

Aus dem Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Prävalenz und Quantifizierung ESBL/AmpC-
produzierender *Enterobacteriaceae* bei Masthähnchen
während des Schlachtprozesses**

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

vorgelegt von
Philine von Tippelskirch
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2017
Journal-Nr.: 3997

Aus dem Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Prävalenz und Quantifizierung ESBL/AmpC-produzierender *Enterobacteriaceae*
bei Masthähnchen während des Schlachtprozesses**

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

vorgelegt von
Philine von Tippelskirch
Tierärztin
aus Berlin

Berlin 2017

Journal-Nr.: 3997

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Thomas Alter
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Marcus Fulde
Dritter Gutachter: PD Dr. Markus Heimesaat

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

broilers; poultry; enterobacteriaceae; prevalence; extended spectrum beta-lactamases; slaughter; carcasses; meat hygiene; food safety; cefotaxime; MALDI-TOF; polymerase chain reaction

Tag der Promotion: 10.11.2017

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-861-0

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2017

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2017

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

1. Einleitung	- 1 -
2. Literatur	- 3 -
2.1. Charakteristika der <i>Enterobacteriaceae</i>	- 3 -
2.1.1. <i>Escherichia coli</i>	- 4 -
2.2. Beta-Laktamasen.....	- 8 -
2.2.1. Extended-Spectrum-Beta-Laktamasen (ESBL)	- 11 -
2.2.2. AmpC Beta-Laktamasen.....	- 14 -
2.3. Prävalenzen und Epidemiologie	- 15 -
2.3.1. ESBL/AmpC-produzierende <i>Enterobacteriaceae</i> in der Umwelt	- 15 -
2.3.2. ESBL/AmpC-produzierende <i>Enterobacteriaceae</i> beim Tier	- 18 -
2.3.3. ESBL/AmpC-produzierende <i>Enterobacteriaceae</i> während des Schlachtprozesses	- 27 -
2.3.4. ESBL/AmpC-produzierende <i>Enterobacteriaceae</i> im Lebensmittel	- 29 -
2.3.5. ESBL/AmpC-produzierende <i>Enterobacteriaceae</i> beim Menschen.....	- 35 -
3. Material	- 40 -
3.1. Nährmedien	- 40 -
3.2. Chemikalien	- 40 -
3.3. qPCR Primer.....	- 41 -
3.4. Bakterienstämme.....	- 41 -
3.5. Geräte und Software.....	- 42 -
3.6. Verbrauchsmaterialien.....	- 43 -
4. Methoden.....	- 44 -
4.1. Beprobung am Schlachthof	- 44 -
4.2. Aufbereitung der Proben.....	- 44 -
4.3. Isolierung der Cefotaxim resistenten <i>Enterobacteriaceae</i>	- 45 -
4.3.1. Qualitativer Nachweis	- 45 -
4.3.2. Quantitativer Nachweis	- 45 -
4.4. Genus- und Spezies-Bestimmung der Isolate	- 46 -
4.4.1. MALDI-TOF MS	- 46 -
4.5. Phänotypische Charakterisierung der ESBL/AmpC – produzierenden <i>Enterobacteriaceae</i>	- 47 -
4.5.1. Kultivierung der Stämme	- 47 -
4.5.2. Plättchen-Diffusionstest	- 47 -
4.6. Genotypische Charakterisierung der ESBL/AmpC-produzierenden <i>Enterobacteriaceae</i>	- 47 -
4.6.1. Isolierung der DNA (Chelex-Methode).....	- 47 -

4.6.2.	Real-Time PCR (qPCR).....	- 48 -
4.7.	Bestimmung der Phylogruppen	- 49 -
4.8.	Sequenzierung der ESBL/AmpC-Gene	- 50 -
4.9.	Auswertung der Daten	- 50 -
5.	Ergebnisse	- 51 -
5.1.	Qualitative Analyse	- 51 -
5.2.	Quantitative Analyse.....	- 54 -
5.3.	Genus- und Spezies-Bestimmung der Isolate	- 57 -
5.4.	Bestimmung des Antibiotikaresistenz-Profiles der Isolate	- 57 -
5.5.	Bestimmung der ESBL/AmpC-Gene	- 58 -
5.6.	Bestimmung der Phylogruppen	- 60 -
5.7.	Sequenzierung der ESBL/AmpC-Gene	- 61 -
6.	Diskussion	- 66 -
6.1.	Qualitative Analyse	- 66 -
6.2.	Quantitative Analyse.....	- 69 -
6.3.	Genus- und Spezies-Bestimmung der Isolate	- 71 -
6.4.	Bestimmung der ESBL/AmpC-Gene	- 72 -
6.5.	Bestimmung der Phylogruppen	- 73 -
6.6.	Sequenzierung der ESBL/AmpC-Gene	- 74 -
7.	Zusammenfassung	- 77 -
8.	Summary	- 79 -
9.	Literaturverzeichnis	- 81 -
10.	Anhang	I
10.1.	Abkürzungsverzeichnis.....	I
10.2.	Tabellenverzeichnis	III
10.3.	Abbildungsverzeichnis	IV
Publikationen		
Danksagung		
Selbstständigkeitserklärung		

1. Einleitung

Antibiotikaresistente Bakterien stellen weltweit sowohl in der Human- als auch in der Tiermedizin ein zunehmendes Problem dar. Einer der häufigsten Resistenzmechanismen gramnegativer Bakterien ist die enzymatische Deaktivierung von β -Laktam-Antibiotika durch β -Laktamasen, zu denen auch Extended Spectrum β -Laktamasen (ESBL) und AmpC β -Laktamasen (AmpC) gehören. β -Laktamasen können Resistenzen gegen eine Vielzahl an Wirkstoffen, wie Cephalosporine der 3. und 4. Generation verursachen, die von der WHO als „critically important antimicrobials“ gelistet sind (WHO, 2017).

Die für ESBL und AmpC- β -Laktamasen kodierenden Gene liegen häufig auf Plasmiden, die auch speziesübergreifend übertragen werden können. Da auf den Plasmiden häufig weitere Resistenzgene liegen, kann nicht nur die Gabe von β -Laktam-Antibiotika, sondern auch die weiterer Wirkstoffklassen zu einer Selektion ESBL/AmpC-produzierender *Enterobacteriaceae* führen. Neben Plasmiden können weitere mobile genetische Elemente wie Transposons und Integrons, aber auch Bakteriophagen, zur Ausbreitung der ESBL/AmpC-Gene in den *Enterobacteriaceae* beitragen.

In den letzten Jahren hat die Prävalenz ESBL/AmpC-produzierender *Enterobacteriaceae* nicht nur im Zusammenhang mit medizinischen Einrichtungen zugenommen, sondern auch in der Umwelt (Abwasser, Gewässer, Boden), bei Wildtieren, bei Haustieren, bei Nutztieren und in Lebensmitteln. Da lebensmittelliefernde Tiere ein mögliches Reservoir für ESBL/AmpC-produzierende *Enterobacteriaceae* darstellen, können tierische Lebensmittel wie Fleisch eine potenzielle Quelle für die Kolonisation oder Infektion des Menschen mit ESBL/AmpC-produzierenden *Enterobacteriaceae* sein. In mehreren anderen Studien konnten hohe Prävalenzen ESBL/AmpC-produzierender *Enterobacteriaceae*, insbesondere bei Mastgeflügel von bis zu 100 % nachgewiesen werden (Dierikx et al., 2013b; Friese et al., 2013; Hering et al., 2016; Kameyama et al., 2013). Allerdings gibt es bisher nur wenige Daten über die quantitative Belastung von Masthähnchen mit ESBL/AmpC-produzierenden *Enterobacteriaceae* während des Schlachtprozesses (Pacholewicz et al., 2015; Reich et al., 2016).

Ziel dieser Arbeit war es, die Prävalenz sowie die quantitative Belastung verschiedener Probenmatrizes (Caecum, Haut, Filet) von sieben Masthähnchenherden während der Schlachtung mit ESBL/AmpC-produzierenden *Enterobacteriaceae* zu erfassen. Zudem wurde die Umgebung während der Schlachtung der jeweiligen Herde beprobt, um Hinweise auf

mögliche Quellen für Kontaminationen bzw. Kreuzkontaminationen mit ESBL/AmpC-produzierenden *Enterobacteriaceae* sowie deren mögliche Übertragungswege zu erhalten.

2. Literatur

2.1. Charakteristika der *Enterobacteriaceae*

Die Familie der *Enterobacteriaceae* gehört zu der Klasse der *Gammaproteobacteria*, der Ordnung der *Enterobacteriales* und umfasst derzeit 53 Genera (Kayser et al., 2014). Es handelt sich um gramnegative, fakultativ anaerobe, durch eine äußere Membran mit Lipopolysaccharid (LPS) umgebene, meist durch Flagellen bewegliche Stäbchenbakterien. Die Zellwandstrukturen können für die serologische Stammtypisierung genutzt werden. Neben dem Oberflächenantigen LPS (O-Antigen) sowie den Flagellen (H-Antigen) exprimieren einige *Enterobacteriaceae* zusätzlich Kapselantigene (K-Antigen). Die daraus resultierende Antigenformel O:H:K ist die Grundlage des serologischen Typisierungsschemas nach Kauffmann und White. Dieses wird allerdings zunehmend von DNA-Sequenz-basierten Methoden ersetzt (Wieler et al., 2011b).

Enterobacteriaceae kommen natürlicherweise im Intestinaltrakt von Mensch und Tier vor. Viele Spezies sind fakultativ pathogen, wie z. B. *Escherichia (E.) coli*, der zu der häufigsten als Krankheitserreger isolierten Spezies gehört. *Enterobacteriaceae* sind häufig für nosokomiale Infektionen verantwortlich (Kayser et al., 2014). So werden ca. 40 % aller Harnwegsinfektionen, 20 % aller Pneumonien, 17 % aller Wundinfektionen und 8 % aller nosokomialen Septikämien durch fakultativ pathogene *Enterobacteriaceae* ausgelöst. Einige *Enterobacteriaceae* weisen eine hohe Tenazität auf. Darüber hinaus entwickelten sie in den letzten Jahren vermehrt Resistenzen gegen eine Vielzahl von Antibiotika (z. B. β -Laktame, Chinolone, Tetrazykline) (Tschäpe et al., 2009; Wieler et al., 2011b).

Durch ihre Anpassung an das Habitat Darm können sie in hoher Dichte vorkommen. So kann *E. coli* den Säugetierdarm mit bis zu 10^{10} KBE/g Fäzes besiedeln. Die hohe Bakteriendichte ist eine gute Voraussetzung für einen horizontalen Gentransfer. Somit können Gene, die für spezifische adaptive Eigenschaften wie z. B. Virulenzfaktoren kodieren, verbreitet werden. Darüber hinaus sind *Enterobacteriaceae* auch für die Ausbildung des Immunsystems ihrer Wirte von Bedeutung. Sie können aber auch häufig für Zooanthroponosen verantwortlich sein (Wieler et al., 2011b).

Zur Anzucht von *Enterobacteriaceae* dienen hemmstoffhaltige (Gallensalze, Farbstoffe) Nährmedien, die das Wachstum grampositiver Bakterien größtenteils verhindern. Ein wichtiges Selektivmedium ist der MacConkey-Agar, der die grampositive Begleitflora hemmt und den Abbau von Laktose anzeigt. Die mittlere Generationszeit von *Enterobacteriaceae* liegt

bei 20 - 30 min *in vitro* (Kayser et al., 2014). Neben der negativen Zytochromoxidase-Reaktion sowie der Eigenschaft einiger Genera (z.B. *E. coli*, *Klebsiella* (K.), *Enterobacter* (E.)) aus Laktose Säure zu bilden, gibt es eine Vielzahl von Stoffwechselreaktionen, die zur weiteren Differenzierung genutzt werden können („Bunte Reihe“) (Wieler et al., 2011b).

Da in der vorliegenden Arbeit vor allem *E. coli* isoliert wurde, wird im Folgenden auf diese Spezies genauer eingegangen.

2.1.1. *Escherichia coli*

E. coli wurde erstmals 1885 von Theodor Escherich als „*Bacterium coli commune*“ in den unteren Darmabschnitten von Säuglingen beschrieben (Escherich, 1988). Es handelt sich um gramnegative, gerade, teilweise durch peritriche Flagellen bewegliche Stäbchenbakterien mit einer Größe von 1,1 - 1,5 x 2,0 - 6,0 µm. Die optimale Wachstumstemperatur liegt zwischen 35 °C und 40 °C. Sie sind Oxidase-negativ und in der Regel Laktose-positiv. Das gemeinsame Kerngenom von *E. coli*-Stämmen beträgt lediglich ca. 30%. Aufgrund von horizontalem Gentransfer sowie einer reduktiven Evolution besteht eine hohe Variabilität innerhalb der Spezies (Wieler et al., 2011b). *E. coli* kommt ubiquitär vor und kolonisiert symptomlos den Intestinaltrakt von Säugetieren sowie Vögeln. Er dient daher als Indikator für fäkale Verunreinigung von Trinkwasser, Badegewässern sowie Lebensmitteln (Kayser et al., 2014). Zudem ist dieses Bakterium auch in der Umwelt weit verbreitet (Wirth et al., 2006). *E. coli* ist für die Darmgesundheit von Warmblütlern von Bedeutung (Tschäpe et al., 2009), da *E. coli* Vitamin K2 synthetisiert und unter Umständen die Besiedlung des Darms mit pathogenen Bakterien verhindern kann (Hudault et al., 2001). Allerdings existieren auch pathogene *E. coli*, die von globaler Bedeutung sind und zu einer Vielzahl von Erkrankungen führen können (Wirth et al., 2006). Diese unterscheiden sich von den Kommensalen vor allem durch die über horizontalen Gentransfer erworbenen spezifischen Virulenzfaktoren und die dadurch erhöhte Anpassungsfähigkeit an neue Nischen. Der Gentransfer erfolgt mithilfe mobiler genetischer Elemente wie Bakteriophagen, Pathogenitätsinseln, Plasmiden oder konjugativen Transposons (Tschäpe et al., 2009). Die *E. coli*-Stämme mit den erfolgreichsten Virulenzfaktor-Kombinationen haben sich zu spezifischen Pathovaren entwickelt (Kaper et al., 2004). Aus einer Infektion mit obligat pathogenen *E. coli*-Stämmen können im allgemeinen drei verschiedene Erkrankungen resultieren: enterische/diarrhöische Erkrankungen, Harnwegsinfektionen, Sepsis und Meningitis (Nataro und Kaper, 1998). Es wird je nach Lokalisation der von ihnen verursachten Infektion zwischen intestinal (InPEC) und extraintestinal pathogenen (ExPEC) *E. coli* unterschieden. Diese beiden Gruppen können weiter unterteilt und jeweils anhand spezifischer Virulenzfaktor-Kombinationen unterschieden werden (Kaper et al., 2004) (Abbildung 1).

Darüber hinaus gibt es auch fakultativ pathogene *E. coli*, die zu unspezifischen Krankheitsbildern wie Wundinfektionen, Sepsis, Peritonitis sowie Infektionen des Genitaltraktes führen können. Diese entstehen, wenn sie aus dem Darm an Orte des Makroorganismus gelangen, an denen sie normalerweise nicht anzutreffen sind und dort auf gute Bedingungen für ihre Vermehrung treffen (Kayser et al., 2014).

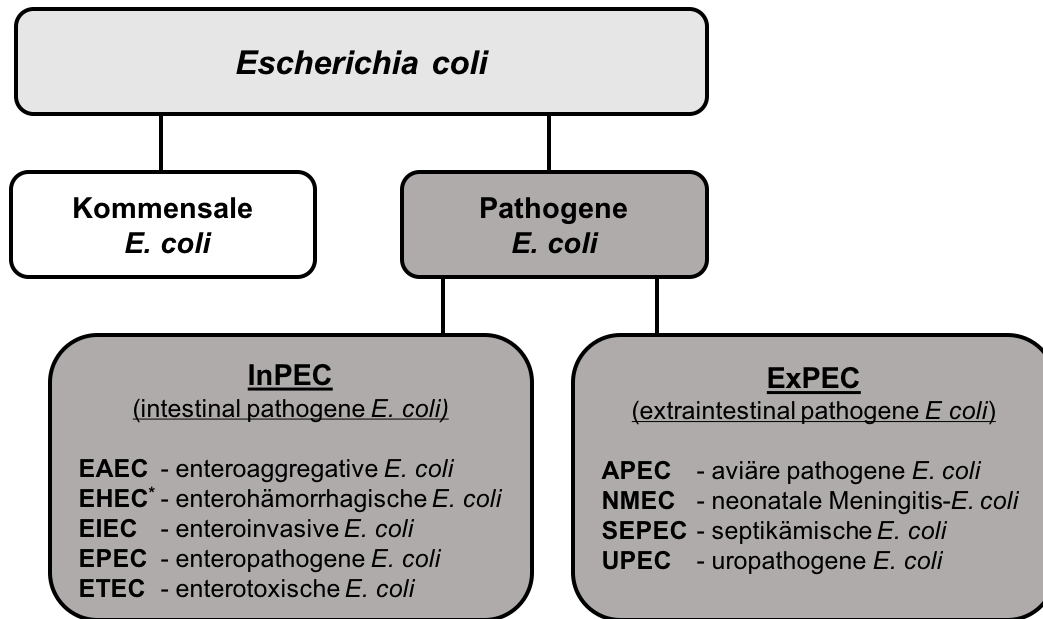


Abbildung 1 Unterteilung der wichtigsten *E. coli*-Pathovaren

* Synonym: STEC, VTEC

2.1.1.1. Intestinal pathogene *E. coli* (InPEC)

InPEC können sowohl beim Menschen als auch beim Tier eine Vielzahl von Infektionen hervorrufen. Das Reservoir von InPEC ist, mit Ausnahme von EHEC (inapparente Nutz- sowie Wildtiere), in der Regel der Mensch (Kayser et al., 2014). Zur Anheftung bzw. zur Schädigung des Darmepithels werden Virulenzfaktoren wie Adhäsine (z. B. spezifische Fimbrien-Antigene, *E. coli*-sezerniertes Protein A, Intimin) bzw. Toxine (z. B. ST, Stx, *E. coli* secreted Proteins F, G und H) eingesetzt (Wieler et al., 2011b).

EAEC (enteroaggregative *E. coli*) verursachen bei ihren Wirten (alle Altersgruppen) eine akute sowie oft persistierende, durch Enterotoxine verursachte Diarrhö. Sie sind in der Lage, durch Autoaggregation auf der Oberfläche des Darmepithels Biofilme zu bilden.

Eine hämorrhagische Kolitis wird durch EHEC (enterohämorrhagische *E. coli*) ausgelöst; dabei sind das Adhärenz-Protein Intimin sowie Shiga-Toxin-ähnliche Toxine wichtige Pathogenitätsfaktoren (Kayser et al., 2014). Eine Komplikation einer EHEC-Infektion ist das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS), welches bei dem EHEC-Ausbruch 2011 in Deutschland vermehrt auftrat (Bielaszewska et al., 2011). Es ist durch eine hämolytische Anämie, Thrombozytopenie sowie Nierenversagen gekennzeichnet. Hierfür ist vor allem das Toxin Stx2c verantwortlich, das zudem auch hämatogen in das ZNS gelangen und neurologische Symptome verursachen kann (Kayser et al., 2014; Tschäpe et al., 2009). Der EHEC-Ausbruchs-Stamm O104:H4 verursachte eine hohe Anzahl von HUS- sowie Todesfällen in Deutschland. Es wird spekuliert, ob die Kombination aus EHEC- sowie EAEC-Eigenschaften (autoaggregativ) zu einer verbesserten Adhärenz führte und somit die Resorption des Stx2c sowie die systemische Wirkung vereinfachte. Zudem verfügte dieser Stamm zusätzlich über ein plasmidkodiertes ESBL-Gen (*bla_{CTX-M-15}*) und war somit gegen eine Vielzahl von Antibiotika resistent (Bielaszewska et al., 2011). Shigatoxin-bildende *E. coli* (STEC bzw. EHEC) sind auch für osmotische Durchfälle bei diversen Tieren (z. B. Kalb, Lamm, Dammwild) verantwortlich. Es handelt sich um einen klassischen Zoonoseerreger. Vor allem Rinder können inapparente Ausscheider sein (Wieler et al., 2011b).

EIEC (enteroinvasive *E. coli*) invadieren mittels eines plasmidkodierten Invasins die Enterozyten des Kolons und erzeugen lokale, akut-entzündliche Prozesse im Dickdarm. Dies kann zu schleimiger bis blutiger Diarrhö führen. Das Krankheitsbild ist von der Shigellose schwer zu unterscheiden (Tschäpe et al., 2009).

EPEC (enteropathogene *E. coli*) gehören zu den häufigsten Durchfallerregern weltweit, insbesondere in Entwicklungsländern. Sie rufen eine Säuglings- und Jungtierdiarrhö (Rinder, Schweine, Kaninchen, Hunde, Katzen) hervor und verursachen typische Attaching-and-Effacing-Läsionen (Nataro und Kaper, 1998; Tschäpe et al., 2009). Diese sind durch das Verstreichen der Mikrovilli am Ort der Adhärenz gekennzeichnet. Auch EPEC sind potentielle Zoonoseerreger (Wieler et al., 2011b).

ETEC (enterotoxische *E. coli*) sind die häufigste Ursache für reiseassoziierte Durchfallerkrankungen, insbesondere im Zusammenhang mit Reisen in Entwicklungsländer. Sie treten unter mangelhaften lebensmittel- sowie trinkwasserhygienischen Verhältnissen auf (Daniels, 2006). ETEC heften sich über spezifische Haftfimbrien an Enterozyten des proximalen Dünndarms, sezernieren hitzelabile sowie -stabile Enterotoxine und führen zu einer starken wässrigen Diarrhö sowie teilweise zu Erbrechen (Kayser et al., 2014). In der Nutztierhaltung führen sie bei Ferkeln, Absetzferkeln sowie Kälbern (Neonaten) zu schwerer

und oft endemisch auftretender Diarrhö. Da sie aufgrund unterschiedlicher Fimbrienausstattungen wirtsspezifisch sind, sind die Tierstämme nicht humanpathogen (Tschäpe et al., 2009; Wieler et al., 2011b).

2.1.1.2. Extraintestinal pathogene *E. coli* (ExPEC)

Harnwegsinfektionen, Septikämien sowie neonatale Meningitiden sind die am häufigsten durch ExPEC hervorgerufenen Infektionen beim Menschen. Auch hier sind die Virulenzfaktoren wie Adhäsine, Toxine, Lipopolysaccharide, Invasine sowie Systeme zur Eisen-Sequestrierung von Bedeutung (Johnson et al., 2003a). Auch bei Hunden sowie Katzen sind durch uropathogene *E. coli* (UPEC) hervorgerufene Harnwegsinfektionen häufig. Diese können auch auf deren Besitzer übertragen werden. Bei Pferden kommt es durch ExPEC zu Fruchtbarkeitsstörungen, und bei Rindern sowie vor allem auch Sauen sind sie bedeutende Erreger von Mastitiden. Septikämische *E. coli* (SEPEC) können vor allem bei Kälbern in der ersten Lebenswoche zu einer Septikämie führen (Wieler et al., 2011b). Aviäre pathogene *E. coli* (APEC) verursachen die Colibakteriose bei Wirtschaftsgeflügel, die die wichtigste durch *E. coli* verursachte Infektion des Wirtschaftsgeflügels darstellt. Sie führt zu multiplen Organschäden, wobei es hauptsächlich zu Aerosacculitis, Pericarditis sowie Perihepatitis kommt (Ewers et al., 2003; Wieler et al., 2011b). Außerdem können ExPEC bei Geflügel zu lokalen Wundinfektionen sowie Dottersackinfektionen führen.

Aufgrund vermehrter Nachweise ESBL-bildender *E. coli* bei Haus- sowie Nutztieren, sollte ein strenges Antibiotika- und Hygienemanagement eingehalten werden, um die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen und damit schwer therapierbaren Infektionen sowie das Risiko von Infektionen des Menschen zu minimieren (Belanger et al., 2011; Wieler et al., 2011b).

2.1.1.3. Phylogenetische Einteilung von *E. coli*

E. coli kann in vier verschiedene phylogenetische Hauptgruppen (A, B1, B2 und D) eingeteilt werden. Inzwischen sind weitere Phylogruppen wie C, E und F bekannt. Die Bestimmung der Phylogruppen kann z. B. über Multi Locus Enzym Elektrophorese (MLEE) oder mithilfe der PCR nach Clermont et al. (2013) sowie über Multi Locus Sequenz Typisierung (MLST) erfolgen. Es konnte ein Zusammenhang zwischen Phylogruppen und Virulenzeigenschaften hergestellt werden. Extraintestinale *E. coli* gehören häufig zu der Phylogruppe B2 sowie in geringerem Ausmaß zu D, während kommensale *E. coli* vor allem zu den Phylogruppen A sowie B1 gehören (Branger et al., 2005; Saeed et al., 2009). Es konnten Zusammenhänge zwischen verschiedenen Antibiotikaresistenzen und der Phylogruppe gezeigt werden (Branger et al., 2005; Johnson et al., 2003b; Saeed et al., 2009). In der Studie von Branger et al. (2005)

konnten ESBL-produzierende *E. coli* kodiert durch *bla_{SHV}* und in geringerem Ausmaß auch *bla_{TEM}* vor allem der Phylogruppe B2 zugeordnet werden, während durch *bla_{CTX-M}* kodierte vornehmlich der Gruppe D angehörten.

2.2. Beta-Laktamasen

Die enzymatische Deaktivierung von β -Laktam-Antibiotika durch β -Laktamasen gehört zu den häufigsten Resistenzmechanismen gramnegativer Bakterien gegenüber β -Laktam-Antibiotika (Bush und Jacoby, 2010; Livermore, 1995). β -Laktamasen spalten die Amidbindung im β -Laktamring von Penicillinen, Cephalosporinen sowie verwandten Wirkstoffen. Dies führt zu einer Unwirksamkeit der β -Laktam Antibiotika (Ambler et al., 1991; Medeiros, 1997; Pitout und Laupland, 2008).

β -Laktamasen können im Allgemeinen entweder anhand molekularer Kriterien nach dem Schema nach Ambler oder anhand funktioneller Kriterien nach dem Schema nach Bush, Jacoby und Medeiros klassifiziert werden (Ambler, 1980; Bush et al., 1995). Nach Ambler werden β -Laktamasen anhand ihrer Aminosäuresequenz in vier Hauptgruppen (A-D) eingeteilt (Abbildung 2). β -Laktamasen der Klassen A, C und D gehören zu den Serin- β -Laktamasen und besitzen Serin in ihrem aktiven Zentrum. Klasse B-Enzyme gehören zu den Metallo- β -Laktamasen und haben ein Zink-Ion in ihrem aktiven Zentrum (Paterson und Bonomo, 2005).

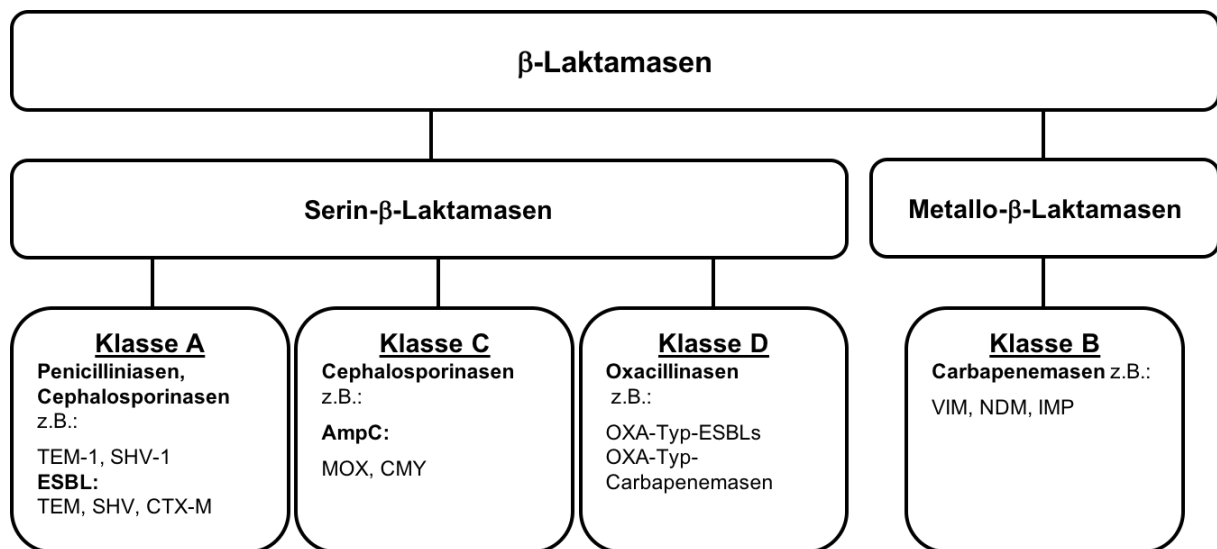


Abbildung 2 Molekulare Einteilung der β -Laktamasen nach Ambler

Nach Bush et al. (1995) werden β -Laktamasen anhand ihrer hydrolytischen Eigenschaften sowie ihrer Empfindlichkeit gegenüber β -Laktamase-Inhibitoren, wie Clavulansäure, eingeteilt. Gruppe 1 enthält Cephalosporinasen der Ambler-Klasse C, die kaum durch Clavulansäure inhibierbar sind. Zu Gruppe 2 gehören Penicillinasen, Cephalosporinasen sowie Breitspektrum- β -Laktamasen der Ambler-Klasse A und D, die normalerweise empfindlich gegenüber β -Laktamase-Inhibitoren sind. In Gruppe 3 sind Metallo- β -Laktamasen der Ambler-Klasse B, die außer durch Ethylendiamintetraacetat (EDTA) sowie 4-Chlormercuribenzoensäure (pCMP) schlecht inhibierbar sind. Die Penicillinasen, die in die Gruppe 4 eingeordnet werden, sind nicht durch Clavulansäure hemmbar (Bush et al., 1995). Tabelle 1 zeigt die erweiterte Klassifizierung der β -Laktamasen nach Bush und Jacoby (2010). Die wichtigsten, sich zunehmend in Bakterien ausbreitenden β -Laktamasen sind die plasmidkodierte Cephalosporinasen, die Metallo- β -Laktamasen sowie die Extended-Spectrum- β -Laktamasen (Bush, 2001).

Tabelle 1 Erweiterte funktionelle und molekulare Einteilung von β -Laktamasen nach Bush und Jacoby (2010)

Bush-Jacoby Gruppe (2009)	Bush-Jacoby-Medeiros Gruppe (1995)	Molekulare Klasse (Subklasse)	Bevorzugte Substrate	Hemmbar durch:		Representative Enzyme
				CA ^a oder TZB	EDTA	
1	1	C	Cephalosporine	-	-	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	NA ^b	C	Cephalosporine	-	-	GC1, CMY-37
2a	2a	A	Penicilline	+	-	PC1
2b	2b	A	Penicilline, frühe Cephalosporine	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Extended-Spektrum-Cephalosporine Monobaktame	+	-	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Penicilline	-	-	TEM-30, SHV-10
2ber	-	A	Extended-Spektrum-Cephalosporine Monobaktame	-	-	TEM-50
2c	2c	A	Carbenicillin	+	-	PSE-1, CARB-3
2ce	-	A	Carbenicillin, Cefepim	+	-	RTG-4
2d	2d	D	Cloxacillin	+/-	-	OXA-1, OXA-10
2de	-	D	Extended-Spektrum Cephalosporine	+/-	-	OXA-11, OXA-15
2df	-	D	Extended-Spektrum Cephalosporine Carbapeneme	+/-	-	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Extended-Spektrum Cephalosporine	+	-	CepA
2f	2f	A	Carbapeneme	+/-	-	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B (B1) B (B3)	Carbapeneme	-	+	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1 L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	3	B (B2)	Carbapeneme	-	+	CphA, Sfh-1
NA	4	nicht bekannt				

^a CA, Clavulansäure; TZB, Tazobactam; EDTA, Ethylendiamintetraacetat

^b NA, nicht angegeben

2.2.1. Extended-Spectrum-Beta-Laktamasen (ESBL)

ESBLs unterscheiden sich von ihren Vorgängern, den Broad-Spectrum-Beta-Laktamasen (BSBLs), durch den Austausch weniger Aminosäuren. Dies führt zu einer Änderung der Konfiguration und somit neuen Eigenschaften im aktiven Zentrum der β -Laktamasen (Stürenburg und Mack, 2003). Sie sind in der Lage, ein breiteres Spektrum an β -Laktam-Antibiotika zu hydrolysieren. ESBLs gehören zu der Ambler-Klasse A oder D, besitzen Serin in ihrem aktiven Zentrum und können Oxyimino-Cephalosporine (z. B. Ceftazidim, Cefotaxim) sowie Monobactame, wie Aztreonam, hydrolysieren (Bradford, 2001; Livermore, 1995). Sie sind im Allgemeinen durch β -Laktamase-Inhibitoren, wie Clavulansäure oder Sulbactam, hemmbar (Bush et al., 1995). *K. pneumoniae* sowie *E. coli* sind die am häufigsten vorkommenden ESBL-produzierenden Bakterien weltweit. Aber auch in anderen Genera der *Enterobacteriaceae* sowie in Nonfermentern wie z. B. *Acinetobacter* konnten ESBLs bereits detektiert werden (Pitout und Laupland, 2008).

Die für ESBLs kodierenden Gene befinden sich häufig auf Plasmiden und können innerhalb der Spezies sowie speziesübergreifend übertragen werden (Jacoby und Medeiros, 1991). Die erste plasmidkodierte β -Laktamase, die auch neuere β -Laktam-Antibiotika, wie Cephalosporine der 3. Generation hydrolysieren konnte, wurde 1983 in Deutschland beschrieben. Diese war mit dem SHV-1-Enzym aus *K. pneumoniae* verwandt (Canton und Coque, 2006; Philippon et al., 1989). Die ersten ESBLs unterschieden sich auf DNA-Ebene nur in wenigen Punktmutationen von den weit verbreiteten plasmidkodierten β -Laktamasen TEM-1, TEM-2 sowie SHV-1 (Bonnet, 2004). ESBL-produzierende Bakterien sind häufig auch gegen weitere Antibiotika wie Aminoglycoside, Tetracyclin sowie Trimethoprim-Sulfamethoxazol resistent. Die dafür kodierenden Gene liegen meist auf dem gleichen Plasmid wie die ESBL-Gene (Branger et al., 2005). Die weltweit am häufigsten nachgewiesenen ESBL-Typen sind, neben vielen anderen, TEM, SHV sowie CTX-M (Canton und Coque, 2006).

Im Folgenden wird auf die β -Laktamasen, die für die vorliegende Arbeit von Relevanz waren, genauer eingegangen.

2.2.1.1. TEM

TEM-1 wurde erstmals 1965 aus einem *E. coli*-Isolat eines griechischen Patienten namens Temoneira isoliert. Davon leitet sich auch der Name ab (Datta und Kontomichalou, 1965). TEM-2 bzw. TEM-13 unterscheiden sich von TEM-1 durch die Substitution einer bzw. zweier Aminosäuren (Jacoby und Medeiros, 1991). Dies hat keinen Einfluss auf das Substratspektrum. TEM-1, TEM-2 sowie TEM-13, die zu den Broad-Spectrum-Beta-Laktamasen gehören, hydrolysieren Penicilline sowie die ersten Cephalosporine wie

Cephalothin (Paterson und Bonomo, 2005). Alle TEM-ESBLs sind Verwandte von TEM-1 sowie TEM-2. Im Jahr 1988 berichteten Sougakoff et al. (1988) über neue plasmidkodierte β -Laktamasen in *K. pneumoniae*, *E. coli* sowie *Citrobacter freundii*. Diese waren in Frankreich und Deutschland für Infektionen, die auch mit Cephalosporinen der 3. Generation nicht zu behandeln waren, verantwortlich. Sie wurden mit TEM-3 bis TEM-7 bezeichnet. Heute sind über 200 verschiedene TEM-Typen beschrieben. Die meisten sind Extended-Spectrum-Beta-Laktamasen (Paterson und Bonomo, 2005). Einen Überblick über die verschiedenen Beta-Laktamasen bietet die Datenbank <https://www.lahey.org/studies/temtable.asp>.

2.2.1.2. SHV

SHV-1 (BSBL) ist der Vorgänger aller weiteren SHV-Varianten. Die Bezeichnung SHV leitet sich von „sulfhydryl variable“ ab, was sich auf die strukturelle Eigenschaft der Enzyme bezieht. SHV-1 verursacht Resistenzen gegen Penicilline wie Ampicillin oder Amoxicillin (Livermore, 1995). Bei den meisten *K. pneumoniae*-Stämmen befindet sich das SHV-1-Gen chromosomal. Es ist aber inzwischen, vor allem bei *E. coli*, häufig plasmidkodiert zu finden. Es wird vermutet, dass das Gen in ein Plasmid integriert wurde und so auch auf andere *Enterobacteriaceae* übertragen werden konnte (Stürenburg und Mack, 2003). 1983 wurden die ersten Isolate mit einer Resistenz gegen Cefotaxim sowie gegen weitere Cephalosporine der 3. Generation beschrieben. Diese neue, plasmidkodierte β -Laktamase, als SHV-2 bezeichnet, ist durch nur eine Mutation aus SHV-1 entstanden (Knothe et al., 1983). Die Mehrzahl der SHV-Varianten mit einem ESBL-Phänotyp zeichnet sich durch die Substitution von Glycin durch Serin an Position 238 aus (Bradford, 2001).

2.2.1.3. CTX-M

CTX-M-ESBLs, die weder TEM- noch SHV-verwandt sind, repräsentieren eine neuere und schnell wachsende ESBL-Familie (Bonnet, 2004). Ein CTX-M-Enzym wurde erstmals 1986 in einem Cefotaxim-resistenten *E. coli*, der aus einem japanischen Laborhund isoliert wurde, entdeckt (Matsumoto et al., 1988). Das erste klinische Isolat wurde 1989 in Deutschland aus dem Ohr eines Säuglings isoliert und als CTX-M-1 bezeichnet (Bauernfeind et al., 1990). CTX-M bezieht sich auf die starke hydrolytische Aktivität dieser Enzyme gegenüber Cefotaxim. Es wird vermutet, dass chromosomal kodierte β -Laktamasen von *Kluyvera* spp. die Vorgänger der plasmidkodierten CTX-M- β -Laktamasen waren (Humeniuk et al., 2002; Poirel et al., 2002). Anhand der Ähnlichkeit ihrer Aminosäure-Sequenz können CTX-M- β -Laktamasen in fünf Hauptgruppen unterteilt werden (Bonnet et al., 2000): CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 sowie CTX-M-25 (Bonnet, 2004). Tabelle 2 zeigt die fünf Hauptgruppen mit ihren dazugehörigen plasmidkodierten CTX-M-Varianten. Inzwischen gehören CTX-M- β -

Laktamasen zu den weltweit am weitesten verbreiteten ESBLs (Bonnet, 2004; Pitout und Laupland, 2008; Poirel et al., 2012).

