

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

**Langzeituntersuchungen von Extended-Spektrum-Beta-Laktamase (ESBL)/AmpC Beta-
Laktamase-bildenden *Escherichia coli* in Schweinemastbetrieben und deren Umgebung**

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

vorgelegt von
Christina Katharina Beatrice von Salviati-Claudius
geb. von Salviati
Tierärztin
aus Kronberg im Taunus

Berlin 2016

Journal-Nr.: 3941

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:	Prof. Dr. Karl-Heinz Lahrmann

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

pigs; *Escherichia coli*; extended spectrum beta-lactamases; pig farming; pig finishing;
environment; prevalence; emission; drug resistance; antibiotics; MALDI-TOF;
polymerase chain reaction; pulsed field electrophoresis; germany

Tag der Promotion: 16.06.2017

Für meine Familie
in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)/AmpC beta-lactamases-producing <i>Escherichia coli</i> in German fattening pig farms: a longitudinal study.....	7
2.1	Summary - Zusammenfassung	7
2.2	Introduction	9
2.3	Material and Methods.....	10
2.4	Results	14
2.5	Discussion.....	16
2.6	Acknowledgement.....	20
2.7	Literature	21
2.8	Tables.....	25
3	Emission of ESBL/AmpC-producing <i>Escherichia coli</i> from pig fattening farms to surrounding areas	29
3.1	Abstract.....	29
3.2	Introduction	30
3.3	Material and methods	31
3.4	Results	36
3.5	Discussion.....	39
3.6	Conclusion.....	42
3.7	Acknowledgements	42
3.8	References	43
3.9	Tables and figures.....	47

4	Diskussion	52
4.1	Langzeituntersuchungen von ESBL/AmpC-bildenden <i>Escherichia coli</i> in deutschen Schweinemastbetrieben	53
4.2	Emission ESBL/AmpC-bildender <i>Escherichia coli</i> aus Schweinemastbetrieben	61
4.3	Nachweis und Charakterisierung von ESBL/AmpC Beta-Laktamasen in <i>Escherichia coli</i>	69
5	Schlussfolgerung	72
6	Zusammenfassung	78
7	Summary	81
8	Literaturverzeichnis	83
9	Publikationsverzeichnis	97
10	Danksagung	103
11	Selbstständigkeitserklärung	104

1 Einleitung

Bei ihrer Entdeckung wurden Antibiotika als „Wundermittel“ bezeichnet. In der Tat stellen sie sehr wirksame Mittel gegen bakterielle Erkrankungen dar, die die Medizin des 20. Jahrhunderts revolutioniert haben. In den vergangenen Jahrzehnten haben Bakterien jedoch zunehmend Resistenzen gegen diese antimikrobiellen Wirkstoffe entwickelt und Antibiotikaresistenzen sind zu einem bedeutenden Thema in Human- und Tiermedizin geworden. Dabei ist die Bildung von Beta-Laktamasen mit erweitertem Wirkungsspektrum (**Extended-Spektrum-Beta-Laktamasen (ESBL)**) und AmpC Beta-Laktamasen (AmpC) ein bedeutender Resistenzmechanismus. Diese Enzyme inaktivieren viele der weltweit sehr häufig eingesetzten Beta-Laktam-Antibiotika, inklusive der von der WHO als „critically important antimicrobials“ eingestuft, medizinisch-therapeutisch sehr relevanten Cephalosporine der 3. und 4. Generation. Dabei hydrolisieren sie den Beta-Laktamring, der die Grundstruktur der Beta-Laktame und das antibakteriell aktive Zentrum bildet und inaktivieren somit deren antibakterielle Wirkung. Darüber hinaus sind diese Resistenzen oft durch Co-Lokalisation von Resistenzgenen gekoppelt mit weiteren Resistenzen (Co-Resistenz) gegen andere Antibiotika wie Fluorchinolone, Aminoglykoside und Trimethoprim-Sulfamethoxazol (1). Als Konsequenz schränken ESBL/AmpC-bildende Enterobakterien die therapeutischen Möglichkeiten in der Human- und Tiermedizin zunehmend ein.

Die meisten der heute bekannten Extended-Spektrum-Beta-Laktamasen sind durch Punktmutationen in den *bla*-Genen aus den klassischen Beta-Laktamasen entstanden. Dadurch konnten diese Enzyme nun auch an die neueren Cephalosporine binden und diese hydrolisieren (2). Die zunehmende Verbreitung von Beta-Laktamasen gab den Anstoß, Beta-Laktamase-stabile Beta-Laktam-Antibiotika zu entwickeln (3) und somit kamen in den 1980er Jahren Oxyiminio-Cephalosporine auf den Markt. Sie wurden bald umfangreich eingesetzt, was zu einem entsprechend großen Selektionsdruck und schließlich, durch Veränderung der Laktamasen, zur vermehrten Ausbildung von Resistenzen führte (3). Diese Beta-Laktamasen wurden aufgrund ihres erweiterten Aktivitätsspektrums, insbesondere gegenüber Oxyiminio-Cephalosporinen, als Extended-Spektrum-Beta-Laktamasen klassifiziert (4).

Die Vielzahl der Beta-Laktamasen lassen sich nach ihrer molekularen Struktur mit dem Schema nach Ambler (5) und nach ihrer Funktion (6) in Klassen und Gruppen einteilen. Der überwiegende Teil der ESBL gehört zur Ambler Klasse A und zur funktionellen Gruppe 2be (7). ESBL und AmpC Beta-Laktamasen weisen verschiedene Genotypen auf. Die vorherrschenden ESBL-Genfamilien sind *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} und *bla*_{SHV}. Die vorherrschende AmpC-Genfamilie ist *bla*_{CMY} (8). Am häufigsten werden diese ESBL/AmpC-Gene bei *Escherichia coli* und nicht-typhoiden *Salmonella* spp. nachgewiesen (8). Obwohl sich ESBL nur durch Punktmutationen im *bla*-Gen voneinander unterscheiden, sind sie in ihrem Wirkungsspektrum doch sehr verschieden.

In den 1960er Jahren beschrieben Datta und Kontomichalou (9) *bla*_{TEM-1} als erste plasmidvermittelte Beta-Laktamase in gramnegativen Bakterien. Der Name TEM-1 stammt von den ersten drei Buchstaben einer griechischen Patientin namens Temoniera, in deren Blutprobe in einem *E. coli*-Stamm *bla*_{TEM-1} entdeckt wurde (10). *bla*_{TEM-2} ist das erste Derivat von *bla*_{TEM-1} und unterscheidet sich nur durch eine einzelne Aminosäuresequenz von *bla*_{TEM-1} (11). *bla*_{TEM-1} und *bla*_{TEM-2} gehören selbst nicht zu den Extended-Spektrum-Beta-Laktamasen, jedoch entstanden alle TEM-ESBL durch Punktmutationen aus *bla*_{TEM-1} und *bla*_{TEM-2} (12).

Die SHV Beta-Laktamasen (SHV steht für „Sulphydryl variable“ aufgrund der strukturellen Eigenschaft dieser Enzyme) stammen ursprünglich aus *Klebsiella* spp. Es wird davon ausgegangen, dass *bla*_{SHV-1}, der Vorläufer aller *bla*_{SHV}-Derivate, ursprünglich chromosomal in *Klebsiella* spp. vorkam und plasmidvermittelt auf weitere Enterobakterien übertragen wurde (2). 1983 wurde *bla*_{SHV-2} als erstes Derivat von *bla*_{SHV-1} in einem humanen *Klebsiella pneumoniae*-Isolat in Deutschland entdeckt und stellte gleichzeitig die erste nachgewiesene Extended-Spektrum-Beta-Laktamase dar (13). Bisher wurden 220 TEM und 192 SHV Beta-Laktamasen gelistet (<http://www.lahey.org/Studies/>) (Stand 5.05.2015). Viele davon gehören zu den ESBL.

Vor der Jahrtausendwende waren ESBL vom SHV- und TEM-Typ, die am häufigsten nachgewiesenen ESBL-Varianten (8). Heutzutage ist CTX-M die weltweit am weitesten verbreitete und am häufigsten nachgewiesene ESBL in Lebensmittel liefernden Tieren, Lebensmitteln und dem Menschen (14-17). Bisher wurden fünf *bla*_{CTX-M}-Hauptgruppen beschrieben: Gruppe 1, 2, 8, 9 und 25 (17). Zur Gruppe 1 gehören die *bla*_{CTX-M}-Gene *bla*_{CTX-}

M-1, -3, -10, -11, -12, -15, -22, -23, -27, -28, -29, -30, -32, -33, -34, -36, -37 und -42; Gruppe 2 angehörig sind *bla*_{CTX-M-2}, -4, -5, -6, -7, -20, -31, -35 und *bla*_{Toho-1}; Gruppe 9 enthält *bla*_{CTX-M-9}, -13, -14, -16, -17, -18, -19, -21, -24, -38 und *bla*_{Toho-2}; auf die Gruppe 8 entfallen *bla*_{CTX-M-8}, -40, -41 und zur Gruppe 25/26 gehören *bla*_{CTX-M-25}, -26, und -39 (18). Vor allem das *bla*_{CTX-M-1}-Gen (zur *bla*_{CTX-M}-Gruppe 1 gehörend) ist weit verbreitet bei Lebensmittel liefernden Tieren in der EU (8, 14). ESBL vom *bla*_{CTX-M}-Typ wurde erstmalig 1988 in Japan beschrieben (19). Kurze Zeit später wurde *bla*_{CTX-M} auch in Deutschland nachgewiesen (20). Aufgrund der hydrolytischen Aktivität gegenüber Cefotaxim bekam dieser ESBL-Typ die Bezeichnung CTX-M (Cefotaximase Munich). Anhand von Sequenzanalysen wurde gezeigt, dass CTX-M-ESBL zu weniger als 39% mit SHV und TEM übereinstimmen (21). Es wird vermutet, dass CTX-M-ESBL von den in *Klyuvera* spp. natürlich vorkommenden und chromosomal kodierten Beta-Laktamasen abstammen (17, 22, 23). Üblicherweise befinden sich *bla*_{CTX-M}-Gene auf Plasmiden mit Größen zwischen 7kb (24) und 160 kb (25). Oft befindet sich das *bla*_{TEM-1}-Gen auf dem gleichen Plasmid. Aber auch Kombinationen mit *bla*_{TEM-2}, *bla*_{OXA-1} und *bla*_{SHV} sind möglich (26, 27). Solche Plasmide können neben der Resistenz gegenüber Oxyimino-Cephalosporinen zusätzlich auch Resistenzgene für andere Wirkstoffe, wie zum Beispiel Tetrazykline, Aminoglykoside, Chloramphenicol, Sulfonamide und Trimethoprim, tragen (17). Bisher wurden 166 *bla*_{CTX-M} gelistet (<http://www.lahey.org/studies/other.asp#table1>) (Stand 5.05.2015), die alle zu den ESBL gehören.

Eine weitere Gruppe sind die OXA Beta-Laktamasen, welche vor allem in *Pseudomonas aeruginosa* nachgewiesen wurden (4). Aufgrund der Fähigkeit dieser Enzyme Oxacillin zu hydrolisieren, erhielten sie die Bezeichnung OXA (28). Bisher wurden 488 OXA Beta-Laktamasen gelistet (<http://www.lahey.org/studies/other.asp#table1>) (Stand 5.05.2015), von denen jedoch nur wenige zu den ESBL gehören.

Die meisten ESBL können den oben genannten vier Genfamilien zugeordnet werden. Es gibt jedoch noch weitere ESBL, die nicht mit den etablierten Genfamilien verwandt sind. Dazu gehören *bla*_{PER-1}, *bla*_{PER-2}, *bla*_{VEB-1}, *bla*_{CME-1} und *bla*_{TLA-1}, welche auch Resistenzen gegenüber Oxyimino-Cephalosporinen übertragen (4).

Eine weitere große Gruppe an Beta-Laktamasen bilden die AmpC-Enzyme. Einige gramnegative Bakterien, wie zum Beispiel *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* und *Pseudomonas aeruginosa*, besitzen von Natur

aus ein chromosomal lokalisiertes *ampC*-Gen. Durch den AmpR-vermittelten Regulationsmechanismus ist das Gen reprimiert, bei Therapie mit Cephalosporinen können jedoch konstitutive Mutanten selektiert werden (29). Die bekannten plasmidkodierte Enzyme und AmpC Beta-Laktamasen, die durch ein chromosomales *ampC*-Gen kodiert sind, zeigen deutliche Homologien (30). Durch das Auftreten von AmpC Beta-Laktamasen bei bakteriellen Infektionserregern, die kein chromosomales *ampC*-Gen aufweisen (wie *K. pneumoniae*, *Salmonella* spp. und *P. mirabilis*), kam es schließlich zur Entdeckung der Übertragung von *ampC*-Genen auf Plasmide (31). Daten, die für AmpC-Enzyme mit Herkunft aus *C. freundii* vorhanden sind, weisen darauf hin, dass *ampC*-Gene durch eine Insertionssequenz mobilisiert und anschließend in ein Plasmid integriert wurden. Später führten wahrscheinlich Mutationen in *ampC* zu den verschiedenen CMY- und LAT-Typen (32, 33). Das Auftreten von plasmidkodierten AmpC Beta-Laktamasen wurde mittlerweile weltweit beobachtet (30). Die am häufigsten nachgewiesene AmpC Beta-Laktamase in Nutztieren ist CMY, dabei vor allem das CMY-2-Gen (8).

Seit dem ersten ESBL-Nachweis in einem humanen *Klebsiella pneumoniae*-Isolat im Jahr 1983 (13) wurden ESBL/AmpC Beta-Laktamasen kontinuierlich und zunehmend beschrieben. In der Humanmedizin sind ESBL-bildende Infektionserreger heute von großer Bedeutung. Klinische Daten deuten darauf hin, dass ESBL-bildende Infektionserreger zu höheren Mortalitäts- und Komplikationsraten führen (2). Dabei haben vor allem schwer erkrankte Patienten mit einem langen Krankenhausaufenthalt und intensivmedizinischer Betreuung ein höheres Risiko an einer durch ESBL-Bildner verursachten Infektion zu erkranken (34-36). Außerdem stellt der verstärkte Einsatz von Antibiotika einen weiteren Risikofaktor dar. Eine Verbindung zwischen dem Einsatz von Cephalosporinen der 3. Generation und dem Erwerb von ESBL-bildenden Keimen wurde bereits beschrieben (37, 38). Neben nosokomialen Infektionswegen ist jedoch auch eine Infektion mit ESBL-Bildnern im Alltag möglich (39-42).

Mit großer Besorgnis wird auch die Ausbreitung von ESBL/AmpC-bildenden Bakterien bei Lebensmittel liefernden Tieren beobachtet. Von dem Vorkommen von ESBL/AmpC-bildenden Enterobakterien in Lebensmittel liefernden Tieren wurde erstmals 1999-2000 in den USA berichtet und zwar von *bla*_{CMY-2}-bildenden *Salmonella* spp. (43, 44). Bald folgten

weitere Berichte von dem Vorkommen von ESBL/AmpC-bildenden *E. coli* in Lebensmittel liefernden Tieren von überall auf der Welt: ESBL/AmpC-bildende *E. coli* wurden bei Geflügel (45-59), Rindern (46, 48, 56-58, 60-64) und Schafen (57) nachgewiesen.

Auch bei anderen Tieren wie bei Pferden (65-67), Hunden und Katzen (48, 65, 68, 69), Fischen (70), Känninchen (50, 53) und Ratten (48, 71-73) wurden ESBL/AmpC-bildende *E. coli* gefunden. Sogar bei Wildtieren, wie zum Beispiel bei Rehwild (74), Bären (75, 76), Füchsen (77) und Vögeln (78-80) wurden diese resistenten Keime nachgewiesen.

Bei Schweinen scheinen ESBL/AmpC-bildende *E. coli* ebenfalls weit verbreitet zu sein. So gibt es Berichte aus den USA (81) und Asien (48, 58, 82-84) sowie aus vielen Ländern Europas, wie zum Beispiel aus Spanien (50, 53, 85), Portugal (1, 61, 86), England (46), Frankreich (64), Tschechien (87), Dänemark (88) und der Schweiz (57, 60).

Des Weiteren wurden Schweinefleischproben positiv auf ESBL-produzierende *Enterobacteriaceae* getestet, wobei *Escherichia coli* das am häufigsten detektierte Bakterium darstellte (89, 90). Über die Lebensmittelkette könnten diese Keime dann an den Verbraucher gelangen, was eine Gefahr darstellen könnte (89).

Darüber hinaus ist eine potenzielle Verbreitung von antibiotikaresistenten Mikroorganismen, wie ESBL/AmpC-produzierenden *E. coli*, aus den Tierställen in die Umgebung der Ställe besorgniserregend und wird kritisch diskutiert. Erste Untersuchungen weisen darauf hin, dass das Ausbringen von Fäkalien zur Düngung eine Möglichkeit des Austrags von resistenten Keimen aus Nutztierhaltungen darstellen könnte (91). Des Weiteren scheint auch ein Austrag über die Luft möglich zu sein. Verschiedene Studien haben von einem aerogenen Austrag von antibiotikaresistenten Bakterien, wie zum Beispiel von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA), berichtet (92, 93). Außerdem könnten auch Vektoren, wie zum Beispiel Mäuse und Fliegen, eine Rolle bei der Verbreitung von Antibiotikaresistenzen spielen (94-96).

Bisher sind jedoch kaum Daten über das Vorkommen von ESBL/AmpC-bildenden *E. coli* in deutschen Schweinebeständen und deren Umgebung vorhanden (91) und ein potenzieller fäkaler und/oder aerogener Austrag dieser resistenten Keime aus den Tierställen in deren Umgebung wurde bislang noch nicht systematisch untersucht. Außerdem ist nur wenig über den Nachweis dieser resistenten Keime im Verlauf der Mastperiode bekannt (88).

Daher waren Hauptziele der vorliegenden Arbeit die Bestimmung des Vorkommens und der Quantität von ESBL/AmpC-bildenden *E. coli* in verschiedenen Proben innerhalb und außerhalb von ESBL/AmpC-positiven Schweinemastbetrieben, die Untersuchung der Prävalenzdynamik dieser Keime im Verlauf der Mast sowie die Bestimmung potenzieller Ein- und Austragswege.

Dafür wurden im Rahmen einer Langzeitstudie innerhalb des vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Forschungsverbundes RESET (www.reset-verbund.de) sieben deutsche konventionelle ESBL/AmpC-positive Schweinemastbetriebe sowie deren Umgebung dreimalig im zeitlichen Verlauf einer Mastperiode (Anfang, Mitte und Ende der Mast) auf ESBL/AmpC-bildende *E. coli* untersucht.

In einer ersten Studie lag der Fokus auf der Untersuchung potenzieller Quellen sowie der Prävalenzdynamik von ESBL/AmpC-produzierenden *E. coli* innerhalb der Schweineställe im Verlauf der Mast. In einer zweiten, parallel stattfindenden Studie in denselben Schweinemastbetrieben lag der Fokus auf der Untersuchung der Umgebung der Schweineställe sowie von potenziellen Ein- und Austragswegen. Zu beiden Studien wird in dieser kumulativen Dissertationsschrift jeweils eine Publikation vorgelegt.

2 Extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)/AmpC beta-lactamases-producing *Escherichia coli* in German fattening pig farms: a longitudinal study

veröffentlicht in:

von Salviati C, Friese A, Roschanski N, Laube H, Guerra B, Käsbohrer A, Kreienbrock L, Roesler U (2014): Extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)/AmpC beta-lactamases-producing *Escherichia coli* in German fattening pig farms: a longitudinal study. Berl Münch Tierärztl Wochenschr 127 (9-10): 412-419. DOI: 10.2376/0005-9366-127-412.

You have to read this part online (free of charge).

<http://doi.org/10.2376/0005-9366-127-412>

3 Emission of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from pig fattening farms to surrounding areas

veröffentlicht in:

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. *Vet Microbiol* 175 (1): 77-84. DOI: 10.1016/j.vetmic.2014.10.010.

3.1 Abstract

The presence of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* in livestock such as pigs has been known for some time. However, to date there is little information about the transmission of these resistant bacteria between pig farms and their surroundings. Thus, the aim of this study was to explore this topic by investigating seven German pig fattening farms. Samples from outside (including ground surfaces, ambient air, slurry and digestate from biogas plants) and, in parallel, from inside the pig barns (including pig feces, dust, barn air, flies and mice feces) were examined for ESBL/AmpC-producing *E. coli* and selected isolates were compared by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis. 14/17 (82.4%) slurry samples and three of four samples of digestate from biogas plants tested positive for ESBL/AmpC-producing *E. coli*. In the vicinity of the pig barns these resistant bacteria were detected in 14/87 (16.1%) boot swabs taken from various ground surfaces and in 2/36 (6%) ambient air samples. Inside the pig barns, 6/63 (9.5%) barn air samples and a small proportion of flies and mice feces samples were ESBL/AmpC-positive. PFGE analysis proved fecal emission as well as a possible spread via flies, as identical ESBL-*E. coli* isolates were detected in slurry and on fertilized fields, as well as in flies and pooled feces from inside the barn and slurry. Contaminated slurry presented the major emission source for ESBL/AmpC-producing *E. coli* in the pig fattening farms, but a spread via the airborne route or via different vectors also seems possible.

3.2 Introduction

Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) – and plasmid-mediated AmpC beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* are capable of hydrolyzing numerous beta-lactam antibiotics, including extended-spectrum cephalosporins of the 3rd and 4th generation, thereby dramatically limiting the therapeutic options in today's medicine. The first discovery of an ESBL was in a human *Klebsiella pneumoniae* isolate in 1983 (Knothe et al., 1983). From that time onward, this mechanism of resistance has risen continuously. Since the beginning of the current millennium, the number of studies describing the occurrence of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* in livestock has increased (Seiffert et al., 2013) and in 2006 ESBL-*E. coli* were found for the first time in wildlife (Costa et al., 2006). Today, the most frequent ESBL genes detected in bacteria carried by food-producing animals and humans belong to the CTX-M gene family. CTX-M-1 is particularly widespread among food-producing animals in the EU (Seiffert et al., 2013).

The potential spread of antimicrobial resistant microorganisms such as ESBL/AmpC-producing *E. coli* from livestock to the environment has become an increasing concern and is discussed critically. Initial investigations indicated that fecal emission occurs, since ESBL/AmpC-producing *E. coli* were detected in slurry as well as on fertilized fields in the vicinity of pig farming (Friese et al., 2013a). The airborne route might be another possible way of emission. It has been shown that *E. coli* can be emitted from pig houses to the surroundings via exhaust air (Yuan et al., 2010). Moreover, vectors such as mice and flies may also play a part in the spread of antimicrobial resistance (Kozak et al., 2009; Usui et al., 2013).

During the last decade ESBL/AmpC-producing *E. coli* has been detected in pigs throughout the world (Seiffert et al., 2013). At German pig farms, ESBL/AmpC-producing *E. coli* has been found regularly in animal samples as well as in samples from the housing environment (von Salviati et al., 2014). Knowledge about the occurrence of ESBL/AmpC-producing *E. coli* in the vicinity of pig farms is, however, still scarce (Friese et al., 2013a) and the potential modes of transmission of ESBL/AmpC-producing *E. coli* between pig farms and their vicinity has not yet been investigated detailed. Thus, the purpose of this study has been to systematically investigate both the inside and the surroundings of seven pig fattening farms in

Germany for ESBL/AmpC-producing *E. coli* and to determine fecal, airborne and other potential emission sources of these resistant bacteria.

