.A	Imipenem	<i>P. chlororaphis</i>
	25	D005.B	Netilmicin	<i>P. koreensis</i>
D006	20	D006.A	Imipenem	<i>P. fulva</i>
	110	D006.B	Ciprofloxacin	<i>P. fulva</i>
		D006.C	Ciprofloxacin	<i>P. guariconensis</i>
	60	D006.D	Netilmicin	<i>P. guariconensis</i>
D009	50	D009.A	Imipenem	<i>P. aeruginosa</i>
	20	D009.B	Netilmicin	<i>P. aeruginosa</i>

Interne Lebensmittelnummer	Quantitative Bestimmung (KbE/g Probe)	Isolatbezeichnung	Dem CFC-Agar zugesetztes Antibiotikum von dem das Isolat stammt	Identifizierung des Isolates mittels MALDI-TOF-MS
D014	150	D014.A	Imipenem	<i>P. putida</i>
		D014.B	Imipenem	<i>P. putida</i>
		D014.C	Imipenem	<i>P. monteilii</i>
	85	D014.D	Netilmicin	<i>P. putida</i>

9.8 Ergebnisse der MHK-Bestimmungen

In Tab. 34 sind die Ergebnisse der MHK-Bestimmungen aufgeführt. Diese umfasst sowohl die Ergebnisse der zur Verfügung gestellten Stammsammlung als auch alle Pseudomonaden-Isolate aus den untersuchten Lebensmitteln. Die Stämme der Spezies *P. aeruginosa* bzw. *P. putida*, welche sequenziert wurden, sind mit einem „*“ gekennzeichnet.

Tab. 34: Ergebnisse der MHK-Bestimmungen der Pseudomonaden-Isolate sortiert nach Spezies.

Isolat	MHK Imipenem [mg/l]	MHK Ciprofloxacin [mg/l]	MHK Netilmicin [mg/l]
<i>P. aeruginosa</i>			
ATCC 27853	8	0,5	8
ATCC 15442	8	0,5	4
NCTC 13437	>256	128	>256
NCTC 13921	>256	128	>256
Stamm 4	>256	0,25	2
Stamm 5	128	2	8
Stamm 6	8	0,5	8
17-L-01034-1-1	16	1	32
18-L-08895-3-1	16	0,5	16
18-L-08895-3-1	8	2	16
LMG1242	8	0,5	16
20-L-01597-1-1*	8	0,5	4
P002.A*	>256	0,5	8
P002.B*	>256	2	16
P025.A*	128	0,5	32
S018.A*	32	0,5	32
S018.B*	32	0,5	32

Isolat	MHK Imipenem [mg/l]	MHK Ciprofloxacin [mg/l]	MHK Netilmicin [mg/l]
H032.A*	16	1	64
H032.B*	16	1	64
H032.C*	16	1	64
H034.A*	32	1	64
H034.B*	8	0,5	16
H034.C*	8	0,5	16
H043.D*	64	0,5	64
H043.E*	16	0,5	64
H043.F*	16	0,5	64
H057.B*	8	0,5	8
H057.C*	8	0,5	8
H057.D*	8	1	8
H057.E*	8	0,5	8
H057.F*	8	0,5	32
D009.A*	62	0,5	32
D009.B*	16	0,5	32
S023.A*	8	0,5	4
S023.B*	8	0,5	4
S023.C*	8	0,5	4
S023.D*	8	0,5	4
S023.E*	8	0,2	4
S023.F*	8	0,5	8
S023.G*	8	0,5	4
S023.H*	8	0,5	8
S023.I*	8	0,5	8
S023.J*	8	0,5	16
S023.K*	8	0,5	16
<i>P. fulva</i>			
<i>fulva</i>	2	1	2
P009.A	1	0,25	1
P009.B	1	1	0,5
P009.C	1	1	1
P024.C	32	0,5	1

Isolat	MHK Imipenem [mg/l]	MHK Ciprofloxacin [mg/l]	MHK Netilmicin [mg/l]
S007.A	4	1	4
S009.A	4	0,5	2
S009.B	4	0,5	2
S009.D	8	0,25	2
S012.A	4	0,25	1
S012.B	2	0,25	1
S021.A	4	0,25	2
L014.B	32	0,5	4
L015.A	32	0,5	4
L015.B	16	0,25	4
L015.C	32	0,5	4
L015.E	16	0,5	2
D006.A	16	0,5	1
D006.B	16	1	1
L017.A	8	0,5	4
L017.B	8	0,5	4
L017.C	8	0,5	2
L017.D	8	0,5	2
F009.E	16	0,25	2
F009.G	16	0,25	2
F009.H	16	0,25	2
F009.I	16	0,25	2
F011.A	8	0,5	2
H014.A	16	0,25	0,5
H015.A	16	0,5	4
H027.A	8	1	4
H027.B	8	1	4
H027.D	8	1	32
H029.A	16	1	8
H029.B	16	1	8
H029.C	16	1	8
H029.D	16	1	8
H031.A	16	1	4

Isolat	MHK Imipenem [mg/l]	MHK Ciprofloxacin [mg/l]	MHK Netilmicin [mg/l]
H033.A	16	1	8
H033.B	16	1	8
H033.D	16	0,5	8
H033.E	16	1	8
H033.F	16	1	8
H043.B	8	0,5	4
H043.C	16	0,5	64
H047.D	>256	0,5	2
H047.E	>256	0,5	2
H049.A	>256	0,25	2
H049.B	>256	0,25	2
H049.C	>256	0,25	2
H049.D	>256	0,25	2
H051.A	>256	0,5	2
H051.B	64	0,5	2
H051.C	64	0,5	2
H051.F	64	0,5	2
H051.G	64	0,5	2
H051.H	128	0,5	4
H051.I	128	1	16
H051.J	128	1	4
H055.A	2	0,25	2
H056.A	8	0,25	16
H056.B	8	0,25	8
H056.C	8	0,25	8
H056.D	8	0,25	8
H056.E	8	0,25	8
H056.F	8	1	8
H056.G	8	0,5	2
H061.B	2	0,5	4
H061.C	2	0,5	2
<i>P. putida</i>			
NPO148	4	0,25	2