Tabelle 2 Einteilung der CTX-M-Varianten sowie deren Ursprung und erste Isolierung. Modifiziert nach Canton und Coque (2006) sowie Rossolini et al. (2008)

CTX-M-Gruppe	CTX-M-1	CTX-M-2	CTX-M-8	CTX-M-9	CTX-M-25
Jahr (Enzym, Land¹)	1989 (CTX-M-1, D)	1986 (FEC-1, JP)	1996 (CTX-M-8, BR)	1994 (CTX-M-9, ES)	2000 (CTX-M-25, CA)
CTX-M-Varianten	CTX-M-1 CTX-M-3 CTX-M-10 CTX-M-11 CTX-M-12 CTX-M-15 (UOE-1) CTX-M-22 CTX-M-23 CTX-M-28 CTX-M-29 CTX-M-30 CTX-M-32 CTX-M-33 CTX-M-34 CTX-M-36 CTX-M-37 CTX-M-42 CTX-M-52 CTX-M-53 CTX-M-54 CTX-M-57 CTX-M-58 CTX-M-60 CTX-M-61	CTX-M-2 CTX-M-4 CTX-M-5 CTX-M-6 CTX-M-7 CTX-M-20 CTX-M-31 CTX-M-35 CTX-M-43 CTX-M-44 (TOHO-1) FEC-1	CTX-M-8 CTX-M-40 CTX-M-63	CTX-M-9 CTX-M-13 CTX-M-14 (UOE- 2, TOHO-3) CTX-M-16 CTX-M-17 CTX-M-18 CTX-M-19 CTX-M-21 CTX-M-24 CTX-M-27 CTX-M-38 CTX-M-45 (TOHO-2) CTX-M-46 CTX-M-47 CTX-M-48 CTX-M-49 CTX-M-50 CTX-M-51 CTX-M-55 CTX-M-65	CTX-M-25 CTX-M-26 CTX-M-39 CTX-M-41
Ursprung	<i>Kluyvera (K.) ascorbata</i>	<i>K. ascorbata</i>	<i>K. georgiana</i>	<i>K. georgiana</i>	ND

¹ D, Deutschland; JP, Japan; BR, Brasilien; ES, Spanien; CA, Canada
ND, nicht definiert; CTX-M-14 ist identisch mit CTX-M-18.

2.2.2. AmpC Beta-Laktamasen

Eine weitere Gruppe von Enzymen, die Resistenzen gegen eine Vielzahl von β -Laktam-Antibiotika vermittelt, ist die Gruppe der AmpC- β -Laktamasen. Sie vermitteln Resistenzen gegen Penicilline, Cephamycine sowie Cephalosporine aller Generationen mit Ausnahme von Cefepim und Cefpirom. Im Gegensatz zu den ESBLs sind sie nicht durch β -Laktamase-Inhibitoren wie Clavulansäure hemmbar (Jacoby, 2009). Sie sind ursprünglich bei fast allen *Enterobacteriaceae*, außer *Klebsiella* spp. sowie *Proteus* spp., chromosomal kodiert zu finden, werden aber meist auf einem niedrigen Niveau exprimiert. Sie können über die Gabe von β -Laktam-Antibiotika wie Cefoxitin induziert werden. Es kann außerdem durch Mutationen in der Promoter-Region zu einer dauerhaft hohen *ampC*-Expression kommen und somit zu einer Resistenz gegen die genannten Wirkstoffe. Auch Clavulansäure kann die *ampC*-vermittelte Resistenz in einem induzierbaren Organismus erhöhen (Jacoby, 2009). Zu plasmidkodierten, konstitutiv exprimierten AmpC- β -Laktamasen kam es durch die Integration des chromosomalen *ampC*-Gens verschiedener Spezies, wie *C. freundii* und *Enterobacter cloacae*, in Plasmide. Über horizontalen Gentransfer konnten die Resistenz vermittelnden Gene nun auch auf weitere Spezies wie *K. pneumoniae* übertragen werden (Philippon et al., 2002). Übertragbare *ampC*-Gene werden üblicherweise als plasmidkodierte AmpC oder auch pAmpC bezeichnet. Die erste plasmidkodierte AmpC- β -Laktamase war CMY-1 aus einem *K. pneumoniae*-Isolat aus Südkorea. Sie wurde 1989 von Bauernfeind et al. (1989) beschrieben. Kurz darauf folgte die Beschreibung von MIR-1 und CMY-2 durch Papanicolaou et al. (1990). Anschließend konnten plasmidkodierte AmpC- β -Laktamasen weltweit nachgewiesen werden (Philippon et al., 2002). Die für AmpC- β -Laktamasen kodierenden Gene liegen häufig mit weiteren Resistenzgenen auf einem Plasmid vor. Dies können z. B. Resistenz vermittelnde Gene gegen Aminoglycoside, Chloramphenicol, Sulfonamide, Tetrazykline, Trimethoprim oder auch Gene für andere β -Laktamasen wie ESBLs sein. Neben weiteren AmpC-Typen wie MOX, FOX, ACC, DHA sowie LAT gehört CMY-2 zu der häufigsten plasmidkodierten AmpC- β -Laktamase weltweit (Jacoby, 2009).

2.3. Prävalenzen und Epidemiologie

Resistenzen gegen β -Laktam-Antibiotika nehmen, insbesondere durch das vermehrte Vorkommen resistenter *Enterobacteriaceae*, sowohl im menschlichen als auch im tierischen Intestinaltrakt zu (Urumova, 2015). Die vermehrte Ausbreitung ESBL-produzierender *Enterobacteriaceae* kann auf die Verbreitung von Klonen, die Übertragung ESBL-Gen-tragender Plasmide oder den Austausch von ESBL-kodierenden Genen über mobile genetische Elemente zurückgeführt werden (Valentin et al., 2014). Da Cephalosporine der 3. und 4. Generation für die Therapie von Infektionskrankheiten, vor allem in der Humanmedizin, von Bedeutung sind (WHO, 2011), stellen ESBL-produzierende Bakterien eine zunehmende Bedrohung für eine erfolgreiche Therapie bei Mensch und Tier dar (Livermore, 2009; Olsen et al., 2014).

2.3.1. ESBL/AmpC-produzierende *Enterobacteriaceae* in der Umwelt

In den letzten Jahrzehnten nimmt die Belastung der Umwelt mit Antibiotika-resistenten Bakterien zu (Cornejova et al., 2015). Es konnten bereits in unterschiedlichen Ländern ESBL-produzierende *Enterobacteriaceae* in verschiedenen Matrices wie Wasser, Erde oder Luft nachgewiesen werden (Ben Said et al., 2016; Blaak et al., 2015; Kittinger et al., 2016; Korzeniewska und Harnisz, 2013b; Lu et al., 2010). Folglich sind Antibiotika-resistente Bakterien auch außerhalb medizinischer Einrichtungen aufzufinden (Blaak et al., 2015). Insbesondere die Verbreitung von ESBL-Bildnern in Gewässern stellt ein Risiko dar. Gewässer könnten als potentiell Reservoir von multiresistenten Bakterien unterschiedlicher Herkunft (z.B. Wasser von städtischen oder industriellen Abwässern, Regen, Landwirtschaft) fungieren (Zurfluh et al., 2013).

2.3.1.1. ESBL/AmpC-produzierende *Enterobacteriaceae* in Gewässern

Drieux et al. (2016) haben ESBL-bildende *E. coli* im Abwasser eines Krankenhauses nachgewiesen und quantifiziert. Die Konzentration der ESBL-*E. coli* lag zwischen 10^4 und 10^6 KbE/l. Die ESBL-bildenden Stämme des Abwassers wurden zudem mithilfe des DiversiLab-Systems untersucht. Das DiversiLab System ist eine automatisierte Plattform, die unter Verwendung der rep-PCR (Amplifikation von nicht-kodierenden repetitiven Sequenzen des bakteriellen Genoms) DNA-Fingerprints sowie eine vollständige Isolat-Charakterisierung erstellt. Sie wurden mit den Isolaten aus Patienten, die zur Zeit der Probennahme anwesend waren, verglichen. Die Stämme, die laut DiversiLab ähnlich waren, wurden zudem mittels PFGE untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass zwei der ESBL-*E. coli* Cluster des Abwassers mit denen von Patienten übereinstimmten. Die Autoren folgerten, dass ESBL-*E. coli*-positive Patienten über die Ausscheidung von ESBL-*E. coli* zur Verbreitung der resistenten Bakterien in die Umwelt beitragen können und die Notwendigkeit zur

Verbesserung der Abwassersituation in Krankenhäusern besteht. Eine wichtige Eintragsquelle von resistenten Bakterien sowie Antibiotikarückständen in die kommunalen Kläranlagen stellt somit das Abwasser von Krankenhäusern dar (Korzeniewska und Harnisz, 2013a; Osinska et al., 2017).

Hu et al. (2013) isolierten und verglichen CTX-M positive *E. coli* aus Wasser, Schweinen sowie gesunden und klinisch kranken Menschen in China. Sie verglichen die Isolate mittels phylogenetischer Einteilung, PFGE sowie MLST und folgerten, dass diese Erreger in der Umwelt sowohl vom Menschen als auch von Tieren stammen könnten. Zurfluh et al. (2013) konnten in 36,2 % (21/58) der Proben aus Flüssen und Seen der Schweiz ESBL-produzierende *Enterobacteriaceae* nachweisen. 58 dieser Isolate sowie 2 weitere Isolate wurden von Müller et al. (2016) hinsichtlich ihrer uropathogenen Virulenzfaktoren untersucht. Von insgesamt 60 untersuchten ESBL-positiven Oberflächengewässer-Proben zeigten 33,3 % uropathogene Virulenzeigenschaften.

Anastasi et al. (2010) zeigten, dass *E. coli*-Isolate mit uropathogenen Virulenzeigenschaften die Behandlungsprozesse in Kläranlagen überleben und somit in Oberflächengewässer gelangen können. Erst kürzlich zeigten auch Osinska et al. (2017), dass trotz Reduzierung chemischer und mikrobieller Kontaminanten während der Abwasserbehandlung Antibiotikaresistente Bakterien mit dem Abwasser in aquatische Ökosysteme gelangen können. In Österreich demonstrierten Reinhaller et al. (2010), dass nach erfolgter Klärschlammbehandlung in 61,1 % (44/72) der Proben ESBL-bildende *E. coli* zu finden waren, und folgerten, dass Klärschlamm ohne wirksame Behandlung gegen ESBL-bildende *E. coli* nicht mehr in der Landwirtschaft eingesetzt werden sollte. Von 104 *E. coli*-Stämmen aus einem städtischen Klärwerk in der Slowakei konnten 26 % als ESBL-Bildner identifiziert werden (Cornejova et al., 2015). In Deutschland wurden 2011 während des EHEC-Ausbruchsgeschehens Abwasserproben von zwei Klärwerken (Cuxhaven und Stade) auf *E. coli* untersucht (Heinemeyer et al., 2013). Im Mittel konnten im Abwasser der beiden Klärwerke *E. coli* mit $3,5 \times 10^6$ KBE/ml (davon 500 ESBL-bildende *E. coli*) nachgewiesen werden.

2.3.1.2. ESBL/AmpC-produzierende *Enterobacteriaceae* in der Umgebung von Tierställen

Aus Tierställen können Bakterien direkt mit dem Kot von z. B. Weidetieren oder indirekt z. B. durch Stallabluft, Staub, Fliegen, Mitarbeiter sowie Reinigungswasser in die Umwelt gelangen. Daher untersuchten Blaak et al. (2015) Geflügelbetriebe in den Niederlanden und deren Umgebung auf ESBL-produzierende *E. coli*. Spül- und Abwasser (21/26; 81 %), Staub (21/35; 60 %), an die Betriebe angrenzende Oberflächengewässer (20/35; 57 %), Fliegen (11/73;

15 %) sowie die Stallluft (2/33; 6 %) enthielten ESBL-produzierende *Enterobacteriaceae*. In den angrenzenden Oberflächengewässern konnten während oder kurz nach der Reinigung zwischen den Produktionsdurchläufen im Mittel ESBL-*E. coli*-Konzentrationen von $1,9 \times 10^2$ KbE/l ermittelt werden. Auch in der Studie von Laube et al. (2014) zeigten die Untersuchungen von sieben Mastgeflügelanlagen in Deutschland eine Ausbreitung ESBL/AmpC-produzierender *E. coli* innerhalb der Mastgeflügel Anlagen sowie eine Emission in die Umgebung. Auch hier konnte die Verwandtschaft von mehreren Isolaten aus dem Stall mit den Isolaten aus der Umgebung gezeigt werden. Die Studie beschreibt zudem erstmalig den möglichen Lufttransfer von ESBL-produzierenden *E. coli* aus einer Mastanlage in die Umgebung. So wiesen die *E. coli*-Isolate aus der Stallluft und der Luft 50 m leewärts ein 100 % identisches Bild in der Pulsed-Field-Gelelektrophorese (PFGE) auf.

Auch bei Schweinemastbetrieben in Deutschland konnte die fäkale Emission sowie die mögliche Verbreitung durch Fliegen mittels Analyse der Bandenmuster der Isolate gezeigt werden (von Salviati et al., 2015). Kontaminierte Gülle wurde hier als größte Emissionsquelle von ESBL/AmpC-produzierenden *E. coli* aus Schweinemastbetrieben beschrieben. Aber auch die Transmission über die Luft sowie über verschiedene Vektoren scheint möglich.

Hartmann et al. (2012) isolierten CTX-M-positive *E. coli* aus Erdproben von kultiviertem Ackerland in Frankreich (Burgund). Von 120 untersuchten Erd-DNA-Extrakten waren 22 (18,3 %) *bla*_{CTX-M}-positiv. Zudem wurden die Isolate mittels DiversiLab System und MLST mit Isolaten aus Kotproben von Rindern sowie aus Gülleproben der Region verglichen. Die Erdprobe eines Ackers, auf dem zuletzt vor einem Jahr Rinderdung ausgebracht worden war, enthielt *bla*_{CTX-M}-positive *E. coli*-Stämme. Diese Stämme waren nicht von den Tierstämmen des Betriebes zu unterscheiden. In einem anderen Betrieb waren *E. coli*-Isolate aus Weideboden sowie Rottemist *bla*_{CTX-M}-positiv. Das Isolat aus Rottemist war identisch mit einem bovinen Isolat.

Diese Studien verdeutlichen, dass ESBL/AmpC-produzierende *Enterobacteriaceae* auf verschiedenen Wegen in die Umwelt gelangen können. *E. coli* kann in Abhängigkeit von physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften der Matrix sowie Temperatur, pH, Sonnenlicht, Bodenfeuchte und Anwesenheit von Nährstoffen über Wochen bis Monate im Boden und in der aquatischen Umwelt überleben (Blaak et al., 2015; Franz et al., 2014). Die Umwelt könnte also für Menschen und Tiere eine potentielle Quelle für ESBL/AmpC-produzierende *Enterobacteriaceae* darstellen.

2.3.2. ESBL/AmpC-produzierende *Enterobacteriaceae* beim Tier

Eines der bedeutendsten Reservoirs für multiresistente gramnegative Bakterien ist neben dem Darm des Menschen der Darm von Tieren (Wellington et al., 2013). ESBL/AmpC-bildende *Enterobacteriaceae* konnten bereits aus den Fäzes von Nutztieren (Costa et al., 2009; Dierikx et al., 2013b; Horton et al., 2011; Von Salviati et al., 2014), Haustieren (Ewers et al., 2014; Schmiedel et al., 2014), Fischen (Jiang et al., 2012; Moremi et al., 2016), Wildtieren (Dias et al., 2015; Guenther et al., 2012; Literak et al., 2010b) sowie Insekten (Blaak et al., 2014; Loucif et al., 2016) isoliert werden. Dadurch sind Tierärzte, das Personal auf landwirtschaftlichen Betrieben sowie Schlachthof-Personal unmittelbar gefährdet, durch engen Kontakt mit den Tieren selbst mit resistenten Bakterien kolonisiert oder infiziert zu werden (Marshall und Levy, 2011).

In den letzten Jahren wurden ESBL-produzierende Bakterien hauptsächlich aus gesunden Nutztieren isoliert (Dahms et al., 2015). Die Prävalenz lag bei Geflügel bei 63,4 %. Bei den anderen Tierarten lag die Prävalenz niedriger und war je nach Tierart sehr unterschiedlich: 8,6 % in Fäzes von Schafen, 13,7 % in Fäzes von Rindern bzw. 25,3 % in Fäzes von Kälbern (Geser et al., 2012a). Der am häufigsten detektierte ESBL-Typ in Nutztieren in Europa ist *bla*_{CTX-M-1}. In Geflügel ist zudem *bla*_{SHV-12} sowie *bla*_{TEM-52} häufig zu finden (Seiffert et al., 2013). Auch *bla*_{CMY-2} weist in einigen Regionen eine hohe Prävalenz auf, sofern die Autoren AmpC- β -Laktamasen in ihrer Untersuchung berücksichtigt haben (Seiffert et al., 2013).

2.3.2.1. ESBL/AmpC-produzierende *Enterobacteriaceae* beim Geflügel

Nachdem seit Anfang der 2000er Jahre ESBL/AmpC-produzierende *E. coli* in einigen Studien aus kranken Tieren isoliert worden waren (Bradford et al., 1999; Brinas et al., 2003a; Teshager et al., 2000), erfolgte durch Brinas et al. (2003b) der erste Nachweis in gesunden Masthähnchen. Seitdem ist ein starker Anstieg ESBL/AmpC-bildender *Enterobacteriaceae* vor allem in Geflügel zu dokumentieren. Die Einzeltierprävalenz in Geflügel liegt in den ausgewählten Studien zwischen 13 % und 100 %. Auch auf Betriebsebene liegt die Prävalenz ESBL/AmpC-produzierender *Enterobacteriaceae* bei bis zu 100 % (Tabelle 3). Die am häufigsten isolierten *bla*-Gene in den aufgeführten Studien sind *bla*_{CMY-2} sowie *bla*_{CTX-M-1}, aber auch weitere *bla*_{CTX-M}-Typen, *bla*_{SHV} und *bla*_{TEM} kommen vor.

Tabelle 3 Einzeltier- bzw. Betriebsprävalenz ESBL/AmpC-produzierender *E. coli* bei Geflügel

Land ¹	Tierart ²	Prävalenz ³	häufige <i>bla</i> Gene	Referenz
BE	M	E: 27 % (n=489) B: 100 % (n=5)	CTX-M-1; TEM-52	(Smet et al., 2008)
CH	M	B: 25 % (n=120)	CMY-2; CTX-M-1	(Endimiani et al., 2012)
D	M	B: 100 % (n=8)	pAmpC	(Friese et al., 2013)
D	M	B: 75 % (n=4)	TEM; SHV	(Dahms et al., 2015)
	P	B: 0 % (n=2)		
D	M	E: 81,9 % (n=177) B: 100 % (n=34)	- -	(Hering et al., 2016)
ES	M	B: 100 % (n=10)	CTX-M-14; CMY-2	(Blanc et al., 2006)
JP	M	E: 100 % (n=41)	CMY-2; CTX-M-1	(Kameyama et al., 2013)
NO	M	E: 43 % (n=252)	CMY-2	(Mo et al., 2014)
PL	M	E: 55 % (n=33)	CMY-2	(Wasył et al., 2012)
PL	P	E: 48 % (n=25)	CTX-M-1	(Wasył et al., 2012)
PL	L	E: 42 % (n=23)	CMY-2; CTX-M-1	(Wasył et al., 2012)
SE	M	E: 40 % (n=100)	AmpC-CIT	(SWEDRES-SVARM, 2013)
SE	L	E: 13 % (n=69)	-	(SWEDRES-SVARM, 2013)
TN	M	E: 35 % (n=137)	CTX-M-1; CMY-2	(Maamar et al., 2016)

¹ BE, Belgien; CH, Schweiz; D, Deutschland; ES, Spanien; JP, Japan; NO, Norwegen; PL, Polen; SE, Schweden, TN, Tunesien

² M, Masthähnchen; L, Legehennen; P, Puten

³ E, Einzeltierprävalenz; B, Betriebsprävalenz; Betriebe, in denen aus mindestens einer Probe ESBL/AmpC-produzierende *E. coli* nachgewiesen werden konnten, wurden als positiv gewertet.

Dierikx et al. (2013b) haben die Prävalenz ESBL/AmpC-bildender *E. coli* in Hähnchen im Mastverlauf untersucht. Innerhalb der ersten Woche nahm die Prävalenz von 0 % - 24 % auf 96 - 100 % unabhängig von der Verwendung von Antibiotika zu und blieb bei 100 % bis zur Schlachtung. Am häufigsten konnte *bla*_{CMY-2} detektiert werden.

Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Laube et al. (2013) bei der Untersuchung von sieben konventionellen Mastbetrieben in Deutschland. Hier lag die durchschnittliche Prävalenz ESBL/AmpC-bildender *E. coli* zu drei Zeitpunkten (Einstellung, Mitte und Ende der Mast) bei 51 %, 75 % bzw. 76 %. Allerdings nahm die durchschnittliche Keimzahl putativer ESBL/AmpC-produzierender *E. coli* in den gepoolten Sammelkotproben ($1,25 \times 10^6$ KbE/g) im Mastverlauf nicht zu. Während in den Proben von Farm 1 und 2 vornehmlich *bla*_{CMY} sowie die Kombination *bla*_{CMY} + *bla*_{TEM-1} detektiert wurden, war in den Proben von Farm 3 und Farm 4 *bla*_{SHV-12} am häufigsten zu finden.

Die Prävalenz in zwei verfolgten Masthähnchenherden eines Biobetriebes in den Niederlanden stieg ebenfalls von 24 % bzw. 1 % bis zu Tag 3 auf 99 % bzw. 90 % an. Allerdings erfolgte hier eine Abnahme der Prävalenz bis zur Schlachtung (Tag 70) auf 36 % bzw. 81 % (Huijbers et al., 2016). Innerhalb einer Produktionsrunde war kein Masthähnchen mit ESBL/AmpC-bildenden *E. coli* derselben Phylogruppe positiv. Dies verdeutlicht, wie komplex die Übertragung von ESBL/AmpC-bildenden *E. coli* ist (Huijbers et al., 2016).

2.3.2.2. ESBL/AmpC-produzierende *Enterobacteriaceae* bei Schweinen

Auch bei Schweinen sind ESBL/AmpC-bildende *Enterobacteriaceae* weit verbreitet. Neben den europaweiten Nachweisen (EFSA, 2016; Escudero et al., 2010; Friese et al., 2013; Jorgensen et al., 2007) konnten unter anderem auch in Asien ESBL/AmpC-produzierende *Enterobacteriaceae* aus Schweinen isoliert werden (Tamang et al., 2013; Tian et al., 2009). Die Einzeltierprävalenz ausgewählter Studien liegt bei Schweinen zwischen 18 % und 49 %. Auf Betriebsebene schwankt die Prävalenz zwischen 1 % und 100 % (Tabelle 4). *bla*_{CTX-M-1} ist das am häufigsten nachgewiesene *bla*-Gen, aber auch weitere *bla*_{CTX-M}-Typen, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} sowie *bla*_{CMY} kommen beim Schwein vor.

Tabelle 4 Einzeltier- bzw. Betriebsprävalenz ESBL/AmpC-produzierender *E. coli* bei Schweinen

Land ¹	Tierart ²	Prävalenz ³	häufige <i>bla</i> Gene	Referenz
CH	S	B: 3 % (n=60)	CTX-M-1	(Endimiani et al., 2012)
D	M	B: 44 % (n=16)	CTX-M-Type	(Friese et al., 2013)
D	Z	B: 56 % (n=16)	CTX-M-Type	(Friese et al., 2013)
D	M	E: 37 % (n=420)		(Von Salviati et al., 2014)
D	M	B: 55 % (n=47)	CTX-M-1	(García-Cobos et al., 2015)
DK	S	B: 11 % (n=786)	CTX-M-1	(Agero et al., 2012)
DK	S	B: 1 % (n=137)	CTX-M-1	(Wu et al., 2008)
DK	S	E: 18 % (n=396) B: 30 % (n=20)	CTX-M-1	(Jorgensen et al., 2007)
ES	S	B: 80 % (n=10)		(Blanc et al., 2006)
KR	M	E: 22 % (n=558)	CTX-M-14	(Tamang et al., 2013)
PL	S	E: 33% (n=21)	CTX-M-1	(Wasyl et al., 2012)
PT	S	E: 49 % (n=71)	CTX-M-1	(Ramos et al., 2013)
UK	S	B: 100 % (n=7)	CTX-M-1	(Horton et al., 2011)
UK	M	E: 23 % (n=637)	CTX-M-1	(Randall et al., 2014b)

¹ CH, Schweiz; D, Deutschland; DK, Dänemark; ES, Spanien; KR, Korea; PL, Polen; PT, Portugal; UK, England

² M, Mastschweine; S, Schweine; Z, Zuchtschweine

³ E, Einzeltierprävalenz; B, Betriebsprävalenz; Betriebe, in denen aus mindestens einer Probe ESBL/AmpC-produzierende *E. coli* nachgewiesen werden konnten, wurden als positiv gewertet.

Auch für Schweine wurde die Prävalenz ESBL/AmpC-bildender *E. coli* während des Mastverlaufes ermittelt (Hansen et al., 2013; Von Salviati et al., 2014). In der dänischen Studie wurden Kotproben von insgesamt 54 Sauen kurz vor dem Abferkeln in drei verschiedenen Betrieben untersucht (Hansen et al., 2013). Im weiteren Verlauf wurden je zwei Ferkel pro Sau viermal während des Mastverlaufes beprobt. Es zeigte sich eine signifikante Abnahme der ESBL-*E. coli*-positiven Ferkel über die vier Probenahmen im Mastverlauf von 50 % kurz nach der Geburt, über 58 % kurz vor dem Absetzen und 29 % bei den Läufern auf 12 % während der Endmast. Auch bei der quantitativen Untersuchung der Cefotaxim-resistenten coliformen Bakterien nahm die Keimzahl im Mittel von $\sim 10^7$ KbE/g in den Kotproben der Saugferkel auf $\sim 10^3$ KbE/g in den Kotproben der Endmastschweine signifikant ab.

In der Untersuchung von sieben deutschen Mastbetrieben durch Von Salviati et al. (2014) gab es ebenfalls eine signifikante Abnahme der Keimzahl putativer ESBL/AmpC-produzierender *E. coli* von $2,97 \times 10^4$ KbE/g (erste Probenahme) auf $2,17 \times 10^3$ KbE/g (dritte Probenahme). Die Prävalenz lag einige Tage nach der Einstellung (Ende der Vormast) bei 45 % (n=140) und

fiel zur Mitte der Mast auf 29 % (n=140). In dieser Studie zeigte sich allerdings von der Mitte der Mast bis zum Ende der Mast ein erneuter Anstieg der Prävalenz ESBL/AmpC-bildender *E. coli* auf 36 % (n=140).

2.3.2.3. ESBL/AmpC-produzierende *Enterobacteriaceae* bei Rindern

Die Prävalenz ESBL/AmpC-produzierender *Enterobacteriaceae* ist beim Rind im Vergleich zu Geflügel und Schweinen niedriger. Die Einzeltierprävalenz der aufgeführten Studien liegt bei Rindern zwischen 0 % und 16 %. Auf Betriebsebene schwankt die Prävalenz zwischen 4 % und 100 % (Tabelle 5). Am häufigsten wurden *bla*_{CTX-M} der Gruppe 1 isoliert, aber auch weitere *bla*_{CTX-M}-Typen, *bla*_{TEM}, *bla*_{SVH} sowie *bla*_{CMY} konnten bereits isoliert werden.

Tabelle 5 Einzeltier- bzw. Betriebsprävalenz ESBL/AmpC-produzierender *E. coli* bei Rindern

Land ¹	Tierart ²	Prävalenz ³	häufige <i>bla</i> Gene	Referenz
CH	R	E: 8 % (n=571)	-	(Reist et al., 2013)
CH	R	B: 4 % (n=51)	CTX-M-1; CTX-M-15	(Endimiani et al., 2012)
D	R	B: 60 % (n=10)	CTX-M; TEM	(Friese et al., 2013)
D	R	E: 11 % (n=100)	CTX-M-1	(Wieler et al., 2011c)
D	R	B: 87 % (n=45)	CTX-M (Gruppe 1)	(Schmid et al., 2013)
FR	R	E: 6 % (n=607)	CTX-M-1	(Madec et al., 2008)
FR	R	B: 7 % (n=182)	CTX-M-1; TEM-71	(Hartmann et al., 2012)
KR	R	E: < 1 % (1/654)	CTX-M-15	(Tamang et al., 2013)
PL	R	E: 0 % (n=24)		(Wasył et al., 2012)
SE	K	E: < 1 % (1/202)	CTX-M-15	(SWEDRES-SVARM, 2013)
UK	R	B: 42 % (n=65)	CTX-M (Gruppe 1 u. 9)	(Snow et al., 2012)
UK	R	B: 100 % (n=3)	CTX-M-14; CTX-M-15	(Horton et al., 2011)
US	R	E: 16 % (n=1341)	CTX-M; TEM	(Mir et al., 2016)

¹ CH, Schweiz; D, Deutschland; FR, Frankreich; KR, Korea, PL, Polen; SE, Schweden; UK, England, US, Amerika

² K, Kälber; R, Rinder

³ E, Einzeltierprävalenz; B, Betriebsprävalenz; Betriebe, in denen aus mindestens einer Probe ESBL/AmpC-produzierende *E. coli* nachgewiesen werden konnten, wurden als positiv gewertet.

Wie auch in anderen Studien (Geser et al., 2012a; Horton et al., 2016; Liebana et al., 2006; Schmid et al., 2013) wiesen Watson et al. (2012) auf einem Milchviehbetrieb in England eine besonders hohe Prävalenz ESBL-bildender *E. coli* bei Kälbern (96 %) verglichen mit der bei Milchkühen (30 %) bzw. in der gesamten Herde (17 %) nach. Die Nachweishäufigkeit sank jedoch von 90 % bei 53 Tage alten Kälbern auf 10 % bei 117 Tage alten Kälbern. Die Autoren sahen einen möglichen Grund dafür unter anderem im Absetzen (im Alter von ca. 8 Wochen)

und einer sich verändernden Darmflora. Zudem wurden auch aus der Umgebung der Kälber (Abkalbeboxen) ESBL-bildende *E. coli* isoliert. Die Wahrscheinlichkeit für Kühe und Färsen, ESBL-*E. coli*-positiv zu sein, war ca. achtmal höher in den zehn Tagen nach dem Kalben als in den neun Tagen davor. Während die Kühe in der Laktation eine hohe Prävalenz ESBL-bildender *E. coli* aufwiesen, sank die Prävalenz während der Trockenstehzeit auf 3,4 %. Die hohe Prävalenz in bestimmten Rindergruppen und der Umgebung, insbesondere der Abkalbeboxen, verdeutlicht, dass der Einsatz von Antibiotika sowie die Hygiene möglicherweise einen großen Einfluss auf die Epidemiologie *bla*_{CTX-M}-positiver *E. coli* haben (Watson et al., 2012).

Um abzuklären, ob ein konventionelles Antibiotikaregime (parenterale sowie intramammäre Cephalosporin-Gabe) einen Einfluss auf den ESBL-Status von Milchkühen hat, haben Dolejska et al. (2011) einen konventionellen und einen Bio-Milchviehbetrieb auf ESBL-produzierende *E. coli* untersucht. Die Prävalenz war mit 39 % (120/309) in Rektaltupfern von Kühen in dem konventionellen Betrieb deutlich höher als in dem Biobetrieb mit < 1 % (1/154). Zudem konnten in dem Biobetrieb aus 46 Rektaltupfern von Kälbern keine ESBL-produzierenden *E. coli* isoliert werden. Dies verdeutlicht einen möglichen Einfluss der Cephalosporin-Verwendung auf die Verbreitung der ESBL-produzierenden *E. coli* im konventionellen Milchviehbetrieb (Dolejska et al., 2011).

In der Studie von Horton et al. (2016), die unter anderem markierte Kälber eines Betriebes zu sechs Zeitpunkten wiederholt beprobten, schieden fünf von zehn Kälbern etwa ab dem Zeitpunkt des Absetzens keine *bla*_{CTX-M}-positiven *E. coli* mehr aus. Die Kälber schieden im Untersuchungszeitraum zwischen 0 und 2×10^7 KBE/g putative ESBL-bildende *E. coli* aus. Die hohe Prävalenz sowie Persistenz ESBL-bildender *E. coli* bei Kälbern wurde von den Autoren, wie auch in der Studie von Randall et al. (2014a), mit dem Verfüttern von antibiotikahaltiger Sperrmilch in Zusammenhang gebracht.

2.3.2.4. ESBL/AmpC-produzierende *Enterobacteriaceae* bei Haustieren

In den vergangenen Jahren hat die Nachweishäufigkeit ESBL-bildender *E. coli* auch in klinischen Proben von Haustieren (Hunde, Katzen, Pferde) zugenommen (Walther et al., 2014). Aufgrund des zoonotischen Potenzials der multiresistenten Bakterien und des zunehmend engeren Kontaktes der Besitzer zu ihren Tieren können vermutlich neue Transmissions- und Infektionswege entstehen (Wieler et al., 2011a). Durch die zunehmend intensivmedizinische Versorgung nimmt die Population alter, chronisch kranker sowie immunkompromittierter Tiere und damit das Risiko für eine Besiedlung mit ESBL/AmpC-produzierenden *E. coli* zu (Wieler et al., 2011a).

Das erste klinische ESBL-positive Isolat von Haustieren war ein *bla*_{SHV-12}-positiver *E. coli* von einem Hund mit rezidivierender Harnwegsinfektion in Spanien (Teshager et al., 2000). Seitdem konnten in Europa (Ewers et al., 2010; Hordijk et al., 2013a; Huber et al., 2013; Poirel et al., 2013; Schaufler et al., 2015; Walther et al., 2014), aber auch weltweit (O'Keefe et al., 2010; So et al., 2012; Sun et al., 2010) zunehmend ESBL/AmpC-bildende *Enterobacteriaceae* von hospitalisierten Hunden, Katzen sowie Pferden isoliert werden. Darüber hinaus wurden europaweit (Carattoli et al., 2005; Costa et al., 2004; Costa et al., 2008; Gandolfi-Decristophoris et al., 2013; Hordijk et al., 2013a), aber unter anderem auch in Asien (Harada et al., 2011; Sun et al., 2010), Kanada (Murphy et al., 2009) sowie Tunesien (Sallem et al., 2013) ESBL/AmpC-produzierende *Enterobacteriaceae* auch von gesunden Haustieren isoliert. Die Prävalenz bei gesunden Hunden und Katzen liegt in den ausgewählten Studien zwischen 1 % (Hunde; n=188) bzw. 0 % (Katzen; n=39) (Murphy et al., 2009), 17,5 % (Hunde/Katzen n=80) (Sallem et al., 2013) und 45 % (Hunde; n=20) (Hordijk et al., 2013a). Die am häufigsten detektierten *bla*-Gene bei europäischen Haustieren sind *bla*_{CTX-M-1} sowie *bla*_{CTX-M-15} (Ewers et al., 2012). In Asien bzw. Amerika sind es *bla*_{CTX-M-14} bzw. *bla*_{CTX-M-15} und *bla*_{CTX-M-14} (Ewers et al., 2012).

In einer Longitudinalstudie von Baede et al. (2015) in den Niederlanden wurden die Kotproben von 38 gesunden Hunden über sechs Monate monatlich bzw. von sieben Hunden zusätzlich für sechs Wochen wöchentlich auf ESBL/AmpC-produzierende *Enterobacteriaceae* untersucht. Aus den Kotproben von 84 % (32/38) der Hunde konnte mindestens einmal ein ESBL/AmpC-produzierendes *Enterobacteriaceae*-Isolat nachgewiesen werden. Neun Hunde waren kontinuierlich positiv und 23 Hunde zeigten eine monatliche bzw. teilweise wöchentliche Änderung der Besiedlung mit ESBL/AmpC-produzierenden *Enterobacteriaceae*. Somit lag die Prävalenz, abhängig von dem gewählten Zeitpunkt, zwischen 45 % und 63 % (Baede et al., 2015). Es zeigte sich, dass sich durch das Verfüttern von rohem Fleisch das Risiko der Besiedlung mit ESBL/AmpC-produzierenden *E. coli* erhöhte. Bei der quantitativen Untersuchung der Kotproben lagen die Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* im Mittel bei 6×10^8 KbE/g ($1 \times 10^2 - 6 \times 10^{10}$ KbE/g). Die am häufigsten detektierten *bla*-Gene bei den Hunden waren *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{SHV-12} und *bla*_{CMY-2}.

2.3.2.5. ESBL/AmpC-produzierende *Enterobacteriaceae* bei Wildtieren

Wildtiere werden normalerweise nicht mit antimikrobiellen Wirkstoffen behandelt, können aber resistente Bakterien durch den Kontakt mit Menschen, domestizierten Tieren und der Umwelt erwerben. Insbesondere mit Kot belastetes Wasser scheint ein wichtiger Vektor zu sein (Guenther et al., 2011). Es konnten bereits ESBL/AmpC-bildende *Enterobacteriaceae* bei Wildtieren aus verschiedenen Ländern nachgewiesen werden (Guenther et al., 2012; Literak et al., 2010a; Literak et al., 2010b; Simoes et al., 2010; Zottola et al., 2013). In Portugal wurden

aus 10 % (8/77) der untersuchten Kotproben von Wildschweinen ESBL-bildende *E. coli* isoliert (Poeta et al., 2009). Als häufigstes *bla*-Gen wurde *bla*_{CTX-M-1} detektiert.

Stedt et al. (2015) wiesen in 29 % (906/3158) der Kotproben von Möwen ESBL-bildende *Enterobacteriaceae* während der Brutzeit in verschiedenen europäischen Ländern nach. Dabei gab es signifikante Unterschiede in der Nachweishäufigkeit verschiedener Länder. Eine hohe Prävalenz konnte in Spanien (75 %), den Niederlanden (38 %) sowie England (27 %) gezeigt werden. Hingegen waren die Möwen in Dänemark bzw. Polen gar nicht bzw. nur selten (<1 %) mit ESBL-bildenden *Enterobacteriaceae* kolonisiert. In den Proben aus England, Spanien und Portugal wurde am häufigsten *bla*_{CTX-M-14} detektiert, während in allen anderen beprobten Ländern (außer Schweden, *bla*_{CTX-M-15}) *bla*_{CTX-M-1} am häufigsten vorkam (Stedt et al., 2015).

Guenther et al. (2012) untersuchten Kotproben von Wildvögeln aus Deutschland und der Mongolei vergleichend auf ESBL-bildende *E. coli*, da häufiger Kontakt zu Menschen, Gülle aus der Intensivtierhaltung und die damit verbundene Last an Antibiotika-resistenten Bakterien für das Vorkommen ESBL-produzierender *E. coli* in Raubvögeln in Zentraleuropa verantwortlich gemacht werden (Guenther et al., 2012). Die mongolischen Vögel wurden in der Wüste Gobi beprobt, ein Gebiet mit sehr geringer Besiedlung, wenigen Nutztieren sowie ohne Ackerbau. Die Prävalenz ESBL-bildender *E. coli* in den insgesamt 281 untersuchten Kotproben von Vögeln war mit 5,2 % (Deutschland) bzw. 4,5 % (Mongolei) fast identisch. *bla*_{CTX-M-1} konnte am häufigsten in deutschen Isolaten und *bla*_{CTX-M-9} in mongolischen Isolaten detektiert werden. Die Daten weisen darauf hin, dass Zugvögel einen Einfluss auf die Transmission ESBL-produzierender *E. coli* haben können, da alle in der Mongolei beprobten Vögel regelmäßig Richtung Süden in Regionen mit hoher Nachweishäufigkeit ESBL-bildender *E. coli* sowohl bei Menschen als auch bei Nutztieren ziehen (Guenther et al., 2012).

Die Kolonisierung von Wildtieren durch antibiotikaresistente Bakterien über den Kontakt mit Abwässern oder tierischem Dünger könnte bei der globalen Verbreitung von Resistenzgenen von Bedeutung sein und schwerwiegende Folgen für die öffentliche Gesundheit, die Ökosystemfunktion sowie die Gesundheit von Tieren haben (Wellington et al., 2013).