3.3 Material and methods

Examined pig farms

A longitudinal study was conducted on German pig farms that were selected based on a positive result for ESBL/AmpC-producing *E. coli* in pooled feces samples, as determined in a previous screening study (Friese et al., 2013a). With the consent of the farmers, 7 out of 16 conventional pig fattening farms, located in North-east and East Germany and housing between 1800 and 10,800 animals per farm, were included in this study. One barn per farm, with between 80 and 760 animals per barn, was selected for the inside samplings. The study was carried out in the same seven pig fattening farms and barns as described previously by von Salviati et al. (2014) and involved simultaneous samplings inside and outside the pig barns. Sampling was performed from January 2011 to October 2012. All pig farms were investigated three times within one finishing fattening period (at the beginning, in the middle and at the end). The entire sampling period per farm was between 11 and 16 weeks. In addition to the previous study (von Salviati et al., 2014), this study focused on the contamination in the vicinity of the pig barns as well as on potential emission sources. A questionnaire was used to register information on farm characteristics such as housing conditions, ventilation systems and data on the surrounding area of the farms including information on fertilization of fields with slurry. All farmers reported to use the pig slurry for the fertilization of fields. If provided by the farmers, informations on location and time of slurry application were recorded. In all seven pig farms negative pressure ventilation was used. The air inlet was provided via ceiling ventilation (farms 1, 2 and 3) or canals (farms 4, 5, 6 and 7) and the exhaust air was discharged via a ventilator duct (all farms except for farm 7) or underfloor ventilation (farm 7).

Samplings at pig farms

Samplings inside the barn

Three air samples were taken at each moment of sampling (n = 63) by using All-Glass-Impingers (AGI-30, Ace Glass Inc., Vineland, USA) filled with 30 ml phosphate buffered saline (PBS). The air samplers were distributed as symmetrically as possible alongside the barn alley at a height of 1.50 m. During the sampling period of 30 min, the air flow (about 11.5 l/min) was controlled twice by using a rotameter (Analyt-MTC GmbH, Müllheim; Germany). In parallel, one pooled feces sample (n = 21) of about 200 g feces and one pooled dust sample of about 2 g dust (n = 21) were taken at each sampling date. Both pooled samples were collected from at least five different locations within the barn and the pooled dust sample was taken from spots without contact to the animals such as handrails and exposed brick work. When possible, also one pooled sample of five flies caught in the air was taken (n = 12) (at all farms, except farm 3) and about 10 g mice feces, only present at farm 1 (n = 3), were collected from the floor.

Samplings in the vicinity of the barn

Outdoor samples were taken simultaneously to the samples inside. Outside, two air samples were collected by impingement (n = 37). A few times rainy weather conditions hindered air samplings outside the pig barns. The ambient air samples were taken at 100 m distance on the upwind side (n = 18) and at 50 m distance on the downwind side (n = 19) of the pig barns. All-Glass-Impingers, filled with 15 ml PBS and 15 ml glycerol were placed 1.50 m above the ground as described previously (Friese et al., 2013b). The sampling period was about 90 min with an air flow between 11.5 and 13.0 l/min. Moreover, during each sampling moment several boot swab samples (Finnimport, Hamburg, Germany) were taken from different distances and ground surfaces by walking 50 m parallel to the investigated pig barn, as described previously (Friese et al., 2013b): at a distance of 100 m on the upwind side (n = 21) and at 50 m (n = 21), 150 m (n = 21), 300 m (n = 12) and 500 m (n = 12) on the downwind side, if possible. The sampled surfaces included fields, meadows, grass strips, paved road surfaces and other road covers located around the farm buildings (Table S1). In addition, at each sampling moment, 100 g slurry was taken directly from the slurry lagoon (n = 21). If present, 100 g digestate from biogas plants (n = 4, 3rd sampling moment of farm 5 and all

three sampling moments of farm 6, both biogas plants applied mesophilic digestion) and about 50 g dog feces (n = 2, 3rd sampling moment of farm 3 and 1st sampling moment of farm 6) were collected. Additionally, during the first sampling moment of farm 7 pig feces lying on the pathway next to the investigated pig barn were collected (about 50 g).

Laboratory analyses

Samples from inside and from the vicinity of the pig barns

All samples were stored at 4 °C and analyzed within 24 h after sampling.

Air samples

For quantitative detection of suspected ESBL/AmpC-producing *E. coli* in the air samples, 500 µl of the impinger collection fluid were directly streaked onto each of three MacConkey agar plates (Oxoid, CM 0115, Wesel, Germany), supplemented with 1 µg/ml Cefotaxime sodium salt (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany) (MC+). To determine the total counts of *E. coli* (TCE) in the air another 100 µl of the collection fluid were streaked onto each of three Gassner agar plates (CM431, Oxoid GmbH, Wesel, Germany). Moreover, 1 ml of the collection fluid was placed into 9 ml Luria-Bertani (LB) broth (Merck kGaA, Darmstadt, Germany) for preenrichment and 10 ml of the impinger collection fluid were filtrated using a nitrocellulose membrane filter with a pore size of 0.22 µm (Millipore, USA). The filter was also transferred onto a MC+ agar plate. All agar plates and preenrichments were incubated aerobically at 37 °C for 24 h. Afterwards, suspected *E. coli* colonies were counted and concentrations per m³ air (cfu/m³) were calculated. A loop of the preenrichment broth was plated onto MC+ agar and incubated for another 24 h at 37 °C. Suspected *E. coli* were further analyzed as described below. The detection limits of the air sampling method applied in this study were about 9 cfu/m³ for the barn air samples and about 3 cfu/m³ for the ambient air samples.

Slurry, pooled feces, dust, boot swabs, digestate from biogas plants, mice and dog feces, flies

Twenty-five grams each of slurry, digestate from biogas plants, pig and dog feces, 10 g of mice feces, a pooled sample of five flies and one pair of boot swabs were separately transferred into a sterile stomacher bag, filled with 225 ml LB broth (90 ml for mice feces, 50

ml for flies) and homogenized using a stomacher (260 rpm, 2 min). For quantitative analysis of slurry, different feces and digestate from biogas plants, 100 µl of a tenfold and a hundredfold dilution were streaked onto each of three MC+ agar plates. All MC+ agar plates and preenrichments were further processed as described above. To investigate the dust, 0.1 g dust was dissolved in 10 ml PBS + 0.01% TWEEN 20 and was analyzed quantitatively by direct streaking as described above. For preenrichment, 1 ml of the dust-solution was transferred to 9 ml LB broth as described previously (von Salviati et al., 2014).

Confirmation and characterization of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) and AmpC beta-lactamases (AmpC) in *E. coli*

From each positive sample, one suspected *E. coli* colony was randomly selected and identified using MALDI-TOF identification (MALDI Microflex[®] LT and Biotyper[®] database, Bruker Daltonics, Bremen, Germany). The CLSI disk diffusion method (CLSI M02-A11, 2012; M100-S23, 2013) was performed for all selected *E. coli* isolates testing antimicrobial susceptibility against cefotaxime (CTX 30 µg), cefotaxime/clavulanic acid (CTX/Clav 30 µg/10 µg), ceftazidime (CAZ 30 µg), ceftazidime/avibactam (CAZ/AVI 30 µg/10 µg), ceftazidime/avibactam/clavulanic acid (CAZ/AVI/Clav 30 µg/10 µg/10 µg) and amoxicillin/clavulanic acid (AMC 30 µg) (Oxoid, Wesel, Germany and Mast Diagnostica GmbH, Reinfeld, Germany). Isolates showing a resistance to CTX in combination with an increase of the inhibition zone diameter of at least 5 mm of CTX/Clav versus CTX, were defined as ESBL-positive. Resistances to CTX, CTX/Clav, FOX and AMC were considered as phenotypic proof for AmpC-producers. Moreover, all isolates were analyzed by polymerase chain reaction (PCR) amplification to detect the beta-lactamase gene families CTX-M, TEM, SHV and CMY as they are the most common ESBL/AmpC gene families in livestock (Guerra et al., 2001; Zhao et al., 2001; Weill et al., 2004; Batchelor et al., 2005). For all CTX-M-positive isolates additional PCR procedures were performed to determine the CTX-M groups (M-1, M-9, M-2, M-8 and M-25) followed by sequencing of the PCR products (Batchelor et al., 2005; Chmelnitsky et al., 2005; Hopkins et al., 2006; Carattoli et al., 2008; Ruiz del Castillo et al., 2013). Also TEM- and SHV-positive isolates were sequenced using primers as described by Olesen et al. (2004) and Weill et al. (2004). The obtained sequences were analyzed using the program “SeqMan Pro” of the Lasergene 10 Core Suite (DNASTAR, Inc., Madison, USA) and the Basic Local Alignment Search Tool

(BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). All sequence data were compared to sequences deposited in the Lahey database (<http://www.lahey.org/Studies/>).

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis of selected isolates

To investigate the genetic relatedness of ESBL/AmpC – *E. coli* from inside and outside the barns, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis was applied (Ribot et al., 2006). From three farms with ESBL/AmpC-positive results inside and outside the barns, 20 ESBL-positive *E. coli* (from potential emission sources such as pooled feces, slurry, flies and barn air and from surfaces in the vicinity), carrying the same genes inside/outside, were exemplarily selected for PFGE analysis. Genomic DNA was digested with XbaI. The PFGE procedure was conducted using the CHEF-DR III system (Bio-Rad, California) under the following conditions: pulse times were increased from 5 to 50 s over 20.5 h, at a temperature of 14 °C, a voltage of 6.0 V/cm and an included angle of 120°. Lambda Ladder PFG Marker (New England Biolabs, N0340S, England) was used as size marker and *Salmonella enterica* serovar Braenderup H9812 was employed as positive control. The PFGE profiles were analyzed using BioNumerics software version 6.6 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). The Dice coefficient was applied to assess similarity and diversity of the samples and the unweighted pair group method with arithmetic means (UPGMA; position tolerance of 1% and optimization of 1.5%) was used to perform cluster analysis. Isolates with a Dice similarity index $\geq 85\%$ were considered to belong to the same PFGE group (Tenover et al., 1995; Carrico et al., 2005).

Statistical analyses

The software SPSS 21 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) was used for statistical analysis. Pairwise McNemar test was performed to compare the frequencies of ESBL/AmpC-positive boot swab samples of all different distances to the barn. Differences were interpreted as significant if p -value < 0.05 .

3.4 Results

Samples from inside the pig barn

Barn air samples

In four out of seven pig fattening farms ESBL/AmpC-producing *E. coli* were detected in the barn air. Following enrichment, 6 out of 63 (9.5%) barn air samples were tested positive for ESBL/AmpC-producing *E. coli* at four different sampling moments (Table 1): In farms 2, 3 and 5 on one sampling date in one of three barn air samples each; in farm 6 all three barn air samples of the 3rd sampling date tested positive. After direct plating, 4 out of 63 (6.4%) barn air samples tested positive for ESBL/AmpC-producing *E. coli*. The bacterial count of suspected ESBL/AmpC-producing *E. coli* varied from 7.22 cfu/m³ to 1.42 x 10² cfu/m³ (geometric mean count: 1.95 x 10¹ cfu/m³). The total count of *E. coli* (TCE) varied from 8.33 x 10² cfu/m³ to 2.60 x 10³ cfu/m³ (geometric mean count: 1.93 x 10³ cfu/m³) (n = 4), implying a proportion of 1% ESBL/AmpC-producing *E. coli* in the total *E. coli* count in barn air samples.

Pooled feces, dust, flies and mice feces samples

Following enrichment, 11 of 21 (52.4%) pooled feces samples tested positive for ESBL/AmpC-producing *E. coli*. Ten out of 21 pooled feces samples were quantifiable after direct plating and led to a geometric mean count of 6.46 x 10³ cfu/g. ESBL/AmpC-producing *E. coli* were not found in any of the pooled dust samples (n = 21). These data were shown as part of another study before (von Salviati et al., 2014). Three out of 12 (25%) pooled fly samples from six farms were ESBL/AmpC-positive: Two from farm 2 (2nd and 3rd sampling moment) and one from farm 4 (3rd sampling moment). In the mice feces, which were found at all sampling moments on farm 1 (n = 3), ESBL/AmpC-producing *E. coli* were detected only at the 2nd sampling moment (33%).

Samples from the vicinity of the pig barn

Ambient air samples

Two out of 36 (6%) ambient air samples tested positive for ESBL/AmpC-producing *E. coli*. These air samples were taken on the upwind and the downwind side at the 3rd sampling moment on farm 7 (Table 1). In these air samples, 3.19×10^2 cfu/m³ and 2.50×10^1 cfu/m³ suspected ESBL/AmpC-producing *E. coli*, respectively, were counted.

Boot swabs

Of the 87 boot swab samples taken from various ground surfaces in the vicinity of the pig farms 14 (16.1%) tested positive for ESBL/AmpC-producing *E. coli* (Table 1). Eleven of 66 (16.7%) boot swab samples taken on the downwind-side were positive. Most of these samples (6/11, 55%) were taken at 50 m distance on the downwind-side. The other five samples were taken at 150 m distance (2/11), 300 m distance (1/11) and at 500 m distance (2/11) on the downwind-side (Table 1). Moreover, 3 of 21 (14.3%) boot swabs taken at 100 m distance on the upwind-side tested positive for ESBL/AmpC-producing *E. coli*. Comparing frequencies of ESBL/AmpC-positive boot swab samples of all different distances showed no significant differences.

Slurry, digestate from biogas plants, dog and pig feces collected outside

The majority of slurry samples (14/17, 82.4%) tested positive for ESBL/AmpC-producing *E. coli* (Table 1). This slurry was intended for the application on fields as fertilizer. Of these samples, nine (64.3%) tested positive after direct plating with a geometric mean count of 5.38×10^2 cfu/g, a maximum of 6.67×10^3 cfu/g and a minimum of 3.33×10^1 cfu/g. The three samples of digestate from farm 6 tested ESBL/AmpC-positive, the sample from farm 5 was negative. Only one of three samples was positive after direct plating with 3.33×10^1 cfu/g suspected ESBL/AmpC-producing *E. coli* counted. Furthermore, in both dog feces samples (2/2, 100%) from farms 3 and 6 as well as in the pig feces sample collected on the pathway next to the pig barn of farm 7 ESBL/AmpC-producing *E. coli* were found. The dog feces sample of farm 6 was positive after direct plating and 2.48×10^6 cfu/g suspected ESBL/AmpC-producing *E. coli* were counted.

Confirmation and characterization of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) and AmpC beta-lactamases (AmpC) in *E. coli*

Detailed data concerning the beta-lactamase genes in *E. coli* isolates from inside and outside the pig barns are shown in Table 2. ESBL/AmpC production was confirmed for all 57 (100%) *E. coli* isolates subjected to antimicrobial susceptibility testing (48 ESBL and 9 AmpC producers). By PCR and sequencing, ESBL or AmpC beta-lactamases genes were detected in 46 *E. coli* isolates (80.7%) (Table 2). The dominant ESBL gene family detected was CTX-M (42/57, 73.7%), with the majority of these isolates belonging to the CTX-M-1 group (40/42, 95.2%). Only two isolates were assigned to the CTX-M-9 group and sequencing confirmed the CTX-M-9 gene in these isolates. Sequencing of the isolates belonging to the CTX-M-1 group showed the CTX-M-1 gene in 38/40 (95%) isolates and the CTX-M-15 gene in 2 out of 40 (5%) isolates. The remaining 11 isolates with phenotypic ESBL/AmpC production harbored the single TEM-1 gene (n = 5) or carried none of the four ESBL/AmpC gene families tested in this study (n = 6). Most likely these 11 isolates harbor other ESBL/AmpC genes that were not tested in the present study.

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis of selected isolates

One hundred percent similarity was shown by isolates of the following samples: slurry, pooled feces and flies of the 3rd sampling moment of farm 4; boot swabs 150, 300 and 500 m downwind, boot swab 100 m upwind and slurry of the 2nd sampling moment of farm 5; boot swab 50 m downwind, slurry and pig feces from the pathway of the 1st sampling moment of farm 7 (Fig. 1).

3.5 Discussion

In this study ESBL/AmpC-producing *E. coli* were isolated from different surfaces in the vicinity of the pig farms as well as occasionally in the ambient air. The majority of slurry samples tested positive for ESBL/AmpC-producing *E. coli*. Moreover, in *E. coli* isolates from slurry and from the surface of fertilized fields identical genes and PFGE-profiles were found (Fig. 1), indicating that slurry represents a significant emission source for ESBL/AmpC-producing *E. coli* in the investigated pig farms.

Considering all samples, the highest detection rate of ESBL/AmpC-producing *E. coli* was found in slurry (82.4% ESBL/AmpC-positive samples). In addition, to the best of our knowledge, this is the first reported detection of ESBL/AmpC-producing *E. coli* in samples of digestate from biogas plants. In the investigated biogas plants of both farms mesophilic digestion was applied. Temperatures and other conditions of treatment in these biogas plants might not be sufficient to eliminate all of these bacteria. However, further studies investigating different types of biogas plants should be performed. Friese et al. (2013a) assumed fecal emission from livestock as one possible route for the distribution of these resistant bacteria to the environment, as slurry is commonly applied to farm fields as fertilizer. In addition to slurry, digestate from biogas plants is also used for the fertilization of fields. ESBL/AmpC-producing *E. coli* were isolated from various surfaces of the downwind and the upwind side of the barns (Table 1). All fields that tested positive for ESBL/AmpC-producing *E. coli* in this study had been fertilized with slurry about one to seven months before sampling (Table S1). Fecal emission was proven for farm 5 as PFGE analysis revealed *E. coli* isolates with 100% PFGE-similarity in slurry and on fields, even in up to 500 m distance from the barn. These fields had been fertilized with slurry about one month before sampling (Fig. 1), indicating that *E. coli* can survive for a considerable time on ground surfaces. The long-time survival of these bacteria was described earlier in the study of Hartmann et al. (2012), which demonstrated the occurrence of CTX-M-producing *E. coli* in cultivated soils for the first time and showed the ability of these bacteria to survive in soil for even as long as a year. However, to date there are only limited data on the ability of *E. coli* to survive in different soils and under differing environmental conditions (Zhang et al., 2013).

Apart from fertilized fields, ESBL/AmpC-producing *E. coli* were also detected on non-fertilized surfaces such as pathways and meadows in the vicinity of the pig farms. Moving

pigs in and out of barns may contaminate the surroundings of the barns with pig feces. Subsequently, vehicles may distribute the feces within the entire farm, out of the farm and also on fields. This hypothesis would explain the findings of identical ESBL-*E. coli* isolates in PFGE in feces found on the pathway next to the investigated pig barn of farm 7 and on a further pathway just beside a field about 50 m downwind of the same barn (Fig. 1). This highlights the significance of disinfecting wheels before leaving the farm. Moreover, wild animals and dogs might play a role by depositing ESBL-positive feces in the environment (Costa et al., 2006; Hordijk et al., 2013). The feces, collected from dogs living on the pig farms, had comparably high numbers of ESBL/AmpC-suspected *E. coli* and also harbored the CTX-M-1 gene (Table 2).

The airborne route is another possibility for the emission of ESBL/AmpC-producing *E. coli* from animal farms to the vicinity as recently proven for broiler farms (Laube et al., 2014). Also for pig houses it has been shown that airborne *E. coli* can spread to the surroundings via air exchange. More than 90% similarity was found between *E. coli* isolates from downwind air and those from indoor feces or air (Yuan et al., 2010). As soon as bioaerosols are emitted via the ventilation systems they either disperse or sediment, depending on their particle sizes, atmospheric stability and wind speed. In this study, only two ambient air samples of farm 7 tested positive for these resistant bacteria. Similar low detection rates in the ambient air were found in the broiler study of Laube et al. (2014). The low detection levels in the ambient air can be explained by the low number of positive barn air samples along with the expected dilution outside. Yuan et al. (2010) showed a strong decrease of airborne *E. coli* outside pig houses. Moreover, some airborne bacteria might not have been captured given the detection limit of the air sampling method applied in this study. In addition, various environmental factors such as temperature, relative air humidity and UV radiation were discussed as causal factors for the low detection levels (Benbough, 1967; Handley and Webster, 1995). In this study *E. coli* harboring the CMY gene were detected in the ambient air of farm 7, which were not found inside the corresponding pig barn, and therefore it seems unlikely that these microorganisms originated from this pig barn (Table 2). Possibly neighboring cattle or poultry farms in the vicinity of farm 7 were the source, as the CMY gene is also found in these animal species (Laube et al., 2013; Schmid et al., 2013). In addition, sewage treatment plants, also located near to some of the farms examined, may represent a source for ESBL-positive *Enterobacteriaceae* (Korzeniewska and Harnisz, 2013). As air exchange is occurring in both

directions, an entry of contaminated ambient air into the animal barns seems also possible. This, however, was not examined in detail in this study.

In four out of seven pig fattening farms ESBL/AmpC-producing *E. coli* were detected in the barn air. The maximum level of total *E. coli* was 2.60×10^3 cfu/m³ with a proportion of 1% ESBL/AmpC-producing *E. coli* of the total *E. coli* count. In the study of Yuan et al. (2010), lower *E. coli* concentrations were found in the barn air of pig houses, whereas in the broiler studies of Chinivasagam et al. (2009) and Laube et al. (2014), higher levels of total *E. coli* were detected. In addition, the proportion of ESBL/AmpC-producing *E. coli* in the total *E. coli* count as well as the number of ESBL/AmpC-positive barn air samples was higher in the study of Laube et al. (2014). This might be explained by the high detection levels of ESBL/AmpC-producing *E. coli* in dust, litter and feces in the broiler fattening farms (Laube et al., 2013, 2014). In contrast, none of the dust samples taken from the pig farms tested positive. It is known that dust from buildings where livestock is held consists of feed, litter and animal particles such as feces, dander or hair/feathers (Pearson and Sharples, 1995; Seedorf and Hartung, 2002) and that 80% of the airborne microorganisms in these buildings are attached to and carried by dust particles (Müller et al., 1977). The fact that litter was not applied in the pig barns might be another reason as it was shown that levels of airborne bacteria are linked to levels of these bacteria in litter (Chinivasagam et al., 2009).

Vectors such as mice and flies might also play a role in spreading resistant bacteria: One mice feces sample as well as flies from two farms tested positive for ESBL/AmpC-producing *E. coli* in this study. Interestingly, the ESBL/AmpC-positive flies originated from the high prevalent farms 2 and 4, which showed the highest detection frequencies of ESBL/AmpC-producing *E. coli* in individual feces of pigs (von Salviati et al., 2014). The flies may have come into contact with the resistant bacteria by interacting with the contaminated feces/environment. CTX-M-1 positive *E. coli* isolates from flies, pooled feces and slurry of farm 4 showed identical PFGE-profiles, which supports this hypothesis. As flies and mice are able to enter and leave the pig barns they might act as carriers for these resistant bacteria between the pig barns and the environment. The significance of flies in the spread of ESBL-producing *E. coli* was recently shown in a study from Japan (Usui et al., 2013). Kozak et al. (2009) showed that mice living in the proximity of food animal agriculture are more likely to carry resistant *E. coli* than mice living in natural areas. However, ESBL/AmpC-producing *E. coli* have not yet been detected in mice, but have been isolated from rats (Guenther et al.,

2010). To date, the role of insects and rodents as vectors for ESBL/AmpC-producing *E. coli* has been addressed rarely and there is a need for more detailed studies on this topic.

