

Aus dem Institut für Tier- und Umwelthygiene
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Langzeituntersuchung zum Vorkommen und zur Transmission von ESBL/AmpC-
produzierenden *Escherichia coli* in Hähnchenmastbetrieben**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Henriette Laube
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2015

Journal-Nr.: 3827

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler
Zweiter Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Thomas Alter
Dritter Gutachter:	PD Dr. Annemarie Käsbohrer

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus): broilers; Escherichia coli; extended spectrum beta-lactamases; animal husbandry; epidemiology; public health; drug resistance; MALDI-TOF; polymerase chain reaction; pulsed field electrophoresis; drug resistance, microbial (MeSH)

Tag der Promotion: 12.02.2016

Für Opa Günther und Oma Gretel

1.	LITERATURÜBERSICHT	1
1.1	Beta-Laktamasen.....	1
1.2	Extended-Spectrum-Beta-Laktamasen (ESBL).....	4
1.3	TEM.....	5
1.4	SHV	5
1.5	CTX-M	6
1.6	AmpC Beta-Laktamasen	8
1.7	Vorkommen ESBL/AmpC-produzierender <i>E. coli</i> beim Masthähnchen	9
1.8	Vorkommen ESBL/AmpC produzierender <i>E. coli</i> bei Haustieren, Schweinen und Rindern.....	11
1.9	Transmission ESBL/AmpC-produzierender <i>E. coli</i> zwischen Mensch und Tier/Geflügel	13
1.10	ESBL/AmpC-Produzierende <i>E. coli</i> in der Umwelt.....	14
1.10.1	Fäkale Emission aus Tierställen	14
1.10.2	Fäkale Emission von ESBL aus Kläranlagen	15
1.10.3	Aerogene Emission aus Tierställen und das Überleben der Bakterien in der Umwelt	16
1.10.4	Aerogene Emission der ESBLs/AmpCs aus Kläranlagen	17
2	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	19
2.1	LONGITUDINAL MONITORING OF ESBL/AMPC-PRODUCING ESCHERICHIA COLI IN GERMAN BROILER CHICKEN FATTENING FARMS	19
2.2	TRANSMISSION OF ESBL/AMPC-PRODUCING ESCHERICHIA COLI FROM BROILER CHICKEN FARMS TO SURROUNDING AREAS	27
3	DISKUSSION.....	37
3.1	Vorkommen ESBL/AmpC-produzierender <i>E. coli</i> in Masthähnchenbetrieben	37
3.2	Nachweis der ESBL/AmpC-produzierenden <i>E. coli</i> in gesunden Einzeltieren	38
3.2.1	Vorkommen und Verbreitung von ESBL/AmpC-produzierender <i>E. coli</i> innerhalb des Tierstalles	39
3.2.2	Nachweis ESBL/AmpC-produzierender <i>E. coli</i> in der Stallluft.....	40
3.3	Besiedlungsdynamik ESBL/AmpC-produzierender <i>E. coli</i> in Masthähnchenbetrieben	41
3.4	Transmission ESBL/AmpC-produzierender <i>E. coli</i>	43
3.4.1	Fäkale Emission	43
3.4.2	Aerogene Emission	45
4	ZUSAMMENFASSUNG	47
5	SUMMARY	49
6	LITERATURVERZEICHNIS	51

7	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	65
8	DANKSAGUNG	67
9	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....	69

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1 Übersichtsschema zur molekularen Einteilung von Beta-Laktamasen nach Ambler..... 1

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1 Funktionale und molekulare Charakterisierung von Beta-Laktamasen..... 3
Tabelle 2 Einteilung der CTX-M Enzyme in 5 Hauptgruppen und dazugehörige Genvarianten
..... 7

VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

AmpC	Ampicillinase C-Beta-Laktamase
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
CMY	Cephamycinase
CTX-M	Cefotaximase
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ESBL	Extended-Spectrum-Beta-Laktamasen
et al.	<i>et alii</i>
IRT	Inhibitor-resistente TEM
OXA	Oxacillinase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
MALDI TOF	Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation Time-of-flight
SHV	Sulphydryl variabelle
Spp.	Spezies
TEM	Temoniera

1. LITERATURÜBERSICHT

1.1 BETA-LAKTAMASEN

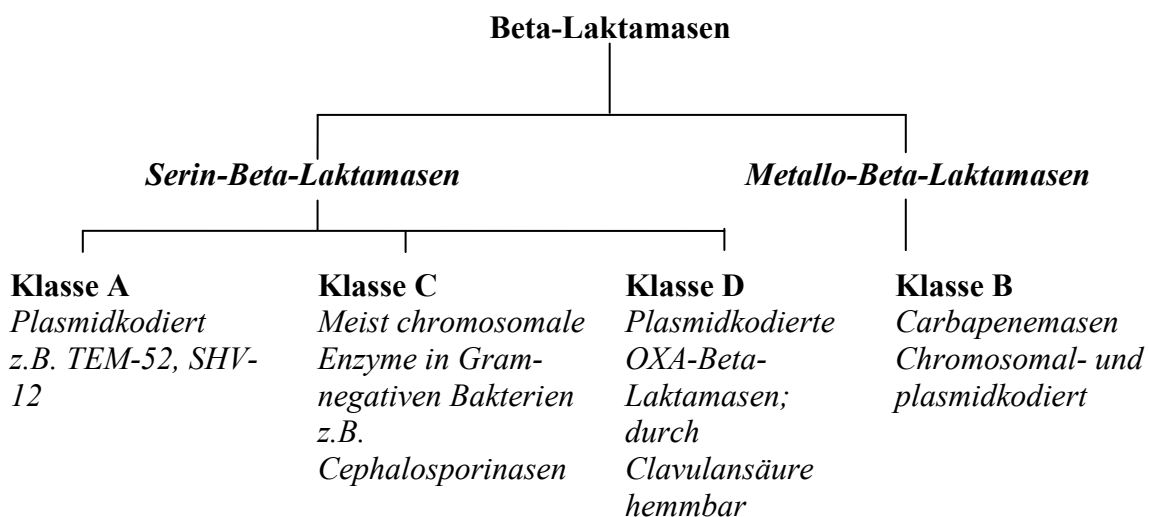
Antibiotikaresistenzen stellen weltweit sowohl in der Human- als auch der Veterinärmedizin zunehmend ein großes Problem dar. Bei der Resistenzentwicklung von *Enterobacteriaceae* gegen Beta-Laktam Antibiotika spielen die Plasmid-vermittelten Beta-Laktamasen eine große Rolle. Die Produktion von Beta-Laktamasen als Beta-Laktam-Ring spaltende Hydrolasen und die damit verbundene enzymatische Inaktivierung von Beta-Laktam-Antibiotika ist einer der am weitesten verbreiteten Resistenzmechanismen bei Bakterien.

Im Allgemeinen lassen sich Beta-Laktamasen sowohl nach molekularen als auch nach funktionellen Kriterien einteilen.

Eine erste Einteilung der Beta-Laktamasen erfolgte im Jahr 1980 durch Ambler (Ambler, 1980). Er teilte die Enzyme nach ihrer molekularen Struktur in vier Klassen ein. Übergeordnet lassen sich zwei molekulare Typen unterscheiden. Zum einen gibt es die Serin Beta-Laktamasen und zum anderen die Metallo-Beta-Laktamasen.

Anfangs standen der Klasse A (Penicillinasen), den Serin Beta Laktamasen, die Klasse B, Metallo Beta Laktamasen, die ein Zink-Atom besitzen, gegenüber (Ambler, 1980). Die Klasse C, gehört zu den Serin-Beta-Laktamasen (Cephalosporinasen) und wurde erst im Jahr 1981 beschrieben (Jaurin and Grundstrom, 1981). Außerdem wurde in den späten 1980er Jahren die Klasse D, ebenfalls Serin-Beta-Laktamasen, als eigene Gruppe der Oxacillin hydrolysierenden Enzyme separiert (Abbildung 1) (Huovinen et al., 1988; Ouellette et al., 1987).

Abbildung 1 Übersichtsschema zur molekularen Einteilung von Beta-Laktamasen nach Ambler



Im Jahre 1995 etablierten Bush, Jacoby und Medeiros die Einteilung der Beta-Laktamasen nach funktionellen Kriterien und Substratprofilen (Bush et al., 1995; Dhillon and Clark, 2012) (Tabelle 1). Die Enzyme werden hier in 4 Funktionsgruppen unterteilt.

Gruppe 1 (Ambler Klasse C) bezeichnet die Cephalosporinasen, welche nicht durch Clavulansäure gehemmt werden. Dazu gehören beispielsweise die AmpC-Beta-Laktamasen, ursprünglich chromosomale Enzyme, die aber auch Plasmid-kodiert vorliegen können.

Die größte Gruppe, Gruppe 2 (Ambler Klasse A und D), beschreibt die Breitspektrum-Beta-Laktamasen, welche durch Clavulansäure gehemmt werden.

Zur Gruppe 3 (Ambler Klasse B) gehören die Metallo-Beta-Laktamasen. Sie vermitteln Resistenzen gegen Carbapeneme sowie alle Beta-Laktame mit Ausnahme von Monobaktamen. Gruppe 3 Beta-Laktamasen können nicht mit Clavulansäure jedoch mit Ethylendiaminetraacetat (EDTA) gehemmt werden.

Gruppe 4 beinhaltet alle übrigen, nicht durch Clavulansäure inhibierbaren Penicillinasen (Bush et al., 1995).

Tabelle 1 Funktionale und molekulare Charakterisierung von Beta-Laktamasen

Funktionelle Gruppe	Hauptuntergruppe	Molekulare Klasse nach Ambler	Eigenschaften von Beta-Laktamasen
1		C	Meist chromosomale Enzyme in Gram-negativen Bakterien, zum Teil auch Plasmid-vermittelt. Vermitteln Resistenzen gegen alle Beta-Laktam-Antibiotika außer Carbapenemen. Nicht durch Clavulansäure inhibierbar.
2	2a	A, D	Die meisten Enzyme werden durch Clavulansäure gehemmt. Enthalten Staphylokokken und Enterokokken Penicillinasen. Häufig hohe Resistenz gegen Penicilline.
	2b	A	Breitspektrum-Beta-Laktamasen, einschließlich TEM-1 und SHV-1, vor allem aus gram-negativen Bakterien
	2be	A	Extended-Spectrum Beta-Laktamasen (ESBL) Resistenzen gegenüber Oxyimino-Cephalosporinen und Monobactamen.
	2br	A	Inhibitor-resistente TEM(IRT) Beta-Laktamasen und ein Inhibitor-resistentes SHV-Derivat
	2c	A	Carbenicillin-hydrolysierende Enzyme
	2d	A	Cloxacillin-hydrolysierende Enzyme. Nur schwach inhibierbar mit Clavulansäure
	2e	A	Cephalosporinasen, durch Clavulansäure inhibierbar
	2f	A	Carbapenem-hydrolysierende Enzyme mit Serin im aktiven Zentrum, durch Clavulansäure inhibierbar
3	3a, 3b, 3c	B	Metallo-Beta-Laktamasen; Vermitteln Resistenz gegen Carbapeneme und alle Beta-Lactam-Klassen, außer Monobaktamen. Nicht durch Clavulansäure inhibierbar.
4		?*	Sonstiges nicht sequenzierte Enzyme, die nicht in die anderen Gruppen passen.

Tabelle 1 wurde von Bush 2001 übernommen und ins Deutsche übersetzt.

*unbekannt

(Bush, 2001)

1.2 EXTENDED-SPECTRUM-BETA-LAKTAMASEN (ESBL)

Schon lange steht die Weiterentwicklung und therapeutische Anwendung neuer Antibiotika in Konkurrenz zur Entstehung und Verbreitung neuer Resistenzen. In der aktuellen Literatur werden vermehrt Extended-Spectrum-Beta-Laktamasen (ESBL) sowie Plasmid-kodierte AmpC-Beta-Laktamasen (AmpCs) in Enterobacteriaceae, vor allem bei *E. coli*, beschrieben. Diese Enzyme mit erweitertem Wirkspektrum gegen Beta-Laktam-Antibiotika neuerer Generationen sollen im Folgenden genauer beschrieben werden. Wie auch massenmedial berichtet, sind Extended-Spectrum-Beta-Laktamasen sowie Plasmid-vermittelte AmpC-Beta-Laktamasen weit verbreitet. Die Enzyme werden in der Humanmedizin bei klinischen Isolaten, wie beispielsweise bei Harnwegsinfektionen isoliert. Aber auch klinisch gesunde Menschen können Träger der ESBLs und AmpCs sein. Ebenso verhält es sich in der Veterinärmedizin. Dabei konnten sowohl Haustiere als auch Lebensmittel liefernde Tiere als potentiell Reservoir für die resistenten Bakterien identifiziert werden. Ubiquitär können in der Primärproduktion der Lebensmittelkette ESBL/AmpC-produzierende *Enterobacteriaceae*, überwiegend *E. coli*, nachgewiesen werden.

Per definitionem sind ESBLs sekundär erworbene, Plasmid-vermittelte Enzyme, welche Resistenzen, zumindest aber verminderte Empfindlichkeit gegenüber Penicillinen, Oxyimino-Cephalosporinen sowie Monobactamen, durch Hydrolyse des Beta-Laktam-Ringes verursachen. Als charakteristisches Merkmal der ESBLs wird in älteren Definitionen auch deren Hemmbarkeit durch typische Inhibitoren wie Clavulansäure oder Sulbactam angegeben. (Bush et al., 1995; Paterson and Bonomo, 2005; Sturenburg and Mack, 2003). Durch die Lokalisation der Resistenzgene auf Plasmiden ist eine Übertragung der Resistenz zwischen Bakterien einer Spezies und sogar zwischen verschiedenen Bakterienspezies durch horizontalen Gentransfer möglich (Pfeifer et al., 2010).

Bei frühen ESBL-Formen handelt es sich hauptsächlich um durch Punktmutationen entstandene Derivate der TEM-1 und SHV-1 Beta-Laktamasen (Bush et al., 1995, Bradford, 2001, Jacoby et al. 1991). Inzwischen wurde eine große Anzahl an verschiedenen ESBLs beschrieben. Einen guten Überblick über alle bekannten Beta-Laktamase-Typen bieten die Datenbanken <http://www.lahey.org> und <http://www.pasteur.fr>.

Gegenwärtig stellen sowohl in der Human- als auch der Veterinärmedizin die CTX-M-Beta-Laktamasen den verbreitetsten und stetig ansteigenden ESBL-Typ dar (Canton et al., 2008; Dierikx et al., 2010; Pitout and Laupland, 2008; Platell et al., 2011a; Platell et al., 2011b). Bezugnehmend auf Abbildung 1 sowie Tabelle 1 gehören die meisten ESBLs zur Ambler Klasse A und nach Bush-Jacoby-Medeiros zur Gruppe 2be. Die CTX-M-Beta-Laktamasen wurden ursprünglich zwar nicht in diesem Schema beachtet, erfüllen aber dennoch die Kriterien der Gruppe 2be (Dhillon and Clark, 2012). Neben der Übertragbarkeit von Resistenzen gegenüber Oxyiminocephalosporinen zeichnen sich ESBLs dadurch aus, dass sie häufig einen multiresistenten Phänotyp exprimieren. Dies führt zu einer dramatischen Limitierung der therapeutischen Möglichkeiten sowohl in der Human- als auch der Veterinärmedizin. (Costa et al., 2009; Dierikx et al., 2010; Pitout and Laupland, 2008). Zusätzlich verschlechtern Plasmid-vermittelte AmpC-Beta-Laktamasen (155 verschiedene AmpC-Beta-Laktamasen) und Carbapenemasen die Situation (Ewers et al., 2012). Obwohl beispielsweise Carbapeneme zur Behandlung Lebensmittelliefernder Tiere, im speziellen Masthähnchen, nicht zugelassen sind und nach den Antibiotika Leitlinien der deutschen Tierärzteschaft nicht angewendet werden dürfen, konnten in Deutschland VIM-1 Carbapenemase positive *Salmonellen* und *E. coli* aus Masthähnchenställen und Schweinemastställen isoliert werden (Fischer et al., 2012a, b). Da wie in den vorherigen

Kapiteln beschrieben, sowohl beim Menschen als auch beim Tier sehr häufig die ESBL Genvarianten TEM, SHV, CTX-M sowie die Plasmid-vermittelte AmpC-Beta-Laktamase CMY in der Literatur beschrieben sind, sollen diese Typen im Folgenden genauer besprochen werden.

1.3 TEM

In den 60-iger Jahren wurde die erste Plasmid-vermittelte Beta-Laktamase, TEM-1, in *Enterobacteriaceae* beschrieben (Datta and Kontomichalou, 1965). Die Bezeichnung TEM resultiert aus der Entdeckung des TEM-1-Enzymes in einem *E. coli* Isolat aus einer Blutkultur eines griechischen Patienten mit Namen Temoniera (Medeiros, 1984). Innerhalb weniger Jahre nach der ersten Isolierung wurde die TEM-1 Beta-Laktamase weltweit beschrieben. Heute gehört sie mit zu den am häufigsten anzutreffenden Resistenzmechanismen gegen Beta-Laktam-Antibiotika in gram-negativen Bakterien (Sturenburg and Mack, 2003). In *E. coli* Isolaten beispielsweise ist die TEM-1 Beta-Laktamase verantwortlich für bis zu 90 % der Ampicillin Resistenzen (Livermore, 1995). Das TEM-1-Enzym sowie das erste Derivat TEM-2 sind in der Lage, Penicilline sowie frühe Cephalosporine, wie Cephalothin und Cephaloridin, zu hydrolysieren, aber unfähig, Oxyimino-Cephalosporine zu bekämpfen (Bradford, 2001; Sturenburg and Mack, 2003). Erst die Beta-Laktamase TEM-3 zeigte gesteigerte Aktivität gegen Breitspektrum-Cephalosporine und somit einen ESBL-Phänotyp (Sougakoff et al., 1988; Sturenburg and Mack, 2003). In den folgenden Jahren nach dieser Entdeckung wurden über 90 zusätzliche TEM-Derivate beschrieben und bei der Mehrheit dieser Enzyme handelte es sich um Extended-Spectrum-Beta-Laktamasen (Bradford, 2001). Interessanterweise beschränkt sich der Aminosäureaustausch bei den TEM-Derivaten nur auf bestimmte Positionen. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine Reihe von Aminosäuresubstitutionen an speziellen Positionen von besonderer Bedeutung für die Entstehung des ESBL-Phänotyps sind. Dazu gehören der Austausch von Glutamat zu Lysin an Position 104, Arginin zu entweder Serin oder Histidin an Position 164 sowie Glycin zu Serin an Position 238 und Glutamat zu Lysin an Position 240 (Bradford, 2001; Perilli et al., 1997). Das erweiterte Resistenzspektrum ist demnach auf Punktmutationen in bestimmten Bereichen zurückzuführen. Zurzeit sind mehr als 200 TEM Beta-Laktamasen beschrieben (Stand 14.10.13), von denen die Mehrzahl zu den ESBLs gehört. Die Internetseite <http://www.lahey.org/Studies/temtable.asp> bietet eine aktuelle Übersicht über die Anzahl der beschriebenen TEM Beta-Laktamasen (Stand 14.10.13).

Inhibitor-resistente TEM (IRT) zeigen die Besonderheit, dass sie im Gegensatz zu TEM nicht durch die typischen Inhibitoren, wie Sulbactam oder Clavulansäure gehemmt werden. Obwohl die IRT nicht zu den klassischen ESBLs gehören, werden sie oft im Zusammenhang mit diesen diskutiert, da auch sie eine klinisch wichtige Rolle spielen und es sich ebenfalls um Derivate der TEM-Enzyme handelt (Bradford, 2001). Aktuell sind über 20 Inhibitor-resistente TEM veröffentlicht [<http://www.lahey.org/Studies/temtable.asp>] (Stand 14.10.13).

1.4 SHV

Die Abkürzung SHV steht für „Sulphydryl variable“, womit eine strukturelle Eigenschaft der Enzyme beschrieben wird. Ursprünglich liegt die SHV-1 Beta-Laktamase, der Progenitor aller SHV-Derivate, bei *Klebsiella pneumoniae* chromosomal codiert vor. Da SHV-1 jedoch bei *E. coli* überwiegend Plasmid-vermittelt ist, nimmt man an, dass das SHV-Gen in ein Plasmid inkorporiert und so auf andere *Enterobacteriaceae* übertragen wurde (Sturenburg and Mack, 2003). SHV-1 verursacht Resistenzen gegen Penicilline wie Ampicillin, Ticarcillin sowie

Piperacillin, aber nicht gegen Oxyimino-Cephalosporine (Livermore, 1995). Im Jahr 1983 wurden die ersten Isolate beschrieben, welche übertragbare Resistenzen gegen Cefotaxime und Cephalosporine der neueren Generationen vermitteln. Durch nur eine Mutation an Position 238 (Gly zu Ser) entstand das SHV-2, eine neue ESBL-Variante (Knothe et al., 1983). Interessanterweise beruht der ESBL-Phänotyp bei der Mehrzahl der SHV-Varianten auf dieser Mutation (Bradford, 2001). Im Vergleich zu den häufigen Inhibitor-resistenten TEM wurde lediglich ein Inhibitor-resistentes SHV-Derivat (SHV-10) beschrieben (Prinarakis et al., 1997). Derzeit sind mindestens 180 SHV Beta Laktamasen bekannt. Bei der Mehrzahl dieser Derivate handelt es sich um ESBL-Produzenten [<http://www.lahey.org/Studies/webt.asp#SHV>] (Stand 14.10.13).

1.5 CTX-M

Bei den CTX-M Beta-Laktamasen handelt es sich um Beta-Laktamasen, welche vorzugsweise Cefotaxim hydrolysieren, daher auch die Abkürzung CTX. Das besondere bei diesen Beta-Laktamasen ist, dass ihre Fähigkeit, Extended Spektrum Cephalosporine zu hydrolysieren, „intrinsisch“ ist und nicht auf speziellen Aminosäuresubstitutionen beruht (Sturenburg and Mack, 2003). Es konnte nachgewiesen werden, dass CTX-M nur zu ca. 40 % identisch mit den üblichen TEM und SHV Beta-Laktamasen sind. Damit weisen CTX-M Enzyme keine enge Verwandtschaft zu TEM- und SHV-Beta-Laktamasen auf (Tzouvelekis et al., 2000). Man vermutet eher, dass CTX-M Beta Laktamasen durch horizontalen Gentransfer und darauffolgende Mutationen der chromosomalen AmpC-Beta-Laktamase von *Klyuvera ascorbata* entstanden sind. Hier konnten 99 % Übereinstimmung mit CTX-M-2 gezeigt werden (Humeniuk et al., 2002; Poirel et al., 2002).

Üblicherweise teilt man CTX-M Enzyme anhand ihrer Aminosäuresequenzähnlichkeiten ein. Dabei wurden 5 Hauptgruppen klassifiziert (Bonnet et al., 2000), wobei die Mitglieder einer jeden Gruppe mehr als 94 % Identität und die Mitglieder aus der phylogenetisch entferntesten Gruppe ≤ 90 % aufweisen müssen (Bonnet, 2004) (Tabelle 2).

Tabelle 2 Einteilung der CTX-M Enzyme in 5 Hauptgruppen und dazugehörige Genvarianten

CTX-M-Gruppe	CTX-M-1	CTX-M-2	CTX-M-8	CTX-M-9	CTX-M-25
Anzahl Plasmid vermittelter ESBLs	18	9	3	17	3
Dazugehörige CTX-M- Varianten	CTX-M-1 CTX-M-3 CTX-M-10 CTX-M-11 CTX-M-12 CTX-M-15 CTX-M-22 CTX-M-23 CTX-M-27 CTX-M-28 CTX-M-29 CTX-M-30 CTX-M-32 CTX-M-33 CTX-M-36 CTX-M-37 CTX-M-42 CTX-M-54	CTX-M-2 CTX-M-4 CTX-M-5 CTX-M-6 CTX-M-7 CTX-M-20 CTX-M-31 CTX-M-35 CTX-M-44 (TOHO-1)	CTX-M-8 CTX-M-40 CTX-M-41	CTX-M-9 CTX-M-13 CTX-M-14 CTX-M-16 CTX-M-17 CTX-M-18 CTX-M-19 CTX-M-21 CTX-M-24 CTX-M-27 CTX-M-38 CTX-M-45 (TOHO-2) CTX-M-46 CTX-M-47 CTX-M-48 CTX-M-49 CTX-M-50	CTX-M-25 CTX-M-26 CTX-M-39

Nach (Canton and Coque, 2006; Xu et al., 2005).

Im Jahre 1989 wurde in Deutschland, durch Bauerfeind et al. die erste CTX-M Beta Laktamase (CTX-M-1) aus einem *E. coli* Isolat beschrieben (Bauerfeind et al., 1989). Auch in Südamerika und später in Osteuropa (Bradford et al., 1998; Gazouli et al., 1998; Gniadkowski et al., 1998) und Japan (Ma et al., 1998) wurde zunehmend der Nachweis von CTX-M Beta-Laktamasen beschrieben. Heute zählen Beta-Laktamasen der CTX-M Familie zu den weltweit am weitesten verbreiteten ESBLs (Bonnet, 2004; Canton and Coque, 2006; Livermore, 2008) und kommen sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin häufig in klinischen oder auch kommensalen Bakterien vor. Unter <http://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1> sind derzeit über 150 verschiedene CTX-M Beta-Laktamasen veröffentlicht (Stand 14.10.13).

1.6 AMPC BETA-LAKTAMASEN

Neben den ESBLs als Ursache für Resistenzen gegen Cephalosporine der 3. und 4. Generation in *Enterobacteriaceae* spielen auch AmpC-Beta-Laktamasen eine entscheidende Rolle. Die AmpC-Beta-Laktamasen werden nach Ambler in die Klasse C eingruppiert. Im funktionalen Modell nach Bush-Jacoby-Medeiros gehören sie zur Gruppe 1 (Abbildung 1 und Tabelle 1). AmpCs vermitteln, mit Ausnahme von Cefepim, Cepriom und Carbapenemen, Resistenzen gegen alle Beta-Laktam Antibiotika. Sie sind zudem nicht durch Clavulansäure inhibierbar. AmpC-Beta-Laktamasen sind ursprünglich chromosomal kodiert und in verschiedenen Bakterienspezies beschrieben und zeichnen sich durch ihre große genetische Diversität aus (Philippon et al., 2002). Seit 1989 ist das Vorhandensein Plasmid-vermittelter AmpCs bekannt. Hier beschrieben Bauerfeind et al. erstmals CMY-1 in einem *Klebsiella pneumoniae* Isolat (Bauerfeind et al., 1989). Den ersten Beweis für eine Plasmid-vermittelte Klasse C-Beta-Laktamase lieferte jedoch erst Papanicolaou et al. im Jahr 1990 mit der Beschreibung des übertragbaren Enzyms MIR-1, welches Resistenzen gegen Oxyimino- und gegen 7 α -Methoxy-Beta-Laktame vermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass das Plasmid-vermittelte Gen zu 90 % identisch mit dem chromosomalen AmpC-Gen von *Enterobacter cloacae* ist (Papanicolaou et al., 1990).