2.3.2.6. Transmission ESBL/AmpC-produzierender *Enterobacteriaceae* zwischen Tier und Mensch

Die Übertragung Antibiotika-resistenter *Enterobacteriaceae* vom Tier auf den Menschen wird seit längerem vermutet. Es ist aber noch nicht abschließend geklärt, welchen Einfluss die Tier-zu-Mensch-Übertragung bei der Entstehung von Infektionen mit ESBL-bildenden

Enterobacteriaceae des Menschen hat. Der Kontakt zu Nutztieren könnte einen wichtigen Risikofaktor für die Besiedlung des menschlichen Intestinaltraktes mit ESBL-*Enterobacteriaceae* darstellen (Denkel et al., 2016). Einige Studien haben den möglichen Transfer von ESBL-Plasmiden sowie ESBL-produzierenden *Enterobacteriaceae* zwischen Tieren (Nutz- und Haustiere) und Menschen untersucht (Carvalho et al., 2016; Dahms et al., 2015; Hammerum et al., 2014; Huijbers et al., 2014; Huijbers et al., 2015; Leverstein-van Hall et al., 2011).

Es konnten Ähnlichkeiten zwischen Genen und Plasmiden der ESBL/AmpC-produzierenden *E. coli* von Landwirten und ihren Masthähnchen in den Niederlanden gezeigt werden (Dierikx et al., 2013a). Auch Huijbers et al. (2014) kamen zu dem Ergebnis, dass die Prävalenz unter Personen mit viel Kontakt zu Masthähnchen mit 27,1 % höher war als bei Personen mit wenig Kontakt zu Masthähnchen (14,3 %). Zudem zeigten fünf humane sowie aviäre Isolate gleiche ESBL/AmpC-Gene, Plasmide und *E. coli*-Sequenztypen. Dies deutet auf eine klonale Transmission hin. Außerdem zeigten sich bei unterschiedlichen Sequenztypen gleiche ESBL/AmpC-Gene auf gleichen Plasmid-Typen, sodass hier auch ein horizontaler Gentransfer wahrscheinlich scheint.

Auch bei der Untersuchung von Personal in Rinder-, Schweine- sowie Geflügelbetrieben in Deutschland waren drei der Mitarbeiter der Rinder- und zwei der Schweinebetriebe ESBL-*E. coli*-positiv (Dahms et al., 2015). Ein humanes Isolat zeigte den identischen Sequenztyp zu einem bovinen Isolat. Dies deutet auf einen klonalen Transfer ESBL-produzierender *E. coli* zwischen Rind und Mensch hin. Außerdem wurde auch hier, aufgrund gleicher ESBL-Gene, ein horizontaler Gentransfer zwischen humanen und porcinen Isolaten sowie humanen und bovinen Isolaten als wahrscheinlich angesehen.

In der Studie von Dohmen et al. (2015) wurde die Anzahl humaner ESBL-Träger mit der durchschnittlichen Arbeitszeit im Schweinebetrieb (OR = 1,04; 95 % CI 1,02 – 1,06) sowie dem Vorhandensein von ESBL-positiven Schweinen (OR = 12,5; 95 % CI 1,4 – 111,7) in Verbindung gebracht. Alle Personen, bei denen ESBL-bildende *Enterobacteriaceae* nachgewiesen werden konnten, arbeiteten mindestens 20 h pro Woche in dem Schweinebetrieb. Zudem zeigten humane und porcine Isolate aus demselben Betrieb teils gleiche ESBL-Gene. Die Isolate aus zwei Betrieben zeigten identische Sequenz- und Plasmidtypen, was auf eine klonale Übertragung hindeutet.

Zu einem anderen Ergebnis kamen de Been et al. (2014), nach einer Ganzgenomsequenzierung humaner, aviärer sowie porciner Isolate. Die Ergebnisse lieferten

keinen Beweis für eine klonale Übertragung, allerdings waren die Plasmide der humanen und jeweiligen tierischen Isolate nahezu identisch, sodass von einem horizontalen Gentransfer ausgegangen wurde.

Meyer et al. (2012) untersuchten Rektaltupfer von Teilnehmern eines Symposiums für Krankenschwestern und Ärzte aus Krankenhäusern in Österreich und Deutschland. Die freiwilligen Teilnehmer füllten zudem einen Fragebogen hinsichtlich bestimmter Risikofaktoren für die Besiedlung mit ESBL-*Enterobacteriaceae* aus. 3,4 % (8/231) der Teilnehmer waren ESBL-positiv. Es zeigte sich unter anderem, dass durch das Halten von Haustieren eine siebenfach höhere Chance bestehen würde, ESBL-positiv zu sein. Carvalho et al. (2016) zeigten, dass 9,5 % von 42 ESBL-produzierenden *E. coli* von Hunden und Besitzern identische PFGE-Profile zeigten. Somit stellen Hunde eine potentielle Quelle für ESBL-*E. coli* für ihre Besitzer dar. Ljunquist et al. (2016) kamen in ihrer Studie zu dem umgekehrten Schluss. Sie fanden bei ESBL-positiven Menschen identische Stämme bei den dazugehörigen Hunden. Sie folgerten eine mögliche Übertragung von den Besitzern auf ihre Hunde. Diese Vermutung wurde bestärkt, da sie keine ESBL-positiven Hunde in Haushalten mit ESBL-negativen Menschen fanden.

Schaufler et al. (2016) verdeutlichen in ihrer Studie eine mögliche Spezies-übergreifende Übertragung eines ST410 ESBL-*E. coli*-Klons zwischen Wildvögeln, Hunden und Menschen. Es zeigten sich fast identische Makrorestriktionsmuster sowie eine geringe Anzahl von Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) mit max. 75 SNPs in Cluster I (sechs Isolate) und max. 85 SNPs in Cluster II (vier Isolate) in der anschließenden Ganzgenom-sequenzierung der insgesamt zehn ESBL-*E. coli*-Isolate (ST410). Somit wiesen die Isolate innerhalb der Cluster eine starke klonale Verwandtschaft auf.

Es wird deutlich, dass der direkte Kontakt zu Nutz-, Wild- sowie Haustieren ein Risiko für die Besiedlung mit ESBL/AmpC-produzierenden *Enterobacteriaceae* für den Menschen darstellen könnte. Aber unter Umständen könnte auch die Übertragung vom Menschen zum Tier von Relevanz sein.

2.3.3. ESBL/AmpC-produzierende *Enterobacteriaceae* während des Schlachtprozesses

Verschiedene Studien haben Nutztiere vor bzw. während der Schlachtung auf Antibiotika-resistente *Enterobacteriaceae* untersucht (Agero et al., 2012; Enne et al., 2008; Geser et al., 2011; Hordijk et al., 2013b; Moreno et al., 2007). Die hohe Prävalenz ESBL/AmpC-bildender *Enterobacteriaceae*, insbesondere bei Geflügel (Costa et al., 2009; Geser et al., 2012a;

Huijbers et al., 2015; Moreno et al., 2007) deutet darauf hin, dass mit ESBL/AmpC-produzierenden *E. coli* kolonisierte bzw. kontaminierte Masthähnchen in den Schlachthof gelangen (Huijbers et al., 2016).

Die Prävalenz ESBL-produzierender *Enterobacteriaceae* lag in den 51 untersuchten Caeca bzw. auf den 70 untersuchten Karkassen (nach Kühlung) in einer Studie von Reich et al. (2013) bei 72,5 % bzw. 88,6 %. Die Prävalenz AmpC-produzierender *Enterobacteriaceae* lag bei 56,9 % (Caecum) bzw. 52,9 % (Karkassen). Zudem haben diese Autoren die putativen ESBL-produzierenden *E. coli* auf den Karkassen quantifiziert. Dabei lagen 34 % (24/70) der Karkassen über der Nachweisgrenze von 5×10^3 KbE/Karkasse. Die Keimzahlen ESBL-bildender *E. coli* lagen zwischen 5×10^3 und $1,5 \times 10^4$ KbE/Karkasse. Die Verteilung der ESBL-Gene war mit den zuletzt aus Europa und anderen Kontinenten gezeigten vergleichbar. Am häufigsten wurden die Gene *bla*_{CTX-M} sowie *bla*_{AmpC-CIT} detektiert (Reich et al., 2013).

Da eine Auswertung der quantitativen Belastung von Fleisch mit ESBL-bildenden *E. coli* die Voraussetzung für eine bessere Einschätzung der Verbraucherexposition darstellt und diese Daten immer noch limitiert sind, untersuchten Reich et al. (2016) in einer zweiten Studie Caecuminhalt (gepoolt) sowie Halshaut (gepoolt) auf drei verschiedenen Schlachthöfen qualitativ sowie quantitativ auf ESBL-bildende *E. coli* sowie auf die Gesamtanzahl an *E. coli*. Sie konnten ESBL-produzierende *E. coli* aus 90 % bzw. 70 % der gepoolten Caecum- bzw. Halshautproben isolieren. Es lagen 32,7 % (n = 150) der gepoolten Halshautproben über der Nachweisgrenze von 10 KbE/g. Die *E. coli*-Konzentration lag im Mittel bei $7,9 \times 10^7$ KbE/g im Caecuminhalt bzw. $2,5 \times 10^2$ KbE/g in den Halshautproben. Die Konzentration ESBL-produzierender *E. coli* lag im Mittel bei 5×10^4 KbE/g (Caecum) bzw. $2,5 \times 10^1$ KbE/g (Halshaut). Eine hohe Prävalenz ESBL-bildender *E. coli* bedingte jedoch keine hohen ESBL-*E. coli*-Konzentrationen. Zudem folgerten Reich et al. (2016), dass die *E. coli*-Konzentration zwar einen Indikator für die fäkale Verunreinigung darstellt, jedoch unzureichend für eine Abschätzung der ESBL-*E. coli*-Konzentration ist. Die niedrige Konzentration ESBL-produzierender *E. coli* von durchschnittlich $2,5 \times 10^1$ KbE/g in den Halshautproben deutet darauf hin, dass der Einfluss von Masthähnchenfleisch auf die Übertragung ESBL-bildender *E. coli* auf den Menschen begrenzt ist (Reich et al., 2016).

Bei der quantitativen Untersuchung von Hähnchenkarkassen während des Schlachtprozesses auf zwei Schlachthöfen, stellten Pacholewicz et al. (2015) eine signifikant variierende Konzentration ESBL/AmpC-produzierender *E. coli* zwischen den Chargen fest. Die Konzentration auf den Karkassen (Karkassenspülmethode) wurde über die Prozessschritte (Entbluten, Brühen, Rupfen, Ausnehmen, Kühlen) um ca. 2 Logstufen/ml reduziert. Nach der

Kühlung lag die ESBL/AmpC-*E. coli*-Konzentration zwischen 10^2 und 10^5 KbE/Karkasse. Es konnten die Gene *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{SHV-12}, *bla*_{CMY-2} sowie *bla*_{TEM-52} detektiert werden. Die Veränderungen in der ESBL/AmpC-*E. coli*-Konzentration entlang der Prozesskette waren ähnlich wie die Konzentrationsänderungen der Gesamtzahl an *E. coli*. Sowohl die geschlachtete Herde als auch der Schlachthof hatten einen Einfluss auf die Änderungen der ESBL/AmpC-*E. coli*-Konzentration während der Prozesskette. Somit haben sowohl die Primärproduktion als auch die Kontrolle der Prozessschritte am Schlachthof einen Einfluss auf die Reduktion ESBL/AmpC-bildender *E. coli* im Endprodukt (Pacholewicz et al., 2015).

2.3.4. ESBL/AmpC-produzierende *Enterobacteriaceae* im Lebensmittel

Lebensmittelliefernde Tiere, insbesondere Geflügel, stellen ein mögliches Reservoir für resistente Bakterien dar. Somit könnte es über den Verzehr von Fleisch zu einer Übertragung ESBL/AmpC-bildender *Enterobacteriaceae* auf den Menschen kommen (Reich et al., 2016). Eine Übertragung von Antibiotikaresistenzen über das Lebensmittel könnte sowohl durch die Übertragung ESBL-Gen-tragender Plasmide auf die Stämme der Darmflora des Menschen (Denkel et al., 2016) als auch durch eine direkte Kolonisierung des Darmes des Menschen mit ESBL-bildenden *Enterobacteriaceae* erfolgen (Leverstein-van Hall et al., 2011). ESBL/AmpC-produzierende *Enterobacteriaceae* konnten bereits in verschiedenen Lebensmitteln wie Fleisch, Gemüse und Kräutern nachgewiesen werden (Cohen Stuart et al., 2012; Kola et al., 2012; Nguyen do et al., 2016; Veldman et al., 2014; Zogg et al., 2016; Zurfluh et al., 2015).

Im aktuellen Zoonose-Monitoring 2014 für Deutschland (BVL, 2016) wurden Lebensmittel liefernde Tiere sowie Lebensmittel auf ESBL/AmpC-produzierende *E. coli* untersucht. Dabei wird insbesondere das Vorkommen ESBL/AmpC-produzierender *E. coli* bei Kräutern als problematisch bewertet, da diese häufig roh verzehrt werden. Eine hohe Prävalenz wiesen mit 39 – 46 % ESBL/AmpC-produzierenden *E. coli* Geflügelkotproben auf. Eier schienen hingegen mit 0,5 % ESBL-positiven Schalen deutlich seltener kontaminiert zu sein (Tabelle 6). Im Zoonose-Monitoring des Vorjahres (2013) (BVL, 2015) lag die Prävalenz ESBL/AmpC-bildender *E. coli* im Kot von Zuchthühnern bzw. Masthühnern bei 45 % (42/93) bzw. 65 % (85/131). Allerdings ist die Prävalenz bei Legehennen auch in anderen Studien niedriger als bei Mastgeflügel (SWEDRES-SVARM, 2013; Wasyl et al., 2012). Im Zoonose-Monitoring 2013 lag die Prävalenz ESBL/AmpC-bildender *E. coli* in Hähnchenfleisch (mit und ohne Haut) mit 66 % (95/144) deutlich höher als in Rindfleisch mit 4 % (5/132).

Tabelle 6 ESBL/AmpC-bildende *E. coli* bei Geflügel (Legehennen) und in Lebensmitteln (Eier, Kräuter) aus dem Zoonose-Monitoring 2014 in Deutschland, modifiziert nach BVL (2016)

Matrix	Anzahl untersuchter Proben	ESBL/AmpC-bildende <i>E. coli</i> -positive Proben	ESBL/AmpC-bildende <i>E. coli</i> -positive Proben (in %) (95 % CI)
Erzeugerbetriebe			
Kot aus Zuchthühnerbetrieben der Legerichtung	61	24	39,3 (28,1 – 51,9)
Kot aus Legehennenbetrieben	922	421	45,7 (42,5 – 48,9)
Einzelhandel			
Konsumeierschalen	427	2	0,5 (0,0 – 1,8)
frische Kräuter	405	9	2,2, (1,1 – 4,2)

Im aktuellen EFSA-Report (EFSA, 2016) wurden putative (nach Phänotypisierung) ESBL/AmpC-produzierende *E. coli* sowie *Salmonella* in Geflügel aus den Mitgliedstaaten erfasst. Die erfasste Prävalenz der putativen ESBL/AmpC-bildenden *Enterobacteriaceae* lag verglichen mit Studien aus den letzten Jahren sowohl für Hähnchenfleisch (Belmar Campos et al., 2014; Borjesson et al., 2013; Cohen Stuart et al., 2012) als auch für lebendes Geflügel (Geser et al., 2012a; Laube et al., 2013; Smet et al., 2008) um ca. 50 % niedriger (Tabelle 7). Möglicherweise könnte dies auf die freiwillige Teilnahme an dem Monitoring sowie auf die begrenzte Anzahl teilnehmender Länder zurückzuführen sein (EFSA, 2016).

Tabelle 7 Prozentualer Anteil putativer (nach Phänotypisierung) ESBL/AmpC-bildender *E. coli*- und *Salmonella*-Isolate bei Geflügel auf EU-Ebene in 2014, modifiziert nach EFSA (2016)

Matrix	<i>Escherichia coli</i>		<i>Salmonella</i>	
	Probenzahl	n ¹ (%R) ²	Probenzahl	n ¹ (%R) ²
Hähnchenfleisch	-	-	672	3 (0,4)
Masthähnchen	4179	245 (5,8)	2293	52 (2,3)
Legehennen	-	-	872	3 (0,3)
Puten	1457	72 (4,9)	-	-

¹ n, Anzahl der Isolate

² (%R), Prozentualer Anteil putativer ESBL/AmpC-bildender *E. coli*- bzw. *Salmonella*- Isolate (n)

-, keine Daten

2.3.4.1. ESBL/AmpC-produzierende *Enterobacteriaceae* in Geflügelfleisch

In Studien verschiedener Länder aus den letzten Jahren, die Geflügelfleisch auf ESBL/AmpC-bildende *Enterobacteriaceae* untersucht haben, lag die Prävalenz zwischen 32 % und 93 % (Tabelle 8).

Cohen Stuart et al. (2012) haben 60 Hähnchenbrüste aus konventioneller und 38 aus Biohaltung auf ESBL-*Enterobacteriaceae* untersucht. Die Prävalenz lag bei 100 % für Fleisch aus konventioneller und bei 84 % für Fleisch aus Biohaltung. Am häufigsten konnte sowohl in konventionellem als auch in Biofleisch *bla*_{CTX-M-1}, gefolgt von *bla*_{TEM-52} und *bla*_{SHV-12} detektiert werden. Bei der quantitativen Untersuchung lagen die Keimzahlen der ESBL-produzierenden *Enterobacteriaceae* im Median bei 80 KbE / 25 g für konventionelles Hähnchenfleisch und bei < 20 KbE / 25 g für Bio-Hähnchenfleisch. Egea et al. (2012) zeigten, dass die Prävalenz ESBL-bildender *E. coli* in Geflügelfleisch in Spanien von 62,5 % (2007) auf 93,3 % (2010) zugenommen hat. *bla*_{SHV-12} wurde am häufigsten detektiert, obwohl es verglichen mit der Untersuchung im Jahr 2007 weniger häufig nachgewiesen wurde. Die Prävalenz *bla*_{CTX-M}-positiver *E. coli* ist hingegen angestiegen (Egea et al., 2012).

Tabelle 8 Prävalenz ESBL/AmpC-produzierender *Enterobacteriaceae* in Hähnchenfleisch aus verschiedenen Ländern

Land ¹	Zeitpunkt ²	Prävalenz	häufige <i>bla</i> -Gene	Referenz
AT	EH	42 % (n=50)	CTX-M-1, SHV-12	(Zarfel et al., 2014)
CH	EH	41,3 % (n=80)	CTX-M-1, SHV-12	(Zogg et al., 2016)
D	EH	60% (n=120)	CTX-M-1, SHV-12	(Belmar Campos et al., 2014)
D	EH	43,9 % (n=399)	SHV-12, CTX-M-1	(Kola et al., 2012)
GB	EH	65,4 % (n=159)	CTX-M-1	(Randall et al., 2017)
IT	EH	58 % (n=163)	TEM; SHV	(Ghodousi et al., 2015)
NL	EH	79,8 % (n=89)	CTX-M-1, TEM-52, SHV-12	(Overdevest et al., 2011)
NO	EH	32 % (n=205)	CMY-2	(Mo et al., 2014)
SE	EH	44% (n=100)	CMY-2	(Borjesson et al., 2013)
VN	EH, GH, S	92,7 % (n=82)	CTX-M-9, CTX-M-1, AmpC-CIT	(Nguyen do et al., 2016)

¹AT, Österreich; CH, Schweiz; D, Deutschland; GB, Großbritannien; IT, Italien; NL, Niederland; NO, Norwegen; SE, Schweden; VN, Vietnam

²EH, Einzelhandel; GH, Großhandel; S, Schlachthof

2.3.4.2. ESBL/AmpC-produzierende *Enterobacteriaceae* in Schweine- und Rindfleisch

Die Prävalenz ESBL/AmpC-produzierender *Enterobacteriaceae* in Schweine- und Rindfleisch liegt in der Regel mit 0 % - 34 % deutlich unter der Prävalenz der resistenten Bakterien in Geflügelfleisch. In der Studie von Randall et al. (2017) bzw. von Overdevest et al. (2011) zeigte sich eine niedrige Prävalenz ESBL-bildender *Enterobacteriaceae* sowohl in Rindfleisch mit 1,9 % bzw. 4,7 % als auch in Schweinefleisch mit 2,5 % bzw. 1,8 %.

Springer und Bruckner (2012) untersuchten Rinder- bzw. Schweinehackfleisch und konnten in 3,7 % der Rinder- bzw. 3,6 % der Schweinehackfleischproben ESBL-Bildner nachweisen. Eine deutlich höhere Prävalenz zeigten Petternel et al. (2014) bzw. Nguyen do et al. (2016) mit 20 % für gemischtes Hackfleisch bzw. ca. 34 % für Schweine- sowie Rindfleisch. Hingegen wiesen Geser et al. (2012a) in 104 Rinder- sowie Schweinehackfleischproben in der Schweiz keine ESBL-produzierenden *Enterobacteriaceae* nach.

2.3.4.3. ESBL/AmpC-produzierende *Enterobacteriaceae* in Wildtierfleisch

Trotz zunehmender Prävalenz resistenter Bakterien bei Wildtieren (Guenther et al., 2011), konnten Marteus-Vargas et al. (2017) bei der Untersuchung von 51 gefrorenen Wildfleischproben (Wildschwein, Rotwild, Reh) nur ein ESBL-positives (*bla*_{CTX-M-1}) *E. coli*-Isolat nachweisen. Insgesamt zeigten 7 % (16/229) der *E. coli*-Isolate gegen mindestens eines der getesteten Antibiotika (Ampicillin, Chloramphenicol, Doxycycline, Cephalosporine, Aztreonam) eine Resistenz. In einer anderen Studie konnte lediglich ein Antibiotika-resistentes *E. coli*-Isolat in Wildfleisch nachgewiesen werden (Mayrhofer et al., 2006).

2.3.4.4. ESBL/AmpC-produzierende *Enterobacteriaceae* in pflanzlichen Lebensmitteln

Abgesehen von tierischen Lebensmitteln können ESBL/AmpC-bildende *Enterobacteriaceae* auch in pflanzlichen Nahrungsmitteln (Gemüse, Kräuter, Obst) vorkommen (Blaak et al., 2014; Nuesch-Inderbinen et al., 2015; Schwaiger et al., 2011; Veldman et al., 2014). Die erfasste Prävalenz ESBL/AmpC-bildender *Enterobacteriaceae* in Gemüse und Obst der ausgewählten Studien variiert zwischen 0 % und 25 %. Randall et al. (2017) konnten in 400 Obst- und Gemüseproben keine ESBL-*E. coli* nachweisen. In anderen Studien wurden bei 5,2 % (63/1216), 5,9 % (7/119) bzw. 8,2 % (4/49) der untersuchten Gemüseproben ESBL/AmpC-produzierende *Enterobacteriaceae* nachgewiesen (Ben Said et al., 2015; Reuland et al., 2014; van Hoek et al., 2015). Eine deutlich höhere Prävalenz zeigten Zurfluh et al. (2015) als sie 169 aus der Dominikanischen Republik, Indien, Thailand und Vietnam importierte Gemüseproben untersuchten. 25,4 % der Proben enthielten ESBL-produzierende *Enterobacteriaceae*. Sie führten die hohe Prävalenz auf die sehr unterschiedlichen landwirtschaftlichen Standards in den exportierenden Ländern verglichen mit denen der meisten europäischen und nordamerikanischen Staaten zurück. In der Landwirtschaft können pflanzliche Produkte durch das Ausbringen von Dünger und Klärschlamm oder durch die Bewässerung mit behandeltem, unzureichend behandeltem oder unbehandeltem Abwasser verunreinigt werden (Hartmann et al., 2012).

Insgesamt wird deutlich, dass ESBL/AmpC-bildende *Enterobacteriaceae* in verschiedenen Lebensmitteln vorkommen können. Somit könnte durch die Aufnahme kontaminierter Lebensmittel eine Besiedlung oder Infektion des Menschen mit resistenten Bakterien erfolgen (Randall et al., 2017).

2.3.4.5. Transmission ESBL/AmpC-produzierender *Enterobacteriaceae* über das Lebensmittel

Es wird deutlich, dass die Prävalenz ESBL/AmpC-bildender *Enterobacteriaceae* je nach Lebensmittel sehr unterschiedlich ist. Insbesondere Geflügel scheint ein Reservoir für

ESBL/AmpC-produzierende *Enterobacteriaceae* darzustellen. Da Geflügelfleisch in der Regel durchgegart verzehrt wird (Reich et al., 2016), kann davon ausgegangen werden, dass ESBL/AmpC-produzierende *Enterobacteriaceae* abgetötet werden. Jedoch kamen Depoorter et al. (2012) in ihrer Modell-Studie zu dem Ergebnis, dass die Mehrheit der Expositionen über Kreuzkontaminationen in der Küche entsteht. Dies wird auch durch andere Studien bestärkt. So wiesen Tschudin-Sutter et al. (2014) auf 12 % (15/126) der Schneidebretter und 50 % (10/20) der Handschuhe ESBL-bildende *E. coli* nach der Geflügelzubereitung nach. Rinder-, Schweinehackfleisch, Obst, Gemüse und Kräuter werden zudem auch roh verzehrt.

Verschiedene Studien haben sich mit der potentiellen Übertragung ESBL/AmpC-bildender *Enterobacteriaceae* über das Lebensmittel (insbesondere Geflügelprodukte) auf den Menschen beschäftigt (Belmar Campos et al., 2014; Borjesson et al., 2016; Evers et al., 2017; Kluytmans et al., 2013; Zurfluh et al., 2014). Dabei wird kontrovers diskutiert, ob und inwieweit eine Übertragung über das Lebensmittel auf den Menschen stattfindet. Mögliche Zusammenhänge könnten zwischen ESBL-produzierenden *E. coli* des Menschen und des Geflügels bestehen, da die untersuchten Stämme aus Geflügelfleisch, Geflügel und Menschen eine ähnliche Verteilung der ESBL-Gene sowie Plasmidtypen zeigten (Kluytmans et al., 2013; Leverstein-van Hall et al., 2011; Overdevest et al., 2011). Ein Vorhersagemodell auf der Grundlage der analysierten Daten klassifizierte 40 % der humanen Isolate als Isolate aus Hühnerfleisch (Kluytmans et al., 2013). Über AFLP und PFGE zeigten sie, dass die Isolate vom Menschen und vom Geflügelfleisch nicht zu unterscheiden waren, und diese zeigten in einem Fall eine perfekte Übereinstimmung (Kluytmans et al., 2013). Diese Ergebnisse sprechen höchstwahrscheinlich für eine lebensmittelassoziierte Übertragung der resistenten Bakterien von Geflügel auf den Menschen (Leverstein-van Hall et al., 2011).

Hingegen stellten Belmar Campos et al. (2014) bei Ihrer Untersuchung keine Korrelation zwischen Isolaten aus Hähnchenfleischproben und Isolaten aus Stuhlproben von Patienten mit gastrointestinalen Beschwerden aus einem Hamburger Krankenhaus fest. Die Unterschiede der ESBL-Genotypen, Sequenztypen sowie Antibiotika-Resistenz-Muster zeigten, dass in diesem klinischen Zusammenhang Hähnchenfleisch keinen großen Einfluss auf die Besiedlung des Menschen mit ESBL-bildenden *Enterobacteriaceae* hatte (Belmar Campos et al., 2014).

Borjesson et al. (2016) kamen zu dem Schluss, dass Geflügel und Hähnchenfleisch ein Reservoir für ESBL/AmpC-produzierende *E. coli* sowie eine Infektionsquelle für den Menschen darstellen könnten. Sie konnten jedoch keine klonale Verbreitung ESBL/AmpC-produzierender *E. coli* vom Lebensmittel zum Menschen beweisen. Allerdings wurden ESBL/AmpC-

produzierende *E. coli* mit identischen Genen und Plasmiden in Nutztieren, Lebensmitteln und Menschen nachgewiesen.

Evers et al. (2017) kamen in ihrem Modell zu dem Ergebnis, dass der Konsum von Rindfleisch zu einer höheren (78 %) Exposition mit ESBL/AmpC-produzierenden *E. coli* als der Konsum von Hähnchenfleisch (18 %) führt, obwohl Hähnchenfleisch die höchste Prävalenz ESBL/AmpC-produzierender *Enterobacteriaceae* aufwies. In einer Fall-Kontroll-Studie bezüglich der Risikofaktoren für eine Besiedlung des Menschen mit ESBL-bildenden *E. coli* (außerhalb von klinischen Einrichtungen) kamen Leistner et al. (2013) unter anderem zu dem Ergebnis, dass der häufige (≥ 3 Mahlzeiten pro Woche) Konsum von Schweinefleisch mit einer Besiedlung mit ESBL-*E. coli* assoziiert war. Zudem konnte weder der häufige Konsum von Geflügelfleisch, noch der vorherige Einsatz von Antibiotika mit einer ESBL-Besiedlung in Zusammenhang gebracht werden (Leistner et al., 2013).

Smet et al. (2011) zeigten am *in situ*-Modell den Plasmidtransfer zwischen einem aviären ESBL-bildenden *E. coli*-Stamm und humanen *E. coli*-Stämmen. Der aviäre ESBL-positive *E. coli* konnte sich auch ohne den Selektionsdruck von Cefotaxim im Fermentationssystem, das einen Teil des humanen Gastrointestinaltraktes simulierte, vermehren. 24 h nach der Inokulation des aviären Donor-Stammes wurden *E. coli*-Transkonjuganten humanen Ursprungs nachgewiesen. Der Gentransfer zwischen aviären und humanen *E. coli* konnte bei einer Konzentration von mindestens 3 log KbE/ml des Donor-Stammes gezeigt werden. Diese Ergebnisse belegen die Besiedlung der humanen kommensalen Darmflora mit einem aviären *E. coli*-Stamm sowie den horizontalen Gentransfer auch ohne Antibiotikabehandlung (Smet et al., 2011).

2.3.5. ESBL/AmpC-produzierende *Enterobacteriaceae* beim Menschen

Surveillance-systeme für Krankenhausinfektionen zeigen die zunehmende Ausbreitung von β -Laktamase (ESBL)-positiven *Enterobacteriaceae* mit zunehmenden Resistenzen gegen Cephalosporine der 3. und 4. Generation sowie Carbapeneme in Europa sowie weltweit (Leistner et al., 2015; Pfeifer et al., 2010).

Mithilfe der Daten des „Krankenhaus Infektions-Surveillance-systems“ (KISS) haben Leistner et al. (2015) die Zunahme der nosokomialen Infektionen durch ESBL-produzierende *Enterobacteriaceae* in Deutschland erfasst. Es zeigte sich, dass der Anteil nosokomialer Infektionen durch ESBL-produzierende *Enterobacteriaceae* in dem Zeitraum von 2007 bis 2012 signifikant von 11,9 % auf 15,4 %, insbesondere durch die Zunahme von ESBL-bildenden *E. coli*, zugenommen hat. Die Daten der „Antibiotika-Resistenz-Surveillance“ (ARS)-

Datenbank des „Robert Koch Institutes“ (RKI) zeigen, dass seit 2008 der Anteil an Cefotaxim-resistenten *E. coli* sowohl in der ambulanten, als auch in der stationären Versorgung in Deutschland stetig angestiegen ist. So stieg der prozentuale Anteil der Cefotaxim-resistenten *E. coli* im ambulanten Bereich von 2,8 % (2008) auf 7,7 % (2015) und der Anteil in der stationären Versorgung von 6,4 % (2008) auf 11,9 % (2015).

Nicht nur auf nationaler Ebene, sondern auch europaweit werden Daten zur Antibiotikaresistenz gesundheitlich relevanter Bakterien erfasst. Das European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) erhebt jedes Jahr mithilfe des European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) Daten zur Antibiotikaresistenz-Situation ausgewählter Erreger. Es werden Erstisolate aus Blutkulturen und Liquor aus verschiedenen Kliniken sowie Laboratorien von bis zu 30 Mitgliedsstaaten der Europäischen Union (EU) sowie des Europäischen Wirtschaftsraums (EWR) für die Auswertung herangezogen. Im Zeitraum von 2011 bis 2014 nahm die Resistenz von *E. coli* bzw. *K. pneumoniae* gegen Cephalosporine der 3. Generation sowohl auf EU/EWR Ebene (9,6 % - 12 % bzw. 23,6 % - 28 %) als auch in vielen der einzelnen Mitgliedstaaten (Belgien, Deutschland, Frankreich, Griechenland, Irland, Italien, Norwegen, Portugal, Schweden, Slowenien, Tschechische Republik,) signifikant zu (ECDC, 2015). Im Jahr 2014 lagen die Resistenzraten gegen Cephalosporine der 3. Generation in den einzelnen Ländern zwischen 3,3 % (Island) und 40,4 % (Bulgarien) für *E. coli* bzw. 0 % (Island) bis 74,8 % (Bulgarien) für *K. pneumoniae* (Tabelle 9). 71,1 % - 100 % der gegen Cephalosporine der 3. Generation resistenten *E. coli*-Isolate bzw. 85 % - 100 % der resistenten *K. pneumoniae*-Isolate konnten als ESBL-Bildner bestätigt werden.

Tabelle 9 Prozentualer Anteil invasiver *E. coli* bzw. *K. pneumoniae* Isolate mit Resistenz gegen Cephalosporine der 3. Generation in EU/EWR Ländern im Jahr 2014, modifiziert nach ECDC (2015); geordnet nach %R

Land	<i>Escherichia coli</i>			<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
	N	%R ¹	(95% CI)	N	%R ¹	(95% CI)
Island	152	3,3	(1-8)	28	0,0	(0-12)
Finnland	4009	5,5	(5-6)	582	2,4	(1-4)
Schweden	6546	5,6	(5-6)	1000	4,5	(3-6)
Niederlande	6497	5,7	(5-6)	911	5,5	(4-7)
Norwegen	3421	5,8	(5-7)	746	5,9	(4-8)
Dänemark	4410	7,0	(6-8)	925	7,6	(6-9)
Litauen	594	8,1	(6-11)	154	52,6	(44-61)
Estland	410	9,3	(7-12)	135	20,7	(14-29)
Österreich	4739	9,4	(9-10)	996	8,2	(7-10)
Belgien	2802	9,7	(9-11)	485	16,3	(13-20)
Frankreich	10349	9,9	(9-11)	2192	29,6	(28-32)
Großbritannien	6219	10,3	(10-11)	977	9,3	(8-11)
Deutschland	6246	10,5	(10-11)	1006	12,7	(11-15)
Irland	2691	10,7	(10-12)	354	11,6	(8-15)
Kroatien	1079	10,8	(9-13)	334	47,9	(42-53)
Malta	279	10,8	(7-15)	101	29,7	(21-40)
Lettland	165	10,9	(7-17)	104	52,9	(43-63)
Luxemburg	368	12,0	(9-16)	66	34,8	(24-48)
Spanien	5821	12,3	(12-13)	1265	18,0	(16-20)
Slowenien	1216	12,7	(11-15)	233	26,6	(21-33)
Tschechien	2978	14,0	(13-15)	1383	52,9	(50-56)
Ungarn	1619	16,4	(15-18)	644	35,6	(32-39)
Portugal	5024	16,4	(15-17)	1712	40,9	(39-43)
Griechenland	1122	21,0	(19-24)	1092	72,5	(70-75)
Italien	3694	28,7	(27-30)	1319	56,5	(54-59)
Zypern	153	28,8	(22-37)	80	32,5	(22-44)
Rumänien	306	29,4	(24-35)	256	73,8	(68-79)
Slowakei	889	31,8	(29-35)	493	69,4	(65-73)
Bulgarien	218	40,4	(34-47)	151	74,8	(67-82)

¹ %R, Prozentualer Anteil invasiver *E. coli* bzw. *K. pneumoniae* Isolate mit Resistenz gegen Cephalosporine der 3. Generation

Abgesehen von der Zunahme Krankenhaus-assoziiertes ESBL-produzierender *Enterobacteriaceae* werden die resistenten *Enterobacteriaceae* auch vermehrt in ambulanten Zusammenhängen und in der gesunden Bevölkerung isoliert (Canton et al., 2008; Nicolas-Chanoine et al., 2013). Das Auftreten unterschiedlicher ESBL-produzierender *Enterobacteriaceae* in der allgemeinen Bevölkerung könnte ein Reservoir der resistenten Bakterien außerhalb von Krankenhäusern darstellen. Dies könnte zu der Ausbreitung der resistenten Bakterien sowohl in der Bevölkerung als auch im klinischen Zusammenhang beitragen (Machado et al., 2013; Valenza et al., 2014; Valverde et al., 2008).

Weltweit wurde in verschiedenen Studien die Prävalenz von ESBL-bildenden *Enterobacteriaceae* in der gesunden Bevölkerung untersucht. Hierbei wurden unterschiedlich hohe Prävalenzen von 3,0 % in Schweden (Stromdahl et al., 2011) bis 69,5 % in China (Zhou et al., 2015) ermittelt (Tabelle 10).

Tabelle 10 Prävalenz ESBL-produzierender *Enterobacteriaceae* im Darm der gesunden Bevölkerung verschiedener Länder, geordnet nach Prävalenzen

Land	Prävalenz	Referenz
China	69,5 % (n=200)	(Zhou et al., 2015)
Thailand	65,7 % (n=417)	(Luvsansharav et al., 2012)
Ägypten	63 % (n=632)	(Abdul Rahman und El-Sherif, 2011)
Niederlande	8,6 % (n=1695)	(Reuland et al., 2016)
Spanien	8,2 % (n=500)	(Paniagua et al., 2010)
Tunesien	7,3 % (n=150)	(Ben Sallem et al., 2012)
Dänemark	7,0 % (n=84)	(Hammerum et al., 2011)
Deutschland (Bayern)	6,3 % (n=3344)	(Valenza et al., 2014)
Frankreich	6,0 % (n=345)	(Nicolas-Chanoine et al., 2013)
Schweiz	5,8 % (n=586)	(Geser et al., 2012b)
Tschechische Republik	3,2 % (n=900)	(Husickova et al., 2012)
Schweden	3,0 % (n=100)	(Stromdahl et al., 2011)

Die Übertragung ESBL-produzierender *Enterobacteriaceae* von Mensch zu Mensch konnte bereits in verschiedenen Studien belegt werden (Hilty et al., 2012; Lietzau et al., 2007; Rodriguez-Bano et al., 2008; Valverde et al., 2008). Auch Adler et al. (2014) haben Rektaltupfer von Personal aus dem Gesundheitswesen sowie von Familienmitgliedern ESBL-*Enterobacteriaceae* positiver Patienten verschiedener Reha-Zentren untersucht und die Isolate anhand der ESBL-Gene sowie mittels PFGE und MLST miteinander verglichen. Es zeigte sich, dass 9 % (26/286) der Familienmitglieder und 3,5 % (35/1001) des Personals ESBL-*Enterobacteriaceae* positiv waren. 17 Isolate der Familienmitglieder bzw. sieben Isolate des Personals waren von denen der Patienten nicht zu unterscheiden. Lietzau et al. (2006)

folgerten nach der Untersuchung von Paaren auf Antibiotika-resistente *E. coli*, dass die Übertragung der resistenten Bakterien zwischen den Partnern relevanter sei als die Einnahme von Antibiotika oder ein Krankenhaus-Kontakt. Auch bei der Untersuchung von Kindern (6 Monate bis 4 Jahre) sowie deren Eltern und Geschwister in Deutschland kamen Lietzau et al. (2007) zu dem Ergebnis, dass die Personen im Haushalt, insbesondere Geschwister, eine entscheidende Rolle bei der Kolonisation mit Antibiotika-resistenten *E. coli* bei Kleinkindern spielen.

