

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

**ESBL-/AmpC -bildende Enterobakterien in der Putenmast –
Prävalenz, Bestandskinetik und Transmissionswege**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Helene Morgenstern Lu
Tierärztin aus Rostock

Berlin 2022
Journal-Nr.: 4336



Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

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

© 2022 by Verlag:

Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH, Gießen
Printed in Germany

Cover:

<https://www.shutterstock.com/de/image-photo/escherichia-coli-colonies-test-on-macconkey-526210390>

ISBN 978-3-86345-652-8

1. Auflage 2022

Verlag:

DVG Service GmbH
An der Alten Post 2
35390 Gießen
Tel.: 0641 984446-0
info@divg.de
www.divg.de

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

**ESBL-/AmpC-bildende Enterobakterien in der Putenmast –
Prävalenz, Bestandskinetik und Transmissionswege**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
Helene Morgenstern Lu
Tierärztin
aus Rostock**

Berlin 2022

Journal-Nr.: 4336

**Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler
Erster Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler
Zweite Gutachterin:	Prof. Dr. Annemarie Käsbohrer
Dritter Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Dr. Hafez Mohamed Hafez

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

turkeys, enterobacteriaceae, extended spectrum beta-lactamases, prevalence, emission, antibiotic resistance, animal husbandry, animal production, food safety, public health, disease vectors, disease transmission, germany

Tag der Promotion: 12.10.2022

Für Mama

Inhalt

Inhalt.....	a
Tabellen/Abbildungsverzeichnis.....	c
Abkürzungsverzeichnis.....	e
1. Einleitung.....	1
2. Literatur.....	3
2.1 Extended-Spectrum-Beta-Laktamasen.....	3
2.2 Vorkommen und Bedeutung von ESBL-/AmpC-bildenden Enterobakterien in der Humanmedizin.....	5
2.3 Vorkommen und Bedeutung von ESBL-/AmpC-bildenden Enterobakterien in der Veterinärmedizin und Tierhaltung.....	6
2.4 Reservoirs und Transmission ESBL-/AmpC-bildender Enterobakterien.....	10
3. Material und Methoden.....	17
3.1 Geräte und Computerprogramme.....	17
3.2 Chemikalien, Nährmedien, Lösungen, Puffer.....	19
3.3 Auswahl der Betriebe und Probenahme.....	23
3.3.1 Studiendesign Querschnittsstudie.....	23
3.3.2 Studiendesign Langzeitstudie.....	25
3.4 Fragebogen.....	29
3.5 Labordiagnostische Untersuchungen ESBL-/AmpC-verdächtiger Enterobakterien.....	30
3.6 Statistik.....	35
4. Ergebnisse.....	37
4.1 Betriebszahlen und -aufbau.....	37
4.2 Ergebnisse der Querschnittsstudie.....	39
4.3 Ergebnisse der Langzeitstudie.....	45
5. Diskussion.....	53
5.1 Querschnittsstudie.....	53
5.2 Langzeitstudie und Transmissionswege.....	60
6. Zusammenfassung.....	73
7. Summary.....	75

8. Literaturverzeichnis	77
Anhang.....	105
Publikationen.....	115
Danksagung	117
Finanzierungshilfen	118
Interessenskonflikte.....	118
Selbstständigkeitserklärung.....	119

Tabellen/Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1: Einordnung von (Extended-Spectrum-) Beta-Laktamasen	4
Tabelle 2: Primer für die PCR-Amplifikation.....	21
Tabelle 3: Übersicht der Betriebsauswahl im Rahmen der Querschnittsstudie	24
Tabelle 4: Probenahmeschema der Langzeitstudie	26
Abbildung 1: Luftproben mittels Impingement	27
Abbildung 2: Impingement im Außenbereich mit Wetterstation.....	28
Abbildung 3: Probenahmeschema im Stallumfeld.....	29
Abbildung 4: <i>E. coli</i> typische Kolonien auf MacConkey - Agar	32
Tabelle 5: Bewertung der Hemmhofdurchmesser (IZD) nach CLSI-Richtlinien.....	33
Tabelle 6: Temperatur-Zeit-Programm der Realtime-PCR.....	34
Tabelle 7: Übersicht der Betriebsdaten der 48 Putenmastbetriebe der Querschnittsstudie ...	37
Tabelle 8: Übersicht über die Betriebsdaten der Putenmastbetriebe der Langzeitstudie.....	38
Tabelle 9: Anteil ESBL-/AmpC-positiver Betriebe bzw. Proben von 48 ausgewerteten Betrieben und 460 Proben.....	39
Tabelle 10: Vergleich von Herdenstatus sowie Probenstatus von Aufzucht- und Mastherden bezüglich ESBL-/AmpC-bildender Enterobakterien und <i>E. coli</i>	40
Tabelle 11: Anzahl der positiven und negativen Proben nach Probenmaterial in jedem Betrieb	40
Abbildung 5: Anteil ESBL-/AmpC-bildender <i>E. coli</i> sowie Enterobakterien (EB) in verschiedenen Probenmatrizes	41
Abbildung 6: Stufenweise Ausdifferenzierung am Beispiel <i>E. coli</i>	42
Tabelle 12: Anteil ESBL-/AmpC-bildender an Gesamt - <i>E. coli</i>	43
Tabelle 13: Enzym-Typen der ESBL-/AmpC- <i>E. coli</i> der Querschnittsstudie.....	44

Tabelle 14: ESBL-/AmpC-bildende <i>E. coli</i> in verschiedenen Proben im Stall sowie der Einzeltieruntersuchungen innerhalb der Langzeitstudie zu drei verschiedenen Zeitpunkten (1, 2, 3).....	46
Tabelle 15: Anzahl ESBL-/AmpC-bildender <i>E. coli</i> und Gesamt- <i>E. coli</i> der Einzeltier-Kloakentupfer der sieben Betriebe der Langzeitstudie zu den verschiedenen Zeitpunkten...	48
Tabelle 16: Friedmantest zwecks Varianzanalyse für verbundene Stichproben bei nicht normalverteilten Daten	48
Tabelle 17: ESBL-/AmpC-bildende <i>E. coli</i> in Boden- und Luftproben außerhalb des Stalls sowie von Staub und Luft innerhalb des Stalls zu drei Zeitpunkten im Rahmen der Langzeitstudie	49
Tabelle 18: Enzym-Typen der ESBL-/AmpC- <i>E. coli</i> der Langzeitstudie	52
Abbildung 7: Fragebogen zur Ermittlung betriebsspezifischer Risikofaktoren	105
Tabelle 19: Referenzen zur Ermittlung der Schwerpunkte der Putenhaltungen in den Bundesländern (ohne Stadtstaaten, Rheinland-Pfalz und Saarland)	109
Tabelle 20: Daten der Wetteraufzeichnung im Außenbereich	110
Tabelle 21: Reaktionsansatz der konventionellen PCRs.....	110
Tabelle 22: Parameter für konventionelle PCRs	110
Tabelle 23: Anzahl ESBL-/AmpC-bildender <i>E. coli</i> und Gesamt- <i>E. coli</i> der Umgebungs- und Einzeltierproben der sieben Betriebe der Langzeitstudie zu den verschiedenen Zeitpunkten	111
Tabelle 24: Antibiotikaaanwendung in der Querschnittsstudie	112

Abkürzungsverzeichnis

AmpC	Ampicillinase C-Beta-Laktamase
AB	Antibiotika
AMC	Amoxicillin + Clavulansäure
bla	Beta-Laktamase-Gen
°C	Grad Celsius
CAZ	Ceftazidim
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
CMY	Cephameycinase
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
CA	Clavulansäure
CTX	Cefotaxim
CTX-Clav	Cefotaxim + Clavulansäure
CTX-M	Cefotaxim München Beta-Laktamase
EB	Enterobakterien
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EFSA	European Food Safety Authority
ESBL	Extended-Spectrum-Beta-Lactamase (Beta-Laktamase erweiterten Wirkungsspektrums)
et al.	et alii (und andere)
-F	Forward (vorwärts)
FEP	Cefepim
FOX	Cefoxitin
g	Gramm
H₂O	Wasser
IRT	Inhibitor-resistente TEM
IZD	Inhibition zone diameter (Hemmhof)
KbE	koloniebildende Einheiten
k.A.	Keine Angabe
Lee	windabgewandt
LF	Luftfeuchtigkeit
Luv	windzugewandt
MALDI-TOF-MS	Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry (Matrix-unterstützte Laser Desorption / Ionisation Flugzeit Massenspektrometrie)

Max.	Maximum
MC+	MacConkey-Agar mit Cefotaximzusatz
MC-	MacConkey-Agar ohne Cefotaximzusatz
McF	McFarland
µg	Mikrogramm
Min.	Minute(-n)
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
PBS	Phosphate buffered solution (phosphat-gepufferte Lösung)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
pmol	Picomol
-R	Reverse
RESET	Forschungsverbund „ESBL and fluoroquinolone resistance in <i>Enterobacteriaceae</i> “
rpm	Revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
s	Sekunde(-n)
SHV	Sulfhydryl variable (sulfhydryl variabel)
Spp.	Spezies
ST	Sockentupfer
TEM	Temoniera
Temp.	Temperatur
VIM	Verona-Integron-Metallobetalaktamase
vs.	Versus
WHO	World Health Organization
\bar{x} geom	Geometrisches Mittel
ZP	Zeitpunkt

1. Einleitung

Zum Schutz der Menschheit vor Infektionskrankheiten ist eine interdisziplinäre Zusammenarbeit erforderlich, da unterschiedlichste Fachgebiete gleichzeitig betroffen sind. Die World Health Organization (WHO) listet globale Herausforderungen, mit den sich die Menschheit künftig auseinandersetzen hat, unter dem Titel „Ten Threats To Global Health“ (W.H.O. 2019). Jedes der Themen, unter anderem auch die weltweit zunehmenden Antibiotikaresistenzen, muss vermehrt und gezielt in Angriff genommen werden. Von den Einsatzmöglichkeiten der Antibiotika hängt die erfolgreiche Therapie von schwerwiegenden Erkrankungen ab. Da Antibiotika vielfach sowohl in der Human- als auch in der Tiermedizin eingesetzt werden, kann daher nicht ein Bereich losgelöst von dem anderen betrachtet werden. Um der Problematik der Resistenzen angemessen begegnen zu können, müssen die Humanmedizin, die Tiermedizin und die Umweltwissenschaften fächerübergreifend Hand in Hand zusammenarbeiten und sich als eine Einheit begreifen (Mc Ewen und Collignon 2018). Insbesondere die Schnittstellen zwischen den verschiedenen Reservoirs, den Menschen, Haus- und Wildtieren und den Ökosystemen als deren Lebensraum, stehen im Rahmen dieser Zusammenarbeit im Mittelpunkt des „One Health“ – Ansatzes (Kim und Cha 2021). Da weltweit gesehen der Verbrauch an Beta-Laktam-Antibiotika bei Menschen und Tieren zunimmt und ihre Verwendung durch den selektiven Druck die Prävalenz antibiotikaresistenter Bakterien beeinflusst, besteht hier ein möglicher Ansatzpunkt zur Verringerung des Auftretens von Resistenzen (Chantziaras et al. 2014; Klein et al. 2018). Forschungsergebnisse lassen hoffen, dass eine Reduktion des Antibiotikaeinsatzes positive Effekte auf die jeweilige Resistenzlage hat (Tang et al. 2017; Scott et al. 2018; Huizinga et al. 2019; E.F.S.A. 2021; Randall et al. 2021). Den Antibiotikaverbrauch zu regulieren ist auch notwendig, da der Einsatz von wichtigen Antibiotika in der Tiermedizin zunehmend im Konflikt mit den Therapiemöglichkeiten und der Therapiebedürftigkeit in der Humanmedizin steht (Tang et al. 2017; Aidara-Kane et al. 2018). Auf europäischer Ebene etablieren sich bereits zunehmend vereinheitlichte Strategien, um der Resistenzproblematik zu begegnen (More 2020). Es ist erforderlich, bereits implementierte Überwachungssysteme zum Antibiotikaeinsatz und zum Auftreten von Resistenzen weiter zu standardisieren, um die statistische Verwertbarkeit der Daten zu verbessern und so deren Aussagekraft zu erhöhen (B.V.L. 2015; E.M.A. et al. 2017; Roth et al. 2019). Dazu gehört auch, die Resistenzsituation für jede Form von Resistenz und für jede Tierart getrennt zu betrachten.

Die hier zu betrachtenden Beta-Laktamasen mit erweitertem Wirkungsspektrum (ESBL-/AmpC - **Extended-Spectrum-Beta-Laktamasen** sowie die AmpC-Beta-Laktamasen) gehören zu den bedeutsamsten Ursachen von Antibiotikaresistenz (Bush und Bradford 2016). Bei

vielen Tierarten wurden bereits Studien zur Prävalenz durchgeführt. Auch gibt es Langzeituntersuchungen zum Auftreten der resistenten Bakterien in einer definierten Herde über längere Zeiträume.

Bislang liegen allerdings kaum Daten zum Vorkommen ESBL-/AmpC-bildender Enterobakterien bei Mastputen vor. Ziel des durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft im Rahmen eines Entscheidungshilfebedarf auf Beschluss des Deutschen Bundestags geförderten Projekts war es daher, die Prävalenz ESBL-/AmpC-bildender Enterobakterien bei Mastputen mittels repräsentativer Datenerhebung deutschlandweit zu bestimmen. Darüber hinaus sollten die Einzeltierprävalenzen über eine Mastperiode beobachtet und die Übertragungswege in die Umgebung der Tierhaltungen untersucht werden. Da vergleichbare Daten bei Mastschweinen und Masthühnern aus Langzeit- und Querschnittsstudien bereits verfügbar waren, sollten im nächsten Schritt die erhobenen Daten, mit jenen des durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung geförderten RESET-Forschungsverbundes verglichen werden. Es sollte die Frage beantwortet werden, ob die Kolonisierung der einzelnen Tiere sowie die Kontamination der Tierumgebung vergleichbar sind und ob eine Verbreitung auf ähnlichen Wegen erfolgt. Weiterhin sollten die ESBL-/AmpC-Beta-Laktamase kodierenden Gene der resistenten Enterobakterien, isoliert aus den verschiedenen Proben der Putenmastbetrieben, analysiert werden. Diese Untersuchungen sollen schlussendlich zur Beurteilung der Situation in deutschen, konventionell geführten Putenmastbetrieben hinsichtlich des Vorkommens und der Verbreitung von ESBL-/AmpC-bildenden Enterobakterien beitragen.

2. Literatur

2.1 Extended-Spectrum-Beta-Laktamasen

Bakterielle Infektionserreger entwickeln verschiedene Mechanismen, um die Wirkung antimikrobiell wirkender Arzneimittel zu reduzieren oder zu neutralisieren. Die Wirkungsweise des Antibiotikums beeinflusst dabei, welcher Mechanismus zum Einsatz kommt. Die Bildung von Proteinen zur Inaktivierung der antibiotischen Struktur ist einer der möglichen Mechanismen. Beta-Laktamasen des erweiterten Wirkungsspektrums sind eines der Beispiele für eine enzymatisch vermittelte Form von Resistenz. Da hauptsächlich kommensale Darmbakterien, wie *E. coli*, Träger von Beta-Laktam-Resistenzen sind, bildet das intestinale Mikrobiom ein Reservoir für ihr Überleben. Über menschliche und tierische Ausscheidungen gelangen die Darmbakterien schließlich in die Umwelt und können dort persistieren (Costa et al. 2008; Costa et al. 2009; Hu et al. 2013). Ihre Omnipräsenz unter Menschen, Tieren und in der Umwelt macht sie für die Resistenzforschung zunehmend relevant (Kawamura et al. 2017; Bush 2018; De Angelis et al. 2020; Ramos et al. 2020a). Neben Enterobakterien wird die Bildung von ESBL bei anderen Bakterien eher selten beschrieben. *Pseudomonas aeruginosa* ist eines der wenigen Beispiele (Nordmann und Guibert 1998).

Die Antibiotikaresistenzen in Enterobakterien stellen sowohl in der Human- als auch in der Tiermedizin zunehmend ein Problem dar (Ewers et al. 2012; Tadesse et al. 2012; Delgado-Valverde et al. 2013). Da Beta-Laktam-Antibiotika die am häufigsten eingesetzte Klasse antibakteriell wirksamer Stoffe sind, haben Resistenzen gegen sie eine besondere Bedeutung (Bush und Bradford 2016). Beta-Laktam-Antibiotika wirken durch Hemmung der Peptidoglycansynthese bei der Zellteilung bakterizid. Die Beta-Laktamasen hydrolysieren die Ringstruktur der Beta-Laktame und verhindern so deren Bindung an die bakteriellen Transpeptidase. In der Folge wird die bakterielle Zellwandsynthese nicht mehr gehemmt. (Hou und Poole 1971; Wiedemann et al. 1989). Die Folge ist die weitere Vermehrung, die Ausbildung eines Infektionsgeschehens oder auch eine asymptomatische Kolonisierung des Wirts.

Eine Einteilung der Beta-Laktamasen erfolgte mittels Aminosäuresequenzanalyse zunächst nach ihrer molekularen Struktur in die Klassen A bis D durch Ambler (1980). Bush et al. (1995) kombinierte funktionelle und molekulare Eigenschaften, je nach Hemmbarkeit der Beta-Laktamasen durch Clavulansäure oder EDTA, für eine Einteilung in vier Gruppen. Beispielhaft ist die Einordnung von relevanten Beta-Laktamasen in Tabelle 1 in Anlehnung an die von Bush und Jacoby (2010) unter Berücksichtigung spezifischer Enzymeigenschaften erweiterte Systematik dargestellt. Die Gruppe 1 beinhaltet Cephalosporinasen, die im Gegensatz zu den Penicillinasen (Gruppe 2) nicht durch Clavulansäure gehemmt werden können, wie zum Beispiel die AmpC-Beta-Laktamasen. Nach Erweiterung des Resistenzspektrums, unter

anderem auch gegen die zuvor inhibierende Clavulansäure, erfolgte später eine weitere Unterteilung der Gruppe 2. Die meisten ESBLs sind dieser Gruppe zuzuordnen. Enzyme der Gruppe 3 vermitteln darüber hinaus auch Resistenzen gegen Carbapeneme.

Tabelle 1: Einordnung von (Extended-Spectrum-) Beta-Laktamasen

Beispiel-Enzym	Funktionelle Gruppe	Molekulare Gruppe ¹	Charakteristisches Zielsubstrat	Hemmung durch	Hydrolyseverhalten
				CA ² /EDTA	
CMY-2	1	C	Cephalosporine	Nein/Nein	Hydrolyse bei Cephalosporinen stärker als bei Benzylpenicillin, hydrolysiert Cephamycin
TEM-1	2b	A	Penicilline, frühe Cephalosporine	Ja/Nein	Vergleichbare Hydrolyse bei Benzylpenicillin und Cephalosporinen
SHV-2	2be	A	Extended-spectrum Cephalosporine, Monobactame	Ja/Nein	Verstärkte Hydrolyse von Oxyimino-Beta-Laktamen
CTX-M-1	2be	A	Extended-spectrum Cephalosporine, Monobactame	Ja/Nein	Verstärkte Hydrolyse von Oxyimino-Beta-Laktamen
VIM-1	3a	B	Carbapeneme	Nein/Ja	Breit-Spektrum Hydrolyse inkl. Carbapeneme, aber keine Monobactame

Tabelle 1 ist übersetzt und in Auszügen nach Bush und Jacoby (2010)

¹nach Ambler (1980)

² Clavulansäure

Erstmals wurde ein Beta-Laktamase-bildendes Bakterium in den 60er Jahren isoliert (Datta und Kontomichalou 1965). Mit der Weiterentwicklung der Beta-Laktam-Antibiotika durch Verwendung von Cephalosporinen der dritten und vierten Generation ging eine Erweiterung des Wirkungsspektrums der Beta-Laktamasen durch Mutationen der einzelnen Aminosäuren einher, resultierend in den ESBL-bildenden Bakterien, gegen die auch moderne Beta-Laktam-Antibiotika wirkungslos wurden. Beta-Laktamasen mit erweitertem Wirkungsspektrum wurden erstmals in Europa beschrieben (Knothe et al. 1983; Sirot et al. 1987). Im Folgenden bewirkte die zunehmende Bedeutung der AmpC-Beta-Laktamasen sowie der Carbapenemasen eine weitere Einschränkung der Optionen zur erfolgreichen Therapie von Infektionskrankheiten (Pitout 2012). Der Einsatz von Reserve-Antibiotika wurde notwendig. Resistenztragende Bakterien können als fakultativ pathogene Mikroorganismen sowohl in gesunden Individuen ohne jegliche Symptomatik als auch zum Beispiel im Zusammenhang mit Infektionen des Harnapparates oder des Darms nachgewiesen werden (Ewers et al. 2010; Ewers et al. 2011).

Der Transfer der genetischen Information einer AmpC-/ESBL-Resistenz kann auf unterschiedlichen Wegen erfolgen. Dies erhöht die Anpassungsfähigkeit der resistenten

Bakterien und sichert so ihr Überleben. Wenn es sich um eine Plasmid-vermittelte Kodierung handelt, liegt die Erbinformation in mobiler Form extrachromosomal vor. So kann die genetische Resistenzeigenschaft über einen Austausch durch Konjugation sehr effizient übertragen werden (Knothe et al. 1983; Philippon et al. 1989; Pfeifer et al. 2010; Carattoli 2011). Chromosomale Kodierungen könnten wiederum ein Überdauern der Resistenzeigenschaft in Abwesenheit des selektiven Drucks durch antimikrobielle Stoffe fördern (Guenther et al. 2017). Das chromosomal kodierte AmpC-Gen kann ferner konstitutiv exprimiert und sekundär eine weitere ESBL-Eigenschaft erworben werden (Witte und Mielke 2003). Bakterienstämme können auch Träger verschiedener Resistenzeigenschaften sein (Woodford et al. 2009).

2.2 Vorkommen und Bedeutung von ESBL-/AmpC-bildenden Enterobakterien in der Humanmedizin

In der Humanmedizin hat die Resistenzproblematik besonders im klinischen Alltag an Bedeutung gewonnen. Bei zuvor asymptomatischer Besiedelung können resistente Bakterien bei geschwächten Individuen oder geschädigter Zellbarriere zum Problem werden und führen zum Beispiel zu Infektionen des Blutkreislaufs (Rodríguez-Baño et al. 2010). Eine aktuelle Kohortenstudie zum Antibiotikaverbrauch und zu Entwicklung von Resistenzen auf deutschen Intensivstationen zeigt über einen Zeitraum von 15 Jahren initial zunehmend Resistenzen von *E. coli* und *Klebsiella pneumoniae* gegen Cephalosporine der dritten Generation, dann jedoch stabilisierte sich die Resistenzrate in den letzten drei bis vier Jahren (Remschmidt et al. 2017). ESBL-/AmpC-bildende Enterobakterien wurden nicht nur im klinischen Kontext nachgewiesen, sondern auch in der gesunden allgemeinen Bevölkerung (Machado et al. 2013; Van Hoek et al. 2015). Studien verzeichneten einen Anstieg der Resistenzrate bei gesunden Individuen weltweit in der ersten Dekade des neuen Jahrtausends. Im Vergleich zu Europa waren nicht nur die Prävalenzen, sondern auch die Anstiege der Resistenzrate in weniger entwickelten Regionen wesentlich höher. Die ermittelten Prävalenzen ESBL-/AmpC-bildender Enterobakterien betragen in europäischen Ländern 0,6 bis 7,4%, während sie beispielsweise in Thailand bei 69,3% lag (Woerther et al. 2013; Karanika et al. 2016). Aus den Jahren 2003 bis 2018 wurde kürzlich die kumulative Prävalenz ESBL-bildender *E. coli* in der weltweiten Bevölkerung mit 16,5% bestimmt. Die Prävalenz nahm innerhalb des Studienzeitraumes um ein achtfaches zu und war auch in dieser Studie in Europa vergleichsweise niedrig (6% in Europa vs. 27% in Südostasien) (Bezabih et al. 2021). Die Werte anderer europäischer Prävalenzstudien bewegen sich ebenfalls in dieser Spanne (Valenza et al. 2014; Van Hoek et al. 2015). Bei Menschen treten die ESBLs vom Typ CTX-M-1, -14 und -15 dominant auf. Der am häufigsten nachgewiesene AmpC-Beta-Laktamase-Typ war CMY-2 (Peirano et al. 2014; Valenza et al. 2014; Van Hoek et al. 2015; Reuland et al. 2016).

Der Anstieg der Resistenzraten verdeutlicht den zunehmenden Handlungsbedarf, um die Wirksamkeit antibiotischer Therapien weiterhin zu gewährleisten. Die WHO hat eine Liste besonders relevanter antibiotikaresistenter Bakterien veröffentlicht, um die Forschung und Entwicklung neuer Antibiotika zu initiieren und priorisieren. Enterobakterien, die Resistenzen gegen Carbapeneme und Cephalosporine der dritten Generation zeigen, werden in die Kategorie mit höchster Priorität eingeordnet (W.H.O. 2017). Infektionen mit ESBL-/AmpC-bildenden Enterobakterien erhöhen die Morbidität und Mortalität und verursachen nach wie vor enorme Kosten im Gesundheitssektor, weshalb eine wirksame Intervention gegen die Verbreitung der Resistenzen dringend erforderlich ist (Schwaber und Carmeli 2007; De Kraker et al. 2011; Hu et al. 2019). Um Strategien zur Minimierung von Resistenzen entwickeln zu können, müssen neben dem Menschen verschiedenste Reservoirs in die Betrachtungen mit einbezogen werden. Domestizierte Tiere können als Überlebensraum und bei der Verbreitung von antibiotikaresistenten Bakterien ebenfalls eine Rolle spielen, wenn die Nähe zum Mensch als Tierhalter gegeben ist (Toombs-Ruane et al. 2020; Van Hoek et al. 2020). Neben der Humanmedizin ist also auch die veterinärmedizinische Forschung gefragt, wenn es um das Verständnis des Vorkommens und der Verbreitung von Antibiotikaresistenzen geht.

2.3 Vorkommen und Bedeutung von ESBL-/AmpC-bildenden Enterobakterien in der Veterinärmedizin und Tierhaltung

Der erste Nachweis ESBL-bildender Enterobakterien in der Veterinärmedizin gelang aus Proben, die in Folge einer Harnwegserkrankung eines Hundes gewonnen wurden (Teshager et al. 2000). Die hier bei *E. coli* nachgewiesene Beta-Laktamase war vom SHV-12-Typ. Sofern die resistenten Bakterien erkrankungsassoziiert nachgewiesen wurden, war dies neben Harnwegsinfektionen häufig im Rahmen von Atemwegserkrankungen, Wundinfektionen oder Erkrankungen des Magen-Darmtraktes (Ewers et al. 2011). Aber auch bei völlig gesunden Individuen wurden Resistenzen dokumentiert (Kawamura et al. 2017; Ewers et al. 2021). Bei Nutztieren erfolgte der Nachweis ESBL-bildender Enterobakterien erstmals in Geflügelhaltungen in Spanien (Brinas et al. 2003). Die hier aus Kotproben gesunder Broiler gewonnenen Isolate produzierten die ESBL-Typen CTX-M-14, SHV-12 und CMY. Nach dem ersten Auftreten der ESBLs wurden zunächst vor allem die für sie kodierenden Gene *bla_{SHV}* und *bla_{TEM}* nachgewiesen. Seit der ersten Dekade des neuen Jahrtausends sind jedoch Isolate, welche ESBLs vom CTX-M-Typ produzieren, wesentlich verbreiteter (Cantón et al. 2008; Dierikx et al. 2010). Neben *bla_{CMY}*, welche von Bauernfeind et al. (1989) erstmals beschrieben wurde, sind die Gene *bla_{CTX.M}*, *bla_{TEM}* und *bla_{SHV}* am bedeutsamsten. Insgesamt erlangten ESBL-/AmpC-bildende Enterobakterien zunächst zunehmend an Bedeutung hinsichtlich des Vorkommens bei lebensmittelliefernden Tieren (Aarestrup 2005) und Heimtieren (Carattoli et al. 2008; Ewers et al. 2011; Ewers et al. 2012; Rubin und Pitout 2014).

Neuere vergleichende Studien zur Resistenzlage von *E. coli* bei Tieren und Menschen in Europa sehen aktuell einen sinkenden Trend in den Resistenzen (Bourély et al. 2020) oder bei lebensmittelliefernden Tieren eine Stabilisierung bei Resistenzen gegen Cephalosporine der dritten Generation, sinkend bei Amoxicillin-Resistenzen (Boireau et al. 2018) oder gar verbreitet signifikant sinkende Prävalenzen ESBL-/AmpC-bildender *E. coli* (E.F.S.A. 2021). Auch von einer signifikant steigenden Anzahl vollständig sensibler *E. coli* wurde berichtet (E.F.S.A. 2021). Ob die Verbesserung der Resistenzlage bei Tieren letztendlich auch einen Einfluss auf die Prävalenz antibiotikaresistenter Bakterien beim Menschen hat, ist nicht klar, es scheint jedoch wahrscheinlich bei direkter Exposition des Menschen mit dem Nutztier (Tang et al. 2017). Die neueren Forschungsergebnisse lassen jedoch zumindest vermuten, dass regionale und auf bestimmte antimikrobielle Stoffe begrenzte Antibiotikaminimierungskonzepte mit dem Zweck der Reduktion des Auftretens von Resistenzen in lebensmittelliefernden Tieren erfolgreich sind (Huizinga et al. 2019; E.F.S.A. 2021; Randall et al. 2021).

Die Publikationen konzentrieren sich häufig auf kommensale *E. coli* als Indikatorkeim zur Studie von Resistenzen bei gram-negativen Bakterien, Prävalenzermittlung und Etablierung eines Frühwarnsystems (Kaesbohrer et al. 2012; E.F.S.A. 2021). Auf Grund der großen Heterogenität der Resistenzüberwachungsprogramme sind die Studien nur bedingt miteinander vergleichbar (Schrijver et al. 2018).