3.6 Conclusion

This is the first systematic study on a potential emission and transmission of ESBL/AmpC-producing bacteria between pig fattening farms and their surroundings. ESBL/AmpC-producing *E. coli* were detected on different surfaces in the vicinity of the pig barns as well as occasionally in the ambient air. A potential risk of colonization for exposed animals or humans cannot be estimated at the moment and needs to be further investigated. Contaminated slurry presented the major emission source for ESBL/AmpC-producing *E. coli* from the pig fattening farms. However, a spread of ESBL/AmpC-producing *E. coli* via the airborne route or via different vectors such as flies and mice, which can leave but also enter a farm, also seems possible.

3.7 Acknowledgements

This study was part of the research consortium RESET (<http://www.reset-verbund.de>) and was financially supported by the German Federal Ministry of Education and Research (funding number 01K11013C).

The authors thank N. Roschanski, J. Fischer, I. Rodriguez, L. Kreienbrock and A. Käsbohrer for scientific advice. All cooperating farmers, veterinarians as well as the excellent technical assistance of M. Thieck, H. Jansen, S. Sellenthin and M. Kühl are gratefully acknowledged.

3.8 References

- Batchelor, M., Hopkins, K., Threlfall, E.J., Clifton-Hadley, F.A., Stallwood, A.D., Davies, R.H., 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.
- Benbough, J.E., 1967. Death mechanisms in airborne *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 47, 325-333.
- 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.
- 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.
- 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.
- Costa, D., Poeta, P., Saenz, Y., Vinue, L., Rojo-Bezares, B., Jouini, A., Zarazaga, M., Rodrigues, J., Torres, C., 2006. Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum beta-lactamases of the CTX-M, TEM and SHV classes in faecal samples of wild animals in Portugal. *J. Antimicrob. Chemother.* 58, 1311-1312.
- 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. Munch. 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.
- Guenther, S., Grobbel, M., Beutlich, J., Guerra, B., Ulrich, R.G., Wieler, L.H., Ewers, C., 2010. Detection of pandemic B2-O25-ST131 *Escherichia coli* harbouring the CTX-M-9 extended-spectrum beta-lactamase type in a feral urban brown rat (*Rattus norvegicus*). *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 582-584.
- 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.
- 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.
- Hopkins, K.L., Deheer-Graham, A., Threlfall, E.J., Batchelor, M.J., Liebana, E., 2006. Novel plasmid-mediated CTX-M-8 subgroup extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-40) isolated in the UK. *Int. J. Antimicrob. Agents* 27, 572-575.
- Hordijk, J., Schoormans, A., Kwakernaak, M., Duim, B., Broens, E., Dierikx, C., Mevius, D., Wagenaar, J.A., 2013. High prevalence of fecal carriage of extended spectrum beta-lactamase/AmpC-producing *Enterobacteriaceae* in cats and dogs. *Front. Microbiol.* 4, 242.
- 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*. *Infection* 11, 315-317.
- Korzeniewska, E., Harnisz, M., 2013. Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-positive *Enterobacteriaceae* in municipal sewage and their emission to the environment. *J. Environ. Manage.* 128, 904-911.
- Kozak, G.K., Boerlin, P., Janecko, N., Reid-Smith, R.J., Jardine, C., 2009. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from swine and wild small mammals in the

- proximity of swine farms and in natural environments in Ontario, Canada. Appl. Environ. Microbiol. 75, 559-566.
- Laube, H., Friese, A., von Salviati, C., Guerra, B., Kaesbohrer, 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.
- 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. Vet. Microbiol. 172, 519-527.
- Müller, W., Wieser, P., Woiwode, J., 1977. The size of colony-forming units in the air of animal stalls. Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 90, 6-11.
- 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. 10, 334-340.
- Pearson, C.C., Sharples, T.J., 1995. Airborne dust concentrations in livestock buildings and the effect of feed. J. Agric. Eng. Res. 60, 145-154.
- 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.
- Schmid, A., Hormansdorfer, S., Messelhauser, U., Kasbohrer, A., Sauter-Louis, C., Mansfeld, R., 2013. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* on bavarian dairy and beef cattle farms. Appl. Environ. Microbiol. 79, 3027-3032.
- Seedorf, J., Hartung, J., 2002. Dust and Microorganisms in Animal Husbandry Systems. Landwirtschaftsvlg, Münster KTBL-Schrift 393 (in German).

- 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.
- 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.
- Usui, M., Iwasa, T., Fukuda, A., Sato, T., Okubo, T., Tamura, Y., 2013. The role of flies in spreading the extended-spectrum beta-lactamase gene from cattle. *Microb. Drug Resist.* 19, 415-420.
- von Salviati, C., Friese, A., Roschanski, N., Laube, H., Guerra, B., Kaesbohrer, A., Kreienbrock, L., Roesler, U., 2014. Extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)/AmpC beta-lactamases-producing *Escherichia coli* in German fattening pig farms: a longitudinal study. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 127, 412–419.
- 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.
- Yuan, W., Chai, T.J., Miao, Z.M., 2010. ERIC-PCR identification of the spread of airborne *Escherichia coli* in pig houses. *Sci. Total Environ.* 408, 1446-1450.
- Zhang, T., Wang, H., Wu, L., Lou, J., Wu, J., Brookes, P.C., Xu, J., 2013. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in soils from Jiangsu Province, China. *PLoS ONE* 8, e81178.
- 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.

3.9 Tables and figures

Table 1

Detection of ESBL/AmpC-positive *E. coli* inside and in the vicinity of seven pig fattening farms.

Farm no.	Downwind side												Inside the barn									Upwind side													
	<u>Surface</u>						<u>air</u>						<u>air</u>			<u>dust</u>			<u>feces</u>			<u>slurry</u>			<u>air</u>			<u>surface</u>							
	500 m		300 m		150 m		50 m		50 m		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3				
S1	*	*	*	*	*	*	+	-	-	-	+	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	*	*	*	*	-	-	-	-			
S2	*	*	*	*	*	*	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	*	+	-	*	-	-	-			
S3	*	*	-	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	*	-	*	-	+	-		
S4	*	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-			
S5	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-		
S6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-			
S7	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+

1 = 1st sampling moment; 2 = 2nd sampling moment; 3 = 3rd sampling moment; + = sample tested genotypically and/or phenotypically positive for ESBL/AmpC-producing *E. coli*; - = sample tested negative for ESBL/AmpC-producing *E. coli*; * = sample not taken.

Table 2

Characterization of beta-lactamases genes by PCR and sequencing in ESBL/AmpC-positive *E. coli* isolates from inside and the vicinity of seven pig fattening farms (n = 57).

Farm	Sampling moments	Beta-lactamase genes (<i>bla</i> -)	Origin of sample	
			Inside the barn	Outside the barn
S1	1st sampling	CTX-M-1	Pooled feces	Boot swab 150 m downwind
	2nd sampling	CTX-M-1	Mice feces	Boot swab 50 m downwind
	3rd sampling	CTX-M-1	Pooled feces	
S2	1st sampling	CTX-M-1		Boot swab 50 m downwind
		CTX-M-9 & TEM-1	Pooled feces	
	2nd sampling	CTX-M-1 & TEM-1	Flies	
		CMY (N)	Air sample inside	
	3rd sampling	CTX-M-9 & TEM-1	Pooled feces	
		(N)	Flies	Slurry
S3	1st sampling	-----	-----	-----
	2nd sampling	(N)		Boot swab 100 m upwind; slurry
	3rd sampling	CTX-M-1	Air sample inside	Dog feces
S4	1st sampling	CTX-M-1		Slurry
		CTX-M-15	Pooled feces	
	2nd sampling	CTX-M-15		Slurry
		CTX-M-1 & TEM-1	Pooled feces	
	3rd sampling	CTX-M-1	Flies; pooled feces	Slurry; boot swab 50 m downwind
S5	1st sampling	CTX-M-1 & TEM-1		Slurry
	2nd sampling	CTX-M-1	Air sample inside	
		SHV-12		Boot swab 50 m downwind
		TEM-1		Slurry; boot swab 100 m upwind Boot swabs 150 m, 300 m and 500 m downwind

Emission of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from pig fattening farms to surrounding areas

	3rd sampling	CTX-M-1 (N)		Boot swab 50 m downwind Slurry
S6	1st sampling	CTX-M-1	Pooled feces	Slurry; dog feces; digestate from biogas plants
	2nd sampling	CTX-M-1 CTX-M-1 & TEM-1		Slurry Digestate from biogas plants
	3rd sampling	CTX-M-1	Air samples inside (n = 3); pooled feces	Slurry; digestate from biogas plants
S7	1st sampling	CTX-M-1 & TEM-1		Slurry; boot swab 50 m downwind; Feces found on the pathway
	2nd sampling	CTX-M-1 & TEM-1	Pooled feces	Slurry
	3rd sampling	CTX-M-1 CTX-M-1 & TEM-1 CMY		Slurry; boot swab 500 m downwind Boot swab 100 m upwind Air sample 50 m downwind Air sample 100 m upwind

----- = No ESBL/AmpC-positive samples; (N) = none of the four ESBL/AmpC gene families (CTX-M, SHV, TEM, CMY) detected.

PFGE XbaI

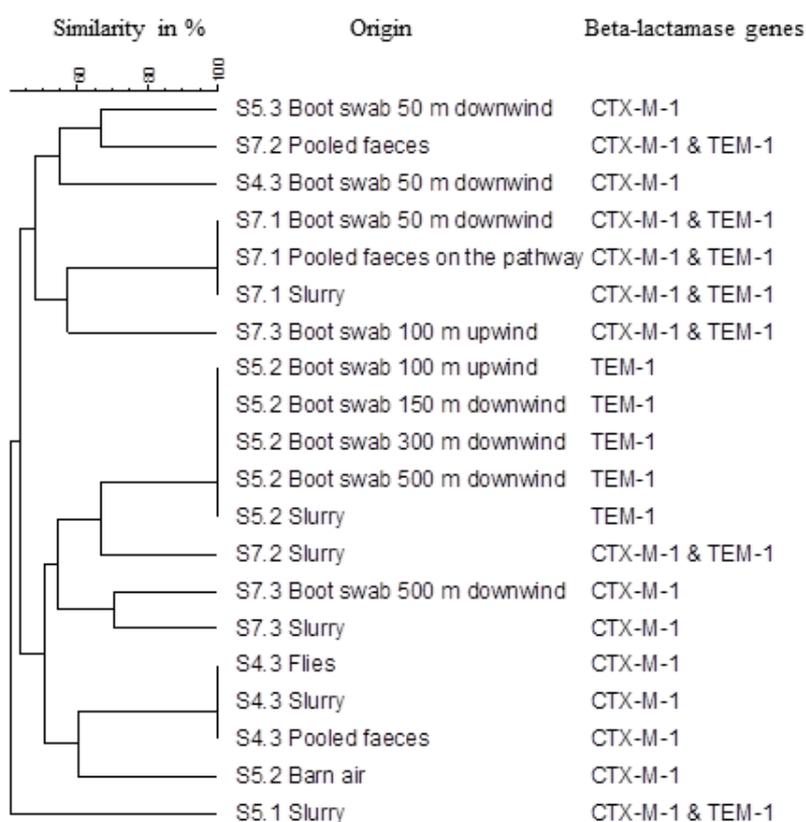


Fig. 1. Pulsed-field gel electrophoresis analysis showing similarities in percent of 20 selected *E. coli* isolates from inside and outside the pig barns. DNA for PFGE analysis was digested with XbaI. S stands for swine farm, the first number stands for the farm number and the second number for the sampling moment.

Table S1

Boot swab samples, which tested positive for ESBL/AmpC-producing *E. coli*, and corresponding ground surfaces in the vicinity of seven investigated pig farms.

Farm	Sampling time	Boot swab sample	Sampled surface
1	1 th sampling	150 m downwind	Fertilized field (date unknown)
	2 nd sampling	50 m downwind	Fertilized field (date unknown)
2	1 st sampling	50 m downwind	Meadow and edge of a fertilized field (5 months before sampling)
3	2 nd sampling	100 m upwind	Fertilized field (4 months before sampling)
4	3 rd sampling	50 m downwind	Edge of a fertilized field (7 months before sampling)
5	2 nd sampling	50 m downwind	Pathway next to the barn
		150 m downwind	Fertilized field (1 month before sampling)
		300 m downwind	Fertilized field (1 month before sampling)
		500 m downwind	Fertilized field (1 month before sampling)
	3 rd sampling	100 m upwind	Pathway next to a forest
	3 rd sampling	50 m downwind	Pathway and grass strip next to a forest
7	1 th sampling	50 m downwind	Pathway next to a field
	3 rd sampling	500 m downwind	Fertilized field (date unknown)
		100 m upwind	Pathway and meadow next to the barn

4 Diskussion

Das zunehmende Vorkommen antibiotikaresistenter Bakterien stellt ein schwerwiegendes Problem in der Tier- und Humanmedizin dar. Besonders das Vorkommen von resistenten Bakterien wie ESBL/AmpC-bildenden Enterobakterien in gesunden, Lebensmittel liefernden Tieren wird als potenzielle Quelle für die Übertragung auf Menschen oder die Umgebung diskutiert.

Die vorliegende Studie zeigt unterschiedliche Nachweislevel von ESBL/AmpC-produzierenden *E. coli* innerhalb und außerhalb der sieben untersuchten Schweinemastbestände und zu verschiedenen Untersuchungszeitpunkten im Verlauf der Mastperiode. Die durchschnittlichen Nachweishäufigkeiten von ESBL/AmpC-*E. coli* in den Einzeltierkotproben lagen dabei zu den drei Probenahmezeitpunkten bei 45%, 29% und 36%, wobei eine signifikante Abnahme der Konzentration von $2,97 \times 10^4$ KbE/g zum Zeitpunkt der ersten Untersuchung nach Einstallung auf $2,17 \times 10^3$ KbE/g zum dritten Untersuchungszeitpunkt am Mastende zu verzeichnen war. In der Tierumgebung innerhalb des Stalls wurden ESBL/AmpC-produzierende *E. coli* regelmäßig in Sammelkot- und Sockentupferproben, vereinzelt in Umgebungstupferproben und Stallluftproben, jedoch nie in Stallstaubproben nachgewiesen. Des Weiteren wurden diese resistenten Keime auch in Fliegen und Mäusekot innerhalb des Stalls gefunden.

Außerhalb des Stalls wurden ESBL/AmpC-bildende *E. coli* auf verschiedenen Bodenoberflächen und vereinzelt in der Außenluft nachgewiesen. Die Mehrheit der Gülleproben (82,4%) und drei von vier Gärrestproben der Biogasanlagen wurden positiv auf ESBL/AmpC-bildende *E. coli* getestet. Durch PFGE-Untersuchungen ausgewählter *E. coli*-Isolate wurde der fäkale Austrag dieser resistenten Keime aus den Schweineställen in die Umgebung der Ställe bewiesen, da identische *E. coli*-Isolate in der Gülle und auf begüllten Feldern desselben Betriebes nachgewiesen wurden. Auch eine Übertragung über Fliegen und andere belebte Vektoren scheint möglich, da identische ESBL-bildende *E. coli*-Isolate in Fliegen, Sammelkot und Gülle eines weiteren Betriebes detektiert wurden.

4.1 Langzeituntersuchungen von ESBL/AmpC-bildenden *Escherichia coli* in deutschen Schweinemastbetrieben

In der vorliegenden Studie wurden ESBL/AmpC-bildende *E. coli* im gesamten Verlauf der Endmastperiode, am Anfang, in der Mitte und am Ende der Mast, nachgewiesen. Insgesamt 37% der untersuchten 420 Einzeltierkotproben wurden dabei positiv auf ESBL/AmpC-bildende *E. coli* getestet. Vergleichbare Daten gibt es in Deutschland nur für Masthähnchen, bei denen sogar noch deutlich höhere Prävalenzraten nachgewiesen wurden (97). Höhere Prävalenzen als in der vorliegenden Arbeit wurden für Schweine in Portugal in der Studie von Ramos et al. (1) nachgewiesen. Sie testeten 49% der untersuchten Schweine-Einzeltierkotproben positiv auf ESBL-bildende *E. coli*. Weitere Studien aus Portugal, der Schweiz und Dänemark berichteten hingegen von niedrigeren Nachweisraten ESBL/AmpC-bildender *E. coli* in Einzeltierkotproben von Schweinen im Vergleich zu unserer Studie (57, 60, 86, 98).

Beachtenswert sind die unterschiedlichen Nachweisraten dieser resistenten Bakterien in den Einzeltierkotproben zu den drei verschiedenen Untersuchungszeitpunkten während der Mastperiode. Dies stimmt mit der dänischen Studie von Hansen et al. (88) überein, bei der die Prävalenzraten während des Produktionszyklus ebenfalls variierten und deutet darauf hin, dass die Auswahl des Untersuchungszeitpunktes einen Einfluss auf die ermittelten Prävalenzen haben könnte. Darüber hinaus wurden in unserer Studie zu jedem Untersuchungszeitpunkt zufällig ausgewählte Tiere und daher sehr wahrscheinlich immer andere Tiere beprobt, was auch einen Einfluss auf die Nachweishäufigkeiten gehabt haben könnte.

Die durchschnittliche Keimzahl (geometrisches Mittel) ESBL/AmpC-verdächtiger *E. coli* lag für die Einzeltierkotproben der vorliegenden Studie bei $1,42 \times 10^4$ KbE/g. Im Vergleich dazu wiesen Horton et al. (46) im Mittel $1,0 \times 10^5$ KbE/g *bla*_{CTX-M}-positive *E. coli* in Schweinekotproben nach. Die Zahl ESBL/AmpC-verdächtiger *E. coli* in den Einzeltierkotproben der vorliegenden Studie nahm dabei im Verlauf der Mastperiode signifikant ab. Dies entspricht den Ergebnissen der Langzeitstudie von Hansen et al. (88), bei der ebenfalls eine signifikante Abnahme der Anzahl an fäkalen *bla*_{CTX-M}-bildenden coliformen Bakterien während des Produktionszyklus von Schweinen beobachtet wurde.

Des Weiteren wurden bei beiden Studien die niedrigsten Bakterienzahlen kurz vor der Schlachtung beobachtet: Bei Hansen et al. (88) wurden im Durchschnitt $< 1,2 \times 10^3$ KbE/g *bla*_{CTX-M}-resistente coliforme Bakterien, in unserer Studie $2,17 \times 10^3$ KbE/g ESBL/AmpC-verdächtige *E. coli* nachgewiesen. Katouli et al. (99) zeigten, dass sich die Zusammensetzung der Darmflora von Schweinen während des Produktionszyklus ändert. Deshalb besteht die Möglichkeit, dass die Abnahme der Prävalenz und der Bakterienanzahl durch altersbedingte Änderungen in der Zusammensetzung der Darmflora verursacht wurde, welche zu einer Verdrängung von *bla*_{CTX-M}-bildenden *E. coli* durch andere Bakterienstämme geführt haben (88).

Das häufige Vorkommen von ESBL/AmpC-bildenden *E. coli* in Lebensmittel liefernden Tieren, wie den in dieser Studie untersuchten Schweinen, könnte eine Rolle bei der Lebensmittelsicherheit spielen.

In allen Betrieben, mit Ausnahme von Betrieb 3 und Betrieb 7, wurden auch bei der Probenahme am Ende der Endmastperiode, also kurz vor der Schlachtung, ESBL/AmpC-bildende *E. coli* in den Schweinekotproben detektiert. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass diese resistenten Bakterien auch noch zum Zeitpunkt der Schlachtung in den Tieren vorhanden waren. Mehrere Studien haben das Vorkommen dieser resistenten Bakterien in Schweinekotproben auf Schlachthöfen nachgewiesen (1, 57, 60, 98, 100). Und es wurde gezeigt, dass eine Kontamination des Schlachtkörpers eines einzelnen Schweines durch *E. coli* vom eigenen Kot des Tieres oder durch Kreuzkontamination zwischen Schweinen, die am selben Tag geschlachtet wurden, wahrscheinlich ist (101). Omisakin et al. (102) zeigten bei Rindern, dass Tiere, die hohe Konzentrationen von *E. coli* O157 ausscheiden, das potenzielle Risiko der Fleisch-Kontamination während des Schlachtprozesses deutlich erhöhen. Darüber hinaus legten Horton et al. (46) nahe, dass Ausscheider von hohen Konzentrationen an *bla*_{CTX-M}-bildenden *E. coli* ($\geq 1 \times 10^4$ KbE/g) ein erhöhtes Risiko für die Kontamination der Lebensmittelkette darstellen. Die Bakterienzahlen der in dieser Studie untersuchten Betriebe waren bei der Probenahme kurz vor der Schlachtung jedoch niedriger als die oben genannten. Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass das Risiko einer Schlachtkörper-Kontamination durch die in unserer Studie untersuchten Schweine gegebenenfalls niedriger einzustufen ist als bei Ausscheidern von hohen Konzentrationen an *bla*_{CTX-M}-bildenden *E. coli* ($\geq 1 \times 10^4$ KbE/g). Auf jeden Fall stellt die Kontamination von

Schlachtkörpern ein Risiko dar, bei der eine Kolonisierung des Menschen mit ESBL-bildenden *E. coli* möglich ist, wenn Fleisch nicht gründlich erhitzt wird (1).

ESBL/AmpC-bildende *E. coli* wurden schon in verschiedenen Ländern im Schweinefleisch nachgewiesen (89, 90, 98, 103) und Leistner et al. (104) zeigten in einer Fall-Kontroll-Studie, dass ein Zusammenhang zwischen dem häufigen Konsum von Schweinefleisch (≥ 3 Mahlzeiten pro Woche) und der ESBL-Kolonisation in der Bevölkerung besteht ($p < 0,001$). Interessanterweise wurde in den Rektaltupfern der untersuchten Probanden am häufigsten *bla*_{CTX-M-1} detektiert (104), welches auch das am häufigsten nachgewiesene ESBL-Gen im Schweinekot der hier vorliegenden Studie war. Leider gibt es bisher nur wenig vergleichende Daten zu ESBL/AmpC-bildenden *E. coli* von Lebensmittel liefernden Tieren, Fleischprodukten und Menschen (105-107). Es deutet bis jetzt jedoch alles darauf hin, dass ESBL-*E. coli* über die Lebensmittelkette von Tieren auf Menschen übertragen werden können (105-107) und es sollten weitere Studien durchgeführt werden, um das detaillierte Risiko bzw. Ausmaß einer Übertragung dieser resistenten Bakterien über die Lebensmittelkette zu analysieren. Zweifellos sind jedoch Hygienemaßnahmen bei der Schlachtung und Weiterverarbeitung von Fleisch von großer Bedeutung, um eine Verbreitung dieser Bakterien über die Lebensmittelkette zu vermeiden. Des Weiteren sind ein guter, hygienischer Umgang mit Lebensmitteln beim Verbraucher und das gründliche Erhitzen von Fleischprodukten unerlässlich (89).