3. Material

3.1. Nährmedien

Tabelle 11 zeigt die verwendeten Nährmedien.

Die Nährmedien wurden laut Herstellerangaben angesetzt.

Tabelle 11 Nährmedien

Nährmedium	Hersteller	Artikelnummer
Müller-Hinton-Agar (MH)	Oxoid, Wesel, D	CM0337
MacConkey-Agar (MC) ¹	Oxoid, Wesel, D	CM007
MacConkey No. 3-Agar (MC) ²	Oxoid, Wesel, D	CM0115
LB-Bouillon nach Miller (LB)	Merck, Darmstadt, D	110285

¹ Bei Herde 1-4 verwendet.

² Bei Herde 5-7 verwendet.

3.2. Chemikalien

Die in den Versuchen verwendeten Chemikalien und Puffer sind in Tabelle 12 aufgelistet.

Tabelle 12 Chemikalien und Puffer

Substanz	Hersteller
ABsolute qPCR Mix (no ROX)	Thermo Scientific, St. Leon Roth, D
Acetonitril	Carl Roth, Karlsruhe, D
Adatab Cefotaxim	Mast Diagnostica, Reinfeld, D
Bruker Matrix HCCA, portioned	Bruker Daltonik, Bremen, D
Cefotaxim ESßL - Set D 62 C	Mast Diagnostica, Reinfeld, D
Cefoxitin FOX 30 C	Mast Diagnostica, Reinfeld, D
Ceftazidime CAZ 30 C	Mast Diagnostica, Reinfeld, D
Chelex 100 Resin	BioRad, München, D
EDTA	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Ethanol (EtOH)	VWR, Dresden
PBS-Tabletten	Merck, Darmstadt, D
Trifluoressigsäure	Carl Roth, Karlsruhe, D
Tris-HCl	Merck, Darmstadt, D

3.3. qPCR Primer

Die Primer und Sonden mit dazugehörigen Sequenzen sind in Tabelle 13 aufgeführt.

Tabelle 13 Primer und Sonden

Gen	Primer/Sonde	Sequenz 5' – 3'
<i>bla_{CMY}</i>	CMY_fwd.	GGCAAACAGTGGCAGGGTAT
	CMY_rev.	AATGCGGCTTTATCCCTAACG
	CMY_probe	ROX-CCTACCGCTGCAGATCCCCGATG-BHQ-2
<i>bla_{CTX}</i>	CTX-B_fwd.	ACCGAGCCSACGCTCAA
	CTX-B_rev.	CCGCTGCCGGTTTTATC
	CTX-B_probe	Yakima Yellow- CCCGCGYGATACCACCACGC-BHQ1
	CTX-A_fwd.	CGGGCRATGGCGCARAC
	CTX-A_rev.	TGCRCCGGTSGTATTGCC
	CTX-A_probe	Yakima Yellow-CCARCGGGCGCAGYTGGTGAC-BHQ1
<i>bla_{SHV}</i>	SHV_fwd.	TCCCATGATGAGCACCTTTAAA
	SHV_rev.	TCCTGCTGGCGATAGTGGAT
	SHV_probe	Cy5-TGCCGGTGACGAACAGCTGGAG-BBQ-650
<i>bla_{TEM}</i>	TEM_fwd.	GCATCTTACGGATGGCATGA
	TEM_rev.	GTCCTCCGATCGTTGTCAGAA
	TEM_probe	6-Fam-CAGTGCTGCCATAACCATGAGTGA-BHQ-1

3.4. Bakterienstämme

Als Positivkontrolle für die qPCR wurde die DNA von fünf Stämmen (nach Roschanski et al. 2014) verwendet (Tabelle 14). Die Stämme wurden in Cryobank-Röhrchen bei -80 °C gelagert.

Tabelle 14 Bakterienstämme (Positivkontrollen)

Spezies	Stamm	<i>bla</i> - Gen	Herkunft
<i>E. coli</i>	P1	CMY-2	siehe Roschanski et al. (2014)
<i>E. coli</i>	P2	CTX-M15	siehe Roschanski et al. (2014)
<i>Salmonella</i> sp.	P3	CTX-M8	siehe Roschanski et al. (2014)
<i>Salmonella</i> sp.	P4	SHV-12	siehe Roschanski et al. (2014)
<i>E. coli</i>	P5	TEM-52	siehe Roschanski et al. (2014)

3.5. Geräte und Software

Die verwendeten Geräte sind in Tabelle 15 aufgeführt. Tabelle 16 zeigt die zur Auswertung verwendete Software.

Tabelle 15 Geräte

Gerät	Hersteller
Air Sampler Coriolis	Bertin, Montigny-le-Bretonneux, F
BagMixer 400	Interscience, St Nom la Bretèche, F
CFX96™ Real-Time PCR System	Bio-Rad, München, D
DiscMaster MDD63	Mast Diagnostika, Reinfeld, D
Inkubator, Modell 700	Memmert, Schwabach, D
MALDI Biotyper, Microflex LT	Bruker Daltonik GmbH, Bremen, D
MSP 96 target polished steel BC	Bruker Daltonik GmbH, Bremen, D
NanoDrop 2000c Spektrophotometer	Thermo Scientific, Bonn, D
Präzisionswaage Kern EW 2200 – 2 NM	Kern&Sohn, Balingen, D
Präzisionswaage PC 440 Delta Range®	Mettler Wagen GmbH, Gießen, D
Thermomixer Comfort oder Compact	Eppendorf, Hamburg, D
UV Sterilizing PCR Workstation	Peqlab, Erlangen, D
Vortex Genie 2	Bender + Hobein AG, Bruchsal, D
Zentrifuge 5403R oder 5418	Eppendorf, Hamburg, D

Tabelle 16 Software

Software	Hersteller
BioNumerics Version 6.6	Applied Maths, BE
CFX Manager™ Version 2.0	Bio-Rad, München, D
Compass®	Bruker Daltonik GmbH, Bremen, D
SPSS Version 23.0	IBM, Ehningen, D

3.6. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 17 fasst die verwendeten Verbrauchsmaterialien zusammen.

Die Einweg-Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Nerbe plus, Sarstedt und VWR bezogen.

Tabelle 17 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
BagFilter sterile lateral filter bags 400ml	Interscience, St Nom la Bretèche, F
BagPage sterile filter bags 80ml	Interscience, St Nom la Bretèche, F
Cryobank-Röhrchen	Mast Diagnostica, Reinfeld, D
Low Multiplate-96, white	Bio-Rad, München, D
Microseal B Adhesive Seals	Bio-Rad, München, D
Plain Swab Sterile Wooden Applicator Cotton Tipped	Copan, Brescia, I

4. Methoden

4.1. Beprobung am Schlachthof

Insgesamt wurden sieben Masthähnchenherden (Herde 1-7) in Sachsen-Anhalt und Brandenburg während der Schlachtung beprobt. Alle Herden, mit Ausnahme von Herde 1, wurden auf demselben Schlachthof geschlachtet. Jeweils 25 Organkonvolute (Caecum) wurden parallel zu den dazugehörigen 25 Karkassen auf Höhe der amtlichen Fleischuntersuchung von den Haken genommen und in sterile Tüten verpackt. Die Auswahl der Organkonvolute erfolgte zufällig in einem Zeitraum von ca. 45 min. 25 Filets derselben Herde wurden ca. 1-2 h nach der Schlachtung vom Schlachthofpersonal filetiert und in sterile Tüten verpackt.

Im weißen Bereich wurden Tupfer am Wäscher (n=2) sowie an den Haken der Karkassen (n=2) und Haken der Organkonvolute (n=2) während der Schlachtung der jeweiligen Herde genommen. Ab der dritten Herde wurde zusätzlich der Luftkeimsammler, dessen Probengefäß mit 10 ml PBS gefüllt war, für 4 min (250 l/min) auf einer Höhe von ca. 130 cm im Bereich der Probennahmestelle der amtlichen Fleischuntersuchung platziert. Im schwarzen Bereich wurde Brühwasser in sterile Probengefäße (n=2) abgefüllt sowie der Rupfer mit Tupfern (n=2) beprobt. Abschließend wurden die Transportkisten der Hähnchen nach erfolgter Reinigung und Desinfektion mithilfe von Tupfern (n=2) beprobt.

Bei Herde 5, 6 sowie 7 wurden zusätzlich vor der Schlachtung der jeweiligen Herde Nullproben der Umgebung genommen. Im schwarzen Bereich wurde eine Brühwasserprobe genommen sowie der Rupfer und die Haken mit je einem Tupfer beprobt. Im weißen Bereich wurden die Haken der Karkassen, die Haken der Organkonvolute sowie der Wäscher mit je einem Tupfer beprobt.

Alle Proben wurden im Anschluss an die Probenahme zum Transport auf Kühlakkus in Plastikkisten verpackt.

4.2. Aufbereitung der Proben

Alle Proben wurden bis zur Aufbereitung bei 7 °C für maximal 15 h gelagert.

Jeweils 5 g Caecuminhalt, 25 g Brusthaut von den Karkassen, 25 g Filets, 10 ml Brühwasser und 3 ml PBS des Luftkeimsammlers wurden 1:10 mit LB-Boullion verdünnt und 2 min auf Stufe 4 im BagMixer durchmischt. Falls nicht ausreichend Caecuminhalt vorhanden war, wurde der Inhalt aus weiteren Darmabschnitten entnommen.

Die Umgebungstupfer wurden in Stomacherbeuteln in 6 ml LB-Boullion ca. 1 min mit den Händen durchgeknetet.

Anschließend wurden für den quantitativen Nachweis jeweils 5 ml der Suspensionen in sterile A-Röhrchen abgefüllt und bei 0 °C gelagert. Der Rest des Probenmaterials wurde in den Stomacherbeuteln unter aeroben Bedingungen für 24 h bei 37 °C bebrütet.

4.3. Isolierung der Cefotaxim resistenten *Enterobacteriaceae*

Es erfolgten qualitative Untersuchungen bei allen sowie quantitative Untersuchungen bei vier (Herde 4-7) der sieben untersuchten Herden. Bei den Untersuchungen der ersten vier Herden wurde MacConkey-Agar verwendet, bei Herde fünf bis sieben MacConkey-Agar No 3 (Tabelle 11). Im Laufe der Untersuchungen zeigte sich, dass MacConkey-Agar No 3 selektiver für den Nachweis der *Enterobacteriaceae* war und sich demnach besser für die Isolierung eignete. Mithilfe des Konkordanz-Korrelationskoeffizienten nach Lin (CCC_{Lin}) konnte gezeigt werden, dass die Ergebnisse der beiden Agar vergleichbar waren. Es ergab sich ein hoher Konkordanz-Korrelationskoeffizient zwischen den ermittelten Keimzahlen der Gesamt-*Enterobacteriaceae* ($CCC=0,96$; $n=20$) bzw. der Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* ($CCC=0,93$; $n=20$) der jeweiligen Proben auf MacConkey-Agar und MacConkey-Agar No 3.

Zur Bestimmung der Gesamtanzahl an *Enterobacteriaceae* wurde MacConkey-Agar/MacConkey-Agar No 3 ohne Antibiotikazusatz (MC-) verwendet. Die Gewinnung ESBL/AmpC-produzierender *Enterobacteriaceae* erfolgte auf MacConkey-Agar/MacConkey-Agar No 3 mit 1 µg/ml Cefotaxim (MC+). Sowohl der qualitative als auch der quantitative Nachweis erfolgte im Doppelansatz. Bei der quantitativen Untersuchung wurden die Proben ausgewertet, bei denen insgesamt mindestens 3 Kolonien je Doppelansatz gewachsen waren.

4.3.1. Qualitativer Nachweis

Aus dem inkubierten Probenmaterial (Stomacherbeutel) wurde mit je 10 µl ein fraktionierter Verdünnungsausstrich auf MC+ Platten aufgetragen und die Platten bei 37 °C aerob für 24 h inkubiert. Anschließend wurde die Kolonie-Morphologie der Bakterien miteinander verglichen und je Morphologie maximal 2 Kolonien auf eine MC+ Platte überimpft und die Platten bei 37 °C aerob für 24 h inkubiert, um anschließend mittels MALDI-TOF Genus und Spezies zu bestimmen.

4.3.2. Quantitativer Nachweis

Jeweils 10 Caecum-, 10 Haut- sowie 5 Filetproben (Herde 4-7) wurden zusätzlich quantitativ untersucht. Hierzu wurden aus dem bei 0 °C gelagerten Probenmaterial 1:10 Verdünnungsreihen mit PBS angefertigt. Jeweils 50 µl der Verdünnungen wurde mittels Drop

Plating-Verfahren auf die MC- Platten verteilt und bei 37 °C aerob für 24 h inkubiert, um die Gesamtanzahl an *Enterobacteriaceae* zu bestimmen. Die untere Nachweisgrenze lag bei 3×10^3 KbE/g (Caecum, Haut) bzw. 3×10^2 KbE/g (Filets).

Zur Quantifizierung der Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* wurden je 100 µl der Verdünnungen auf MC+ Platten ausplattiert. Zusätzlich wurde bei den Filetproben je 1 ml des Probenmaterials auf 3 MC+ Platten ausplattiert und bei 37 °C aerob für 24 h inkubiert. Die untere Nachweisgrenze lag bei $1,5 \times 10^2$ KbE/g (Caecum, Haut) bzw. bei $1,5 \times 10^1$ KbE/g (Filets). Die Kolonien wurden nach Morphologie ausgezählt und wie bereits beschrieben wurden maximal 2 Kolonien je Morphologie auf MC+ Platten isoliert.

4.4. Genus- und Spezies-Bestimmung der Isolate

4.4.1. MALDI-TOF MS

Genus und Spezies der Isolate wurden mittels MALDI–TOF MS (nach Murugaiyan et al. 2014) bestimmt. Hierfür wurde ein Lösungsmittel aus 500 µl Acetonitril, 475 µl Aqua dest. und 25 µl Trifluoressigsäure hergestellt. Zur Herstellung der Matrix-Lösung wurden 250 µl dieses Lösungsmittels in ein Röhrchen mit Bruker Matrix HCCA (α -Cyano-4-hydroxymizsäure) pipettiert und ca. 5 min mithilfe des Vortexers durchmischt. Je Isolat wurde eine kleine Menge Koloniematerial auf zwei Spots der MALDI-Platte (Targetplatte) verteilt und anschließend mit 1 µl Matrix-Lösung überschichtet. Die verschiedenen Bakterienspezies können über ihre charakteristischen Massenspektren mit der hinterlegten Referenzdatenbank bestimmt werden und bekommen einen Ergebnis-Wert zwischen 0 und 3 zugeteilt (Tabelle 18). Die als *Enterobacteriaceae* bestätigten Isolate wurden in Cryobank-Röhrchen überführt und bei - 80 °C gelagert.

Tabelle 18 Interpretation der MALDI-Ergebnisse

Score	Bewertung
2,3 – 3,00	Spezies sehr wahrscheinlich richtig identifiziert
2,0 – 2,29	Genus sicher identifiziert, Spezies wahrscheinlich
1,7 – 1,99	Genus wahrscheinlich identifiziert
0,0 – 1,69	kein zuverlässiges Ergebnis

4.5. Phänotypische Charakterisierung der ESBL/AmpC – produzierenden *Enterobacteriaceae*

4.5.1. Kultivierung der Stämme

Für die phänotypische Charakterisierung der ESBL/AmpC-produzierenden *Enterobacteriaceae* wurde der Plättchen-Diffusionstest modifiziert nach dem empfohlenen CLSI Standard (CLSI, 2012, 2014) durchgeführt.

Es wurden 3 ml LB-Bouillon mit Koloniematerial der Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* beimpft und unter aeroben Bedingungen ca. 16 h bei 37 °C inkubiert.

4.5.2. Plättchen-Diffusionstest

Die Übernacht-Kulturen wurden auf eine OD₆₀₀ von 0,09 verdünnt, was, wie sich in Vorversuchen gezeigt hatte, dem geforderten McFarland-Standard von 0,5 entspricht. Je 100 µl der verdünnten Kulturen wurden auf Müller-Hinton-Agar ausplattiert, anschließend die Antibiotikaplättchen mit Hilfe eines Dispensers aufgebracht und die Platten bei 37 °C aerob für 18 h inkubiert. Es wurden folgende Antibiotika getestet: Cefotaxim 30 µg (CTX), Cefotaxim 30 µg/Clavulansäure 10 µg (CTX/Clav), Ceftazidim 30 µg (CAZ), Cefoxitin 30 µg (FOX). Zeigte sich im Bakterienrasen ein Hemmhof ≤ 26 mm um die CTX- und CTX/CLAV-Plättchen in Kombination mit einem Hemmhof ≤ 18 mm um das FOX-Plättchen, wurde das Isolat als phänotypisch AmpC-positiv gewertet. Bei einer Hemmhofvergrößerung von mindestens 5 mm um das CTX/CLAV-Plättchen im Vergleich zu dem Hemmhof um das CTX-Plättchen wurde das Isolat als phänotypisch ESBL-positiv gewertet (CLSI, 2014).

4.6. Genotypische Charakterisierung der ESBL/AmpC- produzierenden *Enterobacteriaceae*

4.6.1. Isolierung der DNA (Chelex-Methode)

3 ml LB-Bouillon wurden mit Koloniematerial beimpft und ca. 16 h aerob bei 37 °C inkubiert. Die Kulturen wurden auf eine OD₆₀₀ von 0,18 verdünnt. Je 1 ml dieser Kultur wurde 6 min bei 16873 rcf zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 300 µl Tris-EDTA (TE)-Puffer (990 ml Aqua dest., 1,21 g Tris-HCL, 0,292 g EDTA, pH 8) resuspendiert, erneut für 6 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden 200 µl einer 5 %igen Chelex-Lösung hinzu pipettiert und die Proben für 1 h bei 56 °C und 15 min bei 95 °C in einem Thermomixer unter Schütteln inkubiert und anschließend 6 min bei 16873 rcf

zentrifugiert. Der Überstand wurde in 0,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bis zur weiteren Verwendung bei 7 °C gelagert.

4.6.2. Real-Time PCR (qPCR)

Um die Isolate auf das Vorhandensein der β -Laktamase-Gene *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} sowie *bla*_{AmpC-CIT} zu untersuchen, wurde die qPCR nach Roschanski et al. (2014) verwendet.

Die lyophilisierten Primer sowie die Sonden (außer TEM_probe) wurden entsprechend der Herstellerangaben auf eine Konzentration von 10 pmol/ μ l verdünnt. Die Sonde TEM_probe wurde auf 5 pmol/ μ l verdünnt. Unter Verwendung der jeweiligen Primerpaare (Tabelle 13), den Sonden (Tabelle 13) dem Absolute qPCR Mix sowie der Zugabe von Aqua dest. wurde ein Mastermix hergestellt (Tabelle 19). Von diesem wurde je 24 μ l in die Vertiefung einer 96-Well-Platte pipettiert. Abschließend wurde 1 μ l DNA hinzugefügt und die Platte mit einer Folie verschlossen. Die Platte wurde anschließend bei 1948 rcf ca. 30 s zentrifugiert, um die Komponenten am Boden der Wells zu sammeln. Die qPCR wurde entsprechend des Protokolls (Tabelle 20) durchgeführt. Zusätzlich zur no template control (NTC) wurden in jedem Lauf 5 Positivkontrollen (Tabelle 14) mitgeführt. Die Auswertung erfolgte mithilfe der Software CFX Manager™.

Tabelle 19 Pipettierschema qPCR für eine Probe

Komponente	Volumen [µl]
ABsolute qPCR Mix	12,5
SHV_fwd. [10 pmol/µl]	1,0
SHV_rev. [10 pmol/µl]	1,0
SHV_probe [10 pmol/µl]	0,2
CTX-A_fwd. [10 pmol/µl]	1,0
CTX-A_rev. [10 pmol/µl]	1,0
CTX-A_probe [10 pmol/µl]	0,2
CTX-B_fwd. [10 pmol/µl]	1,0
CTX-B_rev. [10 pmol/µl]	1,0
CTX-B_probe [10 pmol/µl]	0,2
CMY_fwd. [10 pmol/µl]	1,0
CMY_rev. [10 pmol/µl]	1,0
CMY_probe [10 pmol/µl]	0,2
TEM_fwd. [10 pmol/µl]	1,0
TEM_rev. [10 pmol/µl]	1,0
TEM_probe [5 pmol/µl]	0,1
Aqua dest.	0,6
DNA	1,0
Σ	25

Tabelle 20 qPCR-Protokoll

Temperatur	Zeit	
95 °C	15 min	
95 °C	15 s	} 30 Zyklen
50 °C	15 s	
70 °C	20 s	

4.7. Bestimmung der Phylogruppen

Die Bestimmung der Phylogruppen erfolgte im Institut für Tier- und Umwelthygiene, FU Berlin. Für alle nach qPCR ESBL/AmpC-positiven Isolate, die mittels MALDI-TOF MS als *E. coli* identifiziert wurden, wurde die Phylogruppe mit der quadruplex-PCR nach Clermont et al. (2013) bestimmt. Das Protokoll wurde entsprechend Projahn et al. (2017) durchgeführt.

4.8. Sequenzierung der ESBL/AmpC-Gene

In Zusammenarbeit mit dem Institut für Tier- und Umwelthygiene, FU Berlin wurden Isolate für die Sequenzierung der Resistenzgene ausgewählt. Kamen in einer Probe mehrere Isolate mit derselben Spezies, derselben Phylogruppe sowie demselben *bla*-Gen vor, wurde exemplarisch das Resistenzgen von nur einem dieser Isolate sequenziert. Das Institut für Tier- und Umwelthygiene, FU Berlin hat die aufgereinigten PCR-Produkte der Isolate zur Sequenzierung an die LGC Genomics GmbH in Berlin geschickt und ausgewertet. Für die Auswertung wurden die Nukleotidsequenzen mithilfe von BioNumerics (Version 6.6) ausgewertet und mit den bei GenBank hinterlegten Referenzsequenzen verglichen.

4.9. Auswertung der Daten

Die deskriptive sowie explorative statistische Auswertung der Daten wurde mit SPSS (Version 23.0) durchgeführt. Für die Auswertung der quantitativen Daten wurde der Median bestimmt. Die Daten wurden log-transformiert und mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung geprüft. Die Daten der Filetproben wurden aufgrund der geringen Stichprobengröße statistisch nicht weiter analysiert.

Mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests wurden jeweils die Keimzahlen der *Enterobacteriaceae* bzw. Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* aus Caecum- und Hautproben auf Unterschiede zwischen den Herden getestet. Zudem wurden die *Enterobacteriaceae* und Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* mithilfe der Spearman-Korrelation auf lineare Zusammenhänge untersucht. Bei einem p-Wert < 0,05 wurden die Ergebnisse der statistischen Tests als signifikant gewertet.

Die Ergebnisse der Keimzahlbestimmungen auf MacConkey-Agar und MacConkey-Agar No 3 wurden mithilfe des Konkordanz-Korrelationskoeffizienten nach Lin (CCC_{Lin}) auf Vergleichbarkeit geprüft (Lin, 1989).

Die Ergebnisse der Nullproben von Herde 5, 6 sowie 7 werden nur bei den Sequenzierungsergebnissen gezeigt.

5. Ergebnisse

Im Projektzeitraum von 2014 bis 2016 wurden sieben Masthähnchenherden in Sachsen-Anhalt bzw. Brandenburg auf das Vorkommen ESBL/AmpC-produzierender *Enterobacteriaceae* während der Schlachtung untersucht. Lediglich Herde 1 war während der Mast mit einem Makrolidantibiotikum (Tylosin) behandelt worden. Alle anderen Herden hatten keine antimikrobiellen Wirkstoffe während des Mastverlaufs erhalten. Alle Herden, mit Ausnahme von Herde 1, wurden auf demselben Schlachthof geschlachtet. Die Schlachtung von Herde 1, 3 und 5 erfolgte jeweils als erste des Tages. Es wurden verschiedene Probenmatrizes (Caecum, Haut, Filet) untersucht, um einen Überblick über die Belastung mit ESBL/AmpC-produzierenden *Enterobacteriaceae* von Mastgeflügel während der Schlachtung zu gewinnen. Zudem wurde die Umgebung während der Schlachtung beprobt, um Hinweise auf mögliche Quellen für Kontaminationen bzw. Kreuzkontaminationen zu erhalten.

5.1. Qualitative Analyse

Alle Proben wurden qualitativ untersucht, um das Vorkommen ESBL/AmpC-produzierender *Enterobacteriaceae* in den verschiedenen Probenmatrizes während der Schlachtung zu ermitteln. Als ESBL/AmpC-positiv wurden Proben gewertet, bei denen mindestens in einem Isolat eines der untersuchten *bla*_{ESBL/AmpC-CIT}-Gene durch Sequenzierung als ESBL/AmpC-Gen bestätigt worden war.

In den sieben untersuchten Herden wiesen durchschnittlich 47 % (83/175) der Caecum-, 55 % (96/175) der Haut-, 28 % (49/175) der Filet- und 28 % (25/89) der Umgebungsproben ESBL/AmpC-produzierende *Enterobacteriaceae* auf (Abbildung 3).

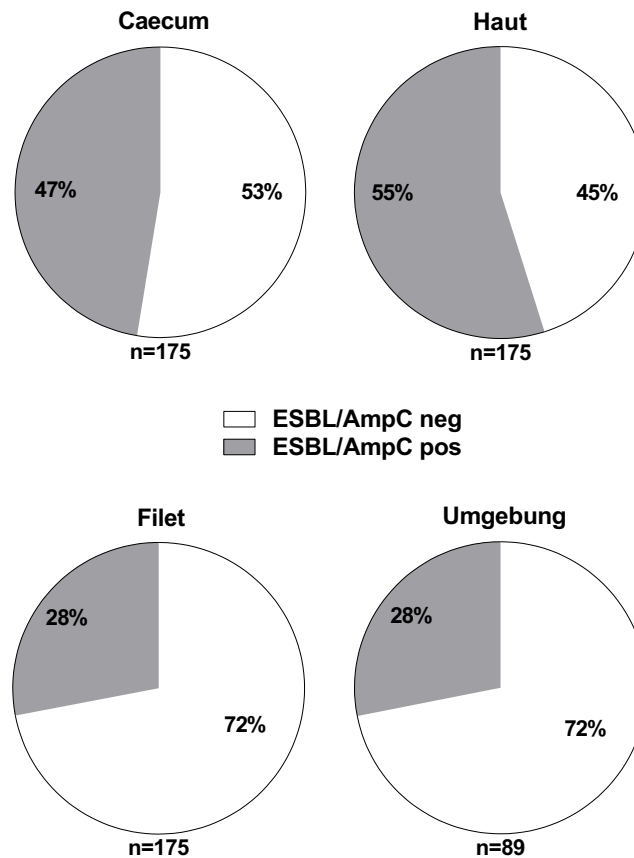


Abbildung 3 Prozentualer Anteil der Proben mit ESBL/AmpC-positiven *Enterobacteriaceae*. Die Graphen zeigen die Gesamtheit aller Proben aus Herde 1-7. Als ESBL/AmpC-positiv wurden Proben gewertet, bei denen mindestens eines der untersuchten Gene *bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* oder *bla_{AmpC-CIT}* durch Sequenzierung als ESBL/AmpC-Gen bestätigt worden war.

Die Prävalenzen in den Herden fielen sehr unterschiedlich aus (Abbildung 4). ESBL/AmpC-produzierende *Enterobacteriaceae* wurden in allen Probenmatrizes (Caeca, Haut, Filets, Umgebung) mit Ausnahme der Filetproben von zwei und den Caecum- sowie Hautproben von je einer der sieben untersuchten Herden nachgewiesen. Auffällig sind die sehr niedrigen Nachweisraten ESBL/AmpC-produzierender *Enterobacteriaceae* in allen Probenmatrizes der Herde 2. Während der Schlachtung aller Herden konnten ESBL/AmpC-produzierende *Enterobacteriaceae* in der Umgebung nachgewiesen werden.

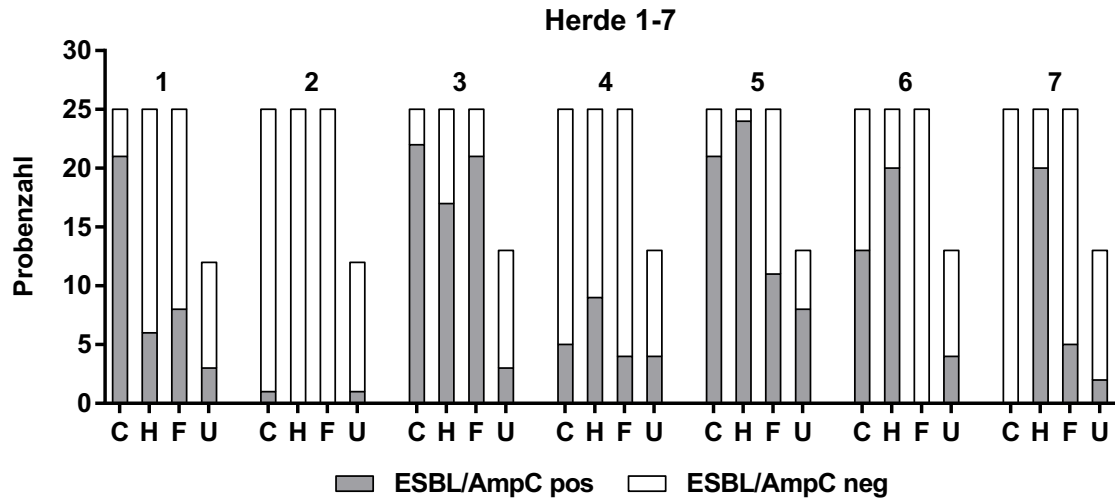


Abbildung 4 Anzahl der Proben mit ESBL/AmpC-positiven *Enterobacteriaceae*. Die Graphen zeigen die sieben Herden sortiert nach Probenmatrix. Als ESBL/AmpC-positiv wurden Proben gewertet, bei denen mindestens eines der untersuchten Gene *bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* oder *bla_{AmpC-CIT}* durch Sequenzierung als ESBL/AmpC-Gen bestätigt worden war.

(C, Caecumproben; H, Hautproben; F, Filetproben; U, Umgebungsproben).

5.2. Quantitative Analyse

Um die Konzentration der ESBL/AmpC-bildenden *Enterobacteriaceae* in den verschiedenen Probenmatrizes des Mastgeflügels zu ermitteln, sind die Proben von vier Herden (Herde 4-7) zusätzlich quantitativ untersucht worden.

Bei 57 % (23/40) der Caecum- sowie 47 % (19/40) der Hautproben lagen die Keimzahlen der Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* unter der quantitativen Nachweisgrenze von $1,5 \times 10^2$ KbE/g. Bei 70 % (14/20) der Filetproben konnten keine *Enterobacteriaceae* (Nachweisgrenze 3×10^2 KbE/g) und bei 85 % (17/20) keine Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* nachgewiesen werden (Nachweisgrenze $1,5 \times 10^1$ KbE/g).

Im Median lagen die Keimzahlen der Gesamt-*Enterobacteriaceae* der Caecum-, Haut- bzw. Filetproben bei $2,8 \times 10^7$, $9,5 \times 10^5$ bzw. $3,6 \times 10^3$ KbE/g. Der Median der Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* lag je nach Probenmatrix 1-4 Logstufen unter dem Median der Gesamt-*Enterobacteriaceae*. Die Keimzahlen der Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* unterschieden sich in den verschiedenen Probenmatrizes nur um max. eine Logstufe. Sie lagen bei $2,5 \times 10^3$ KbE/g (Caecum), $1,5 \times 10^3$ KbE/g (Haut) und $1,5 \times 10^2$ KbE/g (Filet) (Abbildung 5).

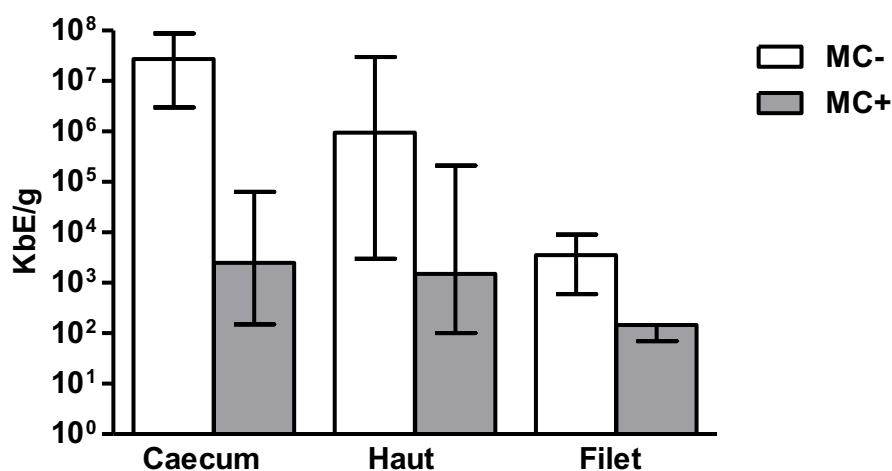


Abbildung 5 Keimzahl der Gesamt-*Enterobacteriaceae* (MC-) sowie der Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* (MC+), die über der Nachweisgrenze von $1,5 \times 10^2$ KbE/g in den Caecum- und Hautproben bzw. $1,5 \times 10^1$ KbE/g in den Filetproben der vier quantifizierten Herden lagen. Dargestellt ist jeweils der Median \pm Interquartilsabstand (IQR).

Der Kruskal-Wallis-Test zeigte, dass es zwischen den Herden signifikante Unterschiede in der Keimzahl der Gesamt-*Enterobacteriaceae* im Caecum (Chi-Quadrat 21,962, $p=0,0001$) und der Haut (Chi-Quadrat 21,874, $p=0,0001$) gab sowie signifikante Unterschiede zwischen der Keimzahl der Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* im Caecum (Chi-Quadrat 19,554, $p=0,0001$) und der Haut (Chi-Quadrat 13,521, $p=0,004$). Anschließend durchgeführte Post-hoc-Tests (Dunn-Bonferroni-Test) zeigten, dass sich die Keimzahlen zwischen einzelnen, aber nicht allen Herden signifikant voneinander unterscheiden (Abbildung 6).

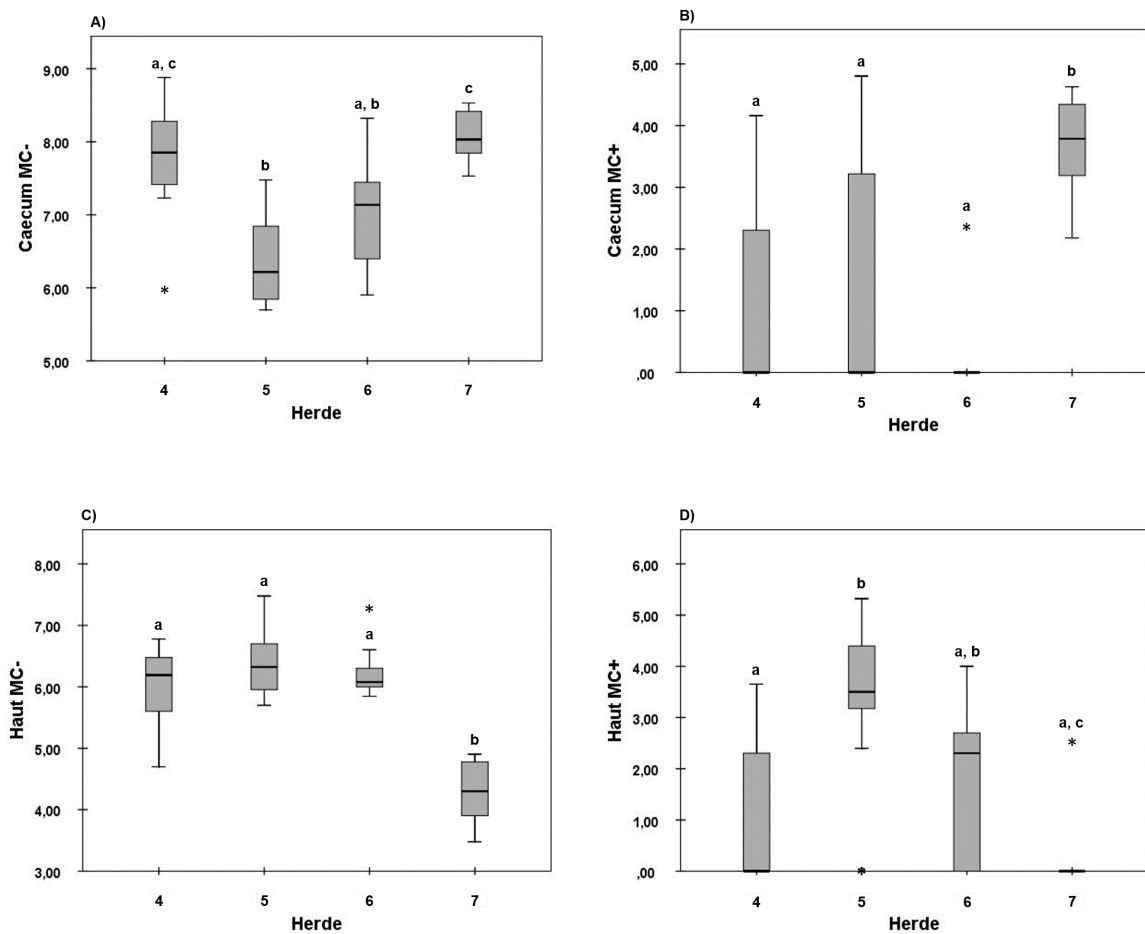


Abbildung 6 Dargestellt sind die logarithmierten Keimzahlen der Gesamt-*Enterobacteriaceae* (MC-) sowie der Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* (MC+) in den Caecum- (A), (B) und Hautproben (C), (D) der vier quantifizierten Herden. Die Herden mit dem gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (Dunn-Bonferroni-Test, $p < 0,05$).

* = Ausreißer

Mithilfe der Spearman-Korrelation wurde die Keimzahl der Gesamt-*Enterobacteriaceae* mit der Keimzahl der Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* sowohl in den Caecum- als auch in den Hautproben in den vier Herden verglichen. Die Keimzahl der Gesamt-*Enterobacteriaceae* in den Caecumproben der jeweiligen Herde korrelierte nicht mit der Keimzahl der Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae*. Auch bei den Hautproben der Herde 4 korrelierte die Keimzahl der Gesamt-*Enterobacteriaceae* nicht mit der Keimzahl der Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae*. In den Hautproben von Herde 5 ergab sich eine mittlere, jedoch nicht signifikante Korrelation zwischen der Keimzahl der Gesamt-*Enterobacteriaceae* und der Keimzahl der Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* ($r=0,616$; $p=0,58$; $n=10$). Zwischen der Keimzahl der Gesamt-*Enterobacteriaceae* und der der Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* in den Hautproben der Herde 6 ergab sich eine hohe signifikante Korrelation ($r=0,713$, $p=0,21$; $n=10$). In den Hautproben der Herde 7 korrelierte eine niedrige Keimzahl der Gesamt-*Enterobacteriaceae* mit einer niedrigen bzw. unter der Nachweisgrenze liegenden Keimzahl der Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae*. Hierbei handelte es sich um eine mittlere, jedoch nicht signifikante Korrelation ($r=0,525$; $p=0,119$; $n=10$). Bei gemeinsamer Betrachtung der vier quantifizierten Herden ergab sich insgesamt in den Hautproben eine mittlere signifikante Korrelation zwischen der Keimzahl der Gesamt-*Enterobacteriaceae* und der Keimzahl der Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* ($r=0,655$, $p=0,0001$, $n=40$).