Bei **Heimtieren** wurde im weltweiten Vergleich von Prävalenzen der ESBL-*E. coli* großer Bandbreite berichtet, die insgesamt jedoch eher niedrig ausfallen (0,63 – 16,56% bei Hunden, 0 – 16,82% bei Katzen) (Salgado-Caxito et al. 2021). Die Häufigkeiten bei Katzen und Hunden unterschieden sich hierbei nicht signifikant voneinander und zeigten über den die Metastudie umfassenden Zeitraum von 2000 bis 2020 zudem auch keinen Anstieg. Bei einer insgesamt beachtlichen Diversität dominierten einige wenige ESBL-Gene und Sequenztypen. ESBLs vom Typ CTX-M-15 sowie SHV-12 wurden beispielsweise auf allen Kontinenten gefunden. Der Entwicklungsstand eines Landes scheint mit der Prävalenz von ESBL-/AmpC-bildenden Enterobakterien analog zu den Ergebnissen in der Humanmedizin im Zusammenhang zu stehen (Bezabih et al. 2021; Salgado-Caxito et al. 2021). In Entwicklungsländern sind nicht nur die höchsten Prävalenzen, sondern auch die gravierendsten Anstiege der Antibiotikaresistenzraten allgemein und im speziellen bei ESBL-bildenden *E. coli* bei Hunden und Katzen zu verzeichnen (Van Boeckel et al. 2019; Salgado-Caxito et al. 2021).

Bei den lebensmittelliefernden Tieren liegen die ermittelten Prävalenzen der ESBL-/AmpC-bildenden Enterobakterien teils sehr weit auseinander, wobei zahlreiche Studien aus der ganzen Welt zu diesem Thema verfügbar sind. Publikationen zum Vorkommen ESBL-/AmpC-bildender Enterobakterien bei **Equiden** sind im Vergleich zu den anderen hier betrachteten Tierarten eher unterrepräsentiert. Teils war die Nachweisrate ESBL-/AmpC-bildender

Enterobakterien auf individueller Ebene mit 84% hoch (Johns et al. 2012; Apostolakos et al. 2017), teils fiel die Prävalenz mit 7,3% resp. 6,3% eher niedrig aus (Maddox et al. 2012; De Lagarde et al. 2020). In Prävalenzstudien in den Niederlanden bzw. in Kanada war die Prävalenz mit 11% bzw. 12% nur wenig höher (Hordijk et al. 2020; Shnaiderman-Torban et al. 2020). Es wurden auch in der direkten Umgebung der Tiere resistente Bakterien nachgewiesen. Die Typen CTX-M-1 und CTX-M-2 traten bei Equiden gehäuft auf (Apostolakos et al. 2017; De Lagarde et al. 2019), jedoch wurde auch CMY-2 detektiert (De Lagarde et al. 2020).

Prävalenzstudien bei **Wiederkäuern** konzentrieren sich, gemäß ihrer relativen Bedeutung als Nutztier, meist auf Rinder. Querschnittsstudien zum Vorkommen bei ESBL-/AmpC-bildender Enterobakterien bzw. *E. coli* bei Rindern ergaben auf Probenebene teils niedrige Prävalenzen von 13,7% in der Schweiz (Geser et al. 2012), teils moderate Prävalenzen von 32,8% im Raum Bayern in Deutschland (Schmid et al. 2013). Auf Betriebsebene ergab die Untersuchungen von Schmid et al. (2013) eine sehr hohe Prävalenz von 86,7%. Das für ESBLs kodierende Gen *bla_{CTX-M-1}* wurde am häufigsten gefunden, neben *bla_{CMY-2}*, letzteres jedoch nur in niedriger Prävalenz. Die Resistenzlage scheint in Abhängigkeit vom Antibiotikaeinsatz bei Mastrindern und Schafen günstiger auszufallen als bei Milchrindern (Hille et al. 2017; Tello et al. 2020) und im Allgemeinen meist niedriger als bei Schweinen und Geflügel (Tello et al. 2020). Kälber scheiden häufiger und in größerer Menge ESBL-/AmpC-bindende *E. coli* aus als ältere Tiere (Heuvelink et al. 2019).

Im europäischen Vergleich wurde ein Anstieg der Prävalenz ESBL-bildender *E. coli* bei **Schweinen** in den letzten zehn Jahren verzeichnet (Bergšpica et al. 2020). Die Prävalenz ESBL-/AmpC-bildender Enterobakterien bei Schweinemastbetrieben in Deutschland ergab eine Prävalenz von 85% (Hering et al. 2014). Die Studie wurde als Teilprojekt des Forschungsverbundes RESET durchgeführt. Während des RESET I – Projektes wurde die Prävalenz ESBL-/AmpC-bildender *E. coli* erstmals deutschlandweit bestimmt, mit dem Ziel das Vorkommen resistenter Enterobakterien bei Nutztieren, bei Lebensmitteln und beim Menschen systematisch zu untersuchen, Verbreitungswege zu erkennen und so das Gefährdungspotenzial für die öffentliche Gesundheit abzuschätzen.

Neben den Prävalenzstudien sind auch diverse Langzeituntersuchungen zu Nutztieren verfügbar. Unter anderem wurden diese auch durch den RESET – Verbund initiiert (RESET II). Eine Langzeitstudie zum Vorkommen ESBL-/AmpC-bildender *E. coli* bei Mastschweinen in Deutschland ergab zu den drei Beprobungszeitpunkten eine moderate Einzeltierprävalenz von 37% (Von Salviati et al. 2014). Der quantitative Nachweis ESBL-/AmpC-bildender *E. coli* ergab einen Abfall der Zellzahlen über die Mastperiode hinweg, analog zu den Ergebnissen von Hansen et al. (2013). In einer niederländischen Langzeitstudie bei Schweinezucht- und -mastbetrieben sank die Anzahl der auf ESBL-bildende *E. coli* positiv getesteten Betrieben im

Untersuchungszeitraum und auch die Anzahl der positiven Proben halbierte sich. Auf die einzelnen Betriebe bezogen, entwickelte sich die Prävalenz unterschiedlich. Als Einflussfaktoren auf die Prävalenz wurden ein Cephalosporin-Einsatz in den Herden, die Herkunft des Tränkewassers und Hygieneaspekte ermittelt. Die ESBL-Typen CTX-M-1, TEM-52 und CTX-M-14 dominierten (Dohmen et al. 2017). Eine weitere dänische Studie ermittelte ebenfalls eine Reduktion in der Prävalenz über den Untersuchungszeitraum hinweg (Hansen et al. 2013).

Die Antibiotikaresistenzlage wird in vielen Ländern mit hoher Dichte an **Geflügelhaltungen** überwacht, jedoch ist eine Bewertung der Datenlage angesichts der Vielfalt der Überwachungsmethoden des Antibiotikaverbrauchs, Detektionsverfahren bei den Resistenzen und der variierenden Probenanzahl schwierig (Kaesbohrer et al. 2012; Roth et al. 2019). Weltweit wurden in zahlreichen Studien die Prävalenzen ESBL-/AmpC-bildender Enterobakterien bei Masthühnern ermittelt. Im Rahmen des RESET I-Projektes konnte flächendeckend eine hohe Verbreitungsrate der resistenten Bakterien bei Masthühnern nachgewiesen werden (Hering et al. 2016). Auch andere Studien bestätigen die sehr hohen Prävalenzen in Hühnerhaltungen auf Herdenebene. Die dominant auftretenden ESBL-/AmpC-Typen waren CMY-2, CTX-M-1, SHV-12 und TEM-52 (Machado et al. (2008); Costa et al. (2009); Ewers et al. (2012); Geser et al. (2012); Dierikx et al. (2013a); Friese et al. (2013a); Day et al. (2016a); Saliu et al. (2017a); Ceccarelli et al. (2019); Gundran et al. (2019); Ewers et al. (2021)). In Deutschland, Frankreich und Italien scheinen die Prävalenzen ESBL-bildender *E. coli* beim Geflügel im Vergleich zu Schweinen und Rindern allgemein deutlich höher zu sein. Dies scheint jedoch weltweit zu differieren (Ramos et al. 2020b; Ibekwe et al. 2021). In den Niederlanden konnte zwischen den Jahren 2014 und 2017 eine signifikante Reduktion der Prävalenz ESBL-/AmpC-bildender *E. coli* von 67,3% auf 32,6% positiver Proben beobachtet werden (Ceccarelli et al. 2019).

Longitudinale Untersuchungen des RESET II - Projektes bei Broilern ergaben hohe Prävalenzen in den Tierproben, jedoch auch in Stallumgebungs-, Staub- und Luftproben. Die resistenten Keime wurde hier bereits in Einzeltierproben der Eintagsküken in den ersten Tagen der Einstellung nachgewiesen und ebenso wie in den Umgebungsproben. Die Prävalenz stieg im Laufe der Mastperiode, ebenso wie die Anzahl der positiven Umgebungsproben. Es wurde überwiegend der AmpC-Beta-Laktamase Typ CMY-2 nachgewiesen (Laube et al. 2013; Laube et al. 2014). Auch andere Langzeituntersuchungen innerhalb einer Aufstallungsperiode von Mast- bzw. Elterntierherden ergaben hohe Prävalenzen bereits zur Einstellung und anschließend einen Abfall der Prävalenz z.T. sogar unter die Detektionsgrenze, während in der Umgebung kontinuierlich ESBL-/AmpC-bildende *E. coli* nachgewiesen wurden (Dame-Korevaar et al. 2017; Van Hoek et al. 2018; Apostolakos et al. 2019).

Bei der Tierart **Pute** existieren bislang keine systematischen Querschnittsuntersuchungen zu der Verbreitung von ESBL-/AmpC-bildenden Enterobakterien in Deutschland bzw. ihre Prävalenzentwicklung innerhalb einer Mastperiode. Wenige europäische Studien berichten mit einer großen Bandbreite der Prävalenzen von der Verbreitung ESBL-/AmpC-bildender Enterobakterien in Großbritannien mit 5,2 % bei Masthühnerherden (Randall et al. 2011), 20% in der Tschechischen Republik (Dolejska et al. 2011) oder in Polen mit 48% ESBL-verdächtigen Herden (Wasyl et al. 2012). In einer finnischen Studie von Päivärinta et al. (2016) zur Verbreitung ESBL-/AmpC-bildender *E. coli* bei lebensmittelliefernden Tieren wurden in keiner der 35 von Puten stammenden Proben resistente Keime nachgewiesen. Eine italienische Studie zu klinischen *E. coli*-Isolaten ergab eine niedrige Prävalenz ESBL-/AmpC-bildender *E. coli* von 7% bei Puten (Niero et al. 2018). Insgesamt ist die Prävalenz bei diesen bisher durchgeführten Studien wesentlich niedriger im Vergleich zur Situation beim Masthähnchen. Bei Randall et al. (2011) traten hauptsächlich die ESBL-Typen CTX-M-1 und -M-14 auf. Wissenschaftler aus den Niederlanden wiesen kürzlich die dominierenden Typen SHV-12 und CTX-M-1 nach und in geringeren Anteilen CMY-2, CTX-M-32 und CTX-M-15 (Ceccarelli et al. 2019). Der jährliche Bericht zur Resistenzlage bei Menschen, Tieren und Lebensmitteln der European Food Safety Authority schildert in der Studienperiode von 2014 bis 2018 zwar insgesamt hohe Prävalenzen, jedoch signifikant sinkende Trends bei Ampicillinresistenzen in Putenmastbetrieben in 11 Ländern der Europäischen Union (E.F.S.A. 2021). Die Resistenzlage bei Cefotaxim und Ceftazidim ist auf niedrigem Level stabil (2,0% resp. 1,9%).

2.4 Reservoirs und Transmission ESBL-/AmpC-bildender Enterobakterien

Das Thema Antibiotikaresistenz berührt einerseits die belebten Reservoirs, wie Menschen und Tiere, aber auch andererseits spielen die unbelebten Überlebensräume eine Rolle. Neben den Tieren, die der Lebensmittelgewinnung dienen, sind auch ihre Produkte als Quelle und Vektor bei der Verbreitung von Resistenzen von Bedeutung (Plaza-Rodríguez et al. 2021). Ein weiteres Reservoir wird durch die Umwelt gebildet, die sowohl als Überlebensraum dient, aber auch als Transmissionsweg fungieren kann, zum Beispiel durch bewegtes Oberflächenwasser (Fagerström et al. 2019). Hygienemaßnahmen, die einen Einfluss auf den potenziellen Transfer von Resistenzen durch Unterbrechung von Transmissionswegen zwischen den Reservoirs haben können, werden so als Möglichkeit der Intervention interessant.

Es wurden bereits verwandte Isolate in **Mensch, Tier und Umwelt** gefunden, die eine Zirkulation zwischen den Reservoirs vermuten lassen (Falgenhauer et al. 2016). Auch Tiere stehen im mikrobiellen Austausch mit ihrer Umgebung. Im Ergebnis einer Langzeitstudie bei in Freiland gehaltenen Mastkälbern aus den USA wurde zum Beispiel eine umweltbedingte

Transmission ESBL-bildender Bakterien über das Grünfutter vermutet (Mir et al. 2018). Diverse aquatische Habitats können ebenfalls als Überlebensraum für resistente Bakterien relevant sein. Nicht nur Abwässer und Kläranlagen konnten als Reservoir für ESBL-bildende *E. coli* identifiziert werden (Hocquet et al. 2016; Jiang et al. 2019; Makowska et al. 2020), auch in natürlicher aquatischer Umgebung und sogar in der Antarktis wurden ESBL-Bildner detektiert (Amaya et al. 2012; Hernández et al. 2012; Zurfluh et al. 2013; Nnadozie und Odume 2019; Hooban et al. 2020). Ebenso wurde in Abwässern aus Schlachthöfen eine Belastung mit antibiotikaresistenten Bakterien nachgewiesen (Savin et al. 2020; Greenpeace 2021). In Schweden und Deutschland ermittelten die Wissenschaftler eine enge Verwandtschaft zwischen ESBL-bildenden *E. coli* aus Oberflächenwasser und klinischen Isolaten menschlichen Ursprungs (Fagerström et al. 2019; Falgenhauer et al. 2021). Auch vergleichende molekularbiologische Analysen von Isolaten menschlichen Ursprungs, von Schweinen und aus Oberflächenwasser ergaben genetische Übereinstimmungen, die für einen Austausch zwischen den Kompartimenten sprechen. Die in der Umwelt nachgewiesenen Beta-Laktam-Resistenzen könnten also gleichermaßen menschlichen und tierischen Ursprungs sein (Hu et al. 2013). Antibiotikaresistente Bakterien werden zwar regelmäßig in der Umwelt detektiert, eine Transmission zwischen Umwelt und Mensch konnte bislang jedoch noch nicht bewiesen werden (Huijbers et al. 2015).

Die belebten Anteile aquatischer Reservoirs sind von der anthropogenen Verbreitung der Resistenzen betroffen, wie der Nachweis resistenter Enterobakterien bei **Meeressäugern** (Grünzweil et al. 2021) und bei **Fischen** aus Aquakultur (Jiang et al. 2012) zeigt. Gleichermaßen können auch terrestrisch lebende wilde Tiere als Vektoren für die Verbreitung von Resistenzen dienen. Ratten sind beispielsweise mit multiresistenten *E. coli* besiedelt und können so zu deren Transmission in andere Reservoirs beitragen (Guenther et al. 2012b). Bei **Wildtieren und -vögeln** sind ESBL-/AmpC-Bildner in unterschiedlichen Prävalenzen präsent (Costa et al. 2006; Stedt et al. 2015; Plaza-Rodríguez et al. 2020), weshalb ihre Funktion als Reservoir und Vektor bei der Übertragung von Antibiotikaresistenzen berücksichtigt werden sollten (Wang et al. 2017; Dolejska und Papagiannitsis 2018). Eine Studie zum Auftreten ESBL-bildender *E. coli* bei verschiedenen Wildtieren in Portugal und Spanien offenbarte die ESBL-Gene *bla_{CTX-M-14}*, *bla_{CTX-M-1}* und *bla_{SHV-12}*, teilweise in Kombination mit *bla_{TEM-52}* (Cristóvão et al. 2017). Dies überschneidet sich mit den Ergebnissen von Plaza-Rodríguez et al. (2020), in denen bei einer Speziesvariation noch *bla_{CTX-M-15}* zu finden war, jedoch nicht *bla_{SHV-12}*. Dieser war zuvor bereits bei Wildvögeln nachgewiesen worden (Guenther et al. 2010). Bei Wildtieren scheint in räumlicher Nähe zu menschlichen Siedlungen das Risiko einer Besiedelung mit ESBL-/AmpC-bildender Enterobakterien höher zu sein (Parker et al. 2016; Swift et al. 2019). Eine anthropogene (bspw. über Abwässer) oder durch domestizierte Tiere verursachte Transmission auf Wildtiere ist also denkbar (Wang et al. 2017). In einigen Studien wurden verwandte Bakterienstämme bei Wildvögeln und menschlichen Isolaten gefunden (Bonnedahl

et al. 2009; Hernandez et al. 2013; Dorado-Garcia et al. 2018). Die Rolle der Wildtierpopulation als Reservoir wird dennoch kontrovers diskutiert (Radhouani et al. 2014; Plaza-Rodríguez et al. 2020). Es wird vermutet, dass auch artspezifisches Verhalten und die Flugrouten bei Zugvögeln als prävalenzbeeinflussende Faktoren zu berücksichtigen sind (Guenther et al. 2012a).

Werden die **Verwandtschaftsverhältnisse** von Isolaten unterschiedlichsten Ursprungs im direkten menschlichen Umfeld betrachtet, bestätigt sich, dass eine Form von Austausch zwischen den Reservoirs stattfinden muss. Leverstein-Van Hall et al. (2011) ermittelten in ihrer Studie geflügelassoziierte ESBL-Typen, meist CTX-M-1 und TEM-52, in 35% der Isolate menschlichen Ursprungs. 19% dieser Isolate wiederum wiesen gar den gleichen Sequenztyp des Plasmids auf. Auch Overvest et al. (2011) wiesen übereinstimmende ESBL-Gene im menschlichen Darm und in Geflügelfleisch nach. Im Gegensatz hierzu schlussfolgerten Wissenschaftler in anderen Studien weniger Ähnlichkeit zwischen Isolaten aus menschlichen Stuhl- und Geflügelproben (Randall et al. 2011). Übereinstimmende ESBL-Sequenztypen in menschlichen Proben, Tieren und der Umwelt sprechen zwar für einen Austausch zwischen den Reservoirs (Hu et al. 2013) und die Resistenzlage antibiotikaresistenter *E. coli* bei lebensmittelliefernden Tieren scheint sich in ihren Fleischprodukten wiederzufinden (Käsbohrer et al. 2013), jedoch kann das Risiko einer Übertragung durch den Fleischkonsum trotz der teilweise hohen Belastung mit ESBL-Bildnern noch nicht abschließend eingeschätzt werden (Evers et al. 2017). Wahrscheinlich spielt jedoch die direkte Transmission über Fleisch eine geringere Rolle, als bisher vermutet (Carmo et al. 2014). Die Herausforderung ist hierbei, zwischen einer direkten Übertragung und einer Übertragung durch mobile Elemente zu unterscheiden (Kluytmans et al. 2013). Trotz umfangreicher Studien zur genetischen Vielfalt resistenter Bakterien in den verschiedenen Reservoirs sind die tatsächlichen Übertragungswege noch nicht vollends verstanden (Bonten und Mevius 2015). Wahrscheinlich ist der horizontale Transfer von Resistenzen für ihre Verbreitung bedeutsamer als eine etwaige klonale Transmission (Hu et al. 2016). Unter näherer Betrachtung der verschiedenen Charakterisierungsmethoden ist ein bloßer Vergleich der Gen-, Sequenztypen und Phylogruppen nur bedingt geeignet, die Verwandtschaftsgrade von Bakterienstämmen unterschiedlicher Herkunft zu beschreiben. Die Ganzgenomanalyse wird diesbezüglich als zukunftsweisend angesehen (De Been et al. 2014; Wee et al. 2020). Vielfach wurde der Verwandtschaftsgrad der Isolate mittels Multi-Lokus-Sequenztypisierung ermittelt. Demgegenüber ist die in neueren Studien üblicherweise verwendete Ganzgenomsequenzierung die überlegenere Methode, beispielsweise auch für epidemiologische Ermittlungen in klinischen Ausbruchsszenarien (Lazarus et al. 2015; Kluytmans-Van Den Bergh et al. 2016). Sie findet zunehmend als Standardmethode Verwendung (Aerts et al. 2019).

Lebensmittel tierischen Ursprungs können eine Funktion als Vehikel für resistente Bakterien erfüllen, da zum Beispiel die Fleischproduktion zur Lebensmittelgewinnung eine Verbindung zwischen den Reservoirs Tierhaltung und Mensch schaffen kann. In einer umfangreichen Studie wurden verschiedene Lebensmittel tierischen Ursprungs auf das Vorkommen ESBL-/AmpC-bildende Enterobakterien hin untersucht (Kaesbohrer et al. 2019). Der regelmäßige Fund der resistenten Bakterien verdeutlicht das potenzielle Risiko einer Transmission durch Exposition des Verbrauchers. Besonders Hühner- und Putenfleisch waren in den Untersuchungen hoch belastet (74,9% resp. 40,1%). Im Vergleich zu Hähnchenfleisch scheint Schweine- und Rindfleisch deutlich weniger mit ESBL-/AmpC-bildenden *E. coli* belastet zu sein. Der ESBL-Typ CTX-M-1 dominierte bei allen Fleischarten (Carmo et al. 2014; Randall et al. 2017). Viele weitere Studien beschäftigten sich ebenfalls mit dem Vorkommen ESBL-/AmpC-bildender *E. coli* in Puten- und Hühnerfleisch mit häufigem Nachweis der Gene *bla_{CTX-M-1}* und *bla_{SHV-12}* (Egea et al. 2012; Huizinga et al. 2019). Zwischen 2009 und 2014 konnten hier Huizinga et al. (2019) eine Reduktion der Kontamination von Geflügelfleisch mit ESBL-bildenden Enterobakterien in den Niederlanden nachweisen und führten das auf die Reduktion des Antibiotikaeinsatzes zurück. Analog zu den Forschungsergebnissen in den Niederlanden verzeichnete eine Gruppe von Wissenschaftlern im Vereinigten Königreich zwischen 2013 und 2018 einen massiven Rückgang des Nachweises ESBL-/AmpC-bildender *E. coli* in Hähnchenfleisch von 65,4 auf 7,4% (Randall et al. 2017; Randall et al. 2021), vermutlich ebenfalls infolge des verminderten Antibiotikaeinsatzes. Allgemein scheint sich die Prävalenz antibiotikaresistenter Bakterien bei einer Tierart sich später auch in ihrem Produkt niederzuschlagen, so dass sich mit der Prävalenz bei einer Tierart auch die Prävalenz im Fleisch entsprechend ändert (Ceccarelli et al. 2019; Bergšpica et al. 2020).

Bei einer Kontamination von Lebensmitteln mit resistenten Bakterien besteht das Risiko, dass Resistenzeigenschaften auf pathogene Keime, wie beispielsweise *Salmonella ssp.*, übertragen werden (Winokur et al. 2001). In Italien konnte beispielsweise ein Zusammenhang zwischen ESBL-produzierenden Salmonellen und humanen Magen-Darm-Infektionen dargestellt werden, deren Ursprung bei Hühnern und in Hühnerfleisch zu finden war (Franco et al. 2016). So stellt jedes Vorkommen ESBL-/AmpC-bildender Bakterien, zum Beispiel im Reservoir Lebensmittel, durch den potenziellen Transfer von Resistenzen auf den Menschen eine latente Gefahr für die öffentliche Gesundheit dar. Die Einhaltung von Hygienestandards ist daher bereits in der Primärproduktion von Lebensmitteln und in der weiteren Verarbeitung wichtig, um das Risiko einer Kontamination zu minimieren. Die Fleischhygiene und -zubereitung hat beispielsweise einen großen Einfluss auf die Nachweishäufigkeit resistenter Bakterien (Plaza-Rodríguez et al. 2021).

Alle domestizierten Tiere sind zweifelsohne als Reservoir für resistente Bakterien relevant. Es wird allerdings kontrovers diskutiert, ob beispielsweise Nutztiere auf der Stufe der

Primärproduktion von Lebensmitteln eine Quelle mit unmittelbarem Transmissions- und Infektionspotenzial für den Menschen sein können (Vieira et al. 2011; Aarestrup 2015; Lazarus et al. 2015; Day et al. 2016b; Huang et al. 2020). Es scheint, dass die Übertragung von Mensch zu Mensch im Vergleich zu der **Tier-Mensch-Transmission** wahrscheinlicher ist (Ewers et al. 2012; Wu et al. 2013; Mughini-Gras et al. 2019; Martischang et al. 2020). Da jedoch bei Landwirten und ihren Tieren vereinzelt identische Sequenz- und Plasmidtypen nachgewiesen werden konnten, scheint der Nutztierbestand zumindest bei räumlicher Nähe auch für Menschen als Reservoir relevant zu sein. Dieser Zusammenhang wurde vornehmlich bei Masthühnern und Schweinen beobachtet (Dierikx et al. 2013a; Hammerum et al. 2014; Huijbers et al. 2014; Dahms et al. 2015; Dohmen et al. 2015; Dorado-García et al. 2018). Van Hoek et al. (2020) wiesen via Ganzgenomsequenzierung klonale als auch horizontale Transmission bei Geflügel, Geflügelhaltern und weiteren Haushaltsmitgliedern nach. Ähnliche Schlussfolgerungen zogen auch De Been et al. (2014), die eine direkte Übertragung bei Schweinehaltern und ihren Tieren beweisen konnten. Für das betreuende Personal in Geflügelbeständen wurde einerseits die Art des Kontakts zu den Tieren, aber auch die Anzahl der Arbeitsstunden sowie die Ausstattung mit persönlicher Schutzausrüstung als Risikofaktor für eine Besiedelung mit ESBL-bildenden Bakterien identifiziert (Franceschini et al. 2019). Tatsache ist auch, dass die Prävalenz bei Geflügel- und Schweinehaltern höher ist als bei der allgemeinen Bevölkerung (Dierikx et al. 2012). Die Haltereigenschaft scheint also das Vorkommen resistenter Bakterien zu beeinflussen. Eine direkte Übertragung von geflügelassoziierten Resistenzträgern auf den Menschen über die Lebensmittelkette wird jedoch als unwahrscheinlich eingeschätzt.

Auch in **privaten Haushalten** können verschiedene Transmissionswege resistenter Bakterien betrachtet werden. Bei Heimtieren beispielsweise wurden mit menschlichen Isolaten übereinstimmende Sequenztypen gefunden, die für eine klonale Transmission resistenter Bakterien zwischen ihnen und ihren Haltern sprechen (Ewers et al. 2010). Die Haustier-Mensch-Übertragung wurde an anderer Stelle durch vertiefte Analyse mittels Ganzgenomsequenzierung verifiziert (Toombs-Ruane et al. 2020; Schmitt et al. 2021; Yasugi et al. 2021). Eine hohe Viehdichte um den Wohnort allein scheint jedoch ohne einen direkten Mensch-Tier-Kontakt keinen Einfluss auf die Prävalenz ESBL-/AmpC-bildender Enterobakterien in der allgemeinen Bevölkerung zu haben (Huijbers et al. 2013; Van Hoek et al. 2015; Wielders et al. 2017). Bestätigt wird dies dadurch, dass Vergleiche zwischen Isolaten aus Nutztierbeständen und der allgemeinen Bevölkerung bzw. klinischen Isolaten ebenfalls wenig Übereinstimmung ergaben (Dorado-García et al. 2018; Ludden et al. 2019).

Korrespondierend mit dem Nachweis ESBL-/AmpC-bildender Enterobakterien in Nutztierbeständen erfolgt sowohl eine **fäkale als auch luftgetragene Transmission** in die Umgebung von beispielsweise Geflügel- und Schweinemastbeständen (Friese et al. 2013a;

Laube et al. 2014; Von Salviati et al. 2015). Es wurden Fliegen als Vektor identifiziert und auch ein Aufrag resistenter Bakterien über die Gülle spielt eine Rolle. Noch ein Jahr nach dem Düngen wurden ESBL-bildende *E. coli* auf Feldern nachgewiesen (Hartmann et al. 2012). Offenbar persistieren sie auch ohne selektiven Druck durch Antibiotikagabe, verbreiten sich vektorvermittelt und gelangen so z.B. auch auf andere Ebenen der Produktionskette, wie es beim Geflügel bereits nachgewiesen wurde (Projahn et al. 2018a). Die Verbreitung ESBL-/AmpC-bildender Enterobakterien wurde vielfach auch auf den weiteren Stufen der Geflügelproduktion untersucht, wobei sich die Transmissionswege komplex darstellen (Dierikx et al. 2013b; Zurfluh et al. 2014; Projahn et al. 2017; Saliu et al. 2017b; Apostolakos et al. 2019; Dame-Korevaar et al. 2019). Es wurde nachgewiesen, dass bei positiven Herden die Stallungen bereits vor Einstallung kontaminiert waren, ebenso wie die Transportmittel (Projahn et al. 2017; Daehre et al. 2018; Van Hoek et al. 2018). Die indirekte Übertragung von resistenten Stämmen über die Produktionsstufen hinweg, wie von Brüterei zu Stall und Stall zu Stall, mittels Vektoren wie Transportmittel, Ausrüstung und Personal spielt eine Rolle und weist auf die Wichtigkeit von Biosicherheitsmaßnahmen zur Unterbrechung der Übertragungswege hin (Apostolakos et al. 2020). Auch die Anzahl der ursprünglichen Elterntierherden und der ESBL-Status der vorher eingestellten Herde konnten beispielsweise als Risikofaktoren für den ESBL-Status einer Herde identifiziert werden (Mo et al. 2016b). Es wird vermutet, dass die Besiedelung der Masthühner mit resistenten Erregern verursacht durch kontaminierte Umgebung gegenüber dem selektiven Druck durch antibiotische Behandlung die bedeutendere Rolle einnimmt (Hiroi et al. 2012). Bekräftigt wird dies durch die Tatsache, dass auch solche Masthühnerherden positiv auf ESBL-/AmpC-bildende *E. coli* getestet wurden, die keine antimikrobiellen Stoffe erhalten hatten, in deren Umgebung jedoch jene Resistenzträger persistierten (Huijbers et al. 2016).