Isolat	MHK Imipenem [mg/l]	MHK Ciprofloxacin [mg/l]	MHK Netilmicin [mg/l]
LMG 2257	4	0	4
K14	>256	0,25	2
H027.C	8	0,5	8
H046.C	128	0,25	2
H057.A	8	0,25	2
H061.A	2	0,25	2
H061.D	2	0,25	1
H061.E	2	0,25	2
H061.F	2	0,25	2
H064.A	2	0,25	1
H064.B	2	0,25	1
H064.C	2	0,25	1
S009.C	8	0,25	4
L015.D	32	0,5	4
L018.B	4	0,25	2
L018.D	2	0,5	4
L018.E	2	1	4
F009.A	16	0,25	2
F009.B	16	0,25	2
F009.C	16	0,25	2
F009.D	16	0,25	2
F009.F	16	0,25	2
F010.A	4	0,25	2
D014.A*	64	1	>256
D014.B	2	0,25	1
D014.D	2	0,25	1
P032.A	4	0,25	4
P044.A	16	0,5	4
<i>P. fragi</i>			
H001.A	8	0,25	1
H002.A	8	0,25	1
H006.A	8	0,25	1
H006.B	8	0,25	1

Isolat	MHK Imipenem [mg/l]	MHK Ciprofloxacin [mg/l]	MHK Netilmicin [mg/l]
H009.A	8	0,25	0,5
H010.A	16	0,25	0,5
H016.A	8	0,25	2
H019.A	8	0,25	2
H030.A	4	0,25	1
H040.A	8	0,25	4
H047.C	256	0,5	2
H047.F	16	0,25	1
H052.A	16	0,25	0,5
H053.A	16	0,	1
H053.B	16	5	1
H060.A	4	0,25	4
L014.C	16	0,25	2
D001.A	4	0,25	0,5
<i>P. koreensis</i>			
H008.A	8	0,25	1
L014.A	16	0,25	2
P024.A	2	0,25	0,5
P026.B	64	0,25	4
P026.C	4	0,25	2
P028.A	8	0,25	1
P031.A	4	0,25	4
P035.A	4	0,25	4
P037.A	4	0,25	4
P037.B	4	0,25	4
P041.A	16	0,25	2
P043.A	8	0,25	1
P050.A	8	0,25	1
D004.A	4	0,25	0,5
D005.B	16	0,5	2
<i>P. monteilii</i>			
H051.D	64	0,25	2
H051.E	64	0,25	2

Isolat	MHK Imipenem [mg/l]	MHK Ciprofloxacin [mg/l]	MHK Netilmicin [mg/l]
S005.A	8	0,25	4
L018.A	4	0,5	2
L018.C	2	0,5	2
F010.B	8	0,25	4
D014.C	2	0,5	2
<i>P. lundensis</i>			
H062.A	2	0,25	4
H062.B	2	0,25	4
H062.C	2	0,25	4
H062.D	2	0,25	4
S022.A	1	0,25	1
S022.B	1	0,25	1
S022.C	1	0,25	1
<i>P. corrugata</i>			
P012.A	2	0,25	4
P024.D	32	0,25	1
P029.C	8	0,25	2
P033.A	4	0,25	4
P047.A	32	0,5	16
P049.A	4	0,25	4
<i>P. rhodesiae</i>			
H047.A	16	0,25	2
S002.A	32	0,25	0,25
S002.B	4	0,25	0,5
S004.B	16	0,5	0,25
D004.B	4	0,25	0,5
<i>P. flavescens</i>			
P012.B	2	0,25	4
P012.C	4	0,25	4
P026.A	64	0,25	4
P033.B	2	0,25	2
<i>P. gessardii</i>			
H041.B	8	0,25	1

Isolat	MHK Imipenem [mg/l]	MHK Ciprofloxacin [mg/l]	MHK Netilmicin [mg/l]
H046.A	8	0,25	2
H046.B	8	0,25	2
P045.A	4	0,25	4
<i>P. fluorescens</i>			
ATCC 13525	8	0,5	8
LMG 1794	4	0,25	4
17-L-06238-1-1	4	0,25	2
17-L-06549-2-1	2	0,25	2
17-L-08128-3-1	2	0,25	2
17-L-08580-1-1	2	0,25	2
17-L-08580-2-1	2	0,25	2
17-L-08582-1-1	2	0,25	2
17-L-08880-2-1	2	0,25	2
17-L-10564-1-1	2	0,25	0,5
H041.A	8	0,25	1
P022.A	2	0,5	4
P029.A	2	0,25	1
<i>P. chlororaphis</i>			
P009.D	4	0,25	8
P012.D	8	0,25	4
D005.A	16	0,25	1
<i>P. libanensis</i>			
H008.B	8	0,25	2
H047.B	16	0,25	2
<i>P. guariconensis</i>			
K7b	>256	1	2
D006.C	16	0,5	2
D006.D	4	0,5	8
<i>P. brassicacearum</i>			
P030.A	2	0,25	0,5
<i>P. synxantha</i>			
P028.B	4	0,25	4

Isolat	MHK Imipenem [mg/l]	MHK Ciprofloxacin [mg/l]	MHK Netilmicin [mg/l]
<i>P. frederiksbergensis</i>			
S004.A	4	0,25	0,25
<i>P. oleovorans</i>			
P004.A	>256	0,25	0,5
<i>P. plecoglossicida</i>			
H038.A	8	0,5	2
<i>Pseudomonas</i>			
P024.B	2	0,5	1
<i>P. spp.</i>			
P011.A	1	0,5	0,5
P011.B	1	0,5	0,5
H024.A	8	0,5	2

9.9 Verwendete Software

Tab. 35 listet die für die im Rahmen dieser Arbeit genutzten Software auf.

Tab. 35: Verwendete Software.

Software	Version	Anwendung
ABRicate	1.0.1	Software zur Bestimmung von Resistenzgenen
ABRicate Plasmidfinder	1.0.1	Software zur Bestimmung von Plasmiden
Bakcharak	2.0	Software zur Bestimmung von Resistenzgenen
ChewieSnake	3.0.0	Software zur Erstellung phylogenetischer Stammbäume
IQ-Tree	1.6.12	Software zur Erstellung phylogenetischer Stammbäume
GrapeTree	3.0.0	Software zur Erstellung phylogenetischer Stammbäume
Microsoft Excel® 2019	1808	Software zur statistischen Auswertung
MULTIQC	1.9	Software, welche weitere NGS-Pipelines enthält und Ergebnisse dieser zusammenführt
snippySnake	1.0.0	Software zur Erstellung von Distanzmatrices
QUAST	5.2	Software zur Genomassemblierung

9.10 Zusammenfassung Qualitätsparameter der Sequenzierungen

In den folgenden drei Tabellen sind die Qualitätsparameter für die 34 sequenzierten *Pseudomonas*-Lebensmittelisolate, getrennt nach Sequenziergerät, aufgeführt. Die Zusammenstellung der sequenzierten Daten erfolgte mit Hilfe der Software Quast (Version 5.2).

Tab. 36: Qualitätsparameter der zehn mittels PacBio® sequenzierten *Pseudomonas*-Lebensmittelisolate.