Die ermittelten Werte der einzelnen Herden wurden mithilfe der Spearman-Korrelation auf den Zusammenhang zwischen der Keimzahl der Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* im Caecum jedes Einzeltieres und der Keimzahl der Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* auf der Haut der jeweiligen Karkasse untersucht. Hierbei korrelierte in keiner der Herden die Keimzahl der Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* im Caecum mit der Keimzahl der Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* auf der Haut.

5.3. Genus- und Spezies-Bestimmung der Isolate

Mittels MALDI-TOF MS-Analyse konnten von insgesamt 767 isolierten Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* 87 % (667/767) als *E. coli* identifiziert werden. Bei den restlichen Isolaten handelte es sich um *E. fergusonii* (32/767), *Hafnia (H.) alvei* (24/767), *K. pneumoniae* (15/767), *Proteus (P.)* spp. (17/767), *Morganella (M.) morganii* (6/767), *Citrobacter (C.) freundii* (3/767) sowie *Enterobacter* spp. (3/767).

5.4. Bestimmung des Antibiotikaresistenz-Profiles der Isolate

Im Disk-Diffusions-Test zeigten 50 % (386/767) der Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* einen ESBL-Phänotyp und 44 % (335/767) einen AmpC-Phänotyp. 6 % (46/767) der Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* konnten keinem der beiden Phänotypen zugeordnet werden (Abbildung 7). Für 88 % (672/767) der Isolate konnte der Phänotyp über den Nachweis der *bla*_{ESBL/AmpC-CIT}-Gene mittels qPCR bestätigt werden. Bei allen phänotypisch negativen Isolaten konnte auch mittels qPCR kein *bla*-Gen detektiert werden. Bei 92 phänotypisch positiven Isolaten konnte keines der untersuchten *bla*-Gene detektiert werden. 78 dieser Isolate stammten aus Herde 7. Drei Isolate zeigten einen AmpC-Phänotyp, aber mittels qPCR wurden *bla*_{ESBL}-Gene nachgewiesen.

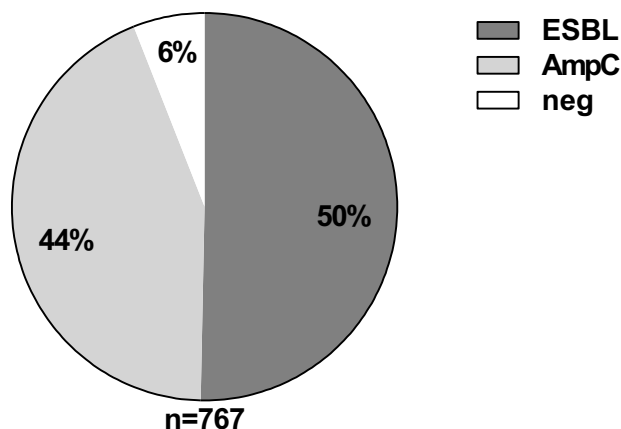


Abbildung 7 ESBL- bzw. AmpC-Phänotyp der Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* (Plättchen-Diffusionstest).

AmpC: CTX, CTX/CLAV \leq 26 mm, FOX \leq 18 mm; **ESBL:** CTX \leq 26 mm, CTX, CTX/CLAV \geq 5 mm größer als CTX

5.5. Bestimmung der ESBL/AmpC-Gene

Mittels qPCR wurde ermittelt, welche *bla*-Gene für die Resistenzen der Isolate kodieren.

Bei 82 % (629/767) der Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* konnte mindestens eines der untersuchten *bla*_{ESBL/AmpC}-Gene *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{AmpC-CIT} mittels qPCR nachgewiesen werden. Bei 25 % (154/629) dieser Isolate wurde eine Kombination aus zwei und bei einem Isolat eine Kombination aus drei der untersuchten Gene detektiert (Abbildung 8).

In Herde 1 wurde die Kombination *bla*_{TEM}+*bla*_{AmpC-CIT} mit 73 % (38/52) am häufigsten nachgewiesen. Bei 17 % (9/52) der Isolate konnte *bla*_{TEM}, bei 4 % (2/52) *bla*_{TEM}+*bla*_{CTX-M} detektiert werden. Je 2 % (1/52) der Isolate zeigten *bla*_{AmpC-CIT} sowie *bla*_{TEM}+*bla*_{CTX-M}+*bla*_{AmpC-CIT}.

In Herde 2 wurde *bla*_{TEM} mit 43 % (6/14) als einziges *bla*_{ESBL/AmpC}-Gen detektiert. Für 57 % (8/14) der Cefotaxim-resistenten Isolate konnte keines der untersuchten Gene mittels qPCR nachgewiesen werden.

In Herde 3 wurde *bla*_{AmpC-CIT} mit 58 % (90/154) am häufigsten detektiert. 34 % (52/154) der Isolate zeigten eine Kombination aus *bla*_{TEM}+*bla*_{AmpC-CIT} und 1 % (2/154) wiesen *bla*_{CTX-M} auf.

In Herde 4 konnte *bla*_{AmpC-CIT} mit 53 % (30/56) am häufigsten nachgewiesen werden. Bei 18 % (10/56) der Isolate wurde *bla*_{CTX-M} und bei 16 % (9/56) *bla*_{SHV} detektiert. *bla*_{TEM} kam zu 7 % (4/56) in Kombination mit *bla*_{AmpC-CIT} sowie in einem Isolat ausschließlich vor.

In Herde 5 war *bla*_{SHV} mit 81 % (175/215) am häufigsten zu finden. Bei 11 % (23/215) der Isolate konnte *bla*_{AmpC-CIT} detektiert werden. Zu jeweils geringen Anteilen waren *bla*_{TEM} und die Kombination *bla*_{TEM}+*bla*_{SHV} nachweisbar.

In Herde 6 zeigten 42 % (41/98) der Isolate *bla*_{SHV}, 31 % (30/98) *bla*_{CTX} und 24 % (24/98) *bla*_{AmpC-CIT}. Für jeweils ein Isolat konnte eine Kombination aus *bla*_{TEM}+*bla*_{CTX-M} bzw. *bla*_{CTX-M}+*bla*_{AmpC-CIT} detektiert werden.

In Herde 7 konnte für 62 % (111/178) der Isolate keines der untersuchten *bla*-Gene detektiert werden. 28 % (50/178) der Isolate zeigten eine Kombination aus *bla*_{TEM}+*bla*_{CTX} und zu jeweils geringen Anteilen waren *bla*_{CTX-M}, *bla*_{AmpC-CIT} und *bla*_{TEM} nachweisbar (Abbildung 8).

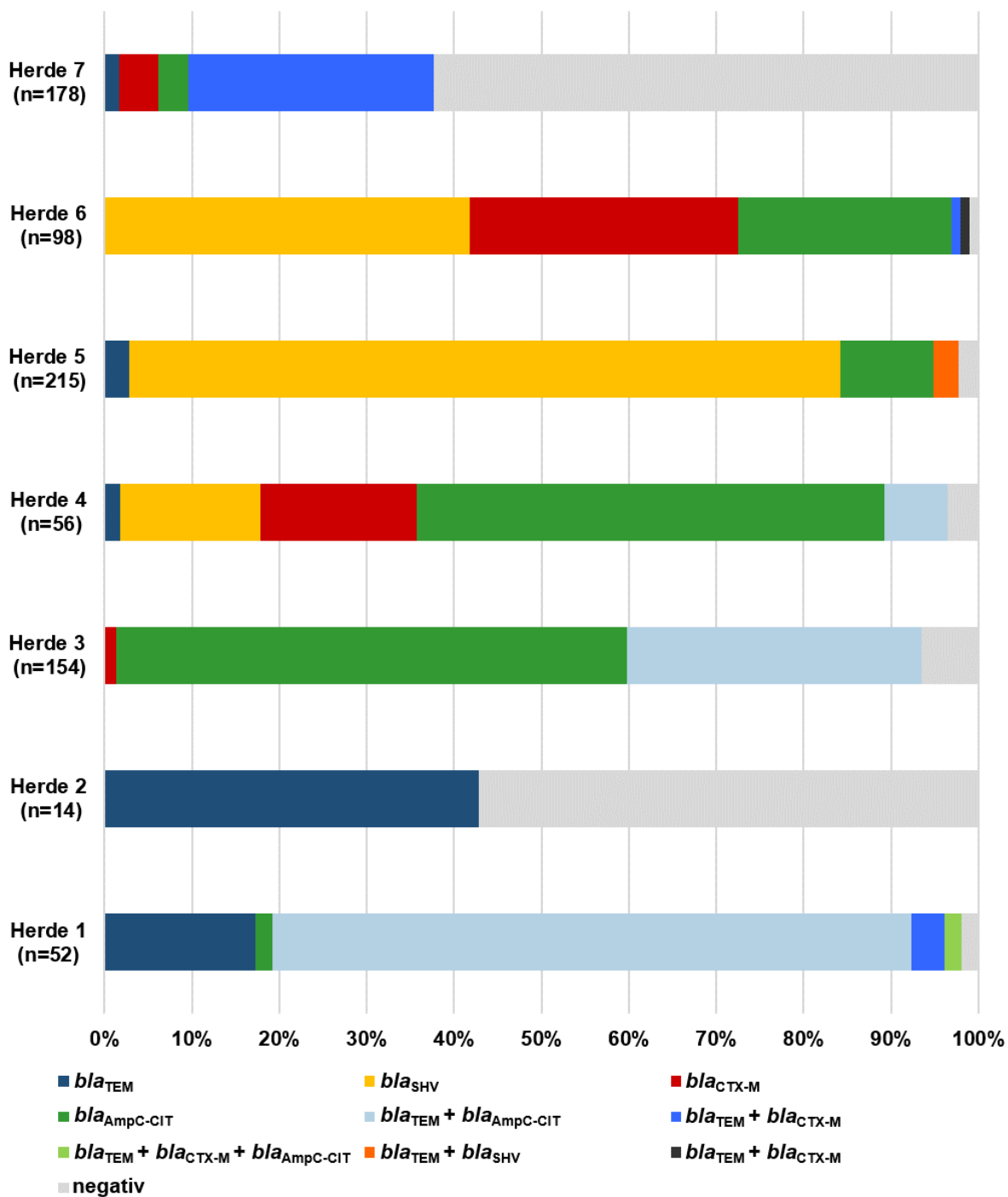


Abbildung 8 Mittels qPCR nachgewiesene *bla*-Gene in den Isolaten aller Probenmatrizes aus den Herden 1-7. Die aufgeschlüsselten Daten befinden sich zusätzlich im Anhang in Tabelle 21

5.6. Bestimmung der Phylogruppen

Zur genaueren Differenzierung der *E. coli*-Isolate wurden die Phylogruppen bestimmt.

Die häufigsten beiden Phylogruppen der qPCR-positiven *E. coli*-Isolate waren B1 bzw. F mit 33 % bzw. 30 %. Die Phylogruppe E/D konnte in 14 %, A/C in 12 %, A in 7 %, B2 in 3 % und E in 1 % der *E. coli*-Isolate bestimmt werden (Abbildung 9).

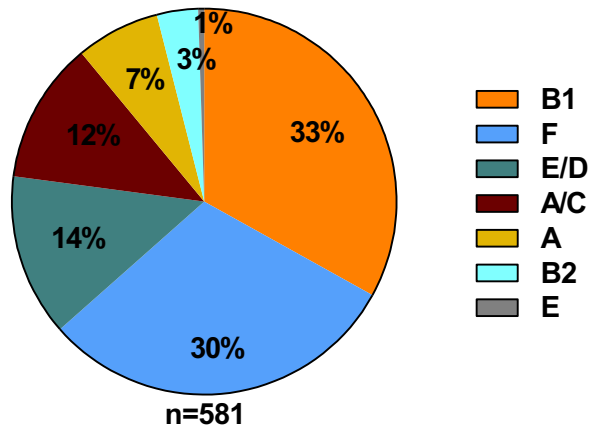


Abbildung 9 Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Phylogruppen der qPCR-positiven *E. coli*-Isolate

5.7. Sequenzierung der ESBL/AmpC-Gene

Bei insgesamt 322 Isolaten wurden die *bla*-Gene sequenziert. *bla*_{CMY-2} war mit 31 % die häufigste Gen-Variante. Bei 23 % der Isolate konnte *bla*_{SHV-12}, bei 17 % eine Kombination aus *bla*_{TEM-1} + *bla*_{CMY-2}, bei 11 % *bla*_{CTX-M-1}, bei 7 % *bla*_{TEM-1} + *bla*_{CTX-M-15}, bei 5 % *bla*_{TEM-52} und bei 1 % *bla*_{SHV-1} + *bla*_{SHV-2} detektiert werden. Zu geringen Anteilen von je < 1 % wurden *bla*_{SHV-2}, *bla*_{SHV-2a}, *bla*_{TEM-1} + *bla*_{SHV-12}, *bla*_{TEM-1} + *bla*_{SHV-27}, *bla*_{TEM-1} + *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-1} + *bla*_{CMY-2}, *bla*_{TEM-1} + *bla*_{CTX-M-15} + *bla*_{CMY-2}, *bla*_{TEM-1} + *bla*_{TEM-52} + *bla*_{CMY-2}, *bla*_{CMY-113}, *bla*_{SHV-1} sowie *bla*_{TEM-1} nachgewiesen (Abbildung 10).

*bla*_{SHV-1} sowie *bla*_{TEM-1} kodieren für Broad-Spectrum-Beta-Laktamasen (BSBLs). Somit konnte ein qPCR-positives Isolat aus Herde 6 (SHV-1) nicht als ESBL/AmpC-positiv bestätigt werden. Da aus dieser Probe ein weiteres AmpC-positives Isolat bestätigt werden konnte, blieb diese Probe insgesamt ESBL/AmpC-positiv. Bei Herde 7 konnten zwei qPCR-positive Isolate (TEM-1) nicht als ESBL/AmpC-positiv bestätigt werden. Diese beiden *E. coli* wurden jeweils als einziges Isolat aus einer Caecum- bzw. einer Hautprobe isoliert. Es waren somit alle Caecumproben der Herde 7 ESBL/AmpC-negativ und 20 von 25 Hautproben ESBL/AmpC-positiv. Alle Isolate mit einer *bla*_{SHV}-Variante wurden, bis auf vier Isolate, aus Herde 5 sowie 6 isoliert.

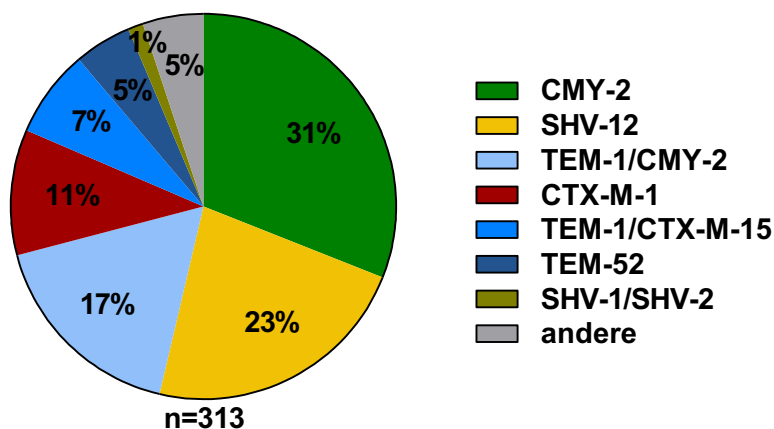


Abbildung 10 Dargestellt ist der prozentuale Anteil der sequenzierten *bla*-Gene ausgewählter Isolate der Herden 1-7. Die Sequenzierungsergebnisse der Nullproben sind nicht mit abgebildet.

Um die resistenten *Enterobacteriaceae* sowie mögliche Kontaminationsquellen besser analysieren zu können, wurden die Resistenzgene sowie die Phylogruppen sortiert nach der Probenart dargestellt (Abbildung 11, Abbildung 12, Abbildung 13). Es wurden auch die Nullproben der Umgebung berücksichtigt. Exemplarisch wurden Herde 5, 6 sowie 7 analysiert.

In Herde 5 konnten *E. coli*-Isolate der Phylogruppe B1 mit dem Resistenzgen *bla*_{SHV-12} mit 68 % (50/74) am häufigsten isoliert werden. Diese Kombination konnte sowohl in Caecum- als auch in Haut-, Filet- sowie Umgebungsproben nachgewiesen werden. *bla*_{CMY-2}-positive *E. coli* der Phylogruppe E/D (14 %) wurden aus den Caecum-, den Haut- sowie den Filetproben isoliert. Alle weiteren Spezies-Resistenzgen-Kombinationen konnten nur vereinzelt in den Filet-, Haut- oder Umgebungsproben nachgewiesen werden. In den Nullproben wurden keine ESBL/AmpC-produzierenden *Enterobacteriaceae* nachgewiesen. Außerdem konnte kein Isolat mit einem *bla*_{CTX-M}-Gen isoliert werden. Im Vergleich zu den anderen Herden fiel auf, dass besonders viele Isolate mit dem Gen *bla*_{SHV-12} vorkamen (Abbildung 11).

In Herde 6 konnten *E. coli*-Isolate der Phylogruppe F mit dem Resistenzgen *bla*_{CTX-M-1} mit 32 % (22/68) am häufigsten isoliert werden. Sie wurden neben den Nullproben auch in den Caecum-, Haut- sowie Umgebungsproben nachgewiesen. *E. fergusonii* mit dem Resistenzgen *bla*_{CMY-2} (26 %) sowie *E. coli* der Phylogruppe F mit dem Gen *bla*_{SHV-12} (16 %) wurden sowohl in den Caecum-, als auch in den Haut- und Umgebungsproben nachgewiesen werden. *K. pneumoniae* mit der Genkombination *bla*_{SHV-1/SHV-2} (1 %) wurden außer aus den Nullproben auch aus Hautproben isoliert. Aus den Nullproben konnten zwei *bla*_{CTX-M-1}-positive *E. coli* der Phylogruppe F (Rupfer, Haken schwarzer Bereich), zwei *bla*_{SHV-1/SHV-2}-positive *K. pneumoniae* (Brühwasser, Rupfer) sowie ein *C. freundii* mit einer neuen *bla*_{CMY}-Variante (Haken der Karkassen im weißen Bereich) isoliert werden. Die neue *bla*_{CMY}-Variante hat im Vergleich zu *bla*_{CMY-113} an Position 6 bzw. 185 einen Aminosäureaustausch von Leucin zu Isoleucin bzw. von Prolin zu Histidin (GenBank accession number: KY646092). Alle weiteren Spezies-Resistenzgen-Kombinationen wurden vereinzelt aus den Caecum-, Haut- oder Umgebungsproben isoliert. Bei SHV-1 (ein *bla*_{SHV-1}-positives *K. pneumoniae*-Isolat aus den Hautproben) handelt es sich um eine Broad-Spectrum-Beta-Laktamase. In den Filetproben konnten keine ESBL/AmpC-produzierenden *Enterobacteriaceae* nachgewiesen werden (Abbildung 12).

In Herde 7 wurden *E. coli*-Isolate der Phylogruppe A/C mit den Resistenzgenen *bla*_{TEM-1/CTX-M-15} mit 70 % (23/33) am häufigsten nachgewiesen. Sie konnten außer aus den Nullproben auch aus Haut-, Filet- sowie Umgebungsproben isoliert werden. Herde 7 ist die einzige Herde, in der ein Isolat mit dem Gen *bla*_{CMY-113} nachweisbar war. Aus den Nullproben konnten ebenfalls

zwei *bla*_{TEM-1/CTX-M-15}-positive *E. coli* der Phylogruppe A/C (Brühwasser, Rupfer) sowie zwei *bla*_{CMY-2}-positive *P. mirabilis* (Brühwasser, Rupfer) isoliert werden. *P. mirabilis* mit *bla*_{CMY-2} wurde außer aus den Nullproben auch aus Hautproben isoliert. In den Caecumproben wurde lediglich ein *E. coli*-Isolat der Phylogruppe B1 mit dem Gen *bla*_{TEM-1} nachgewiesen. *bla*_{TEM-1} kodiert für eine Broad-Spectrum-Beta-Laktamase. Alle weiteren Spezies-Resistenzgen-Kombinationen konnten vereinzelt in den Haut- oder Filetproben nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den anderen Herden fiel auf, dass besonders viele Isolate mit *bla*_{CTX-M-15} vorkamen (Abbildung 13).

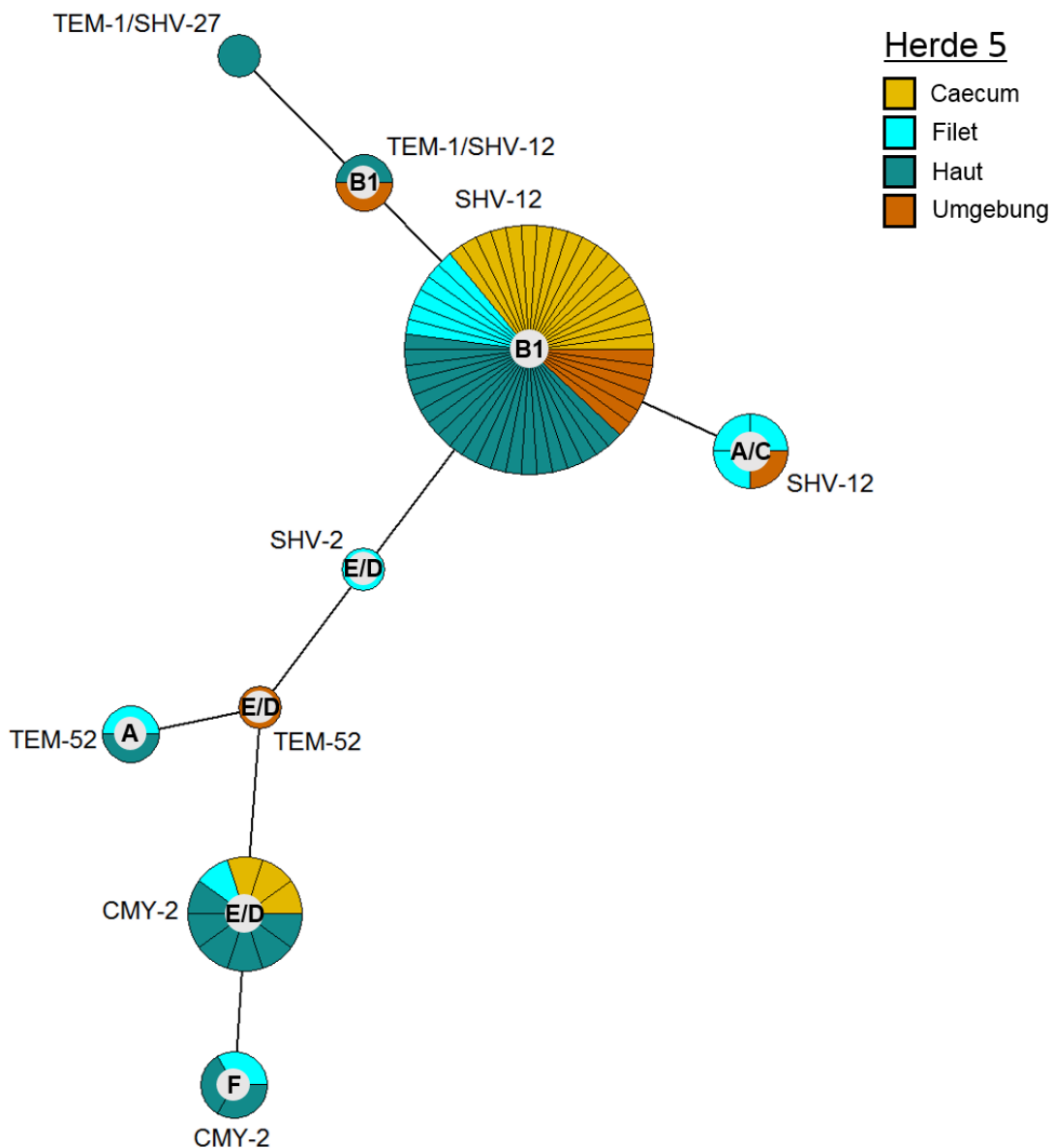


Abbildung 11 Dargestellt sind die Ergebnisse der sequenzierten *bla*-Gene aus 74 Isolaten der Herde 5 mit zugehöriger Phylogruppe. Die Größe der Kreise bzw. die Anzahl der Unterteilungen repräsentiert die Anzahl der Isolate mit der entsprechenden Phylogruppe (in der Mitte der Kreise benannt) und dem jeweiligen *bla*-Gen (neben den Kreisen benannt). Der Kreis ohne Phylogruppe steht für ein *K. pneumoniae*-Isolat.

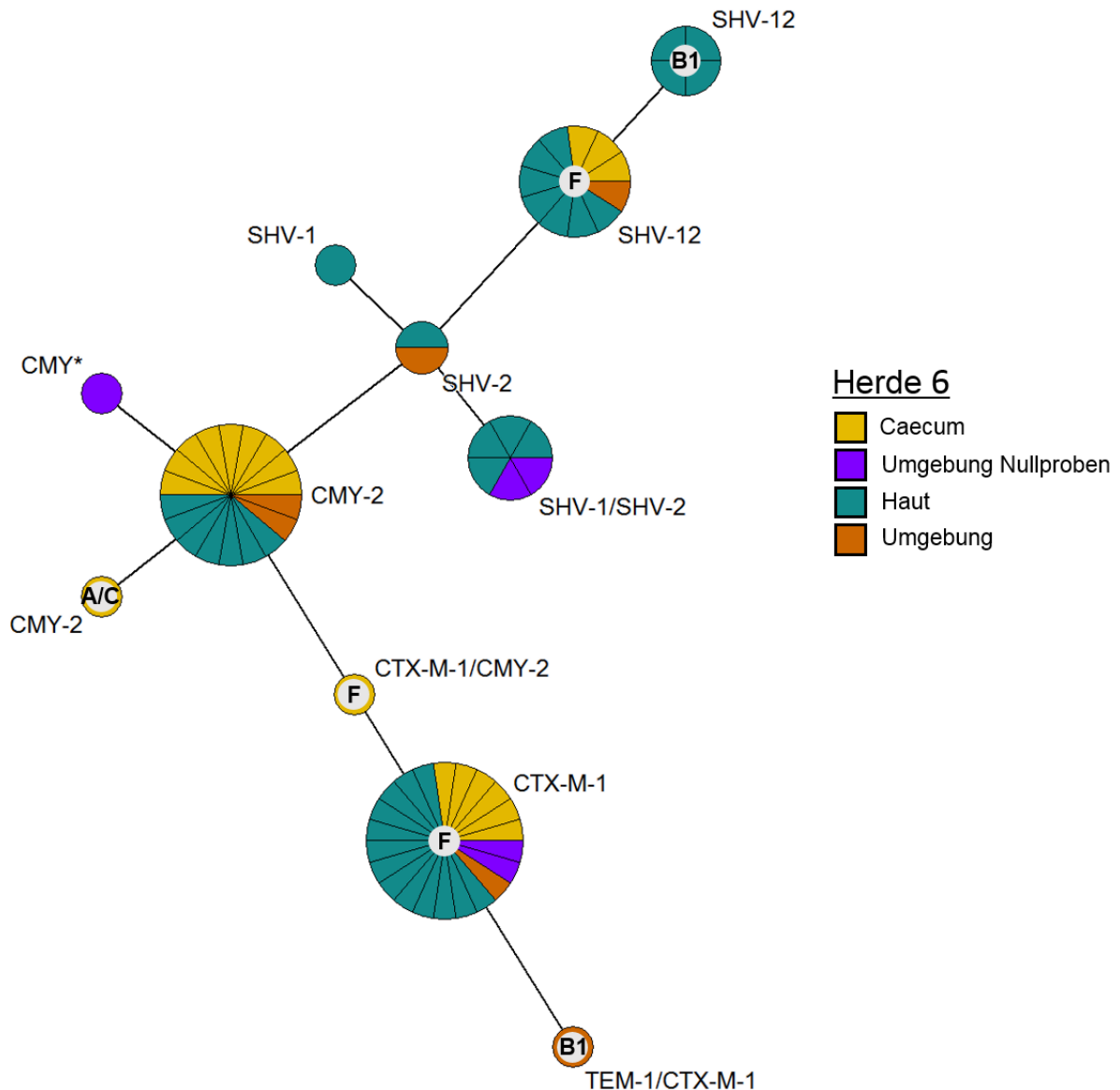


Abbildung 12 Dargestellt sind die Ergebnisse der sequenzierten *bla*-Gene aus 68 Isolaten der Herde 6 r t zugehöriger Phylogruppe. Die Größe der Kreise bzw. die Anzahl der Unterteilungen repräsentiert die Anzahl der Isolate mit der entsprechenden Phylogruppe (in der Mitte der Kreise benannt) und dem jeweiligen *bla*-Gen (neben den Kreisen benannt). Die Kreise ohne Phylogruppen stehen für 18 *E. fergusonii*- (CMY-2) und neun *K. pneumoniae*-Isolate (SHV-2; SHV-1/SHV-2 oder SHV-1) sowie einem *C. freundii*-Isolat (CMY*). Bei SHV-1 handelt es sich um eine Broad-Spectrum-Beta-Laktamase.

* neue CMY-Gen Variante (CMY-113 6L -> I 185P -> H; GenBank accession number: KY646092)

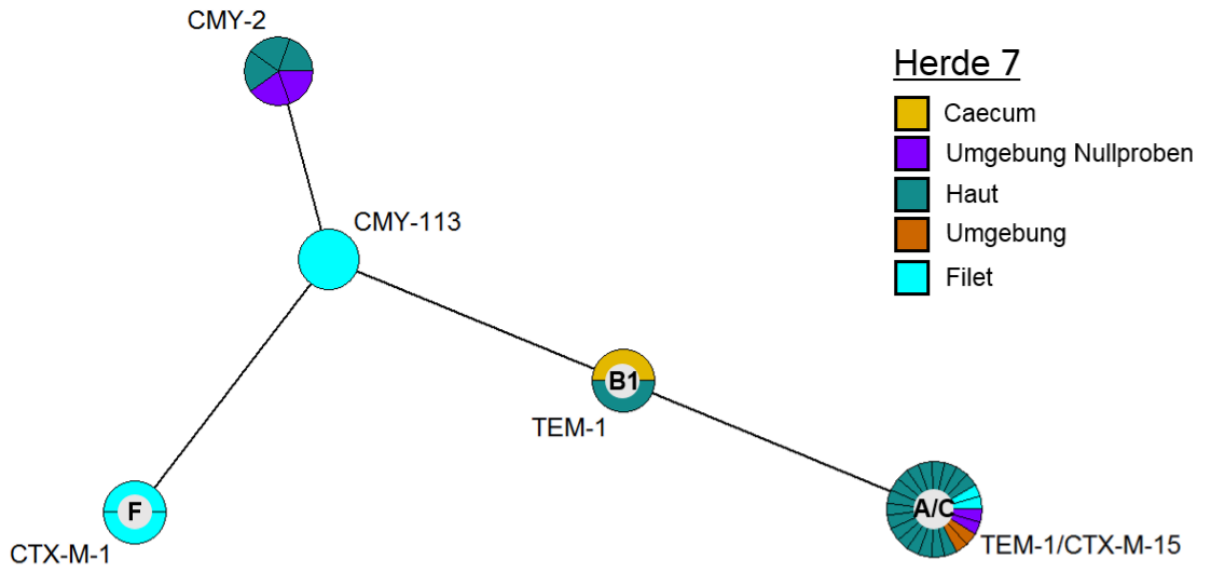


Abbildung 13 Dargestellt sind die Ergebnisse der sequenzierten *bla*-Gene aus 33 Isolaten der Herde 7 mit zugehöriger Phylogruppe. Die Größe der Kreise bzw. die Anzahl der Unterteilungen repräsentiert die Anzahl der Isolate mit der entsprechenden Phylogruppe (in der Mitte der Kreise benannt) und dem jeweiligen *bla*-Gen (neben den Kreisen benannt). Die Kreise ohne Phylogruppen stehen für fünf *P. mirabilis*-Isolate (CMY-2) sowie einem *C. freundii*-Isolat (CMY-113). Bei TEM-1 handelt es sich um eine Broad-Spectrum-Beta-Laktamase.

6. Diskussion

Im Zeitraum von 2014 bis 2016 wurde die Prävalenz ESBL/AmpC-produzierender *Enterobacteriaceae* während der Schlachtung von sieben Mastgeflügelherden sowie die quantitative Belastung verschiedener Probenmatrizes erfasst. Zudem wurde die Umgebung während der Schlachtung der jeweiligen Herde beprobt, um Hinweise auf mögliche Quellen für Kontaminationen bzw. Kreuzkontaminationen sowie Übertragungswege zu erhalten.

6.1. Qualitative Analyse

In allen sieben untersuchten Herden konnten ESBL/AmpC-produzierende *Enterobacteriaceae* während des Schlachtprozesses nachgewiesen werden. Allerdings variierte die Prävalenz ESBL/AmpC-produzierender *Enterobacteriaceae* in den Caecum- (0 % - 88 %), Haut- (0 % - 96 %), Filet- (0 % - 84 %) sowie Umgebungsproben (8 % - 62 %) der sieben Herden stark. Eine mögliche Erklärung für die Unterschiede zwischen den Herden wäre eine Behandlung mit Antibiotika, die als potenzieller Risikofaktor für das vermehrte Vorkommen ESBL/AmpC-produzierender *Enterobacteriaceae* in Geflügel diskutiert wird (Cohen Stuart et al., 2012; Dierikx et al., 2013b). Da lediglich Herde 1 während der Mast mit einem Antibiotikum behandelt worden war, konnte in der vorliegenden Studie kein Zusammenhang zwischen dem vermehrten Vorkommen ESBL/AmpC-produzierender *Enterobacteriaceae* und dem Einsatz von Antibiotika hergestellt werden. So war die Prävalenz ESBL/AmpC-produzierender *Enterobacteriaceae* der Caecum-, Haut- sowie Filetproben in Herde 3 bzw. Herde 5 mit 88 % (22/25), 68 % (17/25), 84 % (21/25) bzw. 84 % (21/25), 96 % (24/25), 44 % (11/25) sogar höher als die der antimikrobiell behandelten Herde 1 mit 84 % (21/25) in den Caecum-, 24 % (6/25) in den Haut- sowie 32 % (8/25) in den Filetproben. Auch Hiroi et al. (2012) kamen in ihrer Studie zu dem Ergebnis, dass der Einsatz von Antibiotika keinen steigernden Einfluss auf das Vorkommen von ESBL-produzierenden *E. coli* bei Masthähnchen hatte.

Durchschnittlich konnten in 47 % (83/175) der Caecumproben ESBL/AmpC-produzierende *Enterobacteriaceae* nachgewiesen werden. Das Ergebnis lag verglichen mit verschiedenen Studien im Bereich der ermittelten Einzeltierprävalenzen für ESBL/AmpC-produzierende *Enterobacteriaceae* bei Masthähnchen von 13 % - 100 % (siehe Tabelle 3). Verglichen mit der Studie von Reich et al. (2016) lag die Prävalenz ESBL/AmpC-produzierender *Enterobacteriaceae* in der vorliegenden Arbeit in den Caecumproben um 43 % niedriger. Da Reich et al. (2016) gepoolte Caecumproben untersuchten, steigt die Wahrscheinlichkeit einer ESBL/AmpC-positiven Probe im Gegensatz zu Einzeltierproben. Verglichen mit der ermittelten Prävalenz ESBL/AmpC-produzierender *Enterobacteriaceae* auf Karkassen von 89 % (ESBL-Bildner) bzw. 53 % (AmpC-Bildner) in der Studie von Reich et al. (2013) war die Prävalenz

ESBL/AmpC-produzierender *Enterobacteriaceae* in den Hautproben der vorliegenden Arbeit mit 55 % (96/175) niedriger. Eine mögliche Ursache dafür könnte darin liegen, dass in der vorliegenden Arbeit lediglich 25 g Haut pro Karkasse und keine kompletten Karkassen untersucht wurden. Auch verglichen mit einer anderen Studie von Reich et al. (2016) lag die ermittelte Prävalenz der Hautproben in der vorliegenden Arbeit um 15 % niedriger. Hierfür dürfte analog zu der Situation bei den Caecumproben das Poolen von je zehn Halshautproben zu einer Sammelprobe ursächlich sein. Es fällt auf, dass der Unterschied in den Prävalenzen der gepoolten Caecumproben der Studie von Reich et al. (2016) und der Einzeltier-Caecumproben der vorliegenden Arbeit größer ist als zwischen den gepoolten Halshautproben und den Hautproben der vorliegenden Arbeit. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Hautproben der vorliegenden Arbeit nach der Eviszation (auf Höhe der amtlichen Fleischuntersuchung) genommen wurden und nicht, wie in der Studie von Reich et al. (2016), nach der Kühlung. So konnten Pacholewicz et al. (2015) zeigen, dass sich die Konzentration ESBL/AmpC-produzierender *Enterobacteriaceae* auf Karkassen je nach Schlachthof sowie Schlachtcharge von der Eviszation bis zur Kühlung um 0,5 – 1,5 Logstufen reduzierte. Somit sind die Hautproben der vorliegenden Arbeit aufgrund des früheren Probenahmezeitpunktes potentiell höher mit ESBL/AmpC-produzierenden *Enterobacteriaceae* belastet.

Die durchschnittliche Prävalenz von 28 % (49/175) in den Filetproben der vorliegenden Arbeit ist verglichen mit anderen Studien aus Deutschland niedriger. So wiesen Kola et al. (2012) in 44 % und Belmar Campos et al. (2014) in 60 % der Hähnchenfleischproben ESBL-produzierende *Enterobacteriaceae* nach. Eine mögliche Ursache könnte sein, dass sowohl Kola et al. (2012) als auch Belmar Campos et al. (2014) Hähnchenfleisch aus dem Einzelhandel untersucht haben. Die Proben aus dem Einzelhandel haben folglich die komplette Prozesskette inklusive Verpackung und Distribution durchlaufen. Somit könnte es zu mehr Kontaminationen über möglicherweise kontaminierte Maschinen sowie zwischen den Filets selbst gekommen sein. In der vorliegenden Arbeit wurden die Filets ca. 1-2 h nach der Schlachtung von dem Schlachthofpersonal den Karkassen entnommen und direkt einzeln in Tüten verpackt. Dadurch kamen die Filets nicht mit den Maschinen und auch nicht untereinander in Kontakt.

Da auch in der vorliegenden Arbeit mehr als ein Viertel der Filetproben und mehr als die Hälfte der Hautproben mit ESBL/AmpC-produzierenden *Enterobacteriaceae* belastet war, muss davon ausgegangen werden, dass Hähnchenfleisch, insbesondere bei Nichtbeachten der Küchenhygiene, ein potentielles Risiko für den Verbraucher darstellen könnte.