Die Kolonisierung der Tiere mit ESBL-/AmpC-bildenden Bakterien geht mit einer Emission der resistenten Bakterien in ihrer Umgebung einher (Laube et al. 2014). Dies fördert ebenso die Verbreitung von Resistenzen wie eine hohe Prävalenz in den Tierhaltungen auf Betriebsebene (Saliu et al. 2017a). Beispielsweise zu Masthühnern sind bezüglich dieser Themen bereits umfangreiche Daten verfügbar. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die Untersuchung des Vorkommens von ESBL-/AmpC-bildenden Enterobakterien in den Tierhaltungen, ihrer Emission in die Umwelt und der Einflussfaktoren zum ganzheitlichen Verständnis der Transmissionswege und der Dynamiken innerhalb der Reservoirs von großer Bedeutung sind.

3. Material und Methoden

3.1 Geräte und Computerprogramme

Geräte

Es wurden folgende Geräte verwendet:

15-well comb and comb holder	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Analysewaage	Faust Lab Science GmbH (Klettgau)
Dräger Handbalgpumpe	C.A.Loewe GmbH & Co.KG (Berlin)
Dräger Röhrchen Öffner	C.A.Loewe GmbH & Co.KG (Berlin)
Elektrophorese-Kammer	CompactM; Biometra GmbH (Göttingen)
Funk-Wetterstation mit Datenlogger	Oregon Scientific WMR200, Bresser GmbH (Rhede)
All-Glas-Impinger	AGI-30, Ace Glass Inc. (Vineland, USA)
Stopper für Impinger	Ace Glass Inc. (Vineland, USA)
Inkubator	Heraeus B6200 incubator; Thermo Electron LED GmbH (Langenselbold)
Labor-Homogenisator	Stomacher 400 Circulator, Seward Ltd. (UK)
LightCycler®480 Real-Time PCR System	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
MacFarland Densitometer DEN-1	Biosan (Riga, Lettland)
Magnetstäbchen	Carl Roth GmbH & Co.KG (Karlsruhe)
Magnetrührer	IKAMAG® RH; IKA®-Werke GmbH & Co. KG (Staufen)
MALDI-TOF Massenspektrometer	MALDI Biotyper microflex™ LT; Bruker Daltonik GmbH (Bremen)
MALDI-Targetplatte	MSP 96 target polished steel plate (MicroScout Target); Bruker Daltonik GmbH (Bremen)
Messband (50m)	Brüder Mannesmann AG (Remscheid)
Mikrozentrifuge	MiniStar; VWR International GmbH (Darmstadt)
Molecular Imager®	Chemi Doc™ XRS Imaging System; Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Multifunktions-Klimamessgerät testo 435-2 mit IAQ-Sonde	Testo AG (Lenzkirch)
PCR Werkbank	Ultraviolet Sterilizing PCR Workstation; PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Pipetten	Eppendorf Reference; Eppendorf AG (Hamburg)
Präzisionswaage	822-61; Kern & Sohn GmbH (Balingen-Frommern)
Rotameter	Analyt-MTC GmbH (Müllheim)
Spannungsgerät	Power Pac 200; Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Sterilwerkbank	HERAsafe HS 18; Kendro Laboratory Products (Hanau)
Thermocycler	T Professional Standard Gradient Thermocycler; Biometra GmbH (Göttingen)
Thermomixer	Thermomixer pro; CellMedia GmbH & Co. KG (Gutenborn)
Tischzentrifuge	Centrifuge 5424; Eppendorf AG (Hamburg)

Vortexer	IKA® Vortex 3; IKA®-Werke GmbH & Co. KG (Staufen)
Wasseraufbereitungssystem	Milli-Q® Advantage A10®; Millipore S.A.S. (Molsheim, FR)
Wasserbad	WNB 22; Memmert GmbH + Co.KG (Schwabach)
Zentrifugen	Centrifuge 5430 und 5415R; Eppendorf AG (Hamburg)

Verbrauchsmaterialien

Es wurden folgende Verbrauchsmaterialien verwendet:

96 PCR-Platte randlos	SARSTEDT AG & Co. (Nümbrecht)
Abstrichtupfer, steril	SARSTEDT AG & Co. (Nümbrecht)
Abstrichtupfer, steril, schmal	Nerbe Plus GmbH (Winsen/Luhe)
CRYOBANK™-Kryoröhrchen	Mast Diagnostica GmbH (Reinfeld)
Dräger Röhrchen Ammoniak 0,25a	C.A.Loewe GmbH & Co.KG (Berlin)
Dräger Röhrchen Schwefelwasserstoff 0,2a	C.A.Loewe GmbH & Co.KG (Berlin)
Homogenisierbeutel	Carl Roth GmbH & Co.KG (Karlsruhe)
Impfösen (1 µl, 10 µl)	Schubert Medizinprodukte GmbH & Co. KG (Wackersdorf)
Nitrocellulose-Membranfilter (22µm)	Millipore S.A.S. (Molsheim, FR)
Petrischalen (92x16mm mit Nocken)	Carl Roth GmbH & Co.KG (Karlsruhe)
Pipettenspitzen	SARSTEDT AG & Co. (Nümbrecht)
Probenbeutel	Carl Roth GmbH & Co.KG (Karlsruhe)
Reagiergefäße (easy cap, safe seal; 1,5 ml, 2 ml)	SARSTEDT AG & Co. (Nümbrecht)
Rotilabo-Aluminiumfolie	Carl Roth GmbH & Co.KG (Karlsruhe)
Rotilabo-Luer-Stopfen	Carl Roth GmbH & Co.KG (Karlsruhe)
Schraubröhrchen (13 ml, 50 ml)	SARSTEDT AG & Co. (Nümbrecht)
Serologische Pipette 1 ml, 10 ml	SARSTEDT AG & Co. (Nümbrecht)
Sockentupfer	4805, Finnimport (Hamburg)
Spritzenvorsatzfilter Filtropur S 0,2	SARSTEDT AG & Co. (Nümbrecht)
Überziehstiefel	WDT-Wirtschaftsgen.dt.Tierärzte eG (Garbsen)
Wattestäbchen Holz steril	VWR International GmbH (Darmstadt)

Computerprogramme

Es wurden folgende Computerprogramme verwendet:

BioNumerics (Version 6.6)	Applied Maths (Kortrijk, Belgium)
FlexAnalysis (Version 3.0)	Bruker Daltonik GmbH (Bremen)
FlexControl (Version 3.0)	Bruker Daltonik GmbH (Bremen)
LightCycler® Software (Version 4.0)	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
MALDI Biotyper (Version 3.0)	Bruker Daltonik GmbH (Bremen)
SPSS (Version 21.0)	IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0 (Armonk, USA)
SAS (Version 9.4)	SAS Institute Inc. (Cary, USA)

3.2 Chemikalien, Nährmedien, Lösungen, Puffer

Chemikalien

Die im Rahmen des Projekts benutzten Reagenzien wurden von folgenden Firmen bezogen:

<p>10x Buffer Cfr9I</p> <p>ABsolute qPCR Mix (ABgene)</p> <p>Acetonitril</p> <p>Agarose Standard (Roti®agarose)</p> <p>Ameisensäure</p> <p>Antibiotika Discs (Cefotaxim 30µg, Cefotaxim+Clavulansäure 30/10µg, Cefoxitin 30µg, Cefepim 30µg, Amoxicillin+Clavulansäure 30 µg, Ceftazidim 30 µg)</p> <p>Biozym LE Genetic Pure Agarose</p> <p>Borsäure</p> <p>Cefotaxim Natrium Salz 1 µg/ml</p> <p>DreamTaq™ Green PCR MasterMix (2x)</p> <p>Ethylendiamintetraacetat (EDTA)</p> <p>Ethanol</p> <p>GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain; 10.000x in Water</p> <p>Gene Ruler™ 100bp Plus DNA Ladder</p> <p>Midori Green Advance DNA</p> <p>Natriumchlorid</p> <p>Natriumchlorid 0,85 % (5 ml Ampullen, steril)</p> <p>Natriumhydroxid</p> <p>Reinstwasser</p> <p>Trifluoressigsäure</p> <p>Tris(hydroxymethyl)aminomethan</p> <p>Tween 80</p> <p>Water, Mol Bio Grade, DNase-, RNase and Protease-free</p> <p>α-Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure (Art.# 255343)</p>	<p>Thermo Fisher Scientific Bioscience (St. Leon-Rot)</p> <p>Thermo Fisher Scientific Bioscience (St. Leon-Rot)</p> <p>Sigma-Aldrich (Steinheim)</p> <p>Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)</p> <p>Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)</p> <p>bestbion^{dx} GmbH (Köln)</p> <p>Biozym Scientific GmbH (Hess. Oldendorf)</p> <p>VWR International GmbH (Darmstadt)</p> <p>Pan Reac AppliChem GmbH (Darmstadt)</p> <p>Thermo Fisher Scientific Bioscience (St. Leon-Rot)</p> <p>Sigma-Aldrich (Steinheim)</p> <p>Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)</p> <p>Biotium (Hayward, CA, USA)</p> <p>Thermo Fisher Scientific Bioscience (St. Leon-Rot)</p> <p>Stain Biozym Scientific GmbH, (Oldendorf)</p> <p>VWR International GmbH (Darmstadt)</p> <p>bioMerieux Deutschland GmbH (Nürtingen)</p> <p>Merck KGaA (Darmstadt)</p> <p>Milli-Q® Integral Water Purification Systems, Merck Millipore (Billerica, MA, USA)</p> <p>Sigma-Aldrich (Steinheim)</p> <p>VWR International GmbH (Darmstadt)</p> <p>VWR International GmbH (Darmstadt)</p> <p>5 Prime GmbH (Hamburg)</p> <p>Bruker Daltonik GmbH (Bremen)</p>
---	--

Nährmedien

<p>Columbia-Agar mit Schafblut</p> <p>Luria/Miller-Bouillon</p> <p>MacConkey-Agar</p> <p>Müller-Hinton-Agar</p>	<p>Oxoid®, CMO 331 (Wesel)</p> <p>Carl Roth®, X968.2</p> <p>Oxoid®, CMO 115B (Wesel)</p> <p>Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)</p>
---	---

Lösungen

Lösung zur Untersuchung der Staubproben

- 10 ml phosphat-gepufferte Lösung (PBS)
- 0,01% Tween 20

TE-Puffer für DNA-Hitzeextraktion

- 10 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan
- 0,1 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA)
- pH 8, autoklavieren

Lösungen für die Agarosegelelektrophorese

5xTBE-Puffer

- 54 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan
- 27,5 g Borsäure
- 20 ml 0,5 M EDTA Stocklösung
- 1000 ml Milli-Q® Wasser

0,5xTBE-Puffer

- 100 ml 5 x TBE-Puffer
- ad 1000 ml Milli-Q® Wasser

1,2 % Agarose

- 1,2 g Agarose Standard auf 100 ml 0,5 x TBE
- Zugabe von 1,5 µl Midori Green

Matrixlösung für die MALDI-TOF-MS-Analyse

- 25mg α -Cyano-4 hydroxymethylsäure
- 1 ml organische Lösung (500 µl Acetonitril, 475 µl Aqua bidest und 25 µl Trifluoressigsäure)

Fertige Reaktionssysteme

innuPREP PCRpure Kit (Analytik Jena AG)

Tabelle 2: Primer für die PCR-Amplifikation

Verfahren	Primer	Primersequenz	Amplikonlänge in bp	Ziel-Gen/Gen-Familie	Referenz
PCR Realtime	SHV_F	TCCCATGATGAGCACCTTTAAA	-	<i>bla_{SHV}</i>	Roschanski (2014)
	SHV_R	TCCTGCTGGCGATAGTGGAT	-		
	SHV_Probe	Cy5-TGCCGGTGACGAACAGCTGGAG-BBQ-650	-		
	CTX-A_F	CGGGCRATGGCGCARAC	-	<i>bla_{CTX-M}</i>	
	CTX-A_R	TGCRCCGGTSGTATTGCC	-		
	CTX-A_Probe	Yakima Yellow-CCARCGGGCGCAGYTGGTGAC-BHQ1	-		
	CTX-B_F	ACCGAGCCSACGCTCAA	-		
	CTX-B_R	CCGCTGCCGGTTTTATC	-		
	CTX-B_Probe	Yakima Yellow- CCCGCGYGATACCACCACGC-BHQ1	-	<i>bla_{TEM}</i>	
	TEM_F	GCATCTTACGGATGGCATGA	-		
	TEM_R	GTCCTCCGATCGTTGTCAGAA	-		
	TEM_Probe	6-Fam-CAGTGCTGCCATAACCATGAGTGA-BHQ-1	-	<i>bla_{AmpC-CIT}</i>	
	CMY_F	GGCAAACAGTGGCAGGGTAT	-		
	CMY_R	AATGCGGCTTTATCCCTAACG	-		
	CMY_Probe	ROX-CCTACCGCTGCAGATCCCCGATG-BHQ-2	-		
PCR konventionell Sequenzierung	SHV_F	GGCCCTCACTCAAGGATGTA	1028	<i>bla_{SHV}</i>	Projahn et al. (2017)
	SHV_R	CCACGTTTATGGCGTTACCT			
	CTX-M-1_F	CCCATGGTTAAAAAATCACTGC	1000	<i>bla_{CTX-M-1}</i>	Carattoli et al. (2008)
	CTX-M-1_R	CAGCGCTTTTGCCGTCTAAG			

Material und Methoden

	CTX-M-2_F	TCAAGAAGAGCGACCTGGTT		<i>bla</i> _{CTX-M-2}	Ruiz Del Castillo et al. (2013)
	CTX-M-2_R	GATACCTCGCTCCATTTATTG			
	CTX-M-8_F	TGATGAGACATCGCGTTAAG	876	<i>bla</i> _{CTX-M-8}	Hopkins et al. (2006)
	CTX-M-8_R	TAACCGTCGGTGACGATTTT			
	CTX-M-9_F	ATGGTGACAAAGAGAGTGCAAC			
	CTX-M-9_R	TTACAGCCCTTCGGCGATG		<i>bla</i> _{CTX-M-9}	Batchelor et al. (2005)
	TEM_F	GCGGAACCCCTATTTG	900	<i>bla</i> _{TEM}	Olesen et al. (2004)
	TEM_R	ACCAATGCTTAATCAGTGAG			
	CMY-2_F	CAACACGGTGCAAATCAAAC	1322	<i>bla</i> _{CMY-2}	Projahn et al. (2017)
CMY-2_R	CATGGGATTTTCCTTGCTGT				

3.3 Auswahl der Betriebe und Probenahme

3.3.1 Studiendesign Querschnittsstudie

Auswahl der Betriebe

Ziel der Studie war es, die Prävalenz ESBL-/AmpC-produzierender Enterobakterien in konventionellen Putenmastbetrieben deutschlandweit repräsentativ zu ermitteln. Zur besseren Vergleichbarkeit mit im Rahmen der nationalen Plattform für Zoonosen bereits durchgeführten Studien des Forschungsverbundes RESET bei Masthähnchen, Schweinen und Rindern (Schmid et al. (2013); Hering et al. (2014); Hering et al. (2016)) wurde analog zu diesen eine Anzahl von 40 an der Studie teilnehmenden Betrieben angestrebt. Die Anzahl der Betriebe, die beprobt werden sollten, richtete sich hierbei nach den Zahlen der gehaltenen Puten in jedem Bundesland. Hierzu wurden Daten aus den statistischen Berichten der einzelnen Bundesländer verwendet, basierend auf der zu diesem Zeitpunkt verfügbaren letzten Landwirtschaftszählung von 2010 (Statistisches Statistisches-Bundesamt (2011)). Die Zahl der Betriebe wurde in Abhängigkeit von dem Anteil der Putenpopulation eines jeden Bundeslandes an der Gesamtputenpopulation Deutschlands ermittelt (siehe Tabelle 3). Aus dieser Berechnung und nach Aufrundung des Ergebnisses auf ein ganzzahliges Ergebnis ergab sich eine Gesamtzahl von 46 Putenmastbetrieben, deren ESBL-/AmpC-Status für die Querschnittsstudie ermittelt werden sollte. Die ausgewählten Betriebe sollten repräsentativ für die am meisten verbreitete Haltungform sein und mindestens eine Anzahl von 10.000 Tieren pro Betrieb halten und sowohl Aufzucht- als auch Mastgruppen beherbergen. Bedingt durch eine hohe Dichte an Putenmastbetrieben im Nordwesten Deutschlands lag hier auch ein Schwerpunkt der Probenentnahmen. Die Stadtstaaten Berlin, Hamburg und Bremen wurden auf Grund der geringen Tierzahlen schon in der Berechnung der zu beprobenden Betriebe nicht berücksichtigt. In den Bundesländern Saarland und Rheinland-Pfalz wurden ebenfalls keine Betriebe untersucht, da keine konventionellen Betriebe mit Haltungen von mindestens 10.000 Puten auffindig gemacht werden konnten. Die insgesamt unbedeutenden Tier- und Betriebszahlen machen die Berücksichtigung im Gesamtkontext jedoch vernachlässigbar.

Die angestrebte Betriebszahl wurde in allen Bundesländern erreicht, mit Ausnahme von Niedersachsen, wo nur 17 von 18 angestrebten Betrieben beprobt werden konnten. 2014 und 2015 gab es in Deutschland mehrere Ausbrüche hochpathogener aviärer Influenza in Hausgeflügelbeständen. Die Tierseuchenlage während der Studie erschwerte die Organisation der Probenentnahme, da der Personenverkehr in unmittelbarer Umgebung der Seuchenherde einschränkt war. Auch schwand die Bereitschaft der Betriebe an der Studie teilzunehmen, da die Anwesenheit betriebsfremder Personen auf dem Betriebsgelände, mit Kontakt zu anderen Geflügelhaltungen, als Risikofaktor für eine potenzielle Einschleppung der Seuche in den Tierbestand anzusehen ist. Da in zwei Bundesländern zusätzliche Betriebe für

die Teilnahme an der Studie gewonnen werden konnten (Baden-Württemberg und Mecklenburg-Vorpommern), wurde die erforderliche Gesamtzahl mit 48 beprobten Betrieben schließlich übertroffen.

Die Verteilung der für das Projekt ausgewählten Betriebe richtete sich nach regionalen Schwerpunkten des Vorkommens der Putenmäster. So wurden Landkreise anhand der Tier- und Betriebsdichte ausgewählt, in denen dann vorrangig Betriebe beprobt werden sollten (Referenzen siehe Anhang, Tabelle 19). Diese Methode der Regionalisierung wurde bereits für andere Nutztierarten beschrieben (Merle (2012)). Jedoch fand die Differenzierung in unterschiedliche Geflügelarten bei Merle et. al. keine Berücksichtigung, weshalb anhand der Daten aus den statistischen Berichten der Bundesländer eine eigenständige Festlegung der Schwerpunkte der Putenhaltungen in Deutschland und somit der Probenentnahmen erfolgte.

Zur Akquirierung der Betriebe wurde Kontakt zu den maßgeblichen Putenerzeugern, mit den betreuenden Tierärzten oder direkt mit den Putenmältern aufgenommen, um eine Kooperation zu erwirken.

Tabelle 3: Übersicht der Betriebsauswahl im Rahmen der Querschnittsstudie

Bundesland ¹	Tierzahl	Anteil an Gesamtpopulation in %	Zu untersuchende Betriebe ²	Aufgerundete Betriebszahl	Anzahl untersuchter Betriebe
Brandenburg	1.054.430	9,31 %	3,72	4	4
Mecklenburg-Vorpommern	379.277	3,35 %	1,34	2	3
Sachsen	194.878	1,72 %	0,69	1	1
Sachsen-Anhalt	1.156.191	10,21 %	4,08	5	5
Thüringen	183.449	1,62 %	0,65	1	1
Niedersachsen	4.871.768	43,02 %	17,21	18	17
Schleswig-Holstein	70.337	0,62 %	0,25	1	1
Baden-Württemberg	927.671	8,19 %	3,28	4	6
Bayern	809.900	7,15 %	2,86	3	3
Hessen	117.501	1,04 %	0,42	1	1
Nordrhein-Westfalen	1.557.910	13,76 %	5,49	6	6
GESAMT	11323312	100 %	40	46	48

¹ ohne Stadtstaaten, Rheinland-Pfalz und Saarland ² ausgehend von $n \geq 40$, = $40 \times$ Anteil an Gesamtpopulation in %

Zeitpunkt der Probenentnahme und Probenart

Optimalerweise sollten die Betriebe in zwei verschiedenen Altersgruppen auf ESBL-/AmpC-produzierende Enterobakterien untersucht werden, um im Rahmen der Datenauswertung das Alter der Tiere bei Beprobung als Einflussfaktor auf die Prävalenz bewerten zu können. Die Zuordnung zu der Altersgruppe ergab sich aus dem Zeitpunkt der Umstallung, so dass die Proben möglichst aus einer jungen Gruppe vor Umstallung in der Aufzuchtphase bis ca. vier Wochen nach Einstallung, sowie aus einer älteren Gruppe nach Umstallung in der Mastphase stammten, die zum gleichen Zeitpunkt beprobt wurden. Ausnahmen von dieser angestrebten Regel ergaben sich, wenn sich auf einem Betrieb durch ein Management im All-in-all-out-Prinzip nur eine Altersgruppe befand. So wurden in einem Betrieb lediglich Proben in der Aufzuchtphase genommen und in drei Betrieben wurden nur die älteren Tiere während der Mastperiode beprobt. In 44 Betrieben konnten beide Altersgruppen untersucht werden.

Methodisch orientierte sich die Auswahl der Probenart ebenfalls an den Projekten des RESET Forschungsverbundes, um die für die einzelnen Isolate gewonnenen Daten nach Abschluss des Projektes in die gemeinsame Datenbank des Forschungsverbundes einpflegen zu können, welche durch das Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie der Universität Leipzig betreut wird. So werden eine übergreifende Untersuchung und Bewertung von Isolaten ermöglicht.

In jeder Altersgruppe wurden **drei Sammelkotproben** aus je 10 Proben von Einzeltieren entnommen. Für jede Probe von ca. 15 g wurden anteilig 10 frische Kothaufen vom Stallgrund gesammelt und vor der Weiterverarbeitung im Labor im Beutel gemischt. Die **Sammelstaubprobe** von ca. 5 g wurde von verschiedenen Stellen oberhalb der Kopfhöhe der Tiere mit einem sterilen Pinsel in ein Probenröhrchen abgestrichen. Mittels einmaligen Ablaufens der gesamten Stalllänge wurde **ein Paar Sockentupfer** (4805, Finnimport, Hamburg) zur Untersuchung auf ESBL-/AmpC-bildende Enterobakterien entnommen und in einem sterilen Beutel verpackt.

3.3.2 Studiendesign Langzeitstudie

Auswahl der Betriebe

Für die Auswahl der sieben Betriebe für die Langzeitstudie war ein positiver ESBL-/AmpC-Status maßgeblich. Dieser wurde entweder durch vorherige Teilnahme des Betriebes an der Querschnittsstudie oder durch initiale Analyse von Sammelkotproben ermittelt. Die Festlegung auf sieben Betriebe erfolgte in Anlehnung an die Langzeitstudien des RESET-

Forschungsverbundes zu Masthähnchen und Schweinen (Laube et al. 2013; Von Salviati et al. 2014).

Zeitpunkt der Probenentnahme und Probenart

Die sieben ausgewählten konventionellen Putenmastbetriebe wurden dreimalig im Laufe einer Mastperiode mit umfangreichen Probenentnahmen im Stall und in der Stallumgebung untersucht (Tabelle 4). Erstmals am Tag der Einstallung, weiterhin in der Mitte der Mast und abschließend am Ende einer Mastperiode.

Tabelle 4: Probenahmeschema der Langzeitstudie

		Probenart	Anmerkung
Im Stall	Proben vor Einstallung #	Tränkewasser	
		Einstreu	
		4 Umgebungstupfer	Wände, Tröge, Technik
	Tierumgebung *	Sammelstaub	
		Sammelkot	oder Kükenwindeln #
		Sockentupfer, 1 Paar	
		Futter	
		Tränkewasser	
		4 Umgebungstupfer	Analog zu Proben vor Einstallung
		3 Luftproben	All-Glas-Impinger
Einzeltierproben *	20 Kloakentupfer		
	Stallklimamessung	Inkl. Schadgase	
Stallumfeld *		Sockentupfer, 6 Paar	
		ggf. Misthaufen	
		2 Luftproben	All-Glas-Impinger
		Wetter- /Klimamessung	

* jeweils zu drei Zeitpunkten zur Einstallung, in der Mitte und am Ende der Mast # nur qualitative Untersuchung (siehe 3.5)

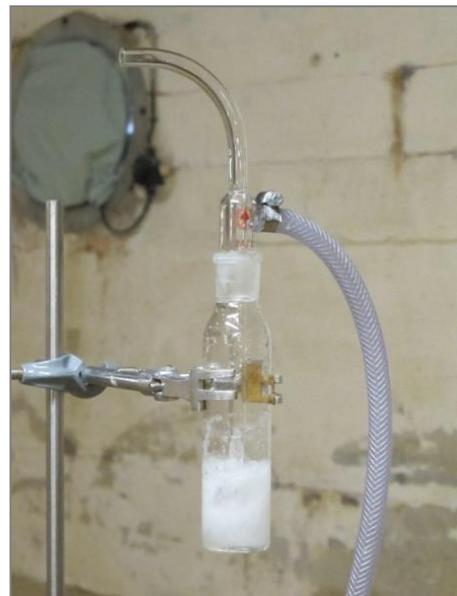
Die verschiedenen Proben zu den drei Zeitpunkten wurde immer in derselben Herde entnommen, so dass die Entwicklung der Prävalenz ESBL-/AmpC-bildender Enterobakterien während der gesamten Aufzucht- und Mastperiode beobachtet wurde. Auch hier richtete sich die Vorgehensweise bei der Probenentnahme nach den Langzeituntersuchungen ESBL-/AmpC-bildender Enterobakterien im Rahmen des RESET-Forschungsverbundes in Geflügel- und Schweinebetrieben (Laube et al. 2013; Von Salviati et al. 2014). Auch etablierte sich das Verfahren, insbesondere hinsichtlich der Untersuchung luftgetragener Partikel, bereits im Vorfeld im Rahmen der Untersuchung des Vorkommens von MRSA in Schweine- (Friese et al. 2012) und Geflügelmastbetrieben (Friese et al. 2013b).

Als **Hygienekontrolle** wurden Proben nach Desinfektion der Haltungseinrichtung und Einbringen frischer Einstreu vor der Einstallung der Tiere, sowie vor der Umstallung in ein neues Stallgebäude entnommen. Die sterilen und mit 0,5 ml phosphat-gepufferten Lösung (PBS) angefeuchteten Umgebungstupfer (Abstrichtupfer, SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht) wurden an vier verschiedenen Stellen im Stall auf einer Fläche von ca. 15 x 15 cm abgestrichen. Ferner wurde die frische Einstreu und das Tränkewasser beprobt, welche noch nicht mit Tieren in Kontakt gekommen waren, um einen möglichen von der Tierhaltung unabhängigen Eintrag der resistenten Bakterien durch diese Medien zu untersuchen bzw. auszuschließen.

Die Probenahme des **Sammelstaubs**, **Sammelkots** sowie der **Sockentupfer** erfolgte analog zu den Proben der Querschnittsstudie. Alternativ zu der Sammelkotprobe wurde bei Anlieferung der Küken am ersten Beprobungstag Kükenwindeln (Material in den Transportkisten der Küken, meist Zellstoff oder Holzwolle) entnommen, da noch kein Kot gewonnen werden konnte. Darüber hinaus wurden im Stall **Futter**, **Tränkewasser** und **vier Umgebungstupfer** entnommen. Die Entnahmetechnik der Tupfer entsprach jener der Hygienekontrolle. An jedem Beprobungstag wurden zudem **Einzeltierproben bei 20 Tieren** entnommen (Küken: Nerbe Plus GmbH, Winsen/Luhe; ältere Puten: SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht).