Die Plasmid-vermittelten AmpC-Enzyme lassen sich in verschiedene phylogenetische Gruppen einteilen. Die Nomenklatur richtet sich dabei zum Teil nach:

- ➔ der vermittelten Resistenz; CMY (Cephamycin), FOX (Cefoxitin) sowie MOX (Moxalactam) und LAT (Latamoxef)
- ➔ nach dem Beta-Laktamase-Typ; wie ACT (AmpC-typ) und ACC (Ambler Klasse C)(Philippon et al., 2002)
- ➔ dem jeweiligen Entdeckungsort; wie MIR-1 (Miriam Hospital in Providence, R.I.) und DHA (Dhahran Hospital in Saudi Arabia)

Bei CMY-2 handelt es sich um die weltweit am häufigsten detektierte Plasmid-vermittelte AmpC-Beta-Laktamase (Jacoby, 2009).

Aktuell sind unter <http://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1> 108 CMY-Enzyme beschrieben (Stand 14.10.2013).

1.7 VORKOMMEN ESBL/AMPC-PRODUZIERENDER *E. COLI* BEIM MASTHÄHNCHEN

Weltweit wird zunehmend über die Detektion von ESBL/AmpC-produzierenden *E. coli* bei verschiedenen Tieren, darunter Schweine (Blanc et al., 2006; Cortes et al., 2010), Pferde (Dierikx et al., 2012b), Rinder, Hunde und Katzen (Dierikx et al., 2012b; Ewers et al., 2012) sowie Fische (Jiang et al., 2012), aber auch häufig bei Broilern (Blanc et al., 2006; Brinas et al., 2003; Dierikx et al., 2012a; Dierikx et al., 2010), berichtet. Der Gastrointestinal-Trakt der Tiere kann als Reservoir für diese Beta-Laktamase produzierenden Bakterien angesehen werden (Costa et al., 2009) und bietet somit anderen potentiell pathogenen Bakterien die Möglichkeit, unter Selektionsdruck entsprechende Resistenzgene zu erwerben. Dies wird insbesondere dadurch erleichtert, dass die Gene für ESBL/AmpC-Beta-Laktamasen auf Plasmiden codiert sind und zwischen Bakterien einer Spezies, und sogar zwischen verschiedenen Bakterienspezies, leicht horizontal übertragen werden können (Pfeifer et al., 2010).

Auf den Nachweis ESBL/AmpC-bildender *E. coli* in klinischen Proben verschiedener Tierarten folgte 2003 erstmals die Beschreibung von ESBL/AmpC in *E. coli*-Isolaten aus Kotproben gesunder Mastbroiler in Spanien (Brinas et al., 2003). Bezogen auf die eigenen Untersuchungsergebnisse berichten die Autoren bereits ein Jahr später über einen Prävalenzanstieg (von 2,5 % auf 6,3%) sowie eine stärkere Variabilität in den detektierten ESBL-produzierenden *E. coli* Stämmen (Brinas et al., 2005). In den darauf folgenden Jahren wurden weltweit ESBL/AmpC-produzierende *E. coli* überwiegend aus Kotproben/Kloakentupfern gesunder Mastbroiler dokumentiert. Unter anderem in Japan (Brinas et al., 2005; Hiroi et al., 2011; Kojima et al., 2005), China (Li et al., 2010a; Li et al., 2010b; Liu et al., 2007), Spanien (Blanc et al., 2006; Cortes et al., 2010), Belgien (Smet et al., 2008), Italien (Bortolaia et al., 2010; Giufre et al., 2012), Frankreich (Meunier et al., 2006), Portugal (Machado et al., 2008), UK (Randall et al., 2011), Dänemark (DANMAP, 2011) und Niederlande (Dierikx et al., 2012a; Dierikx et al., 2010; Leverstein-van Hall et al., 2011). Die Nachweishäufigkeiten für ESBL/AmpC-produzierende *E. coli* schwanken in den verschiedenen Ländern und angegebenen Studien zwischen 1,3 % und 85 %. Es lässt sich allerdings eine hohe Variabilität der ESBL-Typen erkennen. Für Deutschland sind beim Masthähnchen bisher ausschließlich ESBL, genauer CTX-M-1 bildende *E. coli*-Isolate aus klinischen Proben, beschrieben (Büchter, 2010).

Auffällig ist, dass sich das Vorkommen einiger spezifischer ESBL-Typen auf bestimmte Länder zurückführen lässt. So wird zum Beispiel das Enzym TEM-106 nur bei Geflügelisolaten in Belgien beschrieben (Smet et al., 2008) und verschiedene CTX-M Enzyme (z.B. CTX-M-65, -55, -27) überwiegend in China (Li et al., 2010a; Li et al., 2010b; Liu et al., 2007), während ESBLs wie CTX-M-1, -2 und -14 sowie TEM-52 und SHV-12, speziell beim Geflügel, vermehrt in europäischen Ländern dokumentiert sind. Betrachtet man neben ESBLs die Plasmid-vermittelten AmpC-Beta-Laktamasen, stellt CMY-2 den weltweit am häufigsten detektierten Typ in Proben klinisch gesunder Masthähnchen dar.

Bei den veröffentlichten Studien zum Vorkommen von ESBL/AmpC-produzierenden *E. coli* bei gesunden Masthähnchen gibt es zum einen die Studien auf Schlachthofebene und zum anderen solche auf Betriebsebene. Im Fall der Schlachthofassoziierten Daten wurden meist Zaekalkot- oder Kloakentupferproben von Karkassen auf ESBLs hin untersucht. (Blanc et al., 2006; Brinas et al., 2005; Brinas et al., 2003; Randall et al., 2011). Bei den auf Betriebsebene erhobenen Daten wurden neben Kloakentupferproben vorrangig Sammelkotproben untersucht, wobei hier die Nachweishäufigkeiten zwischen 1,7 % und 100 % schwanken. Dabei ist hervorzuheben, dass in einer Vielzahl der Studien alle untersuchten Broilermastbetriebe positiv auf ESBL/AmpC-produzierende *E. coli* getestet wurden (Blanc et al., 2006; Dierikx et al., 2012a; Mesa et al., 2006; Smet et al., 2008).

Nur in wenigen Studien wurden Einzeltiere untersucht, die sich während der Probenahme noch im Stall befanden. Auch über die potentiellen Eintragsquellen und Verbreitungswege der resistenten Bakterien in den Masthähnchenbetrieben ist bisher wenig bekannt.

Untersuchungen von Mevius et al. (2009) zeigen jedoch, dass die ESBL/AmpC-produzierenden Bakterien bereits in den Großeltern-tierherden vorhanden sind. Hier wurden in 22,5 % bis 44 % der Eintagsküken, bestimmt zum Aufbau von Großeltern-tierherden, ESBL-produzierende *E. coli* beschrieben. In den Eintagsküken der Broilermastherden wurden dagegen nur 3,3 % der Erreger detektiert (Mevius et al., 2009).

In Deutschland ist die Datenlage zum Vorkommen von ESBL/AmpC-produzierenden *E. coli* in Masthähnchenbetrieben sehr begrenzt. Obgleich in einer deutschen Studie (Ewers et al., 2009) bereits angenommen wird, dass nicht nur der Gastrointestinaltrakt der gesunden Tiere, sondern auch die direkte Stallumgebung als Reservoir für *E. coli*, auch mit zoonotischem Potential, dient. Lediglich Friese et al. (2013) beschreiben für 60 % der untersuchten Nutztierbestände, darunter auch 8 Broilermastbetriebe, den Nachweis von ESBL/AmpC-produzierenden *E. coli* in Sammelkotproben. (Friese et al., 2013a).

Der ubiquitäre Nachweis bzw. die hohen Nachweishäufigkeiten der Erreger beim Masthähnchen weltweit lassen eine erfolgreiche Übertragung sowie Persistenz von ESBL/AmpC-produzierenden *E. coli* ohne klinischen Hintergrund in Masthähnchenbetrieben vermuten. Über die Entwicklung bzw. den Eintrag der Erreger sowie deren Anreicherung in den Masthähnchenherden gibt es derzeit sehr wenig systematische Daten. Ebenfalls fehlen Daten zum Vorkommen von ESBL/AmpC-produzierenden *E. coli* in den Tieren und deren Haltungsumgebung. Auch über die Besiedlungsdynamik der resistenten Mikroorganismen im zeitlichen Verlauf ist zurzeit nichts bekannt.

1.8 VORKOMMEN ESBL/AMPC PRODUZIERENDER *E. COLI* BEI HAUSTIEREN, SCHWEINEN UND RINDERN

Die erste Extended-Spectrum-Beta-Laktamase bei Tieren (CTX-M) wurde 1988 in einem *E. coli* Isolat in Japan beschrieben. Dieses Isolat stammte von einem Hund, welcher zuvor mit Beta-Laktam-Antibiotika behandelt wurde (Matsumoto et al., 1988). Im Jahr 2000 wurde ein SHV-12 bildender *E. coli* bei einem an einer Harnwegsinfektion erkranktem Hund nachgewiesen und damit das erste klinische ESBL-Isolat beschrieben (Teshager et al., 2000). In den darauf folgenden Jahren wurden weltweit ESBLs/AmpCs in klinischen *E. coli* Isolaten von Hunden und Katzen beschrieben (Carattoli et al., 2005; Ewers et al., 2011; Ewers et al., 2010; Feria et al., 2002; Gibson et al., 2010; Pomba et al., 2009; Sanchez et al., 2002; Schink et al., 2013; Schink et al., 2011; Shaheen et al., 2011; Sidjabat et al., 2006; Steen and Webb, 2007; Sun et al., 2010; Timofte et al., 2011). Aber auch bei klinisch gesunden Hunden und Katzen konnten die resistenten Bakterien nachgewiesen werden (Carattoli et al., 2005; Costa et al., 2004; Costa et al., 2008; Moreno et al., 2008; Murphy et al., 2009; Sun et al., 2010). Es sind zum Beispiel CMY-2-bildende *E. coli* beim Hund in Canada (Murphy et al., 2009) oder CTX-M-1 und TEM-52 positive Stämme bei Hunden in Portugal (Costa et al., 2004) beschrieben. Auch bei gesunden sowie kranken Pferden konnten auf der ganzen Welt ESBL/AmpC-produzierende *E. coli* nachgewiesen werden (Dierikx et al., 2012b; Dolejska et al., 2011; Ewers et al., 2010; Gibson et al., 2010; Maddox et al., 2012). Der am weitesten verbreitete ESBL-Typ scheint dabei bei Haustier-Isolaten CTX-M-1 zu sein, aber auch CTX-M-15 konnte bei Isolaten der Haustiere häufig nachgewiesen werden (Ewers et al., 2012).

Seit dem Jahr 2000 lässt sich neben dem Nachweis der resistenten Bakterien bei Haustieren auch ein deutlicher Anstieg an Berichten über ESBL/AmpC-produzierende *E. coli* in Lebensmittelliefernden Tieren verzeichnen. Inzwischen wurde weltweit in zahlreichen Studien über das Vorkommen der resistenten Bakterien in Schweinen, Rindern und am häufigsten bei Geflügel, vor allem in Europa, berichtet. Allgemein lässt sich sagen, dass in Lebensmittelliefernden Tieren in Europa am häufigsten ESBL-*E. coli* vom CTX-M-Typ, gefolgt von SHV-12 und TEM-52 beschrieben werden (Seiffert et al., 2013). Speziell der CTX-M-1-Typ ist europaweit bei allen Lebensmittelliefernden Tieren verbreitet (Seiffert et al., 2013). SHV-12 und TEM-52 werden häufig im Zusammenhang mit Geflügel nachgewiesen. Auch die Plasmid-vermittelte AmpC-Beta-Laktamase CMY-2 wird in Lebensmittelliefernden Tieren mit einer hohen Prävalenz nachgewiesen.

Beim Mastschwein wurden hauptsächlich *E. coli*-Isolate mit den ESBL-Typen CTX-M-1 und SHV-12 gefunden. Aber auch CTX-M-2, -9, -14, -15 und TEM-52 konnten nachgewiesen werden. Bei AmpC-produzierenden *E. coli* aus Schweineisolaten handelte es sich hauptsächlich um den Typ CMY-2. Zwischen klinischen Isolaten und denen gesunder Tiere fallen dabei keine Unterschiede auf. In Abhängigkeit vom Probenumfang liegen die Nachweishäufigkeiten der ESBLs/AmpCs in den angegebenen weltweiten Studien zwischen 0,7 % und 32 %. (Akujobi CO, 2008; DANMAP, 2011; Escudero et al., 2010; Geser et al., 2011; Wu et al., 2008).

Beim gesunden Rind wurde das erste CTX-M-2 positive *E. coli*-Isolat 2004 in Japan beschrieben (Shiraki et al., 2004). Inzwischen wurden sowohl bei gesunden als auch bei klinisch kranken Rindern regelmäßig in vielen Ländern ESBL/AmpC-produzierende *E. coli* nachgewiesen (Donaldson et al., 2006; Geser et al., 2011; Gupta et al., 2003; Hiroi et al., 2011; Hopkins et al., 2006; Jensen et al., 2006; Liebana et al., 2006; Madec et al., 2008; Meunier et al., 2006; Wieler et al., 2011b; Wittum et al., 2010). In Deutschland konnten die

resistenten Bakterien aus Kotproben gesunder Rinder ebenfalls isoliert werden. Hier wurden die Varianten CTX-M-1, CTX-M-15 und TEM-52 detektiert (Wieler et al., 2011b). Die gleichen Genvarianten konnten in Deutschland auch bei klinisch kranken Rindern nachgewiesen werden (Büchter, 2010). Betrachtet man alle weltweit veröffentlichten Studien, fällt auf, dass beim Rind hauptsächlich CTX-M-1 positive *E. coli* beschrieben sind (Büchter, 2010; DANMAP, 2011; Hunter et al., 2010; Madec et al., 2008; Meunier et al., 2006; Wieler et al., 2011a). Aber auch die Varianten SHV-12, TEM-52, CTX-M-14 und CTX-M-15 wurden regelmäßig gefunden. Darüber hinaus konnten auch AmpC-Beta-Laktamasen vom Typ CMY-2 aus Rinder-assoziierten Isolaten nachgewiesen werden. Endimiani et al. (2012) beschrieben beispielsweise erst kürzlich einen CMY-2 produzierenden *E. coli* aus einer Milchprobe einer Kuh mit subklinisch rezidivierender Mastitis (Endimiani et al., 2012). Die in den einzelnen Studien angegebenen Nachweishäufigkeiten schwanken zwischen 0,4 % und 37 % ESBL/AmpC-positiver Proben von gesunden oder kranken Rindern (Geser et al., 2011; Jensen et al., 2006; Liebana et al., 2006; Snow et al., 2011).

1.9 TRANSMISSION ESBL/AMPC-PRODUZIERENDER *E. COLI* ZWISCHEN MENSCH UND TIER/GEFLÜGEL

Die Transmission von ESBL-bildenden *Enterobacteriaceae* von Mensch zu Mensch, speziell in Krankenhäusern, in der allgemeinen Bevölkerung sowie im privaten Haushalt konnte bereits nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse lassen stark vermuten, dass der kolonisierte Gastrointestinaltrakt des Menschen ein Reservoir für ESBL/AmpC-produzierende *Enterobacteriaceae* darstellt (Decre et al., 1998; Hilty et al., 2012; Valverde et al., 2008).

Das ursprüngliche Reservoir der resistenten Bakterien wird jedoch diskutiert. Obgleich auch die Transmission von ESBLs und/oder AmpCs zwischen Nutztieren und Menschen entweder durch direkten Kontakt oder über das Lebensmittel vermutet wird (Dierikx et al., 2012a; Smet et al., 2009), lassen sich derzeit keine Rückschlüsse auf das konkrete Übertragungsrisiko ziehen.

Zahlreiche Studien beschreiben ESBL/AmpC-produzierende *E. coli* in Geflügelfleischproben (Bergenholtz et al., 2009; Cohen Stuart et al., 2012; Machado et al., 2008; Overdevest et al., 2011; Warren et al., 2008). Erst kürzlich wurden in Deutschland, von Kola et al. (2012) in 43.9 % der untersuchten Geflügelfleischproben aus verschiedenen Supermärkten, ESBL-produzierende *Enterobacteriaceae* isoliert. Bei der überwiegenden Zahl der Isolate handelte es sich um *E. coli*, in denen hauptsächlich die Genvarianten *bla*SHV-12, *bla*CTX-M-1 sowie *bla*TEM-52 nachgewiesen werden konnten (Kola et al., 2012). Als mögliche Ursache werden Kreuzkontaminationen auf dem Schlachthof diskutiert. Das Vorkommen von ESBLs/AmpCs in der fäkalen Mikroflora von gesunden Lebensmittelliefernden Tieren, wie Masthähnchen, stellt also wahrscheinlich ein Risiko für eine Kontamination von rohen Lebensmitteln tierischen Ursprungs dar. Die Gefahr der Übertragung von ESBL/AmpC-Genen, Plasmiden und *E. coli* Isolaten vom Mastbroiler auf den Menschen wird unter anderem von Leverstein-van Hall diskutiert (Leverstein-van Hall et al., 2011). Nach neuesten Untersuchungen und Ganz-Genom-Sequenzierungs-Analysen konnte diese Hypothese allerdings nicht bestätigt werden (M. de Been and Willems, 2013), denn die untersuchten Isolate humanen und tierischen Ursprungs zeigten wenig Ähnlichkeit. Eine weitere Studie zeigte 2011 jedoch, dass die auf Geflügelfleisch vorherrschenden ESBL-Gene identisch mit denen aus humanen Rektaltupfern gewonnenen waren (Overdevest et al., 2011). Cortes et al. (2010) vermutet sogar, dass von Geflügel gewonnene ESBL/AmpC Isolate eine potentiell höhere Pathogenität für den Menschen haben können (Cortes et al., 2010).

Bei der Frage nach der Übertragbarkeit der ESBL/AmpC-produzierenden Bakterien zwischen Mensch und Tier oder umgekehrt wurden in den Niederlanden potentiell gefährdete Bevölkerungsgruppen untersucht. Man beprobte zum einen Landwirte und zum anderen Menschen, die in unmittelbarer Nähe zu einer Geflügelproduktionsanlage leben. Durch Dierikx et al. (2012) wurden 6 von 18 teilnehmenden Landwirten positiv auf ESBL/AmpC-produzierende *E. coli* getestet. In allen Fällen konnten die bei den Farmern isolierten ESBL/AmpC-Gene auch in den dazugehörigen Broilern nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigten in 2 von 18 Fällen die Isolate der Farmer sowohl bezüglich der ESBL-Gene als auch der isolierten Plasmide genetische Ähnlichkeiten zu denen der dazugehörigen Broiler. Es könnte also angenommen werden, dass für Broilerfarmer ein höheres Risiko besteht, Träger eines ESBL/AmpC-produzierenden *E. coli* zu sein als für die restliche Bevölkerung (Dierikx et al., 2012a). In diesem Zusammenhang haben Huijbers et al. (2013) 1025 Menschen aus Gemeinden mit hoher und niedriger Masthähnchendichte auf ESBL/AmpC-produzierende *Enterobacteriaceae* untersucht. Die gesamte Nachweishäufigkeit für ESBLs lag hier im Durchschnitt bei 5,1 %. Die Hypothese, dass Menschen, die in Gebieten mit hoher

Masthähnchendichte leben, ein höheres Risiko haben, einen ESBL-produzierenden Erreger zu tragen, konnte hier allerdings nicht bestätigt werden (Huijbers et al., 2013).

1.10 ESBL/AMPC-PRODUZIERENDE *E. COLI* IN DER UMWELT

Bei einer Vielzahl wildlebender Tiere wurden ESBL-bildende Bakterien beschrieben (Bonnedahl et al., 2010; Guenther et al., 2012a; Guenther et al., 2012b; Guenther et al., 2011; Guenther et al., 2010; Literak et al., 2010a). Es ist jedoch nicht klar, wie die ESBLs/AmpCs ihren Weg in die Umwelt beschritten haben. Da man vermuten sollte, dass wildlebende Tiere nicht mit den klassischen in der Klinik eingesetzten Antibiotika in Berührung kommen, wird darüber spekuliert, ob das Vorkommen umweltassoziiertes ESBL-*E. coli* ein Transmissionseffekt der durch den Menschen hervorgerufenen „Umweltverschmutzung“ ist (Guenther et al., 2011). Dabei wird der horizontale Gentransfer von Resistenzgenen klinischer Isolate, aber auch der Eintrag ESBL/AmpC-produzierender Isolate in die Umwelt über humane Fäkalien, Abwässer, aber auch Gülle als sehr wahrscheinlich angesehen (Kummerer, 2009; Martinez, 2009). Es wird davon ausgegangen, dass ein Zusammenhang besteht zwischen dem Vorkommen resistenter, kommensaler und pathogener Bakterien in der Umwelt und dem Vorkommen dieser in Human- und Tiermedizin bedingt durch regelmäßigen oder gar konstanten antimikrobiellen Druck. Die Anwesenheit der resistenten Bakterien in Kläranlagen, Abwässern und Gülle führt zwangsläufig zu deren Verbreitung in der Umwelt sowie zu deren konstanter Freisetzung (Martinez, 2009).

Jüngst wurden in China CTX-M-produzierende *E. coli* aus Wasser, Schweinekot und gesunden sowie klinisch kranken Menschen isoliert und auf klonale Zusammenhänge hin untersucht. Es konnte hier gezeigt werden, dass die in der Umwelt detektierten ESBL produzierenden Bakterien mit hoher Wahrscheinlichkeit sowohl vom Menschen als auch vom Tier (Schwein) stammen (Hu et al., 2013).

1.10.1 FÄKALE EMISSION AUS TIERSTÄLLEN

Über das genaue Risiko einer Emission der ESBL/AmpC-produzierenden Erreger aus den Tierhaltungen in die Umgebung ist bisher wenig bekannt, obgleich der potentielle Austrag resistenter Erreger über die Gülle und deren dadurch bedingte Verbreitung in der Umwelt durchaus beschrieben ist (Heuer et al., 2009; Looper et al., 2009). In Frankreich und Deutschland gibt es bereits Studien über das Vorkommen ESBL/AmpC-produzierender *E. coli* in Gülle aus Rinder-, Schweine- und Broilerbetrieben. Da Gülle üblicherweise als Düngemittel auf die Felder aufgebracht wird, kann man hierin einen potentiellen Emissions- und Verbreitungsweg der resistenten Bakterien in die Umwelt sehen. Hartmann et al. (2012) berichteten kürzlich über das Vorkommen CTX-M-1-positiver *E. coli*-Isolate in Rottemist aus einem Rinderstall in Frankreich. Zusätzlich konnten auf kultivierten Böden und Weiden der Stallumgebung zweier Rinderbestände ebenfalls CTX-M-1-produzierende *E. coli* nachgewiesen werden. Bei genotypischen Analysen stellte sich heraus, dass die Umweltisolate und die Isolate aus dem Rottemist klonal verwandt waren (Hartmann et al., 2012). In Deutschland wurde 2012 durch Friese et al. ähnliches beschrieben. Hier konnten in der Gülle aus vier Broilermast- und fünf Schweinemastbetrieben ESBL/AmpC-produzierende *E. coli* nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden Sockentupferproben der Stallumgebung, darunter auch von nachweislich begüllten und bewirtschafteten Feldern, untersucht. In einem Fall wurde Gülle aus dem ESBL/AmpC-positiven Schweinestall 6 Wochen vor Probenahme auf das untersuchte Feld aufgebracht. Auch hier wird darüber spekuliert, dass ESBL/AmpC-produzierende *E. coli* über die Gülle in die Umwelt gelangen und dort über einen unbekanntem

Zeitraum ein Reservoir darstellen (Friese et al., 2013a). Beweise für einen tatsächlichen klonalen Zusammenhang der Isolate aus dem Tierstall und der Umgebung liegen in dieser Studie jedoch nicht vor.

Wie lange ESBL/AmpC-produzierende *E. coli* unter dem Einfluss von Temperatur, Regen, UV-Strahlung oder bei unterschiedlicher Bodenbeschaffenheit in der Umwelt überleben können, ist ebenso ungewiss. Einen zusätzlichen Hinweis auf eine Gülle-assoziierte Transmission von ESBL/AmpC-positiven Isolaten in die Umwelt bietet jedoch die Tatsache, dass diese kurz nach dem Auftreten der Erreger in Lebensmittelliefernden Tieren, auch in Wildtieren, beschrieben wurden (Guenther et al., 2011; Kummerer, 2009). Derzeit liegen allerdings keine systematischen Untersuchungen zur Nachweishäufigkeit ESBL/AmpC-produzierender *E. coli* in Gülle aus verschiedenen Tierhaltungen vor. Auch über den klonalen Zusammenhang der Isolate in der Umwelt und denen in der Tierproduktion ist bisher wenig bekannt.