Bereits zum ersten Probenahmezeitpunkt wurden ESBL/AmpC-bildende *E. coli* in hohem Maße in Einzeltierkotproben und Sammelkotproben nachgewiesen. Dies bedeutet, dass die Schweine schon vor der Endmastperiode mit diesen Bakterien kolonisiert waren. Wann und wie wurden die Schweine jedoch mit diesen Bakterien kolonisiert? Schon als Ferkel über vertikale Übertragung? Oder erst später im Flatdeck über horizontale Übertragung?

Hansen et al. (88) konnten beweisen, dass Mastschweine eine größere Wahrscheinlichkeit haben *bla*_{CTX-M}-positiv zu sein, wenn sie schon als Ferkel positiv waren. Des Weiteren vermuteten Hansen et al. (88) einen Zusammenhang zwischen dem ESBL-Status von Sauen und ihrem Nachwuchs. Diese Hypothese konnte jedoch statistisch bisher nicht bewiesen werden. Auch bei Masthähnchen wurden ESBL/AmpC-produzierende *E. coli* bereits in Eintagsküken nachgewiesen (97).

All diese Ergebnisse zeigen, dass detaillierte Untersuchungen zu möglichen vertikalen Übertragungswegen und über „den ersten Eintrag“ von ESBL/AmpC-bildenden *E. coli* in der Schweine- und Geflügelproduktion von großer Bedeutung sind und in zukünftigen Studien stärker berücksichtigt werden sollten.

Des Weiteren stellt sich die Frage, welche Faktoren einen Einfluss auf die Prävalenz von ESBL/AmpC-bildenden *E. coli* in Schweinebetrieben haben könnten.

Das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit berichtet in einer Presseinformation vom August 2014, dass im Jahr 2013 insgesamt 1.452 Tonnen Antibiotika von pharmazeutischen Unternehmen und Großhändlern an Tierärzte in Deutschland abgegeben wurden. Die Hauptabgabemengen bilden dabei Penicilline mit etwa 473 Tonnen und Tetrazykline mit etwa 454 Tonnen (108).

Der Gebrauch von Antibiotika, besonders von Beta-Laktam-Antibiotika, stellt einen Risikofaktor für die Selektion von ESBL-bildenden Bakterien in Menschen (28) und Tieren (109) dar.

Auch bei Schweinen wurde dieser Zusammenhang schon in verschiedenen Studien beschrieben: Die Ergebnisse von Jorgensen et al. (110) zeigen, dass der Gebrauch von Beta-Laktam-Antibiotika, insbesondere von Cephalosporinen, eine Rolle bei der Selektion von ESBL/AmpC-bildenden Bakterien in Schweinen spielen könnte. Auch Cavaco et al. (111) beobachteten, dass bestimmte Beta-Laktame, unter anderem Amoxicillin, die in der Schweineproduktion angewandt werden, zur Selektion von *bla*_{CTX-M}-bildenden *E. coli* in der Darmflora von Schweinen führen. Hansen et al. (88) vermuten ebenfalls einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein *bla*_{CTX-M}-bildender *E. coli* und dem Gebrauch von Amoxicillin und Ampicillin.

Neben Beta-Laktam-Antibiotika könnten jedoch auch andere Antibiotika eine Rolle bei der Selektion von Beta-Laktamase-Genen spielen. Funk et al. (112) zeigten, dass gramnegative Isolate von Schweinen, die eine subtherapeutische Dosis an Chlortetracyclinen über das Futter erhalten hatten, eine größere Wahrscheinlichkeit haben gegen Ceftriaxon resistent zu sein als Isolate von unbehandelten Schweinen. Auch die Ergebnisse von Looft et al. (113) demonstrieren das Potenzial zur indirekten Selektion von Resistenzen gegen Antibiotika-Klassen, die nicht verabreicht wurden. Andere Studien berichteten wiederum, dass die

Behandlung von Schweinen mit Nicht-Beta-Laktam-Antibiotika (Chlortetracyclin und Tylosin) keinen Effekt auf die Prävalenz von antimikrobieller Resistenz hatte (114).

Die in dieser Studie untersuchten Schweine wurden mit unterschiedlichen antimikrobiellen Substanzen behandelt. Die Behandlungen fanden vor allem in der Vormast (im Flatdeck), also vor unseren Probenahmen, statt. Das könnte einen maßgeblichen Einfluss auf die ESBL/AmpC-Prävalenzen gehabt haben. Das einzige Beta-Laktam-Antibiotikum, welches in den untersuchten Schweinebetrieben (nur in den Betrieben 1, 2 und 5) während dieser Studie verabreicht wurde, war Amoxicillin. Betrieb 2, bei dem Amoxicillin zweimal verabreicht wurde, zeigte während der gesamten Mastperiode eine hohe Prävalenzrate und hohe fäkale Bakterienzahlen von ESBL/AmpC-bildenden *E. coli*.

Hansen et al. (88) vermuten zudem, dass *bla*_{CTX-M}-bildende *E. coli* in Schweinen eine lange Zeit ohne direkten Selektionsdruck persistieren können. Dies würde das Vorkommen von ESBL/AmpC-bildenden *E. coli* in denjenigen Betrieben der vorliegenden Arbeit erklären, in denen keine Beta-Laktame während der Vormast- und Endmastperiode verabreicht wurden. In einer Untersuchung von Looft et al. (113) wurden auch bei Schweinen, die keine Antibiotika erhalten hatten, diverse Resistenzgene im Mikrobiom nachgewiesen. Dies deutet zusätzlich darauf hin, dass auch ohne antibiotischen Selektionsdruck diverse Resistenzgene im Schweine-Mikrobiom vorhanden sind.

Die Untersuchung der Bedeutung des Antibiotika-Gebrauchs bei der Resistenzbildung stand jedoch nicht im Fokus dieser Studie. Die Ergebnisse sind somit nicht ausreichend geeignet eine signifikante Beziehung zwischen Antibiotikabehandlung und der Prävalenz von ESBL/AmpC-bildenden Bakterien zu demonstrieren. Weitere Studien sollten daher durchgeführt werden, um die genauen Auswirkungen des Antibiotikagebrauchs auf die Entwicklung, Selektion und Co-Selektion resistenter Bakterien bei Schweinen zu ermitteln.

Ein weiterer Faktor, der einen Einfluss auf die Prävalenz von ESBL/AmpC-bildenden *E. coli* in Schweinebetrieben ausüben könnte, ist die Kontamination der Ställe mit diesen Bakterien. In der vorliegenden Arbeit wurden ESBL/AmpC-bildende *E. coli* regelmäßig in Proben der Tierumgebung innerhalb des Stalls detektiert: 47,6% der Sammelkot- und Sockentupferproben und 5,9% der Umgebungstupferproben, jedoch keine der Staubproben wurden positiv auf ESBL/AmpC-*E. coli* getestet. Diese Ergebnisse führen zu der Annahme,

dass Sammelkot- und Sockentupferproben im Gegensatz zu Staubproben geeignet sind, um den ESBL/AmpC-Status von Schweinebetrieben zu ermitteln.

Der ESBL/AmpC-positive Kot kontaminiert die gesamte Stallumgebung. Der niedrigere Nachweis dieser resistenten Keime in den Sockentupferproben sowie der fehlende Nachweis in den Umgebungstupferproben zum ersten Probenahmezeitpunkt (kurz nach Einstallung der Tiere) unterstützt diese Hypothese, denn dann ist der Stall, kurz nach der Reinigung und Desinfektion, am wenigsten kontaminiert. Eine kontaminierte Stallumgebung fördert die horizontale Übertragung dieser resistenten Bakterien auf die potenziell nicht-kolonisierten Tiere. Da sogar Umgebungstupferproben von Tränken in dieser Studie positiv auf ESBL/AmpC-bildende *E. coli* getestet wurden, besteht die Möglichkeit, dass die Schweine diese resistenten Bakterien mit der Wasser- oder Futteraufnahme inkorporieren.

Jedoch wurden in den Schweinemastbetrieben 2 und 5 auch schon zum ersten Probenahmezeitpunkt ESBL/AmpC-*E. coli* in den Sockentupferproben nachgewiesen. Der Schweinemastbetrieb 2 wurde dabei schon einen Tag nach Einstallung der Schweine auf ESBL/AmpC-*E. coli* untersucht. Der positive Sockentupferbefund könnte somit auf eine unzureichende Reinigung und Desinfektion der Ställe hinweisen. Frisch eingestellte Schweine, die noch „ESBL/AmpC-frei“ sind, müssen sich so direkt mit den Bakterien auseinandersetzen und könnten kolonisiert werden. Auch in der Studie zu Masthähnchen von Laube et al. (97) wurden schon zum ersten Probenahmezeitpunkt ESBL/AmpC-*E. coli* in verschiedenen Umgebungsproben wie Einstreu, Sockentupfer, Umgebungstupfer und Staub der erst kurz zuvor gereinigten und desinfizierten Ställe detektiert. Hiroi et al. (115) vermuten, dass das Vorkommen von ESBL-bildenden *E. coli* in Masthähnchen nicht in Zusammenhang mit der Antibiotikagabe steht, sondern dass die Kontamination der Ställe mit ESBL-bildenden *E. coli* einen wichtigen Faktor spielen könnte. Auf eine gründliche Reinigung und Desinfektion der Tierställe sollte daher besonders geachtet werden.

In diesem Zusammenhang sollte jedoch erwähnt werden, dass auch der Gebrauch von Desinfektionsmitteln eine Gefahr der Selektion von antibiotikaresistenten Bakterien bergen könnte (116). Frye et al. (116) berichteten von Resistenzgenen gegen Desinfektionsmittel in *E. coli*- und *Salmonella*-Isolaten, die sich oft auf demselben genetischen Element wie antimikrobielle Resistenzgene befinden und mit ihnen verbunden sind.

Neben einer kontaminierten Stallumgebung könnte auch die Anzahl der Tiere in Schweineställen einen Faktor darstellen, der einen Einfluss auf die Prävalenz von ESBL/AmpC-bildenden *E. coli* haben könnte. So weisen Costa et al. (45) darauf hin, dass hohe Tierkonzentrationen in Masthähnchenherden die Übertragung resistenter Bakterien zwischen den Tieren erleichtern könnte. Diese Annahme wird auch durch die vorliegende Studie gestützt. In den sieben Schweinemastbetrieben der vorliegenden Studie waren die Tierzahlen sehr verschieden und es wurden auch sehr unterschiedliche Nachweishäufigkeiten von ESBL/AmpC-bildenden *E. coli* in diesen Betrieben aufgezeichnet. Betrieb 4 war mit 760 Schweinen der Betrieb mit den höchsten Tierzahlen pro untersuchtem Stall, gefolgt von Betrieb 6 und Betrieb 2. Interessanterweise war auch Betrieb 4, gefolgt von Betrieb 2 und Betrieb 6, der Betrieb mit dem höchsten Vorkommen von ESBL/AmpC-bildenden *E. coli*. Die niedrigsten Tierzahlen hatte Betrieb 5 mit nur 80 Schweinen im untersuchten Stall und Betrieb 5 stellte gleichzeitig auch den Betrieb mit dem niedrigsten Vorkommen von ESBL/AmpC-bildenden *E. coli* dar.

Schließlich können Mitarbeiter der Betriebe, die Zugang zu den Schweineställen haben, als potenzielle Eintrags-, Austrags- und Verbreitungsquelle für diese resistenten Bakterien agieren, wenn keine strengen Hygienemaßnahmen durchgeführt werden.

Die Landwirte aller sieben Betriebe berichteten, dass die Personen, die die Schweine betreuen, privat Kontakt zu Nutztieren und/oder Haustieren haben. Außerdem wird in keinem der untersuchten Betriebe eine Händereinigung und Händedesinfektion vom Betriebspersonal als Hygienemaßnahme vor dem Betreten der Schweineställe durchgeführt und es werden keine Schutzhandschuhe getragen. Beim Betrieb 4 werden sogar gar keine Hygienemaßnahmen vor dem Betreten der Schweineställe durchgeführt (auch keine Schutzkleidung). Es besteht also die Möglichkeit, dass ESBL/AmpC-bildende *E. coli* vom Betriebspersonal in die Betriebe sowohl ein- als auch ausgetragen werden.

Des Weiteren kann das Betriebspersonal mit seiner benutzten Arbeitskleidung (u. a. Stiefel, Schutzanzüge) und den benutzten Arbeitswerkzeugen (z. B. Futterwagen, Ferkelwaagen, Reinigungsequipment, Treibbretter, Kennzeichnungsstifte, Ohrmarkenzangen, Waagen, Spritzpistole, Werkzeuge, Schlinge) die resistenten Bakterien innerhalb des ganzen Stalls und sogar innerhalb des ganzen Betriebes verbreiten. Die Landwirte der sieben untersuchten Schweinebetriebe berichteten ausnahmslos, dass die Arbeitswerkzeuge in ihren Betrieben in

mehreren Ställen bzw. allen Gebäuden ohne vorherige Desinfektion benutzt werden. Auch dieselbe Schutzkleidung und Stiefel werden bei vielen Betrieben für mehrere Ställe und ohne vorherige Reinigung und Desinfektion benutzt. In der Studie von Tamang et al. (117) wurde das *bla*_{CTX-M-14}-Gen in einem *E. coli*-Isolat von der Hand eines Bauern einer Rinderfarm nachgewiesen. PFGE-Analysen zeigten, dass dieses *E. coli*-Isolat von der Hand des Bauern nicht unterscheidbar war von einem *E. coli*-Isolat einer Futterprobe, welches wiederum sehr nah verwandt war mit Isolaten, die von Zitzen- und Kälberkotproben stammten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine klonale Verbreitung von bestimmten *bla*_{CTX-M}-bildenden *E. coli*-Isolaten bei Tieren, Menschen und der Umgebung stattfindet (117). In der Studie von Moodley und Guardabassi (118) wurden *bla*_{CTX-M-1}-produzierende *E. coli* von Schweinen und Personal desselben Schweinebetriebes isoliert. Diese Isolate trugen nicht unterscheidbare oder nah verwandte IncN Plasmide mit dem *bla*_{CTX-M-1}-Gen und die Ergebnisse deuten darauf hin, dass diese Cephalosporin-Resistenz vermittelnden IncN Plasmide zwischen *E. coli*-Isolaten von Schweinen und dem Betriebspersonal übertragen wurden (118). Unzureichende Hygienemaßnahmen in Betrieben können also eine potenzielle Gefahr der Resistenzverbreitung darstellen. Durch gute Schutzkleidung (Stiefel, Overalls, Schutzhandschuhe usw.) und konsequente Reinigung/Desinfektion (Händedesinfektion, Duschen, Wechseln der Kleidung usw.) im Anschluss an jeden Tierkontakt, kann das potenzielle Risiko einer Verbreitung minimiert werden.

4.2 Emission ESBL/AmpC-bildender *Escherichia coli* aus Schweinemastbetrieben

In dieser Studie stellten Gülleproben mit 82,4% ESBL/AmpC-positiven Proben diejenigen Proben mit der höchsten Nachweisrate dar. Laut statistischem Bundesamt haben in Deutschland im Jahr 2010 rund 166 000 landwirtschaftliche Betriebe ihre Flächen mit flüssigem Wirtschaftsdünger, also Gülle, Jauche oder flüssigen Gärresten aus Biogasanlagen gedüngt. Das waren 55%, also mehr als die Hälfte aller Betriebe in Deutschland, die im Jahr 2010 landwirtschaftliche Flächen bewirtschafteten. Auch die sieben innerhalb dieser Studie untersuchten Schweinebetriebe bringen Gülle auf Ackerflächen aus und vier der sieben Schweinebetriebe düngen ebenfalls ihre Grünlandflächen mit Gülle. Friese et al. (91) vermuten, dass der Austrag von Nutztierfäkalien einen möglichen Weg für die Verbreitung von resistenten Bakterien in die Umwelt darstellen könnte. In der hier vorliegenden Studie wurden ESBL/AmpC-produzierende *E. coli* von verschiedenen Bodenoberflächen der windabgewandten und windzugewandten Seite der untersuchten Schweineställe isoliert. Alle landwirtschaftlichen Anbauflächen mit positivem ESBL/AmpC-*E. coli*-Nachweis wurden zwischen 1-7 Monaten vor der Probenahme mit Gülle gedüngt. Der mögliche Austrag dieser resistenten Bakterien über Fäkalien, konnte anhand von PFGE-Analysen für Betrieb 5 aufgezeigt werden: *E. coli*-Isolate mit einer Übereinstimmung von 100% in den PFGE-Analysen wurden sowohl in der Gülle als auch auf Feldern desselben Betriebes in bis zu 500 Meter Entfernung vom Stall detektiert. Diese Felder wurden ungefähr einen Monat zuvor mit Gülle gedüngt, was darauf hinweist, dass *E. coli*-Bakterien diese beachtliche Zeit auf den Oberflächen überleben können.

Die langfristige Überlebensfähigkeit dieser resistenten Bakterien wurde bereits in der Studie von Hartmann et al. (119) beschrieben. Sie berichteten zum ersten Mal von dem Vorkommen von *bla*_{CTX-M}-bildenden *E. coli* in kultivierten Böden und konnten zeigen, dass diese Bakterien sogar die Fähigkeit besitzen, ein Jahr lang im Boden zu überleben. Dies wirft Fragen auf wie: Überleben ESBL/AmpC-produzierende *E. coli* gegebenenfalls länger in der Umgebung als Bakterien ohne Resistenzgen? Verursacht das Tragen eines ESBL/AmpC-Gens Vorteile in der Überlebensfähigkeit? Bisher ist nur wenig bekannt über die Überlebensfähigkeit von *E. coli* bei verschiedenen Umweltbedingungen und auf

verschiedenen Böden. Der pH-Wert, die Konzentration an organischem Kohlenstoff in der Erde (120) und das Vorkommen von Schwermetallen (121) könnten einen Einfluss auf die Überlebensfähigkeit von *E. coli* in der Erde haben. In der Studie von Bolton et al. (122) wurde in 20% der Boden-Proben, die mit *E. coli* O157-kontaminiertem Kot gedüngt wurden, noch nach 99 Tagen dieses Pathogen nachgewiesen. Jiang et al. (123) zeigten, dass *E. coli* O157:H7 bis zu 77 Tage bei 5 °C, bis zu > 226 Tage bei 15 °C und bis zu 231 Tage bei 21 °C in mit Gülle behandelter, autoklavierter Erde überleben können. In nicht-autoklavierter Erde, die mit Gülle behandelt wurde, nahm die Anzahl an Pathogen-Populationen unter den ansonsten gleichen Umgebungsbedingungen schneller ab; wahrscheinlich aufgrund von antagonistischen Interaktionen mit anderen Mikroorganismen der Erde. Darüber hinaus scheint auch das Verhältnis Gülle : Erde eine Rolle beim Überleben der Erreger in mit Gülle behandeltem Boden zu spielen (123).

Des Weiteren stellt sich die Frage, ob die übliche Verwendung von Gülle als Düngemittel auf Feldern ein unterschätztes Risiko für die Verbreitung dieser resistenten Bakterien in die Umgebung und in die Lebensmittelkette darstellt. Looper et al. (124) vermuten, dass *E. coli* O157:H7 innerhalb von vier Tagen, nachdem Rohrschwingelpflanzen mit *E. coli* O157:H7-kontaminierter Gülle gedüngt wurden, von diesen Pflanzen aufgenommen werden und Solomon et al. (125) demonstrierten, dass *E. coli* O157:H7 von Salatpflanzen durch das Wurzelsystem aufgenommen werden und dann auch durch die essbaren Bereiche der Pflanze wandern. ESBL-bildende *E. coli* wurden schon in verschiedenen Studien in Salatproben nachgewiesen (53, 107, 126).

Bei drei von sieben Schweinebetrieben der vorliegenden Studie wird Stroh von mit Gülle gedüngten Flächen in der eigenen Tierhaltung eingesetzt, was zu der Frage führt: Stellt der Einsatz von mit Gülle gedüngtem Stroh in der Schweinehaltung eine Gefahr für die Einschleppung dieser resistenten Bakterien in die Tierhaltung dar? Die Bedeutung von mit Gülle gedüngtem Stroh als potenzielle Eintragsquelle sollte in zukünftigen Studien untersucht werden.

Darüber hinaus spekulierten Ghosh und LaPara (127), dass die exzessive Anwendung von Gülle zu der Übertragung von Resistenzen auf Bakterien im Boden führt, welche dann wiederum als persistierendes Reservoir für Antibiotikaresistenzgene dienen. Rahube und Yost (128) zeigten, dass Schweinegülle multiple Antibiotikaresistenz-Plasmide beinhalten kann, die nach Ausbringung der Gülle in der Erde nachgewiesen werden können. Diese Plasmide

können mobilisiert werden und sind in der Lage, Resistenzgene auch auf andere Bakterienspezies zu übertragen (128).

Abgesehen von Gülle wird auch der Gärrest von Biogasanlagen als Düngemittel auf Felder ausgebracht. In der vorliegenden Studie wurden drei von vier Gärrestproben positiv auf ESBL/AmpC-bildende *E. coli* getestet. Nach bestem Wissen ist dies der erste Nachweis von ESBL/AmpC-bildenden *E. coli* im Gärrest von Biogasanlagen. In den Biogasanlagen von beiden untersuchten Betrieben wurden mesophile Temperaturen angewendet. Diese Temperaturen waren offensichtlich nicht hoch genug, um ESBL/AmpC-bildende *E. coli* zu eliminieren. Weitere Studien, die auch Biogasanlagen mit thermophilen Bedingungen einschließen, sollten jedoch durchgeführt werden, um diese Hypothese zu überprüfen.

Interessanterweise wurden im Gärrest der Biogasanlagen niedrigere Konzentrationen von ESBL/AmpC-bildenden *E. coli* im Vergleich zu den Gülleproben nachgewiesen und in der Gülle waren die Konzentrationen dieser Bakterien wiederum niedriger als in den Sammelkotproben. Gülle besteht aus einer Mischung aus Kot und Urin. Für die Biogasproduktion werden der Gülle in der Biogasanlage verschiedene Materialien, wie beispielsweise Mais-, Getreide- und Grassilage sowie Roggen-GPS, hinzugefügt. Das erklärt die niedrigeren Konzentrationen von ESBL/AmpC-bildenden *E. coli* im Gärrest und in der Gülle im Vergleich zu den Sammelkotproben. Darüber hinaus zeigten Avignon und Lafont schon im Jahr 1985, dass die Lagerung und Belüftung von Schweinegülle vor dem Ausbringen die Konzentration an Enterobakterien reduziert und somit das Risiko der Verbreitung von antibiotikaresistenten Bakterien in die Umgebung verringert (129). Während der Lagerung der Gülle finden zahlreiche Prozesse der Selbst-Hygenisierung statt, die für die Verringerung der Anzahl an Pathogenen in der Gülle verantwortlich sind (130).

Neben begüllten Feldern wurden ESBL/AmpC-bildende *E. coli* aber auch auf nicht begüllten Oberflächen wie Wegen und Wiesen in der Umgebung der untersuchten Schweinebetriebe nachgewiesen. Durch Regenwasser könnten ESBL/AmpC-*E. coli* abhängig von den jeweiligen topographischen Verhältnissen von begüllten Feldern auf umgebende Wege und Wiesen verbreitet worden sein. Auch Wind könnte diese resistenten Bakterien weiter verbreitet haben.