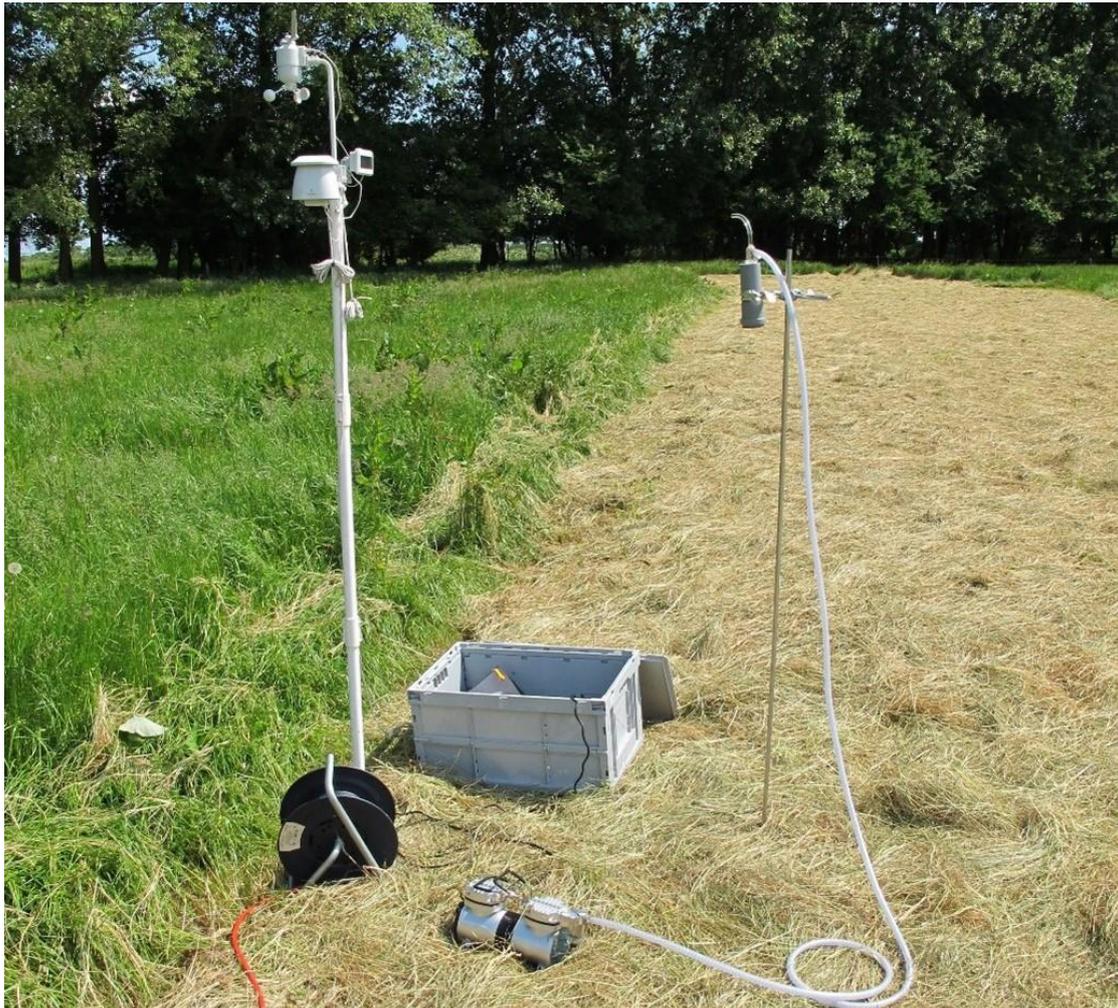
Luftproben zur Untersuchung der luftgetragenen Partikel in der Stallluft wurden an drei verschiedenen Stellen im Stall mittels Impingement gewonnen (Abbildung 1). Die All-Glas-Impinger (AGI-30) wurden zuvor mit 30 ml PBS als Auffangmedium befüllt. Der Luftstrom durch die in einer Höhe von 1,50 m auf einem Metallgestell angebrachten Impinger wurde 30 Minuten mit einer Durchflussrate von 11-12 l/min aufrechterhalten, welche mit Hilfe eines Rotameters zweimalig überprüft wurde.

Abbildung 1: Luftproben mittels Impingement



Während der **Stallklimamessung** unter Zuhilfenahme des Multifunktions-Klimamessgerät testo 435-2 (TCI Transport Control International GmbH, Oststeinbek) wurden an drei Messpunkten, die sich in gleichmäßigen Abständen auf die Länge des Stallgebäudes verteilen, die Parameter Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Kohlendioxid gemessen. Mittels Dräger Handbalgpumpe und passender Probenröhrchen (C.A.Loewe GmbH & Co.KG, Berlin) wurden Schwefelwasserstoff- und Ammoniakgehalt der Luft bestimmt.

Abbildung 2: Impingement im Außenbereich mit Wetterstation

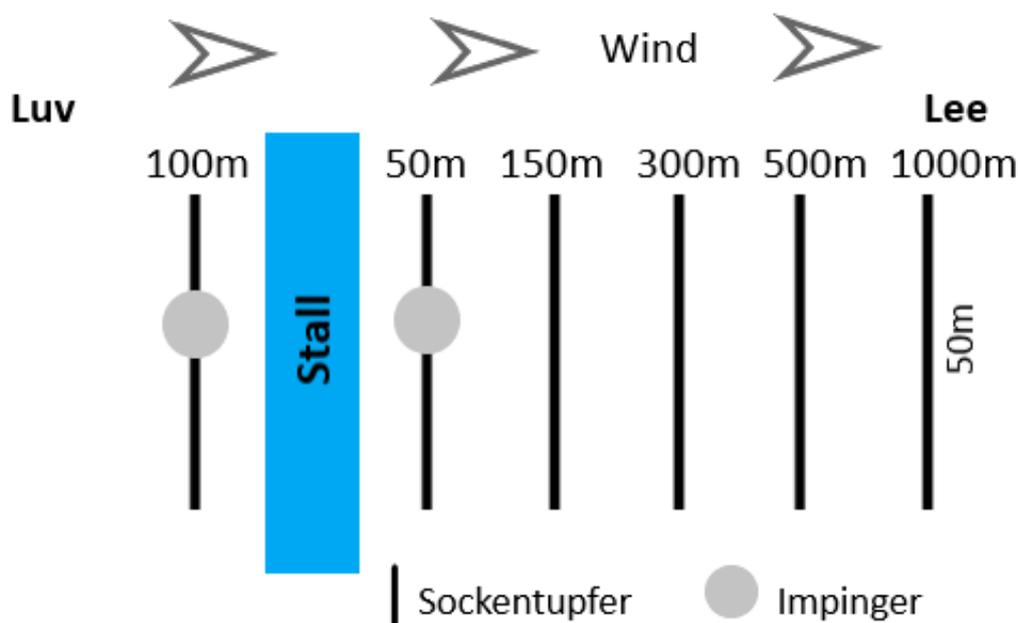


Im Rahmen der Probenentnahme im **Umfeld des Stalls** erfolgte der Aufbau der zwei Impinger analog wie oben dargestellt, nur das hier die Messdauer 90 Minuten betrug. Die Befüllung erfolgte hier zum Zweck des Frostschutzes bei widriger Witterung sowie zum Schutz vor der bei der Probenentnahme entstehender Verdunstungskälte je mit 15 ml PBS und 15 ml Glycerin. Je ein Impinger wurde zur Analyse der Stallabluft auf der windzugewandten (Luv, 50 m Distanz zum Stall) und auf der windabgewandten Seite (Lee, 100 m Distanz zum Stall) platziert. Auf Höhe des Impingers mit 50 Metern Abstand zum Stall erfolgte darüber hinaus die Wettermessung unter Verwendung einer Funk-Wetterstation (Oregon Scientific WMR200,

Bresser GmbH, Rhede)(Abbildung 2). Neben der Außentemperatur und Luftfeuchtigkeit wurden Windrichtung und -geschwindigkeit während des gesamten Aufenthalts auf dem Betriebsgelände minütlich gemessen. Zur weiteren Untersuchung des Stallumfelds wurden ausgerichtet nach der Windrichtung mittels Ablaufens auf je einer Länge von 50 Metern in sechs unterschiedlichen Abständen zum Stall auf der windzugewandten und auf der windabgewandten Seite je ein Paar **Sockentupfer** entnommen (Abbildung 3).

Die Probenahmen im Außenbereich und im Stall erfolgten zeitgleich.

Abbildung 3: Probenahmeschema im Stallumfeld



3.4 Fragebogen

Um festzustellen, ob ein Zusammenhang zwischen spezifischen Risikofaktoren auf die Prävalenz ESBL-/AmpC-bildender Enterobakterien besteht, wurde in Zusammenarbeit mit den Landwirten und Tierärzten bestandsspezifische Daten zum Betrieb erhoben, zum Betriebsmanagement, Daten zu den gehaltenen und untersuchten Tieren, beispielsweise zu Tier- und Personenverkehr und Ursprung der Tiere, zu baulichen Aspekten, Fütterung und Tränkung der Tiere, zu der allgemeinen Hygiene und zu den Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen (siehe Anhang, Abbildung 7). Weiterhin wurden geografische Gegebenheiten erfragt, wie zu anderen Tierhaltungen oder sowie zur Behandlung der landwirtschaftlichen Nutzfläche in direkter Umgebung der untersuchten Tiere. Weiterhin wurde eine umfassende Aufstellung der antibiotischen Behandlung der Tiere erstellt.

Die Anwendung der Antibiotika sowie ausgewählte Aspekte der Betriebshygiene werden im Diskussionsteil näher betrachtet, während die komplexe statistische Analyse der erhobenen Daten durch das Bundesinstitut für Risikobewertung erfolgt.

3.5 Labordiagnostische Untersuchungen ESBL-/AmpC-verdächtiger Enterobakterien

Mikrobiologische Analyse der Proben

Nach der Probenentnahme wurden alle Proben bei + 4 °C gelagert. Es folgte eine qualitative Untersuchung aller Proben auf das Vorhandensein ESBL-/AmpC-bildender Enterobakterien, mit einem speziellen Fokus auf *E. coli*. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte zunächst mittels Voranreicherung in einem Flüssignährmedium (LB, Luria/Miller-Bouillon, Carl Roth®, X968.2). Gemischt mit der Bouillon in einem Verhältnis von 1:10 (durch Ermitteln des Probengewichts bzw. bei Tupfern nach Ausschütteln in einer Pufferlösung und Abmessen dieser) wurden die Proben mit Hilfe eines Stomachers homogenisiert (260 rpm, 120 s). Die Umgebungs- sowie Kloakentupfer der Einzeltiere wurden in jeweils 1,5 ml phosphat-gepufferten Lösung (PBS) ausgeschüttelt. Der Tupfer sowie 1 ml PBS wurden in 9 ml LB überführt. Die mit den verschiedenen Proben versetzte Bouillon wurde über Nacht bei 37 °C aerob inkubiert und danach mittels Ösenausstrich auf MacConkey-Agar (Oxoid®, CMO 115B) supplementiert mit 1 µg/ml Antibiotikum Cefotaxim (PanReac AmpliChem®, A4802,0001) (MC+) ausplattiert, welche anschließend für 17 bis 24 Stunden aerob inkubiert wurden. Dies ist ein von der European Food Safety Authority zur Selektion ESBL-/AmpC-bildender *E. coli* empfohlenes Verfahren (E.F.S.A. 2012), welches wie auch die im Folgenden geschilderten Verfahren zur qualitativen und quantitativen Analyse der entnommenen Proben analog im Forschungsverbund RESET eingesetzt wurde (Laube et al. 2013; Von Salviati et al. 2014).

Der verwendete selektive MacConkey-Agar ist geeignet zum Nachweis der gesuchten gramnegativen Enterobakterien, da enthaltene Gallensalze und Kristallviolett ein Wachstum grampositiver Bakterien inhibieren. Zudem wachsen Laktose verstoffwechselnde Bakterien, wie z.B. *E. coli*, unter Färbung des pH-Indikators Neutralrot mit rosa-rotem, nicht-mukoidem Erscheinungsbild. Durch ausfallende Gallensalze bildet sich um die runden, leicht fruchtig riechenden *E. coli* – Kolonien ein opakes Präzipitat.

Unter Zusatz des Cefotaxims wird das Wachstum nicht-resistenter Bakterien auf dem Agar gehemmt, so dass potenziell alle auf MC+ wachsenden Kolonien als ESBL-/AmpC-verdächtig eingestuft werden können.

Der überwiegende Teil der Proben wurde im Hinblick auf das Vorkommen ESBL-/AmpC-verdächtiger *E. coli* quantitativ untersucht. Lediglich die Proben vor Einstellung, die Kükenwindeln sowie die Sockentupfer in der Querschnittsstudie wurden ausschließlich qualitativ untersucht.

Zur Quantifizierung wurde die Bouillon nach Vorbereitung der Voranreicherung (siehe oben) vor Inkubation zur Herstellung einer Verdünnungsreihe verwendet. 100 µl der verschiedenen Verdünnungsstufen der Bouillon wurden auf je drei MacConkey-Agarplatten mit Zusatz von Antibiotikum (MC+) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C aerob inkubiert. Zur Untersuchung der Sammelstaubprobe wurde 0,1 g Probenmaterial in 10 ml PBS-TWEEN20 (0,01 %, vol/vol) mittels 30-minütigem Schütteln gelöst und ebenfalls in eine Verdünnungsreihe überführt. Im Unterschied zur quantitativen Untersuchung der o.g. Proben wurde Rahmen der Untersuchung der Impingerflüssigkeit 500 µl direkt auf MC+ ausplattiert. Ferner wurden 10 ml Probenflüssigkeit unter Verwendung eines Nitrocellulose-Membranfilters (22µm) gefiltert. Der Filter wurde zur Detektion der ESBL-/AmpC-bildenden Bakterien ebenfalls auf MC+ inkubiert.

Ergänzend zur quantitativen Bestimmung auf MacConkey-Platten mit Zusatz von Antibiotikum wurden die Verdünnungsstufen auch auf Agar ohne Zusatz von Antibiotikum ausgebracht (MC-).

Die *E. coli*-Kolonien der Verdünnungsstufe mit 15 bis 300 Kolonien je Platte wurden ausgezählt und die Quantität in koloniebildende Einheiten (KbE) je g Probenmaterial bzw. je Tupfer berechnet.

Die auf MC+ phänotypisch verschiedenen Kolonien wurden mittels Subkultur vereinzelt und deren Gattung und Spezies mittels MALDI-TOF-MS (MALDI Biotyper microflex™ LT; Bruker Daltonik GmbH, Bremen) bestimmt. Dieses von Karas und Hillenkamp (Karas und Hillenkamp 1988; Hillenkamp und Karas 1990) entwickelte Verfahren der *Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry* bietet auf Grund seiner Schnelligkeit und hohen Präzision eine komfortable Alternative zur klassischen zeitintensiven Speziesidentifizierung in der mikrobiologischen Routinediagnostik (Schubert 2009). Durch Laserbeschuss in der evakuierten Messkammer wird das auf der Targetplatte aufgebrachte und mit einer speziellen Matrixlösung überschichtete Koloniematerial ionisiert. Die Masse, der im elektronischen Feld beschleunigten Ionen wird anhand der charakteristischen Flugzeit ermittelt und in einem Spektrum abgebildet, welches schließlich eine Speziesidentifizierung unter Zuhilfenahme einer hinterlegten Referenzdatenbank ermöglicht (Sauer et al. 2008).

Alle *E. coli* (Abbildung 4) sowie darüber hinaus weitere ESBL-/AmpC-verdächtige Enterobakterien wurden für weiterführende Untersuchungen kryokonserviert (CRYOBANK™-Kryoröhrchen, Mast Diagnostica GmbH, Reinfeld).

Abbildung 4: *E. coli* typische Kolonien auf MacConkey - Agar



Weiterführende Untersuchungen verdächtiger Isolate

Von jeder Probe wurde mindestens je ein verdächtiges Isolat jeder detektierten Bakterienspezies weiter untersucht, um schlussendlich den ESBL-/AmpC-Status der Einzelprobe zu bestimmen. Dazu wurde zunächst ein Antibiotika-Plättchen-Diffusionstest durchgeführt. Hierzu wurde eine Keimsuspension mittels Aufnahme von Koloniematerial und Auflösung in 0,85-prozentiger Natriumchloridlösung unter Verwendung eines Densitometers zur Messung der Trübung (DEN-1, Biosan, Riga) auf 0,5 McFarland (McF) eingestellt, einem Zellgehalt von $1,5 \times 10^8$ Zellen/ml Bakteriensuspension entsprechend. Die Methode wurde erstmals von (Mcfarland 1907) beschrieben. Die Suspension wurde anschließend mittels eines mäßig getränkten Wattestäbchens flächendeckend auf Müller-Hinton-Agar in drei Richtungen aufgebracht, welcher nach Antrocknung mit sechs Antibiotikaplättchen im Abstand von 2 cm zueinander belegt wurde: Cefotaxim 30µg, Cefotaxim+Clavulansäure 30/10µg, Cefoxitin 30µg, Cefepim 30µg, Amoxicillin+Clavulansäure 30 µg, Ceftazidim 30 µg. Die Anwendung erfolgte laut Herstellerangaben (bestbion^{dx} GmbH). Der fertig präparierte Agar-Diffusionstest wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Auswertung der ausgemessenen Hemmhofdurchmesser erfolgte anschließend gemäß der CLSI-Richtlinien (Tabelle 5).

Tabelle 5: Bewertung der Hemmhofdurchmesser (IZD) nach CLSI-Richtlinien

Antibiotikum	sensibel in mm	Intermediär in mm	Resistent in mm
Cefotaxim (CTX)	≥ 26	23 - 25	≤ 22
Cefotaxim + Clavulansäure (CTX/Clav)	Bewertung im Vergleich zum Hemmhof um CTX		
Cefoxitin (FOX)	≥ 18	15 - 17	≤ 14
Cefepim (FEP)	≥ 18	15 - 17	≤ 14
Amoxicillin + Clavulansäure (AMC)	≥ 18	14 - 17	≤ 13
Ceftazidim (CAZ)	≥ 21	18 - 20	≤ 17

Eine Resistenz gegen Cefotaxim und Ceftazidim in Verbindung mit einer Sensibilität gegen Cefoxitin und Amoxicillin + Clavulansäure bei gleichzeitiger Differenz des Durchmessers Cefotaxim im Vergleich zu dem des Cefotaxim + Clavulansäure von mindestens 5 mm spricht gemäß den CLSI-Richtlinien für die Produktion einer Extended-Spectrum-Beta-Laktamase (C.L.S.I. 2012).

Als AmpC-verdächtig galt demnach eine Kolonie, wenn der Hemmhof keine Sensibilität bei Cefotaxim und Cefotaxim + Clavulansäure anzeigt und beide Durchmesser in etwa gleich groß waren bei gleichzeitiger Resistenz gegen Cefoxitin, Ceftazidim und Amoxicillin + Clavulansäure.

Molekularbiologische Analyse der Isolate

Für die folgenden molekularbiologischen Untersuchungen wurde DNA mittels Hitzeextraktion aus den Isolaten gewonnen. Hierzu wurden jeweils 1 ml der Übernachtskultur (Voranreicherung in LB) in ein Eppendorfgefäß pipettiert. Nach Zentrifugierung (14000 rpm, 3 Min.) wurde der Überstand verworfen und das durch Abschütteln der Flüssigkeit getrocknete Pellet in 300 µl sterilfiltriertem TE-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde bei 500 rpm 10 Minuten gekocht und anschließend 2 bis 3 Minuten auf Eis abgekühlt. Nach vortexen der Suspension wurde diese erneut zentrifugiert (14000 rpm, 2 Min.). Der abschließend von den sich absetzenden Zelltrümmern in ein neues Reagiergefäß abpipettierte Überstand enthält die zur weiteren Verwendung präparierte chromosomale und Plasmid-DNA.

Die nach CLSI-Richtlinien im Antibiotika-Plättchen-Diffusionstest als verdächtig bzw. fraglich eingeordnete Isolate wurden anschließend unter Durchführung einer von Roschanski et al. (2014) entwickelten Multiplex-Real-Time-PCR (LightCycler® 480 Real-Time PCR System, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) auf das Vorhandensein verschiedener, vorrangig bei

Nutztieren vorkommender ESBL- Gene *bla_{CTX-M}*, *bla_{SHV}* und *bla_{TEM}* sowie das AmpC-Gen *bla_{CMY}* untersucht.

Die weitere Bearbeitung der Probe erfolgte im Thermocycler nach dem in Tabelle 6 dargestellten Temperatur-Zeit-Programm in 30 Zyklen nach initialer Denaturierung.

Tabelle 6: Temperatur-Zeit-Programm der Realtime-PCR

Programmschritt	Temperatur in °C	Zeit
Initiale Denaturierung	95	15 Min.
Denaturierung	95	15 Sek.
Primerhybridisierung	50	15 Sek.
Amplifikation	70	20 Sek.

30 Zyklen

Die Auswertung erfolgte unter Verwendung der LightCycler Software (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). Bei negativem Ergebnis der Realtime-PCR wurden zwei weitere ESBL-/AmpC-verdächtige und via MALDI-TOF-MS identifizierte Isolate jeder Spezies aus der Probe wie beschrieben analysiert, um die Wahrscheinlichkeit eines falsch negativen Probenstatus zu minimieren.

Bei positivem Ergebnis erfolgte die nähere Bestimmung der nachgewiesenen Gene durch Sequenzierung. Zu diesem Zweck wurden bis zu vier weitere konventionelle PCRs bei vorher bestimmtem Gen *bla_{CTX-M}* (Batchelor et al. 2005; Hopkins et al. 2006; Carattoli et al. 2008; Ruiz Del Castillo et al. 2013) und je eine bei den anderen Genen (Olesen et al. 2004; Projahn et al. 2017), wie bereits beschrieben durchgeführt. Der Reaktionsansatz erfolgte gemäß Tabelle 21 (siehe Anhang, Tabelle 21). Die Einstellung der Reaktionsparameter erfolgte wie in Tabelle 22 dargestellt (siehe Anhang, Tabelle 22). Nach Zugabe von 1,5 µl Midori Green zur Anfärbung der DNA in 100 µl eines 1,2-prozentigen Agarosegels sowie unter Zugabe von 1,5 µl DNA Ladder (100 bp, Gene Ruler) als DNA-Längenstandard erfolgte die Auftrennung der DNA-Fragmente in der Gelelektrophorese bei 140 V / 45 Minuten und die optische Auswertung unter UV-Licht.

Die Detektion von SHV oder TEM machte eine Bestätigung des ESBL-Status durch nähere Spezifizierung erforderlich, da nicht alle Enzymtypen den ESBLs zugeordnet werden. Bei dem ESBL-Typ CTX-M sowie CMY führt die Sequenzierung bei heutiger Datenlage zu einer besseren Vergleichbarkeit mit anderen Studien und sich daraus ergebenden epidemiologischen Rückschlüssen. Für die Sequenzierung der mit Hilfe des innuPREP PCRpure Kit (Analytik Jena AG) nach Herstellerangaben aufgereinigten PCR-Produkte wurde LGC Genomics GmbH (Berlin) beauftragt. Die Auswertung und Zuordnung zu den Enzymtypen erfolgte unter Verwendung der BioNumerics Software (Version 6.6) und nach

Abgleich mit den aus der Lahey Datenbank (<http://www.lahey.org/Studies/>) importierten Sequenzen.

3.6 Statistik

Die statistischen Auswertungen wurden mit den Programmen SPSS 21.0 (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0, Armonk, NY, USA) und SAS 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) in Zusammenarbeit mit dem Institut für Veterinär-Epidemiologie und Biometrie FU Berlin durchgeführt.

Die Prävalenz des Betriebsstatus in den Putenmastbetrieben wurde mit der beim Masthähnchen, Schwein und Rinder mit Hilfe des exakten Fisher-Tests verglichen, ebenso die Nachweishäufigkeiten in den einzelnen Probenarten bei den Putenmastbetrieben im Vergleich zu den jeweiligen Probenarten der anderen Tierarten.

Die Frage, ob signifikante Unterschiede in den Prävalenzen der verschiedenen Probenarten vorliegen, wurde mit Hilfe des Chi-Quadrat-Unabhängigkeits-Tests beantwortet. Zum Vergleich des Vorkommens ESBL-/AmpC-bildender *E. coli* bei den unterschiedlichen Tierarten wurde ebenfalls der Chi-Quadrat-Test verwendet.

Der McNemar-Test wurde verwendet zum Vergleich der Altersgruppen untereinander.

Zum Vergleich der bakteriellen Konzentrationen wurden die geometrischen Mittelwerte der positiven, quantifizierbaren Proben herangezogen. Ob die Keimzahlen sich hinsichtlich des Probenmaterials bzw. der Altersgruppe unterscheiden, wurde zunächst mit dem einfachen t-Test berechnet und bei Vorliegen von Hinweisen auf eine Relevanz mittels SAS im gemischten linearen Regressionsmodell ermittelt, wobei der Herkunftsbetrieb als zufälliger Effekt in das Modell einbezogen wurde, da z.T. mehrere quantifizierte Proben aus demselben Betrieb stammten.

Vor statistischer Analyse der Keimzahlen fand der Kolmogorow-Smirnow-Test zur Prüfung auf Normalverteilung der Daten Anwendung.

Ob zwischen den verschiedenen Probenahmezeitpunkten der Langzeitstudie ein signifikanter Unterschied in den Anteilen positiver Kloakentupfer vorliegt, wurde mit dem Friedman-Test ermittelt.

Die Unterschiede wurden als signifikant identifiziert, sofern der *p*-Wert unter 0,05 lag.

4. Ergebnisse

4.1 Betriebszahlen und -aufbau

Im Rahmen der **Querschnittsstudie** wurde der ESBL-/AmpC-Status bei 48 Betrieben bestimmt (Übersicht über die Betriebsdaten siehe Tabelle 7). In 44 von 48 Betrieben wurde jeweils eine Aufzuchttherde und eine Masttherde parallel beprobt. In vier Betrieben war zum Zeitpunkt der Beprobung nur eine Altersgruppe vorhanden. So konnten in drei Betrieben jeweils nur die Masttherde, bei einem nur die Aufzuchttherde untersucht werden. Da der Zeitpunkt der Umstallung betriebsbedingt unterschiedlich festgelegt wurde, sind im Ergebnis einige Tiere der Aufzuchttherde älter als die jüngsten beprobten Mastherden. Die ursprünglich angestrebte Betriebsgröße wurde mit 8 000 Tieren bei einem Betrieb in Niedersachsen unterschritten und auf Grund der tierseuchenbedingt besonderen Situation konnte kein größerer Betrieb mehr in die Studie aufgenommen werden. Die Probenentnahmen erfolgten zwischen Januar 2014 und Oktober 2015, wobei die anschließenden Laboruntersuchungen, einschließlich der Sequenzierungen, im Februar 2016 abgeschlossen wurden. Abschließend erfolgte die statistische Auswertung der erhobenen Daten.

Tabelle 7: Übersicht der Betriebsdaten der 48 Putenmastbetriebe der Querschnittsstudie

	Anzahl der Tiere			Alter der Tiere (in Tagen)	
	In untersuchter			In untersuchter	
	im Betrieb	Aufzuchtgruppe	Mastgruppe	Aufzuchtgruppe	Mastgruppe
Median	23 000	10 740	4 500	11	126
Minimum	8 000	4 120	350	1	50
Maximum	66 000	28 000	8 500	51	147

In der **Langzeitstudie** wurden sieben Betriebe mit zuvor bestätigtem positiven ESBL-/AmpC-Status im Laufe einer Mastperiode intensiv untersucht (Übersicht über die Betriebsdaten siehe Tabelle 8). Jeder Betrieb wurde am Tag der Einstallung, in der Mitte der Mast sowie am Ende der Mast untersucht. Die Probenahmen erfolgten von April 2014 bis Juli 2015 in zwei weiblichen Herden und fünf männlichen Herden. Die Herden wurden das erste Mal am Tag der Einstallung beprobt, mit Ausnahme eines Betriebes, der erst an Tag 3 nach Einstallung beprobt werden konnte, da die Herde unerwartet früher eingestallt wurde. Zum Zeitpunkt der zweiten Probenahme waren die Tiere zwischen 54 und 76 Tage alt. In einem Alter von 104 und 147 Tagen erfolgte die dritte Beprobung. Die Differenz des Alters der Tiere zur Probenentnahme ergab sich aus der unterschiedlichen Mastdauer (weiblich: 16 – 17 Wochen,

männlich: 20 – 21 Wochen). Auf Grund der kürzeren Mastdauer der weiblichen Tiere wurden diese im Verlauf der Probenentnahmen auch früher beprobt. Weiterhin sind in Tabelle 8 die durchschnittlich im Außenbereich gemessenen Temperaturen und Luftfechtigkeiten dargestellt.

Alle Tiere wurden im Verlauf Ihrer Mast antibiotisch behandelt. Nur eine Herde hatte zum zweiten Zeitpunkt der Beprobung noch keine Beta-Laktam-Antibiotika erhalten, jedoch wurden in allen untersuchten Herden bis zum Zeitpunkt der dritten Beprobung Beta-Laktam-Antibiotika eingesetzt.

Tabelle 8: Übersicht über die Betriebsdaten der Putenmastbetriebe der Langzeitstudie

Betriebsnummer	Tierzahl gesamt Betrieb	1. Probenahme	2. Probenahme	3. Probenahme	Geschlecht
		(Datum, Temp., LF) Alter, Tiere in Herde AB/Beta-Laktam-AB-Behandlung	(Datum, Temp., LF) Alter, Tiere in Herde AB/Beta-Laktam-AB-Behandlung	(Datum, Temp., LF) Alter, Tiere in Herde AB/Beta-Laktam-AB-Behandlung	
1	26.000	03.04.14, 4°C, 83% 1 Tage, 5 600 -/-	26.05.14, 28°C, 41% 54 Tage, 2 700 +/-	15.07.14, 23°C, 58% 104 Tage, 2 580 +/-	weiblich
2	23.000	15.04.14, 10°C, 48% 1 Tage, 6 000 -/-	16.06.14, 21°C, 48% 63 Tage, 2 000 +/-	08.09.14, 22°C, 55% 147 Tage, 1 850 +/-	männlich
3	20.200	29.08.14, k.A. 1 Tage, 13 270 -/-	03.11.14, 16°C, 73% 67 Tage, 4 900 +/-	08.12.14, 4°C, 74% 102 Tage, 4 900 +/-	weiblich
4	20.000	07.11.14, 10°C, 65% 1 Tage, 10 900 -/-	21.01.15, 1°C, 74% 76 Tage, 3 300 +/-	24.03.15, 11°C, 43% 138 Tage, 3 300 +/-	männlich
5	50.000	09.03.15, 14°C, 57% 3 Tage, 5 660 -/-	06.05.15, 17°C, 52% 61 Tage, 1 500 +/-	09.07.15, 15°C, 74% 125 Tage, 1 500 +/-	männlich
6	11.600	12.03.15, 11°C, 54% 1 Tage, 7 000 -/-	12.05.15, 21°C, 53% 62 Tage, 4 000 +/-	20.07.15, 21°C, 47% 131 Tage, 4 000 +/-	männlich
7	20.000	18.03.15, 15°C, 36% 1 Tage, 11 000 -/-	20.05.15, 15°C, 50% 64 Tage, 4 000 +/-	23.07.15, 20°C, 54% 128 Tage, 4 000 +/-	männlich

k.A. – Messung entfiel wegen technischer Probleme, LF – Luftfeuchtigkeit im Außenbereich, AB – Antibiotika, Temp. – Temperatur im Außenbereich

4.2 Ergebnisse der Querschnittsstudie

Betriebs- und Probenstatus hinsichtlich ESBL-/AmpC-bildender Enterobakterien

In jedem Betrieb wurden insgesamt zehn Proben untersucht. Eine Ausnahme stellten die vier Betriebe mit nur einer Altersgruppe dar, bei welchen lediglich fünf Proben analysiert wurden.