1.10.2 FÄKALE EMISSION VON ESBL AUS KLÄRANLAGEN

Neben der Emission der resistenten Bakterien aus Nutztierhaltungen spielt auch deren Verbreitung durch den Menschen eine entscheidende Rolle. Da ESBL/AmpC-produzierende *E. coli* regelmäßig in klinischen Isolaten in der Humanmedizin nachgewiesen werden, ist es nicht verwunderlich, dass sie auch im Abwassersystem, in Kläranlagen und deren Umgebung beschrieben werden. Im Jahr 2006 wurden in Spanien erstmals ESBL-produzierende *Enterobacteriaceae* in Abwasserproben detektiert (Mesa et al., 2006). Obwohl die Abwasserreinigungen die Zahl der Bakterien in Abwasser bis zu 99% reduzieren, gibt es Studien, die berichten, dass mehr als $2,7 \times 10^3$ KbE/ml *E. coli* noch im gereinigten Wasser zu finden sind (Korzeniewska et al., 2013). Eine weitere Studie aus Österreich belegte sogar, dass *E. coli* einige der durchgeführten Klärschlammbehandlungen oder Behandlungsverfahren überleben kann, insgesamt wurden in 61 % der verschiedenen untersuchten Klärschlammproben ESBL-*E. coli* detektiert (Reinthaler et al., 2010). Auch in Deutschland wurden 2013 in Cuxhaven und Stade während des EHEC-Ausbruchs Wasserproben zweier Kläranlagen gesammelt und auf *E. coli* untersucht. Die Gesamtrate an *E. coli* im behandelten Abwasser lag bei 35 000 KbE/100ml in beiden Kläranlagen. Von den untersuchten *E. coli* Isolaten waren 500 (1,4%) ESBL-positiv (Heinemeyer et al., 2013). Es kann also angenommen werden, dass ESBLs über die Kläranlagen wieder in den Wasserkreislauf gelangen und so zu deren Verbreitung in der Umwelt beitragen. Auch der in der Landwirtschaft genutzte Klärschlamm kann ein Weg für ESBL-produzierende Bakterien in die Umwelt und gegebenenfalls in die Nahrungskette sein und somit ein Risiko für die Gesundheit der allgemeinen Bevölkerung darstellen (Livermore, 2008; Lu et al., 2010).

Zarfel et al. (2013) spekulieren, dass ein Austausch zwischen den ESBL-produzierenden *E. coli* Populationen aus infizierten Menschen und Klärschlamm stattfindet. Dies geschieht laut den Autoren wahrscheinlich durch den Eintritt von ESBL-bildenden *E. coli* aus Harnwegsinfektionen in die Kanalisation (Zarfel et al., 2013). Diese Vermutung wird belegt durch Galvin et al. (2010) sowie Chagas et al. (2011). In diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Krankenhauskläranlagen nicht zur Beseitigung aller Antibiotika-resistenten Mikroorganismen in Krankenhausabwässern führen. Die das Krankenhaus verlassenden Abwässer enthalten nach Angaben der Autoren einen höheren Anteil an antimikrobiell-resistenten *E. coli* als die Abwässer aus Einzugsgebieten ohne Beteiligung eines Krankenhauses (Chagas et al., 2011; Galvin et al., 2010). Unter den detektierten Isolaten fanden sich auch stets ESBL-positive *E. coli*.

All diese Studien unterstützen die Vermutung, dass ESBL-produzierende *E. coli* über Kläranlagen in die Umwelt gelangen können. Zusammen mit gereinigtem Abwasser können sie in den Boden eindringen sowie Oberflächenwasser und Grundwasser der ländlichen Versorgung und damit auch Trink- und Tränkwasser kontaminieren (Korzeniewska et al., 2013).

1.10.3 AEROGENE EMISSION AUS TIERSTÄLLEN UND DAS ÜBERLEBEN DER BAKTERIEN IN DER UMWELT

Auch die aerogene Emission von Bakterien aus Tierställen wurde bereits beschrieben. Hartung et al. berichteten schon im Jahr 1998, dass mit der Luft in Tierhaltungen nicht nur Gase und Gerüche sondern auch Staphylokokken, Streptokokken, Coliforme, Pilze und Hefen transportiert werden. Die bakterien- und schadstoffbeladene Luft wird schließlich über verschiedenste Ventilationssysteme in die Umgebung geleitet (Hartung, 1998). Natürlich können auf diesem Weg auch Bakterien mit spezifischen antimikrobiellen Resistenzen in die Stallumgebung und so in die Umwelt gelangen. Friese et al. (2013) beispielsweise zeigen, dass Methicillin- resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) über die Stallabluft aus verschiedenen Tierhaltungen in die Umwelt emittiert werden. Die resistenten Bakterien konnten bis zur maximal beprobten Entfernung von 150 m auf der windabgewandten Seite des Tierstalles in der Außenluft nachgewiesen werden (Friese et al., 2013a; Friese et al., 2013b). Staphylokokken werden als die am häufigsten detektierten Organismen in der Umgebung von mechanisch belüfteten Broilerbetrieben beschrieben.

Sie stellen einen „Marker bzw. Indikator Organismus“ für die luftgetragene Emission aus Tierställen in die Umgebung dar (Chinivasagam et al., 2010).

Die potentielle aerogene Emission ESBL/AmpC-produzierender *E. coli* aus Tierhaltungen wurde bislang noch nicht systematisch untersucht. Es gibt allerdings Studien, die beschreiben, dass generell nur wenige gram-negative Bakterien, wie *E. coli*, aus der Luft der Tierställe isoliert werden können (Zucker et al., 2000). Die geringe Anzahl an kultivierbaren gram-negativen Bakterien, wie *E. coli*, in Stallluftproben wird auf deren kurze Überlebensrate in der Luft zurückgeführt.

Bakterien, welche über unterschiedlichste Ventilationssysteme aus Tierhaltungen in die Atmosphären Luft gelangen, sind zudem verschiedensten Stressoren ausgesetzt. Diese beeinflussen wiederum die Überlebensrate der Mikroorganismen in der Umwelt. Die biologische Sterberate von *E. coli* in Bioaerosolen ist zum Beispiel mit der Partikelgröße und der vorherrschenden Temperatur korreliert (Chinivasagam et al., 2010; Handley and Webster, 1995). Ebenso hat das vorherrschende Wetter einen großen Einfluss auf die Überlebensrate der Bakterien, mit schlechteren Überlebenschancen an sonnigen als an wolkigen Tagen (Tong, 1998). Außerdem ist das Überleben von *E. coli* in der Außenluft deutlich von der vorherrschenden relativen Luftfeuchte abhängig. Die Überlebensrate ist in Aerosolen bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 70% bis 80% deutlich höher als bei Werten unter 70% (Marthi et al., 1990). Mit Abnahme der relativen Luftfeuchtigkeit erhöht sich zusätzlich der toxische Effekt von Sauerstoff auf die Bakterien (Benbough, 1967). Auch die „Verdünnung“ der Bakterien in der Außenluft sowie deren Verteilung/Zerstreuung werden als Ursachen für die geringen Nachweishäufigkeiten in der Atmosphärenluft aufgeführt.

Jüngst wurde die Emission von gram-negativen Mikroorganismen, darunter auch *E. coli*, aus mechanisch belüfteten Broilerbetrieben untersucht (Chinivasagam et al., 2009, 2010). *E. coli* konnten in relativ großer Zahl in den Broilerbetrieben in der Stallluft und auch im Staub

nachgewiesen werden. Die Staubbelastung in Geflügelproduktionen war zum Teil sehr hoch, wobei sich der Staub hauptsächlich aus Futter-, Einstreu, Feder- und Kotpartikeln zusammensetzt (Pearson, 1995). Darüber hinaus ist bekannt, dass 80% der luftgetragenen Mikroorganismen in Tierställen an Staubpartikel gebunden sind (Jens Seedorf, 2002). Sobald diese bakteriell beladenen Bioaerosole den Stall über die Lüftungsanlagen verlassen, werden die an Staubteilchen haftenden Mikroorganismen durch simple Sedimentation, in Abhängigkeit von der Partikelgröße, in der direkten Stallumgebung verbreitet. Chinivasagam et al. (2010) beschreiben jedoch, dass *E. coli* als Indikator-Bakterium für die Emission von gram-negativen Bakterien aus der Masthähnchenproduktion in Abständen über 20 Meter zum Tierstall nicht mehr nachzuweisen ist, obgleich hohe Konzentrationen von *E. coli* in der Stallluft detektiert werden konnten (Chinivasagam et al., 2010).

Studien über eine luftgetragene Emission ESBL/AmpC-produzierender *E. coli* aus Tierproduktionsanlagen, im speziellen aus Masthähnchenbetrieben, gibt es bisher nicht. Aufgrund mangelnder Informationen über das Verhalten und den Transport von bakterienbeladenen Bioaerosolen aus intensiven Tierhaltungen in die Umgebung ist eine genaue Vorhersage über das gesundheitliche Risiko für die Gesellschaft derzeit somit nicht möglich.

1.10.4 AEROGENE EMISSION DER ESBLs/AMPCs AUS KLÄRANLAGEN

Wie vorstehend beschrieben, zeigten frühere Berichte, dass ESBL-produzierende *E. coli*-Stämme sowohl in Krankenhaus-Abwasserleitungen als auch in Zu- und Abflüssen von Kläranlagen zu finden sind. Auch bei der luftgetragenen Emission der ESBL/AmpC-produzierenden *E. coli* stellen Kläreinlagen ein Risiko dar.

E. coli und andere Enterobakterien wie *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.* und *Citrobacter spp.*, die einen großen Teil der Bakterienpopulation in Abwässern darstellen, können aus dem Abwasser in die Luft übertragen werden. Dies geschieht hauptsächlich während der mechanischen (Beförderung von Rohfäkalien in den Kiesbehälter) und biologischen (Belüftung der Abwässer in die Bioreaktoren) Prozesse der Abwasserreinigung (Korzeniewska, 2011). Das heißt, auch Bioaerosole aus Kläranlagen stellen ein Instrument zur Verbreitung von resistenten Bakterien, darunter auch ESBLs/AmpCs, aus dem Abwasser in die nähere Umgebung dar (Bunger et al., 2007).

Es gibt derzeit aber nur wenige systematische Studien über die aerogene Emission ESBL/AmpC-produzierender *E. coli* in die Umwelt und deren Bedeutung oder Gefahr für die menschliche Gesundheit. Im Januar 2013 konnten Korzeniewska et al. in 28.6 % der Luftproben aus der direkten Umgebung einer Kläranlage ESBL-produzierende *E. coli* nachweisen. CTX-M stellte den am häufigsten detektierten Beta-Laktamase-Typ in diesen Isolaten dar. Es konnte hier belegt werden, dass ESBLs aus Kläranlagen in die Atmosphärenluft und die direkte Umgebung der Kläranlage, aber auch in Gewässer emittieren (Korzeniewska et al., 2013).

Der potentielle Eintrag der ESBL/AmpC-produzierenden Erreger aus den Kläranlagen und der Umwelt in die Tierhaltungen hinein wurde bisher jedoch noch nicht systematisch untersucht.

2 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Das übergeordnete Ziel des ersten Teiles der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der Nachweishäufigkeit von ESBL-produzierenden *E. coli* in konventionellen deutschen Masthähnchenbetrieben während des gesamten Mastverlaufes. Vor allem sollen neue Erkenntnisse über die Besiedlungsdynamik der resistenten Bakterien sowie deren Verbreitung im Masthähnchenstall gewonnen werden.

2.1 LONGITUDINAL MONITORING OF ESBL/AMPC-PRODUCING ESCHERICHIA COLI IN GERMAN BROILER CHICKEN FATTENING FARMS

veröffentlicht in: Laube, H., A. Friese, C. von Salviati, B. Guerra, A. Käsbohrer, L. Kreienbrock, U. Roesler. 2013. **Longitudinal monitoring of ESBL/AmpC-producing Escherichia coli in German broiler chicken fattening farms**. Appl Environ Microbiol. 2013 Jun 7. 79, 4815-4820; DOI:10.1128/aem.00856-13

Longitudinal Monitoring of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase/AmpC-Producing *Escherichia coli* at German Broiler Chicken Fattening Farms

H. Laube,^a A. Friese,^a C. von Salviati,^a B. Guerra,^b A. Käsbohrer,^b L. Kreienbrock,^c U. Roesler^a

Institute for Animal Hygiene and Environmental Health, Free University Berlin, Berlin, Germany^a; Federal Institute for Risk Assessment, Department Biological Safety, Berlin, Germany^b; Institute for Biometrics, Epidemiology and Information Processing, Veterinary University Hannover, Hannover, Germany^c

Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* to modern beta-lactam antibiotics due to the production of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) and/or plasmid-mediated AmpC beta-lactamases (AmpC) represents an emerging and increasing resistance problem that dramatically limits therapeutic options in both human and veterinary medicine. The presence of ESBL/AmpC genes in commensal *E. coli* from food-producing animals like broilers may pose a human health hazard. However, there are no data available concerning the prevalence of ESBL/AmpC-producing *E. coli* in German broiler flocks using selective methods. In this longitudinal study, samples were taken from seven conventional broiler fattening farms at three different times within one fattening period. Various samples originating from the animals as well as from their direct environment in the barn were investigated for the occurrence of ESBL/AmpC-producing *E. coli*. Average detection levels of 51, 75, and 76% in animal samples collected during the three samplings in the course of the fattening period demonstrate a colonization of even 1-day-old chicks, as well as a continuous significant ($P < 0.001$) increase in prevalence thereafter. The detection frequencies in housing environmental samples were relatively high, with an increase over time, and ranged between 54.2 and 100%. A total of 359 *E. coli* isolates were characterized by PCR and partly via the disc diffusion method. This study shows that prevalence of ESBL/AmpC-producing *E. coli* increases during the fattening period of the broiler flocks examined. Both colonized day-old chicks and contaminated farm environments could represent significant sources of ESBL/AmpC-producing *E. coli* in German broiler fattening farms.

Antimicrobial resistance is a major problem in both human and veterinary medicine. One mechanism of resistance which has recently gained more and more importance is the production of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) and plasmid-encoded cephalosporins (pAmpC). These enzymes inactivate many beta-lactam antibiotics, including modern extended-spectrum cephalosporins, by hydrolyzing their beta-lactam ring. Currently, CTX-M beta-lactamases represent the most widespread and still increasing ESBL type in humans and in animals (1–7). Among the AmpC beta-lactamases, CMY represents by far the most frequent beta-lactamase in livestock in Europe (3, 4, 8–10).

ESBL producers transfer resistance to oxyminocephalosporins and often express a multidrug-resistant phenotype (6, 11, 12), resulting in dramatically limited therapeutic options. Additionally, plasmid-mediated AmpC beta-lactamases and, even more alarming, carbapenemases are leading to a worsening of the situation in both human and veterinary medicine (13). Although the resistant bacteria were initially observed in human samples, an increase in the detection of ESBL/AmpC-producing *E. coli* in animals, such as pigs (9, 14), horses (15), cattle, dogs, cats (4, 15), fish (16), and, particularly, broiler chickens, has been reported worldwide (3, 8, 12, 14). The gastrointestinal tract of healthy broilers may be an important reservoir for these beta-lactamase-producing bacteria (11). The relevance for German food production is reflected by the finding in a German study that 43.9% of chicken meat samples tested positive for ESBL-producing *Enterobacteriaceae*, predominantly *E. coli*, in a convenience sample (17). This represents an issue of public health due to a possible route for transmission to consumers, which was shown in different international studies (18, 19). So far, data on neither the prevalence of ESBL/AmpC-producing *E. coli* in German broiler fattening flocks

nor the changes in the prevalence in the course of the fattening period are available. Moreover, little is known about the distribution and spread of these multidrug-resistant bacteria within broiler flocks. However, apart from the gastrointestinal tract of healthy broilers, the barn's environment itself serves as a reservoir for *E. coli* with zoonotic potential (20). Therefore, in this study, carried out within the consort project RESET (<http://www.reset-verbund.de/>), the changes in the prevalence of ESBL/AmpC-producing *E. coli* isolates in chicken as well as their occurrence within the barn's environment were investigated in the course of a fattening period in seven conventional broiler fattening flocks in Germany.

MATERIALS AND METHODS

Sampled farms. Broiler fattening farms in Germany were preselected by initial testing of pooled feces samples for the occurrence of ESBL/AmpC-producing *E. coli*. All of the screened broiler farms ($n = 16$) were suspected to be positive for these microorganisms based on phenotypic data.

Out of these, seven conventional broiler fattening farms, dispersed throughout Germany (northwest, northeast, and east), were selected for long-term investigations of the occurrence of ESBL/AmpC-producing *E. coli*. Besides the declaration of consent of the farmers, criteria for farm

Received 15 March 2013 Accepted 30 May 2013

Published ahead of print 7 June 2013

Address correspondence to H. Laube, laube.henriette@vetmed.fu-berlin.de

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00856-13>.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AEM.00856-13

LONGITUDINAL MONITORING OF ESBL/AMPC-PRODUCING ESCHERICHIA COLI IN GERMAN BROILER CHICKEN FATTENING FARMS

Laube et al.

TABLE 1 Detection frequencies of ESBL/AmpC-producing *E. coli* obtained from cloacal swabs from seven German broiler fattening farms

Sampling ^b	% ESBL/AmpC-positive samples (total no.) for farm ^a :							
	All	1	2	3	4	5	6	7
First	51 (140)	85 (<i>n</i> = 20)	95 (20); ENR	40 (20); AMX, INN	60 (20)	55 (20); ENR	0 (20); ENR	20 (20); ENR
Second	75 (140)	100 (20)	60 (20)	60 (20); PEN, COL	85 (20); COL	75 (20)	95 (20)	50 (20); ENR
Third	76 (140)	100 (20)	85 (20)	85 (20)	75 (20)	25 (20)	100 (20)	68 (20)

^a Numbers in parentheses are numbers of samples from all farms at each sampling. Between-sample antimicrobial treatments, if any, are listed after the numbers of samples. COL, colistin; ENR, enrofloxacin; AMX, amoxicillin; INN, neomycin; PEN, benzylpenicillin.

^b First sampling, about the 1st to 2nd day of life; second sampling, about the 14th to 18th day of life; third sampling, about the 26th to 35th day of life.

selection were a positive result for phenotypically suspected ESBL/AmpC-producing *E. coli* based on growth on MacConkey agar (CM 0115; Oxoid, Wesel, Germany) supplemented with 1 mg/liter cefotaxime (D-6429; Appligen GmbH, Darmstadt, Germany) (termed MC⁺ agar) and species identification by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) in initial tests of pooled feces samples. On each farm, a single representative barn was chosen for sample collection. Each broiler flock was investigated at three time points (3 to 36 h after restocking and 14 to 18 and 26 to 35 days after being housed) during one fattening period. On all farms, a standardized questionnaire was used to obtain information concerning general management and hygiene, including the use of antibiotics for the flock under investigation. Unit sizes ranged from 48,000 to 360,000 animals per farm, 2 to 15 animal houses per farm, and 20,000 to 82,000 animals per house. All farms employed an all-in, all-out management scheme for the individual animal houses. The fattening period for the examined flocks ranged between 35 and 42 days. In three out of the seven animal houses, preharvesting of a few animals was established at the third sampling. On farm 1, no antibiotics were used during the entire fattening period. On all other farms, antibiotics were applied at least once during the fattening period. The antibiotic treatments were carried out due to pericardial and yolk sac infections, *E. coli* enteritis/infections, and/or mixed infections. The antibiotics used were mainly enrofloxacin and colistin. Enrofloxacin was used on farms 2, 5, and 6 during the first 3 days of fattening and also at the end of the fattening period on farm 7. On farms 3 and 4, colistin was used at the beginning of the fattening period, whereas on farm 4 the substance was also applied for 2 days at the end of the fattening period. Amoxicillin, neomycin, and benzylpenicillin were used on farm 3 only (Table 1).

Sampling at the broiler farms. During each sampling, 20 broilers were sampled randomly by collecting cloacal swabs (dry thin cotton swab; Nerbe Plus GmbH, Winsen/Luhe, Germany). Environmental samples, such as pooled samples of approximately 200 g feces and 200 g litter, as well as approximately 2 g pooled dust samples, were collected from at least 10 different spots on each sampling date. Moreover, four environmental swabs from water and feeding troughs, walls, and scale/radiators were collected using dry cotton swabs (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Germany) moistened with phosphate-buffered saline (PBS). With each environmental swab, material was collected from 10 different places evenly distributed inside the barn, swabbing a surface of approximately 15 cm² each. Additionally, a pair of boot swabs (Finnimport, Hamburg, Germany) was taken at each sampling date by walking the whole length of the investigated barn.

Laboratory analysis. All samples were processed within 24 h of sampling, at which time they were cooled to 4°C.

Animal and environmental samples. All samples were cultured on MC⁺ agar without preenrichment and after preenrichment in Luria-Bertani (LB) broth (Merk KGaA, Darmstadt, Germany) (21). For culture without preenrichment, cloacal swabs as well as environmental swabs were streaked directly on MC⁺ agar; for all other samples, 100 µl of an initial suspension was plated. To prepare the initial suspension, 225 ml LB broth was added to 25 g of pooled feces samples, 25 g of litter samples, and one pair of boot swabs, respectively, and homogenized using a stomacher (260 rpm for 2 min). For dust, 0.1 g of the dust sample was dissolved in 10 ml PBS plus 0.01% Tween 20 and shaken for approximately 30 min.

To determine quantitative data concerning ESBL/AmpC-producing *E. coli* and overall *E. coli* numbers in the pooled feces and dust samples, respectively, 100 µl of the initial suspension and a 1:10 dilution were streaked onto three MC⁺ agar plates as well as onto three Gassner agar plates (CM431; Oxoid GmbH, Wesel, Germany). All agar plates were incubated overnight at 37°C under aerobic conditions.

For preenrichment, 1 ml of the initial dilution of the dust, feces, litter, and sock samples was transferred into 9 ml LB broth, while cloacal swabs and environmental swabs were directly transferred into 9 ml LB broth. The LB broths were incubated overnight at 37°C under aerobic conditions. After the preenrichment step, a loopful of all samples was streaked onto MC⁺ agar and incubated again overnight at 37°C under aerobic conditions.

Confirmation and characterization of ESBL/AmpC β-lactamases in *E. coli*. For each sample, the species was identified with a randomly chosen suspected *E. coli* colony using MALDI-TOF (Bruker Daltonik GmbH, Bremen), and the occurrence of ESBL/AmpC was confirmed by PCR. To this end, the presence of the extended-spectrum beta-lactamase genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, and *bla*_{TEM} and the AmpC beta-lactamase gene *bla*_{CMY} were examined as described previously (22–25) or using protocols kindly provided by the ESBL SafeFoodEra Consortium (EU-SAFEFOODERA project 08176). The *bla*_{CMY} gene was chosen because it is the most frequently detected AmpC beta-lactamase gene in livestock in Europe (3, 4, 8–10). All isolates yielding positive results in *bla*_{TEM} and/or *bla*_{SHV} PCRs were subsequently sequenced by using SHV primers as described by Weill et al. (24) or by using TEM primers as described by Olesen et al. (26) in order to unequivocally confirm the presence of extended-spectrum beta-lactamases in these samples (24, 26). The nucleotide sequences were analyzed with BioNumerics software (version 6.6). The BLAST program of NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) was used for database comparison.

Antimicrobial susceptibility testing for ESBL/AmpC detection. All isolates tested negative by PCR (*n* = 7), and all isolates harboring only the *bla*_{TEM-1} gene (*n* = 45) were subjected to susceptibility testing by the disc diffusion method (27). The antibiotics tested were cefotaxime (CTX; 30 µg), amoxicillin-clavulanic acid (AMC; 30 µg), cefepime (FEP; 30 µg), cefoxitin (FOX; 30 µg), and cefotaxime-clavulanic acid (CTX-Clav; 30 and 10 µg, respectively). An inhibition zone diameter (IZD) of ≤26 mm for both CTX and CTX-Clav in combination with an IZD of ≤18 mm for FOX and AMC was considered phenotypic proof of AmpC production. An increase of more than 5 mm in the IZD for CTX-Clav versus that for CTX alone was considered phenotypic proof of ESBL production (28, 29) (Table 2).

Statistical analyses. Statistical analyses were performed by using SPSS (version 13; Chicago, IL). To explore the data, classical chi-square tests were used, omitting any adjustment for multiple testing and considering statistical significance if *P* < 0.05. For descriptive statistical analysis of quantitative bacterial counts, measures of location were used to describe the outcome. Explorative comparison of groups was performed using the Wilcoxon test procedure.

RESULTS

Animal samples and samples of animals' environments. ESBL/AmpC-producing *E. coli* organisms were detected in all investi-

LONGITUDINAL MONITORING OF ESBL/AMPC-PRODUCING ESCHERICHIA COLI IN GERMAN BROILER CHICKEN FATTENING FARMS

ESBL/AmpC-Producing *E. coli* in German Broiler Farms

TABLE 2 Detection frequencies of ESBL/AmpC-producing *E. coli* (mean values) in samples from the housing environments of all investigated farms

Source of ESBL/AmpC-positive samples (three samplings each)	% ESBL/AmpC-positive samples (total no.) for all farms/all samplings	Detection frequency for farm ^a :						
		1	2	3	4	5	6	7
Pooled feces	100 (20)	+++	+++	+++	+++	+++	o++	+++
Litter	95.2 (18)	+++	+++	+++	+++	+++	-++	+++
Boot swabs	90.4 (21)	+++	+++	+++	+++	-++	-++	+++
Pooled dust	71.4 (21)	+++	+++	+++	-++	+--	-++	+--
Environmental swabs	54.2 (83)	+++	+++	+++	+++	+++	--+	+++

^a Each sign represents one sampling date; +, positive for ESBL/AmpC-producing *E. coli*; -, negative for ESBL/AmpC-producing *E. coli*; o, sample not taken.

gated broiler fattening farms. Except for farm 6, where no ESBL/AmpC-producing *E. coli* could be detected during the first sampling, these pathogens were found at all times of investigation on all farms. At least one sample per barn and sampling tested positive for ESBL/AmpC-producing *E. coli* even without the preenrichment step, again with the exception of farm 6. Without preenrichment, the detection frequencies of ESBL/AmpC-producing *E. coli* in individual animal samples were 32% ($n = 140$) for the first, 59% ($n = 140$) for the second, and 64% ($n = 140$) for the third sampling. Including the preenrichment step, the detection frequencies increased from 51% ($n = 140$) for the first sampling up to 75 and 76% ($n = 140$) for the second and third samplings, respectively (Table 1). Moreover, the detection frequency of ESBL/AmpC-producing *E. coli* in animal samples (cloacal swabs) increased significantly ($P < 0.001$) from the first sampling (3 to 36 h after housing of the hatched broilers) to the second sampling (about 14 to 18 days of life). High detection frequencies of ESBL/AmpC-producing *E. coli* were also found in all samples of the animals' environments (Table 2). All pooled feces samples (100%; $n = 20$), 95.2% of the pooled litter samples ($n = 21$), and 90.4% of the boot swabs ($n = 21$) tested positive. Even 71.4% of the pooled dust samples ($n = 21$) and 54.2% of the different environmental swabs, including walls, scales, water, and feeding troughs ($n = 83$), revealed positive results for ESBL/AmpC-producing *E. coli*. Moreover, the detection frequency of ESBL/AmpC-

producing *E. coli* in all environmental samples together also increased significantly ($P < 0.05$) from the first to the second sampling. Detection frequencies for litter and boot swabs increased from 86 and 71%, respectively, at the first samplings to 100% at samplings two and three. The detection frequencies of ESBL/AmpC-producing *E. coli* in pooled dust samples were 57% for the first, 71% for the second, and 86% for the third sampling. For the environmental swabs, there was an increase in the detection frequencies from 37 to 61% during the fattening period.