Parameter	P002.A	P025.A	S018.A	S018.B	D009.A	H032.A	H032.B	H034.A	H034.B	H043.D
Genomfraktion (%)	98,336	95,607	95,331	95,331	96,231	67,424	96,231	92,409	95,913	97,291
Vervielfältigungs- verhältnis	1,004	1,002	1,002	1,002	1,006	1,021	1,006	1,007	1,004	1,002
Längstes aligniertes Fragment (bp)	472739	448487	540575	540575	437002	349086	437002	491169	381082	590271
Gesamte alignierte Genomlänge (bp)	6175116	6000207	5971921	5971921	6054140	4298318	6054140	5816980	6019866	655471
NG50 (bp)	2345266	6458410	6833896	6833896	5722231	583156	5722231	4863597	6530302	6173524
NG75 (bp)	2345266	6458410	6833896	6833896	5722231	170289	5722231	4863597	6530302	772237
NA50 (bp)	165287	173084	140163	140163	160096	96604	160096	170289	159178	472610
NA75 (bp)	100660	104729	56217	56217	97961	102640	97961	102262	100604	230647
NGA50 (bp)	211148	186351	152584	152584	170290	102640	170290	170289	169610	123320
NGA75 (bp)	129177	104833	77315	77315	103678	0	103678	102262	104785	230647
LG50 (bp)	2	1	1	1	1	3	1	1	1	1

9. Anhang

Parameter	P002.A	P025.A	S018.A	S018.B	D009.A	H032.A	H032.B	H034.A	H034.B	H043.D
LG75 (bp)	2	1	1	1	1	0	1	1	1	3
LA50 (bp)	11	12	14	14	13	10	13	11	14	6
LA75 (bp)	25	23	32	33	26	19	26	23	27	9
LGA50 (bp)	9	11	12	12	12	16	12	11	13	19
LGA75 (bp)	19	22	24	26	24	0	24	23	25	18
Fehl-Assemblierung (engl.: misassemblies)										
# Fehl-Assemblierung	52	58	65	71	69	6	69	62	63	100
# Relokationen	52	58	65	71	69	6	69	62	63	10
# Translokationen	0	0	0	0	0	30	0	0	0	0
# Inversionen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
# Fehlerhafte Contigs	4	1	1	1	3	0	3	2	2	36
Fehlerhaft assemblierte Contig-Länge (bp)	7115550	6458410	6833896	6833896	6562634	0	6562634	6259398	6548816	5539251
# Lokale Fehl-Assemblierungen	29	45	43	43	45	0	45	39	52	0
# scaffold gap ext. mis.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11

9. Anhang

Parameter	P002.A	P025.A	S018.A	S018.B	D009.A	H032.A	H032.B	H034.A	H034.B	H043.D
# scaffold gap loc. mis.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
# Nicht alignierte fehlerhaft assemblierte Contigs	0	0	0	0	0	5	0	1	0	3
Nicht aligniert (engl.: unaligned)										
Vollständig nicht alignierte Contigs (bp)	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0
Vollständig nicht alignierte Genomlänge (bp)	20438	27681	22925	22925	0	20692	0	8113	0	0
Teilweise nicht alignierte Contigs (bp)	4	1	1	1	2	1411	2	3	2	1
Teilweise nicht alignierte Genomlänge (bp)	928153	455312	851722	851722	501142	2915	501142	497491	515879	0
Nichtübereinstimmungen (engl.: mismatches)										
# Nicht-übereinstimmungen	25544	30027	29780	29780	29462	33.41	29462	27836	29761	11
# Indels	678	717	711	711	840	1333	840	787	870	327920

Parameter	P002.A	P025.A	S018.A	S018.B	D009.A	H032.A	H032.B	H034.A	H034.B	H043.D
Länge Indels (bp)	2239	2839	2564	2564	3065	78	3065	2803	2940	
# Nicht-Übereinstimmungen pro 100 kbp	414,66	501,35	498,67	498,67	488,73	0	488,73	480,85	495,32	250,18
# Indels pro 100 kbp	44937,00	35735,00	33543,00	33543,00	13,93		13,93	13,59	14,48	774
# Indels (<= 5 bp)	590	611	606	606	725	1333	725	679	758	3550
# Indels (> 5 bp)	88	106	105	105	115	78	115	108	112	156
# N's	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20790
# N's pro 100 kbp	0	0	0	0	0	0	0	0	0	651
Statistik ohne Referenz (engl.: statistics without reference)										
# Contigs	5	2	2	2	3	7	3	4	2	4
# Contigs (>= 0 bp)	5	2	2	2	3	7	3	4	2	4
# Contigs (>= 1000 bp)	5	2	2	2	3	7	3	4	2	4
# Contigs (>= 5000 bp)	5	2	2	2	3	7	3	4	2	4
# Contigs (>= 10000 bp)	5	2	2	2	3	7	3	3	2	4
# Contigs (>= 25000 bp)	3	2	1	1	2	7	2	3	1	4

9. Anhang

Parameter	P002.A	P025.A	S018.A	S018.B	D009.A	H032.A	H032.B	H034.A	H034.B	H043.D
# Contigs (>= 50000 bp)	3	1	1	1	2	6	2	3	1	4
Längster Contig (bp)	2751623	6458410	6833896	6833896	5722231	2229912	5722231	4863597	6530302	1273191
Gesamtlänge (bp)	7135988	6486091	6856821	6856821	6562634	4608231	6562634	6335201	6548816	6504867
Gesamtlänge (>= 0 bp)	7135988	6486091	6856821	6856821	6562634	4608231	6562634	6335201	6548816	6511831
Gesamtlänge (>= 1000 bp)	7135988	6486091	6856821	6856821	6562634	4608231	6562634	6335201	6548816	6500227
Gesamtlänge (>= 5000 bp)	7135988	6486091	6856821	6856821	6562634	4608231	6562634	6335201	6548816	6488588
Gesamtlänge (>= 10000 bp)	7135988	6486091	6856821	6856821	6562634	4608231	6562634	6327088	6548816	6483287
Gesamtlänge (>= 25000 bp)	7096496	6486091	6833896	6833896	6551312	4608231	6551312	6327088	6530302	6483287
Gesamtlänge (>= 50000 bp)	7096496	6458410	6833896	6833896	6551312	4582403	6551312	6327088	6530302	6433972
N50 (bp)	2345266	6458410	6833896	6833896	5722231	842215	5722231	4863597	6530302	647210
N75 (bp)	1999607	6458410	6833896	6833896	5722231	583156	5722231	4863597	6530302	300200
L50 (bp)	2	1	1	1	1	2	1	1	1	1
L75 (bp)	3	1	1	1	1	3	1	1	1	1

9. Anhang

Parameter	P002.A	P025.A	S018.A	S018.B	D009.A	H032.A	H032.B	H034.A	H034.B	H043.D
GC (%)	65,69	66,38	66,15	66,15	66,22	66,09	66,22	66,15	66,31	66,84
Ähnlichkeitsstatistik (engl.: similarity statistics)										
# Ähnlich korrekte Contigs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
# Ähnlich nicht-übereinstimmene Blocks	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Abdeckungstiefe (engl.: coverage depth)										
Abdeckung (%)	59,1	100	45,8	81,2	100	100	64,2	100	100	65,4
SNP										
Anzahl SNPs	2278	1	8	6	0	0	5	6	3	4

Tab. 37: Qualitätsparameter für die 24 mittels Illumina MiSeq® sequenzierten Isolate, Teil 1.