Ein Isolat und somit auch die dazugehörige Probe wurden ESBL-/AmpC-positiv gewertet, wenn diese im Antibiotika-Plättchen-Diffusionstest phänotypisch verdächtig waren und ein ESBL-/AmpC-Gen mittels PCR und ggf. Sequenzierung nachgewiesen wurde.

Einen positiven Betriebsstatus erhielt ein Betrieb beim Nachweis ESBL-/AmpC-bildender Enterobakterien in mindestens einer der entnommenen Proben.

70,8 % der 48 untersuchten Betriebe wiesen einen positiven Status für ESBL-/AmpC-produzierende Enterobakterien auf, inklusive *E. coli*, und in 60,4 % der Betriebe wurden ESBL-/AmpC-bildende *E. coli* nachgewiesen.

Betrachtet man die ESBL-/AmpC-Prävalenzen auf Probenebene, ergeben sich Nachweisraten von 37,6 % ESBL-/AmpC-positiv Proben bezüglich Enterobakterien und 29,8 % bezüglich *E. coli* (Tabelle 9).

Neben *E. coli* wurden verschiedene andere ESBL-/AmpC-bildende Enterobakterien nachgewiesen: *Proteus* ssp. (24/48), *Klebsiella* ssp. (10/48), *Enterobacter* ssp. (7/48), *Escherichia* ssp. (5/48) und *Citrobacter* ssp. (2/48).

Tabelle 9: Anteil ESBL-/AmpC-positiver Betriebe bzw. Proben von 48 ausgewerteten Betrieben und 460 Proben

ESBL-/AmpC-bildende	Enterobakterien in %	<i>E. coli</i> in %
Betriebsstatus	70,8 (34/48)	60,4 (29/48)
Probenstatus	37,6 (173/460)	29,8 (137/460)

Eine weitere Fragestellung des Projekts war es das Vorkommen der resistenten Bakterien bei den unterschiedlich alten Tieren (Aufzuchttherde und Masttherde) zu untersuchen (Tabelle 10) Den ESBL-/AmpC-Status der Herden sowie die Anzahl ESBL-/AmpC-positiver Proben betreffend ergab die Auswertung des McNemar's Test keine signifikanten Unterschiede, ebenso wie die differenzierte Betrachtung der Ergebnisse von *E. coli* und Enterobakterien.

Tabelle 10: Vergleich von Herdenstatus sowie Probenstatus von Aufzucht- und Mastherden bezüglich ESBL-/AmpC-bildender Enterobakterien und *E. coli*

	Aufzucht	Mast
Herdenstatus Enterobakterien in %	46,7 (21/45)	57,4 (27/47)
Herdenstatus <i>E. coli</i> in %	42,2 (19/45)	44,7 (21/47)
Probenstatus Enterobakterien in %	35,6 (80/225)	39,6 (93/235)
Probenstatus <i>E. coli</i> in %	29,8 (67/225)	29,8 (70/235)

In der Gegenüberstellung der positiven Proben (Tabelle 11) wird ersichtlich, dass in Betrieben mit einem positiven Status der Nachweis ESBL-/AmpC-bildender Enterobakterien in mindestens einer Sockentupferprobe oder einer Sammelkotprobe gelang. Gleichzeitig wurden Sammelkot- und Sockentupferproben besonders häufig positiv getestet. Der Nachweis im Staub war im Vergleich eher gering und gelang auch nur in den Fällen, in denen gleichzeitig eine Sockentupferprobe oder eine Sammelkotprobe positiv getestet wurde.

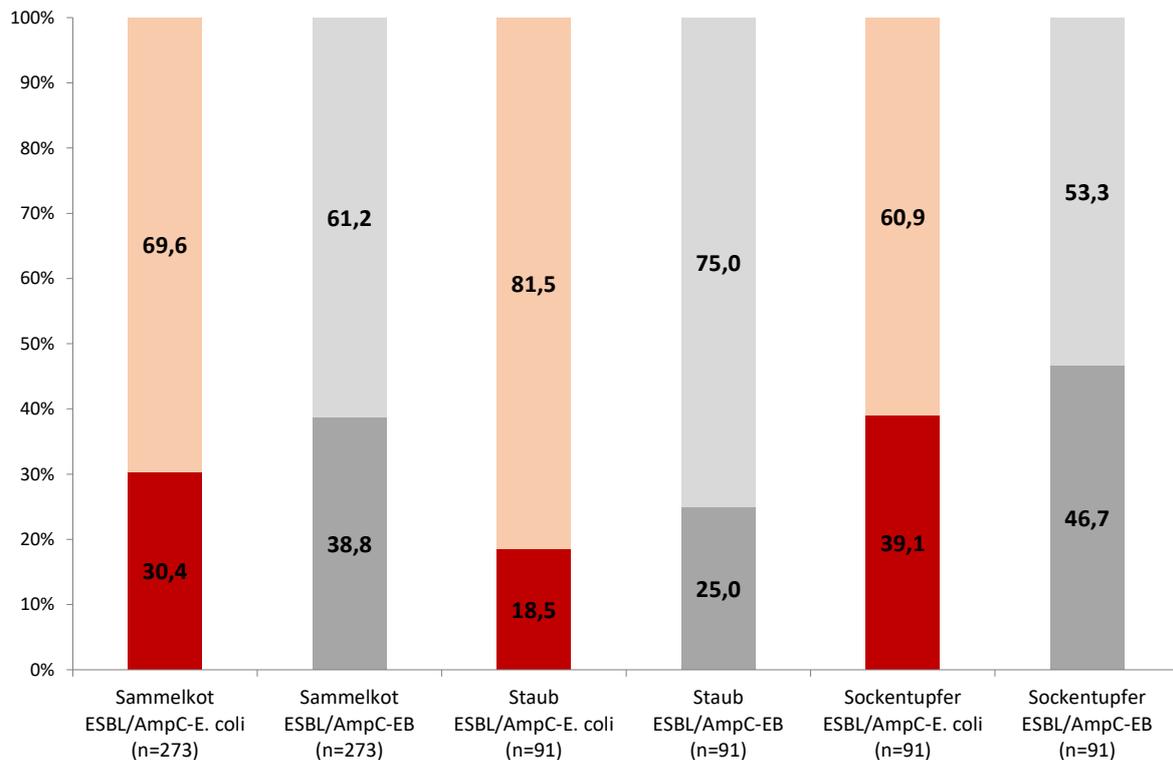
Tabelle 11: Anzahl der positiven und negativen Proben nach Probenmaterial in jedem Betrieb

Sammelkot		Sockentupfer		Staub		Anzahl der Betriebe	
1-2	3-4	5-6	1	2	1		2
						2	positiv
						6	
						1	
						1	
						2	
						7	
						3	
						2	
						6	
						3	
						1	
						14	
						48	

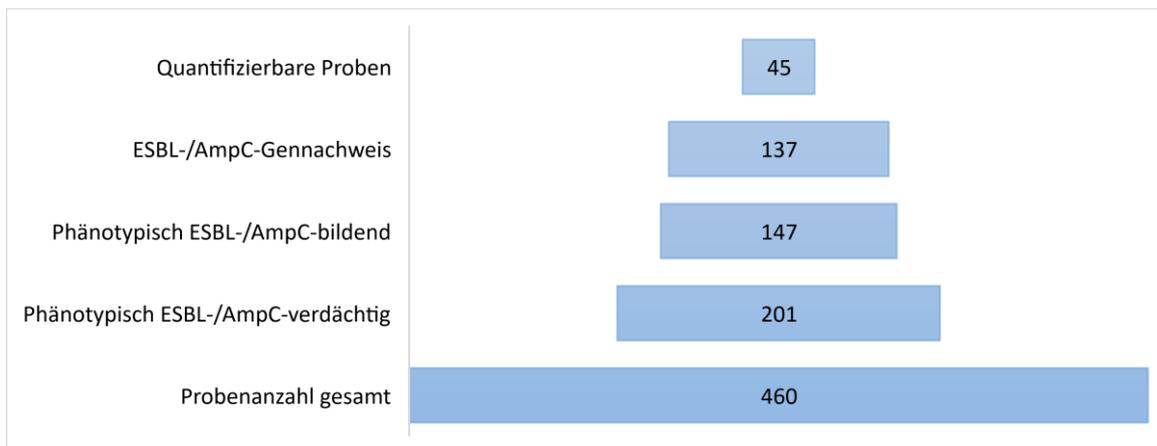
Der Sockentupfer wurde mit 46,7 % bzw. 39,1 % am häufigsten positiv für ESBL-/AmpC-Enterobakterien bzw. ESBL-/AmpC-*E. coli* getestet, dicht gefolgt von der Sammelkotprobe (siehe Abbildung 5). Der Staub zeigte mit 25 % bzw. 18,5 % die niedrigsten Nachweisraten.

Die drei Probenmatrizes unterschieden sich nicht signifikant voneinander (Chi-Quadrat-Test, $p > 0,05$).

Abbildung 5: Anteil ESBL-/AmpC-bildender *E. coli* sowie Enterobakterien (EB) in verschiedenen Probenmatrizes



Im Laufe der Laboranalyse wurde deutlich, dass nur bei einem Teil der Proben schlussendlich ein ESBL-/AmpC-Gen nachgewiesen werden konnte, obwohl ein Wachstum des Probenansatzes nach Anreicherung auf MC+ einen Verdacht auf ESBL-/AmpC-Bildung begründete (Abbildung 6). Bei insgesamt 460 Proben ergab die Auswertung von 201 MC+ Agarplatten ein positives Ergebnis hinsichtlich für die ESBL-AmpC-Bildung verdächtiger *E. coli*. Von diesen Platten ausgewählte Einzelkolonien waren nach Auswertung des Antibiotikaplättchen-Diffusionstests noch 147 phänotypisch ESBL-/AmpC-bildend. Letztendlich wurde ein ESBL-/AmpC-Gen noch bei 137 Isolaten, also gut zwei Drittel der Proben, nachgewiesen. Quantifizierbar waren von diesen Proben nur 45.

Abbildung 6: Stufenweise Ausdifferenzierung am Beispiel *E. coli*

Quantitative Analyse

Jeweils die erste von drei Sammelkotproben jeder Altersgruppe sowie jede Staubprobe wurde hinsichtlich der Anzahl ESBL-/AmpC-bildender *E. coli* sowie der Gesamt-*E. coli* (gemeinsames Wachstum resistenter und nicht resistenter Kolonien auf MC-) untersucht (Tabelle 12). Aus allen Ergebnissen in koloniebildenden Einheiten je Gramm wurde der geometrische Mittelwert errechnet. Negative oder ausschließlich über das Anreicherungsverfahren ESBL-/AmpC-positive Proben wurden in der Berechnung nicht berücksichtigt.

Vergleicht man die beiden Altersgruppen miteinander, fällt auf, dass in den quantifizierbaren Sammelkotproben der Aufzuchtherden mit $1,2 \cdot 10^6$ KbE/g mehr ESBL-/AmpC-*E. coli* als bei den Mastherden ($5,8 \cdot 10^4$ KbE/g) nachweisbar waren. Der einfache t-Test gab Hinweise auf statistisch signifikante Unterschiede ($p = 0,023$), welche sich im gemischten linearen Regressionsmodell bestätigten ($p = 0,026$). Unter Einbezug der Betriebe als zufälligen Faktor zeigte sich, dass diese einen signifikanten Einfluss auf die totale Varianz bilden. Die Keimzahlen im Sammelkot scheinen also im Mastverlauf zu sinken.

Die Keimzahlen der Staubproben unterscheiden sich hingegen unter Berücksichtigung der Altersgruppe nicht signifikant voneinander.

Auch eine Analyse und Vergleich der Gesamt-*E. coli* (MC-) ergab keine signifikanten Unterschiede, weder hinsichtlich der untersuchten Altersgruppe noch des Probenmaterials. Auch sind die Gesamt-*E. coli* bei ESBL-AmpC-positiven Proben vergleichbar mit jenen der negativen Proben.

Betrachtet man die ESBL-/AmpC-Fraktion an den Gesamt-*E. coli* lassen sich Anteile von 0,3 % bei Sammelkotproben und 6,1 % bei Sammelstaub zeigen. Nur ein Bruchteil aller *E. coli* bilden demnach auch Extended-Spektrum- bzw. AmpC-Beta-Laktamasen.

Tabelle 12: Anteil ESBL-/AmpC-bildender an Gesamt - *E. coli*
in KbE/g , $x^- geom$

		Sammelkot	Staub
Aufzucht	MC+	$1,2 * 10^6$ (n=16) ($6,7 * 10^2 - 2,6 * 10^9$)	$1,3 * 10^4$ (n=6) ($1,3 * 10^3 - 3,6 * 10^5$)
	MC-	$1,1 * 10^8$ (n=16) ($1,4 * 10^6 - 1,5 * 10^{10}$)	$1,7 * 10^5$ (n=6) ($1,0 * 10^4 - 3,6 * 10^6$)
	Anteil ESBL-/AmpC- verdächtige <i>E. coli</i>	1,1 %	7,9 %
Mast	MC+	$5,8 * 10^4$ (n=16) ($3,3 * 10^2 - 1,6 * 10^7$)	$7,9 * 10^3$ (n=7) ($1,0 * 10^3 - 2,6 * 10^4$)
	MC-	$5,2 * 10^7$ (n=16) ($1,1 * 10^6 - 1,8 * 10^9$)	$1,7 * 10^5$ (n=7) ($4,4 * 10^4 - 1,6 * 10^6$)
	Anteil ESBL-/AmpC- verdächtige <i>E. coli</i>	0,1 %	4,8 %
GESAMT	MC+	$2,6 * 10^5$ (n=32) ($3,3 * 10^2 - 2,6 * 10^9$)	$1,0 * 10^4$ (n=13) ($1,0 * 10^3 - 3,6 * 10^5$)
	MC-	$7,7 * 10^7$ (n=32) ($1,1 * 10^6 - 1,5 * 10^{10}$)	$1,7 * 10^5$ (n=13) ($1,0 * 10^4 - 3,6 * 10^6$)
	Anteil ESBL-/AmpC- verdächtige <i>E. coli</i>	0,3 %	6,1 %

Enzymgenotypisierung ESBL-/AmpC-verdächtigter Isolate aus der Querschnittsstudie

Für jede ESBL-/AmpC-positive Probe wurde ein Isolat jeder Spezies der Familie Enterobakterien zum einen phänotypisch mittels eines Antibiotika-Plättchen-Diffusionstest untersucht, zum anderen auf das Vorhandensein der ESBL-Gene *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} und *bla*_{SHV} sowie des AmpC-Gens *bla*_{CMY}. Bei negativem Ergebnis wurden zwei weitere verdächtige Isolate derselben Probe dahingehend untersucht. Detektierte ESBL-/AmpC-Gene wurden anschließend sequenziert, um den genauen Enzym-Typ zu bestimmen.

Im Ergebnis dominierten bei den 137 erfolgreich bestimmten *E. coli*-Isolaten mit ca. 88% die CTX-M-Enzymtypen, welche alle zu den Extended-Spektrum-Beta-Laktamasen zählen (Tabelle 13). Unter den CTX-M-Enzymtypen (n = 121) kamen verschiedene Enzymvarianten vor, unter denen CTX-M-1 mit einem Anteil von 41,6 % am häufigsten gefunden wurde, gefolgt von CTX-M-14 mit 20,7 %, CTX-M-15 mit 17,3 % und in geringeren Anteilen CTX-M-32, CTX-M-27 und CTX-M-55. Neben CTX-M wurde die AmpC-Beta-Laktamase vom Typ CMY-2 bei 9 Isolaten (6,6 %) sowie andere ESBL-Typen wie SHV-12, SHV-2 und TEM-52 nachgewiesen. Es traten auch Enzymkombinationen mit Beta-Laktamasen (keine ESBLs) der TEM-Gruppe, wie TEM-1, TEM-57 oder TEM-135 auf.

Andere ESBL-/AmpC-verdächtige Enterobakterien, außer *E. coli*, zeigten auch überwiegend CTX-M-Enzymtypen, jedoch dominierte hier CTX-M-65, welches bei *E. coli* überhaupt nicht gefunden wurde. Zudem traten noch vereinzelt SHV-2 sowie CMY-2 auf (Tabelle 13).

Tabelle 13: Enzym-Typen der ESBL-/AmpC- *E. coli* der Querschnittsstudie

Enzym-Typ	ESBL-/AmpC-positive <i>E. coli</i> in % (n) n=137	ESBL-/AmpC-positive Enterobakterien in % (n) n=48
CTX-M	88,3 (121)	87,5 (42)
CTX-M-1	41,6 (57)	20,8 (10)
CTX-M-9	-	2,1 (1)
CTX-M-14	18,2 (25)	-
CTX-M-15	15,3 (21)	16,7 (8)
CTX-M-27	5,8 (8)	-
CTX-M-32	6,6 (9)	-
CTX-M-55	0,7 (1)	-
CTX-M-65		47,9 (23)
CMY-2	6,6 (9)	6,3 (3)
SHV	3,7 (5)	
SHV-12	2,9 (4)	-
SHV-2	-	6,3 (3)
SHV-2a	0,7 (1)	-
TEM-52	1,5 (2)	-

Antibiotische Behandlungen

In insgesamt 44 von 48 Betrieben wurden die untersuchten Herden einer antibiotischen Behandlung unterzogen, wobei 25 der 45 Aufzuchtherden und 44 der 47 Mastherden behandelt waren. Von 19 Aufzuchtherden mit positivem ESBL-/AmpC-*E. coli*-Status erhielten neun Antibiotika und von 26 mit negativem Ergebnis wurden 16 antibiotisch behandelt. Alle Mastherden mit positivem Status wurden mit Antibiotika behandelt und 23 der 26 negativen Mastgruppen. Es wurden Betalaktam-Antibiotika verabreicht (Amoxicillin, Benzylpenicillin) sowie Sulfonamide, Colistin, Enrofloxacin, Doxycyclin, Tylosin, Lincomycin, Tiamulin und

Neomycin. Die Anzahl der antibiotischen Behandlungen variierte in den Mastherden zwischen einer einmaligen bis hin zu 16 (mit spezifischer Therapiedauer). Es gab sowohl negative Mast- als auch Aufzuchttherden, die eine hohe Anzahl antibiotischer Behandlungen vorwiesen (siehe Anhang, Tabelle 24)

4.3 Ergebnisse der Langzeitstudie

Die detaillierten Ergebnisse für die einzelnen Betriebe zeigen Tabelle 14 für die Untersuchungen der Tiere sowie der Tierumgebung im Stall und Tabelle 17 für die Untersuchungen der Stallumgebung sowie dafür relevante Stallproben (Staub und Luft). Die quantitativen Untersuchungen der Tier- bzw. Umgebungsproben sind in Tabelle 15 sowie Tabelle 23 zusammengefasst (siehe Anhang, Tabelle 23).

Jeder Betrieb wurde zur Einstellung der Eintagsküken (Zeitpunkt 1), zur Mastmitte (Zeitpunkt 2) sowie zum Ender der Mast (Zeitpunkt 3) untersucht.

Untersuchung der Tiere und Tierumgebung

Tabelle 14: ESBL-/AmpC-bildende *E. coli* in verschiedenen Proben im Stall sowie der Einzeltieruntersuchungen innerhalb der Langzeitstudie zu drei verschiedenen Zeitpunkten (1, 2, 3)

Betrieb	Umgebungs- tupfer (n=4) in %			Tränkwasser			Futter			Sockentupfer Stall			Kükenwindel/ Sammelkot			Kloakentupfer (n=20) in %			Null- proben	
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	01*	02*
1	-	25	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	40	-	-	-
2	-	25	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	90	90	-	-
3	-	-	50	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	5	75	-	-
4	-	25	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	5	-	-	-
5 [#]	-	25	25	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	100	50	-	+
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	60	5	-	-
7	-	25	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	95	10	-	-
Gesamt in %	-	18	11	-	57	57	-	57	57	14	100	71	-	100	57	-	56	33	-	14

*01=Nullprobe vor Einstellung der Küken, 02= Nullprobe vor Umstallung in den Maststall

Alter der Küken zu Zeitpunkt 1 hier 3 Tage, bei allen anderen Betrieben 1 Tag

+ = positiv für ESBL-/AmpC-*E. coli*; - = negativ für ESBL-/AmpC-*E. coli*

Zum Zeitpunkt der ersten Beprobung waren, mit Ausnahme eines Betriebes, alle Proben der Tiere sowie der Tierumgebung im Stall ESBL-/AmpC-negativ. In Betrieb 5 war der Sockentupfer im Stall positiv, bei dieser Herde wurden die Tiere jedoch unerwartet früher eingestallt und waren daher bei der Beprobung bereits 3 Tage alt. Erwähnenswert sind die negativen Ergebnisse der frisch eingestellten Küken sowie der Kükenwindeln. Alle anderen Proben im Stall sowie die Nullproben, welche vor Einstellung entnommen wurden, waren ebenfalls negativ.

Zum Zeitpunkt der zweiten Beprobung zur Mastmitte waren die Tiere bereits vom Aufzuchtstall in den Maststall umgestallt. Hier wurden ESBL-/AmpC-*E. coli* regelmäßig gefunden. So waren die Sammelkotprobe, der Sockentupfer sowie auch Einzeltiere in unterschiedlicher Prävalenz in jedem Betrieb positiv. Aber auch bei anderen Probenarten wie Tupfer der Umgebung, Tränkwasser, Futter oder Staub (Tabelle 17) wurden die resistenten

Bakterien detektiert. Die Einzeltierprävalenzen variierten zwischen 5 und 100 %, wobei bei den hochprävalenten Betrieben (Nr. 2, 5 und 7) tendenziell auch die Tierumgebung stärker belastet war. So waren genau bei diesen drei Betrieben beispielsweise auch die Stallstaubproben zu dem zweiten Zeitpunkt ESBL-/AmpC-positiv (Tabelle 17). Der Betrieb 5 mit einer Einzeltierprävalenz von 100% wies zudem eine positive Nullprobe des Maststalls auf, in welchen die Tiere nach der Aufzuchtphase verbracht wurden. Die Befragung der Betriebe ergab, dass eine Nassreinigung unter Hochdruck und anschließender Trocknung in allen Ställen vor Neubelegung mit Tieren erfolgte und außerdem eine Desinfektion der Tränken, Futtertröge, Böden und Wände. Die Luftschächte und die Außenanlagen wurden hingegen weniger konsequent desinfiziert.

Zum Zeitpunkt der dritten Beprobung zum Mastende wiesen zwei Betriebe (Nr. 1 und 4) einen komplett ESBL-/AmpC-negativen Status auf. Auch alle Tier- sowie Stallproben waren negativ. Lediglich im Mist, welcher außerhalb des Stalls gelagert wurde, wurden bei Betrieb 1 ESBL-/AmpC-*E. coli* nachgewiesen. Bezogen auf die Einzeltiere war Betrieb 4 schon zur Mastmitte mit 5 % positiven Kloakentupfer eher niedrigprävalent, Betrieb 1 lag mit 40 % im mittleren Bereich. Beide Betriebe wiesen allerdings zum Zeitpunkt 2 noch verschiedene ESBL-/AmpC-positiv Tierumgebungsproben auf. Die quantitativen Untersuchungen (Tabelle 15) zeigen, dass in Betrieb 1 auch zur Mastmitte hin lediglich drei von acht positiven Kloakentupfern quantifizierbar waren und dabei geringe Keimzahlen aufwiesen. Bei der Untersuchung des Sockentupfers im Stall jedoch war eine quantitative Bestimmung der ESBL-/AmpC-*E. coli* möglich, wobei die Konzentration mit $2,4 \times 10^6$ KbE/Tupfer im oberen Bereich lag. Jedoch zeigte sich der Stall zum letzten Beprobungszeitpunkt komplett negativ. Im Betrieb 4 konnte zum Zeitpunkt 2 keiner der wenigen positiven Kloakentupfer quantifiziert werden, jedoch die Tränkwasser-, sowie Sockentupferprobe mit Keimzahlen im Bereich von 10^2 bzw. 10^3 KbE/ml bzw. Tupfer. In den Betrieben Nr. 5, 6 und 7 sank die Einzeltierprävalenz bei positiver Tierumgebung ab, obwohl stets sehr viele der positiven Kloakentupfer zum 2. Zeitpunkt quantifizierbar waren. Bei Betrieb Nr. 6 waren lediglich noch 5% der Einzeltiere ESBL-/AmpC-*E. coli*-positiv und auch nur noch eine Tierumgebungsprobe (Sockentupfer). Betrieb 5 zeigte zum Mastende zwar noch 10/20 positive Kloakentupfer, jedoch waren nur noch zwei Tupfer quantifizierbar. Bei den anderen konnten nur noch im Anreicherungsverfahren die ESBL-/AmpC-Bildner nachgewiesen werden. Betrieb 2 zeigte keine Veränderung der Einzeltierprävalenz sowie auch kaum Veränderungen der positiven Tierumgebung, in Betrieb 3 stieg sogar die Einzeltierprävalenz von 5 % auf 75 % an, verbunden mit einem Anstieg an quantifizierbaren Proben der Einzeltiere aber auch der Tierumgebung.

Tabelle 15: Anzahl ESBL-/AmpC-bildender *E. coli* und Gesamt-*E. coli* der Einzeltier-Kloakentupfer der sieben Betriebe der Langzeitstudie zu den verschiedenen Zeitpunkten

in KbE/g , $x^- geom$ *

Betriebs-Nr.	Zeitpunkt 2			Zeitpunkt 3		
	MC+	MC-	Anteil ESBL-/AmpC-verdächtige <i>E. coli</i> an Gesamt- <i>E. coli</i> in %	MC+	MC-	Anteil ESBL-/AmpC-verdächtige <i>E. coli</i> an Gesamt- <i>E. coli</i> in %
1	1,36*10 ² (n=3)	9,56*10 ⁵ (n=3)	0,01	-	-	
2	1,63*10 ³ (n=16)	1,32*10 ⁵ (n=16)	1,24	1,54*10 ⁴ (n=18)	4,61*10 ⁵ (n=18)	3,34
3	-	-		5,51*10 ² (n=3)	1,91*10 ⁵ (n=3)	0,29
4	-	-		-	-	
5	2,64*10 ⁴ (n=20)	1,26*10 ⁵ (n=20)	20,90	6,36*10 ² (n=2)	2,90*10 ⁵ (n=2)	0,22
6	1,72*10 ⁴ (n=9)	2,76*10 ⁵ (n=9)	6,23	-	-	
7	3,54*10 ³ (n=14)	1,20*10 ⁵ (n=14)	2,96	5,61*10 ² (n=4)	1,82*10 ⁴ (n=4)	3,08
GESAMT	5,96E+03 (n=62)	1,56E+05 (n=62)	3,82	5,14*10 ³ (n=27)	2,50*10 ⁵ (n=27)	2,06

* zum Zeitpunkt 1 war keine der Proben quantifizierbar, daher bleibt dieser in der Tabelle unberücksichtigt.

Ein Vergleich der Anteile positiver Kloakentupfer der sieben Betriebe zu den verschiedenen Zeitpunkten mittels Friedman-Test ergab, dass zwischen dem ersten und zweiten Zeitpunkt die Prävalenz signifikant ansteigt (siehe Markierung, Tabelle 16).

Tabelle 16: Friedmantest zwecks Varianzanalyse für verbundene Stichproben bei nicht normalverteilten Daten

Stichprobe1- Stichprobe2	Teststatistik	Standardfehler	Standard Teststatistik	Signifikanz	Angepasste Signifikanz
ZP 1 – ZP 3	-0,929	0,535	-1,737	0,082	0,247
ZP 1 – ZP 2	-1,643	0,535	-3,074	0,002	0,006
ZP 3 – ZP 2	0,714	0,535	1,336	0,181	0,544

ZP-Zeitpunkt

Untersuchung der Luft, Staub und Bodenoberflächen in der Stallumgebung

Tabelle 17 zeigt die Ergebnisse der Untersuchung der Tierstallumgebung sowie die für einen Austrag relevante Proben, wie Staub, Stallluft und Mist. Dabei wurde die Bodenoberfläche mit Hilfe von Sockentupfern in verschiedenen Abständen zum untersuchten Stallgebäude auf der windabgewandten Lee-Seite und auch in einer Distanz auf der windzugewandten Luv-Seite beprobt. Proben der Umgebungsluft wurde in 50 m Abstand auf der Lee-Seite sowie in 100 m Abstand auf der Luv-Seite gesammelt.