The geometric mean bacterial count (CFU/g) of ESBL/AmpC-presumptive *E. coli* was $1.25E+06$ CFU/g for pooled feces samples and $4.00E+03$ CFU/g for dust samples (Table 3). The amount of *E. coli* obtained from Gassner agar was $1.57E+06$ CFU/g in pooled feces and $5.87E+03$ CFU/g in dust samples. In all evaluable fecal and dust samples, the average proportion of ESBL/AmpC-producing *E. coli* out of the total amount of *E. coli* was 17.41% (values ranged between 0.023 and 92.41% for the single investigated samples) and 8.62% for dust samples, respectively (values ranged between 0.38 and 22.1% for the single investigated samples). The average number of ESBL/AmpC-suspected *E. coli* organisms obtained from pooled feces and pooled dust samples did not increase during the fattening period ($P = 0.775$ and 0.104 for pooled feces and pooled dust, respectively, by the Wilcoxon test).

Characterization of beta-lactamases in *E. coli*. The occurrence of ESBL/AmpC beta-lactamase genes was confirmed for one

TABLE 3 Number of ESBL/AmpC-producing *E. coli* (CFU/g) obtained from MC⁺ agar and Gassner agar from pooled feces and pooled dust samples

Sample type and statistic	No. of ESBL/AmpC-producing <i>E. coli</i> (CFU/g) obtained with:					
	MC ⁺ agar			Gassner agar		
	1st sampling ^a ($n = 6$)	2nd sampling ($n = 7$)	3rd sampling ($n = 7$)	1st sampling ($n = 4$)	2nd sampling ^b ($n = 6$)	3rd sampling ^c ($n = 6$)
Pooled feces						
Minimum	7.13E+04	2.80E+04	3.97E+03	2.82E+05	8.00E+05	3.00E+05
Median	1.48E+06	1.69E+06	1.79E+06	6.39E+05	2.07E+06	7.30E+05
Mean	1.60E+07	4.48E+05	6.90E+06	1.01E+06	1.25E+08	1.22E+06
Geometric mean	2.00E+06	1.35E+06	7.65E+05	7.20E+05	5.24E+06	7.86E+05
Maximum	8.50E+07	1.86E+06	2.36E+07	2.49E+06	7.34E+08	4.00E+06
Pooled dust						
Minimum	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	1.36E+03	3.30E+02
Median	0.00E+00	8.33E+03	1.00E+03	0.00E+00	2.60E+04	5.30E+03
Mean	6.29E+03	5.81E+03	3.90E+04	1.50E+02	2.52E+04	4.72E+04
Geometric mean	4.40E+04	5.04E+03	2.22E+03	6.00E+02	1.20E+04	6.04E+03
Maximum	4.40E+04	1.26E+04	1.67E+04	6.00E+02	4.83E+04	2.12E+05

^a For the pooled dust sampling, $n = 7$.

^b For the pooled dust sampling, $n = 3$.

^c For the pooled dust sampling, $n = 5$.

LONGITUDINAL MONITORING OF ESBL/AMPC-PRODUCING ESCHERICHIA COLI IN GERMAN BROILER CHICKEN FATTENING FARMS

Laube et al.

TABLE 4 Proven ESBL/AmpC producers (using PCR and ESBL/AmpC genes) from the investigated German broiler fattening farms^b

Detected gene(s)	ESBL/AmpC producer status ^a	No. of <i>E. coli</i> isolates	% <i>E. coli</i> isolates (<i>n</i> = 359)
CMY	+	78	21.73
SHV-12	+	47	13.12
CTX-M	+	38	10.59
TEM-52	+	26	7.24
TEM-1	(-)	45	12.54
CMY and TEM-1	+	69	19.22
SHV-12 and TEM-1	+	33	9.12
CTX-M and CMY	+	6	1.67
CTX-M and TEM-1	+	4	1.11
TEM-52 and SHV-12	+	2	0.56
TEM-52 and CMY	+	1	0.28
SHV-12 and CTX-M	+	1	0.28
CTX-M, SHV-12, and TEM-1	+	1	0.28
SHV-12, CMY, and TEM-1	+	1	0.28
None ^c	(-)	7	1.95
Proven ESBL/AmpC producer		307	85.51

^a +, proven to be an ESBL/AmpC producer; (-), still suspected of being an ESBL/AmpC producer.

^b Three hundred fifty-nine *E. coli* isolates suspected of being ESBL/AmpC producers were examined.

^c Negative in all PCRs.

E. coli isolate chosen randomly from each presumptive positive sample. In total, 359 suspected ESBL/AmpC-producing *E. coli* isolates were analyzed by PCR and, if necessary, sequenced to examine the presence of the beta-lactamase genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, and *bla*_{TEM} and the AmpC beta-lactamase gene *bla*_{CMY}. Therefore, ESBL and/or plasmidic class C beta-lactamase genes (*bla*_{CMY}) were confirmed in 307 (85.5%) *E. coli* isolates. Details concerning all characterized genes and gene combinations are shown in Table 4.

On farms 1 and 2, mostly only *bla*_{CMY} genes and combinations of *bla*_{CMY} and *bla*_{TEM-1} genes were detected in both animal samples (cloacal swabs) and samples from the animals' environment during all three samplings. Additionally, on farm 2, colonies carrying *bla*_{TEM-1} genes only were frequently detected in environmental samples, and *E. coli* colonies harboring *bla*_{CTX-M} genes only were obtained from single animals during the third sampling. In contrast, *bla*_{SHV-12} was the dominant gene found in samples of animals on farms 3 and 4. Sporadically, single *bla*_{TEM-52} genes as well as *bla*_{TEM-1} genes, in combination with a *bla*_{CMY} gene, were detected in animal samples from the first sampling. Environmental samples also mainly harbored single *bla*_{SHV-12} genes or *bla*_{TEM-1} genes during the entire fattening period. Farm 5 showed single *bla*_{CMY} genes exclusively at the first sampling in all kinds of samples. In the course of the fattening period, other genes, such as the *bla*_{TEM-1} gene, alone or in combination with *bla*_{CMY}, as well as single *bla*_{TEM-52} genes, were also found. On farm 6, which was completely negative for ESBL/AmpC-producing *E. coli* during the first sampling, *bla*_{SHV-12} alone and/or in combinations with *bla*_{TEM-1} genes and *bla*_{CTX-M} genes were detected in *E. coli* colonies from all samples during the later samplings. Isolates collected on farm 7 at the first sampling harbored single *bla*_{SHV-12} genes and single *bla*_{CMY} genes in all samples, sometimes in combination with *bla*_{TEM-1} genes. In the course of the fattening period, mainly isolates harboring single *bla*_{CTX-M} genes and isolates harboring a

combination of *bla*_{CMY} and *bla*_{TEM-1} genes were detected in both kinds of samples (see Table S1 in the supplemental material).

Antimicrobial susceptibility testing. All isolates harboring only the *bla*_{TEM-1} gene (*n* = 45), as well as those that tested negative via PCR (*n* = 7), were subjected to susceptibility testing by the disc diffusion method. ESBL/AmpC production was confirmed in 93.3% of the *E. coli* isolates with a single *bla*_{TEM-1} gene. Three isolates (6.67%) could not be confirmed as ESBL/AmpC producers. The isolates that tested negative for *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, and *bla*_{CMY} by PCR were positive for ESBL (6/7) and AmpC (1/7) production by the disc diffusion method.

DISCUSSION

The results show a high occurrence of ESBL/AmpC-producing *E. coli* in German broiler flocks. Another main finding is its occurrence even in 1-day-old broilers, a result that has not been shown previously for German broilers. Additionally, ESBL/AmpC-producing *E. coli* could be found in samples of the animals' environment during the first sampling. The high detection frequencies shortly after the arrival of the broiler chicks raise the issue of the entry of these resistant microorganisms into the farms. In this regard, Mevius et al. (30) showed that the risk of introducing ESBL/AmpC-producing *E. coli* in the broiler production chain occurs two steps before by buying positive chicks for the restocking of grandparent's flocks. They showed a detection frequency of ESBL-producing *E. coli* between 22.5 and 44% in 1-day-old grandparent chicks. In the same study, the prevalence was 3.3% in 1-day-old broiler chicks, which is much lower than the value of 51% determined in our study. Thus, detailed investigation of possible vertical transmission routes of ESBL/AmpC-producing *E. coli* from hatching eggs to the day-old chicks is of fundamental importance and should be considered in further studies. In contrast to Mevius et al. (30), a study presented by Hiroi et al. (31) assumed contaminated barns as a consequence of insufficient cleaning and disinfection as a cause for high incidences of ESBL/AmpC-producing *E. coli* in broiler farms. The positive findings for various environmental samples at the first sampling date in our study support this hypothesis. Moreover, we showed a significant increase in the detection of ESBL/AmpC-producing *E. coli* from the first to the second samplings in animal as well as in environmental samples. In one farm there was no detection at all at the first sampling but very high detection rates of 95 and 100% during the following samplings. This leads to the suggestion of an enrichment of ESBL/AmpC-producing *E. coli* in the course of a fattening period in animals and/or in their environment.

Costa et al. (11) described the high concentration of animals in conventional flocks, such as the farms investigated in our study, as a possible cause of the high concentration of these pathogens in the animal house, which also facilitates/enhances the transmission of ESBL/AmpC-producing *E. coli* among animals. Additionally, our results show that feces, litter, and even dust may act as transmission sources of ESBL/AmpC-producing *E. coli* within a broiler barn; therefore, the organism may be on a farm and in different barns due to the use of the same equipment, shoes, or clothes. The fact that ESBL/AmpC-producing *E. coli* represents a high proportion out of all *E. coli* organisms in pooled feces and dust samples shows the high relevance of environmental samples as a source of transmission.

Another factor that may have influenced the high detection frequencies in our investigated farms is the use of antibiotics. As

only farm 3 used beta-lactam antibiotics, coselection under antibiotic pressure has to be discussed as a possible cause for the enrichment of ESBL/AmpC-producing *E. coli* on broiler fattening farms (3, 11, 32–34). In our study, 6 out of 7 ESBL/AmpC-positive broiler fattening flocks were treated with antibiotics, mainly enrofloxacin and colistin. The assumed coselection in our obtained ESBL/AmpC-producing isolates will be investigated in this ongoing project. In contrast, Hiroi et al. (31) demonstrated that non-beta-lactam antibiotics do not promote the development of ESBL producers at broilers in each case. Those authors suggested initial contamination of barns due to insufficient cleaning and disinfection as major causes for the high incidence of ESBL/AmpC-producing *E. coli* on broiler farms. In our study, even in the flock without any antibiotic treatment, ESBL/AmpC-producing *E. coli* were detected at a level of 100% in individual animal samples at the end of the fattening period. The high detection frequency (85%) in animal samples from this farm at the beginning of the fattening period suggests entry via hatched chicks or contaminated barn environments. As all investigated barns were from farms that tested positive for ESBL/AmpC-producing *E. coli* in the initial investigation, coselection may not be necessary for spread of ESBL/AmpC-producing *E. coli* within the farms in such high-prevalence situations.

Nevertheless, the influence of antibiotic treatment on ESBL prevalence seems likely; however, due to the small number of untreated farms in our study, this presumption could be not statistically proved. Further investigations about the role of different factors are necessary.

The high detection frequencies of ESBL-producing *E. coli* in this study are comparable to those of reports of other European investigations carried out at the farm or slaughterhouse level (1, 3, 10, 11, 34–36). In addition to these one-time samplings, our long-term investigations show increased detection frequencies of ESBL/AmpC-producing *E. coli* on most of the investigated farms during the fattening period. Even the barn without any findings of ESBL/AmpC-producing *E. coli* at the first sampling showed high detection frequencies, from 95 to 100%, in individual animal samples. Consequently, the time points of samplings also could influence the prevalence in screening studies.

Nevertheless, the spread of ESBL/AmpC-producing *E. coli* in healthy chickens and inside broiler barns is recognized worldwide, although differences in prevalence in different farms and countries are obvious (4). The wide spread of ESBL/AmpC-producing *E. coli* in food animals, especially in broilers, represents an issue of food safety. To this end, a recent German study detected ESBL-producing *Enterobacteriaceae*, predominantly *E. coli*, in 43.9% of 399 poultry meat samples. However, plasmid-mediated AmpC-producing microorganisms were not detected due to the experimental setup (17). In addition, Egea et al. (37) reported a contamination of raw poultry meat with ESBL-producing *E. coli* of 93.3%. Cohen et al. (18) also reported that 94% of chicken meat samples harbored at least one *E. coli* isolate with an ESBL phenotype. Viewed in context with our results, this is very alarming due to hypothesized transmission to humans via the food chain (38, 39).

We demonstrated that, including the results of PCR and disc diffusion testing, 99.2% of our investigated isolates could be confirmed as ESBL/AmpC producers, which is alarming.

Interestingly, on farms 3 and 4, mainly *bla*_{SHV-12} and *bla*_{TEM-52} genes were detected in all samples during the entire fattening period. These two individual barns belong to the same large fattening company, which leads to the suggestion that each fattening

chain, including hatcheries, grandparent, and parent flocks, harbors a specific ESBL/AmpC gene pool. Further studies investigating the whole broiler production chain in detail are necessary to confirm this hypothesis. The first reported instance of a *Salmonella* isolate encoding carbapenemases (VIM-1) originated from poultry on one of the farms (G1). This isolate also encoded AmpC (40).

E. coli isolates in our study mainly harbored *bla*_{CMY} genes, often in combination with *bla*_{TEM-1}. Additionally, *bla*_{SHV-12}, genes of the *bla*_{CTX-M} group, and (sporadically) *bla*_{TEM-52} were detected. This is in line with the first detection of ESBL/AmpC-producing *E. coli* strains in healthy chickens harboring the resistance genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV-12}, and *bla*_{CMY} (8) and is comparable to findings in numerous other studies on healthy broilers (9, 12, 14, 41).

Recently, a German study on ESBL-producing *E. coli* in chicken meat samples most frequently found the genes *bla*_{SHV-12}, *bla*_{TEM-52}, and *bla*_{CTX-M-1} (17). The detection of the same ESBL genes in German broiler fattening farms as well as in chicken meat samples suggests a possible risk of transmission between animals and humans, which is in agreement with a study by Leverstein-van Hall et al. (42). Another study also showed identical ESBL genes, *bla*_{CTX-M-1} and *bla*_{TEM-52}, in poultry meat and human rectal swabs, which confirms possible transmission (19). Cortes et al. (9) even suggested that ESBL/AmpC-producing isolates, recovered from poultry, can have a higher pathogenicity for humans. However, there is no data on the exact risk of transmission of these pathogens between animals and humans.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was financially supported by the Federal Ministry of Education and Research (funding number 01KI1013C) as part of the joint research consortium RESET (<http://www.reset-verbund.de>).

We gratefully thank N. Roschanski, I. Rodríguez, and J. Fischer for scientific advice. All cooperating farmers and veterinarians, as well as the excellent technical assistance of H. Jansen, M. Thieck, S. Sellenthin, and K. Fiedler (Institute for Animal Hygiene and Environmental Health), are gratefully acknowledged.

REFERENCES

1. Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme (DANMAP). 2011. Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark. <http://www.danmap.org>.
2. Canton R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, Coque TM. 2008. Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 14:144–153.
3. Dierikx C, van der Goot J, Fabri T, van Essen-Zandbergen A, Smith H, Mevius D. 2012. Extended-spectrum-beta-lactamase- and AmpC-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Dutch broilers and broiler farmers. *J. Antimicrob. Chemother.* 68:60–67.
4. Ewers C, Bethe A, Semmler T, Guenther S, Wieler LH. 2012. Extended-spectrum beta-lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. *Clin. Microbiol. Infect.* 18:646–655.
5. Livermore DM, Hawkey PM. 2005. CTX-M: changing the face of ESBLs in the UK. *J. Antimicrob. Chemother.* 56:451–454.
6. Pitout JD, Laupland KB. 2008. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *Lancet Infect. Dis.* 8:159–166.
7. Platell JL, Johnson JR, Cobbold RN, Trott DJ. 2011. Multidrug-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* of sequence type ST131 in animals and foods. *Vet. Microbiol.* 153:99–108.
8. Brinas L, Moreno MA, Zarazaga M, Porrero C, Saenz Y, Garcia M, Dominguez L, Torres C. 2003. Detection of CMY-2, CTX-M-14, and

LONGITUDINAL MONITORING OF ESBL/AMPC-PRODUCING ESCHERICHIA COLI IN GERMAN BROILER CHICKEN FATTENING FARMS

Laube et al.

- SHV-12 beta-lactamases in *Escherichia coli* fecal-sample isolates from healthy chickens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:2056–2058.
- Cortes P, Blanc V, Mora A, Dahbi G, Blanco JE, Blanco M, Lopez C, Andreu A, Navarro F, Alonso MP, Bou G, Blanco J, Llagostera M. 2010. Isolation and characterization of potentially pathogenic antimicrobial-resistant *Escherichia coli* strains from chicken and pig farms in Spain. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:2799–2805.
 - Smet A, Martel A, Persoons D, Dewulf J, Heyndrickx M, Catry B, Herman L, Haesebrouck F, Butaye P. 2008. Diversity of extended-spectrum beta-lactamases and class C beta-lactamases among cloacal *Escherichia coli* isolates in Belgian broiler farms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:1238–1243.
 - Costa D, Vinue L, Poeta P, Coelho AC, Matos M, Saenz Y, Somalo S, Zarazaga M, Rodrigues J, Torres C. 2009. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates in faecal samples of broilers. *Vet. Microbiol.* 138:339–344.
 - Dierikx C, van Essen-Zandbergen A, Veldman K, Smith H, Mevius D. 2010. Increased detection of extended spectrum beta-lactamase producing *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolates from poultry. *Vet. Microbiol.* 145:273–278.
 - Fischer J, Rodriguez I, Schmogger S, Friese A, Roesler U, Helmuth R, Guerra B. 2012. *Escherichia coli* producing VIM-1 carbapenemase isolated on a pig farm. *J. Antimicrob. Chemother.* 67:1793–1795.
 - Blanc V, Mesa R, Saco M, Lavilla S, Prats G, Miro E, Navarro F, Cortes P, Llagostera M. 2006. ESBL- and plasmidic class C beta-lactamase-producing *E. coli* strains isolated from poultry, pig and rabbit farms. *Vet. Microbiol.* 118:299–304.
 - Dierikx CM, van Duijkeren E, Schoormans AH, van Essen-Zandbergen A, Veldman K, Kant A, Huijsdens XW, van der Zwaluw K, Wagenaar JA, Mevius DJ. 2012. Occurrence and characteristics of extended-spectrum-beta-lactamase- and AmpC-producing clinical isolates derived from companion animals and horses. *J. Antimicrob. Chemother.* 67:1368–1374.
 - Jiang HX, Tang D, Liu YH, Zhang XH, Zeng ZL, Xu L, Hawkey PM. 2012. Prevalence and characteristics of beta-lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Escherichia coli* isolated from farmed fish in China. *J. Antimicrob. Chemother.* 67:2350–2353.
 - Kola A, Kohler C, Pfeifer Y, Schwab F, Kuhn K, Schulz K, Balau V, Breitbach K, Bast A, Witte W, Gastmeier P, Steinmetz I. 2012. High prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in organic and conventional retail chicken meat, Germany. *J. Antimicrob. Chemother.* 67:2631–2634.
 - Cohen Stuart J, van den Munckhof T, Voets G, Scharringa J, Fluit A, Hall ML. 2012. Comparison of ESBL contamination in organic and conventional retail chicken meat. *Int. J. Food Microbiol.* 154:212–214.
 - Overdeest I, Willemsen I, Rijsburger M, Eustace A, Xu L, Hawkey P, Heck M, Savelkoul P, Vandenbroucke-Grauls C, van der Zwaluw K, Huijsdens X, Kluytmans J. 2011. Extended-spectrum beta-lactamase genes of *Escherichia coli* in chicken meat and humans, The Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* 17:1216–1222.
 - Ewers C, Antao EM, Diehl I, Philipp HC, Wieler LH. 2009. Intestine and environment of the chicken as reservoirs for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains with zoonotic potential. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:184–192.
 - European Food Safety Authority (EFSA). 2011. Scientific opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum-beta-lactamases and/or AmpC beta-lactamases in food and food-producing animals. *EFSA J.* 9:1–95.
 - Batchelor M, Hopkins K, Threlfall EJ, Clifton-Hadley FA, Stallwood AD, Davies RH, Liebana E. 2005. bla(CTX-M) genes in clinical *Salmonella* isolates recovered from humans in England and Wales from 1992 to 2003. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:1319–1322.
 - Guerra B, Soto SM, Arguelles JM, Mendoza MC. 2001. Multidrug resistance is mediated by large plasmids carrying a class 1 integron in the emergent *Salmonella enterica* serotype [4,5,12:i:-]. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:1305–1308.
 - Weill FX, Demartin M, Tande D, Espie E, Rakotoarivony I, Grimont PA. 2004. SHV-12-like extended-spectrum-beta-lactamase-producing strains of *Salmonella enterica* serotypes Babelsberg and Enteritidis isolated in France among infants adopted from Mali. *J. Clin. Microbiol.* 42:2432–2437.
 - Zhao S, White DG, McDermott PF, Friedman S, English L, Ayers S, Meng J, Maurer JJ, Holland R, Walker RD. 2001. Identification and expression of cephamycinase bla_{CMY} genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from food animals and ground meat. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:3647–3650.
 - Olesen I, Hasman H, Aarestrup FM. 2004. Prevalence of beta-lactamases among ampicillin-resistant *Escherichia coli* and *Salmonella* isolated from food animals in Denmark. *Microb. Drug Resist.* 10:334–340.
 - Wikler MA. 2009. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard, 10th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
 - Sabia C, Gargiulo R, Sarti M. 2012. Evaluation of a double synergy differential test (DSDT) for differential detection of ESBL and AmpC-type beta-lactamases in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis*. *New Microbiol.* 35:221–225.
 - Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard, 11th ed. CLSI document M02-A11. CLSI, Wayne, PA.
 - Mevius DJK, Koene MGJ, Witt B, van Pelt W, Bondt W. 2009. Monitoring of antimicrobial resistance and antibiotic usage in animals in the Netherlands in 2009. Central Veterinary Institute of Wageningen University and Research Centre, Wageningen, The Netherlands.
 - Hiroi M, Matsui S, Kubo R, Iida N, Noda Y, Kanda T, Sugiyama K, Hara-Kudo Y, Ohashi N. 2012. Factors for occurrence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in broiler. *J. Vet. Med. Sci.* 74:1635–1637.
 - Brinas L, Moreno MA, Teshager T, Saenz Y, Porrero MC, Dominguez L, Torres C. 2005. Monitoring and characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy and sick animals in Spain in 2003. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:1262–1264.
 - Smet A, Martel A, Persoons D, Dewulf J, Heyndrickx M, Herman L, Haesebrouck F, Butaye P. 2010. Broad-spectrum beta-lactamases among Enterobacteriaceae of animal origin: molecular aspects, mobility and impact on public health. *FEMS Microbiol. Rev.* 34:295–316.
 - Geser N, Stephan R, Hachler H. 2012. Occurrence and characteristics of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae in food producing animals, minced meat and raw milk. *BMC Vet. Res.* 8:21. doi:10.1186/1746-6148-8-21.
 - Machado E, Coque TM, Canton R, Sousa JC, Peixe L. 2008. Antibiotic resistance integrons and extended-spectrum beta-lactamases among Enterobacteriaceae isolates recovered from chickens and swine in Portugal. *J. Antimicrob. Chemother.* 62:296–302.
 - Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring (SVARM). 2010. Swedish veterinary antimicrobial resistance monitoring. The National Veterinary Institute (SVA), Uppsala, Sweden. <http://www.sva.se>.
 - Egea P, Lopez-Cerero L, Torres E, Gomez-Sanchez Mdel C, Serrano L, Navarro Sanchez-Ortiz MD, Rodriguez-Bano J, Pascual A. 2012. Increased raw poultry meat colonization by extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in the south of Spain. *Int. J. Food Microbiol.* 159:69–73.
 - Levy SB, FitzGerald GB, Macone AB. 1976. Spread of antibiotic-resistant plasmids from chicken to chicken and from chicken to man. *Nature* 260:40–42.
 - Vincent C, Boerlin P, Daignault D, Dozois CM, Dutil L, Galanakis C, Reid-Smith RJ, Tellier PP, Tellis PA, Ziebell K, Manges AR. 2010. Food reservoir for *Escherichia coli* causing urinary tract infections. *Emerg. Infect. Dis.* 16:88–95.
 - Fischer J, Rodriguez I, Schmogger S, Friese A, Roesler U, Helmuth R, Guerra B. 2012. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* producing VIM-1 carbapenemase isolated from livestock farms. *J. Antimicrob. Chemother.* 68:478–480.
 - Randall LP, Clouting C, Horton RA, Coldham NG, Wu G, Clifton-Hadley FA, Davies RH, Teale CJ. 2011. Prevalence of *Escherichia coli* carrying extended-spectrum beta-lactamases (CTX-M and TEM-52) from broiler chickens and turkeys in Great Britain between 2006 and 2009. *J. Antimicrob. Chemother.* 66:86–95.
 - Leverstein-van Hall MA, Dierikx CM, Cohen Stuart J, Voets GM, van den Munckhof MP, van Essen-Zandbergen A, Platteel T, Fluit AC, van de Sande-Bruinsma N, Scharinga J, Bonten MJ, Mevius DJ. 2011. Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. *Clin. Microbiol. Infect.* 17:873–880.