Parameter	20-L-1597	D009-B	D014-A	H032-C	H034-C	H043-E	H043-F	H057-B	H057-C	H057-D	H057-E	H057-F
Genomfraktion (%)	95,399	96,247	84,202	95,586	95,604	97,285	97,291	93,101	93,11	93,128	93,125	95,414
Vervielfältigungsverhältnis	1,001	1,003	1,005	1,002	1,002	1,002	1,002	1,001	1,001	1,001	1,001	1,001
Längstes aligniertes Fragment (bp)	421397	654644	168676	352795	350365	655742	655471	697926	697926	697926	697926	421397
Gesamte alignierte Genomlänge (bp)	6080325	6110476	5221939	6093358	6089920	6174970	6173524	6346315	6346700	6347861	6347493	6080812
NG50 (bp)	363116	406919	169791	260950	250515	626504	772237	420934	425508	307617	425508	363116
NG75 (bp)	184384	206146	92148	218692	185560	300200	472610	174789	214777	210812	244320	210429
NA50 (bp)	177725	176386	48879	145235	139411	230647	230647	214777	261958	210812	261958	177129
NA75 (bp)	84574	91222	17422	80078	74013	123320	123320	116749	128528	123231	130625	87994
NGA50 (bp)	177725	195737	48740	154970	145235	230647	230647	214777	214777	210812	242120	177129
NGA75 (bp)	86772	91912	15725	83735	76994	123530	123530	91278	123679	116749	128528	88199
LG50 (bp)	7	6	11	6	7	4	3	6	5	6	5	7
LG75 (bp)	12	11	24	13	14	8	6	13	11	12	11	13
LA50 (bp)	11	11	39	15	16	9	9	10	9	10	9	11
LA75 (bp)	25	23	89	30	33	19	19	20	19	20	18	26

Parameter	20-L-1597	D009-B	D014-A	H032-C	H034-C	H043-E	H043-F	H057-B	H057-C	H057-D	H057-E	H057-F
LGA50 (bp)	11	10	40	14	15	9	9	10	10	10	10	11
LGA75 (bp)	24	22	91	29	31	18	18	21	20	21	19	25
Vollständiger BUSCO (%)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Teilweiser BUSCO (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fehl-Assemblierung (engl.: misassemblies)												
# Fehl-Assemblierung	32	42	125	54	56	34	36	29	28	28	28	31
# Relokationen	32	42	125	54	56	34	36	29	28	28	28	31
# Translokationen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
# Inversionen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
# Fehlerhafte Contigs	14	21	36	17	18	12	11	15	14	15	14	14
Fehlerhaft assemblierte Contig-Länge (bp)	4326983	5368292	4986311	4963888	4966923	5326954	5539251	4861788	5266769	5095255	5267274	4441579
# Lokale Fehl-Assemblierungen	37	73	110	60	59	48	48	33	31	31	31	36

9. Anhang

Parameter	20-L-1597	D009-B	D014-A	H032-C	H034-C	H043-E	H043-F	H057-B	H057-C	H057-D	H057-E	H057-F
# scaffold gap ext. mis.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
# scaffold gap loc. mis.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
# Nicht alignierte fehlerhaft assemblierte Contigs	0	4	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nicht aligniert (engl.: unaligned)												
Vollständig nicht alignierte Contigs (bp)	8	9	2	12	12	0	0	1	1	1	1	6
Vollständig nicht alignierte Genomlänge (bp)	49962	13434	8174	35811	36221	0	0	1329	1329	1329	1329	48484
Teilweise nicht alignierte Contigs (bp)	18	28	39	23	24	12	11	12	11	12	11	15
Teilweise nicht alignierte Genomlänge (bp)	322695	291366	898032	360976	408786	320644	327920	279423	278289	278263	278240	322091

9. Anhang

Parameter	20-L-1597	D009-B	D014-A	H032-C	H034-C	H043-E	H043-F	H057-B	H057-C	H057-D	H057-E	H057-F
Nichtübereinstimmungen (engl.: mismatches)												
# Nicht-übereinstimmungen	26202	33187	52450	29859	29859	24909	25018	6627	6488	6458	6501	26281
# Indels	719	1003	1956	789	789	769	774	316	314	321	317	731
Länge Indels (bp)	2606	4526	10229	2848	2848	3557	3550	1814	1812	1989	1863	2623
# Nicht-Übereinstimmungen pro 100 kbp	431,31	544,34	1008,14	490,81	490,72	404,2	405,95	104,54	102,34	101,85	102,53	432,54
# Indels pro 100 kbp	30987,00	16,45	37,6	35765,00	35765,00	17868,00	20790,00	35886,00	34790,00	45082,00	5,00	44997,00
# Indels (<= 5 bp)	631	877	1700	682	682	646	651	282	280	284	282	643
# Indels (> 5 bp)	88	126	256	107	107	123	123	34	34	37	35	88
# N's	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
# N's pro 100 kbp	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Statistik ohne Referenz (engl.: statistics without reference)												
# Contigs	64	63	94	71	73	35	30	57	51	49	48	63
# Contigs (>= 0 bp)	120	106	225	136	142	64	54	111	113	102	108	129
# Contigs (>= 1000 bp)	44	48	72	48	51	26	22	40	38	40	37	42