Des Weiteren ist auch beim Ein- und Ausställen von Schweinen eine Kontamination der Umgebung mit Schweinekot möglich. Daraufhin können Fahrzeuge den Kot innerhalb des ganzen Betriebsgeländes, aber auch außerhalb des Betriebes und auf Felder verbreiten. Diese Hypothese würde zum Beispiel den Nachweis von ESBL-*E. coli*-Isolaten mit 100% Übereinstimmung in den PFGE-Analysen in einer Kotprobe, die auf dem Weg neben dem untersuchten Stall von Betrieb 7 gesammelt wurde und einer Sockentupferprobe eines weiteren Weges ungefähr 50 Meter auf der windabgewandten Seite des gleichen Stalls erklären. Dies hebt die Bedeutung der Reifendesinfektion als wichtige Biosicherheitsmaßnahme an den Ein- und Ausgängen von Betrieben hervor.

Darüber hinaus könnten auch Hunde und Wildtiere durch das Ausscheiden von ESBL-positivem Kot in der Umgebung eine Rolle bei der Kontamination von Wegen, Wiesen und Feldern spielen (131, 132). Der Kot, der von Hunden der untersuchten Schweinebetriebe untersucht wurde, zeigte vergleichsweise hohe Konzentrationen an ESBL/AmpC-verdächtigen *E. coli*. Wie die überwiegende Anzahl der *E. coli*-Isolate der untersuchten Schweinebetriebe wurden auch diese Hundekot-Isolate positiv auf *bla*_{CTX-M-1} getestet. Wildtiere wurden schon vor Jahren als potenzielles Reservoir ESBL/AmpC-bildender *E. coli* erkannt (75, 133). ESBL-bildende *E. coli* wurden unter anderem in Füchsen (77), Vögeln (79, 80) und Rehen (74) nachgewiesen.

Wie erst kürzlich bei Masthähnchenbetrieben gezeigt wurde, stellt der luftgetragene Weg eine weitere Möglichkeit des Austrags von ESBL/AmpC-bildenden *E. coli* von Nutztierbetrieben in die Umgebung dar (134). Auch für Schweineställe demonstrierten Yuan et al. (135) und Duan et al. (136), dass luftgetragene *E. coli* über Luftaustausch in die Stallumgebung ausgetragen werden können. Mehr als 90% Übereinstimmung wurde zwischen *E. coli*-Isolaten von der windabgewandten Seite des Stalls und den *E. coli*-Isolaten von Luft- oder Kotproben von innerhalb des Stalls festgestellt (135, 136). Sobald die Bioaerosole über das Ventilationssystem aus dem Stall in die Umgebung abgegeben werden, dispergieren oder sedimentieren sie je nach Partikelgröße, atmosphärischer Stabilität und Windgeschwindigkeit. In der vorliegenden Arbeit stammte die Mehrzahl der ESBL/AmpC-positiven Sockentupferproben von der windabgewandten Seite des Stalls, überwiegend von 50 Meter Entfernung. Diese Ergebnisse führen zu der Vermutung, dass ein Austrag über die Luft stattgefunden hat, denn die größeren und schwereren Partikel sedimentieren schneller und in

der Nähe des Stalls und es können sich wegen der größeren Oberfläche mehr Bakterien anhaften (137). Jedoch waren bei dem in unserer Studie angewandten McNemar-Test keine signifikanten Unterschiede bei den Häufigkeiten der positiven Sockentupferproben von den verschiedenen Entfernungen und Seiten des Stalls feststellbar.

Nur zwei Außenluftproben, jeweils eine von der windabgewandten und der windzugewandten Seite von Betrieb 7, wurden positiv auf diese resistenten Mikroorganismen getestet, wobei ein Austrag über die Luft anhand der durchgeführten PFGE-Analysen nicht bestätigt werden konnte. Ebenfalls niedrige Nachweisraten von ESBL/AmpC-bildenden *E. coli* in der Außenluft von Ställen wurden in der Studie zu Masthähnchen von Laube et al. (134) festgestellt. Auch in einer Studie von Chinivasagam et al. (138) wurden *E. coli* in 20 Meter Entfernung vom Masthähnchenstall nur in geringem Maße in der Außenluft nachgewiesen. Der sehr geringe Nachweis in der Außenluft der Umgebung der Schweineställe kann durch das geringe Vorkommen dieser resistenten Bakterien in der Stallluft und der erwarteten starken Verdünnung in der Luft außerhalb des Stalls erklärt werden. Außerdem unterliegen Keime in der Außenluft rasch einer erheblichen Absterberate (139). Yuan et al. (135) zeigten eine starke Abnahme der *E. coli*-Konzentrationen in der Luft außerhalb von Schweineställen. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass einige der luftgetragenen *E. coli* mit der Nachweisgrenze der in dieser Studie angewandten Methode der Luftprobenahme nicht detektiert wurden. Negativ getestete Luftproben garantieren also nicht die Abwesenheit dieser resistenten Bakterien in der Luft. Darüber hinaus wurden auch verschiedene Umweltbedingungen wie Temperatur, relative Luftfeuchtigkeit und UV-Strahlung sowie Schädigung der Zellstruktur im Impinger als kausale Faktoren für die niedrigen Nachweislevel diskutiert (138, 140-144).

In beiden Außenluftproben von Betrieb 7 wurden *bla*_{CMY}-positive *E. coli* nachgewiesen. Da dieses Gen nicht im untersuchten Schweinestall von Betrieb 7 detektiert wurde, scheint es unwahrscheinlich, dass diese Mikroorganismen von diesem Stall stammten. Möglicherweise waren benachbarte Rinder- oder Geflügelbetriebe die Quelle, denn das *bla*_{CMY}-Gen wird auch bei diesen Tierarten nachgewiesen (97, 145). Alle Landwirte, mit Ausnahme von Betrieb 1, erwähnten benachbarte Tierhaltungen mit einer Entfernung von circa 1-3 Kilometer. Eine weite Verfrachtung über die Luft hängt neben der Tenazität der Erreger von meteorologischen Bedingungen und weiteren begünstigenden Faktoren wie der Adsorption an Staubpartikel ab (139).

Des Weiteren könnten Kläranlagen und Schlachthöfe, welche sich in der Nähe von einigen der untersuchten Betriebe befinden, eine Quelle für den Austrag und die Kontamination der Umwelt mit ESBL/AmpC-bildenden Enterobakterien darstellen (146-148). ESBL-bildende Enterobakterien wurden in den Abwasserproben und in der Außenluft der Umgebung einer Kläranlage sowie in Flusswasser (in den Fluss fließt Abwasser der Kläranlage) nachgewiesen (146). Korzeniewska et al. (147) zeigten in einer weiteren Studie, dass, obwohl die Abwasserbehandlung in Kläranlagen die Bakterienkonzentrationen verringert, ein beträchtlicher Teil der antibiotikaresistenten Bakterien im Abwasser bestehen bleiben. Keimzahlen von mehr als $2,7 \times 10^3$ KbE/ml *E. coli* erreichten über das Vorfluterwasser den Fluss und trugen zur Verbreitung der resistenten Bakterien in die Umwelt bei (147).

Da Luftaustausch in beiden Richtungen stattfindet, scheint neben dem Austrag von ESBL/AmpC-bildenden *E. coli* auch ein Eintrag von kontaminierter Außenluft in die Tierställe möglich zu sein. Dadurch könnten gereinigte und desinfizierte Tierställe rekontaminiert werden. Dieser Aspekt stand jedoch nicht im Fokus der vorliegenden Studie und wurde deshalb nicht im Detail untersucht.

In vier von sieben Schweinemastbetrieben dieser Studie wurden ESBL/AmpC-bildende *E. coli* in der Stallluft nachgewiesen. Der Höchstwert der Gesamtanzahl an *E. coli* war dabei $2,60 \times 10^3$ KbE/m³, mit einem Anteil von 1% ESBL/AmpC-bildenden *E. coli*. Für *E. coli* O157:H7 wurde gezeigt, dass eine indirekte Übertragung auf Schweine über kontaminierte Luft stattfinden kann (149). Es besteht also die Möglichkeit, dass auch ESBL/AmpC-bildende *E. coli* über die Luft von Schwein zu Schwein übertragen werden könnten. Im Vergleich zu der vorliegenden Studie wurden in den Studien von Yuan et al. (135) und Chinivasagam und Blackall (150) niedrigere *E. coli*-Konzentrationen in der Stallluft von Schweineställen gefunden. Eine Vielzahl von unterschiedlichen Faktoren bestimmt das Spektrum und die Anzahl von luftgetragenen Mikroorganismen in Schweineställen (151). Faktoren wie das Management (z. B. Futtersorte, Reinigung usw.), das Haltungssystem (z. B. Einstreu oder Spaltenboden, Lüftungssystem, Fütterungssystem), die Tiere selbst (Aktivität, Infektionen, Mikroorganismenbesiedlung usw.), die Tages- und Jahreszeit und der Eintrag von Mikroorganismen aus der Umgebung des Stalls führen zu starken Konzentrationsschwankungen und beeinflussen die Artzusammensetzung der Mikroorganismenflora in der Luft (151). Des Weiteren können Temperatur und relative Luftfeuchtigkeit die Überlebensfähigkeit von *E. coli* in der Luft beeinflussen (152).

Wathes et al. (152) zeigten, dass eine warme, trockene Atmosphäre (ca. 30 °C und < 50% relative Luftfeuchtigkeit) das schnelle Absterben von luftgetragenen *E. coli* begünstigt. In der Stallluft von Masthähnchenställen detektierten Chinivasagam et al. (138, 153) und Laube et al. (134) höhere Werte in der Gesamtanzahl an *E. coli* im Vergleich zu unserer Studie. Außerdem war die Anzahl an ESBL/AmpC-positiven Stallluftproben und der Anteil von ESBL/AmpC-bildenden *E. coli* an der Gesamtanzahl *E. coli* in der Studie von Laube et al. (134) höher. Die höheren Werte können auf die allgemein hohen Nachweishäufigkeiten von ESBL/AmpC-bildenden *E. coli* im Staub, Einstreu und Kot in den Masthähnchenbetrieben zurückgeführt werden (97, 134). Im Gegensatz zu den Broilerbetrieben, bei denen 71,4% der Staubproben positiv auf ESBL/AmpC-bildende *E. coli* getestet wurden, waren alle Staubproben der untersuchten Schweinemastbetriebe negativ. Es ist bekannt, dass Stallstaub von Nutztierställen aus Futter, Einstreu und Tiermaterialien wie Kot, Hautschuppen und/oder Haaren/Federn besteht (154, 155) und dass 80% der luftgetragenen Mikroorganismen in diesen Gebäuden an Staubpartikel gebunden sind (156). Die Tatsache, dass in den untersuchten Schweineställen kein Einstreu verwendet wurde, könnte ein weiterer Grund für die niedrigeren Nachweisraten in der Stallluft der Schweineställe sein, da gezeigt wurde, dass die Bakterienkonzentrationen in der Stallluft im Zusammenhang mit den Bakterienkonzentrationen in der Einstreu stehen (153).

Vektoren, wie zum Beispiel Fliegen oder Mäuse, könnten eine weitere Rolle bei der Verbreitung von antimikrobieller Resistenz spielen.

In dieser Studie wurde eine Mäusekotprobe positiv auf ESBL/AmpC-bildende *E. coli* getestet. Kozak et al. (96) zeigten, dass Mäuse, die innerhalb oder in der Nähe von Nutztierhaltungen leben, eine größere Wahrscheinlichkeit haben resistente *E. coli* zu tragen, als Mäuse, die in naturbelassenen Gebieten leben. ESBL/AmpC-bildende *E. coli* wurden bisher jedoch ausschließlich in Ratten nachgewiesen und noch nicht in Mäusen (71-73).

Des Weiteren wurden Fliegen von zwei Betrieben dieser Studie positiv auf ESBL/AmpC-bildende *E. coli* getestet. Interessanterweise stammten diese ESBL/AmpC-positiv getesteten Stallfliegen von den hoch-prävalenten Betrieben 4 und 2. Durch Interaktion mit kontaminiertem Kot und/oder kontaminierter Stallumgebung könnten die Fliegen mit diesen resistenten Bakterien in Kontakt gekommen sein. *bla*_{CTX-M-1}-positive *E. coli*-Isolate von Fliegen, Sammelkot und Gülle von Betrieb 4 zeigten identische PFGE-Profile, was diese

Hypothese untermauert. Da Fliegen in der Lage sind, sich zwischen den Schweineställen und der Umgebung frei zu bewegen, können sie als Vektoren dieser resistenten Bakterien zwischen den Tierställen und der Umgebung agieren. Die Bedeutung von Fliegen bei der Verbreitung von ESBL-bildenden *E. coli* wurde erst kürzlich in verschiedenen Studien aus Japan, Tschechien und der Niederlande beschrieben (94, 95, 157). In der tschechischen Studie von Dolejska et al. (94) wurden ESBL-bildende *E. coli* in 18% der untersuchten Fliegen einer Pferdeklinik nachgewiesen. In der japanischen Studie von Usui et al. (95) wurden Cephalosporin-resistente *E. coli* von 10,3% der untersuchten Falschen Stallfliegen (*Muscina stabulans*) und 14,3% der untersuchten Stubenfliegen (*Musca domestica*) eines Rinderstalls isoliert. Interessanterweise ernähren sich diese beiden Fliegenarten vom Kot der Rinder, der ebenfalls ESBL-positiv getestet wurde. Die Wadenstecher (*Stomoxys calcitrans*) wiederum, die zu den blutsaugenden Insekten gehören, wurden negativ auf diese resistenten Bakterien getestet (95). In der holländischen Studie von Blaak et al. (157) wurden 2 von 19 Fliegen-Pools (10,5%) zweier Geflügelbetriebe positiv auf ESBL-bildende *E. coli* getestet. Die Ergebnisse dieser Studie implizieren ebenso, dass die Fliegen die ESBL-bildenden *E. coli* auf den Geflügelbetrieben erworben haben (157).

In der hier vorliegenden Studie wurden ESBL/AmpC-bildende *E. coli* jedoch zum ersten Mal von Fliegen aus Schweineställen isoliert. Drei von 12 (25%) Fliegen-Pools, die von sechs verschiedenen Schweinebetrieben stammten, wurden in dieser Studie ESBL/AmpC-positiv getestet. Im Vergleich zu den drei beschriebenen Studien ist dies ein höherer Anteil an ESBL/AmpC-positiven Fliegenproben. Dabei sollte jedoch erwähnt werden, dass in den anderen Studien eine vergleichsweise größere Anzahl an Fliegen untersucht wurde. Vergleichbar zu der hier vorliegenden Studie zeigten Usui et al. (95) und Dolejska et al. (94) identische PFGE-Profile bei ESBL-*E. coli*-Isolaten von Fliegen, Tieren und/oder Umgebungsproben des Stalls, was auf eine Verbreitung einiger Stämme durch die Fliegen hinweist. Die Studie von Dolejska et al. (94) veranschaulicht, dass ESBL-bildende *E. coli* und Plasmide, die ESBL-Gene tragen, leicht zwischen Tieren, Menschen und Fliegen, die in engem Kontakt zueinander leben, übertragen werden können. Auch wenn Fliegen sich nicht weit von den Tierställen wegbewegen, könnten sie dennoch ESBL-bildende *E. coli* bei Menschen verbreiten, die in der Nähe landwirtschaftlicher Betriebe leben oder dort Erholung suchen (157).

4.3 Nachweis und Charakterisierung von ESBL/AmpC Beta-Laktamasen in *Escherichia coli*

Die Mehrheit der in dieser Studie weiter charakterisierten ESBL/AmpC-verdächtigen *E. coli* wurde mittels Blättchendiffusionstest zur antimikrobiellen Empfindlichkeitstestung, PCR und Sequenzierung als ESBL/AmpC-Bildner bestätigt.

*bla*_{CTX-M} stellte, wie auch schon in anderen vergleichbaren Schweinestudien (1, 86, 87, 98), die mit Abstand am häufigsten nachgewiesene ESBL-Genfamilie in den untersuchten *E. coli*-Isolaten dar. *bla*_{CTX-M} wurde allein, aber auch häufig in Kombination mit *bla*_{TEM-1} detektiert, was ebenfalls mit anderen Schweinestudien übereinstimmt (82, 83, 86).

Eine Vielzahl von *E. coli*-Isolaten wurde sequenziert, wobei das *bla*_{CTX-M-1}-Gen das insgesamt am häufigsten nachgewiesene ESBL-Gen darstellte. Das *bla*_{CTX-M-1}-Gen wurde in der Mehrzahl aller Isolate von Sammelkotproben und anderen Proben von innerhalb und außerhalb der Schweineställe detektiert. Dies war zu erwarten, da besonders *bla*_{CTX-M-1} bei Lebensmittel liefernden Tieren in der EU weit verbreitet ist (14) und stimmt mit Studien aus anderen Ländern überein, in denen *bla*_{CTX-M-1} ebenfalls das am häufigsten nachgewiesene ESBL-Gen im Schweinekot war (1, 46, 50, 86, 87, 98, 110, 118).

Im Gegensatz zu unserer Studie haben Tian et al. (83) vor allem *bla*_{CTX-M-15/22}- und Tamang et al. (82) hauptsächlich *bla*_{CTX-M-14/15}-positive *E. coli* im Schweinekot nachgewiesen. Auch weitere *bla*_{CTX-M}-Gene, wie zum Beispiel *bla*_{CTX-M-32} (1), *bla*_{CTX-M-27}, *bla*_{CTX-M-65} (58, 82) *bla*_{CTX-M-3}, *bla*_{CTX-M-55} (82) und *bla*_{CTX-M-98} (58) wurden in Isolaten aus Schweinekot anderer Studien gefunden.

Bei den in unserer Studie untersuchten Fliegen wurde *bla*_{CTX-M-1} ebenfalls am häufigsten nachgewiesen. Dies stimmt mit der Studie von Dolejska et al. (94) überein, bei der auch *bla*_{CTX-M-1} am häufigsten bei Fliegen gefunden wurde. In anderen Studien zu Fliegen waren jedoch andere ESBL-Gene (*bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{SHV-12} und *bla*_{TEM-52}) vorherrschend (95, 157).

Darüber hinaus stellte *bla*_{CTX-M-1} das am häufigsten nachgewiesene ESBL-Gen in *E. coli*-Isolaten von den Oberflächen der Umgebung der Schweineställe, der Stallluft, der Gülle, des Gärrestes sowie des Hunde- und Mäusekotes dar. In Übereinstimmung mit unserer Studie wurde *bla*_{CTX-M-1} in der Studie von Moodley und Guardabassi (118) ebenfalls in *E. coli*-Isolaten der Gülle und der Luft eines Schweinebetriebes nachgewiesen. Des Weiteren wurde

in der Studie von Rodrigues et al. (158) wie in unserer Studie *bla*_{CTX-M-1}, allerdings auch *bla*_{TEM-52}, in der Schweinegülle detektiert.

In nur vier *bla*_{CTX-M}-positiven *E. coli*-Isolaten unserer Studie wurde nicht *bla*_{CTX-M-1}, sondern *bla*_{CTX-M-9} (zwei Sammelkotproben) und *bla*_{CTX-M-15} (eine Sammelkot-, eine Gülleprobe) nachgewiesen. Diese Gene wurden ebenfalls in den Schweinekotproben anderer Studien detektiert (1, 84, 85). Das *bla*_{CTX-M-15}-Gen ist das am häufigsten nachgewiesene Beta-Laktamase-Gen bei Extended-Spektrum Cephalosporin-resistenten *E. coli*-Isolaten von Menschen (14). Interessanterweise wurde jedoch *bla*_{CTX-M-1} vor kurzem häufiger in Rektaltupfern von Menschen nachgewiesen als *bla*_{CTX-M-15} (104).

Es gibt allerdings auch Untersuchungen, bei denen andere ESBL-Gene wie *bla*_{SHV-12} und *bla*_{TEM-52} am häufigsten in *E. coli*-Isolaten vom Schweinekot detektiert wurden (85, 158). In der vorliegenden Studie wurden *bla*_{SHV} und *bla*_{CMY} nur sehr vereinzelt und *bla*_{TEM-52} in keiner Probe gefunden.

Das Vorkommen des *bla*_{TEM-1}-Gens in Isolaten unserer Studie, die *bla*_{CTX-M}-, *bla*_{SHV}- und/oder *bla*_{CMY}-negativ waren oder in Kombination mit diesen drei Genen, ist nicht überraschend, da dieses Gen sehr weit verbreitet ist (17).

Darüber hinaus wurde im Verlauf dieser Studie ein neues, bisher nicht beschriebenes Gen *bla*_{TEM-206} in zwei Schweinekotproben entdeckt.

Vereinzelte ESBL/AmpC-verdächtige *E. coli*-Isolate waren beim Agardiffusionstest zur antimikrobiellen Empfindlichkeitstestung phänotypisch ESBL- oder AmpC-positiv, es konnte jedoch kein ESBL/AmpC-Gen der vier Genfamilien *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CMY} oder nur *bla*_{TEM-1} nachgewiesen werden. Da dies jedoch nur eine begrenzte Anzahl aller ESBL/AmpC-Gene darstellt, ist es wahrscheinlich, dass andere ESBL/AmpC-Gene oder andere Resistenzene, die nicht in dieser Studie getestet wurden, für den ESBL- und AmpC-Phänotyp verantwortlich sind.

So wurde in einigen Isolaten von Schweinebetrieb 2 (*E. coli*-Isolate einer Sockentupferprobe und Sammelkotprobe sowie ein *Salmonella* Infantis-Isolat einer Kotprobe), welche phänotypisch AmpC-positiv waren, bei denen jedoch kein Resistenzgen der vier Genfamilien *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} und *bla*_{CMY} nachgewiesen werden konnte, das *bla*_{VIM-1} Carbapenemase-Gen detektiert. Des Weiteren wurde in der Umgebung des Betriebes 1, in

einer Sockentupferprobe von 100 Meter Entfernung der windzugewandten Seite des untersuchten Stalls, das *bla*_{VIM-1}-Gen in einem *Salmonella* Infantis-Isolat nachgewiesen (159, 160). Nach bestem Wissen stellen diese Isolate die ersten beschriebenen Carbapenemase-produzierenden Enterobakterien aus Nutztierhaltungen dar.

In Deutschland sind Carbapeneme zur Behandlung von Nutztieren nicht zugelassen. Fischer et al. (160) diskutierten Co-Selektion als mögliche Erklärung für das Vorkommen bei den untersuchten Schweinebetrieben. Zudem ist ein Eintrag der ursprünglich von Menschen stammenden, Carbapenemase-bildenden Bakterien über kontaminierte belebte Vektoren wie Personen, Schädner, Insekten, aber auch über kontaminierte unbelebte Vektoren wie Luft, Wasser oder Futter wahrscheinlich.

Aufgrund der großen Bedeutung von Carbapenemen als Reserveantibiotika in der Humanmedizin und dem Vorkommen des *bla*_{VIM-1}-Gens auf mobilen genetischen Elementen, sind die Ergebnisse von Fischer et al. (159, 160) besorgniserregend und das Vorkommen von Carbapenemase-bildenden Bakterien bei Nutztieren sollte in zukünftigen Studien dringend weiter untersucht werden.