Als zweiter wichtiger Teil der vorliegenden Arbeit steht die Untersuchung der verschiedenen möglichen Emissionswege ESBL-produzierender Enterobakterien, speziell *E. coli*, aus den Masthähnchenhaltungen heraus in die Umwelt im Vordergrund. Der besondere Fokus liegt dabei auf der Untersuchung der potentiellen aerogenen sowie fäkalen Emission der ESBL/AmpC-produzierenden *E. coli* in die direkte Stallumgebung.

2.2 TRANSMISSION OF ESBL/AMPC-PRODUCING ESCHERICHIA COLI FROM BROILER CHICKEN FARMS TO SURROUNDING AREAS

veröffentlicht in: Laube, H., Friese, A., von Salviati C., Guerra, B., Roesler, U., 2014. TRANSMISSION OF ESBL/AMPC-PRODUCING ESCHERICHIA COLI FROM BROILER CHICKEN FARMS TO SURROUNDING AREAS, Journal of Veterinary Microbiology (No. VETMIC-D-14-9237R3 June 2014)

DOI: 10.1016/j.vetmic.2014.06.008

You must purchase this part online.

3 DISKUSSION

Weltweit wird über einen Anstieg der Nachweishäufigkeiten ESBL/AmpC-bildender Bakterien, besonders *Escherichia coli*, in Lebensmittelliefernden Tieren, darunter auch häufig bei Masthähnchen, berichtet. Auch gesunde Tiere kommen als Reservoir der resistenten Bakterien infrage (Costa et al., 2009). Doch über die Verbreitungswege der resistenten Erreger innerhalb der verschiedensten Tierpopulationen sowie deren Besiedlungsdynamik ist nur sehr wenig bekannt. Auch über die Verbreitung und Verbreitungswege der Bakterien in der Umwelt, beispielsweise aus Masthähnchenhaltungen heraus, in die direkte Umgebung der Ställe, konnte bisher nur spekuliert werden.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Verbreitung ESBL/AmpC-produzierender *E. coli* in Masthähnchenhaltungen sowie deren Besiedlungsdynamik bzw. Prävalenz innerhalb verschiedener Maststadien zu untersuchen. Darüber hinaus sollten potentielle Verbreitungswege der resistenten Mikroorganismen sowohl innerhalb des Tierstalles als auch in die direkte Umgebung des Stalles untersucht werden. Dazu wurden erstmals sieben konventionell bewirtschaftete Masthähnchenbetriebe innerhalb und außerhalb des Stalles systematisch auf das Vorkommen ESBL/AmpC-bildender *Escherichia coli* sowie auf die Besiedlungsdynamik dieser resistenten Bakterien hin untersucht. Nach einem Vorscreening wurden in 7 ausgewählten Masthähnchenhaltungen mit positivem ESBL/AmpC-Status umfangreiche Probenahmen durchgeführt. Dabei wurde jeder Betrieb und der ausgewählte repräsentative Stall sowie eine definierte Umgebung des Stalles, dreimalig (Anfang-, Mitte- und Ende der Mast) innerhalb einer Mastperiode beprobt und auf das Vorhandensein ESBL/AmpC-produzierender *E. coli* hin untersucht.

Mit dieser Arbeit ist es gelungen, den Verlauf der Nachweishäufigkeit ESBL/AmpC-produzierender *E. coli* bzw. deren Besiedlungsdynamik innerhalb einer Mastperiode sowohl beim Tier als auch in der Tierumgebung zu zeigen. Darüber hinaus konnten mögliche Eintragswege der resistenten Bakterien und Wege der Verbreitung innerhalb des Tierstalles aufgezeigt werden. Zusätzlich wurden durch die umfangreichen Untersuchungen erstmals verschiedene Transmissionswege der ESBL/AmpC-produzierenden *E. coli* aus Broilermastbetrieben heraus in die Umwelt oder umgekehrt aufgedeckt und bewiesen.

3.1 VORKOMMEN ESBL/AMPC-PRODUZIERENDER *E. COLI* IN MASTHÄHNCHENBETRIEBEN

Ein wichtiges Ergebnis dieser Studie ist die sehr hohe Nachweishäufigkeit ESBL/AmpC-produzierender *E. coli* in konventionell betriebenen deutschen Masthähnchenbetrieben. Sowohl in Tier- als auch in Stallumgebungsproben wurden die resistenten Bakterien regelmäßig nachgewiesen.

Im Jahr 2003 wiesen Brinas et al. (2003) erstmals ESBL/AmpC-produzierende *E. coli* in Kotproben gesunder Mastbroiler nach (Brinas et al., 2003). Bereits ein Jahr darauf berichtete dieselbe spanische Forschergruppe über einen Anstieg der Nachweishäufigkeit der resistenten Erreger (Brinas et al., 2005). In den darauf folgenden Jahren wurde nicht nur in Europa, wie beispielsweise in Spanien (Blanc et al., 2006), Frankreich (Girlich et al., 2007), Belgien (Smet et al., 2008), Portugal (Costa et al., 2009; Machado et al., 2008), Italien (Bortolaia et al.,

2010) oder den Niederlanden (Dierikx et al., 2010; Leverstein-van Hall et al., 2011) über das Vorkommen ESBL/AmpC-produzierender *E. coli* in gesunden Broilern berichtet. Auch in Japan (Kojima et al., 2005), Taiwan (Yan et al., 2004) oder China (Li et al., 2010a; Li et al., 2010b; Liu et al., 2007) wurden ESBL/AmpC-produzierende *E. coli* aus Proben gesunder Tiere nachgewiesen. Der Prozentsatz an Proben, in denen ESBL/AmpC-produzierende *E. coli* nachgewiesen werden konnten, variiert in den verschiedenen Studien zwischen 1,3% und 85%. Allerdings muss erwähnt werden, dass es sich bei den meisten in der Literatur beschriebenen Proben ausschließlich um Sammelkotproben und/oder Kloakentupferproben handelte, welche entweder noch im Mastbetrieb, zum Ende der Mastperiode oder aber im Schlachthof entnommen wurden. In der hier beschriebenen Studie wurden dagegen zusätzlich zu den Einzeltierproben auch zahlreiche andere Probenmatrices, wie z. B. Sammelstaub, Sockentupfer, Einstreuproben aber auch Luftproben, mehrmals im Verlauf einer Mastperiode untersucht.

Mit durchschnittlichen Nachweishäufigkeiten von 51 % bis 76 % bezogen auf die Einzeltierproben, zeigen unsere Ergebnisse eine hohe Besiedlung deutscher Masthähnchenbetriebe mit ESBL/AmpC-produzierenden *E. coli*. Weiterhin konnte durch die hier erstmals durchgeführte Longitudinaluntersuchung gezeigt werden, dass in allen sieben untersuchten deutschen Masthähnchenbetrieben, zu allen Beprobungszeitpunkten in mindestens einer Probe ESBL/AmpC-produzierende *E. coli* nachweisbar waren. Zu gleichen Ergebnissen kamen, allerdings nicht in einer Longitudinaluntersuchung, unter anderem auch Smet et al. (2008), Simner et al. (2011) und Dierikx et al. (2012) (Dierikx et al., 2012a; Simner et al., 2011; Smet et al., 2008). Auch hier konnten in allen getesteten Broilermastbetrieben ESBL/AmpC-produzierende *E. coli* nachgewiesen werden.

3.2 NACHWEIS DER ESBL/AMPC-PRODUZIERENDEN *E. COLI* IN GESUNDEN EINZELTIEREN

Im Rahmen dieser Studie wurden in sieben Masthähnchenbetrieben dreimalig im Verlauf einer Mastperiode (1.-2. Lebenstag; 14.-18. Lebenstag, 26.-35. Lebenstag) je zwanzig klinisch gesunde Masthähnchen mittels Kloakentupferproben auf ESBL/AmpC-produzierende *E. coli* hin untersucht. Im Ergebnis kam es zu einer hohen Nachweishäufigkeit der resistenten Mikroorganismen in den Kloakentupfern der Einzeltiere. Mit Ausnahme eines beprobten Stalles ist darüber hinaus bemerkenswert, dass bereits die frischeingestellten Eintagsküken mit einer Einzeltierprävalenz von 20 % bis 95 % positiv auf ESBL/AmpC-produzierende *E. coli* getestet wurden. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen beispielsweise auch andere Wissenschaftler (Mevius et al., 2009). Dies wirft die Frage auf, ob nicht frischgeschlüpfte Eintagsküken einen der Haupteintragswege der resistenten Bakterien in die Hähnchenmast darstellen.

In den Niederlanden zeigten in diesem Zusammenhang Mevius et al. (2009), dass die Gefahr der Einschleppung von ESBL/AmpC-produzierenden *E. coli* in die Broilerproduktionskette bereits zwei Schritte vor der Aufzucht der Masttiere erfolgen kann (Mevius et al., 2009). Die Einschleppung erfolgt eventuell bereits mit der Einnistung positiver Küken in den Großeltern-tierherden. Die Forscher wiesen in 22,5 % bis 44 % der zur Aufstallung von Großeltern-tierherden verwendeten Eintagsküken ESBL-produzierende *E. coli* nach. In der gleichen Studie lag die Nachweishäufigkeit für diese Bakterien in Eintagsküken der zur Broilermast aufgestellten Tiere bei 3,3 %. Die in unserer Studie vergleichsweise viel höhere Nachweishäufigkeit von 51 % in einem Tag alten Masthähnchenküken, macht die Relevanz

der Einschleppung der resistenten Bakterien durch besiedelte Eintagsküken deutlich. Detaillierte Untersuchungen möglicher vertikaler Transmissionswege ESBL/AmpC-produzierender *E. coli* von Bruteiern in die Eintagsküken bzw. entlang der verschiedenen Produktionsstufen der Broilermast sind von grundlegender Bedeutung und sollten in weiteren Studien berücksichtigt werden. Nicht zuletzt, um einen Beitrag zur Entwicklung und Validierung von Interventionsmaßnahmen gegen die stetige Verbreitung der resistenten Mikroorganismen in der Masthähnchenproduktion zu leisten.

3.2.1 VORKOMMEN UND VERBREITUNG VON ESBL/AMPC-PRODUZIERENDER *E. COLI* INNERHALB DES TIERSTALLES

Systematische Untersuchungen der direkten Tierumgebung, im Zusammenhang mit ESBLs/AmpCs und deren Verbreitung in den Tierställen, sind in der Literatur nicht beschrieben. Um aber eine ganzheitliche Aussage über das Vorkommen und die Verbreitung ESBL/AmpC-produzierender *E. coli* in den Masthähnchenbetrieben sowie deren Besiedlungsdynamik innerhalb einer Mastperiode treffen zu können, wurden in der hier beschriebenen Arbeit erstmalig zusätzlich zu den Einzeltierproben, zahlreiche Proben der direkten Tierumgebung untersucht. Zu jedem Untersuchungszeitpunkt wurden in jedem Betrieb Sammelkot, Sammelstaub, Einstreu, Sockentupferproben sowie Umgebungstupfer der Wände, der Waage/Gaskanone, der Tröge und der Wassernippel auf ESBL/AmpC-produzierende *E. coli* getestet.

Als Ergebnis konnten in allen untersuchten Sammelkotproben, in 95,2 % der Einstreuproben sowie in 90,4 % der Sockentupferproben ESBL/AmpC-produzierende *E. coli* nachgewiesen werden. Auch die untersuchten Sammelstaub- und Umgebungstupferproben waren zu 71,4 % bzw. 54,2 % positiv für die resistenten Mikroorganismen. Es muss an dieser Stelle hervorgehoben werden, dass die resistenten Bakterien bereits zum ersten Untersuchungszeitpunkt in nahezu allen Betrieben (Ausnahme G6) in Sammelkot und Einstreu sowie in mindestens einem der vier Umgebungstupfer nachweisbar waren. Diese Ergebnisse lassen die Frage zu, ob auch kontaminierte Einstreu und/oder unzureichende Reinigung und Desinfektion des Stalles sowie der Stalleinrichtungen wie Waagen, Gaskanonen, Tränkwasserleitungen und Futtertrögen zur Anreicherung und Verbreitung der ESBLs/AmpCs im Tierstall und nicht zuletzt in den Tieren selbst beitragen. Es kann darüber spekuliert werden, ob und in welchem Umfang initial ESBL/AmpC-freie Tiere die resistenten Bakterien, beispielsweise durch bepicken kontaminierter Einstreu oder anderer Stalleinrichtungen, aufnehmen. Die dabei interessante Frage nach der minimal aufzunehmenden Dosis an ESBL/AmpC-*E. coli*, die erforderlich ist, um ein Masthähnchen erfolgreich zu besiedeln, wird sowohl in dieser Studie als auch in der aktuellen Literatur allerdings nicht beantwortet.

In diesem Zusammenhang beschreiben Hiroi et al. (2012), im Rahmen einer experimentellen Studie, dass initial kontaminierte Masthallen in Folge unzureichender Reinigung und Desinfektion eine Ursache für die hohe Inzidenz ESBL/AmpC-produzierender *E. coli* in Broilerhaltungen darstellen können (Hiroi et al., 2012). Die positiven Befunde in verschiedenen Umweltproben, die während der ersten Probenahme in unserer Studie gezeigt wurden, unterstützen diese Hypothese und verdeutlichen die Wichtigkeit einer sachgemäßen Reinigung und Desinfektion der Broilermasthallen und Stalleinrichtung vor einer Wiederbelegung. Zudem werfen diese Ergebnisse die Frage auf, ob ESBL/AmpC-produzierende *E. coli* möglicherweise auch erweiterte Resistenzen gegenüber gängigen

Desinfektionsmitteln zeigen. Um die Broilermasthallen in Zukunft optimal dekontaminieren zu können, sollte in folgenden Studien auch dieser Fragestellung nachgegangen werden.

3.2.2 NACHWEIS ESBL/AMPC-PRODUZIERENDER *E. COLI* IN DER STALLLUFT

Zusätzlich zu den oben beschriebenen Stallumgebungsproben wurden in jedem Stall je drei Luftproben mittels Impingement auf ESBL/AmpC-produzierende *E. coli* untersucht. Dabei konnten in vier von sieben Masthähnchenbetrieben ESBL/AmpC-produzierenden *E. coli* in der Stallluft nachgewiesen werden. Insgesamt waren 16% aller Luftproben positiv für ESBL/AmpC-produzierende *E. coli*, bezogen auf alle Untersuchungszeitpunkte aller sieben Betriebe im Verlauf der Mastperiode. Obwohl nur wenige kultivierbare *E. coli* in der Stallluft nachgewiesen werden konnten, ist der Anteil an ESBL/AmpC-produzierenden *E. coli* in der Luft mit 17 % relativ hoch.

Chinivasagam et al. (2009) berichten für *E. coli* über maximale Nachweisraten von 10^5 KBE/m³ Stallluft (Chinivasagam et al., 2009). Weitere Studien beschreiben die generell geringe Nachweisbarkeit gram-negativer Bakterien aus der Luft von Tierställen, bedingt durch deren schlechte Überlebensrate in der Luft (Chinivasagam et al., 2010; Handley and Webster, 1995). Teilweise bedingt auch die Sammelmethode mittels Impinger, durch Zerstörung/Verletzung der Zellen während des Sammelprozesses, die geringe Nachweishäufigkeit und Kultivierbarkeit, obwohl das Impingement insgesamt als schonendstes Keimsammelverfahren angesehen wird. Der in der hier beschriebenen Studie ermittelte maximale Wert an *E. coli* in der Stallluft von $3,6 \times 10^6$ KBE/m³ Luft ist im Vergleich ein wenig höher als die in der Literatur bisher beschriebenen Werte.

Von 63 Luftproben lieferten drei Proben quantifizierbare Ergebnisse. Im geometrischen Mittel lag die Anzahl der phänotypisch ESBL/AmpC-produzierenden *E. coli* aller positiven Luftproben bei $3,4 \times 10^3$ KBE/m³ Luft. Der quantitative Nachweis der *E. coli* allgemein war bei Verwendung von Gassner Agar in 12 Luftproben möglich und führte zu einem geometrischen Mittelwert von $2,07 \times 10^4$ KBE/m³ Luft, resultierend in einem Anteil von 17% ESBL/AmpC-produzierender *E. coli* an der gesamt *E. coli*-Anzahl der in der Stallluft detektierten und quantifizierbaren Bakterien.

Der hohe Anteil von 17% der ESBL/AmpC-produzierender *E. coli* an der gesamten *E. coli* Anzahl aller quantifizierbaren Stallluftproben kann durch die hohe Prävalenz der resistenten Bakterien in Staub, Kot und Einstreu im Stall erklärt werden. Denn es ist bekannt, dass 80% der Mikroorganismen in der Stallluft an Staubteilchen gebunden sind und so transportiert werden können. Der mit den Mikroorganismen beladene, im Tierstall zu findende Staub besteht dabei hauptsächlich aus Einstreuteilchen sowie tierischen Bestandteilen in Form von Kot, Hautschuppen oder Federn (Chinivasagam et al., 2010; Pearson, 1995; Seedorf et al., 1998). Der in der hier vorliegenden Untersuchung vergleichsweise hohe Anteil an ESBL/AmpC-produzierenden *E. coli* in der Stallluft liefert einen ersten Hinweis darauf, dass auch mit ESBL/AmpC-produzierenden *E. coli* beladene Stallluft sowie der kontaminierte Staub eine Verbreitungsquelle der Bakterien im Stall, aber auch in die Umwelt, darstellen können.

3.3 BESIEDLUNGSDYNAMIK ESBL/AMPC-PRODUZIERENDER *E. COLI* IN MASTHÄHNCHENBETRIEBEN

Neben dem Nachweis der ESBL/AmpC produzierenden *E. coli* in Kloakentupfern klinisch gesunder Masthähnchen und deren hoher Prävalenz in Eintagsküken, konnte ein signifikanter Anstieg der Nachweishäufigkeit der resistenten Bakterien im Verlauf der Mastperiode nachgewiesen werden. Dieser Prävalenzanstieg konnte sowohl in den Einzeltierproben als auch in den Proben der Tierumgebung vom ersten zum zweiten sowie vom ersten zum dritten Untersuchungszeitpunkt gezeigt werden.

Der Anstieg der Nachweishäufigkeit ESBL/AmpC-produzierender *E. coli* im Verlauf der Mastperiode macht deutlich, dass bei der Ermittlung des ESBL/AmpC-Status in Masthähnchenbetrieben, der Untersuchungszeitpunkt eine entscheidende Rolle spielt. Bei Tieren ab einem Alter von 14 Tagen scheint die Nachweisrate für ESBLs/AmpCs höher zu sein. Die in der gegenwärtigen Literatur beschriebenen, zum Teil hohen Nachweisraten für die resistenten Bakterien lassen sich durch diese Erkenntnis besser einordnen, denn meist wurden Tiere kurz vor der Schlachtung beprobt (Costa et al., 2009; Smet et al., 2008).

Neben dem möglichen Eintrag der ESBLs/AmpCs über positive Eintagsküken, kann in der hier beschriebenen Arbeit auch ein Einfluss der Tierumgebung auf den ESBL/AmpC-Status der Masthähnchenherde belegt werden. Hohe Nachweisraten an ESBL/AmpC produzierenden *E. coli* in Einstreuproben, Sammelstaub, sowie den Umgebungstupfern als auch der signifikante Anstieg der Nachweishäufigkeit im Verlauf der Mastperiode, lassen eine Anreicherung der resistenten Bakterien in der Tierumgebung vermuten.

Costa et al. (2009) sehen in der hohen Besatzdichte der konventionellen Masthähnchenhaltung eine mögliche Ursache für die hohe Konzentration der Erreger im Stall (Costa et al., 2009). Die hohe Besatzdichte in den Ställen erleichtert/verbessert laut den Autoren die Übertragung von ESBL/AmpC-produzierenden *E. coli* unter den Tieren. Darüber hinaus zeigen unsere Ergebnisse, dass Kot, Staub, Einstreu und sogar Luft potentielle Übertragungsquellen der ESBL/AmpC-produzierenden *E. coli* in Broilermastställen darstellen. Auch die Übertragung der resistenten Bakterien innerhalb eines Mastbetriebes, zwischen verschiedenen Masthallen, beispielsweise durch die Verwendung betriebsübergreifender Geräte und Ausrüstungen wie Schubkarren, Schuhen oder Kleidung, kann nicht ausgeschlossen werden. Zudem verdeutlicht die Tatsache, dass ESBL/AmpC-produzierende *E. coli* einen hohen Anteil an der gesamt *E. coli* Zahl in Sammelkotproben und Staubproben haben, die hohe Relevanz von Umweltproben als Quelle der Resistenzverbreitung innerhalb des Stalles.

Ein weiterer Faktor, der die hohen Nachweisraten der ESBL/AmpC-produzierenden *E. coli* in Broilermastbetrieben beeinflusst haben kann, ist der Einsatz von Antibiotika. Es wird darüber diskutiert, ob der Einsatz verschiedenster Antibiotikaklassen in der Masthähnchenproduktion zur Co-Selektion der resistenten Mikroorganismen führt und damit als mögliche Ursache für die Anreicherung von ESBL/AmpC -produzierenden *E. coli* in Masthähnchenbetrieben verantwortlich ist (Brinas et al., 2005; Costa et al., 2009; Dierikx et al., 2012b; Geser et al., 2012; Smet et al., 2010).

In unserer Studie wurden sechs von sieben ESBL/AmpC - positive Masthähnchenherden mit Antibiotika, vor allem Enrofloxacin und Colistin, behandelt. Nur in einem der untersuchten Betriebe wurden Beta-Laktam-Antibiotika eingesetzt. Diese Ergebnisse lassen durchaus eine

Co-Selektion unter antimikrobiellem Druck vermuten. Gegen diese Hypothese spricht allerdings, dass in einem der untersuchten Betriebe gar keine Antibiotika eingesetzt wurden, die Einzeltierproben aber zu 85 % bis 100 % positiv für ESBL/AmpC-produzierende *E. coli* waren. In diesem Fall ist jedoch zu beachten, dass für alle untersuchten Broilermastbetriebe bereits ein positiver ESBL/AmpC-Status bekannt war. Möglicherweise wurde die Co-Selektion, bedingt durch die hohe initiale Prävalenz der ESBL/AmpC-produzierenden Bakterien in den Tierställen, begünstigt. Hiroi et al. (2012) argumentieren in diesem Zusammenhang, dass die Gabe von Antibiotika die Entwicklung/Anreicherung der ESBL/AmpC-Produzenten nicht in jedem Fall fördert (Hiroi et al., 2012). Die Autoren vermuten als Hauptursache für die hohe Inzidenz von ESBL/AmpC - produzierenden *E. coli* in Masthähnchenbetrieben, eine unzureichende Reinigung und Desinfektion initial kontaminierter Ställe. Die Ergebnisse in Betrieb G6 sowie die hohe Nachweishäufigkeit der resistenten Bakterien in Umgebungsproben bereits zum ersten Untersuchungszeitpunkt untermauern diese Hypothese.

Dennoch scheint der Einfluss antibiotischer Behandlungen auf die ESBL/AmpC- Prävalenz der Broilermastbetriebe nicht unwahrscheinlich. Die vorliegende Studie ist allerdings in der Argumentationskette zum Einfluss der Antibiotikaawendungen auf die ESBL/AmpC-Prävalenz in den Betrieben nicht aussagekräftig genug, da die Anzahl an mit Antibiotika behandelten, aber vor allem unbehandelten landwirtschaftlichen Betrieben nicht groß genug war, um statistisch signifikante Beweise für einen antimikrobiellen Einfluss zu liefern. Um den tatsächlichen Einfluss des Antibiotikamanagements auf die ESBL/AmpC-Prävalenz der Betriebe ermitteln zu können, wären Untersuchungen mit größerer Stichprobenmenge und vor allem auch deutlich mehr ESBL/AmpC-negative Betriebe erforderlich. Ausgedehnte Untersuchungen, beispielsweise im Rahmen deutschlandweiter Querschnittstudien zur Ermittlung der verschiedenen Einflussfaktoren des Antibiotika- und Betriebsmanagements, wären hier von besonderem Interesse.

3.4 TRANSMISSION ESBL/AMPC-PRODUZIERENDER *E. COLI*

Systematische Studienergebnisse zum Vorkommen ESBL/AmpC-produzierender *E. coli* in der Umwelt oder deren mögliche Emission aus Broilermastanlagen existieren in der aktuellen Literatur leider nicht. Es ist allerdings bekannt, dass diese resistenten Bakterien ubiquitär in der Umwelt nachzuweisen sind. Auch in Wildtieren, wie Greifvögeln und auch Eulen, Rehwild, Füchsen (Costa et al., 2009; Literak et al., 2010a; Literak et al., 2010b), Möwen (Bonnedahl et al., 2010; Radhouani et al., 2009) Wildschweinen (Poeta et al., 2009) oder Ratten (Guenther et al., 2012b) konnten ESBL-bildende Bakterien nachgewiesen werden. Weiterhin konnten vereinzelt ESBL/AmpC - produzierende *E. coli* in Bodenproben bzw. Sockentupferproben bewirtschafteter Felder nachgewiesen werden (Friese et al., 2013a; Hartmann et al., 2012). Über den Ursprung der in der Umwelt nachgewiesenen Isolate konnte bisher jedoch nur spekuliert werden.

Um detaillierte Aussagen über eine potentiell stattfindende Emission der resistenten Bakterien aus Masthähnchenställen hinaus in die Umwelt treffen zu können, wurden in der vorliegenden Studie unter anderem Gülleproben, zahlreiche Sockentupferproben der Stallumgebung in Abhängigkeit der Windrichtung und unterschiedlichen Abständen zum Tierstall sowie Luftproben innerhalb und außerhalb des Tierstalles auf ESBL/AmpC - produzierende *E. coli* und deren Verwandtschaft untersucht. Es ist hier gelungen, einen klonalen Zusammenhang zwischen *E. coli* Isolaten aus Broilermastbetrieben und Umweltisolaten herzustellen. Damit konnte erstmals systematisch gezeigt werden, dass sowohl aerogene als auch fäkale Emission ESBL/AmpC-produzierender *E. coli* aus Masthähnchenbetrieben stattfinden kann und somit einen möglichen Weg der Resistenzen in die Umwelt darstellt.