Parameter	20-L-1597	D009-B	D014-A	H032-C	H034-C	H043-E	H043-F	H057-B	H057-C	H057-D	H057-E	H057-F
# Contigs (≥ 5000 bp)	33	33	58	32	36	21	17	30	28	28	27	33
# Contigs (≥ 10000 bp)	31	32	55	29	32	20	16	28	27	27	25	31
# Contigs (≥ 25000 bp)	30	29	42	27	29	19	16	28	25	27	23	29
# Contigs (≥ 50000 bp)	24	24	36	25	27	18	15	25	23	23	22	23
Längster Contig (bp)	774124	705800	537389	949443	998078	1152028	1273191	934106	936494	936573	936494	774124
Gesamtlänge (bp)	6456475	6420847	6134412	6492099	6540744	6496670	6504867	6627593	6626821	6627869	6627366	6454677
Gesamtlänge (≥ 0 bp)	6473006	6433112	6169393	6512713	6561858	6505070	6511831	6644445	6646317	6645247	6646194	6473442
Gesamtlänge (≥ 1000 bp)	6442947	6410280	6118985	6476384	6525870	6491505	6500227	6616422	6618382	6621778	6620141	6440537
Gesamtlänge (≥ 5000 bp)	6420781	6374691	6082976	6444221	6501067	6479866	6488588	6595080	6600034	6601093	6603189	6420586
Gesamtlänge (≥ 10000 bp)	6406899	6369413	6063049	6425251	6476179	6474565	6483287	6583054	6592419	6593478	6588932	6409464
Gesamtlänge (≥ 25000 bp)	6390974	6322648	5869700	6388947	6423372	6455589	6483287	6583054	6566722	6593478	6552901	6377292

9. Anhang

Parameter	20-L-1597	D009-B	D014-A	H032-C	H034-C	H043-E	H043-F	H057-B	H057-C	H057-D	H057-E	H057-F
Gesamtlänge (>= 50000 bp)	6179149	6125868	5623659	6301164	6328100	6406274	6433972	6484313	6513850	6458068	6525874	6150919
N50 (bp)	363116	406919	169791	260950	250515	536055	647210	420934	425508	420934	425508	363116
N75 (bp)	179727	178667	94583	218692	185560	300200	300200	214777	214777	210812	244320	210429
L50 (bp)	7	6	11	6	7	5	4	6	5	5	5	7
L75 (bp)	13	12	23	13	14	8	7	12	11	12	11	13
GC (%)	66,39	66,38	61,79	66,27	66,24	66,38	66,37	66,17	66,17	66,17	66,17	66,39
Ähnlichkeitsstatistik (engl.: similarity statistics)												
# Ähnlich korrekte Contigs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
# Ähnlich nicht-übereinstimmene Blocks	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Abdeckungstiefe (engl.: coverage depth)												
Abdeckung (%)	60,4	62,6	58,8	66,8	69,6	58,4	59,4	58,0	53,9	51,8	56,1	61,8
SNP												
Anzahl SNPs	5	17712	16	0	6	5	2	7	0	0	3	8

Tab. 38: Qualitätsparameter für die 24 mittels Illumina MiSeq® sequenzierten Isolate, Teil 2.

Parameter	P002-B	S023-A	S023-B	S023-C	S023-D	S023-E	S023-F	S023-G	S023-H	S023-I	S023-J	S023-K
Genomfraktion (%)	93,113	95,202	95,233	95,177	95,25	95,224	95,228	95,2	95,199	95,222	95,229	95,198
Vervielfältigungsverhältnis	1,001	1,005	1,005	1,005	1,004	1,005	1,005	1,005	1,005	1,005	1,005	1,005
Längstes aligniertes Fragment (bp)	697926	543635	543691	543760	543691	543691	543635	543691	543691	543691	543691	543635
Gesamte alignierte Genomlänge (bp)	6346744	6500289	6502482	6498880	6493312	6501919	6502065	6500160	6500026	6501798	6502459	6500178
NG50 (bp)	420934	777911	705493	258240	758118	632783	639551	639551	507857	717897	639551	574593
NG75 (bp)	214777	211616	541828	201188	462264	260711	416679	292443	209700	416679	210874	215863
NA50 (bp)	260701	210376	234240	170656	234240	210806	233805	210947	209700	234240	210806	207223
NA75 (bp)	128528	101202	106423	90182	115105	94708	101202	101191	101202	106423	101202	100399
NGA50 (bp)	214777	210376	234240	170656	234240	210806	233805	210947	209700	234240	210806	207223
NGA75 (bp)	122751	101202	106423	90182	115056	94708	106423	101191	101202	106423	101202	100399
LG50 (bp)	6	4	5	9	5	5	5	5	5	5	5	5
LG75 (bp)	11	8	7	16	7	9	8	9	10	8	10	10
LA50 (bp)	9	11	11	13	11	11	11	12	12	11	11	12
LA75 (bp)	19	22	21	28	20	23	22	22	23	21	23	25
LGA50 (bp)	10	11	11	13	11	11	11	12	12	11	11	12
LGA75 (bp)	20	22	21	28	21	23	21	22	23	21	23	25
Vollständiger BUSCO (%)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Teilweiser BUSCO (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

9. Anhang

Parameter	P002-B	S023-A	S023-B	S023-C	S023-D	S023-E	S023-F	S023-G	S023-H	S023-I	S023-J	S023-K
Fehl-Assemblierung (engl.: misassemblies)												
# Fehl-Assemblierung	28	38	38	36	36	39	39	37	38	38	37	38
# Relokationen	28	38	38	36	36	39	39	37	38	38	37	38
# Translokationen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
# Inversionen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
# Fehlerhafte Contigs	15	14	13	18	12	16	13	14	15	12	14	15
Fehlerhaft assemblierte Contig-Länge (bp)	5265874	5777862	5602877	4569518	5913198	5725478	5987778	5862190	5796304	5862364	5386832	5863299
# Lokale Fehl-Assemblierungen	31	6	6	6	5	6	6	6	6	6	6	6
# scaffold gap ext. mis.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
# scaffold gap loc. mis.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
# Nicht alignierte fehlerhaft assemblierte Contigs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nicht aligniert (engl.: unaligned)												
Vollständig nicht alignierte Contigs (bp)	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0

9. Anhang

Parameter	P002-B	S023-A	S023-B	S023-C	S023-D	S023-E	S023-F	S023-G	S023-H	S023-I	S023-J	S023-K
Vollständig nicht alignierte Genomlänge (bp)	1329	0	0	29710	0	0	0	0	0	0	0	0
Teilweise nicht alignierte Contigs (bp)	12	8	8	11	6	9	7	10	9	8	9	9
Teilweise nicht alignierte Genomlänge (bp)	278292	305894	305994	275610	212276	306010	305755	306100	305922	305994	306073	305994
Nichtübereinstimmungen (engl.: mismatches)												
# Nicht-übereinstimmungen	6439	2443	2450	2437	1947	2445	2443	2411	2438	2468	2441	2417
# Indels	312	126	128	126	106	127	126	129	126	127	127	127
Länge Indels (bp)	1810	320	324	320	279	321	320	325	320	321	321	323
# Nicht-Übereinstimmungen pro 100 kbp	101,56	37,78	37,88	37,7	30,01	37,81	37,77	37,29	37,71	38,16	37,74	37,38
# Indels pro 100 kbp	33695,00	34700,00	35796,00	34700,00	23377,00	35065,00	34700,00	2,00	34700,00	35065,00	35065,00	35065,00
# Indels (<= 5 bp)	278	116	118	116	97	117	116	119	116	117	117	117
# Indels (> 5 bp)	34	10	10	10	9	10	10	10	10	10	10	10
# N's	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
# N's pro 100 kbp	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Statistik ohne Referenz (engl.: statistics without reference)												
# Contigs	48	36	33	54	31	40	32	37	41	37	42	40
# Contigs (>= 0 bp)	109	74	63	120	60	73	63	78	85	68	72	87