5 Schlussfolgerung

Die vorliegende Studie stellt die erste Studie in deutschen Schweinebeständen dar, die sich dem Vorkommen von ESBL/AmpC-bildenden *E. coli* bei Schweinen zu verschiedenen Zeitpunkten im Verlauf der Mastperiode widmet. Des Weiteren liefert diese Studie die ersten Ergebnisse zu Konzentrationen und zur Prävalenzdynamik von ESBL/AmpC-bildenden *E. coli* in der deutschen Schweineproduktion. Eine Abnahme der Konzentration von ESBL/AmpC-bildenden *E. coli* wurde in den Einzeltierkotproben der Schweine im Verlauf der Mastperiode nachgewiesen. Neben den Einzeltierkotproben wurden ESBL/AmpC-bildende *E. coli* auch regelmäßig in den Proben der Tierumgebung gefunden. Dabei scheinen Sammelkot- und Sockentupferproben im Gegensatz zu Staubproben geeignet zu sein, um den ESBL/AmpC-Status von Schweinebetrieben zu bestimmen.

Darüber hinaus ist dies die erste systematische Studie über den Transfer von ESBL/AmpC-bildenden Bakterien zwischen Schweinemastbetrieben und deren Umgebung. Zum ersten Mal wurden ESBL/AmpC-bildende *E. coli* im Gärrest von Biogasanlagen, im Mäusekot und bei Fliegen von Nutztierställen in Deutschland nachgewiesen. ESBL/AmpC-bildende *E. coli* wurden auf verschiedenen Bodenoberflächen in der Umgebung der Schweineställe detektiert und PFGE-Analysen bewiesen den Austrag dieser resistenten Keime aus den Schweineställen in die Umgebung über kontaminierte Gülle. Zudem bestätigten PFGE-Untersuchungen eine mögliche Übertragung über kontaminierte Fliegen. Eine Verbreitung über die Luft oder weitere Vektoren wie Mäuse scheint ebenfalls möglich zu sein. Die Hauptaustragsquelle für ESBL/AmpC-bildende *E. coli* in den untersuchten Schweinebetrieben stellte jedoch kontaminierte Gülle dar.

Der regelmäßige Nachweis der antibiotikaresistenten Bakterien bei den in dieser Studie untersuchten Schweinen könnte die therapeutischen Optionen bei den betroffenen Schweinen im Krankheitsfall stark einschränken. Außerdem könnte das Vorkommen von ESBL/AmpC-bildenden *E. coli* bei gesunden, Lebensmittel liefernden Tieren, wie den Schweinen dieser Studie, eine potenzielle Gefahr für den Verbraucher darstellen. Über die Lebensmittelkette (kontaminiertes Fleisch) könnten diese resistenten Bakterien von Menschen aufgenommen

werden. Frye et al. (116) vermuten, dass antimikrobielle Resistenzgene zwischen verschiedenen Bakterien durch horizontalen Austausch übertragen werden können. Die Übertragung von antimikrobiellen Resistenzgenen, wie zum Beispiel ESBL/AmpC-Genen, auf pathogene Keime, stellt möglicherweise eine weitere Gefahr dar.

Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Studie stellt sich außerdem die Frage, ob die Anwendung von Gülle als Düngemittel ein unterschätztes Risiko für die Verbreitung dieser resistenten Bakterien aus den Tierställen in die Umgebung und in die Lebensmittelkette darstellt. Eine mögliche Übertragung von ESBL/AmpC-Genen von *E. coli*-Bakterien der Gülle auf Bakterien in natürlichen Lebensräumen, wie der Oberfläche von Feldern/Wiesen der Umgebung der Schweineställe, sollte berücksichtigt werden. Durch Wind und Regen, Fahrzeuge sowie durch Wildtiere könnten ESBL/AmpC-bildende Bakterien weiter in der Umwelt verbreitet werden. Außerdem könnten Anwohner und deren Haustiere aus der Umgebung der Schweinebetriebe mit den kontaminierten Oberflächen, aber auch mit kontaminierter Luft oder Fliegen in Kontakt kommen. Anhand der vorliegenden Studie kann das genaue Risiko einer Kolonisation für Menschen und Tiere und die potenzielle Rolle von Emissionen aus den Tierställen für die Kontamination benachbarter Betriebe jedoch nicht abgeschätzt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden bedeutende Ergebnisse generiert. Einige davon führen zu **weiteren Fragestellungen**, welche in zukünftigen Studien berücksichtigt und genauer untersucht werden sollten. Diese sollen an dieser Stelle noch einmal zusammengefasst werden:

- 1) In dieser Studie wurden bereits zum ersten Untersuchungszeitpunkt, kurz nach Einstellung in die Endmast, ESBL/AmpC-bildende *E. coli* bei den Schweinen nachgewiesen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Schweine schon vor der Endmast ESBL/AmpC-positiv waren. In zukünftigen Studien sollte daher analysiert werden, wo, wann und wie die Tiere mit ESBL/AmpC kolonisiert werden und ob sie anschließend kolonisiert bleiben. Dazu wäre es zielführend, dieselben Schweine von der Geburt bis hin zur Schlachtung zu untersuchen.

- 2) Die Art und der Umfang des Antibiotikagebrauchs scheint ein wichtiger Einflussfaktor bei dem Vorkommen von ESBL/AmpC-bildenden *E. coli* in der Nutztierhaltung zu sein. Die genauen Auswirkungen des Antibiotikagebrauchs auf das Vorkommen ESBL/AmpC-bildender *E. coli* und die Bedeutung von Co-Selektion sollten in zukünftigen Studien untersucht werden.
- 3) Die Reinigung und Desinfektion wurde in dieser Studie als weiterer wichtiger Einflussfaktor auf das Vorkommen von ESBL/AmpC-bildenden Bakterien diskutiert. Die Rolle der Reinigung und Desinfektion sollte in weiteren Studien genauer untersucht werden.
- 4) Die Anzahl der Tiere im Stall wurde als weiterer Einflussfaktor diskutiert, der in zukünftigen Studien genauer betrachtet werden sollte.
- 5) Es gibt bisher nur wenige vergleichende Studien zu ESBL/AmpC-bildenden *E. coli* von Lebensmittel liefernden Tieren, Fleischprodukten und Menschen. Diesbezüglich sollten weitere Studien durchgeführt werden, um das genaue Risiko einer Übertragung dieser resistenten Bakterien über die Lebensmittelkette und durch direkten Kontakt zu Tieren zu analysieren.
- 6) In beiden Biogasanlagen dieser Studie wurden mesophile Bedingungen angewendet. In zukünftigen Studien wäre es interessant, neben mesophilen auch thermophile Biogasanlagen in die Untersuchungen miteinzubeziehen, um den Einfluss der verschiedenen Bedingungen auf das Vorkommen ESBL/AmpC-bildender *E. coli* besser beurteilen zu können.
- 7) In dieser Studie wurde dargestellt, dass neben einem Austrag von ESBL/AmpC-*E. coli* aus den Tierställen auch ein Eintrag dieser Bakterien über die Luft, Personenverkehr, Vektoren wie Fliegen, Nager usw. stattfinden könnte. Dieser Aspekt sollte in zukünftigen Studien genauer betrachtet werden.

- 8) In der vorliegenden Studie wurde bewiesen, dass ein Austrag von ESBL/AmpC-bildenden *E. coli* aus Schweineställen in die Umgebung über Gülle stattfinden kann. Über die Tenazität von ESBL/AmpC-*E. coli* in der Umgebung gibt es bisher jedoch leider noch keine genauen Daten. Darüber hinaus bleibt offen, ob der Einsatz von mit Gülle gedüngtem Stroh in der Schweinehaltung eine Gefahr für die Einschleppung dieser resistenten Bakterien in die Tierhaltung darstellen könnte.

Als **Interventionsmaßnahmen** zur Reduzierung des Vorkommens von ESBL/AmpC-bildenden *E. coli* in der Schweinehaltung und zur Minimierung des Austrags sowie der Übertragung zwischen den Schweineställen und der Umgebung, sollen an dieser Stelle die folgenden Vorschläge gemacht werden:

- 1) Den Eintrag dieser resistenten Bakterien in den Bestand verhindern und dadurch „ESBL/AmpC-freie Bestände“ aufbauen. Dies könnte zum Beispiel dadurch erreicht werden, indem Tiere vor dem Zukauf auf diese resistenten Keime getestet werden und somit keine positiven Tiere neu eingestallt werden. Drei von sieben Schweinebetrieben dieser Studie berichteten, dass sie ihre Schweine von anderen Betrieben kaufen. Die anderen vier untersuchten Betriebe führen ein geschlossenes System mit Zucht und Mast auf einem Betrieb, was die potenzielle Gefahr der Einschleppung von anderen Betrieben ausschließt. Außerdem sollte die Anzahl an Personen, die Zugang zu den Schweineställen haben, so gering wie möglich gehalten werden. Die Personen, die die Ställe betreten, sollten gut ausgebildet sein und strenge Hygienemaßnahmen einhalten, um einen Eintrag, Austrag und/oder eine Verbreitung der resistenten Bakterien durch Personenverkehr zu verhindern. Darüber hinaus ist eine konsequente Reinigung und Desinfektion von Fahrzeugen nach Tiertransporten und an den Ein- und Ausgängen der Schweinebetriebe unerlässlich, um den Eintrag und die Verbreitung ESBL/AmpC-bildender *E. coli* zu verhindern.
- 2) Die Tierhaltung bzw. das Haltungs- und Hygienemanagement sollte optimiert werden: Haltungssysteme sollten tiergerecht (hohe Tierdichten sollten vermieden werden, da diese die Übertragung dieser resistenten Bakterien zwischen den Tieren erhöhen/beschleunigen könnten) und modern sein und es sollte von der Geburt an bis

zum Ende der Mast eine gute und konsequente Haltungshygiene (u. a. Reinigung und Desinfektion) stattfinden. Auch auf Schlachthöfen und während der Schlachtung sollten strenge Hygienemaßnahmen eingehalten werden, um die Gefahr einer Kontamination von Schlachtkörpern und Fleisch mit diesen resistenten Bakterien zu minimieren.

3) Der Antibiotikaeinsatz bei Nutztieren sollte stark reduziert werden. Liebana et al. (161) schlagen als Hauptmaßnahmen, um die Selektion und Verbreitung von ESBL/AmpC-bildenden Bakterien in Lebensmittel liefernden Tieren zu kontrollieren, unter anderem vor:

a) Die Anwendung von Cephalosporinen bei Lebensmittel liefernden Tieren zu stoppen oder zu reduzieren.

b) Die Einhaltung der existierenden Rechtsvorschriften zum Antibiotikagebrauch bei Nutztieren zu erhöhen.

c) Den gesamten antimikrobiellen Gebrauch in der Tierproduktion in der Europäischen Union zu verringern (161).

Das 16. Gesetz zur Änderung des Arzneimittelgesetzes (16. AMG-Novelle), das im April 2014 in Kraft getreten ist, hat zum Ziel, den Antibiotikagebrauch in der Nutztierhaltung deutlich zu reduzieren. Dies ist ein wichtiger Schritt in die richtige Richtung.

4) Neben der Lagerung und Belüftung von Schweinegülle, die die Konzentration an Enterobakterien reduziert (129), wäre eine thermophile Behandlung in einer Biogasanlage oder eine Fäkalienhygienisierung zur Unterbindung bzw. Reduzierung des Austrags ESBL/AmpC-bildender *E. coli* über die Gülle sinnvoll.

5) Als Maßnahmen, um die Anzahl an luftgetragenen Mikroorganismen in Tierställen zu verringern, nannten Seedorf et al. (162) unter anderem häufige Desinfektion und künstliche UV-Strahlung. Um Staubentstehung zu reduzieren (was wiederum auch die mikrobielle Kontamination verringert), schlugen sie das Zufügen von Fett zum Futter oder das Besprühen mit Pflanzenöl vor. Wie bereits beschrieben, soll außerdem eine warme, trockene Atmosphäre (ca. 30 °C und < 50% relative Luftfeuchtigkeit) das

schnelle Absterben von luftgetragenen *E. coli* begünstigen (152). Die von Wathes et al. (152) ermittelten Werte für Temperatur und Luftfeuchte entsprechen jedoch nicht den klimatischen Anforderungen von Schweinen. Als Maßnahme zur Reduzierung des Austrags dieser resistenten Keime über die Luft könnte die Verwendung von Biofiltern oder biologischen Abluftwäschern geeignet sein. Sie wurden ursprünglich entwickelt, um den Austrag von Ammoniak zu verringern, jedoch können sie auch den Austrag von Bioaerosolen reduzieren (162). Seedorf und Hartung (163) zeigten für zwei Schweineställe, dass Biofilter die Partikelanzahl der Abluft um 79% bis 96% und die Anzahl an mesophilen Bakterien um 11% und 71% reduzieren. Schulz et al. (164) demonstrierten, dass die Kombination von Luftwäscher und UV-Strahlung eine wirkungsvolle Maßnahme zur Entkeimung der Stallluft sein kann. Bei gleichzeitigem Betrieb von Luftwäscher und UV-Strahlung wurden Konzentrationsabnahmen der luftgetragenen Bakterien von 90-99% beobachtet (164).

- 6) Da Insekten und Nager eine Rolle beim Ein- und Austrag ESBL/AmpC-bildender *E. coli* spielen können, ist eine gute Insekten- und Nagerbekämpfung in den Nutztierbeständen auch für die Bekämpfung antibiotikaresistenter Erreger von zentraler Bedeutung.

Bei ihrer Entdeckung wurden Antibiotika als „Wundermittel“ bezeichnet. Im Jahr 2016 gibt es fast keine antimikrobiellen Substanzen mehr, gegen die noch keine Resistenzen nachgewiesen wurden. Dies schränkt die therapeutischen Möglichkeiten in der Human- und Tiermedizin dramatisch ein. In dieser Studie wurden ESBL/AmpC-bildenden *E. coli* regelmäßig bei gesunden, Lebensmittel liefernden Schweinen in Deutschland nachgewiesen und es wurde gezeigt, dass ein Austrag dieser resistenten Bakterien aus den Schweineställen in die Umgebung stattfindet. Sogar Resistenzen gegen die als Reserveantibiotika gedachten Carbapeneme wurden dabei nachgewiesen. Diese Resistenzentwicklung ist besorgniserregend und sollte dringend weiter untersucht werden. Darüber hinaus sollten Maßnahmen ergriffen werden, um das Vorkommen antibiotikaresistenter Bakterien bei Nutztieren sowie deren Austrag aus den Tierställen und die Verbreitung effektiv zu minimieren.

6 Zusammenfassung

Extended-Spektrum-Beta-Laktamase (ESBL)/AmpC Beta-Laktamase-bildende *Enterobacteriaceae*, insbesondere *Escherichia coli* (*E. coli*), schränken die Therapieoptionen in der heutigen Medizin dramatisch ein. Die Entwicklung und potenzielle Verbreitung dieser resistenten Mikroorganismen bei Nutztieren und der mögliche Austrag aus der Tierhaltung in die Umwelt werden kritisch diskutiert.

Allerdings gibt es nur wenig detaillierte Daten zum Vorkommen von ESBL/AmpC-produzierenden *E. coli* in deutschen Schweinehaltungen und deren Umgebung, insbesondere zu potenziellen Verbreitungswegen und Nachweisraten im Mastverlauf.

Daher waren Hauptziele dieser Langzeitstudie zum einen die Untersuchung potenzieller Emissionsquellen und der Prävalenzdynamik sowie auch die quantitative Analyse ESBL/AmpC-bildender *Escherichia coli* in sieben deutschen konventionellen Schweinemastbetrieben im Mastverlauf. Zum anderen wurde parallel die Umgebung der Betriebe auf diese resistenten Bakterien hin untersucht, um fäkale, aerogene und andere potenzielle Ausbreitungswege von ESBL/AmpC-produzierenden *E. coli* zu analysieren.

Die Probenahmen erfolgten dabei zu drei verschiedenen Zeitpunkten innerhalb einer Endmastperiode und umfassten 20 Einzeltierkotproben sowie verschiedene Proben der Tierumgebung im Stall wie Sammelkot, Sockentupfer, Staub, Umgebungstupfer, Stallluft, Fliegen und Mäusekot. Proben von der Umgebung der Schweineställe wurden zeitgleich genommen und beinhalteten Bodenoberflächen und Außenluft von der windzugewandten und der windabgewandten Seite des Stalls sowie Gülle und Gärrest von Biogasanlagen. Für jede Probe wurde eine verdächtige *E. coli*-Kolonie zufällig ausgewählt, mittels MALDI-TOF-Untersuchung bestätigt und anhand der Agardiffusionsmethode auf antimikrobielle Empfindlichkeit getestet. Zusätzlich wurden PCR und Sequenzierungen der Resistenzgene durchgeführt, um das Vorhandensein und den Typ von ESBL/AmpC Beta-Laktamase-Genen in diesen Isolaten zu ermitteln. Darüber hinaus wurden ausgewählte *E. coli*-Isolate von Proben von innerhalb und außerhalb der Schweineställe mittels Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)-Analyse typisiert, um eine klonale Verwandtschaft der Isolate herauszufinden.

Unterschiedliche Nachweishäufigkeiten von ESBL/AmpC-bildenden *E. coli* wurden zu verschiedenen Untersuchungszeitpunkten im Mastverlauf nachgewiesen. In den Einzeltierkotproben lagen die durchschnittlichen Nachweishäufigkeiten von ESBL/AmpC-*E. coli* zu den drei Probenahmezeitpunkten bei 45% (63/140), 29% (41/140) und 36% (51/140), wobei eine signifikante Abnahme der Konzentration von $2,97 \times 10^4$ KbE/g zum ersten Zeitpunkt zu $2,17 \times 10^3$ KbE/g zum dritten Zeitpunkt zu verzeichnen war ($p = 0.000$). Zudem unterschieden sich die Nachweishäufigkeiten von ESBL/AmpC-bildenden *E. coli* in den Einzeltierkotproben zwischen den verschiedenen Schweinebetrieben: Es gab zwei Betriebe mit einer kontinuierlich hohen Prävalenz, drei Betriebe mit einer niedrigen Prävalenz und zwei Betriebe mit Prävalenzen dazwischen. In der Tierumgebung im Stall wurden bei Sammelkot- und Sockentupferproben jeweils 47,6% (10/21) der Proben positiv getestet. 5,9% (4/68) der Umgebungstupferproben, 9,5% (6/63) der Stallluftproben sowie 25% (3/12) der Fliegen- und 33% (1/3) der Mäusekotproben, jedoch keine der Staubproben war ESBL/AmpC-positiv. In der Umgebung der Schweineställe wurden ESBL/AmpC-bildende *E. coli* in 16,1% (14/87) der untersuchten Sockentupferproben von verschiedenen Bodenoberflächen nachgewiesen. Des Weiteren wurden in 6% (2/36) der Außenluftproben diese resistenten Keime gefunden. Die Mehrzahl der Gülleproben (82,4%; 14/17) und drei von vier Gärrestproben von Biogasanlagen waren ebenfalls positiv. Insgesamt 274 *E. coli*-Isolate wurden durch phänotypische und genotypische Methoden weiter analysiert. Davon waren bei der antimikrobiellen Empfindlichkeitstestung 32 *E. coli*-Isolate AmpC- und 224 Isolate ESBL-positiv. Mittels PCR-Analysen und nachfolgender Sequenzierung wurden in 215 von 274 *E. coli*-Isolaten ESBL- oder AmpC Beta-Laktamase-Gene detektiert. Dabei war *bla*_{CTX-M} die dominante ESBL-Genfamilie mit 97,2% (209/215) *bla*_{CTX-M}-positiven Isolaten. Darüber hinaus wurde während dieser Studie ein neues Gen *bla*_{TEM-206}, welches für eine Beta-Laktamase kodiert, gefunden. PFGE-Analysen bewiesen einen fäkalen Austrag von resistenten *E. coli* sowie eine mögliche Verbreitung über Fliegen.

Die vorliegende Studie liefert neue Informationen zum Vorkommen und der Prävalenzdynamik von ESBL/AmpC-bildenden *E. coli* in der deutschen Schweineproduktion. Darüber hinaus ist dies die erste systematische Studie über eine potenzielle Emission und Übertragung von ESBL/AmpC-produzierenden Bakterien zwischen Schweinemastbetrieben und ihrer Umgebung. Kontaminierte Gülle stellte die Hauptemissionsquelle für ESBL/AmpC-bildende *E. coli* in den Schweinemastbetrieben dar. Eine Verbreitung über die Luft oder über

verschiedene Vektoren scheint ebenfalls möglich, jedoch eine geringere Rolle zu spielen. Eine mögliche Gefahr der Besiedlung von exponierten Tieren oder Menschen kann im Augenblick nicht abgeschätzt werden und muss weiter untersucht werden.

7 Summary

Long-term investigations of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)/AmpC beta-lactamases-producing *Escherichia coli* in pig fattening farms and their surrounding areas

Extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)/AmpC beta-lactamases-producing *Enterobacteriaceae*, especially *Escherichia coli* (*E. coli*), are dramatically limiting the therapeutic options in today's medicine. The development and potential spread of these resistant microorganisms amongst farm animals and the potential emission from livestock to the environment are discussed critically.

However, there is only little information available on the occurrence of ESBL/AmpC-producing *E. coli* in German pig farms and their vicinity, especially with regard to their detection over the course of a fattening period and potential paths of transmission.

Therefore, the main objectives of this long-term study were to determine the potential sources of emission, the prevalence dynamics and the quantities of ESBL/AmpC-producing *E. coli* in seven German conventional pig fattening farms over the course of one fattening period, and to simultaneously investigate the surroundings of the pig farms for these resistant bacteria to determine faecal, airborne and other potential emission routes.

Samples tested were taken at three different times within one finishing fattening period and included 20 individual faeces samples as well as various samples from the animals' housing environment inside the barn such as pooled faeces, boot swabs, dust, environmental swabs, barn air, flies and mice faeces. Samples from the surroundings of the pig barns were taken simultaneously to the samples inside and included ground surfaces and ambient air on the up- and downwind side of the barn as well as slurry and digestate from biogas plants. One suspected *E. coli* colony was randomly selected for each sample, confirmed using the MALDI-TOF method and tested for antimicrobial susceptibility by the disk diffusion method. In addition, PCR and sequencing of resistance genes were performed to determine the presence and type of ESBL/AmpC beta-lactamases genes in these isolates. Moreover, selected *E. coli* isolates from samples from inside and outside the pig barns were typed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis to identify the clonal relationship of the isolates.