3.4.1 FÄKALE EMISSION

Im Jahr 2012 berichteten Hartmann et al. (2012) erstmals über einen aus Rottemist isolierten, CTX-M-1 positiven *E. coli* Stamm aus einem Rinderbestand in Frankreich (Hartmann et al., 2012). In der beschriebenen Studie konnten zudem ebenfalls CTX-M-1 positive *E. coli* in zwei Proben kultivierter und bewirtschafteter Böden nachgewiesen werden. Diese beprobten Böden wurden nachweislich ein Jahr zuvor mit Rottemist des ESBL positiven Rinderbestandes gedüngt. Mit Hilfe der Puls-Feld-Gel-Elektrophorese (PFGE) konnte zwischen dem Isolat aus Rottemist und einem der ebenfalls CTX-M-1 positiven Umweltisolate eine klonale Verwandtschaft nachgewiesen werden (Hartmann et al., 2012). In Deutschland berichteten Friese et al. (2013) erstmals über die mögliche fäkale Emission ESBL/AmpC-produzierender *E. coli* aus Tierställen in die Umwelt (Friese et al., 2013a). Hier wurden die Gülle sowie bewirtschaftete und nachweislich begüllte Felder der Stallumgebung von Schweine- und Geflügelmastbetrieben auf ESBL/AmpC hin untersucht. Eine Vielzahl der Gülleproben beider Tierarten wurden positiv auf ESBL/AmpC-produzierende *E. coli* getestet. Auch in den Sockentupferproben der bewirtschafteten Felder konnten teilweise die resistenten Erreger nachgewiesen werden. Auch in dieser Studie wird ein Austrag der resistenten Bakterien über Schweine- und/oder Geflügelgülle in die Umgebung diskutiert, wobei jedoch keine weiterführenden Untersuchungen, z.B. zu klonalen Zusammenhängen der Isolate, erfolgten (Friese et al., 2013a).

In der vorliegenden Arbeit zum Vorkommen der ESBL/AmpC - produzierender *E. coli* in Masthähnchenbeständen wurden insgesamt 14 Gülleproben aus fünf Masthähnchenbetrieben untersucht. Nach Bestätigung der phänotypisch positiven Proben mittels PCR und Agar-diffusion konnten in 86 % der Gülleproben ESBL/AmpC - produzierende *E. coli*

nachgewiesen werden. Ebenfalls konnten in 28,75 % aller mittels Sockentupfer untersuchten Bodenoberflächen ESBL/AmpC-produzierende *E. coli* detektiert werden.

Die Ergebnisse der PFGE, welche die klonale Übereinstimmung verschiedener Isolate von innen und außen belegen, untermauern die Hypothese des fäkalen Austrags von ESBL/AmpC - produzierenden *E. coli* aus Masthähnchenhaltungen in die Umwelt. So konnte beispielsweise ein TEM-52 positives Gülle-Isolat mit einem ebenfalls TEM-52 positiven *E. coli* Isolat aus der Sockentupferprobe eines nachweislich mit Gülle aus diesem Betrieb gedüngten und bewirtschafteten Feldes in Verbindung gebracht werden. Diese beiden beschriebenen Isolate zeigten nach Auswertung der Restriktionsprofile eine 86,3 %ige klonale Übereinstimmung. Darüber hinaus zeigten die Restriktionsprofile weiterer *E. coli* Isolate, gewonnen aus Gülle und Stallumgebungsproben in Betrieb G2, sogar 100 %ige klonale Übereinstimmung. Bezugnehmend auf diese Ergebnisse kann geschlussfolgert werden, dass fäkale Emission ESBL/AmpC - produzierender *E. coli* aus Broilermastbetrieben, vor allem über das Aufbringen kontaminierter Gülle, sehr wahrscheinlich ist.

Wie lange die resistenten Bakterien in der Umwelt persistieren, bleibt ungewiss. Doch alleine der tatsächliche Austrag der resistenten Mikroorganismen auf bewirtschaftete Felder und die mögliche Verbreitung der entsprechenden Resistenzgene auf andere eventuell pathogene Erreger durch horizontalen Gentransfer, stellt eine potentielle Gefahr für die Gesellschaft dar (Kruse and Sorum, 1994; Pfeifer et al., 2010). Es stellt sich daher die Frage, ob das Aufbringen von Gülle als Dünger ein unterschätztes Risiko für die Verbreitung/Emission von resistenten Bakterien in der natürlichen Umwelt und der Nahrungskette darstellt.

Schon vor Jahren wurde der mögliche Transfer Plasmid-vermittelter Resistenzen gegenüber Antibiotika als signifikantes Problem und Risiko für die Gesundheit erkannt (Kruse and Sorum, 1994). Es wird angenommen, dass die Übertragung von Resistenzen zwischen nicht verwandten Bakterienstämmen in verschiedenen Umgebungen, auch in Abwesenheit von Antibiotika oder antimikrobiellem Druck, auftreten (Kruse and Sorum, 1994). Daher ist die mögliche Übertragung von Resistenzgenen, wie ESBL/AmpC-Genen zwischen Bakterien in natürlichen Lebensräumen als auch auf Oberflächen gedüngter Felder oder Oberflächen in der Umgebung von Tierhaltungen, mit besonderer Aufmerksamkeit zu beobachten. Hier besteht die Gefahr, dass sich in ubiquitär vorhandenen Keimen ein Reservoir der Resistenzen entwickelt und diese damit ein Gesundheitsrisiko für die Gesellschaft darstellen können. Im Hinblick auf diesen vermuteten Zusammenhang sei darauf hingewiesen, dass wir in unserer Studie ein CTX-M-14-positives *E. coli* Isolat sowie ein ebenfalls CTX-M-14 positives *Acinetobacter baumannii* Isolat aus derselben Sockentupferprobe eines nachweislich mit Gülle des untersuchten Masthähnchenbestandes gedüngten Feldes, isolieren konnten. Zur schlussendlichen Belegung der Hypothese, dass es zu einem Austausch des resistenztragenden Plasmides zwischen den beiden Bakterienarten gekommen ist, sind weiterführende Plasmidanalysen notwendig. Dies war jedoch nicht Inhalt dieser Studie. Darüber hinaus machen unsere Ergebnisse dennoch deutlich, dass neben *E. coli* auch ubiquitär in der Umwelt vorkommende Bakterien wie *Acinetobacter* spp. und *Pseudomonas* spp. ein Reservoir für ESBLs/AmpCs darstellen können. Der Nachweis der Resistenzgene in solchen Bakterien unterstützt die Hypothese von Ghosh et al. (2007), dass die umfassende Anwendung von Gülle in der Landwirtschaft zur Ausbreitung von Resistenzen, auch in Bodenbakterien, führt, die dann ein persistierendes Reservoir der Antibiotikaresistenz darstellen können (Ghosh and LaPara, 2007), nicht zuletzt, da mit der Gülle auch teils erhebliche Antibiotikamengen ausgebracht werden.

Eine besondere Betrachtung verdienen die Ergebnisse aus Masthähnchenbetrieb G1, bei dem kein klonaler oder genetischer Zusammenhang zweier Isolate aus dem Tierstall und der

Umgebung gefunden werden konnte. Besonders für diesen Betrieb könnte die Kontamination der Umwelt auch von anderen Emissionsquellen, wie z.B. Kläranlagen, verursacht werden.

Das Aufbringen von Düngemitteln humanen Ursprungs, wie Klärschlamm aus Abwasseraufbereitungsanlagen, könnte ein ebenso großes Verbreitungsrisiko der resistenten Bakterien sowie deren Resistenzgenen darstellen. In diesem Zusammenhang haben Hu et al. (2013) kürzlich CTX-M-produzierende *E. coli* aus Wasser, Schweinekot und gesunden sowie klinisch kranken Menschen isoliert und auf klonale Zusammenhänge hin untersucht (Hu et al., 2013). Als Schlussfolgerung ihrer Ergebnisse postulieren die Autoren, dass die in der Umwelt detektierten ESBL produzierenden Bakterien mit hoher Wahrscheinlichkeit sowohl vom Menschen als auch vom Tier (Schwein) stammen. Neben der aus Tierställen auf die Felder aufgetragenen Gülle, wird in der Literatur auch der Eintrag der resistenten Mikroorganismen über Kläranlagen in die Gewässer und damit in die Umwelt diskutiert (Korzeniewska et al., 2013) (Mesa et al., 2006) (Reinthal et al., 2010).

3.4.2 AEROGENE EMISSION

Neben der fäkalen Ausbreitung der resistenten Mikroorganismen in die Umgebung, kann auch ein Austrag der Bakterien über die Luft vermutet werden. Diese Vermutung resultiert nicht zuletzt aus der Tatsache, dass 17% der in der Stallluft detektierten *E. coli*, ESBL/AmpC - produzierende *E. coli* waren. Über die aerogene Verbreitung ESBL/AmpC-produzierender *E. coli* aus Tierställen in die Stallumgebung gibt es in der gegenwärtigen Literatur allerdings keine Angaben. Lediglich über die luftgetragene Verbreitung der resistenten Bakterien aus kommunalen Kläranlagen wird berichtet. In einer Studie von Korzeniewska et al. (2013) konnte gezeigt werden, dass ESBLs über die Kläranlagen in die Atmosphärenluft in der direkten Umgebung der Kläranlagen emittiert werden. CTX-M-1 stellte die am häufigsten detektierte Genvariante dar (Korzeniewska and Harnisz, 2013; Korzeniewska et al., 2013). Über die Entfernungen, welche die resistenten Bakterien auf diesem Weg zurücklegen können und über ihre Überlebensdauer in der Umwelt, ist allerdings wenig bekannt.

Chinivasagam et al. (2010) beschreiben in ihrer Studie zur Verbreitung verschiedener Bakterienspezies aus Tierställen, dass es höchst unwahrscheinlich ist, *E. coli* in über 20 m Entfernung zum Stall, insbesondere in der Stallabluft, nachzuweisen (Chinivasagam et al., 2010). Darüber hinaus ist bekannt, dass das Überleben von *E. coli* im Freien signifikant reduziert wird, vor allem, wenn die Bakterien direktem Tageslicht und steigenden Temperaturen ausgesetzt sind (Handley and Webster, 1995). Allerdings beziehen sich diese Ergebnisse nicht auf ESBL/AmpC-produzierende *E. coli* und deren Überlebensmöglichkeiten in der Umwelt. In der Tat zeigen unsere Ergebnisse, dass eine luftgetragene Emission von ESBL/AmpC - produzierenden *E. coli* aus Broilermastbetrieben in die Umgebung sehr wahrscheinlich ist und das sogar über eine Entfernung von 20 Metern hinaus, da die resistenten Keime in Außenluftproben in der maximal erfassten Entfernung von 150 Metern gefunden wurden.

Die These des aerogenen Austrags untermauern unsere Ergebnisse der PFGE-Analyse, bei welcher eine Übereinstimmung von 100 % von ESBL-*E. coli* Isolaten der Stallluft sowie Stallabluft ermittelt wurde.

Es ist interessant, dass sich einer der von uns beprobten Broilermastbetriebe genau zwischen einem stark frequentierten Geflügelschlachthof (ca. 100 Meter Luftlinie) und einer kommunalen Abwasseraufbereitungsanlage (ca. 500 Meter Luftlinie) befindet. In der Umgebung dieses Betriebs konnten drei, nach PFGE-Analyse 100 % klonal verwandte, CMY-2 und TEM-1 positive Isolate isoliert werden. Diese Isolate stammen aus einer

Luftprobe sowie zwei Sockentupferproben der Stallumgebung. Eine klonale Verwandtschaft dieser drei Isolate zu ausgewählten Isolaten innerhalb des beprobten Tierstalles konnte jedoch nicht gezeigt werden. Der nicht nachgewiesene klonale Zusammenhang dieser Isolate lässt sich möglicherweise mit der geringen Anzahl der mittels PFGE untersuchten Isolate erklären. Dennoch verleiten unsere Erkenntnisse zu der Annahme, dass diese drei 100 % identischen Isolate möglicherweise einen anderen, beispielsweise humanen Ursprung haben, oder eventuell aus dem benachbarten Schlachthof auf aerogenem Wege emittierten. Demnach scheint nicht nur die Emission ESBL/AmpC-produzierender *E. coli* durch Stallabluft sondern auch deren Eintrag durch kontaminierte Umgebungsluft in die Tierställe möglich. In diesem Zusammenhang ist nicht nur in Masthähnchenbetrieben sondern auch in Geflügelschlachthöfen eine hohe Nachweishäufigkeit ESBL/AmpC-produzierender *E. coli* beschrieben. Gregova et al. (2012) konnten in 43 % aller untersuchten Isolate aus Bioaerosolen der Produktionshalle ESBL/AmpC bestätigen. CMY-2 stellte hier die am häufigsten nachgewiesene Genvariante dar (Gregova et al., 2012). Bezugnehmend auf die hohen Nachweishäufigkeiten der resistenten Bakterien in der Luft, besonders während dem Einhängen der Tiere, der Tötung und dem Ausweiden, kann auch ein Austrag der ESBLs/AmpCs über die Abluft der Schlachthöfe nicht ausgeschlossen werden. Bei der Planung einer Geflügelproduktionsstätte ist demnach auch die Lage von entscheidender Bedeutung. Um diese Hypothese der möglichen Verbreitung der Bakterien und deren potentiellen Eintrag in die Broilermast zu bestätigen, wären allerdings umfassende Untersuchungen, sowohl im betreffenden Schlachthof als auch in der dazugehörigen Kläranlage sowie erneut des Betriebes G1 und/oder weiteren, ähnlich gelegenen Betrieben erforderlich.

4 ZUSAMMENFASSUNG

Antibiotikaresistenzen stellen weltweit sowohl in der Human- als auch der Veterinärmedizin ein ständig größer werdendes Problem dar. Bei der Resistenzentwicklung von *Enterobacteriaceae* gegen Beta-Laktam Antibiotika spielen die Plasmid-vermittelten Beta-Laktamasen eine entscheidende Rolle. Die Produktion von Beta-Laktamasen als Beta-Laktam-Ring spaltende Hydrolasen und die damit verbundene enzymatische Inaktivierung von Beta-Laktam-Antibiotika ist einer der am weitesten verbreiteten Resistenzmechanismen bei Bakterien. Durch die sogenannten Extended-Spectrum-Beta-Laktamasen (ESBL) wird die Effektivität von modernen extended-spectrum Cephalosporinen und Monobactamen dramatisch reduziert.

Seit Jahren werden weltweit steigende Nachweise von ESBLs beschrieben. Studien berichten von ESBL-produzierenden *E. coli* und auch anderen Enterobakterien in gesunden Lebensmittel liefernden Tieren in Europa, unter anderem auch bei gesunden Masthähnchen. Aber auch in Endprodukten und Lebensmitteln wie Fleisch, Fisch und Rohmilch können die resistenten Bakterien nachgewiesen werden. Aufgrund der zum Vorkommen und zur Verbreitung von „ESBLs/AmpCs“ bei Mensch, Tier und Lebensmitteln, in Deutschland dürftigen Datenlage, wurde das Verbundprojekt RESET, finanziert aus Mitteln des Bundesministerium für Bildung und Forschung, ins Leben gerufen. Hier wurden (und werden in einer zweiten Förderphase) von Forschergruppen aus Tier- und Humanmedizin umfangreiche Erhebungen durchgeführt. Als Teilaspekt des RESET Verbundes war das übergeordnete Ziel der hier vorgelegten Arbeit, die Untersuchung der Nachweishäufigkeit von ESBL/AmpC - produzierenden *E. coli* in konventionellen deutschen Masthähnchenbetrieben während des gesamten Mastverlaufes. Vor allem sollten neue Erkenntnisse über die Besiedlungsdynamik der resistenten Bakterien sowie deren Verbreitung im Masthähnchenstall gewonnen werden. Zusätzlich lag der Fokus auf der Untersuchung verschiedenster Transmissionswege ESBL/AmpC-produzierender Enterobakterien, speziell *E. coli*, aus den Masthähnchenhaltungen heraus in die Umwelt oder umgekehrt.

In initialen Untersuchungen wurden 16 Masthähnchenbetriebe auf ihren ESBL/AmpC-Status hin mittels Sockentupferproben, untersucht. Aus diesen 16 Betrieben wurden sieben ESBL/AmpC - positive Masthähnchenhaltungen in die hier beschriebenen Langzeituntersuchungen zur Prävalenz und Transmission der resistenten Mikroorganismen aufgenommen. Zur Ermittlung der Nachweishäufigkeiten von ESBL/AmpC-produzierenden *E. coli* in den Masthähnchenhaltungen während des Mastverlaufes wurden in jedem Betrieb dreimalig (Beginn, Mitte und Ende der Mast) umfangreiche Messungen und Probenahmen am Tier, der Tierumgebung, der Stallluft und Stallabluft sowie der Stallumgebung durchgeführt. Um die verschiedenen potentiellen Emissionswege ESBL/AmpC-produzierender Enterobakterien, speziell *E. coli*, aus den Tierhaltungen in die Umwelt hinaus aufzudecken, wurden unter anderem ESBL-produzierende *E. coli* speziell in der Stallluft sowie in der Stallabluft mittels Impingement bestimmt. Sowohl die Luftproben außerhalb der Masthähnchenställe als auch Proben von Bodenflächen der direkten Stallumgebung wurden dabei, in Abhängigkeit der jeweiligen Windrichtung zum Stallgebäude, entnommen. Zusätzlich konnten Gülleproben direkt aus der Güllelagune entnommen und auf ESBL/AmpC-*E. coli* untersucht werden. Alle aus diesen Proben mittels Kultivierung auf antibiotikahaltigen Selektivmedien gewonnenen phänotypisch ESBL-verdächtigen Isolate wurden mittels MALDI-TOF als *E. coli* bestätigt und anschließend mittels PCR als Träger eines ESBL - Gens oder plasmidkodierten AmpC - Gens bestätigt. Darüber hinaus wurden ausgewählte Isolate der Stallumgebung und des Tierstalles mittels Pulsed-Field-Gelelektrophorese (PFGE) auf ihren klonalen Zusammenhang hin untersucht.

Als erstes Ergebnis ist hervorzuheben, dass in jedem der untersuchten Ställe zu jedem Untersuchungszeitpunkt in mindestens einer Probe ESBL/AmpC-produzierende *E. coli* nachgewiesen und deren Resistenzgene mittels PCR identifiziert werden konnten. Dabei konnten die resistenten Mikroorganismen regelmäßig sowohl im Stall, z.B. im Staub oder der Einstreu, als auch auf dem Boden der Stallumgebung und der Gülle, aber auch in der Stallluft sowie Stallabluft nachgewiesen werden. Die Nachweishäufigkeiten bei den Tieren aus jeweils zwanzig Einzeltierproben pro Bestand variierten für ESBL/AmpC - produzierende *E. coli* zwischen 0% und 100%. Damit erbringen die Ergebnisse dieser Arbeit den Nachweis, dass ESBL/AmpC - produzierende *E. coli* in Kloakentupfern klinisch gesunder Masthähnchen sowie in deren Stallumgebung regelmäßig vorkommen. Dabei konnten bereits in Eintagsküken hohe Prävalenzen der resistenten Mikroorganismen nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit erstmals ein signifikanter Anstieg der Nachweishäufigkeit der resistenten Bakterien im Verlauf der Mastperiode nachgewiesen. Dieser Prävalenzanstieg konnte sowohl in den Einzeltierproben als auch in den Proben der Tierumgebung innerhalb der Mastperiode gezeigt werden. Zudem kann in der vorliegenden Arbeit neben dem möglichen Eintrag der ESBLs/AmpCs über positive Eintagsküken auch ein Einfluss der Tierumgebung auf den ESBL/AmpC - Status der Masthähnchenherde aufgezeigt und belegt werden.

Als weiteres Hauptergebnis konnte mit dieser Arbeit die Hypothese des fäkalen sowie aerogenen Austrags von ESBL/AmpC - produzierenden *E. coli* aus Masthähnchenhaltungen in die Umwelt untermauert werden. Mit Hilfe der PFGE wurden klonale Übereinstimmungen verschiedener Isolate von innen und außen nachgewiesen. So zeigten sich nach Auswertung der Restriktionsprofile 86,3 %ige bis 100 %ige klonale Übereinstimmungen bei Isolaten aus dem Tierstall (Luft und Gülle) verglichen mit denen aus der Stallumgebung. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass sowohl die fäkale als auch die aerogene Emission ESBL/AmpC-produzierender *E. coli* aus Masthähnchenbetrieben, unter anderem durch das Aufbringen kontaminierter Gülle sowie durch Stallabluft, sehr wahrscheinlich ist. Zugleich kann durch diese Ergebnisse auch ein potentieller Eintrag der resistenten Mikroorganismen über die Luft oder andere Vektoren nicht ausgeschlossen werden.

5 SUMMARY

Long-term study on the prevalence and transmission of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* in broiler fattening farms

Resistances against antibiotics represent a growing challenge for both human and veterinary medicine around the globe. Plasmid-transmitted beta lactamases play a pivotal role in the development of resistances against beta-lactam antibiotics in *Enterobacteriaceae*. The bacterial synthesis of hydrolases with the capability of cleaving the beta lactam ring and thereby enzymatically inactivating beta lactam antibiotics is one of the most common bacterial antibiotic resistance mechanisms. In this context, a subgroup of beta lactamases termed 'extended spectrum beta lactamases' (ESBL) are of particular relevance, as they are capable of dramatically reducing the efficacy even of modern extended-spectrum cephalosporine und monobactame antibiotics.

In recent years, increasing evidence of ESBLs have been described worldwide. Studies have reported of ESBL - producing *E. coli*, and other enterobacteriaceae; in healthy livestock in Europe .inter alia, in healthy broilers. In addition, resistant bacteria have been found in end products and foods such as meat, fish and raw milk. Due to the limited data available on the presence and potential distribution of 'ESBLs/AmpCs' in humans, animals and foods in Germany, the collaborative project RESET was launched, which is financed by assets from the German Ministry of Education and Research (BMBF). In this project, research groups from the fields of veterinary and human medicine have collected and are continuing to collect (during a second promotion period) substantial amounts of data on the dissemination of ESBLs in the food chain. As one aspect of the RESET collaboration, the main focus of the work presented here was the analysis of the detection frequency of ESBL/AmpC - producing *E. coli* in conventional broiler fattening farms in Germany throughout the entire fattening period. In particular, it was the aim to achieve new insights into the colonization dynamic of the resistant bacteria as well as their distribution in the broiler fattening farm houses. An additional focus was the analysis of a variety of transmission pathways of ESBL/AmpC- producing *Enterobacteriaceae*, particularly *E. coli*, from broiler fattening farms to the surrounding environment or vice versa.

In initial investigations, the ESBL/AmpC - status of 16 broiler fattening farms was determined using boot swab samples. Of these 16 farms, seven ESBL/AmpC - positive broiler fattening farms were included in the long-term study on the prevalence and transmission of resistant microorganisms which is presented here. To determine the detection frequencies of ESBL/AmpC - producing *E. coli* in broiler fattening farms during the course of the fattening period, extensive measurements and sample collections from animals, their surroundings, the stable air and exhaust as well as the stable surroundings were carried out in each of the examined broiler fattening farms on three occasions during the fattening period (beginning, middle and end). Moreover, impingement was used to determine the presence of ESBL-producing *E. coli* and other microorganisms in the stable air and exhaust in order to identify potential emission pathways of ESBL/AmpC-producing *Enterobacteriaceae*, particularly *E. coli*, from animal farms into the environment. In doing so, the air samples from outside animal housings as well as the floor samples from the direct stable surroundings were collected in dependence of the respective wind direction. In addition, slurry samples were collected directly from the slurry pit and examined for ESBL/AmpC - *E. coli*. All suspected ESBL/AmpC- producing colonies isolated from MacConkey agar, containing antibiotics, gathered from these samples were identified as *E. coli* using MALDI-TOF and subsequently confirmed as carriers of an ESBL gene or plasmid-coded AmpC gene using PCR. In addition,

selected isolates from the stable surroundings and the stable were analyzed for clonal relation using pulsed field gel electrophoresis (PFGE).