Tabelle 17: ESBL-/AmpC-bildende *E. coli* in Boden- und Luftproben außerhalb des Stalls sowie von Staub und Luft innerhalb des Stalls zu drei Zeitpunkten im Rahmen der Langzeitstudie

Betrieb	Lee						Im Stall		Luv		Mist-lager
	ST 1000m	ST 500m	ST 300m	ST 150m	ST 50m	Luft 50m	Staub	Luft Stall	ST 100m	Luft 100m	
1	- /- /o	- /- /-	- /- /-	- /- /-	- /- /-	- /- /-	- /- /-	- /- /-	- /- /-	- /- /-	- /- /+
2	- /- /-	- /- /-	- /- /-	- /- /-	- /- /-	- /- /-	- /+ /+	- /- /-	- /- /-	- /- /-	- /- /+
3	- /- /-	- /- /-	- /- /-	- /- /+	+ /- /+	- /- /-	- /- /+	- /- /-	+ /+ /-	- /- /-	o
4	+ /- /-	+ /- /-	+ /- /-	+ /- /-	+ /- /-	- /- /-	o /- /-	- /- /-	+ /- /-	- /- /-	+ /- /-
5	- /- /-	- /- /-	- /- /o	- /- /-	- /+ /-	- /- /-	- /+ /-	- /- /-	- /- /+	- /- /-	o
6	- /- /-	- /- /-	- /- /-	- /- /-	- /- /-	- /- /-	o /- /-	- /- /-	- /- /-	- /- /-	o
7	- /- /-	- /- /o	- /- /o	- /- /-	- /+ /-	- /- /-	- /+ /-	- /- /-	- /+ /-	- /- /-	o

Die drei Zeitpunkte (1, 2, 3, siehe Tabelle 14) sind hier durch den Schrägstrich getrennt

ST=Sockentupfer, + = positiv für ESBL-/AmpC-*E. coli*; - = negativ für ESBL-/AmpC-*E. coli*; o = keine Probenahme möglich

In keiner der Außenluftproben wurden ESBL-/AmpC-*E. coli* oder andere ESBL-/AmpC-Enterobakterien detektiert. Die umgebenen Bodenoberflächen von Betrieb 1, 2 und 6 waren zu jedem Zeitpunkt ESBL-/AmpC-*E. coli*-negativ und dies obwohl beispielsweise Betrieb 2 ein eher hochprävalenter Betrieb mit positiven Stallstaubproben zum zweiten und dritten Zeitpunkt war. Bei den anderen Betrieben waren die Bodenoberflächen vereinzelt positiv, meist in der näheren Stallumgebung bis zu 150 m auf der Lee-Seite bzw. 100 m auf der Luv-Seite. Eine Ausnahme stellt hier Betrieb 4 dar, bei welchem zum Zeitpunkt 1 alle Bodenoberflächen einschließlich in der größten Entfernung vom Stall (1000 m) ESBL-/AmpC-*E. coli*-positiv waren. Auch auf der Luv-Seite war der Boden kontaminiert. Erwähnenswert ist, dass keine der Proben der Bodenoberflächen um die Stallgebäude quantifizierbar war, sondern nur qualitativ

im Anreicherungsverfahren ESBL-/AmpC-*E. coli* nachweisbar waren. Das weist auf eine sehr niedrige Konzentration resistenter Bakterien in der Umgebung hin.

Die untersuchten Bodenoberflächen, welche in Abhängigkeit von der bei der Probenahme vorherrschenden Windrichtung ausgewählt wurden, waren von unterschiedlichster Qualität und Nutzung. Es handelte sich dabei um Grünflächen, Felder oder auch Wege.

Dem Austrag über die Stallabluft ist nach vorliegenden Daten keine größere Rolle zuzuschreiben, wie aus den negativen Luftproben zu schließen ist. Es wird zwar im Staub von vier Betrieben der Langzeitstudie sowie in 18,5 % aller Staubproben der Querschnittsstudie gefunden und somit ist auch ein potenzieller Austrag mit dem Staub über die Lüftung möglich, es handelt sich jedoch höchstwahrscheinlich um eher geringe Keimmengen, was durch die quantitativen Ergebnisse der Staubproben der Querschnittsstudie (Tabelle 12) untermauert wird.

Wetteraufzeichnung

Die mobile Wetterstation zeichnete Windgeschwindigkeit, Windrichtung sowie die Lufttemperatur und -feuchtigkeit im Außenbereich im Minutentakt parallel zur Probenahme auf. Aus den gemessenen Werten wurden dann die in Tabelle 20 dargestellten Mittelwerte gebildet (siehe Anhang, Tabelle 20). Zur Gegenüberstellung sind ergänzend die Lufttemperatur und -feuchtigkeit im Stall aufgeführt. Während der ersten Beprobung des dritten Betriebes, der zweiten des fünften Betriebes sowie der dritten Probenahme des siebenten Betriebes konnten auf Grund technischer Probleme nur wenige oder gar keine Werte aus der Windmessung aufgezeichnet werden.

Enzymgenotypisierung ESBL-/AmpC-verdächtiger Isolate aus der Langzeitstudie

Auch alle phänotypisch verdächtigen *E. coli*-Isolate mit positivem PCR-Ergebnis aus der Langzeitstudie wurden hinsichtlich des genauen ESBL-/AmpC-Typs sequenziert (Tabelle 18).

Es wurden vorrangig ESBLs vom Typ CTX-M gefunden, häufig in Kombination mit TEM. Vereinzelt waren auch *E. coli* mit einem SHV-12-Enzymtyp nachweisbar. Ordnet man die untersuchten Probenarten zu den jeweiligen Genen bzw. Gen-Kombinationen zu, ist festzustellen, dass Isolate, welche direkt vom Tier stammen, wie Kloakentupfer, gleiche Gen-Kombinationen aufweisen wie Isolate aus der unmittelbaren Tierumgebung. Legt man den Fokus auf die Kontamination der Bodenoberflächen um das Stallgebäude, sieht man in allen

Betrieben, die ESBL-/AmpC-positive Bodenoberflächen vorwiesen (Betrieb 1, 3, 4, 5 und 7), einen potenziellen Zusammenhang zu Isolaten aus dem Stall. Dabei wurden häufig zum gleichen Probenahmezeitpunkt gleiche ESBL-Gen-Kombinationen in Isolaten der Tiere, der Tierumgebung sowie der Stallgebäudeumgebung gefunden. Bei Betrieb 4, bei welchem zum Zeitpunkt 1 in vielen Proben der Bodenoberflächen ESBLs vom CTX-M-15-Typ nachgewiesen wurden, jedoch keine der Stall-Proben positiv war, findet man genau diesen Typ zum Zeitpunkt 2 in den verschiedenen Proben innerhalb des Stalls wieder. Außerdem weist auch der Mist Isolate mit gleichen Enzym-Typen auf wie die Umgebung. Ähnlich verhält es sich im Betrieb 3 für Isolate der Gen-Kombination *bla_{SHV-12}* und *bla_{TEM-135}*. Hier tauchen in Isolaten aus dem Stall jedoch noch zusätzlich *E. coli* mit einem *bla_{CTX-M}*-Gen auf, die nicht in der Stallgebäudeumgebung gefunden wurden.

Tabelle 18: Enzym-Typen der ESBL-/AmpC- *E. coli* der Langzeitstudie

Betrieb	Zeitpunkt der Probenahme	Enzym-Typ	ESBL-/AmpC-positive <i>E. coli</i> von n=198	Probenart im Stall	Probenart der Stallumgebung
1	2	CTX-M-32	11	STs, UT, KT, SK, Fu	ST 50
		CTX-M-32, TEM-1	1	KT	
	3	CTX-M-32	1		Mi
2	2	CTX-M-32	24	STs, UT, KT, SK, SS, TW, Fu	
	3	CTX-M-14	23	STs, KT, SK, SS, Fu	Mi
		CTX-M-14, TEM-1	1	TW	
3	1	SHV-12, TEM-1	1		STa50
		SHV-12, TEM-135	1		STa100
	2	CTX-M-15	1	STs	
		CTX-M-15, TEM-135	1	SK	
	3	SHV-12, TEM-135	2	KT	STa100
		CTX-M-15	17	KT, SK, SS, Fu	
		CTX-M-15, TEM-135	5	KT, TW	
		SHV-12, TEM-135	1	KT	
		SHV-12	1		STa50
	4	1	CTX-M-15	5	
CTX-M-15, TEM-135			2		STa100, STa500
2		CTX-M-15	5	STs, UT, KT, SK, TW	
5	1	CTX-M-1, TEM-1	1	STs	
	2	CTX-M-1	29	STs, UT, KT, SK, SS, TW, Fu, ES0, UT20	STa50
	3	CTX-M-1	16	STs, UT, KT, SK, TW, Fu	STa100
6	2	CTX-M-1	12	STs, KT, SK	
		CTX-M-1, TEM-1	2	KT	
	3	CTX-M-1, TEM-1	2	STs, KT	
7	2	CTX-M-1	16	UT, KT, TW, Fu	STa100, STa50
		CTX-M-1, TEM-1	10	KT, SK	
		CTX-M-15, TEM-1	1	SS	
	3	CTX-M-15, SHV-1	1	KT	
		CTX-M-15 + TEM-135	1	KT	
		CTX-M-15, SHV-1, TEM-135	4	STs, TW, Fu	

5. Diskussion

Die Erforschung ESBL-/AmpC-bildender Enterobakterien zum besseren Verständnis der Resistenzlage, Besiedelungsdynamiken und Transmissionswege ist auf Grund der nach wie vor großen weltweiten Bedeutsamkeit in allen relevanten Feldern voranzutreiben. Bezüglich der Tierart Pute ist die Datenlage noch lückenhaft. Es existieren bis jetzt keine Querschnittsstudien zur Prävalenz ESBL-/AmpC-bildender Enterobakterien bei Mastputen in Deutschland. Darüber hinaus sind Publikationen zur Entwicklung der Prävalenz innerhalb einer Mastperiode sowie im Zusammenhang mit dem Tierbestand bestehende Transmissionswege zu Puten bisher nicht verfügbar. Die Datenlage konzentriert sich aktuell vor allem auf Masthühner, da sie die am weitesten verbreitete Nutzgeflügelart sind (Geser et al. 2012; Dierikx et al. 2013a; Saliu et al. 2017a). Ob die Resistenzlage bei Enterobakterien hinsichtlich der Bildung von ESBLs/AmpCs bei Mastputen vergleichbar ist und sich die Prävalenzen innerhalb der Mastputenbestände analog verhalten, ist nicht geklärt. Diese Wissenslücken sollten mit den validen Daten dieser Arbeit geschlossen werden.

Analog zu den Studien des Forschungsverbundes RESET zu Masthühnern, -schweinen und Rindern (RESET I, Hering et al. (2014); Hering et al. (2016), Schmid et al. (2013)) wurden in einer **Querschnittsstudie** erstmals repräsentativ Mastputenbestände deutschlandweit auf das Vorkommen ESBL-/AmpC-bildender Enterobakterien hin untersucht. Das einheitliche Vorgehen der Studien innerhalb des Forschungsverbundes macht die Ergebnisse sehr gut vergleichbar und erhöht die Aussagekraft (Valentin et al. 2014).

Weiterhin wurden im Rahmen einer **Langzeitstudie** mittels Probenahme von Tier-, Stall-, Umgebungs- und Luftproben sieben konventionell bewirtschaftete Mastputenbetriebe dreimalig innerhalb einer Mastperiode systematisch analysiert. So konnten die Einzeltierprävalenzen sowie Eintrags- und Verbreitungswege der resistenten Bakterien zum ersten Mal erfolgreich dargestellt und mit der Datenlage bei Mastschweinen und Masthühnern verglichen werden. Das Vorgehen entsprach ebenfalls den vorangegangenen Langzeitstudien des RESET-Verbundes (RESET II, Laube et al. (2013); Laube et al. (2014); Von Salviati et al. (2014); Von Salviati et al. (2015)).

5.1 Querschnittsstudie

Vergleich zu Masthähnchen

Im Rahmen der Querschnittsstudie des Forschungsverbundes RESET zu Masthähnchen wurden 59 Herden von insgesamt 34 Masthähnchenbetrieben auf das Vorkommen von ESBL-/AmpC-verdächtige *E. coli* untersucht. In deren Ergebnis lag die Herden- und auch

Betriebsprävalenz bei 100 % (Hering et al. 2016). Dies ist deutlich höher als die in dieser Studie erhobene Prävalenz von 60,4 % für ESBL-/AmpC-produzierende *E. coli* in Putenmastbetrieben (Fisher-Test, $p < 0,01$). Bei Dierikx et al. (2013a) wurden ebenfalls alle der 26 Betriebe positiv auf die resistenten Bakterien getestet. Bei 22 der 26 Betriebe lag die Prävalenz in der Herde darüber hinaus bei über 80%. Auch andere Studien berichten von hohen Prävalenzen in Geflügelhaltungen (Saliu et al. 2017a).

Im Gegensatz zu den im RESET-Projekt untersuchten Masthähnchenbetrieben wurden in diesem Projekt Betriebe identifiziert, deren entnommene Proben vollständig negativ getestet wurden. Die Gründe, weshalb einige Betriebe einen positiven, andere einen negativen Status aufwiesen, waren anhand der erhobenen Daten nicht offensichtlich. Die Nachweisraten der verschiedenen Probenarten waren in den Masthähnchenbetrieben mit 82 % positiven Sammelkotproben ($n = 177$), 80 % positiven Sockentupferproben ($n = 59$) und 63 % positiven Sammelstaubproben ($n = 59$) signifikant höher als in den Putenmastbetrieben mit 30,4 % bei Sammelkot, 39,1 % bei Sockentupfer und 18,5 % bei Sammelstaub. (Fisher-Test für die einzelnen Probenarten, $p < 0,01$). Im Vergleich zu den Puten ergab die quantitative Untersuchung der Sammelkotproben und -staubproben bei den Masthähnchen eine um ca. eine Logstufe höhere Zellzahl. Das bedeutet, dass nicht nur die Prävalenz auf Betriebsebene, sondern auch die Belastung in den einzelnen Proben bei Mastputen niedriger als bei Masthähnchen ist. Grund hierfür könnte sein, dass auch auf Ebene des einzelnen Tieres die Prävalenz niedriger ist und in der Folge auch der Anteil positiver Tiere in einer Sammelkotprobe. Ist der Anteil positiver Tiere niedriger, erklärt dies auch die niedrigere Belastung in den Staubproben. In anderen Studien bei Nutztieren erfolgte meist keine quantitative Bestimmung der ESBL-/AmpC-bildenden *E. coli*, so dass die Konzentration an resistenten Bakterien auf Probenebene und ihre Entwicklung in einer Mastperiode nur mit wenigen Daten verglichen werden kann. Grund hierfür könnte sein, dass es sich bei der quantitativen Untersuchung um eine sehr aufwendige Methode handelt. Eine Bestimmung lohnt sich jedoch, da die bakterielle Keimzahl ein wichtiger Parameter ist, um das Risiko einer Verbreitung von antibiotikaresistenten Bakterien abschätzen zu können.

Bei fast allen phänotypisch im Agar-Diffusionstest ESBL-/AmpC-bildenden *E. coli*-Isolaten wurde letztlich eines der vier untersuchten ESBL-/AmpC-Gene gefunden (137/147). Jedoch waren nur 45 der 137 genotypisch bestätigten Isolate auch quantifizierbar. Das heißt, dass die Konzentration an den resistenten Bakterien bei zwei Dritteln der Proben so gering war, dass sie nur durch einen Voranreicherungsschritt in der Probenbearbeitung nachweisbar wurde. Bei einem initialen Screening der Betriebe auf ESBL-/AmpC-bildende Bakterien sollte also immer eine Kultivierung der Bakterien mittels Voranreicherung erfolgen, um die Nachweishäufigkeit zu erhöhen.

In Masthähnchenhaltungen wird permanent sehr viel Staub produziert, der auch zu einem großen Teil aus Federstaub, Einstreu und Kotpartikeln besteht. Bei den Putenhaltungen würde man eine vergleichbare Situation wie bei den Masthähnchenbetrieben vermuten, findet aber niedrigere Nachweisraten. Dies könnte mit den unterschiedlichen Umweltbedingungen wie Temperatur und Luftfeuchte zusammenhängen, mit den Haltungsbedingungen, wie der Belegungsdichte, mit der Aktivität der Tiere oder auch mit der grundlegenden Beschaffenheit des Einstreumaterials mit unterschiedlichem Feuchtigkeitsgrad und/oder pH, des Kot sowie der Hautschuppen und Federn, welche Einfluss auf die Staubentwicklung, -zusammensetzung und aerogene Ausbreitung der resistenten Erreger nehmen und so Differenzen zwischen den Prävalenzen der Masthähnchen- und Putenmastbetriebe erklären könnten (Sauter et al. 1981; Guardia et al. 2011; Hering et al. 2014; Zhao et al. 2014; Hering et al. 2016). Systematische Laborstudien zu diesen Zusammenhängen wurden hierzu bislang jedoch insbesondere bei oder im Vergleich zu Puten noch nicht durchgeführt.

Auf Grund der im Vergleich zu den anderen Probenarten hohen Nachweisrate in den Sockentupfern, sind diese eine sehr gut geeignete Probe zur Bestimmung des ESBL-/AmpC-Status eines Putenmastbetriebes, welche zudem schnell und einfach im Tierstall zu nehmen ist. Der initiale Nachweis (z.B. im Rahmen eines Monitorings) könnte also beispielsweise schon durch eine unkompliziert durchführbare Sockentupfer-Probenahme erreicht werden. Aber auch die Sammelkotproben eignen sich grundsätzlich gut zur Bestimmung des ESBL-/AmpC-Status. Bei Mastschweinen- und -hühnern der RESET-Studie waren die Prävalenzen ESBL-/AmpC-bildender Enterobakterien in Sammelkot- und Sockentupfern ähnlich hoch (Hering et al. 2014; Hering et al. 2016). Jedoch waren auch in diesen Studien die Nachweishäufigkeiten in diesen beiden Probenarten auch in diesen Studien im Vergleich zum Staub höher.

Die vergleichende Untersuchung von verschiedenen Probenmaterialien ist eine Besonderheit der RESET-Studien. Bei den meisten internationalen Studien wurden lediglich Kotproben auf ESBL-/AmpC-bildende Bakterien hin untersucht (Machado et al. 2008; Costa et al. 2009; Geser et al. 2012; Ceccarelli et al. 2019). Neben der Prävalenzermittlung unter den Tieren im Hinblick auf ihre Rolle als Reservoir für ESBL-/AmpC-bildende Enterobakterien, war das Ziel der RESET-Studien eine Einschätzung, auf welchen Wegen eine Emission der resistenten Bakterien in die Umgebung der Tiere erfolgt. Die Entnahme von Proben verschiedenen Ursprungs erlaubt hierzu erste Rückschlüsse.

Hinsichtlich der detektieren ESBL-/AmpC-Genen in den verdächtigen *E. coli*-Isolaten war im Gegensatz zu den Puten, bei denen überwiegend die ESBL-Gene *bla_{CTX-M}* gefunden wurden, bei den Masthähnchen-Isolaten aus dem RESET-Verbund vor allem das Gen *bla_{CMY}* sowie *bla_{SHV-12}* dominierend, gefolgt von *bla_{CTX-M-1}* und *bla_{TEM-52}* (interne Daten des RESET-I-Verbundes). Die Ergebnisse anderer Studien bestätigen das häufige Vorkommen dieser Gene

bei Masthühnern (Ewers et al. 2012; Dierikx et al. 2013b; Friese et al. 2013a; Ewers et al. 2021). Da bei Puten neben den ESBL-Typen CTX-M-1 auch CTX-M-14 und -15 häufig vorkamen, bedeutet dies eventuell, dass sich die ESBL-/AmpC-bildenden *E. coli* bei Pute und Masthähnchen zumindest auf regionaler Ebene epidemiologisch unterscheiden. Für valide Aussagen hierzu sind allerdings weitere Untersuchungen wie u.a. die Bestimmung der phylogenetischen Gruppe und des Sequenztyps notwendig. Vergleichbare Ergebnisse der genotypischen Untersuchung ergab die zu Puten durchgeführte Studie im Vereinigten Königreich (Randall et al. 2011), die ebenfalls die ESBL-Typen CTX-M-14, -M-15 und -M-1 häufig nachwies. Die in dieser Studie seltener nachgewiesenen Typen CTX-M-55, -M-27 und -M-32 wurden bereits beim Masthuhn und bei der Pute isoliert (Cortés et al. 2010; Randall et al. 2011; Zhang et al. 2016). Ebenfalls selten wurde der SHV-12-Typ detektiert, der wiederum in Untersuchungen von Putenmastherden bei Dolejska et al. (2011) dominierte. Der AmpC-Beta-Laktamase Typ CMY-2 wurde sporadisch in der vorliegenden Studie nachgewiesen. In anderen Studien bei Mastputen wurde meist nicht auf diesen AmpC-Typ hin untersucht (Dolejska et al. 2011; Randall et al. 2011). Da *bla_{CMY}* in zahlreichen Studien bei Broilern das dominierende Gen war (Smet et al. 2008; Laube et al. 2013), wird die Vermutung gestützt, dass kein enger epidemiologischer Zusammenhang zwischen den Isolaten der beiden Geflügelarten besteht. Da sich abgesehen von den Studien zu Broilern wenige Publikationen mit dem Vorkommen der AmpC-bildenden Bakterien bei Tieren beschäftigen, sondern meist eine Fokussierung auf die ESBL-Gene erfolgt, könnten hier weiterführende Studien die Wissenslücke schließen.

Vergleich zu Mastschweinen

Im Vergleich der europäischen Länder stellt sich die Resistenzlage mit einem starken Gefälle dar. Im Norden wurden verbreitet sehr niedrige Prävalenzen ESBL-bildender *E. coli* von unter 1% beobachtet, während in Südeuropa die Mastschweinebestände hochprävalent waren. Die höchsten Prävalenzen wurden hier in Spanien mit über 80% ermittelt (Bergšpica et al. 2020). Auch die Prävalenz in 48 untersuchten deutschen Schweinemastbetrieben war mit 85,4 % ESBL-/AmpC-verdächtigen Betrieben sehr hoch und zudem signifikant höher als bei den in dieser Studie untersuchten Putenbetrieben (Fisher-Test, $p < 0,01$) (Hering et al. 2014). Die Nachweisraten in den einzelnen Probenarten aus den Schweinebetrieben waren bei Sammelkot mit 61,5 % verdächtigen Proben und Sockentupfer mit 54,2 % ebenfalls deutlich höher (Fisher-Test, $p < 0,01$), beim Sammelstaub mit 10,5 % ähnlich hoch (Fisher-Test, $p > 0,05$) wie bei den hier untersuchten Putenmastbetrieben. Da sie oft ohne Einstreu gehalten werden, fällt bei den konventionellen Schweinemastbetrieben weniger Staub an, der vor allem aus Futterstäuben besteht und bei der Sammlung wahrscheinlich auch schon länger

abgelagert war. Dies erklärt die niedrigen Nachweisraten ESBL-/AmpC-bildender Enterobakterien in den Staubproben aus Schweinehaltungen.

Die Enzymtypen waren bei den ESBL-/AmpC-Isolaten der Mastschweinebetriebe fast ausschließlich CTX-M-1, welche auch in den Putenhaltungen vorrangig zu finden waren. Die sporadisch bei Puten detektierten ESBL-Typen CTX-M-9, -14, -15, TEM-52, SHV-12 oder CMY-2 traten auch bei Schweinen selten auf. Der bei Schweinen nachgewiesene ESBL-Typ CTX-M-24 wurde bei Puten jedoch nicht gefunden.

Vergleich zu Rindern

Bei 45 in Bayern untersuchten Rinderbetrieben lag die Betriebsprävalenz für ESBL-bildende *E. coli* bei 86,7 %, also auch signifikant höher als in den Putenmastbetrieben (Fisher-Test, $p < 0,01$) (Schmid et al. 2013). Die Nachweisraten der einzelnen Probenarten waren für alle drei (Sammelkot: 34,4 %, Sockentupfer: 27,3 % und Sammelstaub: 15,4 %) ähnlich wie in der vorliegenden Studie (Fisher-Test, $p > 0,05$). Auch hier erfolgten Nachweise der Resistenzträger v.a. im Sockentupfer und am wenigsten in der Staubprobe. Bei Kälbern wurden signifikant häufiger ESBL-bildende *E. coli* gefunden als bei Kühen (55,7% vs. 37,3%, $p=0,002$, Schmid et al. (2013)). Eine kürzlich durchgeführte Studie zum Vorkommen ESBL-bildender Enterobakterien bei Kälbern beschreibt sogar eine Prävalenz von 96,5% auf individueller Ebene (Waade et al. 2021). Auch Heuvelink et al. (2019) ermittelten in den Niederlanden bei den jüngeren Tieren die höhere Prävalenz. Sie stellten zudem fest, dass auch die Menge der ausgeschiedenen ESBL-/AmpC-bildenden *E. coli* bei Kälbern größer war als bei älteren Tieren.

Auch bei den in der vorliegenden Studie untersuchten Mastputen unterschieden sich die Keimzahlen der Sammelkotproben der beiden Altersgruppen signifikant. Die jüngeren Tiere schieden in größerer Menge ESBL-/AmpC-bildende *E. coli* aus. Die Prävalenzen liegen bei beiden Altersgruppen der Puten mit 29,8% unter jener der Kühe und Kälber in der Studie von Schmid et al. (2013). In anderen Prävalenzstudien konzentrieren sich die Untersuchungen oft nur auf eine Altersgruppe, so dass zu den Prävalenzen in den verschiedenen Altersgruppen wenig vergleichbare Daten verfügbar sind.

Die Enzymtypen wurden in den ESBL-/AmpC-Isolaten der Rinder wie bei den Isolaten der Putenbetriebe fast ausschließlich dem CTX-M-Typ zugeordnet, mit CTX-M-1 als dominierenden Typ, gefolgt von CTX-M-14 und CTX-M-15.

Weitere Einflussfaktoren auf die Prävalenz

Als Ursache, für die im Vergleich zu Masthähnchen niedrigere Prävalenz, könnten die antibiotischen Behandlungen vermutet werden. Bei 25 der 45 Aufzuchtherden und 44 der 47 Mastputenherden wurden Antibiotika eingesetzt. Von 19 Aufzuchtherden mit positivem ESBL-/AmpC-*E. coli*-Status erhielten neun Antibiotika und von 26 mit negativem Ergebnis wurden 16 antibiotisch behandelt. Es gab sowohl negative Mast- als auch Aufzuchtherden, die eine hohe Anzahl antibiotischer Behandlungen vorwiesen (siehe Anhang, Tabelle 24). Die Prävalenz scheint also auch von anderen Faktoren als der Antibiotikagabe beeinflusst zu sein, wie bei Masthähnchen bereits geschlussfolgert wurde (Hiroi et al. 2012).

Die Bio-Haltungsform und ein Verzicht auf antibiotische Behandlungen ist im Vergleich zur konventionellen Haltung von Broilern mit einem geringeren Auftreten von Resistenzen assoziiert (Pesciaroli et al. 2020). Obwohl Resistenzen durchaus ohne eine Verabreichung von Antibiotika auftreten können (Projahn et al. 2018a), scheint es Zusammenhänge zwischen den eingesetzten Antibiotika und den Resistenzprofilen zu geben (Luiken et al. 2019).

Wie den Daten der Querschnittsstudie entnommen werden kann, ist die Ausstattung mit betriebs- oder stalleigener Kleidung sowie Stiefeldesinfektion sehr unterschiedlich, so dass die Gefahr eines Eintrags in den Tierbestand durch kontaminierte Ausrüstung gegeben sein kann. Die Befragung in der Querschnittsstudie zeigte, dass bestimmtes Equipment, wie Waage, Futterwagen oder Reinigungsgegenstände, nur bei vereinzelt Betrieben einer Zwischendesinfektion unterzogen wurden. Ebenso gab es stalleigene Ausrüstungsgegenstände bei nicht einmal einem Viertel der Betriebe. Das Personal kann auch selbst Träger einer Resistenz sein und bei engem Kontakt als Vektor fungieren (Huijbers et al. 2014; Hering et al. 2016). Da fehlende Ausstattung des Personals mit persönlicher Schutzausrüstung das Risiko einer oral-fäkalen Infektion erhöhen kann (Franceschini et al. 2019), stellt dies auch umgekehrt ein höheres Risiko für eine Übertragung auf die Tiere dar. Auch bei strenger Verwendung von stalleigener Kleidung oder gar personelle Trennung der Betreuung der Produktionsabschnitte oder Betriebsteile (Aufzucht und Mast) kann ein Eintrag der resistenten Bakterien in den Tierbestand gegeben sein, sofern das Hygienemanagement durch ineffiziente Reinigung und Desinfektion mangelhaft ist (Hiroi et al. 2012; Dierikx et al. 2013b).

Alle Außenanlagen um die beprobten Ställe werden regelmäßig einer Nassreinigung unterzogen. Jedoch wurden diese nur in 16 von 45 bzw. 18 von 47 Fällen (Aufzuchtställe bzw. Mastställe) einer Desinfektion unterzogen, so dass bei kontaminierter Stallumgebung ein Eintrag in die Tierumgebung mit deren Kolonisierung wahrscheinlicher ist. Eine Nassreinigung unter Hochdruck und anschließender Trocknung erfolgte in allen Betrieben vor Neubelegung mit Tieren. In fast allen Betrieben wurden zudem mindestens Tränken, Futtertröge, Böden und

Wände desinfiziert. Die Decken und Luftschächte wurden hingegen weniger konsequent desinfiziert, so dass auch hier ein Risiko des späteren Eintrags in die Umgebung frisch eingestallter Tiere besteht. Wie bereits bei Masthähnchen dargestellt wurde, ist nicht nur eine Kolonisierung durch ein mangelhaftes Hygienemanagement möglich, sondern auch eine horizontale Transmission zwischen Herden auf demselben Betrieb (Daehre et al. 2018).