Die Umgebung von Hähnchen innerhalb sowie außerhalb des Maststalles wurde bereits in anderen Studien beprobt (Blaak et al., 2015; Dierikx et al., 2013b; Laube et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit wurden Umgebungsproben (weißer Bereich: Luft, Wäscher, Haken der Karkassen sowie Haken der Darmkonvolute; schwarzer Bereich: Brühwasser, Rupfer, Kisten nach erfolgter Reinigung und Desinfektion) im Schlachthof während des Schlachtprozesses der beprobten Masthähnchenherden auf ESBL/AmpC-produzierende *Enterobacteriaceae* untersucht. Durchschnittlich konnten in 28 % (25/89) der Umgebungsproben ESBL/AmpC-produzierende *Enterobacteriaceae* nachgewiesen werden. Vor allem die Tupferproben der Haken (Organkonvolute, weißer Bereich), des Rupfers sowie des Brühwassers enthielten ESBL/AmpC-produzierende *Enterobacteriaceae*. Die resistenten Bakterien konnten aber auch an den Haken der Karkassen (weißer Bereich) sowie dem Wäscher nachgewiesen werden. Das verdeutlicht, dass ESBL/AmpC-produzierende *Enterobacteriaceae* während des Schlachtprozesses an verschiedenen Stellen im Schlachthof vorkommen können und somit eine potentielle Quelle für Kontaminationen bzw. Kreuzkontaminationen sowohl der aktuell geschlachteten als auch der nachfolgenden Herden darstellen könnten. Besonders hervorzuheben ist, dass bei allen bis auf zwei Herden ESBL/AmpC-produzierende *Enterobacteriaceae* auch in den Transportkisten der Masthähnchen, nach erfolgter Reinigung und Desinfektion, nachgewiesen werden konnten. Das bedeutet, dass mit den Kisten ESBL/AmpC-produzierende *Enterobacteriaceae* zurück zu den Mastbetrieben gelangen und dort wiederum über das Personal verbreitet werden könnten. Die nachfolgend in den Kisten transportierten Masthähnchen könnten mit den resistenten Bakterien kontaminiert werden.

Obwohl in anderen Studien in der Abluft aus Geflügelhaltungssystemen bzw. aus der Umgebung von Wasseraufbereitungsanlagen ESBL/AmpC-produzierende *Enterobacteriaceae* in der Luft nachgewiesen wurden (Blaak et al., 2015; Korzeniewska und Harnisz, 2013b; Laube et al., 2014), konnten in der vorliegenden Arbeit keine ESBL/AmpC-produzierenden *Enterobacteriaceae* in der Luft detektiert werden. Allerdings wurden die Luftproben im weißen Bereich auf Höhe der amtlichen Fleischuntersuchung genommen. In folgenden Studien sollte die Luft auch im schwarzen Bereich beprobt werden, da dort durch den Federstaub beim Einhängen des Geflügels sowie der anschließend sehr hohen Luftfeuchtigkeit unter anderem durch das Brühwasser ESBL/AmpC-produzierende *Enterobacteriaceae* möglicherweise besser aerogen verbreitet werden könnten. Unter Umständen könnten schon zu Beginn der Prozesskette ESBL/AmpC-produzierende *Enterobacteriaceae* auch über die Luft verteilt und somit in die folgenden Prozessschritte gelangen.

6.2. Quantitative Analyse

Bei der quantitativen Untersuchung lagen bei 57 % (23/40) der Caecum-, 47 % (19/40) der Haut- sowie 85 % (17/20) der Filetproben die Keimzahlen der Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* unter der quantitativen Nachweisgrenze von $1,5 \times 10^2$ KbE/g für Caecum- und Haut- bzw. $1,5 \times 10^1$ KbE/g für Filetproben. Auch in anderen Studien lagen 61 % der Karkassen- bzw. 67 % der Halshautproben unter der quantitativen Nachweisgrenze von 5×10^3 KbE/Karkasse bzw. 10^1 KbE/g für Halshautproben (Reich et al., 2013; Reich et al., 2016). In den Caecumproben lag die Keimzahl der Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* im Median bei $2,5 \times 10^3$ KbE/g. Dies ist vergleichbar mit dem Median der Keimzahl von $5,4 \times 10^3$ KbE/g für Caecumproben von Hähnchen in der Studie von Horton et al. (2011). Die Keimzahl liegt allerdings um eine bzw. drei Logstufen unter den ermittelten Werten von Reich et al. (2016) bzw. Laube et al. (2013). Ein möglicher Grund könnte sein, dass in beiden Studien gepoolte Caecumproben quantifiziert wurden. Zudem wurde in der Studie von Reich et al. (2016) sowohl für die Quantifizierung der Gesamt-*E. coli* als auch der Cefotaxim-resistenten *E. coli* eine andere Nachweismethode verwendet. Möglicherweise war aber, insbesondere in der Studie von Laube et al. (2013), eine höhere quantitative Belastung der Proben mit ESBL/AmpC-produzierenden *Enterobacteriaceae* ursächlich für die höheren Keimzahlen.

Die Keimzahl der Gesamt-*Enterobacteriaceae* bzw. Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* in den Hautproben lag mit einem Median von $9,5 \times 10^5$ KbE/g bzw. $1,5 \times 10^3$ KbE/g um ca. 2 bzw. 1,5 Logstufen höher als die Keimzahl der Gesamt-*E. coli* bzw. Cefotaxim-resistenten *E. coli* in den Halshautproben der Studie von Reich et al. (2016). Eine mögliche Erklärung könnte der Probenahmezeitpunkt sein, da die Halshautproben von Reich et al. (2016) zu einem späteren Zeitpunkt (nach der Kühlung) untersucht wurden. Pacholewicz et al. (2015) konnten auf den Karkassen nach der Kühlung ESBL/AmpC-*E. coli*-Konzentrationen zwischen 10^2 und 10^5 KbE/Karkasse nachweisen. Diese Keimzahlen lassen sich allerdings mit denen aus der vorliegenden Arbeit schwer vergleichen, da sie sich auf die gesamte Karkasse und nicht auf 1 g der Probe beziehen.

Die Konzentration ESBL/AmpC-produzierender *Enterobacteriaceae* in den Filetproben lag im Median bei $1,5 \times 10^2$ KbE/g. Allerdings lagen nur 15 % (3/20) der quantifizierten Filetproben über der Nachweisgrenze, sodass aufgrund der geringen Anzahl der auswertbaren Proben dieser Wert schwer vergleichbar ist. Cohen Stuart et al. (2012) wiesen mit 80 KbE/25 g im Median in ihrer Studie weniger ESBL-produzierende *Enterobacteriaceae* nach. Auch hier wurde eine andere Nachweismethode als in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Bei allen Probenmatrizes wird deutlich, dass eine hohe Prävalenz ESBL/AmpC-produzierender *Enterobacteriaceae* nicht unbedingt hohe Konzentrationen zur Folge hat. Das

zeigte sich auch in anderen Studien (Cohen Stuart et al., 2012; Reich et al., 2013; Reich et al., 2016). Allerdings konnten Smet et al. (2011) anhand eines *in situ*-Fermentationssystems zeigen, dass ein Gentransfer zwischen aviären und humanen *E. coli*-Stämmen bereits bei einer Konzentration von 10^3 KbE/ml des Donor-Stammes stattfinden konnte.

Der Median der Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* lag je nach Probenmatrix 1-4 Logstufen unter dem Median der Gesamt-*Enterobacteriaceae*. Die Konzentrationen der Gesamt-*Enterobacteriaceae* waren wie erwartet mit $2,8 \times 10^7$ KbE/g im Caecum, $9,5 \times 10^5$ KbE/g auf der Haut und $3,6 \times 10^3$ im Filet unterschiedlich hoch. Es fällt allerdings auf, dass die Anzahl der Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* in den Caecum- ($2,5 \times 10^3$ KbE/g) sowie Hautproben ($1,5 \times 10^3$ KbE/g) gleich hoch und auf den Filetproben ($1,5 \times 10^2$ KbE/g) nur um eine Logstufe niedriger war. Somit war, vergleichbar mit der Studie von Reich et al. (2016), der Anteil der Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* an den Gesamt-*Enterobacteriaceae* höher in den Haut- als in den Caecumproben.

In der vorliegenden Arbeit konnte wie bei Reich et al. (2016) keine Korrelation zwischen der Keimzahl der Gesamt-*Enterobacteriaceae* und der Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* im Caecum nachgewiesen werden. Jedoch konnte gezeigt werden, dass in drei der vier quantitativ untersuchten Herden die Keimzahl der Gesamt-*Enterobacteriaceae* auf der Haut mit der Keimzahl der Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* korrelierte. Eine mögliche Erklärung könnte das je nach Kontamination vorliegende Verhältnis von *Enterobacteriaceae* zu Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* im Brühwasser darstellen. Da die ganze Herde in dasselbe Brühwasser getaucht wird, könnte sich für die gesamte Herde, je nach Zusammensetzung der Mikroflora des Brühwassers, ein ähnliches Verhältnis von *Enterobacteriaceae* zu Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* auf der Haut ergeben.

Die Keimzahl der Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* der Caecumprobe korrelierte nicht mit der Keimzahl der Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* der jeweiligen Hautprobe des Tieres. Somit konnte gezeigt werden, dass eine hohe Konzentration ESBL/AmpC-produzierender *Enterobacteriaceae* im Caecum des Einzeltieres nicht unbedingt eine hohe Konzentration auf dessen Haut bedingte. Umgekehrt bedingte eine niedrige Konzentration im Caecum nicht automatisch eine niedrige Konzentration auf der Haut. Das deutet daraufhin, dass nicht nur das Einzeltier und die Herde, sondern auch die Umgebung wie z. B. das Brühwasser einen Einfluss auf die Konzentration ESBL/AmpC-produzierender *Enterobacteriaceae* auf der Haut haben könnte.

Neben der unterschiedlich hohen Prävalenz der Herden zeigten sich auch bei der quantitativen Untersuchung Unterschiede zwischen den Herden. Die Keimzahl der Gesamt-*Enterobacteriaceae* sowie Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* in den Caecum- sowie Hautproben unterschied sich teilweise signifikant zwischen den Herden (siehe Abbildung 6). Dabei fiel auf, dass sich die Keimzahl der Gesamt-*Enterobacteriaceae* im Caecum von Herde 4 und 5 signifikant voneinander unterschieden, jedoch die Keimzahl der Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* nicht. Umgekehrt unterschieden sich die Keimzahlen der Gesamt-*Enterobacteriaceae* in den Caecumproben von Herde 4 und 7 bzw. den Hautproben von Herde 4 und 5 nicht signifikant voneinander, während sich die Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* der jeweiligen Herden signifikant voneinander unterschieden. Es wird zudem deutlich, dass von der Keimzahl der *Enterobacteriaceae* nicht auf die absolute Konzentration der Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* geschlossen werden konnte. So war z. B. im Mittel die Keimzahl der *Enterobacteriaceae* im Caecum der Herde 4 um ca. 1,5 Logstufen höher als in Herde 5. Jedoch war die Keimzahl der Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* im Caecum von Herde 4 um ca. 0,5 Logstufen niedriger als in Herde 5 (siehe Abbildung 6).

6.3. Genus- und Spezies-Bestimmung der Isolate

Von insgesamt 767 Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* konnten 87 % (667/767) als *E. coli* identifiziert werden. Auch in anderen Studien zu ESBL-produzierenden *Enterobacteriaceae* wurde bei der Untersuchung von Caecum- sowie Karkassenproben (Reich et al., 2013), als auch von Hähnchenfleisch (Belmar Campos et al., 2014; Kola et al., 2012) überwiegend *E. coli* nachgewiesen. Daher wurde in einigen Studien Geflügel während des Schlachtprozesses direkt auf ESBL/AmpC-produzierende *E. coli* und nicht auf weitere Spezies der Familie der *Enterobacteriaceae* untersucht (Pacholewicz et al., 2015; Reich et al., 2016).

Reich et al. (2013) wiesen bei 78 Isolaten neben *E. coli* lediglich zwei Isolate des Genus *Enterobacter* sowie zwei *Proteus mirabilis*-Isolate nach. In der vorliegenden Arbeit konnten vor allem Cefotaxim-resistente *E. fergusonii*- (n=32), *H. alvei*- (n=24), *Proteus* spp.- (n=17) sowie *K. pneumoniae*-Isolate (n=15) nachgewiesen werden. Alle Cefotaxim-resistenten sowie phänotypisch ESBL/AmpC-positiven *E. fergusonii*-, *K. pneumoniae*- sowie *P. mirabilis*-Isolate (n=8) wurden auch genotypisch bestätigt. *E. fergusonii* konnte sowohl in der Humanmedizin im Zusammenhang mit Wundinfektionen, abdominalen Abszessen, Harnwegsinfektionen, Sepsis und Durchfällen (Lagace-Wiens et al., 2010; Mahapatra et al., 2005) als auch von Tieren mit schweren Durchfällen isoliert werden (Hariharan et al., 2007; Herraes et al., 2005). Zudem wurden bereits multiresistente *E. fergusonii*-Isolate sowohl bei Hähnchen (Forgetta et

al., 2012) als auch bei Patienten mit Cystitis nachgewiesen (Lagace-Wiens et al., 2010; Savini et al., 2008). Diese Studien sowie der Nachweis ESBL/AmpC-produzierender *E. fergusonii* in der vorliegenden Arbeit verdeutlichen, dass auch andere Spezies der Familie der *Enterobacteriaceae* auf das Vorhandensein von ESBLs sowie AmpC- β -Laktamasen untersucht werden sollten. Allerdings konnte in keinem der Cefotaxim-resistenten *H. alvei*-, *P. vulgaris*-, *M. morgani*- sowie *Enterobacter* spp.-Isolate eines der untersuchten ESBL/AmpC-Gene nachgewiesen werden. Bei den Cefotaxim-resistenten *C. freundii*-Isolaten konnten nicht alle genotypisch als ESBL/AmpC-positiv bestätigt werden.

Das Fehlen eines genotypischen Nachweises in phänotypisch als AmpC klassifizierten Isolaten könnte damit zusammenhängen, dass bei vielen *Enterobacteriaceae* (außer *Klebsiella* spp. sowie *Proteus* spp.) *ampC* chromosomal vorliegen kann und es unter anderem durch Mutationen in der Promoter/Attenuator-Region zu einer dauerhaft hohen *ampC*-Expression und somit zu einer Resistenz gegen β -Laktam-Antibiotika kommen kann (Jacoby, 2009; Peter-Getzlaff et al., 2011). Die in der vorliegenden Arbeit verwendete qPCR konnte lediglich *bla*_{AmpC-CIT}-Gene nachweisen. Bei *Enterobacter* spp. kann es über Veränderungen der Membranproteine zu einer Resistenz gegen β -Laktam-Antibiotika kommen (Hopkins und Towner, 1990). Außerdem wurde in der vorliegenden Arbeit nur auf die häufigsten ESBL/AmpC-Gene mittels qPCR untersucht. Somit könnte die Resistenz der Isolate auch durch andere ESBL-kodierende Gene wie z. B. *bla*_{OXA} oder *bla*_{PER} verursacht worden sein. Da 78 der 92 phänotypisch positiven, aber genotypisch ESBL/AmpC-negativen Isolate aus Herde 7 stammten und zudem in dieser Herde alle Caecumproben mittels qPCR ESBL/AmpC-negativ getestet wurden, könnte es möglich sein, dass insbesondere in dieser Herde eine andere Genvariante für die Resistenz der Isolate verantwortlich war. Das Vorhandensein von ESBLs in *Enterobacteriaceae* kann zudem phänotypisch durch die Expression von AmpC β -Laktamasen überdeckt werden (Yilmaz et al., 2013). Das könnte erklären, warum drei der Isolate phänotypisch als AmpC-produzierende *Enterobacteriaceae* klassifiziert wurden, jedoch für ESBLs kodierende Gene detektiert wurden.

Insgesamt eignete sich die verwendete qPCR der vorliegenden Arbeit gut für die genotypische Bestätigung der phänotypisch ESBL/AmpC-positiven Isolate. Lediglich bei drei Isolaten wurde bei der Sequenzierung ausschließlich eine Broad-Spectrum-Beta-Laktamase (TEM-1, SHV-1) und keine ESBL/AmpC-Beta-Laktamase nachgewiesen.

6.4. Bestimmung der ESBL/AmpC-Gene

Bei 82 % (629/767) der Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* konnte mindestens eines der untersuchten *bla*_{ESBL/AmpC}-Gene mittels qPCR nachgewiesen werden. Die detektierten

ESBL/AmpC-Typen entsprechen den am häufigsten aus Geflügel in Europa isolierten Varianten (Seiffert et al., 2013). Erneut zeigten sich Unterschiede zwischen den Herden. So konnte in den Herden 1, 3 und 4 *bla*_{AmpC-CIT}, auch in Kombination mit *bla*_{TEM}, am häufigsten nachgewiesen werden, während in den Herden 5 und 6 *bla*_{SHV} dominierte. In Herde 2 konnten lediglich 14 Cefotaxim-resistente *Enterobacteriaceae* isoliert werden, von denen nur sechs ein über die qPCR detektierbares Gen (*bla*_{TEM}) besaßen. In Herde 7 konnte für den Großteil der Isolate (62 %) keines der untersuchten *bla*-Gene detektiert werden. Gleichzeitig war das die Herde mit der höchsten Anzahl an Isolaten mit Genen vom *bla*_{CTX-M}-Typ (58/178). Diese Unterschiede zeigten sich auch in der Untersuchung von verschiedenen Mastgeflügel-Farmen in Deutschland. In einigen Farmen konnte *bla*_{AmpC-CIT} am häufigsten in den Isolaten nachgewiesen werden, während bei anderen *bla*_{SHV} dominierte (Laube et al., 2013). Es könnte sein, dass bereits in der Brüterei ESBL/AmpC-produzierende *Enterobacteriaceae* über eine kontaminierte Umgebung bzw. kontaminierte Eioberflächen auf die Küken übertragen werden (Projahn et al., 2017). So könnten sich je nach Kontamination der Umgebung bzw. der Eioberflächen unterschiedliche ESBL/AmpC-Typen in den Herden etablieren. Auch während der Mast könnte durch mit ESBL/AmpC-produzierenden *Enterobacteriaceae* kontaminierte Umgebung, Futter oder Personal eine Übertragung mit unterschiedlichen ESBL/AmpC-Typen auf die Masthähnchen stattfinden. Letztlich könnten auch die Umgebung auf dem Schlachthof, insbesondere das Brühwasser und der Rupfer sowie der Schlachtzeitpunkt, einen Einfluss auf die Unterschiede der detektierten ESBL/AmpC-Gene in den Isolaten der Herden haben. So konnten Pacholewicz et al. (2015) einen Zusammenhang zwischen der Diversität der Resistenzgene und dem Schlachtzeitpunkt zeigen. Die Ähnlichkeit der detektierten Genotypen war nach dem Entbluten der Masthähnchen und nach der Kühlung höher bei Herden, die am Anfang des Tages geschlachtet wurden.

6.5. Bestimmung der Phylogruppen

Der Großteil der *E. coli*-Isolate gehörte den Phylogruppen B1 (33 %) sowie F (30 %) an. Die Phylogruppe B1 kam in der Studie von Kluytmans et al. (2013), die ESBL-*E. coli* aus Hähnchenfleisch sowie humane ESBL-*E. coli* untersuchten, mit 44 % ebenfalls am häufigsten vor. Es fiel auf, dass *E. coli* der Phylogruppe A mit 7 % selten vorkamen. In anderen Studien wurde die Phylogruppe A bei *E. coli*-Isolaten aus Geflügel mit bis zu 57 % häufiger nachgewiesen (Bagheri et al., 2014; Kluytmans et al., 2013; Pasquali et al., 2015; Reich et al., 2013). Allerdings wurde in der vorliegenden Arbeit lediglich die quadruplex-PCR nach Clermont et al. (2013) für die Bestimmung der Phylogruppen verwendet. Die weitere Differenzierung der Phylogruppe A/C (12 %) zu A oder C wurde nicht vorgenommen. Somit könnte der Anteil der *E. coli*-Isolate mit der Phylogruppe A durchaus höher sein. Zudem wurde in den anderen Studien die ältere PCR nach Clermont et al. (2000) für die Bestimmung der

Phylogruppen genutzt. Das könnte zu einem höheren Anteil der Phylogruppe A geführt haben, da insbesondere bei den Phylogruppen A und D unter Umständen eine Wiederholung der Phylogruppenbestimmung mittels quadruplex-PCR empfohlen wurde (Clermont et al., 2013). Letztlich wurden nicht in allen Studien ausschließlich ESBL-produzierende *E. coli* untersucht (Bagheri et al., 2014; Pasquali et al., 2015). In der vorliegenden Arbeit erfolgte der Nachweis der *E. coli*-Isolate ausschließlich auf Cefotaxim-haltigem MacConkey Agar. Ein Zusammenhang zwischen Resistenzgenen und Probenmatrizes und bestimmten Phylogruppen konnte allerdings nicht hergestellt werden.

6.6. Sequenzierung der ESBL/AmpC-Gene

Die Sequenzierung der Resistenzgene zeigte, dass alle Isolate, die laut qPCR neben bla_{TEM} noch mindestens ein weiteres Resistenzgen besaßen, die Broad-Spectrum-Beta-Laktamase TEM-1 aufwiesen. Hingegen handelte es sich bei allen, bis auf zwei Isolaten, die laut qPCR nur das Resistenzgen bla_{TEM} besaßen, um TEM-52. Am häufigsten wurde bla_{CMY-2} mit 31 % (99/322), auch häufig in Kombination mit bla_{TEM-1} (17 %) sowie bla_{SHV-12} (23 %) nachgewiesen. Dies entspricht den ermittelten Resistenzgenen in Isolaten aus Mastgeflügel (Dierikx et al., 2013b; Laube et al., 2013), Mastgeflügel während der Schlachtung (Pacholewicz et al., 2015) sowie aus Geflügelfleisch (Borjesson et al., 2013; Kola et al., 2012) anderer Studien. Einige Studien konnten aber auch $bla_{CTX-M-1}$ als häufigstes Gen nachweisen (Belmar Campos et al., 2014; Randall et al., 2017; Reich et al., 2013; Smet et al., 2008).

E. coli-Isolate der Phylogruppe B1 mit dem Gen bla_{SHV-12} konnten in Herde 5 mit 68 % am häufigsten nachgewiesen werden. Isolate mit dieser Kombination konnten in Caecum, Haut, Filet sowie in der Umgebung detektiert werden. Da die Herde als erste an dem Tag geschlachtet wurde, in keiner der Nullproben ESBL/AmpC-produzierende *Enterobacteriaceae* nachweisbar waren und die Kombination auch im Caecum nachgewiesen wurde, könnten die Hähnchen dieser Herde diesen Stamm in den Schlachthof eingetragen haben. Da die Kombination auch in der Umgebung (unter anderem im Brühwasser sowie am Rupfer) während des Schlachtprozesses nachgewiesen wurde, könnte eine Kontamination durch Fäzes erfolgt sein. Das Gefieder könnte zudem bereits während des Transports mit Fäzes und folglich mit *E. coli* dieses Typs kontaminiert worden sein und somit in das Brühwasser, auf den Rupfer sowie auf die Haut gelangt sein. Dieser *E. coli*-Typ konnte jedoch nicht in den Transportkisten nach erfolgter Reinigung und Desinfektion nachgewiesen werden. Dies könnte aber in diesem Fall auch hinweisend für eine ausreichende Reinigung und Desinfektion sein. Ebenfalls im Caecum und vermehrt auf der Haut wurden *E. coli* der Phylogruppe E/D mit dem Resistenzgen bla_{CMY-2} nachgewiesen. *E. coli* der Phylogruppe A/C mit dem Resistenzgen bla_{SHV-12} bzw. *E. coli* der Phylogruppe B1 mit der Genkombination $bla_{TEM-1}/SHV-12$ konnten

während des Schlachtprozesses lediglich im Filet bzw. auf der Haut und nicht im Caecum nachgewiesen werden, wurden aber auch aus den Transportkisten nach Reinigung und Desinfektion isoliert. Somit könnte auch dieser Stamm über die Herde in den Schlachthof eingetragen worden sein. Zudem verdeutlicht es, dass die Transportkisten teilweise nicht ausreichend oder nicht wirksam gereinigt und desinfiziert wurden.

In Herde 6 war die am häufigsten nachgewiesene Spezies-Resistenzgen-Kombination *E. coli* der Phylogruppe F mit *bla*_{CTX-M-1}. Diese konnte im Caecum, auf der Haut sowie in der Umgebung nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass die Tiere der Herde diesen Stamm schon vor dem Schlachthof aufwiesen. Zusätzlich konnte diese Kombination in den Nullproben des Rupfers sowie den Haken im schwarzen Bereich nachgewiesen werden. Somit war diese Spezies-Resistenzgen-Kombination schon vor der Herde im Schlachthof und hätte somit eine ESBL/AmpC-negative Herde kontaminieren können. *E. fergusonii* mit *bla*_{CMY-2} sowie *E. coli* der Phylogruppe F mit *bla*_{SHV-12} konnten ebenfalls im Caecum, auf der Haut sowie in der Umgebung detektiert werden und weisen auf einen Eintrag und die Verbreitung im Schlachthof durch die Herde hin. *K. pneumoniae*-Isolate mit der Genkombination *bla*_{SHV-1/SHV-2} konnten in den Nullproben des Rupfers sowie auf der Haut, jedoch nicht im Caecum detektiert werden. Das ist hinweisend für eine Kontamination der Haut durch das Brühwasser bzw. den Rupfer mit einem Stamm, der ursprünglich nicht in der Herde etabliert war. Zudem wurde in dieser Herde ein *C. freundii*-Isolat mit einer neuen CMY-Variante (GenBank-accession number: KY646092) aus einer Nullprobe (Haken der Karkassen im weißen Bereich) nachgewiesen. Dieser Stamm wurde jedoch aus keiner anderen Probe isoliert. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass er an den Haken der Karkassen, aber nicht im Brühwasser oder am Rupfer nachgewiesen wurde. Somit konnte potentiell nicht die ganze Herde mit diesem Stamm in Kontakt kommen, sondern nur einzelne Hähnchen an den entsprechenden Haken.

Bei Herde 7 konnte aus den Caecumproben der Hähnchen lediglich ein *E. coli* der Phylogruppe B1 mit dem Gen *bla*_{TEM-1} (BSBL-Gen) isoliert werden. Diese Spezies-Resistenzgen-Kombination konnte zudem auch aus den Hautproben isoliert werden. *E. coli* der Phylogruppe A/C mit der Genkombination *bla*_{TEM-1/CTX-M-15} wurden mit 70 % (23/33) am häufigsten isoliert. Zudem konnte diese Kombination in Isolaten der Nullproben des Brühwassers sowie des Rupfers nachgewiesen werden. Isolate mit dieser Kombination waren also schon vor der Herde am Schlachthof. Während der Schlachtung wurden Isolate mit dieser Kombination auch in den Haut-, Filet- sowie erneut in den Rupferproben, jedoch nicht in den Caecumproben nachgewiesen. Auch *P. mirabilis* mit dem Gen *bla*_{CMY-2} konnte in den Nullproben des Brühwassers sowie des Rupfers und später auf der Haut nachgewiesen werden. Dies deutet auf eine Kontamination der Masthähnchen während des

Schlachtprozesses der Herde mit Stämmen aus einer vorherigen Herde hin. *C. freundii* mit dem Gen *bla*_{CMY-113} sowie *E. coli* der Phylogruppe F mit dem Gen *bla*_{CTX-M-1} konnten jeweils nur aus den Filetproben isoliert werden. Eine mögliche Ursache dafür könnte sein, dass die Filets nicht maschinell, sondern von dem Personal nach der Schlachtung filetiert und somit über Messer oder andere Gegenstände mit weiteren, nicht herdenspezifischen ESBL/AmpC-Typen, kontaminiert wurden. Weiterhin könnten weniger prävalente Genotypen in den 25 untersuchten Caecumproben der Herde nicht erfasst worden sein.

Insgesamt wird deutlich, dass meist herdenspezifisch bestimmte ESBL/AmpC-Typen besonders prävalent waren und diese in den Schlachthof eingebracht wurden. Die teilweise mit diesen Stämmen kontaminierte Umgebung des Schlachthofes könnte durch ungenügende Reinigung und Desinfektion eine potentielle Quelle für Kontaminationen der folgenden Herden darstellen.

Um zu belegen, dass es sich in den beschriebenen Fällen tatsächlich um identische Isolate handelt, müsste eine Ganzgenomsequenzierung vorgenommen werden.

7. Zusammenfassung

Prävalenz und Quantifizierung ESBL/AmpC-produzierender *Enterobacteriaceae* bei Masthähnchen während des Schlachtprozesses

Ziel dieser Arbeit war es, die Prävalenz sowie die quantitative Belastung verschiedener Probenmatrizes (Caecum, Haut, Filet) von sieben Masthähnchenherden während der Schlachtung mit ESBL/AmpC-produzierenden *Enterobacteriaceae* zu erfassen. Zudem wurde die Umgebung während der Schlachtung der jeweiligen Herde beprobt, um Hinweise auf mögliche Quellen für Kontaminationen bzw. Kreuzkontaminationen mit ESBL/AmpC-produzierenden *Enterobacteriaceae* sowie deren mögliche Übertragungswege zu erhalten.

Während der Schlachtung aller sieben Herden konnten ESBL/AmpC-produzierende *Enterobacteriaceae* nachgewiesen werden. Durchschnittlich wiesen 47 % (83/175) der Caecum-, 55 % (96/175) der Haut-, 28 % (49/175) der Filet- und 28 % (25/89) der Umgebungsproben ESBL/AmpC-produzierende *Enterobacteriaceae* auf. Die Prävalenz ESBL/AmpC-produzierender *Enterobacteriaceae* variierte stark zwischen den einzelnen Herden und den verschiedenen Probenmatrizes. In der Umgebung konnten allerdings während der Schlachtung aller Herden ESBL/AmpC-produzierende *Enterobacteriaceae* nachgewiesen werden.

Bei der quantitativen Untersuchung lagen bei ca. der Hälfte der Caecum- und Haut- sowie bei 85 % der Filetproben die Keimzahlen der Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* unter der quantitativen Nachweisgrenze. Der Median der Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* lag, je nach Probenmatrix, 1-4 Logstufen unter dem Median der Gesamt-*Enterobacteriaceae*. Jedoch ergab sich keine Korrelation zwischen der Keimzahl der Gesamt- und der Keimzahl der Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* der Caecumproben. Die Keimzahl der Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* lag im Median bei $2,5 \times 10^3$ KbE/g (Caecum), $1,5 \times 10^3$ KbE/g (Haut) und $1,5 \times 10^2$ KbE/g (Filet).

Mittels qPCR konnte bei 82 % (629/767) der Cefotaxim-resistenten *Enterobacteriaceae* mindestens eines der untersuchten *bla*_{ESBL/AmpC}-Gene *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{AmpC-CIT} nachgewiesen werden. Erneut zeigten sich Unterschiede zwischen den Herden. So wurde in den Herden 1, 3 und 4 *bla*_{AmpC-CIT} mit 61 % bis 92 % am häufigsten nachgewiesen, während in den Herden 5 und 6 *bla*_{SHV} mit 84 % bzw. 42 % dominierte. In Herde 7 konnte für mehr als die Hälfte der Cefotaxim-resistenten Isolate keines der untersuchten *bla*-Gene detektiert werden. In dieser Herde wurden Gene vom *bla*_{CTX-M}-Typ mit 32 % am häufigsten nachgewiesen.

Bei 322 Isolaten wurden die *bla*-Gene sequenziert. *bla*_{CMY-2} war mit 48 %, gefolgt von *bla*_{SHV-12} mit 23 %, die häufigste Gen-Variante. Es konnten teilweise Isolate derselben Spezies, derselben Phylogruppe sowie mit demselben Resistenzgen in allen Probenmatrizes einer Herde sowie in der Umgebung detektiert werden. Dies deutet auf einen horizontalen Eintrag der Stämme über die Masthähnchen in den Schlachthof sowie umgekehrt auf eine Kontamination der Masthähnchen während des Schlachtprozesses durch Stämme aus der Umgebung.

8. Summary

Prevalence and quantification of ESBL/AmpC-producing *Enterobacteriaceae* in broiler chicken during slaughter

The aim of this study was to determine the prevalence as well as quantitative load of ESBL/AmpC-producing *Enterobacteriaceae* in different sample matrices (caecum, skin, filet) of seven broiler chicken flocks during slaughter. In addition, environmental samples were taken during slaughter of the respective flocks to gain insights into possible sources of cross contamination with ESBL/AmpC-producing *Enterobacteriaceae* as well as their possible transmission routes.

ESBL/AmpC-producing *Enterobacteriaceae* were detected during slaughter of all seven investigated flocks. On average, 47 % (83/175) of caecum, 55 % (96/175) of skin, 28 % (49/175) of filet and 28 % (25/89) of environmental samples harboured ESBL/AmpC-producing *Enterobacteriaceae*. Prevalence varied widely between the flocks as well as between the different sample matrices. However environmental samples of all flocks harboured ESBL/AmpC-producing *Enterobacteriaceae*.

In about half of the caecum and skin samples as well as 85 % (17/20) of the filet samples, the number of cefotaxime resistant *Enterobacteriaceae* was below quantification limit. The median of cefotaxime resistant *Enterobacteriaceae* was, depending on sample matrix, 1-4 log units below the median of total *Enterobacteriaceae*. There was no correlation between the number of total and the number of cefotaxime resistant *Enterobacteriaceae* in all caecum samples. The median of cefotaxime resistant *Enterobacteriaceae* was 2.5×10^3 cfu/g in caecum, 1.5×10^3 cfu/g in skin and 1.5×10^2 cfu/g in filet samples.

Using real-time PCR, in 82 % (629/767) of the cefotaxime resistant *Enterobacteriaceae* at least one of the investigated beta-lactamase genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{AmpC-CIT} was detected. Prevalence again varied widely between the flocks. In flock 1, 3 and 4 *bla*_{AmpC-CIT} was, with up to 92 %, the predominant gene, while in flock 5 (84 %) and 6 (42 %) *bla*_{SHV} was most prevalent. For more than half of the cefotaxime resistant isolates of flock 7 none of the investigated genes could be detected. In this flock, isolates encoding *bla*_{CTX-M} genes (32 %) were predominant.

The respective resistance genes of 322 isolates were further sequenced. The predominant *bla* gene was *bla*_{CMY-2} (48 %), followed by *bla*_{SHV-12} (23 %). A contamination from the broiler chicken to the slaughterhouse environment and vice versa seems probable as partially isolates

belonging to the same species and phylogroup and encoding the same resistance genes could be detected in all matrices during slaughter of the respective flock as well as in the environment.

9. Literaturverzeichnis

- Abdul Rahman, E.M., El-Sherif, R.H., 2011. **High rates of intestinal colonization with extended-spectrum lactamase-producing Enterobacteriaceae among healthy individuals.** J Investig Med 59, 1284-1286.
- Adler, A., Baraniak, A., Izdebski, R., Fiett, J., Salvia, A., Samsó, J.V., Lawrence, C., Solomon, J., Paul, M., Lerman, Y., Schwartzberg, Y., Mordechai, E., Rossini, A., Fierro, J., Lammens, C., Malhotra-Kumar, S., Goossens, H., Hryniewicz, W., Brun-Buisson, C., Gniadkowski, M., Carmeli, Y., 2014. **A multinational study of colonization with extended spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in healthcare personnel and family members of carrier patients hospitalized in rehabilitation centres.** Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 20, 0516-523.
- Agero, Y., Aarestrup, F.M., Pedersen, K., Seyfarth, A.M., 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.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy 67, 582-588.
- Ambler, R.P., 1980. **The Structure of Beta-Lactamases.** Philos T Roy Soc B 289, 321-331.
- Ambler, R.P., Coulson, A.F., Frere, J.M., Ghuyssen, J.M., Joris, B., Forsman, M., Levesque, R.C., Tiraby, G., Waley, S.G., 1991. **A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases.** Biochem J 276 (Pt 1), 269-270.
- Anastasi, E.M., Matthews, B., Gundogdu, A., Vollmerhausen, T.L., Ramos, N.L., Stratton, H., Ahmed, W., Katouli, M., 2010. **Prevalence and Persistence of Escherichia coli Strains with Uropathogenic Virulence Characteristics in Sewage Treatment Plants.** Applied and environmental microbiology 76, 5882-5886.
- Baede, V.O., Wagenaar, J.A., Broens, E.M., Duim, B., Dohmen, W., Nijssen, R., Timmerman, A.J., Hordijk, J., 2015. **Longitudinal study of extended-spectrum-beta-lactamase- and AmpC-producing Enterobacteriaceae in household dogs.** Antimicrob Agents Chemother 59, 3117-3124.
- Bagheri, M., Ghanbarpour, R., Alizade, H., 2014. **Shiga toxin and beta-lactamases genes in Escherichia coli phylotypes isolated from carcasses of broiler chickens slaughtered in Iran.** International journal of food microbiology 177, 16-20.
- Bauernfeind, A., Chong, Y., Schweighart, S., 1989. **Extended broad spectrum beta-lactamase in Klebsiella pneumoniae including resistance to cephamycins.** Infection 17, 316-321.
- Bauernfeind, A., Grimm, H., Schweighart, S., 1990. **A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of Escherichia coli.** Infection 18, 294-298.
- Belanger, L., Garenaux, A., Harel, J., Boulianne, M., Nadeau, E., Dozois, C.M., 2011. **Escherichia coli from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic E-coli.** Fems Immunol Med Mic 62, 1-10.
- Belmar Campos, C., Fenner, I., Wiese, N., Lensing, C., Christner, M., Rohde, H., Aepfelbacher, M., Fenner, T., Hentschke, M., 2014. **Prevalence and genotypes of extended spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae isolated from human stool**

and chicken meat in Hamburg, Germany. International journal of medical microbiology : IJMM 304, 678-684.

Ben Said, L., Jouini, A., Alonso, C.A., Klibi, N., Dziri, R., Boudabous, A., Ben Slama, K., Torres, C., 2016. **Characteristics of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)- and pAmpC beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae of water samples in Tunisia.** Sci Total Environ 550, 1103-1109.

Ben Said, L., Jouini, A., Klibi, N., Dziri, R., Alonso, C.A., Boudabous, A., Ben Slama, K., Torres, C., 2015. **Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in vegetables, soil and water of the farm environment in Tunisia.** International journal of food microbiology 203, 86-92.

Ben Sallem, R., Ben Slama, K., Estepa, V., Jouini, A., Gharsa, H., Klibi, N., Saenz, Y., Ruiz-Larrea, F., Boudabous, A., Torres, C., 2012. **Prevalence and characterisation of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Escherichia coli isolates in healthy volunteers in Tunisia.** Eur J Clin Microbiol 31, 1511-1516.

Bielaszewska, M., Mellmann, A., Zhang, W.L., Kock, R., Fruth, A., Bauwens, A., Peters, G., Karch, H., 2011. **Characterisation of the Escherichia coli strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study.** Lancet Infectious Diseases 11, 671-676.

Blaak, H., van Hoek, A.H., Hamidjaja, R.A., van der Plaats, R.Q., Kerkhof-de Heer, L., de Roda Husman, A.M., Schets, F.M., 2015. **Distribution, Numbers, and Diversity of ESBL-Producing E. coli in the Poultry Farm Environment.** PLoS One 10, e0135402.

Blaak, H., van Hoek, A.H., Veenman, C., Docters van Leeuwen, A.E., Lynch, G., van Overbeek, W.M., de Roda Husman, A.M., 2014. **Extended spectrum ss-lactamase- and constitutively AmpC-producing Enterobacteriaceae on fresh produce and in the agricultural environment.** International journal of food microbiology 168-169, 8-16.

Blanc, V., Mesa, R., Saco, M., Lavilla, S., Prats, G., Miro, E., Navarro, F., Cortes, P., Llagostera, M., 2006. **ESBL- and plasmidic class C beta-lactamase-producing E. coli strains isolated from poultry, pig and rabbit farms.** Veterinary microbiology 118, 299-304.

Bonnet, R., 2004. **Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes.** Antimicrob Agents Chemother 48, 1-14.

Bonnet, R., Sampaio, J.L., Labia, R., De Champs, C., Sirot, D., Chanal, C., Sirot, J., 2000. **A novel CTX-M beta-lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant Enterobacteriaceae isolated in Brazil.** Antimicrob Agents Chemother 44, 1936-1942.