As a first result it should be emphasized that, at every sampling occasion, there was at least one sample from each broiler fattening farm where ESBL/AmpC-producing *E. coli* were identified and their resistance genes could be identified using PCR. Moreover, the resistant microorganisms were regularly found in the stable air, e.g. in dust or litter, as well as on the floor of the stable surroundings, the slurry and the stable air and exhaust. The detection frequencies of ESBL/AmpC-producing *E. coli* in animals, from each 20 swab samples from individual animals per farm varied between 0% and 100%. Nevertheless, the results of our work show that ESBL/AmpC-producing *E. coli* are regularly present in cloacal swabs of clinically healthy broilers as well as their stable surroundings. In addition, high prevalences of the resistant microorganisms could even be found in day-old chicks. Moreover, our results are the first report of a significant increase of the detection frequency of resistant bacteria during the course of the fattening period. This increase in prevalence was shown during the whole fattening period in samples from individual animals as well as in samples from the animal's surroundings. Therefore, apart from the possible entry via positive day-old chicks, the current results demonstrate an influence of the stable environment on the ESBL/AmpC status of a broiler flock. As a further main result, these work strengthen the hypothesis of fecal and aerogenic dissemination from broiler farms into the environment, as PFGE analyses showed clonal matching between different isolates from inside and outside the animal housings. PFGE shows results of restriction profile analyses with 86.3% to 100% clonal matching of isolates from the stables (air and slurry) in comparison to isolates from the stable surroundings. Based on these results, it can be concluded that fecal and aerogenic emission of ESBL/AmpC-producing *E. coli* from broiler fattening farms through, among others, distribution of contaminated slurry and stable exhaust is highly probable. However, the results of this work do not exclude that there may also be an influx of the resistant microorganisms.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Akujobi CO, O.J., Alisi CS., 2008. Occurrence of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* isolated from piggery farms in Imo State, Nigeria. . World J Microb Biot 24: 2167-2170.
- Ambler, R.P., 1980. The structure of beta-lactamases. Philos. Trans.R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.. 289, 321-331.
- Bardon, J., Husickova, V., Chroma, M., Kolar, M., 2012. Detection of ESBL-positive strains of *Escherichia coli* in pigs in the Czech Republic. Klin Mikrobiol Infekc Lek 18, 65-67.
- Batchelor, M., Hopkins, K., Threlfall, E.J., Clifton-Hadley, F.A., Stallwood, A.D., Davies, R.H., Liebana, E., 2005a. bla(CTX-M) genes in clinical *Salmonella* isolates recovered from humans in England and Wales from 1992 to 2003. Antimicrob. Agents Chemother. 49, 1319-1322.
- Batchelor, M., Threlfall, E.J., Liebana, E., 2005b. Cephalosporin resistance among animal-associated *Enterobacteria*: a current perspective. Expert Rev. Anti Infect. Ther. 3, 403-417.
- Bauerfeind, A., Chong, Y., Schweighart, S., 1989. Extended broad spectrum beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins. Infection 17, 316-321.
- Benbough, J.E., 1967. Death mechanisms in airborne *Escherichia coli*. J. Gen. Microbiol. 47, 325-333.
- Bergenholtz, R.D., Jorgensen, M.S., Hansen, L.H., Jensen, L.B., Hasman, H., 2009. Characterization of genetic determinants of extended-spectrum cephalosporinases (ESCs) in *Escherichia coli* isolates from Danish and imported poultry meat. J. Antimicrob. Chemother. 64, 207-209.
- Blanc, V., Mesa, R., Saco, M., Lavilla, S., Prats, G., Miro, E., Navarro, F., Cortes, P., Llagostera, M., 2006. ESBL- and plasmidic class C beta-lactamase-producing *E. coli* strains isolated from poultry, pig and rabbit farms. Vet. Microbiol. 118, 299-304.
- Bonnedahl, J., Drobni, P., Johansson, A., Hernandez, J., Melhus, A., Stedt, J., Olsen, B., Drobni, M., 2010. Characterization, and comparison, of human clinical and black-headed gull (*Larus ridibundus*) extended-spectrum beta-lactamase-producing bacterial isolates from Kalmar, on the southeast coast of Sweden. J. Antimicrob. Chemother. 65, 1939-1944.
- Bonnet, R., 2004. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. Antimicrob. Agents Chemother. 48, 1-14.
- Bonnet, R., Sampaio, J.L., Labia, R., De Champs, C., Sirot, D., Chanal, C., Sirot, J., 2000. A novel CTX-M beta-lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil. Antimicrob. Agents Chemother. 44, 1936-1942.
- Bortolaia, V., Guardabassi, L., Trevisani, M., Bisgaard, M., Venturi, L., Bojesen, A.M., 2010. High diversity of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* isolates from Italian broiler flocks. Antimicrob. Agents Chemother. 54, 1623-1626.
- Bradford, P.A., 2001. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin. Microbiol. Rev. 14, 933-951, table of contents.
- Bradford, P.A., Yang, Y., Sahm, D., Grope, I., Gardovska, D., Storch, G., 1998. CTX-M-5, a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase from an outbreak of *Salmonella typhimurium* in Latvia. Antimicrob. Agents Chemother. 42, 1980-1984.
- Brinas, L., Moreno, M.A., Teshager, T., Saenz, Y., Porrero, M.C., Dominguez, L., Torres, C., 2005. Monitoring and characterization of extended-spectrum beta-lactamases in

- Escherichia coli* strains from healthy and sick animals in Spain in 2003. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 1262-1264.
- Brinas, L., Moreno, M.A., Zarazaga, M., Porrero, C., Saenz, Y., Garcia, M., Dominguez, L., Torres, C., 2003. Detection of CMY-2, CTX-M-14, and SHV-12 beta-lactamases in *Escherichia coli* fecal-sample isolates from healthy chickens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 2056-2058.
- Büchter, B., 2010. Vorkommen und Charakterisierung von Extended-Spectrum-Beta-Laktamase (ESBL)-produzierenden *Escherichia coli* bei Lebensmittel liefernden Tieren. Berlin, Freie Univ, Diss, 2010, D 188 2010.
- Bunger, J., Schappler-Scheele, B., Hilgers, R., Hallier, E., 2007. A 5-year follow-up study on respiratory disorders and lung function in workers exposed to organic dust from composting plants. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 80, 306-312.
- Bush, K., 2001. New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin. Infect. Dis.* 32, 1085-1089.
- Bush, K., Jacoby, G.A., Medeiros, A.A., 1995. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 1211-1233.
- Canton, R., Coque, T.M., 2006. The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 466-475.
- Canton, R., Novais, A., Valverde, A., Machado, E., Peixe, L., Baquero, F., Coque, T.M., 2008. Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 14, 144-153.
- Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K.L., Threlfall, E.J., 2005. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J. Microbiol. Methods* 63, 219-228.
- Carattoli, A., Garcia-Fernandez, A., Varesi, P., Fortini, D., Gerardi, S., Penni, A., Mancini, C., Giordano, A., 2008. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases isolated in Rome, Italy. *J. Clin. Microbiol.* 46, 103-108.
- Carrico, J.A., Pinto, F.R., Simas, C., Nunes, S., Sousa, N.G., Frazao, N., de Lencastre, H., Almeida, J.S., 2005. Assessment of band-based similarity coefficients for automatic type and subtype classification of microbial isolates analyzed by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 43, 5483-5490.
- Chagas, T.P., Seki, L.M., Cury, J.C., Oliveira, J.A., Davila, A.M., Silva, D.M., Asensi, M.D., 2011. Multiresistance, beta-lactamase-encoding genes and bacterial diversity in hospital wastewater in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Appl. Microbiol.* 111, 572-581.
- Chinivasagam, H.N., Tran, T., Maddock, L., Gale, A., Blackall, P.J., 2009. Mechanically ventilated broiler sheds: a possible source of aerosolized *Salmonella*, *Campylobacter*, and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7417-7425.
- Chinivasagam, H.N., Tran, T., Maddock, L., Gale, A., Blackall, P.J., 2010. The aerobiology of the environment around mechanically ventilated broiler sheds. *J. Appl. Microbiol.* 108, 1657-1667.
- Chmelnitsky, I., Carmeli, Y., Leavitt, A., Schwaber, M.J., Navon-Venezia, S., 2005. CTX-M-2 and a new CTX-M-39 enzyme are the major extended-spectrum beta-lactamases in multiple *Escherichia coli* clones isolated in Tel Aviv, Israel. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 4745-4750.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved standard, 11th ed. CLSI document M02-A11. CLSI, Wayne, PA.

- Cohen Stuart, J., van den Munckhof, T., Voets, G., Scharringa, J., Fluit, A., Hall, M.L., 2012. Comparison of ESBL contamination in organic and conventional retail chicken meat. *Int. J Food Microbiol.* 154, 212-214.
- Cortes, P., Blanc, V., Mora, A., Dahbi, G., Blanco, J.E., Blanco, M., Lopez, C., Andreu, A., Navarro, F., Alonso, M.P., Bou, G., Blanco, J., Llagostera, M., 2010. Isolation and characterization of potentially pathogenic antimicrobial-resistant *Escherichia coli* strains from chicken and pig farms in Spain. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 2799-2805.
- Costa, D., Poeta, P., Brinas, L., Saenz, Y., Rodrigues, J., Torres, C., 2004. Detection of CTX-M-1 and TEM-52 beta-lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy pets in Portugal. *J. Antimicrob. Chemother.* 54, 960-961.
- Costa, D., Poeta, P., Saenz, Y., Coelho, A.C., Matos, M., Vinue, L., Rodrigues, J., Torres, C., 2008. Prevalence of antimicrobial resistance and resistance genes in faecal *Escherichia coli* isolates recovered from healthy pets. *Vet. Microbiol.* 127, 97-105.
- Costa, D., Vinue, L., Poeta, P., Coelho, A.C., Matos, M., Saenz, Y., Somalo, S., Zarazaga, M., Rodrigues, J., Torres, C., 2009. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates in faecal samples of broilers. *Vet. Microbiol.* 138, 339-344.
- Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme (DANMAP), 2011. Use of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Bacteria From Food Animals, Food and Humans in Denmark. <http://www.danmap.org>.
- Datta, N., Kontomichalou, P., 1965. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*. *Nature* 208, 239-241.
- Decre, D., Gachot, B., Lucet, J.C., Arlet, G., Bergogne-Berezin, E., Regnier, B., 1998. Clinical and bacteriologic epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing strains of *Klebsiella pneumoniae* in a medical intensive care unit. *Clin. Infect. Dis.* 27, 834-844.
- Dhillon, R.H., Clark, J., 2012. ESBLs: A Clear and Present Danger? *Crit Care Res Pract* 2012, 625170.
- Dierikx, C., van der Goot, J., Fabri, T., van Essen-Zandbergen, A., Smith, H., Mevius, D., 2012a. Extended-spectrum-beta-lactamase- and AmpC-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Dutch broilers and broiler farmers. *J. Antimicrob. Chemother.*
- Dierikx, C., van Essen-Zandbergen, A., Veldman, K., Smith, H., Mevius, D., 2010. Increased detection of extended spectrum beta-lactamase producing *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolates from poultry. *Vet. Microbiol.* 145, 273-278.
- Dierikx, C.M., van Duijkeren, E., Schoormans, A.H., van Essen-Zandbergen, A., Veldman, K., Kant, A., Huijsdens, X.W., van der Zwaluw, K., Wagenaar, J.A., Mevius, D.J., 2012b. Occurrence and characteristics of extended-spectrum-beta-lactamase- and AmpC-producing clinical isolates derived from companion animals and horses. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 1368-1374.
- Dolejska, M., Duskova, E., Rybarikova, J., Janoszowska, D., Roubalova, E., Dibdakova, K., Maceckova, G., Kohoutova, L., Literak, I., Smola, J., Cizek, A., 2011. Plasmids carrying blaCTX-M-1 and qnr genes in *Escherichia coli* isolates from an equine clinic and a horseback riding centre. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 757-764.
- Donaldson, S.C., Straley, B.A., Hegde, N.V., Sawant, A.A., DebRoy, C., Jayarao, B.M., 2006. Molecular epidemiology of ceftiofur-resistant *Escherichia coli* isolates from dairy calves. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3940-3948.
- European Food Safety Authority (EFSA), 2011. Scientific opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum-beta-lactamases and/or AmpC beta-lactamases in food and food-producing animals. *EFSA J.* 9, 1-95.

- Egea, P., Lopez-Cerero, L., Torres, E., Gomez-Sanchez Mdel, C., Serrano, L., Navarro Sanchez-Ortiz, M.D., Rodriguez-Bano, J., Pascual, A., 2012. Increased raw poultry meat colonization by extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in the south of Spain. *Int. J. Food Microbiol.* 159, 69-73.
- Endimiani, A., Bertschy, I., Perreten, V., 2012. *Escherichia coli* producing CMY-2 beta-lactamase in bovine mastitis milk. *J. Food Prot.* 75, 137-138.
- Escudero, E., Vinue, L., Teshager, T., Torres, C., Moreno, M.A., 2010. Resistance mechanisms and farm-level distribution of fecal *Escherichia coli* isolates resistant to extended-spectrum cephalosporins in pigs in Spain. *Res Vet Sci* 88, 83-87.
- Ewers, C., Antao, E.M., Diehl, I., Philipp, H.C., Wieler, L.H., 2009. Intestine and environment of the chicken as reservoirs for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains with zoonotic potential. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 184-192.
- Ewers, C., Bethe, A., Semmler, T., Guenther, S., Wieler, L.H., 2012. Extended-spectrum β -lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 646-655.
- Ewers, C., Bethe, A., Wieler, L.H., Guenther, S., Stamm, I., Kopp, P.A., Grobbel, M., 2011. Companion animals: a relevant source of extended-spectrum beta-lactamase-producing fluoroquinolone-resistant *Citrobacter freundii*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 37, 86-87.
- Ewers, C., Grobbel, M., Stamm, I., Kopp, P.A., Diehl, I., Semmler, T., Fruth, A., Beutlich, J., Guerra, B., Wieler, L.H., Guenther, S., 2010. Emergence of human pandemic O25:H4-ST131 CTX-M-15 extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* among companion animals. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 651-660.
- Feria, C., Ferreira, E., Correia, J.D., Goncalves, J., Canica, M., 2002. Patterns and mechanisms of resistance to beta-lactams and beta-lactamase inhibitors in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from dogs in Portugal. *J. Antimicrob. Chemother.* 49, 77-85.
- Fischer, J., Rodriguez, I., Schmoger, S., Friese, A., Roesler, U., Helmuth, R., Guerra, B., 2012a. *Escherichia coli* producing VIM-1 carbapenemase isolated on a pig farm. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 1793-1795.
- Fischer, J., Rodriguez, I., Schmoger, S., Friese, A., Roesler, U., Helmuth, R., Guerra, B., 2012b. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* producing VIM-1 carbapenemase isolated from livestock farms. *J. Antimicrob. Chemother.*
- Friese, A., Schulz, J., Hoehle, L., Fetsch, A., Tenhagen, B.A., Hartung, J., Roesler, U., 2012. Occurrence of MRSA in air and housing environment of pig barns. *Vet. Microbiol.* 158, 129-135.
- Friese, A., Schulz, J., Laube, H., von Salviati, C., Hartung, J., Roesler, U., 2013a. Faecal occurrence and emissions of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (laMRSA) and ESbl/AmpC-producing *E. coli* from animal farms in Germany. *Berl. Münch. Tierarztl. Wochenschr.* 126, 175-180.
- Friese, A., Schulz, J., Zimmermann, K., Tenhagen, B.A., Fetsch, A., Hartung, J., Rosler, U., 2013b. Occurrence of Livestock-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Turkey and Broiler Barns and Contamination of Air and Soil Surfaces in Their Vicinity. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 2759-2766.
- Galvin, S., Boyle, F., Hickey, P., Vellinga, A., Morris, D., Cormican, M., 2010. Enumeration and characterization of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* bacteria in effluent from municipal, hospital, and secondary treatment facility sources. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 4772-4779.
- Gazouli, M., Sidorenko, S.V., Tzelepi, E., Kozlova, N.S., Gladin, D.P., Tzouveleakis, L.S., 1998. A plasmid-mediated beta-lactamase conferring resistance to cefotaxime in a

- Salmonella typhimurium* clone found in St Petersburg, Russia. J. Antimicrob. Chemother. 41, 119-121.
- Geser, N., Stephan, R., Hachler, H., 2012. Occurrence and characteristics of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Enterobacteriaceae* in food producing animals, minced meat and raw milk. BMC Vet Res 8, 21.
- Geser, N., Stephan, R., Kuhnert, P., Zbinden, R., Kaeppli, U., Cernela, N., Haechler, H., 2011. Fecal Carriage of Extended-Spectrum -LactamaseProducing *Enterobacteriaceae* in Swine and Cattle at Slaughter in Switzerland. J. Food Protect. 74, 446-449.
- Ghosh, S., LaPara, T.M., 2007. The effects of subtherapeutic antibiotic use in farm animals on the proliferation and persistence of antibiotic resistance among soil bacteria. ISME J. 1, 191-203.
- Gibson, J.S., Cobbold, R.N., Trott, D.J., 2010. Characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from extraintestinal clinical infections in animals. J. Med. Microbiol. 59, 592-598.
- Girlich, D., Poirel, L., Carattoli, A., Kempf, I., Lartigue, M.F., Bertini, A., Nordmann, P., 2007. Extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-1 in *Escherichia coli* isolates from healthy poultry in France. Appl. Environ. Microbiol. 73, 4681-4685.
- Giufre, M., Graziani, C., Accogli, M., Luzzi, I., Busani, L., Cerquetti, M., 2012. *Escherichia coli* of human and avian origin: detection of clonal groups associated with fluoroquinolone and multidrug resistance in Italy. J. Antimicrob. Chemother. 67, 860-867.
- Gniadkowski, M., Schneider, I., Palucha, A., Jungwirth, R., Mikiewicz, B., Bauernfeind, A., 1998. Cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from a hospital in Warsaw, Poland: identification of a new CTX-M-3 cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase that is closely related to the CTX-M-1/MEN-1 enzyme. Antimicrob. Agents Chemother. 42, 827-832.
- Gregova, G., Kmetova, M., Kmet, V., Venglovsky, J., Feher, A., 2012. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from a poultry slaughterhouse. Ann. Agric. Environ. Med.: AAEM 19, 75-77.
- Guenther, S., Aschenbrenner, K., Stamm, I., Bethe, A., Semmler, T., Stubbe, A., Stubbe, M., Batsajkhan, N., Glupczynski, Y., Wieler, L.H., Ewers, C., 2012a. Comparable High Rates of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Birds of Prey from Germany and Mongolia. PLoS one 7, e53039.
- Guenther, S., Bethe, A., Fruth, A., Semmler, T., Ulrich, R.G., Wieler, L.H., Ewers, C., 2012b. Frequent combination of antimicrobial multiresistance and extraintestinal pathogenicity in *Escherichia coli* isolates from urban rats (*Rattus norvegicus*) in Berlin, Germany. PLoS one 7, e50331.
- Guenther, S., Ewers, C., Wieler, L.H., 2011. Extended-Spectrum Beta-Lactamases Producing *E. coli* in Wildlife, yet Another Form of Environmental Pollution? Front. Microbiol. 2, 246.
- Guenther, S., Grobbel, M., Lubke-Becker, A., Goedecke, A., Friedrich, N.D., Wieler, L.H., Ewers, C., 2010. Antimicrobial resistance profiles of *Escherichia coli* from common European wild bird species. Vet. Microbiol. 144, 219-225.
- Guerra, B., Soto, S.M., Arguelles, J.M., Mendoza, M.C., 2001. Multidrug resistance is mediated by large plasmids carrying a class 1 integron in the emergent *Salmonella enterica* serotype [4,5,12:i:-]. Antimicrob. Agents Chemother. 45, 1305-1308.
- Gupta, A., Fontana, J., Crowe, C., Bolstorff, B., Stout, A., Van Duyne, S., Hoekstra, M.P., Whichard, J.M., Barrett, T.J., Angulo, F.J., 2003. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Newport infections resistant to expanded-spectrum cephalosporins in the United States. J. Infect. Dis. 188, 1707-1716.

- Handley, B.A., Webster, A.J., 1995. Some factors affecting the airborne survival of bacteria outdoors. *J. Appl. Bacteriol.* 79, 368-378.
- Hartmann, A., Locatelli, A., Amoureux, L., Depret, G., Jolivet, C., Gueneau, E., Neuwirth, C., 2012. Occurrence of CTX-M Producing *Escherichia coli* in Soils, Cattle, and Farm Environment in France (Burgundy Region). *Front. Microbiol.* 3, 83.
- Hartung, J., 1998. Nature and amount of aerial pollutants from livestock buildings. *DTW. Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 105, 213-216.
- Heinemeyer, E.A., Luden, K., Monazahian, M., 2013. On the Risk of Spread of E. coli/EHEC O104:H4 stx 2 Positive Bacteria via Sewerage Treatment Plants during the 2011 EHEC Outbreak in North Germany. *Gesundheitswesen* 75, 512-514.
- Heuer, H., Kopmann, C., Binh, C.T., Top, E.M., Smalla, K., 2009. Spreading antibiotic resistance through spread manure: characteristics of a novel plasmid type with low %G+C content. *Environ. Microbiol.* 11, 937-949.
- Hilty, M., Betsch, B.Y., Bogli-Stuber, K., Heiniger, N., Stadler, M., Kuffer, M., Kronenberg, A., Rohrer, C., Aebi, S., Endimiani, A., Droz, S., Muhlemann, K., 2012. Transmission dynamics of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in the tertiary care hospital and the household setting. *Clin. Infect. Dis.* 55, 967-975.
- Hiroi, M., Harada, T., Kawamori, F., Takahashi, N., Kanda, T., Sugiyama, K., Masuda, T., Yoshikawa, Y., Ohashi, N., 2011. A survey of beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in farm animals and raw retail meat in Shizuoka Prefecture, Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 64, 153-155.
- Hiroi, M., Matsui, S., Kubo, R., Iida, N., Noda, Y., Kanda, T., Sugiyama, K., Hara-Kudo, Y., Ohashi, N., 2012. Factors for Occurrence of Extended-Spectrum beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Broiler. *J Vet Med Sci.*
- Hopkins, K.L., Liebana, E., Villa, L., Batchelor, M., Threlfall, E.J., Carattoli, A., 2006. Replicon typing of plasmids carrying CTX-M or CMY beta-lactamases circulating among *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 3203-3206.
- Hu, Y.Y., Cai, J.C., Zhou, H.W., Chi, D., Zhang, X.F., Chen, W.L., Zhang, R., Chen, G.X., 2013. Molecular typing of CTX-M-producing *Escherichia coli* isolates from environmental water, swine feces, specimens from healthy humans, and human patients. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 5988-5996.
- Huijbers, P.M., de Kraker, M., Graat, E.A., van Hoek, A.H., van Santen, M.G., de Jong, M.C., van Duijkeren, E., de Greeff, S.C., 2013. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in humans living in municipalities with high and low broiler density. *Clin. Microbiol. Infect.: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.*
- Humeniuk, C., Arlet, G., Gautier, V., Grimont, P., Labia, R., Philippon, A., 2002. Beta-lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 3045-3049.
- Hunter, P.A., Dawson, S., French, G.L., Goossens, H., Hawkey, P.M., Kuijper, E.J., Nathwani, D., Taylor, D.J., Teale, C.J., Warren, R.E., Wilcox, M.H., Woodford, N., Wulf, M.W., Piddock, L.J., 2010. Antimicrobial-resistant pathogens in animals and man: prescribing, practices and policies. *J. Antimicrob. Chemother.* 65 Suppl 1, i3-17.
- Huovinen, P., Huovinen, S., Jacoby, G.A., 1988. Sequence of PSE-2 beta-lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32, 134-136.
- Jacoby G. A., Medeiros A. A., 1991 More extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35:1697-1704.
- Jacoby, G.A., 2009. AmpC beta-lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 161-182, Table of Contents.

- Jaurin, B., Grundstrom, T., 1981. ampC cephalosporinase of *Escherichia coli* K-12 has a different evolutionary origin from that of beta-lactamases of the penicillinase type. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 78, 4897-4901.
- Jens Seedorf, J.H., 2002. Dust and Microorganisms in animal husbandry systems. Landwirtschaftsvlg Münster, 166.
- Jensen, L.B., Hasman, H., Agerso, Y., Emborg, H.D., Aarestrup, F.M., 2006. First description of an oxyimino-cephalosporin-resistant, ESBL-carrying *Escherichia coli* isolated from meat sold in Denmark. J. Antimicrob. Chemother. 57, 793-794.
- Jiang, H.X., Tang, D., Liu, Y.H., Zhang, X.H., Zeng, Z.L., Xu, L., Hawkey, P.M., 2012. Prevalence and characteristics of beta-lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Escherichia coli* isolated from farmed fish in China. J. Antimicrob. Chemother.
- Jones, A.M., Harrison, R.M., 2004. The effects of meteorological factors on atmospheric bioaerosol concentrations--a review. The Science of the total environment 326, 151-180.
- Knothe, H., Shah, P., Krcmery, V., Antal, M., Mitsuhashi, S., 1983. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. Infect. 11, 315-317.
- Kojima, A., Ishii, Y., Ishihara, K., Esaki, H., Asai, T., Oda, C., Tamura, Y., Takahashi, T., Yamaguchi, K., 2005. Extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains isolated from farm animals from 1999 to 2002: report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program. Antimicrob. Agents Chemother. 49, 3533-3537.
- Kola, A., Kohler, C., Pfeifer, Y., Schwab, F., Kuhn, K., Schulz, K., Balau, V., Breitbach, K., Bast, A., Witte, W., Gastmeier, P., Steinmetz, I., 2012. High prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in organic and conventional retail chicken meat, Germany. J. Antimicrob. Chemother.
- Korzeniewska, E., 2011. Emission of bacteria and fungi in the air from wastewater treatment plants - a review. Front. Biosci. (Scholar edition) 3, 393-407.
- Korzeniewska, E., Harnisz, M., 2013. Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-positive *Enterobacteriaceae* in municipal sewage and their emission to the environment. J. Environ. Manage. 128C, 904-911.
- Korzeniewska, E., Korzeniewska, A., Harnisz, M., 2013. Antibiotic resistant *Escherichia coli* in hospital and municipal sewage and their emission to the environment. Ecotoxicol. Environ. Saf.,
- Kruse, H., Sorum, H., 1994. Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. Appl. Environ. Microbiol. 60, 4015-4021.
- Kummerer, K., 2009. Antibiotics in the aquatic environment--a review--part I. Chemosphere 75, 417-434.
- Laube, H., Friese, A., von Salviati, C., Guerra, B., Kasbohrer, A., Kreienbrock, L., Roesler, U., 2013. Longitudinal monitoring of extended-spectrum-beta-lactamase/AmpC-producing *Escherichia coli* at German broiler chicken fattening farms. Appl. Environ. Microbiol. 79, 4815-4820.
- Leverstein-van Hall, M.A., Dierikx, C.M., Cohen Stuart, J., Voets, G.M., van den Munckhof, M.P., van Essen-Zandbergen, A., Platteel, T., Fluit, A.C., van de Sande-Bruinsma, N., Scharinga, J., Bonten, M.J., Mevius, D.J., 2011. Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. Clin. Microbiol. Infect. 17:873-880.
- Levy, S.B., FitzGerald, G.B., Maccone, A.B., 1976. Spread of antibiotic-resistant plasmids from chicken to chicken and from chicken to man. Nature 260, 40-42.