Parameter	P002-B	S023-A	S023-B	S023-C	S023-D	S023-E	S023-F	S023-G	S023-H	S023-I	S023-J	S023-K
# Contigs (≥ 1000 bp)	37	29	26	46	24	30	25	29	31	27	30	30
# Contigs (≥ 5000 bp)	27	26	23	41	21	26	22	26	27	24	27	28
# Contigs (≥ 10000 bp)	26	25	22	39	20	25	21	25	27	23	26	27
# Contigs (≥ 25000 bp)	26	21	20	34	17	22	19	22	24	19	23	23
# Contigs (≥ 50000 bp)	23	19	18	28	15	20	16	19	21	16	21	20
Längster Contig (bp)	936573	1398228	867868	671533	868175	868047	868175	868175	867871	867871	868175	777911
Gesamtlänge (bp)	6626859	6806574	6808905	6804706	6705827	6808331	6808078	6806469	6806371	6808207	6808934	6806447
Gesamtlänge (≥ 0 bp)	6646045	6818029	6817830	6823436	6714336	6818185	6817619	6818910	6819953	6817836	6817961	6820046
Gesamtlänge (≥ 1000 bp)	6619563	6802564	6804690	6799340	6701854	6801891	6803731	6801266	6800089	6801598	6801065	6800428
Gesamtlänge (≥ 5000 bp)	6600381	6797466	6799592	6792653	6697165	6794230	6798633	6796168	6790153	6796500	6795488	6797414
Gesamtlänge (≥ 10000 bp)	6593724	6792149	6794275	6782092	6691848	6788913	6793316	6790851	6790153	6791183	6790171	6792097
Gesamtlänge (≥ 25000 bp)	6593724	6724953	6762875	6686353	6639891	6725548	6754852	6735926	6739382	6724006	6726806	6724866

9. Anhang

Parameter	P002-B	S023-A	S023-B	S023-C	S023-D	S023-E	S023-F	S023-G	S023-H	S023-I	S023-J	S023-K
Gesamtlänge (>= 50000 bp)	6497366	6647749	6685290	6462726	6541182	6626839	6628103	6609177	6612329	6597257	6628097	6598117
N50 (bp)	425508	777911	705493	258240	758118	632783	639551	639551	507857	717897	639551	574593
N75 (bp)	214777	211616	302078	201188	462264	260711	416679	292443	209700	416679	210874	215863
L50 (bp)	5	4	5	9	5	5	5	5	5	5	5	5
L75 (bp)	11	8	8	16	7	9	8	9	10	8	10	10
GC (%)	66,17	66,18	66,18	66,18	66,27	66,18	66,18	66,18	66,19	66,18	66,19	66,19
Ähnlichkeitsstatistik (engl.: similarity statistics)												
# Ähnlich korrekte Contigs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
# Ähnlich nicht- übereinstimmene Blocks	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Abdeckungstiefe (engl.: coverage depth)												
Abdeckung (%)	63,3	57,4	67,8	71,4	60,6	58,1	61,8	58,7	61,0	64,3	57,8	70,7
SNP												
Anzahl SNPs	2243	6	8	5	2	0	6	6	0	7	8	3

10. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Strukturformel von Cefpodoxim nach PubChem, 2022.....	13
Abb. 2: Strukturformel Imipenem nach PubChem, 2022a.....	14
Abb. 3: Strukturformel von Ciprofloxacin nach PubChem, 2022b.....	15
Abb. 4: Strukturformel von Netilmicin nach PubChem, 2022c.....	16
Abb. 5: Schematische Darstellung des Aufbaus eines MALDI-TOF-MS nach Matissek et al., 2020.	24
Abb. 6: Schematische Darstellung der Sequenzierung mittels „SMRT“-Verfahrens nach PacBio®, nach Ardui et al., 2018.	33
Abb. 7: Schematische Darstellung des Verfahrens „Sequence by Synthesis“ nach Illumina®, Illumina, 2017.....	34
Abb. 8: Prozentuale Verteilung der 184 Lebensmittelproben hinsichtlich der Isolation von Pseudomonaden (oben) sowie Aufteilung nach 176 Plan- und acht Anlassproben (unten).....	57
Abb. 9: Anzahl der untersuchten Proben der jeweiligen Lebensmittelkategorie und jeweiliger Anteil der Proben aus denen keine Pseudomonaden, Pseudomonaden und (multi-) resistente Pseudomonaden isoliert wurden.	58
Abb. 10: Verteilung der aus den untersuchten 184 Lebensmittelproben isolierten präsumtiv (multi-)resistenten Pseudomonaden, sortiert nach Spezies.....	59
Abb. 11: Verteilung der aus den 176 untersuchten randomisierten Lebensmittelproben isolierten präsumtiv (multi-)resistenten Pseudomonaden, sortiert nach Spezies.	60
Abb. 12: Anzahl und prozentualer Anteil der 184 Proben aus denen die jeweilige Spezies isoliert wurde.	61
Abb. 13: Anzahl und prozentualer Anteil der 176 randomisierten Proben aus denen die jeweilige Spezies isoliert wurde.	61
Abb. 14: Anzahl und prozentualer Anteil der 64 untersuchten Hackfleischproben aus denen die jeweilige Spezies der Gattung <i>Pseudomonas</i> isoliert wurde.	62
Abb. 15: Anzahl und prozentualer Anteil der 23 Sahneprouben aus denen die jeweilige Spezies der Gattung <i>Pseudomonas</i> isoliert wurde.....	63
Abb. 16: Anzahl und prozentualer Anteil der 22 randomisierten Sahneprouben aus denen die jeweilige Spezies der Gattung <i>Pseudomonas</i> isoliert wurde.	64
Abb. 17: Anzahl und prozentualer Anteil der 19 Lachsproben aus denen die jeweilige Spezies der Gattung <i>Pseudomonas</i> isoliert wurde.....	65
Abb. 18: Anzahl und prozentualer Anteil der elf Fischproben aus denen die jeweilige Spezies der Gattung <i>Pseudomonas</i> isoliert wurde.....	66
Abb. 19: Anzahl und prozentualer Anteil der 51 untersuchten pflanzlichen Lebensmittel aus denen die jeweilige Spezies isoliert wurde.	67
Abb. 20: Anzahl und prozentuale Verteilung der 16 untersuchten Proben der Warengruppe „diverse weitere Lebensmittel“ aus denen die jeweilige Spezies isoliert wurde.	68
Abb. 21: Anzahl und prozentuale Verteilung der neun untersuchten randomisierten Proben der Warengruppe „diverse weitere Lebensmittel“ aus denen die jeweilige Spezies isoliert wurde.	68
Abb. 22: Prozentuale Verteilung der 93 isolierten präsumtiv (multi-)resistenten Pseudomonaden aus den untersuchten 35 Hackfleischproben.....	70
Abb. 23: Bestimmte Pseudomonaden-Keimgehalte und Anzahl Proben je Nährmedium für die untersuchten 64 Hackfleischproben.	71
Abb. 24: Prozentuale Verteilung der 26 isolierten präsumtiv (multi-)resistenten Pseudomonaden aus den untersuchten neun Sahneprouben.....	72
Abb. 25: Prozentuale Verteilung der 15 isolierten präsumtiv (multi-)resistenten Pseudomonaden aus den untersuchten acht randomisierten Sahneprouben.	72