Different detection levels of ESBL/AmpC-producing *E. coli* were observed at different times of investigation during the fattening period. In individual faeces average detection levels of 45% (63/140), 29% (41/140) and 36% (51/140) at the three sampling times were accompanied by decreasing faecal counts from 2.97×10^4 cfu/g at the first to 2.17×10^3 cfu/g at the third visit ($p = 0.000$). Moreover, detection frequencies of ESBL/AmpC-producing *E. coli* in individual faeces samples differed amongst the different pig farms: There were two farms with a continuous high prevalence, three farms with a low prevalence and two farms with prevalences in between. In the animals' housing environment inside the barn pooled faeces and boot swab samples each showed a detection rate of 47.6% (10/21). 5.9% (4/68) of environmental swabs, 9.5% (6/63) of barn air samples, as well as 25% (3/12) of flies and 33% (1/3) of mice faeces samples, but none of the dust samples tested positive for ESBL/AmpC-producing *E. coli*. In the vicinity of the pig barns ESBL/AmpC-producing *E. coli* were detected in 16.1% (14/87) of the examined boot swab samples taken from various ground surfaces and in 6% (2/36) of ambient air samples. The majority of slurry samples (82.4%; 14/17) and three of four samples of digestate from biogas plants were also tested positive for these resistant bacteria. In total 274 *E. coli* isolates were further analysed by phenotypical and genotypical methods. Using antimicrobial susceptibility testing, 32 *E. coli* isolates were AmpC- and 224 *E. coli* isolates were ESBL-positive. By PCR analyses and subsequent sequencing, ESBL or AmpC beta-lactamases genes were detected in 215 of the 274 *E. coli* isolates. The dominant ESBL gene family detected was *bla*_{CTX-M} with 97.2% (209/215) *bla*_{CTX-M}-positive isolates. In addition, a new beta-lactamase encoding gene, *bla*_{TEM-206}, was found during this study. PFGE analyses proved faecal emission of resistant *E. coli* as well as a possible distribution via flies.

The present study provides novel information about amounts and dynamics of ESBL/AmpC-producing *E. coli* in the German pig production. Moreover, this is the first systematic study on a potential emission and transmission of ESBL/AmpC-producing bacteria between pig fattening farms and their surroundings. Contaminated slurry presented the major emission source for ESBL/AmpC-producing *E. coli* in the pig fattening farms. A spread via the airborne route or via different vectors also seems possible, but appears to play a minor role. A potential risk of colonisation for exposed animals or humans cannot be estimated at the moment and needs to be further investigated.

8 Literaturverzeichnis

1. **Ramos S, Silva N, Dias D, Sousa M, Capelo-Martinez JL, Brito F, Caniça M, Igrejas G, Poeta P.** 2013. Clonal diversity of ESBL-producing *Escherichia coli* in pigs at slaughter level in Portugal. *Foodborne Pathog Dis* **10**:74-79.
2. **Stürenburg E, Mack D.** 2003. Extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. *J Infect* **47**:273-295.
3. **Livermore DM.** 2008. Defining an extended-spectrum beta-lactamase. *Clin Microbiol Infect* **14 Suppl 1**:3-10.
4. **Bradford PA.** 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.
5. **Ambler RP.** 1980. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **289**:321-331.
6. **Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA.** 1995. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* **39**:1211-1233.
7. **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.
8. **EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ).** 2011. Scientific opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum β -lactamases and/or AmpC β -lactamases in food and food-producing animals. *EFSA J* **9**:2322.
9. **Datta N, Kontomichalou P.** 1965. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*. *Nature* **208**:239-241.
10. **Medeiros AA.** 1984. Beta-lactamases. *Br Med Bull* **40**:18-27.
11. **Jacoby GA, Medeiros AA.** 1991. More extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **35**:1697-1704.
12. **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.
13. **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*. *Infection* **11**:315-317.
14. **Seiffert SN, 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.

15. **Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, Ayala J, Coque TM, Kern-Zdanowicz I, Luzzaro F, Poirel L, Woodford N.** 2007. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother* **59**:165-174.
16. **Cantón R, Coque TM.** 2006. The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol* **9**:466-475.
17. **Bonnet R.** 2004. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:1-14.
18. **Xu L, Ensor V, Gossain S, Nye K, Hawkey P.** 2005. Rapid and simple detection of blaCTX-M genes by multiplex PCR assay. *J Med Microbiol* **54**:1183-1187.
19. **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.
20. **Bauernfeind A, Grimm H, Schweighart S.** 1990. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection* **18**:294-298.
21. **Barthélémy M, Péduzzi J, Bernard H, Tancrede C, Labia R.** 1992. Close amino acid sequence relationship between the new plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase MEN-1 and chromosomally encoded enzymes of *Klebsiella oxytoca*. *Biochim Biophys Acta* **1122**:15-22.
22. **Poirel L, Kämpfer 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.
23. **Decousser JW, Poirel L, Nordmann P.** 2001. Characterization of a chromosomally encoded extended-spectrum class A beta-lactamase from *Kluyvera cryocrescens*. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:3595-3598.
24. **Cao V, Lambert T, Courvalin P.** 2002. ColE1-like plasmid pIP843 of *Klebsiella pneumoniae* encoding extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-17. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:1212-1217.
25. **Pai H, Choi EH, Lee HJ, Hong JY, Jacoby GA.** 2001. Identification of CTX-M-14 extended-spectrum beta-lactamase in clinical isolates of *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, and *Klebsiella pneumoniae* in Korea. *J Clin Microbiol* **39**:3747-3749.
26. **Karim A, Poirel L, Nagarajan S, Nordmann P.** 2001. Plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-3 like) from India and gene association with insertion sequence *ISEcp1*. *FEMS Microbiol Lett* **201**:237-241.
27. **Sabaté M, Tarragó R, Navarro F, Miró E, Vergés C, Barbé J, Prats G.** 2000. Cloning and sequence of the gene encoding a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase (CTX-M-9) from *Escherichia coli* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:1970-1973.
28. **Paterson DL, Bonomo RA.** 2005. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* **18**:657-686.

29. **Sanders CC.** 1987. Chromosomal cephalosporinases responsible for multiple resistance to newer beta-lactam antibiotics. *Annu Rev Microbiol* **41**:573-593.
30. **Witte W, Mielke M.** 2003. β -Laktamasen mit breitem Wirkungsspektrum - Grundlagen, Epidemiologie, Schlussfolgerungen für die Prävention. *Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz* **46**:881-890.
31. **Bauernfeind A, Chong Y, Schweighart S.** 1989. Extended broad spectrum beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins. *Infection* **17**:316-321.
32. **Philippon A, Arlet G, Jacoby GA.** 2002. Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:1-11.
33. **Wu SW, Dornbusch K, Kronvall G, Norgren M.** 1999. Characterization and nucleotide sequence of a *Klebsiella oxytoca* cryptic plasmid encoding a CMY-type beta-lactamase: confirmation that the plasmid-mediated cephamycinase originated from the *Citrobacter freundii* AmpC beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* **43**:1350-1357.
34. **Lautenbach E, Patel JB, Bilker WB, Edelstein PH, Fishman NO.** 2001. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. *Clin Infect Dis* **32**:1162-1171.
35. **Asensio A, Oliver A, González-Diego P, Baquero F, Pérez-Díaz JC, Ros P, Cobo J, Palacios M, Lasheras D, Cantón R.** 2000. Outbreak of a multiresistant *Klebsiella pneumoniae* strain in an intensive care unit: antibiotic use as risk factor for colonization and infection. *Clin Infect Dis* **30**:55-60.
36. **Peña C, Pujol M, Ricart A, Ardanuy C, Ayats J, Liñares J, Garrigosa F, Ariza J, Gudiol F.** 1997. Risk factors for faecal carriage of *Klebsiella pneumoniae* producing extended spectrum beta-lactamase (ESBL-KP) in the intensive care unit. *J Hosp Infect* **35**:9-16.
37. **Du B, Long Y, Liu H, Chen D, Liu D, Xu Y, Xie X.** 2002. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection: risk factors and clinical outcome. *Intensive Care Med* **28**:1718-1723.
38. **Eveillard M, Schmit JL, Eb F.** 2002. Antimicrobial use prior to the acquisition of multiresistant bacteria. *Infect Control Hosp Epidemiol* **23**:155-158.
39. **Brigante G, Luzzaro F, Perilli M, Lombardi G, Coli A, Rossolini GM, Amicosante G, Toniolo A.** 2005. Evolution of CTX-M-type beta-lactamases in isolates of *Escherichia coli* infecting hospital and community patients. *Int J Antimicrob Agents* **25**:157-162.
40. **Colodner R, Rock W, Chazan B, Keller N, Guy N, Sakran W, Raz R.** 2004. Risk factors for the development of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in nonhospitalized patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **23**:163-167.
41. **Mirelis B, Navarro F, Miró E, Mesa RJ, Coll P, Prats G.** 2003. Community transmission of extended-spectrum beta-lactamase. *Emerg Infect Dis* **9**:1024-1025.

42. **Munday CJ, Whitehead GM, Todd NJ, Campbell M, Hawkey PM.** 2004. Predominance and genetic diversity of community- and hospital-acquired CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in York, UK. *J Antimicrob Chemother* **54**:628-633.
43. **Fey PD, Safranek TJ, Rupp ME, Dunne EF, Ribot E, Iwen PC, Bradford PA, Angulo FJ, Hinrichs SH.** 2000. Ceftriaxone-resistant salmonella infection acquired by a child from cattle. *N Engl J Med* **342**:1242-1249.
44. **Winokur PL, Brueggemann A, DeSalvo DL, Hoffmann L, Apley MD, Uhlenhopp EK, Pfaller MA, Doern GV.** 2000. Animal and human multidrug-resistant, cephalosporin-resistant *Salmonella* isolates expressing a plasmid-mediated CMY-2 AmpC beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:2777-2783.
45. **Costa D, Vinué L, Poeta P, Coelho AC, Matos M, Sáenz 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.
46. **Horton RA, Randall LP, Snary EL, Cockrem H, Lotz S, Wearing H, Duncan D, Rabie A, McLaren I, Watson E, La Ragione RM, Coldham NG.** 2011. Fecal carriage and shedding density of CTX-M extended-spectrum {beta}-lactamase-producing *Escherichia coli* in cattle, chickens, and pigs: implications for environmental contamination and food production. *Appl Environ Microbiol* **77**:3715-3719.
47. **Briñas L, Moreno MA, Zarazaga M, Porrero C, Sáenz Y, García 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.
48. **Ho PL, Chow KH, Lai EL, Lo WU, Yeung MK, Chan J, Chan PY, Yuen KY.** 2011. Extensive dissemination of CTX-M-producing *Escherichia coli* with multidrug resistance to 'critically important' antibiotics among food animals in Hong Kong, 2008-10. *J Antimicrob Chemother* **66**:765-768.
49. **Girlich D, Poirel L, Carattoli A, Kempf I, Lartigue MF, 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.
50. **Blanc V, Mesa R, Saco M, Lavilla S, Prats G, Miró E, Navarro F, Cortés 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.
51. **Dierikx C, van der Goot J, Fabri T, van Essen-Zandbergen A, Smith H, Mevius D.** 2013. Extended-spectrum-beta-lactamase- and AmpC-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Dutch broilers and broiler farmers. *J Antimicrob Chemother* **68**:60-67.

52. **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.
53. **Mesa RJ, Blanc V, Blanch AR, Cortés P, González JJ, Lavilla S, Miró E, Muniesa M, Saco M, Tórtola MT, 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.
54. **Bortolaia V, Guardabassi L, Trevisani M, Bisgaard M, Venturi L, Bojesen AM.** 2010. High diversity of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* isolates from Italian broiler flocks. *Antimicrob Agents Chemother* **54**:1623-1626.
55. **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.
56. **Asai T, Masani K, Sato C, Hiki M, Usui M, Baba K, Ozawa M, Harada K, Aoki H, Sawada T.** 2011. Phylogenetic groups and cephalosporin resistance genes of *Escherichia coli* from diseased food-producing animals in Japan. *Acta Vet Scand* **53**:52.
57. **Geser N, Stephan R, Hächler H.** 2012. Occurrence and characteristics of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Enterobacteriaceae* in food producing animals, minced meat and raw milk. *BMC Vet Res* **8**:21.
58. **Zheng H, Zeng Z, Chen S, Liu Y, Yao Q, Deng Y, Chen X, Lv L, Zhuo C, Chen Z, Liu JH.** 2012. Prevalence and characterisation of CTX-M beta-lactamases amongst *Escherichia coli* isolates from healthy food animals in China. *Int J Antimicrob Agents* **39**:305-310.
59. **Ma J, Liu JH, Lv L, Zong Z, Sun Y, Zheng H, Chen Z, Zeng ZL.** 2012. Characterization of extended-spectrum beta-lactamase genes found among *Escherichia coli* isolates from duck and environmental samples obtained on a duck farm. *Appl Environ Microbiol* **78**:3668-3673.
60. **Geser N, Stephan R, Kuhnert P, Zbinden R, Kaeppli U, Cernela N, Haechler H.** 2011. Fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in swine and cattle at slaughter in Switzerland. *J Food Prot* **74**:446-449.
61. **Machado E, Coque TM, Cantón 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.
62. **Liebana E, Batchelor M, Hopkins KL, Clifton-Hadley FA, Teale CJ, Foster A, Barker L, Threlfall EJ, Davies RH.** 2006. Longitudinal farm study of extended-spectrum beta-lactamase-mediated resistance. *J Clin Microbiol* **44**:1630-1634.

63. **Snow LC, Warner RG, Cheney T, Wearing H, Stokes M, Harris K, Teale CJ, Coldham NG.** 2012. Risk factors associated with extended spectrum beta-lactamase *Escherichia coli* (CTX-M) on dairy farms in North West England and North Wales. *Prev Vet Med* **106**:225-234.
64. **Meunier D, Jouy E, Lazizzera C, Kobisch M, Madec JY.** 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.
65. **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.
66. **Johns I, Verheyen K, Good L, Rycroft A.** 2012. Antimicrobial resistance in faecal *Escherichia coli* isolates from horses treated with antimicrobials: a longitudinal study in hospitalised and non-hospitalised horses. *Vet Microbiol* **159**:381-389.
67. **Maddox TW, Clegg PD, Diggle PJ, Wedley AL, Dawson S, Pinchbeck GL, Williams NJ.** 2012. Cross-sectional study of antimicrobial-resistant bacteria in horses. Part 1: Prevalence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Equine Vet J* **44**:289-296.
68. **Tamang MD, Nam HM, Jang GC, Kim SR, Chae MH, Jung SC, Byun JW, Park YH, Lim SK.** 2012. Molecular characterization of extended-spectrum-beta-lactamase-producing and plasmid-mediated AmpC beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from stray dogs in South Korea. *Antimicrob Agents Chemother* **56**:2705-2712.
69. **Shaheen BW, Nayak R, Foley SL, Kweon O, Deck J, Park M, Rafii F, Boothe DM.** 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.
70. **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.
71. **Guenther S, Grobbel M, Beutlich J, Guerra B, Ulrich RG, Wieler LH, Ewers C.** 2010. Detection of pandemic B2-O25-ST131 *Escherichia coli* harbouring the CTX-M-9 extended-spectrum beta-lactamase type in a feral urban brown rat (*Rattus norvegicus*). *J Antimicrob Chemother* **65**:582-584.
72. **Guenther S, Bethe A, Fruth A, Semmler T, Ulrich RG, Wieler LH, Ewers C.** 2012. Frequent combination of antimicrobial multiresistance and extraintestinal pathogenicity in *Escherichia coli* isolates from urban rats (*Rattus norvegicus*) in Berlin, Germany. *PLoS One* **7**:e50331.

73. **Literak I, Dolejska M, Cizek A, Djigo CAT, Konecny A, Koubek P.** 2009. Reservoirs of antibiotic-resistant *Enterobacteriaceae* among animals sympatric to humans in Senegal: extended-spectrum beta-lactamases in bacteria in a black rat (*Rattus rattus*). *Afr J Microbiol Res* **3**:751-754.
74. **Stephan R, Hächler H.** 2012. Discovery of extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* among hunted deer, chamois and ibex. *Schweiz Arch Tierheilkd* **154**:475-478.
75. **Literak I, Dolejska M, Radimersky T, Klimes J, Friedman M, Aarestrup FM, Hasman H, Cizek A.** 2010. 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.
76. **Poeta P, Radhouani H, Pinto L, Martinho A, Rego V, Rodrigues R, Gonçalves 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.
77. **Radhouani H, Igrejas G, Gonçalves A, Estepa V, Sargo R, Torres C, Poeta P.** 2013. Molecular characterization of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from red foxes in Portugal. *Arch Microbiol* **195**:141-144.
78. **Literak I, Dolejska M, Janoszowska D, Hrusakova J, Meissner W, Rzyaska H, Bzoma S, Cizek A.** 2010. 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.
79. **Silva N, Igrejas G, Rodrigues P, Rodrigues T, Gonçalves A, Felgar AC, Pacheco R, Gonçalves D, Cunha R, Poeta P.** 2011. Molecular characterization of vancomycin-resistant enterococci and extended-spectrum beta-lactamase-containing *Escherichia coli* isolates in wild birds from the Azores Archipelago. *Avian Pathol* **40**:473-479.
80. **Guenther S, Aschenbrenner K, Stamm I, Bethe A, Semmler T, Stubbe A, Stubbe M, Batsajkhan N, Glupczynski Y, Wieler LH, Ewers C.** 2012. Comparable high rates of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in birds of prey from Germany and Mongolia. *PLoS One* **7**:e53039.
81. **Lutz EA, McCarty MJ, Mollenkopf DF, Funk JA, Gebreyes WA, Wittum TE.** 2011. Ceftiofur use in finishing swine barns and the recovery of fecal *Escherichia coli* or *Salmonella* spp. resistant to ceftriaxone. *Foodborne Pathog Dis* **8**:1229-1234.
82. **Tamang MD, Nam HM, Kim SR, Chae MH, Jang GC, Jung SC, Lim SK.** 2013. Prevalence and molecular characterization of CTX-M beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from healthy swine and cattle. *Foodborne Pathog Dis* **10**:13-20.

83. **Tian GB, Wang HN, Zou LK, Tang JN, Zhao YW, Ye MY, Tang JY, Zhang Y, Zhang AY, Yang X, Xu CW, Fu YJ.** 2009. Detection of CTX-M-15, CTX-M-22, and SHV-2 extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in *Escherichia coli* fecal-sample isolates from pig farms in China. *Foodborne Pathog Dis* **6**:297-304.
84. **Tian GB, Wang HN, Zhang AY, Zhang Y, Fan WQ, Xu CW, Zeng B, Guan ZB, Zou LK.** 2012. Detection of clinically important beta-lactamases in commensal *Escherichia coli* of human and swine origin in western China. *J Med Microbiol* **61**:233-238.
85. **Escudero E, Vinué L, Teshager T, Torres C, Moreno MA.** 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.
86. **Gonçalves A, Torres C, Silva N, Carneiro C, Radhouani H, Coelho C, Araújo C, Rodrigues J, Vinué L, Somalo S, Poeta P, Igrejas G.** 2010. Genetic characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* isolates of pigs from a Portuguese intensive swine farm. *Foodborne Pathog Dis* **7**:1569-1573.
87. **Bardoň J, Husičková V, Chromá M, Kolář M.** 2012. [Detection of ESBL-positive strains of *Escherichia coli* in pigs in the Czech Republic]. *Klin Mikrobiol Infekc Lek* **18**:65-67.
88. **Hansen KH, Damborg P, Andreasen M, Nielsen SS, Guardabassi L.** 2013. Carriage and fecal counts of cefotaxime M-producing *Escherichia coli* in pigs: a longitudinal study. *Appl Environ Microbiol* **79**:794-798.
89. **Ojer-Usoz E, González D, Vitas AI, Leiva J, García-Jalón I, Febles-Casquero A, Escolano Mde L.** 2013. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in meat products sold in Navarra, Spain. *Meat Sci* **93**:316-321.
90. **Doi Y, Paterson DL, Egea P, Pascual A, López-Cerero L, Navarro MD, Adams-Haduch JM, Qureshi ZA, Sidjabat HE, Rodríguez-Baño J.** 2010. Extended-spectrum and CMY-type beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in clinical samples and retail meat from Pittsburgh, USA and Seville, Spain. *Clin Microbiol Infect* **16**:33-38.
91. **Friese A, Schulz J, Laube H, von Salviati C, Hartung J, Roesler U.** 2013. 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* **126**:175-180.
92. **Friese A, Schulz J, Zimmermann K, Tenhagen BA, Fetsch A, Hartung J, Rösler U.** 2013. 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.
93. **Schulz J, Friese A, Klees S, Tenhagen BA, Fetsch A, Rösler U, Hartung J.** 2012. Longitudinal study of the contamination of air and of soil surfaces in the vicinity of pig barns by livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol* **78**:5666-5671.

94. **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 *bla*_{CTX-M-1} and *qnr* genes in *Escherichia coli* isolates from an equine clinic and a horseback riding centre. *J Antimicrob Chemother* **66**:757-764.
95. **Usui M, Iwasa T, Fukuda A, Sato T, Okubo T, Tamura Y.** 2013. The role of flies in spreading the extended-spectrum beta-lactamase gene from cattle. *Microb Drug Resist* **19**:415-420.
96. **Kozak GK, Boerlin P, Janecko N, Reid-Smith RJ, Jardine C.** 2009. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from swine and wild small mammals in the proximity of swine farms and in natural environments in Ontario, Canada. *Appl Environ Microbiol* **75**:559-566.
97. **Laube H, Friese A, von Salviati C, Guerra B, Käsbohrer 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.
98. **Agersø Y, Aarestrup FM, Pedersen K, Seyfarth AM, Struve T, Hasman H.** 2012. Prevalence of extended-spectrum cephalosporinase (ESC)-producing *Escherichia coli* in Danish slaughter pigs and retail meat identified by selective enrichment and association with cephalosporin usage. *J Antimicrob Chemother* **67**:582-588.
99. **Katouli M, Lund A, Wallgren P, Kühn I, Söderlind O, Möllby R.** 1995. Phenotypic characterization of intestinal *Escherichia coli* of pigs during suckling, postweaning, and fattening periods. *Appl Environ Microbiol* **61**:778-783.
100. **Hiroi M, Yamazaki F, Harada T, Takahashi N, Iida N, Noda Y, Yagi M, Nishio T, Kanda T, Kawamori F, Sugiyama K, Masuda T, Hara-Kudo Y, Ohashi N.** 2012. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in food-producing animals. *J Vet Med Sci* **74**:189-195.
101. **Wu S, Dalsgaard A, Vieira AR, Emborg HD, Jensen LB.** 2009. Prevalence of tetracycline resistance and genotypic analysis of populations of *Escherichia coli* from animals, carcasses and cuts processed at a pig slaughterhouse. *Int J Food Microbiol* **135**:254-259.
102. **Omisakin F, MacRae M, Ogden ID, Strachan NJ.** 2003. Concentration and prevalence of *Escherichia coli* O157 in cattle feces at slaughter. *Appl Environ Microbiol* **69**:2444-2447.
103. **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.
104. **Leistner R, Meyer E, Gastmeier P, Pfeifer Y, Eller C, Dem P, Schwab F.** 2013. Risk factors associated with the community-acquired colonization of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) positive *Escherichia Coli*. an exploratory case-control study. *PLoS One* **8**:e74323.