- Li, J., Ma, Y., Hu, C., Jin, S., Zhang, Q., Ding, H., Ran, L., Cui, S., 2010a. Dissemination of cefotaxime-M-producing *Escherichia coli* isolates in poultry farms, but not swine farms, in China. *Foodborne Pathog. Dis.* 7, 1387-1392.
- Li, L., Jiang, Z.G., Xia, L.N., Shen, J.Z., Dai, L., Wang, Y., Huang, S.Y., Wu, C.M., 2010b. Characterization of antimicrobial resistance and molecular determinants of beta-lactamase in *Escherichia coli* isolated from chickens in China during 1970-2007. *Vet. Microbiol.* 144, 505-510.
- Liebana, E., Batchelor, M., Hopkins, K.L., Clifton-Hadley, F.A., Teale, C.J., Foster, A., Barker, L., Threlfall, E.J., Davies, R.H., 2006. Longitudinal farm study of extended-spectrum beta-lactamase-mediated resistance. *J. Clin. Microbiol.* 44, 1630-1634.
- Literak, I., Dolejska, M., Janoszowska, D., Hrusakova, J., Meissner, W., Rzyska, H., Bzoma, S., Cizek, A., 2010a. Antibiotic-resistant *Escherichia coli* bacteria, including strains with genes encoding the extended-spectrum beta-lactamase and QnrS, in waterbirds on the Baltic Sea Coast of Poland. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 8126-8134.
- Literak, I., Dolejska, M., Radimersky, T., Klimes, J., Friedman, M., Aarestrup, F.M., Hasman, H., Cizek, A., 2010b. Antimicrobial-resistant faecal *Escherichia coli* in wild mammals in central Europe: multiresistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in wild boars. *J. Appl. Microbiol.* 108, 1702-1711.
- Liu, J.H., Wei, S.Y., Ma, J.Y., Zeng, Z.L., Lu, D.H., Yang, G.X., Chen, Z.L., 2007. Detection and characterisation of CTX-M and CMY-2 beta-lactamases among *Escherichia coli* isolates from farm animals in Guangdong Province of China. *Int. J. Antimicrob. Agents* 29, 576-581.
- Livermore, D.M., 1995. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 8, 557-584.
- Livermore, D.M., 2008. Defining an extended-spectrum beta-lactamase. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clin. Microbiol. Infect.* 14 Suppl 1, 3-10.
- Livermore, D.M., Hawkey, P.M., 2005. CTX-M: changing the face of ESBLs in the UK. *J. Antimicrob. Chemother.* 56, 451-454.
- Looper, M.L., Edrington, T.S., Callaway, T.R., Rosenkrans, C.F., Jr., 2009. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* from contaminated manure slurry applied to soil surrounding tall fescue. *Lett. Appl. Microbiol.* 48, 513-516.
- Lu, S.Y., Zhang, Y.L., Geng, S.N., Li, T.Y., Ye, Z.M., Zhang, D.S., Zou, F., Zhou, H.W., 2010. High diversity of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in an urban river sediment habitat. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 5972-5976.
- M. de Been, J.S., Y. Du, J. Hu, Z. Liu, Y. Lei, Z. Cen, J.W. Cohen Stuart, A.C. Fluit1, M.A. Leverstein-van Hall, M.J.M. Bonten, R.J.L., Willems1, W.v.S., 2013. Whole genome sequence-based epidemiological analysis of ESBL-producing *Escherichia coli*.
- Ma, L., Ishii, Y., Ishiguro, M., Matsuzawa, H., Yamaguchi, K., 1998. Cloning and sequencing of the gene encoding Toho-2, a class A beta-lactamase preferentially inhibited by tazobactam. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 1181-1186.
- Machado, E., Coque, T.M., Canton, R., Sousa, J.C., Peixe, L., 2008. Antibiotic resistance integrons and extended-spectrum {beta}-lactamases among *Enterobacteriaceae* isolates recovered from chickens and swine in Portugal. *J. Antimicrob. Chemother.* 62, 296-302.
- Maddox, T.W., Pinchbeck, G.L., Clegg, P.D., Wedley, A.L., Dawson, S., Williams, N.J., 2012. Cross-sectional study of antimicrobial-resistant bacteria in horses. Part 2: Risk factors for faecal carriage of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* in horses. *Equine Vet. J.* 44, 297-303.
- Madec, J.Y., Lazizzera, C., Chatre, P., Meunier, D., Martin, S., Lepage, G., Menard, M.F., Lebreton, P., Rambaud, T., 2008. Prevalence of fecal carriage of acquired expanded-

- spectrum cephalosporin resistance in *Enterobacteriaceae* strains from cattle in France. *J. Clin. Microbiol.* 46, 1566-1567.
- Marthi, B., Fieland, V.P., Walter, M., Seidler, R.J., 1990. Survival of bacteria during aerosolization. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 3463-3467.
- Martinez, J.L., 2009. The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proc. Biol. Sci.* 276, 2521-2530.
- Matsumoto, Y., Ikeda, F., Kamimura, T., Yokota, Y., Mine, Y., 1988. Novel plasmid-mediated beta-lactamase from *Escherichia coli* that inactivates oxyimino-cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32, 1243-1246.
- Medeiros, A.A., 1984. Beta-lactamases. *Br. Med. Bull.* 40, 18-27.
- Mesa, R.J., Blanc, V., Blanch, A.R., Cortes, P., Gonzalez, J.J., Lavilla, S., Miro, E., Muniesa, M., Saco, M., Tortola, M.T., Mirelis, B., Coll, P., Llagostera, M., Prats, G., Navarro, F., 2006. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in different environments (humans, food, animal farms and sewage). *J. Antimicrob. Chemother.* 58, 211-215.
- Meunier, D., Jouy, E., Lazizzera, C., Kobisch, M., Madec, J.Y., 2006. CTX-M-1- and CTX-M-15-type beta-lactamases in clinical *Escherichia coli* isolates recovered from food-producing animals in France. *Int. J. Antimicrob. Agents* 28, 402-407.
- Mevius DJK, M.G.J.W., B. ; Pelt, W., van ; Bondt, N. , 2009. Monitoring of antimicrobial resistance and antibiotic usage in animals in the Netherlands in 2009. MARAN2009.
- Moreno, A., Bello, H., Guggiana, D., Dominguez, M., Gonzalez, G., 2008. Extended-spectrum beta-lactamases belonging to CTX-M group produced by *Escherichia coli* strains isolated from companion animals treated with enrofloxacin. *Vet. Microbiol.* 129, 203-208.
- Murphy, C., Reid-Smith, R.J., Prescott, J.F., Bonnett, B.N., Poppe, C., Boerlin, P., Weese, J.S., Janecko, N., McEwen, S.A., 2009. Occurrence of antimicrobial resistant bacteria in healthy dogs and cats presented to private veterinary hospitals in southern Ontario: A preliminary study. *Can. Vet. J.* 50, 1047-1053.
- Olesen, I., Hasman, H., Aarestrup, F.M., 2004. Prevalence of beta-lactamases among ampicillin-resistant *Escherichia coli* and *Salmonella* isolated from food animals in Denmark. *Microb. Drug Resist. (Larchmont, N.Y.)* 10, 334-340.
- Ouellette, M., Bissonnette, L., Roy, P.H., 1987. Precise insertion of antibiotic resistance determinants into Tn21-like transposons: nucleotide sequence of the OXA-1 beta-lactamase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 7378-7382.
- Overdevest, I., Willemsen, I., Rijnsburger, M., Eustace, A., Xu, L., Hawkey, P., Heck, M., Savelkoul, P., Vandenbroucke-Grauls, C., van der Zwaluw, K., Huijsdens, X., Kluytmans, J., 2011. Extended-spectrum beta-lactamase genes of *Escherichia coli* in chicken meat and humans, The Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 1216-1222.
- Papanicolaou, G.A., Medeiros, A.A., Jacoby, G.A., 1990. Novel plasmid-mediated beta-lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino- and alpha-methoxy beta-lactams in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34, 2200-2209.
- Paterson, D.L., Bonomo, R.A., 2005. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 657-686.
- Pearson, C.C., Sharples, T.J., 1995. Airborne Dust Concentrations in Livestock Buildings and the Effect of Feed. *J. Agric. Eng. Res.* Vol:60(3), pp 145-154.
- Pfeifer, Y., Cullik, A., Witte, W., 2010. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *Int. J. Med. Microbiol. : IJMM* 300, 371-379.
- Philippon, A., Arlet, G., Jacoby, G.A., 2002. Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 1-11.

- Perilli M., Felici A., Franceschini N., Santis A. D., Pagani L., Luzzaro F., Oratore A., Rossolini G. M., Knox J. R., Amicosante G., 1997 Characterization of a new TEM-derived β -lactamase produced in a *Serratia marcescens* strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:2374–2382.
- Pitout, J.D., Laupland, K.B., 2008. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *Lancet Infectious Dis.* 8, 159-166.
- Platell, J.L., Cobbold, R.N., Johnson, J.R., Heisig, A., Heisig, P., Clabots, C., Kuskowski, M.A., Trott, D.J., 2011a. Commonality among fluoroquinolone-resistant sequence type ST131 extraintestinal *Escherichia coli* isolates from humans and companion animals in Australia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 3782-3787.
- Platell, J.L., Johnson, J.R., Cobbold, R.N., Trott, D.J., 2011b. Multidrug-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* of sequence type ST131 in animals and foods. *Vet. Microbiol.* 153, 99-108.
- Poeta, P., Radhouani, H., Pinto, L., Martinho, A., Rego, V., Rodrigues, R., Goncalves, A., Rodrigues, J., Estepa, V., Torres, C., Igrejas, G., 2009. Wild boars as reservoirs of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* of different phylogenetic groups. *J Basic Microbiol* 49, 584-588.
- Poirel, L., Kampfer, P., Nordmann, P., 2002. Chromosome-encoded Ambler class A beta-lactamase of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 4038-4040.
- Pomba, C., da Fonseca, J.D., Baptista, B.C., Correia, J.D., Martinez-Martinez, L., 2009. Detection of the pandemic O25-ST131 human virulent *Escherichia coli* CTX-M-15-producing clone harboring the qnrB2 and aac(6')-Ib-cr genes in a dog. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 327-328.
- Prinarakis, E.E., Miriagou, V., Tzelepi, E., Gazouli, M., Tzouvelekis, L.S., 1997. Emergence of an inhibitor-resistant beta-lactamase (SHV-10) derived from an SHV-5 variant. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 838-840.
- Radhouani, H., Poeta, P., Igrejas, G., Goncalves, A., Vinue, L., Torres, C., 2009. Antimicrobial resistance and phylogenetic groups in isolates of *Escherichia coli* from seagulls at the Berlengas nature reserve. *Vet. Rec.* 165, 138-142.
- Randall, L.P., Clouting, C., Horton, R.A., Coldham, N.G., Wu, G., Clifton-Hadley, F.A., Davies, R.H., Teale, C.J., 2011. Prevalence of *Escherichia coli* carrying extended-spectrum beta-lactamases (CTX-M and TEM-52) from broiler chickens and turkeys in Great Britain between 2006 and 2009. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 86-95.
- Reinthaler, F.F., Feierl, G., Galler, H., Haas, D., Leitner, E., Mascher, F., Melkes, A., Posch, J., Winter, I., Zarfel, G., Marth, E., 2010. ESBL-producing *E. coli* in Austrian sewage sludge. *Water Res.* 44, 1981-1985.
- Ribot, E.M., Fair, M.A., Gautom, R., Cameron, D.N., Hunter, S.B., Swaminathan, B., Barrett, T.J., 2006. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog. Dis.* 3, 59-67.
- Ruiz del Castillo, B., Vinue, L., Roman, E.J., Guerra, B., Carattoli, A., Torres, C., Martinez-Martinez, L., 2013. Molecular characterization of multiresistant *Escherichia coli* producing or not extended-spectrum beta-lactamases. *BMC Microbiol.* 13, 84.
- Sabia, C., Gargiulo, R., Sarti, M., 2012. Evaluation of a double synergy differential test (DSDT) for differential detection of ESBL and AmpC-type beta-lactamases in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis*. *New Microbiol.* 35, 221-225.

- Sanchez, S., McCrackin Stevenson, M.A., Hudson, C.R., Maier, M., Buffington, T., Dam, Q., Maurer, J.J., 2002. Characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates associated with nosocomial infections in dogs. *J. Clin. Microbiol.* 40, 3586-3595.
- Schink, A.K., Kadlec, K., Kaspar, H., Mankertz, J., Schwarz, S., 2013. Analysis of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates collected in the GERM-Vet monitoring programme. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 1741-1749.
- Schink, A.K., Kadlec, K., Schwarz, S., 2011. Analysis of bla(CTX-M)-carrying plasmids from *Escherichia coli* isolates collected in the BfT-GermVet study. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 7142-7146.
- Seedorf, J., Schroder, M., Hartung, J., 1998. Emissions and immisions of bio-aerosols from a duck fattening unit. *Zentral Hyg Umweltmed* 201, 387-403.
- Seiffert, S.N., Hilty, M., Perreten, V., Endimiani, A., 2013. Extended-spectrum cephalosporin-resistant Gram-negative organisms in livestock: an emerging problem for human health? *Drug Resist. Updat.* 16, 22-45.
- Shaheen, B.W., Nayak, R., Foley, S.L., Kweon, O., Deck, J., Park, M., Rafii, F., Boothe, D.M., 2011. Molecular characterization of resistance to extended-spectrum cephalosporins in clinical *Escherichia coli* isolates from companion animals in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 5666-5675.
- Shiraki, Y., Shibata, N., Doi, Y., Arakawa, Y., 2004. *Escherichia coli* producing CTX-M-2 beta-lactamase in cattle, Japan. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 69-75.
- Sidjabat, H.E., Townsend, K.M., Hanson, N.D., Bell, J.M., Stokes, H.W., Gobius, K.S., Moss, S.M., Trott, D.J., 2006. Identification of bla(CMY-7) and associated plasmid-mediated resistance genes in multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from dogs at a veterinary teaching hospital in Australia. *J. Antimicrob. Chemother.* 57, 840-848.
- Simner, P.J., Zhanel, G.G., Pitout, J., Taylor, F., McCracken, M., Mulvey, M.R., Lagace-Wiens, P.R., Adam, H.J., Hoban, D.J., 2011. Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamase- and AmpC beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: results of the CANWARD 2007-2009 study. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 69, 326-334.
- Smet, A., Martel, A., Persoons, D., Dewulf, J., Heyndrickx, M., Catry, B., Herman, L., Haesebrouck, F., Butaye, P., 2008. Diversity of extended-spectrum beta-lactamases and class C beta-lactamases among cloacal *Escherichia coli* Isolates in Belgian broiler farms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 1238-1243.
- Smet, A., Martel, A., Persoons, D., Dewulf, J., Heyndrickx, M., Cloeckert, A., Praud, K., Claeys, G., Catry, B., Herman, L., Haesebrouck, F., Butaye, P., 2009. Comparative analysis of extended-spectrum- β -lactamase-carrying plasmids from different members of *Enterobacteriaceae* isolated from poultry, pigs and humans: evidence for a shared β -lactam resistance gene pool? *J. Antimicrob. Chemother.* 63, 1286-1288.
- Smet, A., Martel, A., Persoons, D., Dewulf, J., Heyndrickx, M., Herman, L., Haesebrouck, F., Butaye, P., 2010. Broad-spectrum beta-lactamases among *Enterobacteriaceae* of animal origin: molecular aspects, mobility and impact on public health. *FEMS Microbiol. Rev.* 34, 295-316.
- Snow, L.C., Wearing, H., Stephenson, B., Teale, C.J., Coldham, N.G., 2011. Investigation of the presence of ESBL-producing *Escherichia coli* in the North Wales and West Midlands areas of the UK in 2007 to 2008 using scanning surveillance. *Vet. Rec.* 169, 656.
- Sougakoff, W., Goussard, S., Gerbaud, G., Courvalin, P., 1988. Plasmid-mediated resistance to third-generation cephalosporins caused by point mutations in TEM-type penicillinase genes. *Rev. Infect. Dis.* 10, 879-884.

- Steen, S.I., Webb, P.J., 2007. Extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria isolated from companion animals. *Vet. Rec.* 161, 703.
- Sturenburg, E., Mack, D., 2003. Extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. *J. Infect.* 47, 273-295.
- Sun, Y., Zeng, Z., Chen, S., Ma, J., He, L., Liu, Y., Deng, Y., Lei, T., Zhao, J., Liu, J.H., 2010. High prevalence of bla(CTX-M) extended-spectrum beta-lactamase genes in *Escherichia coli* isolates from pets and emergence of CTX-M-64 in China. *Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 16, 1475-1481.
- Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring (SVARM), 2010. The National Veterinary Institute (SVA), Uppsala, Sweden. <http://www.sva.se>.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., Swaminathan, B., 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2233-2239.
- Terzieva, S., Donnelly, J., Ulevicius, V., Grinshpun, S.A., Willeke, K., Stelma, G.N., Brenner, K.P., 1996. Comparison of methods for detection and enumeration of airborne microorganisms collected by liquid impingement. *Applied and environmental microbiology* 62, 2264-2272.
- Teshager, T., Dominguez, L., Moreno, M.A., Saenz, Y., Torres, C., Cardenosa, S., 2000. Isolation of an SHV-12 beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strain from a dog with recurrent urinary tract infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 3483-3484.
- Timofte, D., Dandrieux, J., Wattret, A., Fick, J., Williams, N.J., 2011. Detection of extended-spectrum-beta-lactamase-positive *Escherichia coli* in bile isolates from two dogs with bacterial cholangiohepatitis. *J. Clin. Microbiol.* 49, 3411-3414.
- Tong, Y., and B. Lighthart., 1998. Effect of simulated solar radiation on mixed outdoor atmospheric bacterial populations. *FEMS Microbiol. Ecol* 26:311–316.
- Tzouveleakis, L.S., Tzelepi, E., Tassios, P.T., Legakis, N.J., 2000. CTX-M-type beta-lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. *International journal of antimicrobial agents* 14, 137-142.
- Valverde, A., Grill, F., Coque, T.M., Pintado, V., Baquero, F., Canton, R., Cobo, J., 2008. High rate of intestinal colonization with extended-spectrum-beta-lactamase-producing organisms in household contacts of infected community patients. *J. Clin. Microbiol.* 46, 2796-2799.
- 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., 2010. Food reservoir for *Escherichia coli* causing urinary tract infections. *Emerging infectious diseases* 16, 88-95.
- Warren, R.E., Ensor, V.M., O'Neill, P., Butler, V., Taylor, J., Nye, K., Harvey, M., Livermore, D.M., Woodford, N., Hawkey, P.M., 2008. Imported chicken meat as a potential source of quinolone-resistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in the UK. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 61, 504-508.
- Weill, F.X., Demartin, M., Tande, D., Espie, E., Rakotoarivony, I., Grimont, P.A., 2004. SHV-12-like extended-spectrum-beta-lactamase-producing strains of *Salmonella enterica* serotypes Babelsberg and Enteritidis isolated in France among infants adopted from Mali. *J. Clin. Microbiol.* 42, 2432-2437.
- Wieler, L.H., Ewers, C., Guenther, S., Walther, B., Lubke-Becker, A., 2011a. Methicillin-resistant *Staphylococci* (MRS) and extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* in companion animals: nosocomial infections as one reason for the rising prevalence of these potential zoonotic pathogens in clinical samples. *Int. J. Med. Microbiol.* 301, 635-641.

- Wieler, L.H., Semmler, T., Eichhorn, I., Antao, E.M., Kinnemann, B., Geue, L., Karch, H., Guenther, S., Bethe, A., 2011b. No evidence of the Shiga toxin-producing *E. coli* O104:H4 outbreak strain or enteroaggregative *E. coli* (EAEC) found in cattle faeces in northern Germany, the hotspot of the 2011 HUS outbreak area. *Gut Pathog* 3, 17.
- Wikler, M.A., 2009. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: Approved standard, 10 Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa, xvi, 53 pp.
- Wittum, T.E., Mollenkopf, D.F., Daniels, J.B., Parkinson, A.E., Mathews, J.L., Fry, P.R., Abley, M.J., Gebreyes, W.A., 2010. CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases present in *Escherichia coli* from the feces of cattle in Ohio, United States. *Foodborne Pathog. Dis.* 7, 1575-1579.
- Wu, S., Chouliara, E., Hasman, H., Dalsgaard, A., Vieira, A., Jensen, L.B., 2008. Detection of a single isolate of CTX-M-1-producing *Escherichia coli* from healthy pigs in Denmark. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 61, 747-749.
- Xu, L., Ensor, V., Gossain, S., Nye, K., Hawkey, P., 2005. Rapid and simple detection of blaCTX-M genes by multiplex PCR assay. *Journal of medical microbiology* 54, 1183-1187.
- Yan, J.J., Hong, C.Y., Ko, W.C., Chen, Y.J., Tsai, S.H., Chuang, C.L., Wu, J.J., 2004. Dissemination of blaCMY-2 among *Escherichia coli* isolates from food animals, retail ground meats, and humans in southern Taiwan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 1353-1356.
- Zarfel, G., Galler, H., Feierl, G., Haas, D., Kittinger, C., Leitner, E., Grisold, A.J., Mascher, F., Posch, J., Pertschy, B., Marth, E., Reinhaller, F.F., 2013. Comparison of extended-spectrum-beta-lactamase (ESBL) carrying *Escherichia coli* from sewage sludge and human urinary tract infection. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)* 173, 192-199.
- Zhao, S., White, D.G., McDermott, P.F., Friedman, S., English, L., Ayers, S., Meng, J., Maurer, J.J., Holland, R., Walker, R.D., 2001. Identification and expression of cephamycinase bla(CMY) genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from food animals and ground meat. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 3647-3650.
- Zucker, B.A., Trojan, S., Muller, W., 2000. Airborne gram-negative bacterial flora in animal houses. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health* 47, 37-46.

7 PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

Wissenschaftliche Artikel

Laube, H., A. Friese, C. von Salviati, B. Guerra, A. Käsbohrer, L. Kreienbrock, U. Roesler. 2013. **Longitudinal monitoring of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* in German broiler chicken fattening farms.** Appl Environ Microbiol. 2013 Aug;79(16):4815-20. doi: 10.1128/AEM.00856-13. Epub 2013 Jun 7. PMID:23747697

Laube H, Friese A, von Salviati C, Guerra B, Rösler U. **Transmission of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from broiler chicken farms to surrounding areas.** Vet Microbiol. 2014 Aug 27;172(3-4):519-27. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.06.008. Epub 2014 Jun 28.

von Salviati C, Laube H, Guerra B, Roesler U, Friese A.

Emission of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from pig fattening farms to surrounding areas. Vet Microbiol. 2015 Jan 30;175(1):77-84. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.10.010. Epub 2014 Oct 25. PMID:25465658

von Salviati, C.; Laube, H.; Guerra, B.; Roesler, U.; Friese, A. (2015): **Emission of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from pig fattening farms to surrounding areas.** Veterinary Microbiology; **175**(1), S. 77–84

Friese A, Schulz J, Laube H, von Salviati C, Hartung J, Roesler U. **Faecal occurrence and emissions of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (laMRSA) and ESBL/AmpC-producing *E. coli* from animal farms in Germany.** Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 2013 Mar-Apr;126(3-4):175-80. PMID: 23540202

Poster

Fluoroquinolone-resistant *Enterobacteriaceae* in and around chicken and swine farms

H. Laube, C. von Salviati, B. Guerra, A. Käsbohrer, L. Kreienbrock, A. Friese, U. Rösler
National Symposium on Zoonoses Research 2012; Berlin – 11.10.-12.10.2012 ; In:
Abstractband Nationales Symposium für Zoonosenforschung 2012; S. 194

Occurrence of disinfectant resistance at ESBL- /AMPC-producing *E. Coli* isolates from chicken.

Li, T.; Roschanski, N.; Laube, H.; Friese, A.; Rösler, U. (2014):

German Symposium on Zoonoses Research and 7th International Conference on Emerging Zoonoses Berlin – 16.10.-17.10.2014.

Vorträge

Bestandskinetik und Emissionen von ESBL-bildenden *E. coli* in Geflügel- und Schweinemastbetrieben

H. Laube, A. Friese, C. Salviati, Prof. U. Rösler

BMELV-Symposium „Verbraucherschutz in DART: Forschungserkenntnisse und –perspektiven zu Antibiotikaresistenzen“; Berlin – 22.05.-23.05.2012.; In: Verbraucherschutz in DART: Forschungserkenntnisse und -perspektiven zu Antibiotikaresistenzen – Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (Hrsg.); S. 41–42

Emissions of ESBL/AmpC-producing *E. coli* from broiler and pig fattening farms in Germany

H. Laube, A. Friese, C. von Salviati, U. Rösler

(<http://www.arae2013.be/Welcome.html>)

ARAE 2013 – 5th Symposium on Antimicrobial Resistance in Animals and the Environment; Ghent, Belgium – 01.07.-03.07.2013; In: 5th Symposium on Antimicrobial Resistance in animals and Environment; S. 50

Spread of ESBL-producing and fluoroquinolone-resistant *Enterobacteriaceae* in and around chicken farms.

H. Laube, A. Friese, C. Salviati, B. Guerra, A. Käsbohrer, U. Rösler

Leipzig – 27.06. – 29.06.2012; In: Tagung der Fachgruppe „Bakteriologie und Mykologie“; Leipzig: DVG-Service, S.25-26; ISBN: 978-3-86345-080-9

8 DANKSAGUNG

Am Anfang möchte ich mich natürlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Uwe Rösler bedanken, der mir die Möglichkeit gab, diese Doktorarbeit am Institut für Tier- und Umwelthygiene schreiben zu können. In dieser Zeit erhielt ich tiefgehende Einblicke in die Molekularbiologie, habe viele neue Dinge gelernt und Erfahrungen gesammelt. Ganz besonders aber danke ich Dr. Anika Frieese für die immer sehr sehr gute und freundliche Betreuung, die permanente Ansprechbarkeit, für viele gute Ratschläge, ständige Hilfe in allen erdenklichen Situationen, eine tolle Reise nach China, aber auch für das Gewähren von Freiheiten.

Daneben richte ich auch ein großes Dankeschön an Dr. Jayaseelan Murugaiyan vor allem für seine Hilfe mit der – "LADY" – MALDI-TOF. Nicht zu vergessen sind die medizinischtechnischen Assistentinnen Karin Fiedler, Heike Jansen, Maja Thieck, Susann Sellenthin und Michael Kühl. Tausend Dank für die vielen netten Stunden im Labor, das Gießen sämtlicher ESBL-Nährböden und das Bereitstellen aller benötigten Labor-Materialien. Ein großer Dank geht natürlich auch an alle meine Kollegen im Doktorandenzimmer, insbesondere Dr. Katrin Zimmermann, Alexandra Irrgang, Karolin Krüger und Nils Kühl. Ich habe immer sehr gerne mit euch zusammen im Labor und noch viel lieber in den Tierställen gearbeitet. Ohne euch wären die vielen Ausfahrten und Probenahmen nicht möglich gewesen. DANKE!!!!

Ein weiteres großes Dankeschön möchte ich noch an Dr. Benjamin Etschmann richten, für unermüdliche und manchmal auch kurzfristige Englisch - Korrekturen.

Über die Universität hinaus möchte ich mich an dieser Stelle natürlich auch für die wunderbare Unterstützung durch meine Freunde bedanken. Zum einen vielen, vielen Dank an Torsten Dahms und Corinna Jankowski für die dauerhafte Motivation und das Korrektur-Lesen und - DANKE Torsten - für das viele KOPF-FREI-LAUFEN durch Berlin.

Abschließend gilt der größte Dank jedoch meiner lieben Familie, dabei ganz besonders meinem lieben Karsten und meinen beiden bezaubernden Kindern Lara und Lena.

9 SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 12.02.2016 Henriette Laube