Borjesson, S., Egervarn, M., Lindblad, M., Englund, S., 2013. **Frequent Occurrence of Extended-Spectrum Beta-Lactamase- and Transferable AmpC Beta-Lactamase-Producing Escherichia coli on Domestic Chicken Meat in Sweden.** Applied and environmental microbiology 79, 2463-2466.

Borjesson, S., Ny, S., Egervarn, M., Bergstrom, J., Rosengren, A., Englund, S., Lofmark, S., Byfors, S., 2016. **Limited Dissemination of Extended-Spectrum beta-Lactamase- and Plasmid-Encoded AmpC-Producing Escherichia coli from Food and Farm Animals, Sweden.** Emerg Infect Dis 22, 634-640.

Bradford, P.A., 2001. **Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat.** Clinical Microbiology Reviews 14, 933-951.

- Bradford, P.A., Petersen, P.J., Fingerman, I.M., White, D.G., 1999. **Characterization of expanded-spectrum cephalosporin resistance in E-coli isolates associated with bovine calf diarrhoeal disease.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy 44, 607-610.
- Branger, C., Zamfir, O., Geoffroy, S., Laurans, G., Arlet, G., Thien, H.V., Gouriou, S., Picard, B., Denamur, E., 2005. **Genetic Background of Escherichia coli and Extended-spectrum β -Lactamase Type.** Emerg Infect Dis 11, 54-61.
- Brinas, L., Moreno, M.A., Teshager, T., Zarazaga, M., Saenz, Y., Porrero, C., Dominguez, L., Torres, C., 2003a. **Beta-lactamase characterization in Escherichia coli isolates with diminished susceptibility or resistance to extended-spectrum cephalosporins recovered from sick animals in Spain.** Microb Drug Resist 9, 201-209.
- Brinas, L., Moreno, M.A., Zarazaga, M., Porrero, C., Saenz, Y., Garcia, M., Dominguez, L., Torres, C., 2003b. **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.
- Bush, K., 2001. **New beta-lactamases in gram-negative bacteria: Diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy.** Clinical Infectious Diseases 32, 1085-1089.
- Bush, K., Jacoby, G.A., 2010. **Updated functional classification of beta-lactamases.** Antimicrob Agents Chemother 54, 969-976.
- Bush, K., Jacoby, G.A., Medeiros, A.A., 1995. **A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure.** Antimicrob Agents Chemother 39, 1211-1233.
- BVL, 2015. **Berichte zur Lebensmittelsicherheit 2013 Zoonosen-Monitoring.**
- BVL, 2016. **Berichte zur Lebensmittelsicherheit 2014 Zoonosen-Monitoring.**
- Canton, R., Coque, T.M., 2006. **The CTX-M β -lactamase pandemic.** Current Opinion in Microbiology, 466 - 475.
- Canton, R., Novais, A., Valverde, A., Machado, E., Peixe, L., Baquero, F., Coque, T.M., 2008. **Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe.** Clin Microbiol Infec 14, 144-153.
- Carattoli, A., Lovari, S., Franco, A., Cordaro, G., Di Matteo, P., Battisti, A., 2005. **Extended-spectrum beta-lactamases in Escherichia coli isolated from dogs and cats in Rome, Italy, from 2001 to 2003.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy 49, 833-835.
- Carvalho, A.C., Barbosa, A.V., Arais, L.R., Ribeiro, P.F., Carneiro, V.C., Cerqueira, A.M., 2016. **Resistance patterns, ESBL genes, and genetic relatedness of Escherichia coli from dogs and owners.** Braz J Microbiol 47, 150-158.
- Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E., 2000. **Rapid and simple determination of the Escherichia coli phylogenetic group.** Applied and environmental microbiology 66, 4555-4558.
- Clermont, O., Christenson, J.K., Denamur, E., Gordon, D.M., 2013. **The Clermont Escherichia coli phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups.** Environ Microbiol Rep 5, 58-65.

CLSI, C.a.L.S.I., 2012. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard - 11th edition. CLSI document M02-A11.**

CLSI, C.a.L.S.I., 2014. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Twenty-Fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24.**

Cohen Stuart, J., van den Munckhof, T., Voets, G., Scharringa, J., Fluit, A., Hall, M.L., 2012. **Comparison of ESBL contamination in organic and conventional retail chicken meat.** International journal of food microbiology 154, 212-214.

Cornejova, T., Venglovsky, J., Gregova, G., Kmetova, M., Kmet, V., 2015. **Extended spectrum beta-lactamases in Escherichia coli from municipal wastewater.** Ann Agr Env Med 22, 447-450.

Costa, D., Poeta, P., Brinas, L., Saenz, Y., Rodrigues, J., Torres, C., 2004. **Detection of CTX-M-1 and TEM-52 beta-lactamases in Escherichia coli strains from healthy pets in Portugal.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy 54, 960-961.

Costa, D., Poeta, P., Saenz, Y., Coelho, A.C., Matos, M., Vinue, L., Rodrigues, J., Torres, C., 2008. **Prevalence of antimicrobial resistance and resistance genes in faecal Escherichia coli isolates recovered from healthy pets.** Veterinary microbiology 127, 97-105.

Costa, D., Vinue, L., Poeta, P., Coelho, A.C., Matos, M., Saenz, Y., Somalo, S., Zarazaga, M., Rodrigues, J., Torres, C., 2009. **Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli isolates in faecal samples of broilers.** Veterinary microbiology 138, 339-344.

Dahms, C., Hubner, N.O., Kossow, A., Mellmann, A., Dittmann, K., Kramer, A., 2015. **Occurrence of ESBL-Producing Escherichia coli in Livestock and Farm Workers in Mecklenburg-Western Pomerania, Germany.** PLoS One 10, e0143326.

Daniels, N.A., 2006. **Enterotoxigenic Escherichia coli: Traveler's diarrhea comes home.** Clinical Infectious Diseases 42, 335-336.

Datta, N., Kontomichalou, P., 1965. **Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae.** Nature 208, 239-241.

de Been, M., Lanza, V.F., de Toro, M., Scharringa, J., Dohmen, W., Du, Y., Hu, J., Lei, Y., Li, N., Tooming-Klunderud, A., Heederik, D.J., Fluit, A.C., Bonten, M.J., Willems, R.J., de la Cruz, F., van Schaik, W., 2014. **Dissemination of cephalosporin resistance genes between Escherichia coli strains from farm animals and humans by specific plasmid lineages.** PLoS genetics 10, e1004776.

Denkel, L.A., Gastmeier, P., Leistner, R., 2016. **The association of ESBL-producing Enterobacteriaceae (ESBL-E) carriage in humans with pigs.** Epidemiol Infect 144, 691-692.

Depoorter, P., Persoons, D., Uyttendaele, M., Butaye, P., De Zutter, L., Dierick, K., Herman, L., Imberechts, H., Van Huffel, X., Dewulf, J., 2012. **Assessment of human exposure to 3rd generation cephalosporin resistant E. coli (CREC) through consumption of broiler meat in Belgium.** International journal of food microbiology 159, 30-38.

Dias, D., Torres, R.T., Kronvall, G., Fonseca, C., Mendo, S., Caetano, T., 2015. **Assessment of antibiotic resistance of Escherichia coli isolates and screening of Salmonella spp. in wild ungulates from Portugal.** Res Microbiol 166, 584-593.

- Dierikx, C., van der Goot, J., Fabri, T., van Essen-Zandbergen, A., Smith, H., Mevius, D., 2013a. **Extended-spectrum-beta-lactamase- and AmpC-beta-lactamase-producing Escherichia coli in Dutch broilers and broiler farmers**. The Journal of antimicrobial chemotherapy 68, 60-67.
- Dierikx, C.M., van der Goot, J.A., Smith, H.E., Kant, A., Mevius, D.J., 2013b. **Presence of ESBL/AmpC-producing Escherichia coli in the broiler production pyramid: a descriptive study**. PLoS One 8, e79005.
- Dohmen, W., Bonten, M.J.M., Bos, M.E.H., van Marm, S., Scharringa, J., Wagenaar, J.A., Heederik, D.J.J., 2015. **Carriage of extended-spectrum beta-lactamases in pig farmers is associated with occurrence in pigs**. Clin Microbiol Infect 21, 917-923.
- Dolejska, M., Jurcickova, Z., Literak, I., Pokludova, L., Bures, J., Hera, A., Kohoutova, L., Smola, J., Cizek, A., 2011. **IncN plasmids carrying bla CTX-M-1 in Escherichia coli isolates on a dairy farm**. Veterinary microbiology 149, 513-516.
- Drieux, L., Haenn, S., Moulin, L., Jarlier, V., 2016. **Quantitative evaluation of extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli strains in the wastewater of a French teaching hospital and relation to patient strain**. Antimicrob Resist Infect Control 5, 9.
- ECDC 2015. **European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)**. Stockholm: ECDC; 2015 (Stockholm).
- EFSA, 2016. **The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2014** European Food Safety Authority European Centre for Disease Prevention and Control.
- Egea, P., Lopez-Cerero, L., Torres, E., Gomez-Sanchez, M.D., Serrano, L., Sanchez-Ortiz, M.D.N., Rodriguez-Bano, J., Pascual, A., 2012. **Increased raw poultry meat colonization by extended spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli in the south of Spain**. International journal of food microbiology 159, 69-73.
- Endimiani, A., Rossano, A., Kunz, D., Overesch, G., Perreten, V., 2012. **First countrywide survey of third-generation cephalosporin-resistant Escherichia coli from broilers, swine, and cattle in Switzerland**. Diagn Microbiol Infect Dis 73, 31-38.
- Enne, V.I., Cassar, C., Sprigings, K., Woodward, M.J., Bennett, P.M., 2008. **A high prevalence of antimicrobial resistant Escherichia coli isolated from pigs and a low prevalence of antimicrobial resistant E. coli from cattle and sheep in Great Britain at slaughter**. FEMS Microbiol Lett 278, 193-199.
- Escherich, T., 1988. **The Intestinal Bacteria of the Neonate and Breast-Fed Infant**. Rev Infect Dis 10, 1220-1225.
- Escudero, E., Vinue, L., Teshager, T., Torres, C., Moreno, M.A., 2010. **Resistance mechanisms and farm-level distribution of fecal Escherichia coli isolates resistant to extended-spectrum cephalosporins in pigs in Spain**. Res Vet Sci 88, 83-87.

- Evers, E.G., Pielaat, A., Smid, J.H., van Duijkeren, E., Vennemann, F.B., Wijnands, L.M., Chardon, J.E., 2017. **Comparative Exposure Assessment of ESBL-Producing Escherichia coli through Meat Consumption**. PLoS One 12, e0169589.
- Ewers, C., Bethe, A., Semmler, T., Guenther, S., Wieler, L.H., 2012. **Extended-spectrum beta-lactamase-producing and AmpC-producing Escherichia coli from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective**. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 18, 646-655.
- Ewers, C., Bethe, A., Stamm, I., Grobbel, M., Kopp, P.A., Guerra, B., Stubbe, M., Doi, Y., Zong, Z., Kola, A., Schaufler, K., Semmler, T., Fruth, A., Wieler, L.H., Guenther, S., 2014. **CTX-M-15-D-ST648 Escherichia coli from companion animals and horses: another pandemic clone combining multiresistance and extraintestinal virulence?** The Journal of antimicrobial chemotherapy 69, 1224-1230.
- Ewers, C., Grobbel, M., Stamm, I., Kopp, P.A., Diehl, I., Semmler, T., Fruth, A., Beutlich, J., Guerra, B., Wieler, L.H., Guenther, S., 2010. **Emergence of human pandemic O25:H4-ST131 CTX-M-15 extended-spectrum-beta-lactamase-producing Escherichia coli among companion animals**. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 65, 651-660.
- Ewers, C., Janssen, T., Wieler, L.H., 2003. **[Avian pathogenic Escherichia coli (APEC)]**. Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift 116, 381-395.
- Forgetta, V., Rempel, H., Malouin, F., Vaillancourt, R., Jr., Topp, E., Dewar, K., Diarra, M.S., 2012. **Pathogenic and multidrug-resistant Escherichia fergusonii from broiler chicken**. Poultry Science 91, 512-525.
- Franz, E., Schijven, J., Husman, A.M.D., Blaak, H., 2014. **Meta-Regression Analysis of Commensal and Pathogenic Escherichia coli Survival in Soil and Water**. Environ Sci Technol 48, 6763-6771.
- 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**. Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift 126, 175-180.
- Gandolfi-Decristophoris, P., Petrini, O., Ruggeri-Bernardi, N., Schelling, E., 2013. **Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in healthy companion animals living in nursing homes and in the community**. Am J Infect Control 41, 831-835.
- García-Cobos, S., Köck, R., Mellmann, A., Frenzel, J., Friedrich, A.W., Rossen, J.W.A., 2015. **Molecular Typing of Enterobacteriaceae from Pig Holdings in North-Western Germany Reveals Extended- Spectrum and AmpC β -Lactamases Producing but no Carbapenem Resistant Ones**. PLoS One 10, e0134533.
- Geser, N., Stephan, R., Hachler, H., 2012a. **Occurrence and characteristics of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae in food producing animals, minced meat and raw milk**. BMC veterinary research 8, 21.
- Geser, N., Stephan, R., Korczak, B.M., Beutin, L., Hachler, H., 2012b. **Molecular Identification of Extended-Spectrum-beta-Lactamase Genes from Enterobacteriaceae Isolated from Healthy Human Carriers in Switzerland**. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 56, 1609-1612.

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.

Ghodousi, A., Bonura, C., Di Noto, A.M., Mammina, C., 2015. **Extended-Spectrum ss-Lactamase, AmpC-Producing, and Fluoroquinolone-Resistant Escherichia coli in Retail Broiler Chicken Meat, Italy.** Foodborne Pathog Dis 12, 619-625.

Guenther, S., Aschenbrenner, K., Stamm, I., Bethe, A., Semmler, T., Stubbe, A., Stubbe, M., Batsajkhan, N., Glupczynski, Y., Wieler, L.H., 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.

Guenther, S., Ewers, C., Wieler, L.H., 2011. **Extended-Spectrum Beta-Lactamases Producing E. coli in Wildlife, yet Another Form of Environmental Pollution?** Front Microbiol 2, 246.

Hammerum, A.M., Larsen, J., Andersen, V.D., Lester, C.H., Skovgaard Skytte, T.S., Hansen, F., Olsen, S.S., Mordhorst, H., Skov, R.L., Aarestrup, F.M., Agerso, Y., 2014. **Characterization of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Escherichia coli obtained from Danish pigs, pig farmers and their families from farms with high or no consumption of third- or fourth-generation cephalosporins.** The Journal of antimicrobial chemotherapy 69, 2650-2657.

Hammerum, A.M., Lester, C.H., Jakobsen, L., Porsbo, L.J., 2011. **Faecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing and AmpC beta-lactamase-producing bacteria among Danish army recruits.** Clin Microbiol Infec 17, 566-568.

Hansen, K.H., Damborg, P., Andreasen, M., Nielsen, S.S., Guardabassi, L., 2013. **Carriage and Fecal Counts of Cefotaxime M-Producing Escherichia coli in Pigs: a Longitudinal Study.** Applied and environmental microbiology 79, 794-798.

Harada, K., Morimoto, E., Kataoka, Y., Takahashi, T., 2011. **Clonal spread of antimicrobial-resistant Escherichia coli isolates among pups in two kennels.** Acta Vet Scand 53.

Hariharan, H., López, A., Conboy, G., Coles, M., Muirhead, T., 2007. **Isolation of Escherichia fergusonii from the feces and internal organs of a goat with diarrhea.** The Canadian Veterinary Journal 48, 630-631.

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.

Heinemeyer, E.A., Luden, K., Monazahian, M., 2013. **On the Risk of Spread of E. coli/EHEC O104:H4 stx 2 Positive Bacteria via Sewerage Treatment Plants during the 2011 EHEC Outbreak in North Germany.** Gesundheitswesen 75, 512-514.

Hering, J., Fromke, C., von Munchhausen, C., Hartmann, M., Schneider, B., Friese, A., Rosler, U., Kreienbrock, L., Hille, K., 2016. **Cefotaxime-resistant Escherichia coli in broiler farms-A cross-sectional investigation in Germany.** Preventive veterinary medicine.

- Herraez, P., Rodriguez, A.F., Espinosa de los Monteros, A., Acosta, A.B., Jaber, J.R., Castellano, J., Castroa, A., 2005. **Fibrino-necrotic typhlitis caused by *Escherichia fergusonii* in ostriches (*Struthio camelus*)**. Avian Dis 49, 167-169.
- Hilty, M., Betsch, B.Y., Bogli-Stuber, K., Heiniger, N., Stadler, M., Kuffer, M., Kronenberg, A., Rohrer, C., Aebi, S., Endimiani, A., Droz, S., Muhlemann, K., 2012. **Transmission Dynamics of Extended-Spectrum beta-lactamase-Producing Enterobacteriaceae in the Tertiary Care Hospital and the Household Setting**. Clinical Infectious Diseases 55, 967-975.
- 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**. The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science 74, 1635-1637.
- Hopkins, J.M., Towner, K.J., 1990. **Enhanced resistance to cefotaxime and imipenem associated with outer membrane protein alterations in *Enterobacter aerogenes***. The Journal of antimicrobial chemotherapy 25, 49-55.
- Hordijk, J., Schoormans, A., Kwakernaak, M., Duim, B., Broens, E., Dierikx, C., Mevius, D., Wagenaar, J.A., 2013a. **High prevalence of fecal carriage of extended spectrum beta-lactamase/AmpC-producing Enterobacteriaceae in cats and dogs**. Front Microbiol 4, 242.
- Hordijk, J., Wagenaar, J.A., Kant, A., van Essen-Zandbergen, A., Dierikx, C., Veldman, K., Wit, B., Mevius, D., 2013b. **Cross-sectional study on prevalence and molecular characteristics of plasmid mediated ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* isolated from veal calves at slaughter**. PLoS One 8, e65681.
- Horton, R.A., Duncan, D., Randall, L.P., Chappell, S., Brunton, L.A., Warner, R., Coldham, N.G., Teale, C.J., 2016. **Longitudinal study of CTX-M ESBL-producing *E. coli* strains on a UK dairy farm**. Res Vet Sci 109, 107-113.
- Horton, R.A., Randall, L.P., Snary, E.L., Cockrem, H., Lotz, S., Wearing, H., Duncan, D., Rabie, A., McLaren, I., Watson, E., La Ragione, R.M., Coldham, N.G., 2011. **Fecal Carriage and Shedding Density of CTX-M Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Cattle, Chickens, and Pigs: Implications for Environmental Contamination and Food Production**. Applied and environmental microbiology 77, 3715-3719.
- Hu, Y.Y., Cai, J.C., Zhou, H.W., Chi, D., Zhang, X.F., Chen, W.L., Zhang, R., Chen, G.X., 2013. **Molecular Typing of CTX-M-Producing *Escherichia coli* Isolates from Environmental Water, Swine Feces, Specimens from Healthy Humans, and Human Patients**. Applied and environmental microbiology 79, 5988-5996.
- Huber, H., Zweifel, C., Wittenbrink, M.M., Stephan, R., 2013. **ESBL-producing uropathogenic *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Switzerland**. Veterinary microbiology 162, 992-996.
- Hudault, S., Guignot, J., Servin, A.L., 2001. ***Escherichia coli* strains colonising the gastrointestinal tract protect germfree mice against *Salmonella typhimurium* infection**. Gut 49, 47-55.
- Huijbers, P.M., Graat, E.A., Haenen, A.P., van Santen, M.G., van Essen-Zandbergen, A., Mevius, D.J., van Duijkeren, E., van Hoek, A.H., 2014. **Extended-spectrum and AmpC beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in broilers and people living and/or**

working on broiler farms: prevalence, risk factors and molecular characteristics. The Journal of antimicrobial chemotherapy 69, 2669-2675.

Huijbers, P.M., Graat, E.A., van Hoek, A.H., Veenman, C., de Jong, M.C., van Duijkeren, E., 2016. **Transmission dynamics of extended-spectrum beta-lactamase and AmpC beta-lactamase-producing Escherichia coli in a broiler flock without antibiotic use.** Preventive veterinary medicine 131, 12-19.

Huijbers, P.M., van Hoek, A.H., Graat, E.A., Haenen, A.P., Florijn, A., Hengeveld, P.D., van Duijkeren, E., 2015. **Methicillin-resistant Staphylococcus aureus and extended-spectrum and AmpC beta-lactamase-producing Escherichia coli in broilers and in people living and/or working on organic broiler farms.** Veterinary microbiology 176, 120-125.

Humeniuk, C., Arlet, G., Gautier, V., Grimont, P., Labia, R., Philippon, A., 2002. **beta-lactamases of Kluyvera ascorbata, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy 46, 3045-3049.

Husickova, V., Cekanova, L., Chroma, M., Htoutou-Sedlakova, M., Hricova, K., Kolar, M., 2012. **Carriage of ESBL- and AmpC-positive Enterobacteriaceae in the gastrointestinal tract of community subjects and hospitalized patients in the Czech Republic.** Biomed Pap 156, 348-353.

Jacoby, G.A., 2009. **AmpC beta-lactamases.** Clin Microbiol Rev 22, 161-182, Table of Contents.

Jacoby, G.A., Medeiros, A.A., 1991. **More extended-spectrum beta-lactamases.** Antimicrob Agents Chemother 35, 1697-1704.

Jiang, H.X., Tang, D., Liu, Y.H., Zhang, X.H., Zeng, Z.L., Xu, L., Hawkey, P.M., 2012. **Prevalence and characteristics of beta-lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance genes in Escherichia coli isolated from farmed fish in China.** The Journal of antimicrobial chemotherapy 67, 2350-2353.

Johnson, J., Gajewski, A., Lesse, A.J., Russ, T.A., 2003a. **Extraintestinal pathogenic Escherichia coli as a cause of invasive nonurinary infections.** Journal of Clinical Microbiology 41, 5798-5802.

Johnson, J.R., Kuskowski, M.A., Owens, K., Gajewski, A., Winokur, P.L., 2003b. **Phylogenetic origin and virulence genotype in relation to resistance to fluoroquinolones and/or extended-spectrum cephalosporins and cephamycins among Escherichia coli isolates from animals and humans.** Journal of Infectious Diseases 188, 759-768.

Jorgensen, C.J., Cavaco, L.M., Hasman, H., Emborg, H.D., Guardabassi, L., 2007. **Occurrence of CTX-M-1-producing Escherichia coli in pigs treated with ceftiofur.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy 59, 1040-1042.

Kameyama, M., Chuma, T., Yabata, J., Tominaga, K., Iwata, H., Okamoto, K., 2013. **Prevalence and epidemiological relationship of CMY-2 AmpC beta-lactamase and CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli isolates from broiler farms in Japan.** The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science 75, 1009-1015.

Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L.T., 2004. **Pathogenic Escherichia coli.** Nat Rev Microbiol 2, 123-140.

Kayser, F.H., Böttger, E.C., Deplazes, P., Haller, O., Roers, A., 2014. **Medizinische Mikrobiologie**, 13. Auflage Edition. Thieme.

Kittinger, C., Lipp, M., Folli, B., Kirschner, A., Baumert, R., Galler, H., Grisold, A.J., Luxner, J., Weissenbacher, M., Farnleitner, A.H., Zarfel, G., 2016. **Enterobacteriaceae Isolated from the River Danube: Antibiotic Resistances, with a Focus on the Presence of ESBL and Carbapenemases**. PLoS One 11.

Kluytmans, J.A., Overdeest, I.T., Willemsen, I., Kluytmans-van den Bergh, M.F., van der Zwaluw, K., Heck, M., Rijnsburger, M., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Savelkoul, P.H., Johnston, B.D., Gordon, D., Johnson, J.R., 2013. **Extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli from retail chicken meat and humans: comparison of strains, plasmids, resistance genes, and virulence factors**. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America 56, 478-487.

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.

Kola, A., Kohler, C., Pfeifer, Y., Schwab, F., Kuhn, K., Schulz, K., Balau, V., Breitbach, K., Bast, A., Witte, W., Gastmeier, P., Steinmetz, I., 2012. **High prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in organic and conventional retail chicken meat, Germany**. The Journal of antimicrobial chemotherapy 67, 2631-2634.

Korzeniewska, E., Harnisz, M., 2013a. **Beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in hospital effluents**. J Environ Manage 123, 1-7.

Korzeniewska, E., Harnisz, M., 2013b. **Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-positive Enterobacteriaceae in municipal sewage and their emission to the environment**. J Environ Manage 128, 904-911.

Lagace-Wiens, P.R., Baudry, P.J., Pang, P., Hammond, G., 2010. **First description of an extended-spectrum-beta-lactamase-producing multidrug-resistant Escherichia fergusonii strain in a patient with cystitis**. J Clin Microbiol 48, 2301-2302.

Laube, H., Friese, A., von Salviati, C., Guerra, B., Kasbohrer, A., Kreienbrock, L., Roesler, U., 2013. **Longitudinal monitoring of extended-spectrum-beta-lactamase/AmpC-producing Escherichia coli at German broiler chicken fattening farms**. Applied and environmental microbiology 79, 4815-4820.

Laube, H., Friese, A., von Salviati, C., Guerra, B., Rosler, U., 2014. **Transmission of ESBL/AmpC-producing Escherichia coli from broiler chicken farms to surrounding areas**. Veterinary microbiology 172, 519-527.

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.

Leistner, R., Schroder, C., Geffers, C., Breier, A.C., Gastmeier, P., Behnke, M., 2015. **Regional distribution of nosocomial infections due to ESBL-positive Enterobacteriaceae in Germany: data from the German National Reference Center for the Surveillance of Nosocomial Infections (KISS)**. Clin Microbiol Infec 21.

- Leverstein-van Hall, M.A., Dierikx, C.M., Stuart, J.C., Voets, G.M., van den Munckhof, M.P., van Essen-Zandbergen, A., Platteel, T., Fluit, A.C., van de Sande-Bruinsma, N., Scharinga, J., Bonten, M.J.M., Mevius, D.J., Grp, N.E.S., 2011. **Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains.** Clin Microbiol Infec 17, 873-880.
- Liebana, E., Batchelor, M., Hopkins, K.L., Clifton-Hadley, F.A., Teale, C.J., Foster, A., Barker, L., Threlfall, E.J., Davies, R.H., 2006. **Longitudinal farm study of extended-spectrum beta-lactamase-mediated resistance.** J Clin Microbiol 44, 1630-1634.
- Lietzau, S., Raum, E., von Baum, H., Marre, R., Brenner, H., 2006. **Clustering of antibiotic resistance of E-coli in couples: suggestion for a major role of conjugal transmission.** BMC Infectious Diseases 6.
- Lietzau, S., Raum, E., Von Baum, H., Marre, R., Brenner, H., 2007. **Household contacts were key factor for children's colonization with resistant Escherichia coli in community setting.** J Clin Epidemiol 60, 1149-1155.
- Lin, L.I., 1989. **A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility.** Biometrics 45, 255-268.
- Literak, I., Dolejska, M., Janoszowska, D., Hrusakova, J., Meissner, W., Rzycka, H., Bzoma, S., Cizek, A., 2010a. **Antibiotic-resistant Escherichia coli bacteria, including strains with genes encoding the extended-spectrum beta-lactamase and QnrS, in waterbirds on the Baltic Sea Coast of Poland.** Applied and environmental microbiology 76, 8126-8134.
- Literak, I., Dolejska, M., Radimersky, T., Klimes, J., Friedman, M., Aarestrup, F.M., Hasman, H., Cizek, A., 2010b. **Antimicrobial-resistant faecal Escherichia coli in wild mammals in central Europe: multiresistant Escherichia coli producing extended-spectrum beta-lactamases in wild boars.** Journal of applied microbiology 108, 1702-1711.
- Livermore, D.M., 1995. **beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance.** Clin Microbiol Rev 8, 557-584.
- Livermore, D.M., 2009. **Has the era of untreatable infections arrived?** Journal of Antimicrobial Chemotherapy 64, 29-36.
- Ljungquist, O., Ljungquist, D., Myrenas, M., Ryden, C., Finn, M., Bengtsson, B., 2016. **Evidence of household transfer of ESBL-/pAmpC-producing Enterobacteriaceae between humans and dogs - a pilot study.** Infect Ecol Epidemiol 6, 31514.
- Loucif, L., Gacemi-Kirane, D., Cherak, Z., Chamlal, N., Grainat, N., Rolain, J.M., 2016. **German cockroaches (Blattella germanica): reservoirs of CTX-M-15 ESBL and OXA-48 carbapenemase producing Enterobacteriaceae in Batna university hospital, Algeria: First report.** Antimicrob Agents Chemother.
- Lu, S.Y., Zhang, Y.L., Geng, S.N., Li, T.Y., Ye, Z.M., Zhang, D.S., Zou, F., Zhou, H.W., 2010. **High Diversity of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Bacteria in an Urban River Sediment Habitat.** Applied and environmental microbiology 76, 5972-5976.
- Luvsansharav, U.O., Hirai, I., Nakata, A., Imura, K., Yamauchi, K., Niki, M., Komalamisra, C., Kusolsuk, T., Yamamoto, Y., 2012. **Prevalence of and risk factors associated with faecal carriage of CTX-M beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in rural Thai communities.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy 67, 1769-1774.

- Maamar, E., Hammami, S., Alonso, C.A., Dakhli, N., Abbassi, M.S., Ferjani, S., Hamzaoui, Z., Saidani, M., Torres, C., Boutiba-Ben Boubaker, I., 2016. **High prevalence of extended-spectrum and plasmidic AmpC beta-lactamase-producing Escherichia coli from poultry in Tunisia.** International journal of food microbiology 231, 69-75.
- Machado, E., Coque, T.M., Canton, R., Sousa, J.C., Peixe, L., 2013. **Commensal Enterobacteriaceae as reservoirs of extended-spectrum beta-lactamases, integrons, and sul genes in Portugal.** Front Microbiol 4, 80.
- Madec, J.Y., Lazizzera, C., Chatre, P., Meunier, D., Martin, S., Lepage, G., Menard, M.F., Lebreton, P., Rambaud, T., 2008. **Prevalence of fecal carriage of acquired expanded-spectrum cephalosporin resistance in Enterobacteriaceae strains from cattle in France.** J Clin Microbiol 46, 1566-1567.
- Mahapatra, A., Mahapatra, S., Mahapatra, A., 2005. **Escherichia fergusonii: an emerging pathogen in South Orissa.** Indian J Med Microbiol 23, 204.
- Marshall, B.M., Levy, S.B., 2011. **Food animals and antimicrobials: impacts on human health.** Clin Microbiol Rev 24, 718-733.
- Mateus-Vargas, R.H., Atanassova, V., Reich, F., Klein, G., 2017. **Antimicrobial susceptibility and genetic characterization of Escherichia coli recovered from frozen game meat.** Food Microbiol 63, 164-169.
- 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.
- Mayrhofer, S., Paulsen, P., Smulders, F.J.M., Hilbert, F., 2006. **Antimicrobial resistance in commensal Escherichia coli isolated from muscle foods as related to the veterinary use of antimicrobial agents in food-producing animals in Austria.** Microbial Drug Resistance-Mechanisms Epidemiology and Disease 12, 278-283.
- Medeiros, A.A., 1997. **Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics.** Clinical Infectious Diseases 24, S19-S45.
- Meyer, E., Gastmeier, P., Kola, A., Schwab, F., 2012. **Pet animals and foreign travel are risk factors for colonisation with extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli.** Infection 40, 685-687.
- Mir, R.A., Weppelmann, T.A., Johnson, J.A., Archer, D., Morris, J.G., Jr., Jeong, K.C., 2016. **Identification and Characterization of Cefotaxime Resistant Bacteria in Beef Cattle.** PLoS One 11, e0163279.
- Mo, S.S., Norstrom, M., Slette-meas, J.S., Lovland, A., Urdahl, A.M., Sunde, M., 2014. **Emergence of AmpC-producing Escherichia coli in the broiler production chain in a country with a low antimicrobial usage profile.** Veterinary microbiology 171, 315-320.
- Moremi, N., Manda, E.V., Falgenhauer, L., Ghosh, H., Imirzalioglu, C., Matee, M., Chakraborty, T., Mshana, S.E., 2016. **Predominance of CTX-M-15 among ESBL Producers from Environment and Fish Gut from the Shores of Lake Victoria in Mwanza, Tanzania.** Front Microbiol 7, 1862.
- Moreno, M.A., Teshager, T., Porrero, M.A., Garcia, M., Escudero, E., Torres, C., Dominguez, L., 2007. **Abundance and phenotypic diversity of Escherichia coli isolates with**

diminished susceptibility to expanded-spectrum cephalosporins in faeces from healthy food animals after slaughter. Veterinary microbiology 120, 363-369.

Muller, A., Stephan, R., Nuesch-Inderbinen, M., 2016. **Distribution of virulence factors in ESBL-producing Escherichia coli isolated from the environment, livestock, food and humans.** Sci Total Environ 541, 667-672.

Murphy, C., Reid-Smith, R.J., Prescott, J.F., Bonnett, B.N., Poppe, C., Boerlin, P., Weese, J.S., Janecko, N., McEwen, S.A., 2009. **Occurrence of antimicrobial resistant bacteria in healthy dogs and cats presented to private veterinary hospitals in southern Ontario: A preliminary study.** The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne 50, 1047-1053.

Nataro, J.P., Kaper, J.B., 1998. **Diarrheagenic Escherichia coli.** Clinical Microbiology Reviews 11, 142-+.

Nguyen do, P., Nguyen, T.A., Le, T.H., Tran, N.M., Ngo, T.P., Dang, V.C., Kawai, T., Kanki, M., Kawahara, R., Jinnai, M., Yonogi, S., Hirai, Y., Yamamoto, Y., Kumeda, Y., 2016. **Dissemination of Extended-Spectrum beta-Lactamase- and AmpC beta-Lactamase-Producing Escherichia coli within the Food Distribution System of Ho Chi Minh City, Vietnam.** Biomed Res Int 2016, 8182096.

Nicolas-Chanoine, M.H., Gruson, C., Bialek-Davenet, S., Bertrand, X., Thomas-Jean, F., Bert, F., Moyat, M., Meiller, E., Marcon, E., Danchin, N., Noussair, L., Moreau, R., Leflon-Guibout, V., 2013. **10-Fold increase (200611) in the rate of healthy subjects with extended-spectrum -lactamase-producing Escherichia coli faecal carriage in a Parisian check-up centre.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy 68, 562-568.

Nuesch-Inderbinen, M., Zurfluh, K., Peterhans, S., Hachler, H., Stephan, R., 2015. **Assessment of the Prevalence of Extended-Spectrum beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Ready-to-Eat Salads, Fresh-Cut Fruit, and Sprouts from the Swiss Market.** J Food Prot 78, 1178-1181.

O'Keefe, A., Hutton, T.A., Schifferli, D.M., Rankin, S.C., 2010. **First detection of CTX-M and SHV extended-spectrum beta-lactamases in Escherichia coli urinary tract isolates from dogs and cats in the United States.** Antimicrob Agents Chemother 54, 3489-3492.

Olsen, R.H., Bisgaard, M., Lohren, U., Robineau, B., Christensen, H., 2014. **Extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli isolated from poultry: a review of current problems, illustrated with some laboratory findings.** Avian pathology : journal of the W.V.P.A 43, 199-208.

Osinska, A., Korzeniewska, E., Harnisz, M., Niestepski, S., 2017. **The prevalence and characterization of antibiotic-resistant and virulent Escherichia coli strains in the municipal wastewater system and their environmental fate.** Sci Total Environ 577, 367-375.

Overdevest, I., Willemsen, I., Rijnsburger, M., Eustace, A., Xu, L., Hawkey, P., Heck, M., Savelkoul, P., Vandenbroucke-Grauls, C., Zwaluw, K.v.d., Huijsdens, X., Kluytmans, J., 2011. **Extended-Spectrum β -Lactamase Genes of Escherichia coli in Chicken Meat and Humans, the Netherlands.** Emerg Infect Dis Vol. 17, No. 7, 1216 - 1222.

Pacholewicz, E., Liakopoulos, A., Swart, A., Gortemaker, B., Dierikx, C., Havelaar, A., Schmitt, H., 2015. **Reduction of extended-spectrum- β -lactamase- and AmpC- β -lactamase-producing Escherichia coli through processing in two broiler chicken slaughterhouses.** International journal of food microbiology 215, 57-63.

- Paniagua, R., Valverde, A., Coque, T.M., Baquero, F., Canton, R., 2010. **Assessment of prevalence and changing epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae fecal carriers using a chromogenic medium.** *Diagn Microbiol Infect Dis* 67, 376-379.
- Papanicolaou, G.A., Medeiros, A.A., Jacoby, G.A., 1990. **Novel plasmid-mediated beta-lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino- and alpha-methoxy beta-lactams in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae.** *Antimicrob Agents Chemother* 34, 2200-2209.
- Pasquali, F., Lucchi, A., Braggio, S., Giovanardi, D., Franchini, A., Stonfer, M., Manfreda, G., 2015. **Genetic diversity of Escherichia coli isolates of animal and environmental origins from an integrated poultry production chain.** *Veterinary microbiology* 178, 230-237.
- Paterson, D.L., Bonomo, R.A., 2005. **Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update.** *Clin Microbiol Rev* 18, 657-686.
- Peter-Getzlaff, S., Polsfuss, S., Poledica, M., Hombach, M., Giger, J., Bottger, E.C., Zbinden, R., Bloemberg, G.V., 2011. **Detection of AmpC beta-lactamase in Escherichia coli: comparison of three phenotypic confirmation assays and genetic analysis.** *J Clin Microbiol* 49, 2924-2932.
- Peternel, C., Galler, H., Zarfel, G., Luxner, J., Haas, D., Grisold, A.J., Reinthaler, F.F., Feierl, G., 2014. **Isolation and characterization of multidrug-resistant bacteria from minced meat in Austria.** *Food Microbiol* 44, 41-46.
- Pfeifer, Y., Cullik, A., Witte, W., 2010. **Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens.** *International journal of medical microbiology : IJMM* 300, 371-379.
- Philippon, A., Arlet, G., Jacoby, G.A., 2002. **Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases.** *Antimicrob Agents Chemother* 46, 1-11.
- Philippon, A., Labia, R., Jacoby, G., 1989. **Extended-spectrum beta-lactamases.** *Antimicrob Agents Chemother* 33, 1131-1136.
- Pitout, J.D., Laupland, K.B., 2008. **Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern.** *Lancet Infect Dis* 8, 159-166.
- Poeta, P., Radhouani, H., Pinto, L., Martinho, A., Rego, V., Rodrigues, R., Goncalves, A., Rodrigues, J., Estepa, V., Torres, C., Igrejas, G., 2009. **Wild boars as reservoirs of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing Escherichia coli of different phylogenetic groups.** *J Basic Microb* 49, 584-588.
- Poirel, L., Bonnin, R.A., Nordmann, P., 2012. **Genetic support and diversity of acquired extended-spectrum beta-lactamases in Gram-negative rods.** *Infection Genetics and Evolution* 12, 883-893.
- Poirel, L., Kampfer, P., Nordmann, P., 2002. **Chromosome-encoded amlyer class A beta-lactamase of Kluyvera georgiana, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended-spectrum beta-lactamases.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46, 4038-4040.