Interessanterweise erfolgte in einem Betrieb grundsätzlich keine Desinfektion der Gerätschaften, Ställe sowie Außenanlagen und es gab keine Reinigungs- und Desinfektionsmöglichkeiten für die Hände und Stiefel, jedoch konnten hier keine ESBL-/AmpC-bildenden Enterobakterien nachgewiesen werden. Die Tiere dieses Betriebes erhielten im Verlauf ihrer Mast auch keine antibiotische Behandlung. Da es sich bei diesem Betrieb dem Studiendesign gemäß ebenfalls um eine konventionelle Putenhaltung handelt, gab es in den Haltungsbedingungen oder der Haltungseinrichtung keine auffälligen Unterschiede, welche den negativen Status erklären könnten. Die Brüterei, aus der die Küken stammten, belieferte auch andere Betriebe dieser Studie, die jedoch ihrerseits einen positiven Status erhielten.

Wie aus den Erhebungen der Querschnittsstudie hervorgeht, werden Flächen um die Putenmastbetriebe darüber hinaus oft nicht betriebseigen bewirtschaftet, weshalb das Eintragsrisiko aus der weiteren Stallumgebung für den Tierbestand schwer abzuschätzen und letztlich zu kontrollieren ist. Auch hier ergibt sich ein gewisses Risiko des vektorvermittelten Eintrags.

Untersuchung verschiedener Enterobakterienspezies

Prävalenzstudien zu ESBL-/AmpC-bildenden Enterobakterien konzentrieren sich fast ausschließlich auf *E. coli* als Indikatorkeim. Es sind kaum Untersuchungen zu anderen Enterobakterien zu finden. Machado et al. (2008) fanden in Geflügelfleisch- und Schweinekotproben *Klebsiella* ssp. (4/18) und *Citrobacter* ssp. (2/18), jedoch ausschließlich *E. coli* (11/18) in den Geflügelkotproben. Die 35 bzw. 20 untersuchten Proben stellen hierbei eine vergleichsweise geringe Stichprobenmenge dar. Zudem stammten die Kotproben aus extensiven Tierhaltungen, was die Vergleichbarkeit mit der hier zu betrachtenden Studie einschränkt. Geser et al. (2012) untersuchten Kotproben verschiedener Nutztiere ebenfalls auf andere Enterobakterien, wurden in den Hühnerkotproben jedoch nicht fündig. Lediglich je ein Isolat *Enterobacter* ssp. (1/91) und *Citrobacter* ssp. (1/91) wurden in einer Schaf- bzw. einer Kälberkotprobe detektiert. Reich et al. (2013) wiesen in zwei Proben von Geflügelschlachtkörpern *Proteus* ssp. (2/70) und in zwei Geflügelkotproben *Enterobacter* ssp. (2/51) nach. Die für die Laboranalyse verwendeten Medien differieren in den hier aufgezählten

Studien teilweise, was eine geringere Nachweisrate erklären könnte. Jedoch wurden alle Proben ebenfalls einem Voranreicherungsverfahren unterzogen.

In dieser Studie wurden alle phänotypisch unterscheidbaren Kolonien untersucht. Neben *E. coli* wurde im Vergleich zu den anderen Studien eine größere Vielfalt an anderen ESBL-/AmpC-bildenden Enterobakterien, wie *Proteus* ssp. (24/48), *Klebsiella* ssp. (10/48), *Enterobacter* ssp. (7/48), *Escherichia* ssp. (5/48) und *Citrobacter* ssp. (2/48), gefunden.

5.2 Langzeitstudie und Transmissionswege

Entwicklung der Einzeltierprävalenzen und Keimzahlen im Laufe einer Mastperiode

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass sich die Resistenzlage über die Länge der Mastdauer, welche bei weiblichen Puten ca. 16-17 und bei den männlichen Tieren ca. 20-21 Wochen beträgt, in verschiedene Richtungen entwickeln kann. Die Einzeltierprävalenzen steigen vom ersten zum zweiten Zeitpunkt signifikant an. Zwischen den beiden Altersgruppen Aufzucht (Zeitpunkt 1) und Mast (Zeitpunkt 2 + 3), wurde hingegen kein signifikanter Unterschied festgestellt. In den hier untersuchten Mastputenbetrieben waren am Mastende zwei von sieben Betrieben ESBL-/AmpC-negativ, bei drei anderen sank die Einzeltierprävalenz im Mastverlauf. Bei den übrigen zwei Betrieben blieb die Einzelprävalenz gegen Ende der Mast im Vergleich zum zweiten Beprobungszeitpunkt auf hohem Niveau stabil oder stieg sogar noch an. Die Ausbreitung im Stall erfolgt v.a. fäkal-oral über kontaminierte Einstreu, Tröge oder Tränken. Der luftgetragene Weg scheint keine größere Rolle zu spielen, obwohl auch in der vorliegenden Studie vereinzelt Staubproben ESBL-/AmpC-*E. coli* positiv waren. Eine Begründung für das scheinbare Verschwinden der resistenten Bakterien bei zwei Betrieben zum Mastende hin ist schwierig. Man könnte eine unterschiedliche Anwendung von Antibiotika in den Betrieben vermuten. Wie Tabelle 8 zu entnehmen ist, haben jedoch alle Betriebe zum zweiten und auch zum dritten Untersuchungszeitpunkt Antibiotika, bis auf eine Ausnahme einschließlich Beta-Laktam-Antibiotika, eingesetzt. Die Gabe anderer als Beta-Laktam-Antibiotika kann durch Co-Selektion die Entstehung einer Beta-Laktam-Resistenz begünstigen, da die verschiedenen Resistenzgene oft auf demselben Plasmid lokalisiert sind (Gniadkowski 2001; Cantón und Coque 2006). Da Determinanten für Antibiotika- und Biozid-Resistenzen ebenfalls auf dem gleichen Plasmid lokalisiert sein können, ist auch hier die Gefahr einer Co-Selektion gegeben, sofern Biozide im Rahmen des Reinigungs- und Desinfektionsverfahrens eingesetzt werden (Roedel et al. 2021). Das häufigste bei den Mastputenbeständen dieser Studie eingesetzte Biozid war Peroxyessigsäure.

Neben etwaigen antimikrobiellen Therapien sind auch andere Einflussfaktoren zur berücksichtigen. Bei Broilern wurde bereits beschrieben, dass eine Besiedelung mit ESBL-

/AmpC-bildenden Bakterien auch völlig ohne Antibiotikagabe erfolgen kann (Huijbers et al. 2016; Projahn et al. 2018a; Van Hoek et al. 2018; Robe et al. 2019). Die Persistenz von resistenten Bakterien in der Tierumgebung wirkt sich beeinflussend auf die Prävalenz der Tierproben aus (Hiroi et al. 2012; Daehre et al. 2018). Da Umgebungsproben, wie z.B. der Mist, in der vorliegenden Studie positiv getestet wurden, kann von einem Eintrag resistenter Bakterien in den Tierbestand durch kontaminierte Umgebung ausgegangen werden. Betrieb 5 mit einer Einzeltierprävalenz von 100% wies zum zweiten Beprobungszeitpunkt eine positive Nullprobe des Maststalls auf, in welchen die Tiere nach der Aufzuchtphase verbracht wurden. Hier ist also spätestens nach Umstallung der Tiere die Wahrscheinlichkeit einer Kolonisierung mit den resistenten *E. coli* sehr hoch und resultiert möglicherweise in einer hohen Prävalenz. Auch weitere Eintragsquellen aus der Produktionskette kommen in Frage, wie beispielsweise die Brüterei und der Schlachthof (Projahn et al. 2017; Von Tippelskirch et al. 2018; Dame-Korevaar et al. 2019). In dieser Studie fielen keine offensichtlichen Unterschiede im allgemeinen Management auf. Detailliertere und vergleichende Untersuchungen z.B. zur Fitness und Tenazität der spezifischen Isolate unter verschiedenen Umweltbedingungen könnten mehr Erkenntnisse zu dieser Thematik generieren.

Der ESBL-/AmpC-negative Status der Betriebe Nr. 1 und 4 zum Ende der Mast deutet daraufhin, dass der Kreislauf der Kolonisierung von Tieren durch deren kontaminierte Umgebung und somit einer erneuten Kontamination der Umgebung durch die Ausscheidung der Bakterien mit dem Kot unterbrochen wurde. Lediglich eine Mistprobe im Außenbereich wurde positiv getestet. Da bei Betrieb 1 bereits zur Mastmitte in den drei der acht quantifizierbaren Kloakentupfern geringe Keimzahlen gefunden wurden, scheinen die Tiere bereits zu diesem Zeitpunkt eher schwach kolonisiert gewesen zu sein. Betrieb 4 war schon in der Mitte der Mast mit 5 % positiven Kloakentupfer eher niedrigprävalent, Betrieb 1 lag mit 40 % im mittleren Bereich. Beide Betriebe wiesen allerdings zum Zeitpunkt 2 noch verschiedene ESBL-/AmpC-positive Tierumgebungsproben auf (Tabelle 14).

Ein besonderes Ergebnis der Langzeitstudie bei Masthähnchen waren ESBL-/AmpC-*E. coli*-positive frisch eingestellten Küken (Alter 1-3 Tage) in sechs von sieben Betrieben (Laube et al. 2013). Auch waren die Tierumgebungsproben aus dem Stall zu diesem frühen Untersuchungszeitpunkt schon ESBL-/AmpC-positiv. Bei allen sieben Betrieben wurde außerdem zu jedem Beprobungszeitpunkt mindestens eine Probe positiv getestet. In keinem der hier untersuchten Mastputenbetriebe wurden die Eintagsküken positiv getestet. Es ist jedoch anzumerken, dass bei zwei der sieben Putenmastbetriebe in den Einzeltierproben der Eintagsküken noch keine *E. coli*-Bakterien nachgewiesen werden konnten. Da die Darmflora der Küken also offenbar noch nicht ausreichend entwickelt war, hätte auch eine etwaige Besiedelung mit resistenten Bakterien im Darm nicht detektiert werden können. Es ist davon auszugehen, dass die Belastung bei den eingestellten Tieren von zumindest fünf der sieben

Betriebe nicht vorhanden bzw. so niedrig war, dass sie mit unserer Probenahme sowie Labormethode unterhalb des Detektionslimits lag. Beide Verfahren wurden jedoch identisch zu der Studie in Masthähnchenbetrieben und nach europäischem Standard (EFSA) durchgeführt. In Betrieb 5 wurden zum ersten Beprobungszeitpunkt in einer Sockentupferprobe ESBL-bildende *E. coli* detektiert. Jedoch konnte die Probenahme in diesem Betrieb aus organisatorischen Gründen nicht am Tag der Einstellung der Eintagsküken, sondern erst zwei Tage später erfolgen. Die Kloakentupfer wurden zu diesem Zeitpunkt alle negativ getestet. Dies weist darauf hin, dass die resistenten Bakterien nicht vorrangig durch die Eintagsküken in den Betrieb eingeschleppt werden. Da alle anderen Proben im Stall sowie die Nullproben, welche vor Einstellung entnommen wurden, ebenfalls negativ waren, ist nicht davon auszugehen, dass größere Erregermengen bereits bei Einstellung der Küken im Stall vorhanden waren. Dabei ist allerdings die begrenzte Probenanzahl und auch das Detektionslimit zu berücksichtigen, da zu diesem frühen Zeitpunkt die Erregerlast ggf. noch sehr gering ist und dadurch eventuell trotz des in der Studie angewandten, sehr sensitiven Verfahrens die resistenten Bakterien nicht detektiert werden konnten. Denn schon eine geringfügige Kontamination hätte ggf. ausgereicht, um eine Besiedelung der eingestellten Küken zu initiieren, wie bereits durch experimentelle Inokulation geringster Mengen ESBL-/AmpC-bildender *E. coli* in eine Masthühnerherde bewiesen wurde (Robe et al. 2019).

Beim Masthähnchen lagen die Einzeltierprävalenzen zu den verschiedenen Probenahmezeitpunkten im Vergleich zu den Mastputen höher, verbunden mit einem Anstieg zum Mastende in fünf von sieben Betrieben. Dies war auch in Betrieben der Fall, in welchen kein oder nur einmalig zum Mastbeginn Antibiotika eingesetzt wurden (Laube et al. 2013). Eine weitere Studie zu Masthähnchen ermittelte während einer Mastperiode mittels siebenmaliger Beprobung stark schwankende Prävalenzen (Huijbers et al. 2016). Ein großer Unterschied zu den Mastputen ist die Mastdauer, die beim Masthähnchen mit ca. 35 Tagen wesentlich kürzer ist. Masttag 35 lag bei den in dieser Studie beprobten Puten noch vor der zweiten Probenahme. Möglicherweise zeigt die Bestandskinetik über eine längere Haltungsdauer hinweg grundsätzlich einen Abfall der Prävalenz, der jedoch bei der vergleichsweise kurzen Mastdauer der Masthühner noch nicht festzustellen war. Unterstützt wird diese Vermutung durch eine Langzeitstudie zur Prävalenz AmpC-bildender *E. coli* in Masthähnchen-Elterntierherden, bei denen die Wissenschaftler während des 34-wöchigen Untersuchungszeitraumes ebenfalls ein starkes Abfallen der Einzeltierprävalenzen und in den Keimzahlen dokumentierten (Dame-Korevaar et al. 2017). Bei einer vergleichenden Studie zu Masthähnchen und Legehennen ermittelten Blaak et al. (2015) bei Letzteren eine niedrigere Prävalenz und führten dies auf das höhere Alter und den geringeren Antibiotikaeinsatz zurück. Eine Langzeitstudie zu Mastgänsen wiederum, welche eine ähnliche Mastdauer haben wie Puten, zeigte einen Anstieg der Prävalenz in der ersten Phase der Mast. Zum letzten

Beprobungszeitpunkt fiel in der einen untersuchten Herde die Prävalenz ab, bei der anderen blieb sie auf hohem Niveau stabil (Massaccesi et al. 2021). Das Haltungssystem unterscheidet sich jedoch von jenem der Puten und Broiler, da es sich bei den untersuchten Herden um Freilandhaltungen handelt. Die Zusammensetzung des Mikrobioms der Tiere könnte daher stärker umweltbedingt beeinflusst sein.

Im Vergleich zur Pute verhielt sich die Einzeltierprävalenz beim Mastschwein ähnlich. Diese fiel zwischen der ersten Probenahme, kurz nach Einstellung der ca. acht Wochen alten Tiere aus dem Aufzuchtbetrieb, und der zweiten Probenahme (Mastmitte) signifikant ab (Von Salviati et al. 2014). Auch hier konnte man demnach ein sinkender Verlauf der ESBL-/AmpC-*E. coli*-Nachweisraten mit längerer Haltungsdauer der Tiere verzeichnet werden. So auch in einer niederländischen Langzeitstudie, während der nicht nur die Prävalenz auf Probenebene sank, sondern einige Betriebe im Studienzeitraum sogar einen komplett negativen ESBL-Status erwarben, wie dies auch in dieser Studie bei den Putenbetrieben der Fall war (Dohmen et al. 2017). Auch Hansen et al. (2013) beobachteten bei Mastschweinen einen Abfall der Einzeltierprävalenz über den Untersuchungszeitraum hinweg.

Eine Langzeitstudie bei in Freiland gehaltenen Mastkälbern aus den USA ergab eine schwankende Entwicklung der Einzeltierprävalenz. Bereits zum ersten Beprobungszeitpunkt in einem Alter von bis zu drei Monaten waren 59,8% der Tiere mit ESBL-bildenden Bakterien besiedelt. Die Prävalenz stieg in der Folge bis auf 73,9% bei einem Alter von sechs bis neun Monaten an, um dann zuletzt bei einem Alter von neun bis zwölf Monaten auf 6,2% abzufallen. Interessanterweise wechselte die Genvariante von CTX-M1 und CTX-M32 bei der ersten Probenahme, auf CTX-M15 beim letzten Zeitpunkt. Bei der untersuchten Herde wurden während des einjährigen Untersuchungszeitraumes keine Antibiotika eingesetzt (Mir et al. 2018). Eine weitere niederländische Langzeitstudie bei Mastkälbern ermittelte über den Untersuchungszeitraum hinweg ebenfalls einen Abfall der Prävalenz mit häufigem Nachweis der CTX-M1 und -M15 Typen (Hordijk et al. 2013).

Die quantitative Untersuchung der Proben ergab bei Von Salviati et al. (2014) eine Reduktion der Zellzahlen im Laufe der Mast, analog zu Hansen et al. (2013). Ein vergleichbares Geschehen konnte bei den Puten nicht festgestellt werden (Tabelle 15 und Tabelle 23). Bei den Sammelkot-, Sammelstaub-, Sockentupfer- und Trinkwasserproben konnte eine Reduktion der Zellzahlen der ESBL-verdächtigen *E. coli* um ca. eine Logstufe beobachtet werden. Bei den Kloakentupfern stagnierte die Anzahl im selben Zeitraum auf der gleichen Logstufe. Bei den Umgebungstupfern stieg die Zellzahl sogar um eine Logstufe an. Es zeigt sich also ein uneinheitliches Bild im Ergebnis der quantitativen Analyse der ESBL-verdächtigen *E. coli* in den verschiedenen Probenmaterialien. Zum ersten Probenahmezeitpunkt war, bis auf eine Sockentupferprobe, keine einzige Probe quantifizierbar. Eine Beobachtung des Verlaufs über die gesamte Mastperiode hinweg ist

daher nicht möglich. Einzelne Betriebe wiesen darüber hinaus nur zu einem der drei Probenahmezeitpunkten (n=3/7) oder überhaupt keine quantifizierbaren Kloakentupfer (n=1/7) vor. Die eingeschränkte Quantifizierbarkeit der Proben bei den Mastputen steht im Gegensatz zu den longitudinalen Untersuchungen bei Schwein und Broiler, bei denen bereits zum ersten Probenahmezeitpunkt bei vielen Proben die Detektionsgrenze für die quantitative Bestimmung erreicht wurde (Laube et al. 2013; Von Salviati et al. 2014).

In den ersten Lebenswochen entwickelt das gastrointestinale Mikrobiom eine rapide zunehmende Diversität (Videnska et al. 2014; Ballou et al. 2016; Rychlik 2020). Bis die Darmflora sich stabilisiert, variiert ihre Zusammensetzung, Bakterienstämme konkurrieren miteinander und ihr Vorkommen ist folglich transient (Coloe et al. 1984; Lu et al. 2003). Die in den ersten Lebenstagen die Darmflora dominierenden Enterobakterien nehmen im Laufe der Zeit ab (Videnska et al. 2014). Folglich würde auch eine Prävalenz von resistenten Bakterien beeinflusst. Auf die Entwicklung des gastrointestinalen Mikrobioms wirken viele Faktoren, so dass einzelne Bakterienspezies persistieren, andere wiederum verschwinden (Stanley et al. 2014; Dame-Korevaar et al. 2017; Feye et al. 2020). Für *Campylobacter jejuni* wurde bei Masthühnern bereits dargestellt, dass sich die Zusammensetzung des Mikrobioms auf das Kolonisierungspotenzial von Bakterien auswirken kann (Han et al. 2017). Das Mikrobiom bei aus der Brüterei stammenden Küken unterscheidet sich beispielsweise signifikant von jenem der durch Hennen ausgebrüteten Küken, da die Besiedelung des Darms maßgeblich davon beeinflusst wird, welcher bakteriellen Flora die Küken nach dem Schlupf erstmals ausgesetzt sind (Rychlik 2020). Auch das Einstreumaterial kann einen Einfluss auf die Prävalenz haben. Vermutet wird, dass durch eine höhere Einstreumenge die Aktivität der Tiere erhöht und sie dadurch oral mehr mikrobielles Material aufnehmen (Robe et al. 2019). Stroh soll im Vergleich zu Hobelspänen das Risiko einer Kolonisierung erhöhen (Cressman et al. 2010; Guardia et al. 2011; Persoons et al. 2011; Robé et al. 2021). Da sich die Haltungsbedingungen von Puten und Masthühner unterscheiden, kann dies auch Unterschiede in der Entwicklung des intestinalen Mikrobioms zur Folge haben. Nach der Aufzucht werden konventionell gehaltene Puten im Gegensatz zu Masthähnchen oft in frei belüfteten Ställen gehalten. Verbreitet ist auch der Anbau von für die Tiere zugänglichen Veranden. Der mikrobielle Austausch mit der Umgebung um die Tierställe ist also möglicherweise intensiver als bei Masthühnern. Das intestinale Mikrobiom kann durch diesen Austausch im Laufe einer Mastperiode modifiziert werden. Es spielt eine Rolle, in welchem Entwicklungsstand des intestinalen Mikrobioms das Individuum mit dem konkurrierendem Bakterium in Kontakt kommt (Jurburg et al. 2019). Mit zunehmender Diversität ist eine Kolonisierung möglicherweise nicht mehr so effizient, wie dies direkt nach dem Schlupf der Fall wäre. Komplexe Einflussfaktoren können Gründe für die unterschiedlichen Reaktionen der Herden sein. Im Ergebnis stagniert die Prävalenz bei einigen Herden auf hohem Niveau, bei anderen steigt sie auf nur wenige positive Proben an und wieder bei anderen nimmt sie ab, teilweise bis unter die Detektionsgrenze. Bei weniger

erfolgreicher Kolonisierung erfolgt ein Eintrag der resistenten Bakterien zum Beispiel aus der durch den vorangegangenen Mastdurchlauf kontaminierten Umgebung in den Tierbestand mit dem Ergebnis positiver Proben, jedoch nicht zwangsläufig mit hoher Prävalenz (Daehre et al. 2018).

Wissenschaftler führten kürzlich im humanmedizinischen Bereich eine Studie zur Persistenz ESBL-bildender *E. coli* und *Klebsiella pneumoniae* durch und schlussfolgerten aus ihren Ergebnissen einen möglichen Zusammenhang zwischen dem vorherrschenden Genotyp bzw. den Genkombinationen und anhaltender Besiedelung mit den resistenten Bakterien (Van Duijkeren et al. 2018). Auch in der vorliegenden Studie könnte dies auf die Prävalenz Einfluss genommen haben. Publikationen mit analogen Fragestellungen sind bei Tieren allgemein bislang nicht verfügbar. Dass Bakterienstämme mit bestimmten genetischen Eigenschaften eher die Fähigkeit besitzen zu persistieren als andere, wurde bei Masthuhn-Elterntierherden jedoch bereits vermutet (Dame-Korevaar et al. 2017).

Einflussfaktor Hygiene

Das den Tierbestand betreuende Personal kann als Risikofaktor für eine Besiedelung fungieren, entweder als Vektor, bspw. durch kontaminierte Kleidung, Transportmittel, oder auch als eigener Resistenzträger (Huijbers et al. 2014; Hering et al. 2016). Weiterhin kann ein Eintrag oder ein Verbleib der resistenten Bakterien in den Tierbestand bei mangelhafter Reinigung und Desinfektion gegeben sein (Hiroi et al. 2012; Dierikx et al. 2013b; Daehre et al. 2018). Mitunter kann eine Desinfektion bei zuvor durchgeführter unzureichender Reinigung ineffizient sein. Auch bei Zubereitung der Desinfektionsgebrauchslösung nach Herstellerangaben kommt es vor, dass Enterobakterien nicht ausreichend eliminiert werden (Luyckx et al. 2017). Kritische Punkte mittels Desinfektionskontrollen zu ermitteln, ist umso wichtiger, da an diesen auch nach erfolgter Desinfektion eine bakterielle Kontamination nachgewiesen werden kann (Luyckx et al. 2015). Eine mangelhafte Desinfektion kann auch deshalb ein Problem darstellen, da Desinfektionsmittel im Verdacht stehen, durch Co-Selektion die Entstehung von Resistenzen zu fördern (Roedel et al. 2021).

Als Einschleppungswege kommen kontaminierte Geräte, welche stallübergreifend benutzt werden, wie Einstreumaschinen und Werkzeuge etc. in Frage. Auch die persönliche Hygiene kann eine Rolle bei der Verbreitung der resistenten Bakterien spielen. Eine höhere Anzahl der Personen, die Zugang zu der Tierhaltung haben, wurde als Risikofaktor identifiziert (Mo et al. 2016a). Um einen Eintrag in die direkte Tierumgebung zu verhindern, sollten Stiefelreinigung, Desinfektionsmatten oder -wannen sowie Handwaschbecken und Händedesinfektion im Betrieb Verwendung finden, ebenso wie betriebs- oder stalleigene Kleidung. Nicht alle

Betriebe dieser Studie waren dementsprechend ausgerüstet. Zudem wurden bestimmte Gegenstände (wie Reinigungsequipment, Futter- und Einstreuwagen sowie Werkzeuge) für mehrere Ställe innerhalb des Betriebes benutzt und nicht zwischendurch desinfiziert. Ebenso erfolgte eine Desinfektion der Decken, Luftschächte und die Außenanlagen weniger konsequent, so dass bei kontaminierter Stallumgebung ein Eintrag in die Tierumgebung mit deren Kolonisierung hier wahrscheinlicher ist.

In einer Studie zur Prävalenz ESBL-bildender *E. coli* in den ersten Lebenstagen einer Masthühnerherde zeichnete sich ab, dass der ESBL-Status der Umgebung wahrscheinlich einen Einfluss auf den späteren ESBL-Status der Herde hat (Dierikx et al. 2018). Trotz positiver Elterntierherden erwarben die Herden in experimentell ESBL-frei gehaltener Umgebung im Laufe der Mast keinen positiven Status, was verdeutlicht, dass der vertikalen Transmission gegenüber der horizontalen Transmission die geringere Bedeutung zukommt. Dennoch tragen beide Übertragungswege zur Verbreitung der resistenten Bakterien offenbar bei (Dame-Korevaar et al. 2019).

Transmission vom Stall in die Stallumgebung

Es kann festgehalten werden, dass die Stallumgebungsproben der Putenmastbetriebe eher wenig kontaminiert waren, da die wenigen positiven Proben nicht quantifiziert werden konnten. Dies deutet auf sehr geringe Keimkonzentrationen in den Probenmaterialien hin. Einzelne Mistproben wurden jedoch ESBL-/AmpC-positiv getestet, so dass ein fäkaler Verbreitungsweg möglich scheint. Eine Verbreitung der resistenten Bakterien in die Umgebung der untersuchten Putenmastbetriebe ist daher jedoch insgesamt als weniger relevant einzuschätzen. Ein potenzieller Austrag von ESBL-/AmpC-*E. coli* aus Putenmastbetrieben scheint genauso wie eine Einschleppung der ESBL/AmpCs über die gering kontaminierte Umgebung des Stalls/ des Betriebsgeländes über den Verlauf der Mast auch in der Putenhaltung möglich, dies aber in geringerem Umfang als beim Masthähnchen.

Bei sechs von sieben Masthähnchenbetrieben wurden ESBL-/AmpC-*E. coli* auf den die Stallgebäude umgebenden Bodenoberflächen gefunden (Laube et al. 2014). Insgesamt waren die Bodenoberflächen tendenziell etwas häufiger positiv im Vergleich zu den Putenmastbetrieben. Auch waren alle Mistproben beim Masthähnchen ESBL-/AmpC-positiv, was einen Austrag über den fäkalen Weg annehmen lässt.

Beim Mastschwein waren umliegende Bodenoberflächen eines Betriebes in der Untersuchung komplett ESBL-/AmpC-negativ. Bei allen anderen waren die Proben vereinzelt positiv,

vergleichbar mit den Putenmastbetrieben aus dieser Studie. Auch waren die überwiegende Zahl der Gülleproben ESBL-/AmpC-positiv.

Die Nutzung der untersuchten Bodenoberflächen hat einen Einfluss auf den ESBL-/AmpC-Status der Umgebungsproben. Da bei Betrieb 4 zum Zeitpunkt 1 alle Bodenoberflächen positiv waren, zu den anderen Zeitpunkten jedoch ausnahmslos negativ, ebenso wie die Luft- und Staubproben im Stall, erfolgte die ursprüngliche Kontamination des Stallumfelds wahrscheinlich früher und über andere Wege als aerogen über die Stallluft. Dafür spricht auch, dass neben den Proben auf der windabgewandten Seite auch die Probe auf der windzugewandten Seite positiv getestet wurde. Da allerdings die Proben nicht quantifizierbar waren, konnte keine Differenz in den bakteriellen Konzentrationen der Proben der windabgewandten und windzugewandten Seite ermittelt werden. Bei höheren Konzentrationen auf der windabgewandten Seite würde dies für eine aerogene Transmission in die Stallumgebung sprechen (Ko et al. 2008).

Eine Verschleppung durch Betriebsfahrzeuge oder Kontamination durch das Ausbringen des Mistes oder der Gülle auf Grünflächen und Felder können die Ursache für den positiven Status der Umgebungsproben sein (Jones-Dias et al. 2016). Gemessen daran, dass die resistenten Bakterien sehr lange im Boden persistieren können, kann die initiale Verunreinigung entsprechend lang zurück liegen. In einer Studie von Hartmann et al. (2012) wurden die ESBL-bildenden *E. coli* auf einer landwirtschaftlichen Nutzfläche nachgewiesen, welche ein Jahr zuvor zum letzten Mal gedüngt wurde. Die Überlebensfähigkeit wird durch verschiedene Einflussfaktoren wie die Umgebungstemperatur, Temperaturschwankungen, den pH-Wert und die umgebende Mikroflora beeinflusst, deren Relevanz wohl auch durch eine genetische Komponente bestimmt wird (Van Elsas et al. 2011). Die Lagerungsbedingungen des Mistes hat ebenfalls einen Einfluss auf die Konzentration an ESBL-/AmpC-bildenden *E. coli* (Siller et al. 2020). An dieser Stelle ergibt sich folglich ein Ansatzpunkt für eine Intervention zur Unterbrechung der Infektionskette.