Abb. 26: Anzahl der Proben und ihre bestimmten Pseudomonaden-Keimgehalte je Nährmedium für die untersuchten 23 Sahneprobe...	74
Abb. 27: Anzahl der Proben und ihre bestimmten Pseudomonaden-Keimgehalte je Nährmedium für die untersuchten 22 randomisierten Sahneprobe...	74
Abb. 28: Prozentuale Verteilung der 17 isolierten präsumtiv (multi-)resistenten Pseudomonaden aus den untersuchten 19 Lachsproben...	75
Abb. 29: Anzahl der Proben und ihre bestimmten Pseudomonaden-Keimgehalte je Nährmedium für die 19 untersuchten Lachsproben...	76
Abb. 30: Prozentuale Verteilung der zwölf isolierten präsumtiv (multi-)resistenten Pseudomonaden aus den untersuchten elf weiteren Fischproben...	77
Abb. 31: Anzahl der Proben und ihre jeweils bestimmten Pseudomonaden-Keimgehalte je Nährmedium für die elf untersuchten Proben der Lebensmittelkategorie „weitere Fischproben“...	78
Abb. 32: Prozentuale Verteilung der 40 isolierten präsumtiv (multi-)resistenten Pseudomonaden aus den untersuchten 51 Proben der Warengruppe „pflanzliche Lebensmittel“...	79
Abb. 33: Anzahl der Proben und ihre jeweils bestimmten Pseudomonaden-Keimgehalte je Nährmedium für die 51 pflanzlichen Lebensmittelproben...	80
Abb. 34: Prozentuale Verteilung der 15 isolierten präsumtiv (multi-)resistenten Pseudomonaden aus den untersuchten sechs Proben der Warengruppe „diverse weitere Lebensmittel“...	81
Abb. 35: Anzahl der Proben und ihre jeweils bestimmten Pseudomonaden-Keimgehalte je Nährmedium für die 16 Proben der Lebensmittelkategorie „diverse weitere Lebensmittel“...	82
Abb. 36: Anzahl der Proben und ihre jeweils bestimmten Pseudomonaden-Keimgehalte je Nährmedium für die randomisierten neun Proben der Lebensmittelkategorie „diverse weitere Lebensmittel“...	82
Abb. 37: Prozentuale Verteilung von β -Laktamasengenenen der 33 <i>P. aeruginosa</i> -Lebensmittelisolate in sieben MLST-Sequenztypen...	96
Abb. 38: Phylogenetischer Stammbaum der mittels Illumina MiSeq® sequenzierten <i>Pseudomonas</i> -Isolate auf Basis des cgMLST (Auswertung mittels ChewieSnake/ GrapeTree, Version 3.0.0; die Alleldifferenzen sind in rot dargestellt)...	101
Abb. 39: Phylogenetischer Stammbaum der mittels Illumina MiSeq® sequenzierten Isolate auf Basis des cgMLST, andere Darstellung zu Abb. 38 (Auswertung mittels Chewiesnake/ GrapeTree, Version 3.0.0; die Alleldifferenzen sind in rot dargestellt)...	102
Abb. 40: Allel-Distanzmatrix der mittels Illumina MiSeq® sequenzierten Isolate (Auswertung mittels ChewieSnake, Version 3.0.0)...	103
Abb. 41: Phylogenetischer Stammbaum der mittels Illumina MiSeq® sequenzierten Isolate auf Basis der SNPs (Auswertung mittels IQ-Tree, Version 1.6.12; der abgebildete Maßstab gibt die Nukleotidaustauschraten an)...	104
Abb. 42: SNP-Distanzmatrix für die mittels Illumina MiSeq® sequenzierten Isolate (Auswertung mittels snippySnake, Version 1.0.0)...	105

11. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: In <i>P. aeruginosa</i> charakterisierte Efflux-Systeme nach Pang et al., 2019.	11
Tab. 2: Enzymgruppen und antibiotische Substanzen gegenüber derer sie wirksam sind nach Witte et Mielke (2003), Moore et Flaws (2011), Laudy et al. (2017) und Pang et al. (2019).	12
Tab. 3: Auswerteschema des Vierfeldertests nach SAS, 2017.	18
Tab. 4: Bewertung des Konkordanzindex Kappa nach SAS, 2017.	21
Tab. 5: Arten der Wärmebehandlung von Sahne (Eigene Darstellung; Anlehnung an Krämer, 2017).	26
Tab. 6: Ergebnisse des Vergleichs des Verfahrens nach DIN EN ISO 13720:2010-12 und der zu validierenden Methode.	42
Tab. 7: Inklusivität des Zählverfahrens präsumtiv resistenter Pseudomonaden.	44
Tab. 8: Exklusivität des Zählverfahrens präsumtiv resistenter Pseudomonaden.	46
Tab. 9: Ergebnisse der Bestimmung der Selektivität.	50
Tab. 10: Ergebnisse der Bestimmung der Produktivität durch Vergleich der Koloniezahlen der Pseudomonaden auf Selektivnährböden mit TSA.	51
Tab. 11: Koloniezahlbestimmung von Pseudomonaden auf TSA in Abhängigkeit von der Lebensmittelmatrix.	53
Tab. 12: eLOD ₅₀ in KbE/25 g Probe von resistenten Pseudomonaden im selektiven Nachweisverfahren.	54
Tab. 13: Anzahl der jeweiligen Spezies im Hinblick auf das Nährmedium von welchem sie aus den Hackfleischproben isoliert wurden.	70
Tab. 14: Anzahl der jeweiligen Spezies im Hinblick auf die Nährmedien von welchen sie aus den Sahneproben isoliert wurden.	73
Tab. 15: Anzahl der jeweiligen Spezies im Hinblick auf die Nährmedien von welchen sie aus den Lachsproben isoliert wurden.	75
Tab. 16: Anzahl der jeweiligen Spezies im Hinblick auf die Nährmedien von welchen sie gewonnen wurden.	77
Tab. 17: Anzahl der jeweils isolierten Spezies aus der Lebensmittelkategorie „pflanzliche Lebensmittel“ im Hinblick auf die Nährmedien von welchen sie gewonnen wurden.	79
Tab. 18: Anzahl der jeweils isolierten Spezies der pflanzlichen Lebensmittelproben in Bezug auf die Nährmedien von welchen sie gewonnen wurden.	81
Tab. 19: Minimale Hemmkonzentration der aus den Lebensmittelproben isolierten resistenten <i>Pseudomonas</i> -Stämme.	84
Tab. 20: Nachgewiesene Resistenzgene von zehn <i>P. aeruginosa</i> -Lebensmittelisolaten nach Sequenzierung mittels PacBio®.	88
Tab. 21: Nachgewiesene Resistenzgene von 24 <i>P. aeruginosa</i> -Lebensmittelisolaten nach Sequenzierung mittels Illumina MiSeq®.	89
Tab. 22: Vergleich der phänotypischen und genotypischen Resistenzen der analysierten <i>P. aeruginosa</i> -Lebensmittelisolate.	93
Tab. 23: Ergebnisse des MLST für 33 <i>P. aeruginosa</i> -Lebensmittelisolate.	98
Tab. 24: Minimale Hemmkonzentrationen der <i>P. fluorescens</i> -Isolate aus den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Lebensmitteln.	120
Tab. 25: Vergleich der ST der eigenen analysierten Isolate mit den bekannten Daten in PubMLST, nach PubMLST, 2022.	130
Tab. 26: Liste der verwendeten Antibiotika und Chemikalien nach GESTIS Stoffdatenbank, 2022.	154
Tab. 27: Verwendete Geräte.	155

Tab. 28: Verwendete Verbrauchsmaterialien.	155
Tab. 29: Verwendete Nährmedien und Reagenzien.	156
Tab. 30: Zusammensetzung und Herstellung der verwendeten Nährmedien.	157
Tab. 31: Pseudomonadenstammsammlung.	159
Tab. 32: Liste der analysierten Lebensmittel.	160
Tab. 33: Aus den Lebensmitteln isolierte Stämme, deren Herkunft, Quantifizierung sowie Identifizierung.	173
Tab. 34: Ergebnisse der MHK-Bestimmungen der Pseudomonaden-Isolate sortiert nach Spezies.	180
Tab. 35: Verwendete Software.	189
Tab. 36: Qualitätsparameter der zehn mittels PacBio® sequenzierten <i>Pseudomonas</i> -Lebensmittelisolate.	190
Tab. 37: Qualitätsparameter für die 24 mittels Illumina MiSeq® sequenzierten Isolate, Teil 1. ...	196
Tab. 38: Qualitätsparameter für die 24 mittels Illumina MiSeq® sequenzierten Isolate, Teil 2. ...	202

12. Danksagung

Ohne die Mitarbeit und Unterstützung einiger Personen wäre die vorliegende Arbeit nicht zu dem geworden, was sie schlussendlich ist. Dafür möchte ich an dieser Stelle „Danke“ sagen.

Zunächst möchte ich Herrn Dr. Anselm Lehmacher danken. Ohne ihn und die Idee diese Promotion begleitend zur Arbeit im Institut für Hygiene und Umwelt durchzuführen wäre es nicht einmal zur Durchführung des ersten Laborversuchs dieser Dissertation gekommen. Lieber Anselm, ich danke dir für die Idee zum Thema dieser Arbeit, für die Weitergabe deines fachlichen Wissens sowie deine stetige Unterstützung bei allen Schritten dieser Promotion.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Peter Heisig möchte ich für die wissenschaftliche Betreuung während meiner Promotionszeit und die Möglichkeit meine praktischen Arbeiten „von außerhalb“ anzufertigen danken.

Ich danke zudem den Mitgliedern der Prüfungskommission für die Begutachtung dieser Dissertation sowie Teilnahme an meiner Disputation.

Ein großer Dank gebührt Dr. Christian Schäfers und Anne Reichstein aus der NGS-Arbeitsgruppe des Instituts für Hygiene und Umwelt für das Messen meiner Proben und die Bereitschaft mir bei all meinen Fragen und Problemen hilfreich zur Seite zu stehen.

Auch den Herren Dr. Christian Cutpatel und Prof. Dr. Stephan Niemann des Forschungszentrums Borstel in Schleswig-Holstein möchte ich für die Kooperation in Sachen NGS danken. Vielen Dank, dass ein Teil meiner Proben in eurem Haus gemessen werden konnte.

„Meinem HU233- Team“, bestehend aus Claudia Brandt, Brigitte „Gitti“ Hansen, Niclas Kupfer, Sascha Trociewicz und Stientje Pröll, möchte ich für die große Anteilnahme und das Interesse an den Ergebnissen meiner „Pseudis“ danken.

Meiner Familie und insbesondere meinen Eltern gilt der größte Dank! Ihr wart eine enorme Stütze während meines Studiums und auch allen Phasen meiner Promotionszeit. Schlussendlich habt ihr mir vor allem durch das „Rückenfreihalten“ in manch stressiger Zeit ermöglicht überhaupt so weit zu kommen und meine beruflichen Träume zu erfüllen. Euch verdanke ich so viel!

Dir, Sebastian, möchte ich ebenfalls danken. Dein Anteil an dieser Arbeit geht weit über das Korrekturlesen und die Weitergabe von Excel-Tricks hinaus. Danke, dass du immer dafür sorgst, dass meine Teetasse voll ist- und das auch im übertragenen Sinne. Es ist schön, dich an meiner Seite zu wissen.

Auf geht's in ein neues Kapitel im *HHH*!

13. Eidesstaatliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt zu haben. Ich versichere, dass das in elektronischer Form eingereichte Dissertationsexemplar und die gedruckten gebundenen Exemplare der Dissertationsschrift identisch sind. Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.

Hamburg, 29.11.2023

Ort, Datum

Unterschrift