105. **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.
106. **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.
107. **Lavilla S, González-López JJ, Miró E, Domínguez A, Llagostera M, Bartolomé RM, Mirelis B, Navarro F, Prats G.** 2008. Dissemination of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria: the food-borne outbreak lesson. *J Antimicrob Chemother* **61**:1244-1251.
108. **Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL).** 2014. Dritte Datenerhebung zur Antibiotikaabgabe in der Tiermedizin. <http://www.bvl.bund.de>, Presseinformation vom 01.08.2014, korrigiert am 29.08.2014.
109. **Damborg P, Marskar P, Baptiste KE, Guardabassi L.** 2012. Faecal shedding of CTX-M-producing *Escherichia coli* in horses receiving broad-spectrum antimicrobial prophylaxis after hospital admission. *Vet Microbiol* **154**:298-304.
110. **Jørgensen CJ, Cavaco LM, Hasman H, Emborg HD, Guardabassi L.** 2007. Occurrence of CTX-M-1-producing *Escherichia coli* in pigs treated with ceftiofur. *J Antimicrob Chemother* **59**:1040-1042.
111. **Cavaco LM, Abatih E, Aarestrup FM, Guardabassi L.** 2008. Selection and persistence of CTX-M-producing *Escherichia coli* in the intestinal flora of pigs treated with amoxicillin, ceftiofur, or cefquinome. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:3612-3616.
112. **Funk JA, Lejeune JT, Wittum TE, Rajala-Schultz PJ.** 2006. The effect of subtherapeutic chlortetracycline on antimicrobial resistance in the fecal flora of swine. *Microb Drug Resist* **12**:210-218.
113. **Looft T, Johnson TA, Allen HK, Bayles DO, Alt DP, Stedtfeld RD, Sul WJ, Stedtfeld TM, Chai B, Cole JR, Hashsham SA, Tiedje JM, Stanton TB.** 2012. In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**:1691-1696.
114. **Wagner BA, Straw BE, Fedorka-Cray PJ, Dargatz DA.** 2008. Effect of antimicrobial dosage regimen on *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates from feeder swine. *Appl Environ Microbiol* **74**:1731-1739.
115. **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 broilers. *J Vet Med Sci* **74**:1635-1637.

116. **Frye JG, Lindsey RL, Meinersmann RJ, Berrang ME, Jackson CR, Englen MD, Turpin JB, Fedorka-Cray PJ.** 2011. Related antimicrobial resistance genes detected in different bacterial species co-isolated from swine fecal samples. *Foodborne Pathog Dis* **8**:663-679.
117. **Tamang MD, Nam HM, Gurung M, Jang GC, Kim SR, Jung SC, Park YH, Lim SK.** 2013. Molecular characterization of CTX-M beta-lactamase and associated addiction systems in *Escherichia coli* circulating among cattle, farm workers, and the farm environment. *Appl Environ Microbiol* **79**:3898-3905.
118. **Moodley A, Guardabassi L.** 2009. Transmission of IncN plasmids carrying *bla*_{CTX-M-1} between commensal *Escherichia coli* in pigs and farm workers. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:1709-1711.
119. **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.
120. **Zhang T, Wang H, Wu L, Lou J, Wu J, Brookes PC, Xu J.** 2013. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in soils from Jiangsu Province, China. *PLoS One* **8**:e81178.
121. **Wang Y, Shi J, Wang H, Lin Q, Chen X, Chen Y.** 2007. The influence of soil heavy metals pollution on soil microbial biomass, enzyme activity, and community composition near a copper smelter. *Ecotoxicol Environ Saf* **67**:75-81.
122. **Bolton DJ, Byrne CM, Sheridan JJ, McDowell DA, Blair IS.** 1999. The survival characteristics of a non-toxicogenic strain of *Escherichia coli* O157:H7. *J Appl Microbiol* **86**:407-411.
123. **Jiang X, Morgan J, Doyle MP.** 2002. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in manure-amended soil. *Appl Environ Microbiol* **68**:2605-2609.
124. **Looper ML, Edrington TS, Callaway TR, Rosenkrans CF, 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.
125. **Solomon EB, Yaron S, Matthews KR.** 2002. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. *Appl Environ Microbiol* **68**:397-400.
126. **Egea P, López-Cerero L, Navarro MD, Rodríguez-Baño J, Pascual A.** 2011. Assessment of the presence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in eggshells and ready-to-eat products. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **30**:1045-1047.
127. **Ghosh S, LaPara TM.** 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.
128. **Rahube TO, Yost CK.** 2012. Characterization of a mobile and multiple resistance plasmid isolated from swine manure and its detection in soil after manure application. *J Appl Microbiol* **112**:1123-1133.

129. **Avignon M, Lafont JP.** 1985. [Antibiotic-resistant coliforms in a purification station on a pig-breeding farm]. *Ann Rech Vet* **16**:245-253.
130. **Strauch D, Ballarini G.** 1994. Hygienic aspects of the production and agricultural use of animal wastes. *Zentralbl Veterinarmed B* **41**:176-228.
131. **Hordijk J, Schoormans A, Kwakernaak M, Duim B, Broens E, Dierikx C, Mevius D, Wagenaar JA.** 2013. High prevalence of fecal carriage of extended spectrum beta-lactamase/AmpC-producing *Enterobacteriaceae* in cats and dogs. *Front Microbiol* **4**:242.
132. **Costa D, Poeta P, Saenz Y, Vinue L, Rojo-Bezares B, Jouini A, Zarazaga M, Rodrigues J, Torres C.** 2006. Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum beta-lactamases of the CTX-M, TEM and SHV classes in faecal samples of wild animals in Portugal. *J Antimicrob Chemother* **58**:1311-1312.
133. **Guenther S, Ewers C, Wieler LH.** 2011. Extended-Spectrum Beta-Lactamases Producing *E. coli* in Wildlife, yet Another Form of Environmental Pollution? *Front Microbiol* **2**:246.
134. **Laube H, Friese A, von Salviati C, Guerra B, Rösler U.** 2014. Transmission of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from broiler chicken farms to surrounding areas. *Vet Microbiol* **172**:519-527.
135. **Yuan W, Chai TJ, Miao ZM.** 2010. ERIC-PCR identification of the spread of airborne *Escherichia coli* in pig houses. *Sci Total Environ* **408**:1446-1450.
136. **Duan H, Chai T, Liu J, Zhang X, Qi C, Gao J, Wang Y, Cai Y, Miao Z, Yao M, Schlenker G.** 2009. Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. *Environ Res* **109**:511-517.
137. **Schulz J, Formosa L, Seedorf J, Hartung J.** 2011. Measurement of culturable airborne staphylococci downwind from a naturally ventilated broiler house. *Aerobiologia* **27**:311-318.
138. **Chinivasagam HN, Tran T, Maddock L, Gale A, Blackall PJ.** 2010. The aerobiology of the environment around mechanically ventilated broiler sheds. *J Appl Microbiol* **108**:1657-1667.
139. **Hartung J.** 1998. [Nature and amount of aerial pollutants from livestock buildings]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* **105**:213-216.
140. **Benbough JE.** 1967. Death mechanisms in airborne *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* **47**:325-333.
141. **Handley BA, Webster AJ.** 1995. Some factors affecting the airborne survival of bacteria outdoors. *J Appl Bacteriol* **79**:368-378.
142. **Terzieva S, Donnelly J, Ulevicius V, Grinshpun SA, Willeke K, Stelma GN, Brenner KP.** 1996. Comparison of methods for detection and enumeration of airborne microorganisms collected by liquid impingement. *Appl Environ Microbiol* **62**:2264-2272.
143. **Marthi B, Fieland VP, Walter M, Seidler RJ.** 1990. Survival of bacteria during aerosolization. *Appl Environ Microbiol* **56**:3463-3467.

144. **Ehrlich R, Miller S, Walker RL.** 1970. Relationship between atmospheric temperature and survival of airborne bacteria. *Appl Microbiol* **19**:245-249.
145. **Schmid A, Hörmansdorfer S, Messelhäusser U, Käsbohrer A, Sauter-Louis C, Mansfeld R.** 2013. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* on Bavarian dairy and beef cattle farms. *Appl Environ Microbiol* **79**:3027-3032.
146. **Korzeniewska E, Harnisz M.** 2013. Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-positive *Enterobacteriaceae* in municipal sewage and their emission to the environment. *J Environ Manage* **128**:904-911.
147. **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* **91**:96-102.
148. **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* **19**:75-77.
149. **Cornick NA, Vukhac H.** 2008. Indirect transmission of *Escherichia coli* O157:H7 occurs readily among swine but not among sheep. *Appl Environ Microbiol* **74**:2488-2491.
150. **Chinivasagam HN, Blackall PJ.** 2005. Investigation and application of methods for enumerating heterotrophs and *Escherichia coli* in the air within piggery sheds. *J Appl Microbiol* **98**:1137-1145.
151. **Schulz J, Hartung J.** 2009. Nachweis von MRSA in Schweinestallluft mit Impingement und nachfolgender Membranfiltration. *Gefahrst Reinhalt Luft* **69**:348-352.
152. **Wathes CM, Howard K, Webster AJ.** 1986. The survival of *Escherichia coli* in an aerosol at air temperatures of 15 and 30 degrees C and a range of humidities. *J Hyg (Lond)* **97**:489-496.
153. **Chinivasagam HN, Tran T, Maddock L, Gale A, Blackall PJ.** 2009. Mechanically ventilated broiler sheds: a possible source of aerosolized *Salmonella*, *Campylobacter*, and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **75**:7417-7425.
154. **Pearson CC, Sharples TJ.** 1995. Airborne dust concentrations in livestock buildings and the effect of feed. *J Agric Eng Res* **60**:145-154.
155. **Seedorf J, Hartung J.** 2002. Stäube und Mikroorganismen in der Tierhaltung. *Landwirtschaftsvlg, Münster, KTBL-Schrift* **393**.
156. **Müller W, Wieser P, Woiwode J.** 1977. [The size of colony-forming units in the air of animal stalls]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* **90**:6-11.
157. **Blaak H, Hamidjaja RA, van Hoek AH, de Heer L, de Roda Husman AM, Schets FM.** 2014. Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* on flies at poultry farms. *Appl Environ Microbiol* **80**:239-246.

158. **Rodrigues C, Machado E, Peixe L, Novais A.** 2013. IncI1/ST3 and IncN/ST1 plasmids drive the spread of *bla*_{TEM-52} and *bla*_{CTX-M-1/-32} in diverse *Escherichia coli* clones from different piggeries. *J Antimicrob Chemother* **68**:2245-2248.
159. **Fischer J, Rodríguez I, Schmoger 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.
160. **Fischer J, Rodríguez I, Schmoger S, Friese A, Roesler U, Helmuth R, Guerra B.** 2013. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* producing VIM-1 carbapenemase isolated from livestock farms. *J Antimicrob Chemother* **68**:478-480.
161. **Liebana E, Carattoli A, Coque TM, Hasman H, Magiorakos AP, Mevius D, Peixe L, Poirel L, Schuepbach-Regula G, Torneke K, Torren-Edo J, Torres C, Threlfall J.** 2013. Public health risks of enterobacterial isolates producing extended-spectrum beta-lactamases or AmpC beta-lactamases in food and food-producing animals: an EU perspective of epidemiology, analytical methods, risk factors, and control options. *Clin Infect Dis* **56**:1030-1037.
162. **Seedorf J, Hartung J, Schröder M, Linkert KH, Phillips VR, Holden MR, Sneath RW, Short JL, White RP, Pedersen S, Takai H, Johnsen JO, Metz JHM, Groot Koerkamp PWG, Uenk GH, Wathes CM.** 1998. Concentrations and emissions of airborne endotoxins and microorganisms in livestock buildings in Northern Europe. *J Agric Eng Res* **70**:97-109.
163. **Seedorf J, Hartung J.** 1999. [Reduction efficiencies of a biofilter and a bio-scrubber as bio-aerosols in two piggeries]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* **112**:444-447.
164. **Schulz J, Bao E, Clauss M, Hartung J.** 2013. The potential of a new air cleaner to reduce airborne microorganisms in pig house air: preliminary results. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* **126**:143-148.

9 Publikationsverzeichnis

Wissenschaftliche Artikel

Als Erstautor:

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. *Vet Microbiol* 175:77-84.

von Salviati C, Friese A, Roschanski N, Laube H, Guerra B, Käsbohrer A, Kreienbrock L, Roesler U (2014): Extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)/AmpC beta-lactamases-producing *Escherichia coli* in German fattening pig farms: a longitudinal study. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 127:412-419.

Als Koautor:

Roschanski N, Friese A, von Salviati-Claudius C, Hering J, Kaesbohrer A, Kreienbrock L, Roesler U (2017): Prevalence of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae* isolated from German pig-fattening farms during the years 2011-2013. *Vet Microbiol* 200:124-129.

Laube H, Friese A, von Salviati C, Guerra B, Rösler U (2014): Transmission of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from broiler chicken farms to surrounding areas. *Vet Microbiol* 172:519-527.

Laube H, Friese A, von Salviati C, Guerra B, Käsbohrer 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.

Friese A, Schulz J, Laube H, von Salviati C, Hartung J, Roesler U (2013): 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* 126:175-180.

Vorträge

Als Erstautor:

von Salviati C, Friese A, Roschanski N, Laube H, Guerra-Roman B, Rösler U (2013): ESBL-Emissionen von Broiler- und Mastschweinebetrieben.
DVG Vet-Congress, Berlin – 06.11.-07.11.2013.
In: Tierschutz & Ethologie und Tierhaltung Umwelt- und Tierhygiene, S. 47–49,
ISBN: 978-3-86345-177-6.

von Salviati C, Rösler U (2013):
Antibiotika in der veterinärmedizinischen Praxis und Resistenzentwicklung in der Nutztierhaltung.
Arbeitstagung der pharmazeutischen und veterinärmedizinischen Überwachungskräfte sowie der wissenschaftlichen Beschäftigten der Arzneimitteluntersuchungsstellen der Länder (PhAT), Koblenz – 16.09.-20.09.2013.

von Salviati C, Friese A, Laube H, Rösler U (2013):
Long-term monitoring of ESBL/AmpC-producing *E. coli* in fattening pig farms and farm environment.
8th PhD-Symposium – Bringing Future Scientists Together & DRS Presentation Seminar, Berlin – 15.07.2013.

von Salviati C, Laube H, Käsbohrer A, Kreienbrock L, Friese A, Rösler U (2012):
Long-term monitoring of ESBL-producing and Fluoroquinolone resistant *Enterobacteriaceae* in pig farms and farm environment.
PhD-Symposium, Berlin – 2012.

Als Koautor:

Roschanski N, Thieck M, Hering J, von Salviati-Claudius C, Grobbel M, Friese A, Kreienbrock L, Rösler U (2016):
Occurrence of the colistin resistance gene *mcr-1* in *E. coli* isolated on German pig-fattening farms during the years 2011-2013.
DVG-Tagung der Fachgruppe „Bakteriologie und Mykologie“,
Jena – 31.08.-02.09.2016.
In: Tagung der Fachgruppe „Bakteriologie und Mykologie“, S. 11.

Roschanski N, Thieck M, Hering J, von Salviati-Claudius C, Grobbel M, Kreienbrock L, Roesler U (2016):

Retrospective analysis investigating the occurrence of the colistin resistance gene *mcr-I* on German pig-fattening farms during the years 2011-2013.

Eighth international conference on antimicrobial agents in veterinary medicine (AAVM), Budapest – 23.08.-26.08.2016.

In: Program and abstracts, AAVM 2016, S. 31.

Roschanski N, Murugaiyan J, von Salviati C, Hering J, Kaesbohrer A, Kreienbrock L, Roesler U (2015):

Occurrence and molecular biological characterisation of carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* isolated on pig-fattening farms throughout Germany.

6th Symposium on Antimicrobial Resistance in Animals and the Environment (ARAE), Tours – 29.06.-01.07.2015.

In: ARAE 2015, S. 30.

Roschanski N, von Salviati C, Hering J, Friese A, Guerra B, Käsbohrer A, Kreienbrock L, Rösler U (2014):

Occurrence of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae* (CPE) isolated from pig-fattening farms throughout Germany.

VAAM-Jahrestagung 2014, 66. Jahrestagung der DGHM, Dresden – 05.10.-08.10.2014.

In: Tagungsband der VAAM-Jahrestagung 2014, 66. Jahrestagung der DGHM, S. 138.

Roschanski N, von Salviati C, Hering J, Friese A, Guerra B, Käsbohrer A, Kreienbrock L, Rösler U (2014):

Occurrence of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae* isolated from pig-fattening farms throughout Germany.

Seventh International Conference on Antimicrobial Agents in Veterinary Medicine (AAVM), Berlin – 16.09.-19.09.2014.

In: Program and abstracts, AAVM 2014, S. 38.

Friese A, von Salviati C, Rösler U, Laube H (2013):

Emissionen von ESBL in das Umfeld von Tierhaltungen.

BfR-Symposium „Antibiotikaresistenz in der Lebensmittelkette“,

Berlin – 11.11.-12.11.2013.

Rösler U, von Salviati C, Laube H, Friese A (2013):

Long-term Monitoring of ESBL-producing *E. coli* in Broiler and Pig Fattening Farms and in their Vicinity.

The 3rd Food safety and Zoonoses Symposium for Asia Pacific,
Chiang Mai, Thailand – 02.07.-06.07.2013.

In: 10th year anniversary of Veterinary Public Health Centre for Asia Pacific, S. 22,
ISBN: 978-974-672-799-0.

Laube H, Friese A, von Salviati C, Guerra B, Käsbohrer A, Rösler U (2013):

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

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 the Environment, S. 50.

Friese A, von Salviati C, Laube H, Schulz J, Hartung J, Rösler U (2012):

Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA) und Extended-spectrum Beta-Laktamase (ESBL)-bildende *E. coli* in Schweine- und Geflügelmastbeständen.

53. Arbeitstagung des Arbeitsgebiets Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft,
Garmisch-Partenkirchen – 25.09.-28.09.2012.

In: Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle: Fleischhygiene, Tierschutz, Tiergesundheit, Tierarzneimittel, Programm- und Abstractband, S. 50.

Laube H, Friese A, von Salviati C, Guerra B, Käsbohrer A, Rösler U (2012):

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

Tagung der Fachgruppe „Bakteriologie und Mykologie“, 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.

Laube H, Friese A, von Salviati C, Guerra-Roman B, Käsbohrer A, Kreienbrock L, Rösler U (2012):

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

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.

Poster

Als Erstautor:

von Salviati C, Friese A, Roschanski N, Laube H, Guerra B, Rösler U (2013):

Bestandskinetik von ESBL/AmpC-bildenden *E. coli* in Schweinemast- und Masthähnchenbetrieben.

DACH-Epidemiologietagung 2013, Hannover – 04.09.-06.09.2013.

In: Veterinärmedizinische Epidemiologie in Klinik und Bestandsmedizin, S. 44–45,

ISBN: 978-3-86345-166-0.

von Salviati C, Laube H, Friese A, Rösler U (2012):

Long-term monitoring of ESBL-producing *E. coli* in animal farms and farm environment.

Nationales Symposium für Zoonosenforschung 2012, Berlin – 11.10.-12.10.2012.

In: Abstractband Nationales Symposium für Zoonosenforschung 2012, S. 192.

von Salviati C, Friese A, Laube H, Guerra-Roman B, Käsbohrer A, Rösler U (2012):

Langzeituntersuchungen zur Prävalenz von ESBL-produzierenden und Fluorochinolon-resistenten Enterobakterien in Schweinehaltungen und deren Umgebung.

DVG-Tagung der Fachgruppe „Bakteriologie und Mykologie“,

Leipzig – 27.06.-29.06.2012.

In: Tagung der Fachgruppe „Bakteriologie und Mykologie“, S. 97–98.

von Salviati C, Laube H, Guerra-Roman B, Käsbohrer A, Kreienbrock L, Friese A, Rösler U (2012):

Langzeituntersuchungen zur Prävalenz von Fluorochinolon-resistenten Enterobakterien in Schweinemast- und Broilerhaltungen sowie der Umgebung.

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. 73.

von Salviati C, Laube H, Käsbohrer A, Kreienbrock L, Friese A, Rösler U (2011):

Long-term monitoring of ESBL-producing and Fluoroquinolone resistant *Enterobacteriaceae* in animal farms and farm environment.

Nationales Symposium für Zoonosenforschung 2011, Berlin – 06.10.-07.10.2011.

In: Abstractband Nationales Symposium für Zoonosenforschung 2011, S. 171.

Als Koautor:

Roschanski N, Thieck M, Hering J, von Salviati-Claudius C, Grobbel M, Kreienbrock L, Roesler U (2016):

Retrospective analysis addressing the emergence of the plasmid encoded colistin resistance gene *mcr-I* on German pig-fattening farms during the years 2011-2013. DGHM, Ulm – 11.09.-14.09.2016.

Roschanski N, von Salviati C, Hering J, Friese A, Guerra B, Käsbohrer A, Kreienbrock L, Rösler U (2014):

Occurrence of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae* (CPE) isolated from pig-fattening farms throughout Germany.

German Symposium on Zoonoses Research 2014 and 7th International Conference on Emerging Zoonoses, Berlin – 16.10.-17.10.2014.

In: Program German Symposium on Zoonoses Research 2014 and 7th International Conference on Emerging Zoonoses, S. 310-311.

Laube H, von Salviati C, Guerra B, Käsbohrer A, Kreienbrock L, Friese A, Rösler U (2012):

Fluoroquinolone-resistant *Enterobacteriaceae* in and around chicken and swine farms. Nationales Symposium für Zoonosenforschung 2012, Berlin – 11.10.-12.10.2012.

In: Abstractband Nationales Symposium für Zoonosenforschung 2012, S. 194.

10 Danksagung

Als Erstes möchte ich mich 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 konnte ich fundierte Kenntnisse auf dem Gebiet der Mikrobiologie und Molekularbiologie erwerben und habe darüber hinaus viele neue Dinge gelernt und Erfahrungen gesammelt, die ich nicht missen möchte. Die Arbeit am Institut hat mir immer viel Freude bereitet und ich danke Ihnen für die stets sehr gute und freundliche Zusammenarbeit!

Daneben gilt mein großer Dank Dr. Anika Friese. Zum einen für die hervorragende fachliche Betreuung, zum anderen für die permanente Ansprechbarkeit, die Geduld und das stets sofortige und dabei immer freundliche „mit Rat und Tat zur Seite stehen“. Du warst die größte Hilfe bei dieser Arbeit, auf die man sich jederzeit verlassen konnte!

Dr. Jayaseelan Murugaiyan danke ich vor allem für seine Hilfe bei der Arbeit mit der MALDI-TOF und Dr. Nicole Roschanski für Ihre geduldige Beantwortung jeglicher molekularbiologischer Fragen. Ein besonderes Dankeschön richtet sich auch an alle medizinisch- und biologisch-technischen Assistentinnen und Assistenten des Instituts für Ihre große Unterstützung im Labor. Allen Mitarbeitern des Forschungsverbundes RESET und den Landwirten sei für die gute Zusammenarbeit gedankt. Nicht zu vergessen sind meine Mitstreiter im Doktorandenzimmer, besonders mein Tischnachbar Nils Kühl, dem ich für sein immer offenes Ohr und seine Hilfsbereitschaft danken möchte.

Über die Universität hinaus möchte ich auch meinen Freunden danken, insbesondere meinen besten Freundinnen Laura Rüter und Pauline Riesser, auf die ich immer zählen kann. Bei Heidemarie und Thomas Krauss möchte ich mich an dieser Stelle nochmals ganz herzlich für ihre großartige „native speaker“-Durchsicht der Publikationen bedanken.

Abschließend gilt mein größter Dank jedoch meiner Familie, ganz besonders meinem geliebten Mann Paul Claudius sowie meinen Eltern und Geschwistern.

Euch verdanke ich den größten Anteil, nicht nur an dieser Arbeit!

Diese Arbeit ist Euch gewidmet.

11 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 16.06.2017

Christina von Salviati-Claudius