- Poirel, L., Nordmann, P., Ducroz, S., Boulouis, H.J., Arne, P., Millemann, Y., 2013. **Extended-Spectrum beta-Lactamase CTX-M-15-Producing *Klebsiella pneumoniae* of Sequence Type ST274 in Companion Animals.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57, 2372-2375.
- Projahn, M., Daehre, K., Roesler, U., Friese, A., 2017. **Extended-Spectrum-Beta-Lactamase- and Plasmid-Encoded Cephamycinase-Producing Enterobacteria in the Broiler Hatchery as a Potential Mode of Pseudo-Vertical Transmission.** *Applied and environmental microbiology* 83.
- Ramos, S., Silva, N., Dias, D., Sousa, M., Capelo-Martinez, J.L., Brito, F., Canica, 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.
- Randall, L., Heinrich, K., Horton, R., Brunton, L., Sharman, M., Bailey-Horne, V., Sharma, M., McLaren, I., Coldham, N., Teale, C., Jones, J., 2014a. **Detection of antibiotic residues and association of cefquinome residues with the occurrence of Extended-Spectrum beta-Lactamase (ESBL)-producing bacteria in waste milk samples from dairy farms in England and Wales in 2011.** *Res Vet Sci* 96, 15-24.
- Randall, L.P., Lemma, F., Rogers, J.P., Cheney, T.E., Powell, L.F., Teale, C.J., 2014b. **Prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from pigs at slaughter in the UK in 2013.** *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 69, 2947-2950.
- Randall, L.P., Lodge, M.P., Elviss, N.C., Lemma, F.L., Hopkins, K.L., Teale, C.J., Woodford, N., 2017. **Evaluation of meat, fruit and vegetables from retail stores in five United Kingdom regions as sources of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing and carbapenem-resistant *Escherichia coli*.** *International journal of food microbiology* 241, 283-290.
- Reich, F., Atanassova, V., Klein, G., 2013. **Extended-Spectrum β -Lactamase- and AmpC-Producing Enterobacteria in Healthy Broiler Chickens, Germany.** *Emerg Infect Dis* Vol. 19, No. 8, 1253 - 1259.
- Reich, F., Schill, F., Atanassova, V., Klein, G., 2016. **Quantification of ESBL-*Escherichia coli* on broiler carcasses after slaughtering in Germany.** *Food Microbiol* 54, 1-5.
- Reinthaler, F.F., Feierl, G., Galler, H., Haas, D., Leitner, E., Mascher, F., Melkes, A., Posch, J., Winter, I., Zarfel, G., Marth, E., 2010. **ESBL-producing *E. coli* in Austrian sewage sludge.** *Water Res* 44, 1981-1985.
- Reist, M., Geser, N., Hachler, H., Scharrer, S., Stephan, R., 2013. **ESBL-producing Enterobacteriaceae: occurrence, risk factors for fecal carriage and strain traits in the Swiss slaughter cattle population younger than 2 years sampled at abattoir level.** *PLoS One* 8, e71725.
- Reuland, E.A., Al Naiemi, N., Kaiser, A.M., Heck, M., Kluytmans, J.A., Savelkoul, P.H., Elders, P.J., Vandenbroucke-Grauls, C.M., 2016. **Prevalence and risk factors for carriage of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Amsterdam.** *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 71, 1076-1082.
- Reuland, E.A., Al Naiemi, N., Raadsen, S.A., Savelkoul, P.H.M., Kluytmans, J.A.J.W., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., 2014. **Prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in raw vegetables.** *Eur J Clin Microbiol* 33, 1843-1846.

- Rodriguez-Bano, J., Lopez-Cerero, L., Navarro, M.D., de Alba, P.D., Pascual, A., 2008. **Faecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli: prevalence, risk factors and molecular epidemiology.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy 62, 1142-1149.
- Roschanski, N., Fischer, J., Guerra, B., Roesler, U., 2014. **Development of a multiplex real-time PCR for the rapid detection of the predominant beta-lactamase genes CTX-M, SHV, TEM and CIT-type AmpCs in Enterobacteriaceae.** PLoS One 9, e100956.
- Rossolini, G.M., D'Andrea, M.M., Mugnaioli, C., 2008. **The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases.** Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 14 Suppl 1, 33-41.
- Saeed, M.A., Haque, A., Ali, A., Mohsin, M., Bashir, S., Tariq, A., Afzal, A., Iftikhar, T., Sarwar, Y., 2009. **Relationship of drug resistance to phylogenetic groups of E. coli isolates from wound infections.** Journal of infection in developing countries 3, 667-670.
- Sallem, R.B., Gharsa, H., Slama, K.B., Rojo-Bezares, B., Estepa, V., Porres-Osante, N., Jouini, A., Klibi, N., Saenz, Y., Boudabous, A., Torres, C., 2013. **First detection of CTX-M-1, CMY-2, and QnrB19 resistance mechanisms in fecal Escherichia coli isolates from healthy pets in Tunisia.** Vector Borne Zoonotic Dis 13, 98-102.
- Savini, V., Catavittello, C., Talia, M., Manna, A., Pompetti, F., Favaro, M., Fontana, C., Febbo, F., Balbinot, A., Di Bernardino, F., Di Bonaventura, G., Di Zaccaro, S., Esattore, F., D'Antonio, D., 2008. **Multidrug-resistant Escherichia fergusonii: a case of acute cystitis.** J Clin Microbiol 46, 1551-1552.
- Schaufler, K., Bethe, A., Lubke-Becker, A., Ewers, C., Kohn, B., Wieler, L.H., Guenther, S., 2015. **Putative connection between zoonotic multiresistant extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Escherichia coli in dog feces from a veterinary campus and clinical isolates from dogs.** Infect Ecol Epidemiol 5, 25334.
- Schaufler, K., Semmler, T., Wieler, L.H., Wohrmann, M., Baddam, R., Ahmed, N., Muller, K., Kola, A., Fruth, A., Ewers, C., Guenther, S., 2016. **Clonal spread and interspecies transmission of clinically relevant ESBL-producing Escherichia coli of ST410--another successful pandemic clone?** FEMS Microbiol Ecol 92.
- 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.** Applied and environmental microbiology 79, 3027-3032.
- Schmiedel, J., Falgenhauer, L., Domann, E., Bauerfeind, R., Prenger-Berninghoff, E., Imirzalioglu, C., Chakraborty, T., 2014. **Multiresistant extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae from humans, companion animals and horses in central Hesse, Germany.** BMC Microbiol 14.
- Schwaiger, K., Helmke, K., Holzel, C.S., Bauer, J., 2011. **Antibiotic resistance in bacteria isolated from vegetables with regards to the marketing stage (farm vs. supermarket).** International journal of food microbiology 148, 191-196.
- 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 resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy 16, 22-45.

- Simoës, R.R., Poirel, L., Da Costa, P.M., Nordmann, P., 2010. **Seagulls and Beaches as Reservoirs for Multidrug-Resistant Escherichia coli**. Emerg Infect Dis 16, 110-112.
- Smet, A., Martel, A., Persoons, D., Dewulf, J., Heyndrickx, M., Catry, B., Herman, L., Haesebrouck, F., Butaye, P., 2008. **Diversity of extended-spectrum beta-lactamases and class C beta-lactamases among cloacal Escherichia coli Isolates in Belgian broiler farms**. Antimicrob Agents Chemother 52, 1238-1243.
- Smet, A., Rasschaert, G., Martel, A., Persoons, D., Dewulf, J., Butaye, P., Catry, B., Haesebrouck, F., Herman, L., Heyndrickx, M., 2011. **In situ ESBL conjugation from avian to human Escherichia coli during cefotaxime administration**. Journal of applied microbiology 110, 541-549.
- Snow, L.C., Warner, R.G., Cheney, T., Wearing, H., Stokes, M., Harris, K., Teale, C.J., Coldham, N.G., 2012. **Risk factors associated with extended spectrum beta-lactamase Escherichia coli (CTX-M) on dairy farms in North West England and North Wales**. Preventive veterinary medicine 106, 225-234.
- So, J.H., Kim, J., Bae, I.K., Jeong, S.H., Kim, S.H., Lim, S.K., Park, Y.H., Lee, K., 2012. **Dissemination of multidrug-resistant Escherichia coli in Korean veterinary hospitals**. Diagn Micr Infec Dis 73, 195-199.
- Sougakoff, W., Goussard, S., Gerbaud, G., Courvalin, P., 1988. **Plasmid-mediated resistance to third-generation cephalosporins caused by point mutations in TEM-type penicillinase genes**. Rev Infect Dis 10, 879-884.
- Springer, B., Bruckner, K., 2012. **Characterization of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing Escherichia coli from raw meat and comparison to human isolates**. Wien Tierarztl Monat 99, 44-50.
- Stedt, J., Bonnedahl, J., Hernandez, J., Waldenstrom, J., McMahon, B.J., Tolf, C., Olsen, B., Drobni, M., 2015. **Carriage of CTX-M type extended spectrum beta-lactamases (ESBLs) in gulls across Europe**. Acta Vet Scand 57.
- Stromdahl, H., Tham, J., Melander, E., Walder, M., Edquist, P.J., Odenholt, I., 2011. **Prevalence of faecal ESBL carriage in the community and in a hospital setting in a county of Southern Sweden**. Eur J Clin Microbiol 30, 1159-1162.
- Stürenburg, E., Mack, D., 2003. **Extended-spectrum β -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control**. Journal of Infection 47, 273-295.
- Sun, Y., Zeng, Z., Chen, S., Ma, J., He, L., Liu, Y., Deng, Y., Lei, T., Zhao, J., Liu, J.H., 2010. **High prevalence of bla(CTX-M) extended-spectrum beta-lactamase genes in Escherichia coli isolates from pets and emergence of CTX-M-64 in China**. Clin Microbiol Infec 16, 1475-1481.
- SWEDRES-SVARM, 2013. **Use of antimicrobials and occurrence of antimicrobial resistance in Sweden 2012**. Swedish Institute for Communicable Disease Control and National Veterinary Intitute, Solna/Uppsala.
- Tamang, M.D., Nam, H.M., Kim, S.R., Chae, M.H., Jang, G.C., Jung, S.C., Lim, S.K., 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.

- Teshager, T., Dominguez, L., Moreno, M.A., Saenz, Y., Torres, C., Cardenosa, S., 2000. **Isolation of an SHV-12 beta-lactamase-producing Escherichia coli strain from a dog with recurrent urinary tract infections.** Antimicrob Agents Chemother 44, 3483-3484.
- Tian, G.B., Wang, H.N., Zou, L.K., Tang, J.N., Zhao, Y.W., Ye, M.Y., Tang, J.Y., Zhang, Y., Zhang, A.Y., Yang, X., Xu, C.W., Fu, Y.J., 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.
- Tschäpe, H., Reissbrodt, R., Prager, P., 2009. **Mikrobiologische Diagnostik, 2.,vollständig überarbeitete Auflage Edition.** Thieme
- Tschudin-Sutter, S., Frei, R., Stephan, R., Hachler, H., Nogarth, D., Widmer, A.F., 2014. **Extended-Spectrum beta-Lactamase (ESBL)-Producing Enterobacteriaceae: A Threat from the Kitchen.** Infect Cont Hosp Ep 35, 581-584.
- Urumova, V., 2015. **Extended spectrum beta lactamase producing animal enterobacteriaceae isolates as potential risk to public health - review.** Rev Med Vet-Toulouse 166, 192-207.
- Valentin, L., Sharp, H., Hille, K., Seibt, U., Fischer, J., Pfeifer, Y., Michael, G.B., Nickel, S., Schmiedel, J., Falgenhauer, L., Friese, A., Bauerfeind, R., Roesler, U., Imirzalioglu, C., Chakraborty, T., Helmuth, R., Valenza, G., Werner, G., Schwarz, S., Guerra, B., Appel, B., Kreienbrock, L., Kasbohrer, A., 2014. **Subgrouping of ESBL-producing Escherichia coli from animal and human sources: an approach to quantify the distribution of ESBL types between different reservoirs.** International journal of medical microbiology : IJMM 304, 805-816.
- Valenza, G., Nickel, S., Pfeifer, Y., Eller, C., Krupa, E., Lehner-Reindl, V., Holler, C., 2014. **Extended-Spectrum-beta-Lactamase-Producing Escherichia coli as Intestinal Colonizers in the German Community.** Antimicrob Agents Chemother 58, 1228-1230.
- Valverde, A., Grill, F., Coque, T.M., Pintado, V., Baquero, F., Canton, R., Cobo, J., 2008. **High rate of intestinal colonization with extended-spectrum-beta-lactamase-producing organisms in household contacts of infected community patients.** Journal of Clinical Microbiology 46, 2796-2799.
- van Hoek, A.H., Veenman, C., van Overbeek, W.M., Lynch, G., de Roda Husman, A.M., Blaak, H., 2015. **Prevalence and characterization of ESBL- and AmpC-producing Enterobacteriaceae on retail vegetables.** International journal of food microbiology 204, 1-8.
- Veldman, K., Kant, A., Dierikx, C., van Essen-Zandbergen, A., Wit, B., Mevius, D., 2014. **Enterobacteriaceae resistant to third-generation cephalosporins and quinolones in fresh culinary herbs imported from Southeast Asia.** International journal of food microbiology 177, 72-77.
- Von Salviati, C., Friese, A., Roschanski, N., Laube, H., Guerra, B., Kasbohrer, 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.** Berliner und Munchener tierärztliche Wochenschrift 127, 412-419.
- von Salviati, C., Laube, H., Guerra, B., Roesler, U., Friese, A., 2015. **Emission of ESBL/AmpC-producing Escherichia coli from pig fattening farms to surrounding areas.** Veterinary microbiology 175, 77-84.

Walther, B., Lubke-Becker, A., Stamm, I., Gehlen, H., Barton, A.K., Janssen, T., Wieler, L.H., Guenther, S., 2014. **Suspected nosocomial infections with multi-drug resistant *E. coli*, including extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing strains, in an equine clinic.** Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift 127, 421-427.

Wasyl, D., Hasman, H., Cavaco, L.M., Aarestrup, F.M., 2012. **Prevalence and characterization of cephalosporin resistance in nonpathogenic *Escherichia coli* from food-producing animals slaughtered in Poland.** Microb Drug Resist 18, 79-82.

Watson, E., Jeckel, S., Snow, L., Stubbs, R., Teale, C., Wearing, H., Horton, R., Toszeghy, M., Tearne, O., Ellis-Iversen, J., Coldham, N., 2012. **Epidemiology of extended spectrum beta-lactamase *E-coli* (CTX-M-15) on a commercial dairy farm.** Veterinary microbiology 154, 339-346.

Wellington, E.M., Boxall, A.B., Cross, P., Feil, E.J., Gaze, W.H., Hawkey, P.M., Johnson-Rollings, A.S., Jones, D.L., Lee, N.M., Otten, W., Thomas, C.M., Williams, A.P., 2013. **The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in gram-negative bacteria.** Lancet Infect Dis 13, 155-165.

WHO 2011. **Critically Important Antimicrobials for Human Medicine.**

WHO, 2017. **Critically important antimicrobials for human medicine 5th revision.**

Wieler, L.H., Ewers, C., Guenther, S., Walther, B., Lubke-Becker, A., 2011a. **Methicillin-resistant staphylococci (MRS) and extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in companion animals: nosocomial infections as one reason for the rising prevalence of these potential zoonotic pathogens in clinical samples.** International journal of medical microbiology : IJMM 301, 635-641.

Wieler, L.H., Ewers, C., Selbitz, H.-J., 2011b. **Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 9., vollständig überarbeitete Auflage Edition.** Enke.

Wieler, L.H., Semmler, T., Eichhorn, I., Antao, E.M., Kinnemann, B., Geue, L., Karch, H., Guenther, S., Bethe, A., 2011c. **No evidence of the Shiga toxin-producing *E. coli* O104:H4 outbreak strain or enteroaggregative *E. coli* (EAEC) found in cattle faeces in northern Germany, the hotspot of the 2011 HUS outbreak area.** Gut Pathog 3.

Wirth, T., Falush, D., Lan, R.T., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L.H., Karch, H., Reeves, P.R., Maiden, M.C.J., Ochman, H., Achtman, M., 2006. **Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective.** Mol Microbiol 60, 1136-1151.

Wu, S., Chouliara, E., Hasman, H., Dalsgaard, A., Vieira, A., Jensen, L.B., 2008. **Detection of a single isolate of CTX-M-1-producing *Escherichia coli* from healthy pigs in Denmark.** The Journal of antimicrobial chemotherapy 61, 747-749.

Yilmaz, N.O., Agus, N., Bozcal, E., Oner, O., Uzel, A., 2013. **Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*.** Indian J Med Microbiol 31, 53-59.

Zarfel, G., Galler, H., Luxner, J., Petternel, C., Reinthaler, F.F., Haas, D., Kittinger, C., Grisold, A.J., Pless, P., Feierl, G., 2014. **Multiresistant Bacteria Isolated from Chicken Meat in Austria.** Int J Env Res Pub He 11, 12582-12593.

Zhou, Y., Wu, X., Zhang, J., Tao, X., Deng, Z., Hu, Y., Li, M., Yang, X., Wang, M., Yang, Z., 2015. **High Prevalence of CTX-M Beta-Lactamases in Enterobacteriaceae from Healthy Individuals in Guangzhou, China.** *Microb Drug Resist* 21, 398-403.

Zogg, A.L., Zurfluh, K., Nuesch-Inderbinen, M., Stephan, R., 2016. **Characteristics of ESBL-producing Enterobacteriaceae and Methicillinresistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolated from Swiss and imported raw poultry meat collected at retail level.** *Schweiz Arch Tierheilkd* 158, 451-456.

Zottola, T., Montagnaro, S., Magnapera, C., Sasso, S., De Martino, L., Bragagnolo, A., D'Amici, L., Condoleo, R., Pisanelli, G., Iovane, G., Pagnini, U., 2013. **Prevalence and antimicrobial susceptibility of salmonella in European wild boar (Sus scrofa); Latium Region - Italy.** *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 36, 161-168.

Zurfluh, K., Hachler, H., Nuesch-Inderbinen, M., Stephan, R., 2013. **Characteristics of Extended-Spectrum beta-Lactamase- and Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae Isolates from Rivers and Lakes in Switzerland.** *Applied and environmental microbiology* 79, 3021-3026.

Zurfluh, K., Jakobi, G., Stephan, R., Hachler, H., Nuesch-Inderbinen, M., 2014. **Replicon typing of plasmids carrying bla(CTX-M-1) in Enterobacteriaceae of animal, environmental and human origin.** *Front Microbiol* 5.

Zurfluh, K., Nuesch-Inderbinen, M., Morach, M., Berner, A.Z., Hachler, H., Stephan, R., 2015. **Extended-Spectrum-beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae Isolated from Vegetables Imported from the Dominican Republic, India, Thailand, and Vietnam.** *Applied and environmental microbiology* 81, 3115-3120.

10. Anhang

10.1. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
AmpC	Ampicillinase C-Beta-Laktamase
BfR	Bundesinstitut für Risikoberwertung
BSBL	Broad-Spectrum-Beta-Laktamase
C.	<i>Citrobacter</i>
CAZ	Ceftazidim
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
CMY	Cephamycinase
CTX	Cefotaxim
CTX/CLAV	Cefotaxim/Clavulansäure
CTX-M	Cefotaximase
C _t -Wert	cycle treshold-Wert
E.	<i>Enterobacter</i>
E.	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFSA	European Food Safety Authority
ESBL	Extended-Spectrum-Beta-Laktamase
EtOH	Ethanol
FOX	Cefoxitin
K.	<i>Klebsiella</i>
K.	<i>Kluyvera</i>
MALDI TOF	Matrix asissted Laser Desorption/Ionisation Time of Flight
MC+	MacConkey Agar mit 1 µg/ml Cefotaxim
MC-	MacConkey Agar ohne Zusatz von Antibiotika
M.	<i>Morganella</i>
NTC	no template control
OD	optische Dichte
OXA	Oxacillinase
pAmpC	plasmidkodierte Ampicillinase C-Beta-Laktamase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFGE	Pulsfeld Gelelektrophorese

<i>P.</i>	<i>Proteus</i>
RKI	Robert Koch-Institut
qPCR	Real-Time Polymerasekettenreaktion
spp.	Spezies
SVH	Sulfhydryl variable
TEM	Temoniera

10.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Erweiterte funktionelle und molekulare Einteilung von β -Laktamasen nach Bush und Jacoby (2010).....	- 10 -
Tabelle 2: Einteilung der CTX-M-Varianten sowie deren Ursprung und erste Isolierung. Modifiziert nach Canton und Coque (2006) sowie Rossolini et al. (2008).....	- 13 -
Tabelle 3: Einzeltier- bzw. Betriebsprävalenz ESBL/AmpC-produzierender <i>E. coli</i> bei Geflügel.....	- 19 -
Tabelle 4: Einzeltier- bzw. Betriebsprävalenz ESBL/AmpC-produzierender <i>E. coli</i> bei Schweinen.....	- 21 -
Tabelle 5: Einzeltier- bzw. Betriebsprävalenz ESBL/AmpC-produzierender <i>E. coli</i> bei Rindern.....	- 22 -
Tabelle 6: ESBL/AmpC-bildende <i>E. coli</i> bei Geflügel (Legehennen) und in Lebensmitteln (Eier, Kräuter) aus dem Zoonose-Monitoring 2014 in Deutschland, modifiziert nach BVL (2016).....	- 30 -
Tabelle 7: Prozentualer Anteil putativer (nach Phänotypisierung) ESBL/AmpC-bildender <i>E. coli</i> - und <i>Salmonella</i> - Isolate bei Geflügel auf EU-Ebene in 2014, modifiziert nach EFSA (2016).....	- 30 -
Tabelle 8: Prävalenz ESBL/AmpC-produzierender <i>Enterobacteriaceae</i> in Hähnchenfleisch aus verschiedenen Ländern.....	- 32 -
Tabelle 9: Prozentualer Anteil invasiver <i>E. coli</i> bzw. <i>K. pneumoniae</i> Isolate mit Resistenz gegen Cephalosporine der 3. Generation in EU/EWR Ländern im Jahr 2014, modifiziert nach ECDC (2015); geordnet nach %R.....	- 37 -
Tabelle 10: Prävalenz ESBL-produzierender <i>Enterobacteriaceae</i> im Darm der gesunden Bevölkerung verschiedener Länder, geordnet nach Prävalenzen.....	- 38 -
Tabelle 11: Nährmedien.....	- 40 -
Tabelle 12: Chemikalien und Puffer.....	- 40 -
Tabelle 13: Primer und Sonden.....	- 41 -
Tabelle 14: Bakterienstämme (Positivkontrollen).....	- 41 -
Tabelle 15: Geräte.....	- 42 -
Tabelle 16: Software.....	- 42 -
Tabelle 17: Verbrauchsmaterialien.....	- 43 -
Tabelle 18: Interpretation der MALDI-Ergebnisse.....	- 46 -
Tabelle 19: Pipettierschema qPCR für eine Probe.....	- 49 -
Tabelle 20: qPCR-Protokoll.....	- 49 -
Tabelle 21: Nachgewiesene <i>bla</i> -Gene* in den Isolaten aller Probenmatrizes aus Herde 1-7. (*Nachweis der Gene <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} oder <i>bla</i> _{AmpC-CIT} mittels qPCR).....	VI

10.3. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Unterteilung der wichtigsten <i>E. coli</i> -Pathovaren	- 5 -
Abbildung 2: Molekulare Einteilung der β -Laktamasen nach Ambler	- 8 -
Abbildung 3: Prozentualer Anteil der Proben mit ESBL/AmpC-positiven <i>Enterobacteriaceae</i> . Die Graphen zeigen die Gesamtheit aller Proben aus Herde 1-7. Als ESBL/AmpC-positiv wurden Proben gewertet, bei denen mindestens eines der untersuchten Gene <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} oder <i>bla</i> _{AmpC-CIT} durch Sequenzierung als ESBL/AmpC-Gen bestätigt worden war.....	- 52 -
Abbildung 4: Anzahl der Proben mit ESBL/AmpC-positiven <i>Enterobacteriaceae</i> . Die Graphen zeigen die sieben Herden sortiert nach Probenmatrix. Als ESBL/AmpC-positiv wurden Proben gewertet, bei denen mindestens eines der untersuchten Gene <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} oder <i>bla</i> _{AmpC-CIT} durch Sequenzierung als ESBL/AmpC-Gen bestätigt worden war.....	- 53 -
Abbildung 5: Keimzahl der Gesamt- <i>Enterobacteriaceae</i> (MC-) sowie der Cefotaxim-resistenten <i>Entero-bacteriaceae</i> (MC+), die über der Nachweisgrenze von $1,5 \times 10^2$ KbE/g in den Caecum- und Hautproben bzw. $1,5 \times 10^1$ KbE/g in den Filetproben der vier quantifizierten Herden lagen. Dargestellt ist jeweils der Median \pm Interquartilsabstand (IQR).....	- 54 -
Abbildung 6: Dargestellt sind die logarithmierten Keimzahlen der Gesamt- <i>Enterobacteriaceae</i> (MC-) sowie der Cefotaxim-resistenten <i>Enterobacteriaceae</i> (MC+) in den Caecum- (A), (B) und Hautproben (C), (D) der vier quantifizierten Herden. Die Herden mit dem gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (Dunn-Bonferroni-Test, $p < 0,05$).	- 55 -
Abbildung 7: ESBL- bzw. AmpC-Phänotyp der Cefotaxim-resistenten <i>Enterobacteriaceae</i> (Plättchen-Diffusionstest).	- 57 -
Abbildung 8: Mittels qPCR nachgewiesene <i>bla</i> -Gene in den Isolaten aller Probenmatrizes aus den Herden 1-7. Die aufgeschlüsselten Daten befinden sich zusätzlich im Anhang in Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.....	- 59 -
Abbildung 9: Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Phylogruppen der qPCR-positiven <i>E. coli</i> -Isolate	- 60 -
Abbildung 10: Dargestellt ist der prozentuale Anteil der sequenzierten <i>bla</i> -Gene ausgewählter Isolate der Herden 1-7. Die Sequenzierungsergebnisse der Nullproben sind nicht mit abgebildet.	- 61 -
Abbildung 11: Dargestellt sind die Ergebnisse der sequenzierten <i>bla</i> -Gene aus 74 Isolaten der Herde 5 mit zugehöriger Phylogruppe. Die Größe der Kreise bzw. die Anzahl der Unterteilungen repräsentiert die Anzahl der Isolate mit der entsprechenden Phylogruppe (in	

der Mitte der Kreise benannt) und dem jeweiligen *bla*-Gen (neben den Kreisen benannt). Der Kreis ohne Phylogruppe steht für ein *K. pneumoniae*-Isolat. - 63 -

Abbildung 12: Dargestellt sind die Ergebnisse der sequenzierten *bla*-Gene aus 68 Isolaten der Herde 6 mit zugehöriger Phylogruppe. Die Größe der Kreise bzw. die Anzahl der Unterteilungen repräsentiert die Anzahl der Isolate mit der entsprechenden Phylogruppe (in der Mitte der Kreise benannt) und dem jeweiligen *bla*-Gen (neben den Kreisen benannt). Die Kreise ohne Phylogruppen stehen für 18 *E. fergusonii*- (CMY-2) und neun *K. pneumoniae*-Isolate (SHV-2; SHV-1/SHV-2 oder SHV-1) sowie einem *C. freundii*-Isolat (CMY*). Bei SHV-1 handelt es sich um eine Broad-Spectrum-Beta-Laktamase. - 64 -

Abbildung 13: Dargestellt sind die Ergebnisse der sequenzierten *bla*-Gene aus 33 Isolaten der Herde 7 mit zugehöriger Phylogruppe. Die Größe der Kreise bzw. die Anzahl der Unterteilungen repräsentiert die Anzahl der Isolate mit der entsprechenden Phylogruppe (in der Mitte der Kreise benannt) und dem jeweiligen *bla*-Gen (neben den Kreisen benannt). Die Kreise ohne Phylogruppen stehen für fünf *P. mirabilis*-Isolate (CMY-2) sowie einem *C. freundii*-Isolat (CMY-113). Bei TEM-1 handelt es sich um eine Broad-Spectrum-Beta-Laktamase. - 65 -

Anhang

Tabelle 21 Nachgewiesene *bla*-Gene* in den Isolaten aller Probenmatrizes aus Herde 1-7. (*Nachweis der Gene *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} oder *bla*_{AmpC-CIT} mittels qPCR)

detektierte <i>bla</i> _{ESBL/AmpC} -Gene	Herde							Gesamt
	1	2	3	4	5	6	7	
<i>bla</i> _{TEM}	17,3 % (9/52)	42,8 % (6/14)	0 % (0/154)	1,8 % (1/56)	2,8 % (6/215)	0 % (0/98)	1,7 % (3/178)	3,3 % (25/767)
<i>bla</i> _{AmpC-CIT}	1,9 % (1/52)	0 % (0/14)	58,4 % (90/154)	53,6 % (30/56)	10,7 % (23/215)	24,5 % (24/98)	3,4 % (6/178)	22,7 % (174/767)
<i>bla</i> _{SHV}	0 % (0/52)	0 % (0/14)	0 % (0/154)	16,1 % (9/56)	81,4 % (175/215)	41,8 % (41/98)	0 % (0/178)	29,3 % (225/767)
<i>bla</i> _{CTX-M}	0 % (0/52)	0 % (0/14)	1,3 % (2/154)	17,9 % (10/56)	0 % (0/215)	30,6 % (30/98)	4,5 % (8/178)	6,5 % (50/767)
<i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{AmpC-CIT}	73,1 % (38/52)	0 % (0/14)	33,7 % (52/154)	7,1 % (4/56)	0 % (0/215)	0 % (0/98)	0 % (0/178)	12,3 % (94/767)
<i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{CTX-M}	3,8 % (2/52)	0 % (0/14)	0 % (0/154)	0 % (0/56)	0 % (0/215)	1 % (1/98)	28,1 % (50/178)	6,9 % (53/767)
<i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{SHV}	0 % (0/52)	0 % (0/14)	0 % (0/154)	0 % (0/56)	2,8 % (6/215)	0 % (0/98)	0 % (0/178)	0,0078 % (6/767)
<i>bla</i> _{CTX-M} + <i>bla</i> _{AmpC-CIT}	0 % (0/52)	0 % (0/14)	0 % (0/154)	0 % (0/56)	0 % (0/215)	1 % (1/98)	0 % (0/178)	0,0013 % (1/767)
<i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{CTX-M} + <i>bla</i> _{AmpC-CIT}	1,9 % (1/52)	0 % (0/14)	0 % (0/154)	0 % (0/56)	0 % (0/215)	0 % (0/98)	0 % (0/178)	0,0013 % (1/767)
negativ	1,9 % (1/52)	57,1 % (8/14)	6,5 % (10/154)	3,6 % (2/56)	2,3 % (5/215)	1 % (1/98)	62,4 % (111/178)	17,8 % (138/767)

Publikationen

von Tippelskirch, P.; Gölz, G.; Orquera, S.; Projahn, M.; Dähre, K.; Friese, A.; Rösler, U.; Alter, T. (2017 / Vortrag): **Prevalence and quantitative analysis of ESBL and AmpC β -lactamase producing *Enterobacteriaceae* in broiler chicken**, Workshop "Current challenges in Food Safety" 2017, LSMU Veterinary Academy Litauen

Dähre, K.; Projahn, M.; von Tippelskirch, P.; Gölz, G.; Orquera, S.; Alter, T.; Friese, A.; Roesler, U.; (2017 / Poster): **Distribution of ESBL-/AmpC-producing *Enterobacteriaceae* along the broiler production chain**, RESET & MedVet-Staph – Final Scientific Symposium 2017, Berlin

von Tippelskirch, P.; Gölz, G.; Orquera, S.; Projahn, M.; Dähre, K.; Friese, A.; Rösler, U.; Alter, T. (2017 / Poster): **Prevalence and quantitative analysis of ESBL and AmpC β -lactamase producing *Enterobacteriaceae* in poultry during slaughter**, RESET & MedVet-Staph – Final Scientific Symposium 2017, Berlin

Dähre, K.; Projahn, M.; von Tippelskirch, P.; Gölz, G.; Orquera, S.; Alter, T.; Guenther, S.; Semmler, T.; Friese, A.; Roesler, U. (2017 / Vortrag): **Molecular epidemiology of ESBL-/AmpC-producing enterobacteria in the broiler production chain**, RESET & MedVet-Staph – Final Scientific Symposium 2017, Berlin

Rösler, U.; Projahn, M.; Dähre, K.; von Tippelskirch, P.; Alter, T.; Friese, A. (2016 / Vortrag) **Horizontaler und vertikaler Transfer ESBL-bildender *E. coli* entlang der Masthähnchen-Produktionskette**, bpt-Kongress 2016: Vortragsband Schwein, Rind, Geflügel, BPT Akademie GmbH Frankfurt am Main

von Tippelskirch, P.; Gölz, G.; Orquera, S.; Projahn, M.; Dähre, K.; Friese, A.; Rösler, U.; Alter, T. (2016 / Vortrag) **Prevalence of extended spectrum and AmpC β -lactamases producing *Enterobacteriaceae* in poultry during slaughter**, National Symposium on Zoonoses Research 2016: 13 – 14 October | Berlin 2016; Program and Abstracts, Berlin

von Tippelskirch, P.; Gölz, G.; Orquera, S.; Projahn, M.; Dähre, K.; Friese, A.; Rösler, U.; Alter, T. (2016 / Poster): **Prävalenz von ESBL/AmpC-produzierenden *Enterobacteriaceae* in Geflügel während des Schlachtprozesses**, 57. Arbeitstagung des Arbeitsgebiets Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft 2016, Garmisch-Partenkirchen

Projahn, M.; Dähre, K.; von Tippelskirch, P.; Alter, T.; Friese, A.; Rösler, U. (2016 / Vortrag): **Epidemiologie ESBL-/AmpC produzierender Enterobakterien in der Masthähnchen-Produktionskette**, Gemeinsame Tagung der DVG-Fachgruppe „Epidemiologie und Dokumentation“, der Sektion Epidemiologie der Österreichischen Gesellschaft der Tierärzte, des Forums für Epidemiologie und Tiergesundheit Schweiz 2016, Jena

Projahn, M.; Dähre, K.; von Tippelskirch, P.; Alter, T.; Friese, A.; Rösler, U. (2016 / Vortrag) **Transmissionspfade ESBL-/AmpC produzierender Enterobakterien in der Masthähnchenproduktion**, Tagung der DVG-Fachgruppe „Bakteriologie und Mykologie“ „Mikrobiologie in der Tiermedizin GESTERN – HEUTE - MORGEN“ 2016, Jena

Friese, A.; Projahn, M.; Dähre, K.; von Tippelskirch, P.; Alter, T.; Rösler, U. (2016 / Vortrag): **Epidemiologie ESBL/AmpC-produzierender Enterobakterien entlang der Produktionskette von Masthähnchen**, 16. Fachtagung für Fleisch- und Geflügelfleischhygiene 2016, Berlin

Dähre, K.; Projahn, M.; von Tippelskirch, P.; Orquera, S.; Alter, T.; Rösler, U.; Friese, A. (2015 / Poster): **Occurrence of ESBL-/ AmpC-producing *Enterobacteriaceae* along the broiler production chain**, National Symposium on Zoonoses Research: 15 - 16 October 2015; Program and Abstracts, Berlin

Projahn, M.; Dähre, K.; von Tippelskirch, P.; Orquera, S.; Alter, T.; Friese, A.; Rösler, U. (2015 / Vortrag): **Epidemiological relationship of ESBL-/AmpC-producing *Enterobacteriaceae* in the broiler production chain**, National Symposium on Zoonoses Research: 15 - 16 October 2015; Program and Abstracts, Berlin

Dähre, K.; Projahn, M.; von Tippelskirch, P.; Orquera, S.; Alter, T.; Friese, A.; Rösler, U. (2015 / Vortrag): **Transmission of ESBL-/AMPC-producing *Enterobacteriaceae* along the entire production chain of broilers**, Proceeding of the XVII International Congress of the International Society for Animal Hygiene “Animal hygiene and welfare in livestock production – the first step to food hygiene” 2015, Košice, Slovakia

von Tippelskirch, P.; Götz, G.; Orquera, S.; Projahn, M.; Dähre, K.; Friese, A.; Rösler, U.; Alter, T. (2015 / Vortrag): **Prävalenz von Extended-Spectrum β -Lactamase und AmpC β -Lactamase-bildenden *Enterobacteriaceae* in der Geflügelkette**, 56. Arbeitstagung des Arbeitsgebiets Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft 2015, Garmisch-Partenkirchen

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. Thomas Alter für die Möglichkeit danken am Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene promovieren zu dürfen, für ein stets offenes Ohr und für die produktive Unterstützung beim Anfertigen dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meiner wissenschaftlichen Betreuerin Dr. Stefanie Orquera, die mich vom ersten Tag an unterstützt hat. Dein Einsatz bei unserer zweiten Probenahme am Schlachthof bleibt unübertroffen. Danke für die fachliche Unterstützung, die ausgezeichnete Zusammenarbeit und vor allem auch für die Korrektur dieser Arbeit. Deine fröhliche, motivierende und im entscheidenden Moment geduldige Art zu jeder Tages- und Nachtzeit hat mir vieles leichter gemacht.

Dr. Greta Gölz danke ich für ihre uneingeschränkte Unterstützung, insbesondere bei der Auswertung der Ergebnisse dieser Arbeit. Vielen Dank für die geduldige Beantwortung meiner unzähligen Fragen, die Hilfe im Labor, die Abendschichten, Deine motivierenden Worte in jeder Lage und für unzählige fachliche und private Gespräche.

Ein großer Dank geht an Dr. Stephan Hühn-Lindenbein für seine Hilfsbereitschaft, die unvergesslichen Fahrten zum Schlachthof und für die Unterstützung bei den Probenahmen und im Labor.

Antje Schönknecht möchte ich für ihre liebe und hilfsbereite Art danken. Vielen Dank für Deine Unterstützung bei der Probenahme, der Arbeit im Labor, der Bewältigung des Arbeitsalltages und für die vielen, auch privaten, Gespräche.

Dr. Josef Kleer danke ich für die Beantwortung unzähliger Fragen, das Verstauen meiner Plattenberge im Kühlschrank, das Gassi gehen und vor allem für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Lebensmittelsicherheit und -hygiene danke ich für die fachliche sowie moralische Unterstützung und unter anderen Kathrin Oeleker für den Einsatz im Labor. Ein großer Dank gilt außerdem Christine Zilk für die Bereitstellung unzähliger Nährböden.

Prof. Dr. Uwe Rösler, Dr. Anika Friese, Michaela Projahn und Katrin Dähre danke ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit im Projekt. Bei Michaela Projahn und Katrin Dähre möchte ich

mich besonders für die Bestimmung der Phylogruppen und die Sequenzierung der Resistenzgene bedanken, aber auch ein Teil der Probenahme wäre ohne Euch nicht möglich gewesen. Bedanken möchte ich mich außerdem bei Dr. Nicole Roschanski für die Hilfe bei der qPCR und Dr. Jayaseelan Murugaiyan für die Hilfe mit der MALDI-TOF. Auch bei allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Tier- und Umwelthygiene bedanke ich mich für die freundliche Hilfsbereitschaft.

Für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Daten bedanke ich mich bei PD Dr. Roswitha Merle und Dr. Laura Pieper.

Weiterhin danke ich dem NRL-Antibiotikaresistenz (BfR) für die Bereitstellung der Bakterienstämme (Positivkontrollen).

Abschließend danke ich meinen Freunden und vor allem meiner Familie. Vielen Dank für das Verständnis in allen Lebenslagen, die uneingeschränkte Unterstützung, den Glauben an mich und die Liebe mit der Ihr mir zur Seite standet.

Vielen Dank an alle, die diese Arbeit möglich gemacht haben!

Diese Arbeit wurde im Rahmen des RESET-Verbundprojektes durchgeführt, welches mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) gefördert wurde.

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 10.11.2017

Philine von Tippelskirch



9 783863 878610

mbvberlin | mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-86387-861-0