Darstellung der Transmission mittels Enzymgenotypisierung

Es wurden vorrangig ESBLs vom Typ CTX-M gefunden, häufig in Kombination mit einem *bla*_{TEM}-Gen. Vereinzelt waren auch *E. coli* mit einem SHV-12-Enzym nachweisbar. Ordnet man die untersuchten Probenarten zu den jeweiligen Genen bzw. Gen-Kombinationen zu, ist festzustellen, dass Isolate, welche direkt vom Tier stammen, wie Kloakentupfer, gleiche Gen-Kombinationen aufweisen wie Isolate aus der unmittelbaren Tierumgebung. Eine Kontamination der Umgebung durch den Tierkot ist offensichtlich, aber auch eine (Re)Kolonisierung von eventuell initial negativen Tieren durch die verschmutzte Umgebung ist

möglich. Legt man den Fokus auf die Kontamination der Bodenoberflächen um das Stallgebäude, sieht man in allen Betrieben, die ESBL-/AmpC-positive Bodenoberflächen vorwies (Betrieb 1, 3, 4, 5 und 7), einen potenziellen Zusammenhang zu Isolaten aus dem Stall. Dabei wurden häufig zum gleichen Probenahmezeitpunkt gleiche ESBL-Gen-Kombinationen in Isolaten der Tiere, der Tierumgebung sowie der Stallgebäudeumgebung gefunden. Bei Betrieb 4, bei welchem zum Zeitpunkt 1 auf vielen Bodenoberflächen *E. coli* mit ESBLs vom Typ CTX-M-15 nachgewiesen wurden, jedoch keine der Stall-Proben positiv war, findet man genau diesen Typ zum Zeitpunkt 2 in den verschiedenen Proben innerhalb des Stalls wieder. Außerdem weist auch der Mist Isolate mit gleichen Enzym-Typen auf wie die Umgebung, was auf eine Verschleppung der resistenten Bakterien beim Entmisten, Misttransport und –lagerung sowie der Mistausbringung deutet. Ein Eintrag der ESBL-/AmpC-bildenden *E. coli* in den Tierbestand über eine erneute Verschleppung scheint auf Grund der geringen aerogenen Tenazität wahrscheinlicher als ein luftgetragener Eintrag (Siller et al. 2021). Allerdings würden auch hier geringste Mengen resistenter Bakterien für eine Besiedlung der Herde ausreichen (Robe et al. 2019).

Ein Zusammenhang zwischen Isolaten aus dem Stall und jenen der Stallumgebung konnte auch im Betrieb 3 für Isolate mit der Gen-Kombination *bla*_{SHV-12} und *bla*_{TEM-135} beobachtet werden. Hier tauchen in Isolaten aus dem Stall jedoch noch zusätzlich *E. coli* mit ESBLs vom Typ CTX-M auf, die nicht in der Stallgebäudeumgebung gefunden wurden. Dass ein in der Umgebung detektierter Enzymtyp im Stall nicht gefunden wurde, muss nicht zwangsläufig bedeuten, dass er nicht vorhanden ist. Die Anzahl der für die weitere Laboranalyse ausgewählten Einzelkolonien ist begrenzt, weshalb möglicherweise nicht das gesamte Spektrum des Resistoms abgebildet werden kann (Blaak et al. 2015). Eine weiterführende Studie mit einer größeren Stichprobenmenge an Isolaten je Probe würde hier Aufschluss geben.

Die Daten zeigen, dass sowohl ein Ein- als auch ein Austrag von ESBL-/AmpC-*E. coli* in bzw. aus Putenmastställen möglich ist. Besonders die negativen Ergebnisse zum Zeitpunkt der Einnistung deuten auf einen horizontalen Eintrag der resistenten Bakterien aus der Stallumgebung als eine Möglichkeit einer Kolonisierung der Tiere hin. Für eine Bestätigung des epidemiologischen Zusammenhangs sind jedoch weiterführende Untersuchungen, wie eine Bestimmung der phylogenetischen Gruppe und des Sequenztyps oder eine Ganzgenomsequenzierung erforderlich, die innerhalb dieser Studie noch nicht erfolgten.

Relevanz der aerogenen Transmission

Bei Untersuchungen zu den über die Luft aus Tierhaltungen verbreiteten Bakterien bilden gram-positive Bakterien allgemein den größten Anteil. Für Puten wurde bspw. mittels Kombination aus den Methoden Impingement und Filtration ein Anteil von 82,1% ermittelt (Fallschissel et al. 2010). Dementsprechend ist auch die luftgetragene Transmission bei gram-positiven resistenten Bakterien, wie methillin-resistente *Staphylococcus aureus* regelmäßig beschrieben (Kozajda et al. 2019). Im direkten Vergleich der Bakterienspezies werden höhere Konzentrationen an *Staphylococcus* ssp. als *E. coli* in der Abluft von Tierhaltungen gemessen (De Rooij et al. 2019). Auch scheint die aerogene Übertragung ESBL-/AmpC-bildender Bakterien auf den Menschen eine untergeordnete Rolle zu spielen (Franceschini et al. 2019). Als verursachend für die niedrigeren Nachweisraten in der Luft wird die höhere Anfälligkeit gegenüber Oxidation, Dehydratation und UV-Strahlung angesehen (Zhao et al. 2014).

Insgesamt scheint also der luftassoziierte Transmissionsweg für die in dieser Studie zu betrachtenden Bakterien grundsätzlich weniger ins Gewicht zu fallen. Beispielsweise sind die Nachweisraten an *E. coli* in den Staubproben im Vergleich zu den anderen Probenarten niedrig. Es wird zwar im Staub von vier Betrieben der Langzeitstudie sowie in 18,5 % aller Staubproben der Querschnittsstudie gefunden und somit ist auch ein potenzieller Austrag mit dem Staub über die Lüftung möglich, es handelt sich jedoch höchstwahrscheinlich um eher geringe Keimmengen, was durch die quantitativen Ergebnisse der Staubproben der Querschnittsstudie (Tabelle 12) untermauert wird. In den Luftproben wurden die resistenten Bakterien überhaupt nicht nachgewiesen. Dem Austrag über die Stallabluf ist also nach den vorliegenden Daten keine größere Rolle zuzuschreiben. Möglicherweise wird das Detektionslimit in der Luftprobe (9 KbE/m³ für die Stallluft und 3 KbE/m³ für die Außenluft) dadurch nicht erreicht. Hinzu kommt der auf die geringe Erregerzahl einwirkende Sammelstress bei der Luftprobenentnahme. ESBL-/AmpC-bildende Enterobakterien scheinen insgesamt eine geringe Tenazität bei luftgetragener Verbreitung zu haben, so dass deren Relevanz schon unter natürlichen Bedingungen, also bei Verbreitung über den Wind, niedrig zu sein scheint (Siller et al. 2021).

Im Kontrast zu den Putenbetrieben wurden in den Schweinemastbetrieben einige Stallluftproben sowie auch zwei Außenluftproben positiv auf ESBL-/AmpC-*E. coli* getestet. Staub war hingegen bei den Mastschweinbetrieben stets negativ (Von Salviati et al. 2015). Auch bei Masthähnchen waren einige Stallluft- und Abluftproben ESBL-/AmpC-positiv (Laube et al. 2014). Auch in anderen Studien wurden bei Schweinen (Gao et al. 2015) und bei Masthühnern (Huijbers et al. 2016) die aerogene Transmission von ESBL-produzierenden Bakterien bestätigt, allerdings bei abweichender Untersuchungsmethode.

Wie bereits hinsichtlich der niedrigeren Prävalenz in den Staubproben der Querschnittsstudie diskutiert wurde, könnte die Ursache entweder in der Beschaffenheit des Staubs an sich oder in abweichenden Umweltfeinflüssen zu finden sein.

Andere Eintragsquellen

Wildtiere und -vögel sollten bei der Betrachtung der Transmissionswege nicht vergessen werden (Greig et al. 2015). Die in dieser Studie häufig nachgewiesenen Gene bla_{CTX-M-1}, bla_{CTX-M-14} und bla_{CTX-M-15} wurden auch bei wilden Tieren gefunden (Stedt et al. 2015; Plaza-Rodríguez et al. 2020), so dass denkbar ist, dass eine Transmission zwischen den belebten Reservoirs stattfindet. Die Putenmastbetriebe in der Querschnittsstudie waren häufig nicht umzäunt, so dass ein Zugang auch für terrestrisch lebende Wildtiere möglich ist. Zudem handelt es sich besonders bei den Mastställen verbreitet um frei gelüftete Ställe mit großen, teils offenen Fensterfronten, oder auch mit Veranden, so dass die Barriere zur direkten Stallumgebung vermindert ist. Fliegen, fließende Gewässer und andere auf dem Gelände der Nutztierhaltung gehaltene Tiere können als Vektor zwischen den Reservoirs fungieren, (Blaak et al. 2014; Blaak et al. 2015). Fließende Gewässer sind auch umgekehrt als wichtiges Vehikel für die Verbreitung der resistenten Bakterien und von bakteriellen Krankheitserregern allgemein zwischen den belebten Reservoirs zu betrachten (Blaak et al. 2015; Haberecht et al. 2019; Raseala et al. 2020).

Das in den Putenställen verwendete Tränkwasser stammt oft nicht aus der öffentlichen Wasserversorgung, sondern aus betriebseigenen Brunnen. Nicht immer wird dem Wasser Säure zur Hemmung einer bakteriellen Flora zugesetzt (Hao et al. 2013). Ein Eintrag der resistenten Bakterien in den Tierbestand über kontaminiertes Wasser ist daher grundsätzlich möglich, obwohl diese Vermutung nach den Ergebnissen der Untersuchung der Proben vor Ein- bzw. Umstallung in dieser Studie bislang nicht bestätigt werden konnte.

Ausblick

ESBL-/AmpC-bildende Enterobakterien werden regelmäßig bei Puten nachgewiesen. Wenn auch die Belastung mit den resistenten Bakterien offenbar geringer ist als bei den anderen Nutztierarten, spielen sie ebenso eine wichtige Rolle als Reservoir und Transmissionsquelle. Alle Bemühungen müssen sich daher einerseits auf Maßnahmen zur Reduktion innerhalb des Tierbestandes richten. Dies kann zum Beispiel über eine Verbesserung der Haltungsbedingungen und in dessen Folge die Möglichkeit eines restriktiveren Antibiotikaeinsatzes, oder durch eine verbesserte Biosicherheit erfolgen. Durch Verkleinerung

der Tiergruppen kann eine Verlangsamung der Verbreitung innerhalb eines einmal infizierten Tierbestandes erreicht werden (Dame-Korevaar et al. 2020b). Auch alimentäre Maßnahmen können positive Effekte erzielen. Die gezielte Verabreichung von Bakterien im frühen Alter mit dem Zweck der Verdrängung der resistenten Bakterien führte in einer Studie von Dame-Korevaar et al. (2020a) zu einer Reduktion der Kolonisierung mit ESBL-*E. coli*.

Ein Augenmerk sollte außerdem auf die Vermeidung der Verbreitung der resistenten Bakterien gelegt werden. Ansatzpunkte wären hier die Emission aus dem Tierstall. Ein Vergleich der Haltungformen und ihr Einfluss auf die aerogene Emission könnte Aufschluss bringen für weitere Möglichkeiten der Reduktion. Der Mist sollte eine angemessene Zeit der Lagerung auf dem Gelände der Tierhaltung verbleiben, bevor er über weitere Strecken oder auf das Feld verbracht wird, um die Belastung mit resistenten Bakterien zu verringern (Siller et al. 2020). Die persönliche und die betriebliche Hygiene sind ebenfalls Schritte zu einer Reduktion der Transmission. Sehr wahrscheinlich wird jedoch schlussendlich die Kombination von Maßnahmen zielführend sein (Robé et al. 2021).

Bei Masthühnern zeichnete sich ab, dass mittels einzelner Maßnahmen nur begrenzt Einfluss genommen werden kann, sondern komplexere Anstrengungen vonnöten sind, um der Resistenzproblematik zu begegnen (Projahn et al. 2018b; Robé et al. 2021). Die Interventionsmöglichkeiten bei Puten sind jedoch möglicherweise andere als jene bei Broilerhaltungen, da sich die erhobenen Daten unterscheiden. Beispielsweise scheinen die der Mast vorangegangenen Produktionsstufen nicht im gleichen Maße eine Rolle im Transmissionsgeschehen zu spielen. Auch ist die Zahl der negativ getesteten Betriebe deutlich höher, so dass sich hier nach entsprechender Erforschung der Ursachen und Risikofaktoren die Möglichkeit eröffnet, eine Strategie für ESBL-/AmpC-freie Mastputenhaltungen zu entwickeln.

6. Zusammenfassung

ESBL-/AmpC-bildende Enterobakterien in der Putenmast – Prävalenz, Bestandskinetik und Transmissionswege

Diese Studie wurde als Projekt der Freien Universität Berlin zur Erfüllung eines Entscheidungshilfebedarfs des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft im Auftrag des deutschen Bundestags zur Erforschung ESBL-/AmpC-bildender Enterobakterien bei Mastputen durchgeführt.

Es wurden bereits Prävalenz- und Langzeitstudien zum Vorkommen von ESBL-/AmpC-bildender Enterobakterien bei anderen Nutztierarten vorgenommen. Zu Mastputen sind noch keine systematischen Untersuchungen zu diesem Thema durchgeführt worden. Ziel des Projektes war es, das Vorkommen, die Verbreitungswege und die Entwicklung von ESBL-/AmpC-bildenden Enterobakterien bei Mastputen zu untersuchen und mit der Situation beim Masthähnchen zu vergleichen. Zum einen wurden zu diesem Zweck im Rahmen einer Querschnittstudie deutschlandweit 48 Putenmastbestände, regional verteilt in Abhängigkeit von der jeweiligen Dichte an Putenhaltungen im Bundesland, beprobt. Sammelkot-, Sammelstaub- und Sockentupferproben wurden parallel in zwei Altersgruppen (Aufzucht und Mast) entnommen. Darüber hinaus erfolgte die intensive Beprobung von sieben ESBL-/AmpC-positiven Mastputenherden und deren Umgebung zu drei Zeitpunkten innerhalb einer Mastperiode. Es wurden zahlreiche Proben, bei den Tieren, in der direkten Stallumgebung, der Luft im und außerhalb des Stalls sowie Proben der Umgebung des Stalls entnommen. So wurde untersucht, welche Verbreitungswege der resistenten Bakterien von Bedeutung sind.

ESBL-/AmpC-bildende Enterobakterien wurden in den meisten Proben sowohl qualitativ nach Voranreicherung als auch quantitativ analysiert. Als selektives Medium wurde MacConkey-Agar mit dem Zusatz von 1 µg/ml Cefotaxim verwendet. Alle ESBL-/AmpC-verdächtigen Isolate wurden mittels Disk-Diffusion-Test und der Detektion der ESBL- (*bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}* und *bla_{SHV}*) und AmpC-Gene (*bla_{CMY}*) bestätigt. Erforderlichenfalls erfolgte eine Sequenzierung der Isolate.

70,8 % der 48 untersuchten Betriebe der Querschnittstudie wiesen einen positiven Status für ESBL-/AmpC-produzierende Enterobakterien auf (inklusive *E. coli*) und in 60,4 % der Betriebe wurden ESBL-/AmpC-bildende *E. coli* nachgewiesen. Im Vergleich zu den Ergebnissen der Untersuchungen bei Masthähnchenbetrieben kommen ESBL-/AmpC-bildende Enterobakterien in signifikant niedrigerer Prävalenz vor. Hinsichtlich der ESBL-/AmpC-Prävalenz auf Probenebene ergaben sich Nachweisraten von 37,6 % ESBL-/AmpC-positive Proben bezüglich der Enterobakterien und 29,8 % bezüglich *E. coli*. Zwischen den Prävalenzen der verschiedenen Altersgruppen konnten keine signifikanten Unterschiede bei Puten festgestellt werden. Unter den *E. coli*-Isolaten der Querschnittsstudie dominierten mit

88,3 % Beta-Laktamasen der CTX-M-Gruppe, mit häufigstem Nachweis des CTX-M-1-Enzymtyps. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen bei Masthähnchen, bei denen das Gen *bla_{cmv}* dominierte. Die Keimzahlen der Sammelkotproben der Aufzuchtgruppen waren im Mittel mit $1,2 * 10^6$ KbE/g höher als jene der Mastherden ($5,8 * 10^4$ KbE/g). Die Keimzahlen scheinen also im Mastverlauf zu sinken. Bei den Sammelstaubproben hingegen konnte vergleichbares nicht festgestellt werden.

Ergebnisse der Langzeitstudie zeigten, dass sich innerhalb der Mastperiode die Prävalenzen unterschiedlich entwickelten. Es gab sowohl Betriebe, die ihren positiven ESBL-/AmpC-Status beibehielten als auch Betriebe, bei denen zum letzten Beprobungszeitpunkt keine der Proben positiv getestet wurde. Die Einzeltierprävalenz stieg unter Einbeziehung aller Kloakentupfer vom ersten zum zweiten Beprobungszeitpunkt jedoch insgesamt signifikant an. In Proben der Stallumgebung konnten ESBL-/AmpC-bildende Enterobakterien nur vereinzelt detektiert werden und dies auch nur in sehr niedriger Konzentration mit einem Nachweis erst nach dem Voranreicherungsschritt. Zwar wurden Staubproben in niedriger Prävalenz positiv getestet, in den Luftproben wurden die resistenten Bakterien jedoch überhaupt nicht gefunden. Eine fäkale Transmission in die Stallumgebung findet demnach statt, jedoch in geringerem Umfang als beim Masthähnchen. Die aerogene Verbreitung scheint kein wichtiger Transmissionsweg für ESBL-/AmpC-bildende Enterobakterien in der Putenmast zu sein.

7. Summary

Occurrence, emission, and within-herd dynamics of ESBL-/AmpC-producing *Enterobacteriaceae* in turkey fattening farms in Germany

This study was conducted by the Free University of Berlin on behalf of the German Federal Ministry of Food and Agriculture in response to a decision-making support request for exploring the occurrence of ESBL-/AmpC-producing *E. coli* in turkey fattening farms.

Previous studies have shown the occurrence of ESBL-/AmpC-producing *Enterobacteriaceae* in different farm animals. However, prior to this study these resistant bacteria had not been investigated systematically in turkeys. The goal of this cross-sectional study was to ascertain the prevalence of ESBL-/AmpC-producing *Enterobacteriaceae* in a representative selection of turkey farms distributed across Germany. Samples were taken in 48 locations nationwide; the share of each state was proportionate to its turkey population at the time of the study. Pooled feces, dust samples and boot swabs were collected in parallel in two different age groups (rearing/fattening units). The aim of a second part of this study was to investigate the occurrence of these microorganisms in turkeys, in the production facilities, in the air and on soil surfaces close to ESBL-/AmpC-positive turkey fattening farms, including the possible spread of these bacteria via the fecal route and/or via exhaust air from the operations. Within-herd dynamics of prevalence were also explored. Seven German turkey fattening farms were sampled for this part of the study, each of them three times during one fattening period, by taking slurry samples, exhaust air samples and various surfaces in the vicinity of the facilities. Additionally various samples inside the production facilities including individual samples of animals, environmental samples and air samples were taken in parallel. Collected data was compared with previous studies in broiler farms.

In most of the samples ESBL-/AmpC-producing *Enterobacteriaceae* were detected qualitatively after enrichment and quantitatively too. All taken samples were cultivated on MacConkey-agar with 1µg/ml Cefotaxime after a pre-enrichment step. ESBL-/AmpC-suspected microorganisms are confirmed by disc-diffusion-assay and detecting ESBL- (*bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}* und *bla_{SHV}*) and AmpC-genes (*bla_{CMY}*), if necessary by sequencing.

In 70.8% of the investigated farms a positive ESBL-/AmpC-status concerning all *Enterobacteriaceae* could be detected (incl. *E. coli*), respectively 60.4% individually for *E. coli*. Regarding all samples 37.6% of the samples were tested positive for ESBL-/AmpC-producing *Enterobacteriaceae*, respectively 29.8% individually for *E. coli*. There is no significant difference between the prevalence in samples originating from the rearing units and the fattening units. Bacterial counts were found to be decreasing during the fattening period, at least with regards to samples of pooled feces. In comparison to similar studies in poultry,

especially broilers, the prevalence of ESBL-/AmpC-producing *Enterobacteriaceae* in turkey fattening farms is lower. The CTX-M-type dominated in the samples (88.3% of isolates), which contrasts with results from broilers, where the CMY-type was mostly detected.

In the sampled turkey fattening farms, no ESBL-/AmpC-producing *Enterobacteriaceae* were detected in one-day-old chicks. This contrasts with results from broiler farms, where even one-day-old chicks were tested positive. Prevalence during fattening period was developing in different directions. There were farms which kept their positive ESBL-/AmpC-status, but also farms, which later yielded completely negative test results. However, the detection frequency of positive individual animal samples increased significantly from the first to the second sampling.

The investigated turkey farms show a lower contamination of slurry samples and of the surfaces in the vicinity of the facilities. Samples were tested positive only after pre-enrichment. Prevalence of pooled dust samples was found to be low and no resistant bacteria at all were found in air samples. Fecal emission of ESBL-/AmpC-producing organisms from turkey farms seems to be a possible source for the spread, but in a lower extent than those from broiler barns. Airborne emission doesn't seem to be an important transmission route for ESBL-/AmpC-producing *Enterobacteriaceae*.

8. Literaturverzeichnis

Aarestrup, F. M. (2005): *Veterinary Drug Usage and Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin*, Basic Clin Pharmacol Toxicol 96: 271-281. DOI: 10.1111/j.1742-7843.2005.pto960401.x.

Aarestrup, F. M. (2015): *The Livestock Reservoir for Antimicrobial Resistance: A Personal View on Changing Patterns of Risks, Effects of Interventions and the Way Forward*, Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 370: 20140085. DOI: 10.1098/rstb.2014.0085.

Aerts, M., A. Battisti, R. Hendriksen, I. Kempf, C. Teale, B. A. Tenhagen, K. Veldman, D. Wasyl, B. Guerra, E. Liébana, D. Thomas-López and P. A. Belcøil (2019): *Technical Specifications on Harmonised Monitoring of Antimicrobial Resistance in Zoonotic and Indicator Bacteria from Food-Producing Animals and Food*, Efsa j 17: e05709. DOI: 10.2903/j.efsa.2019.5709.

Aidara-Kane, A., F. J. Angulo, J. M. Conly, Y. Minato, E. K. Silbergeld, S. A. McEwen and P. J. Collignon (2018): *World Health Organization (Who) Guidelines on Use of Medically Important Antimicrobials in Food-Producing Animals*, Antimicrob Resist Infect Control 7: 7. DOI: 10.1186/s13756-017-0294-9.

Amaya, E., D. Reyes, M. Paniagua, S. Calderón, M. U. Rashid, P. Colque, I. Kühn, R. Möllby, A. Weintraub and C. E. Nord (2012): *Antibiotic Resistance Patterns of Escherichia Coli Isolates from Different Aquatic Environmental Sources in León, Nicaragua*, Clin Microbiol Infect 18: E347-354. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2012.03930.x.

Ambler, R. P. (1980): *The Structure of Beta-Lactamases*, Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 289: 321-331. DOI: 10.1098/rstb.1980.0049.

Apostolakos, I., C. Feudi, I. Eichhorn, N. Palmieri, L. Fasolato, S. Schwarz and A. Piccirillo (2020): *High-Resolution Characterisation of Esbl/Pampc-Producing Escherichia Coli Isolated from the Broiler Production Pyramid*, Sci Rep 10: 11123. DOI: 10.1038/s41598-020-68036-9.

Apostolakos, I., E. Franz, A. van Hoek, A. Florijn, C. Veenman, M. M. Sloet-van Oldruitenborgh-Oosterbaan, C. Dierikx and E. van Duijkeren (2017): *Occurrence and Molecular Characteristics of Esbl/Ampc-Producing Escherichia Coli in Faecal Samples from Horses in an Equine Clinic*, J Antimicrob Chemother 72: 1915-1921. DOI: 10.1093/jac/dkx072.

Apostolakos, I., L. Mughini-Gras, L. Fasolato and A. Piccirillo (2019): *Assessing the Occurrence and Transfer Dynamics of Esbl/Pampc-Producing Escherichia Coli across the Broiler Production Pyramid*, PLoS One 14: e0217174. DOI: 10.1371/journal.pone.0217174.

B.V.L. (2015, korr. Version vom Juni 2017). *Germap 2015 - Antibiotika-Resistenz Und - Verbrauch - Bericht Über Den Antibiotikaverbrauch Und Die Verbreitung Von Antibiotikaresistenzen in Der Human- Und Veterinärmedizin in Deutschland*, Abgerufen am: 25.05.2021 um 16:45 Uhr, von

https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/05_Tierarzneimittel/germap2015.pdf;jsessionid=5358D26D41992EA50FC1AF7618F1A932.2_cid360?__blob=publicationFile&v=4

Ballou, A. L., R. A. Ali, M. A. Mendoza, J. C. Ellis, H. M. Hassan, W. J. Croom and M. D. Koci (2016): *Development of the Chick Microbiome: How Early Exposure Influences Future Microbial Diversity*, *Frontiers in Veterinary Science* 3. DOI: 10.3389/fvets.2016.00002.

Batchelor, M., K. Hopkins, E. J. Threlfall, F. A. Clifton-Hadley, A. D. Stallwood, R. H. Davies and E. Liebana (2005): *Bla(Ctx-M) Genes in Clinical Salmonella Isolates Recovered from Humans in England and Wales from 1992 to 2003*, *Antimicrob Agents Chemother* 49: 1319-1322. DOI: 10.1128/AAC.49.4.1319-1322.2005.

Bauernfeind, A., Y. Chong and S. Schweighart (1989): *Extended Broad Spectrum Beta-Lactamase in Klebsiella Pneumoniae Including Resistance to Cephamycins*, *Infection* 17: 316-321. DOI: 10.1007/bf01650718.

Bergšpica, I., G. Kaprou, E. A. Alexa, M. Prieto and A. Alvarez-Ordóñez (2020): *Extended Spectrum B-Lactamase (Esbl) Producing Escherichia Coli in Pigs and Pork Meat in the European Union*, *Antibiotics (Basel)* 9. DOI: 10.3390/antibiotics9100678.

Bezabih, Y. M., W. Sabiiti, E. Alamneh, A. Bezabih, G. M. Peterson, W. M. Bezabhe and A. Roujeinikova (2021): *The Global Prevalence and Trend of Human Intestinal Carriage of Esbl-Producing Escherichia Coli in the Community*, *J Antimicrob Chemother* 76: 22-29. DOI: 10.1093/jac/dkaa399.

Blaak, H., R. A. Hamidjaja, A. H. van Hoek, L. de Heer, A. M. de Roda Husman and F. M. Schets (2014): *Detection of Extended-Spectrum Beta-Lactamase (Esbl)-Producing Escherichia Coli on Flies at Poultry Farms*, *Appl Environ Microbiol* 80: 239-246. DOI: 10.1128/aem.02616-13.

Blaak, H., A. H. van Hoek, R. A. Hamidjaja, R. Q. van der Plaats, L. Kerkhof-de Heer, A. M. de Roda Husman and F. M. Schets (2015): *Distribution, Numbers, and Diversity of Esbl-Producing E. Coli in the Poultry Farm Environment*, *PLoS One* 10: e0135402. DOI: 10.1371/journal.pone.0135402.

Boireau, C., É. Morignat, G. Cazeau, N. Jarrige, É. Jouy, M. Haenni, J. Y. Madec, A. Leblond and É. Gay (2018): *Antimicrobial Resistance Trends in Escherichia Coli Isolated from Diseased Food-Producing Animals in France: A 14-Year Period Time-Series Study*, *Zoonoses Public Health* 65: e86-e94. DOI: 10.1111/zph.12412.

Bonedahl, J., M. Drobni, M. Gauthier-Clerc, J. Hernandez, S. Granholm, Y. Kayser, A. Melhus, G. Kahlmeter, J. Waldenström, A. Johansson and B. Olsen (2009): *Dissemination of Escherichia Coli with Ctx-M Type Esbl between Humans and Yellow-Legged Gulls in the South of France*, *PLoS one* 4: e5958-e5958. DOI: 10.1371/journal.pone.0005958.

Bonten, M. J. M. and D. Mevius (2015): *Less Evidence for an Important Role of Food-Producing Animals as Source of Antibiotic Resistance in Humans*, *Clinical Infectious Diseases* 60: 1867-1867. DOI: 10.1093/cid/civ275.

Bourély, C., T. Coeffic, J. Caillon, S. Thibaut, G. Cazeau, E. Jouy, N. Jarrige, C. Chauvin, J. Y. Madec, M. Haenni, A. Leblond and E. Gay (2020): *Trends in Antimicrobial Resistance among Escherichia Coli from Defined Infections in Humans and Animals*, *J Antimicrob Chemother* 75: 1525-1529. DOI: 10.1093/jac/dkaa022.

Brinas, L., M. A. Moreno, M. Zarazaga, C. Porrero, Y. Saenz, M. Garcia, L. Dominguez and C. Torres (2003): *Detection of Cmy-2, Ctx-M-14, and Shv-12 Beta-Lactamases in Escherichia Coli Fecal-Sample Isolates from Healthy Chickens*, *Antimicrob Agents Chemother* 47: 2056-2058. DOI: 10.1128/aac.47.6.2056-2058.2003.

Bush, K. (2018): *Past and Present Perspectives on B-Lactamases*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 62: e01076-01018. DOI: 10.1128/AAC.01076-18.

Bush, K. and P. A. Bradford (2016): *B-Lactams and B-Lactamase Inhibitors: An Overview*, *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 6: a025247. DOI: 10.1101/cshperspect.a025247.

Bush, K. and G. A. Jacoby (2010): *Updated Functional Classification of Beta-Lactamases*, *Antimicrob Agents Chemother* 54: 969-976. DOI: 10.1128/aac.01009-09.

Bush, K., G. A. Jacoby and A. A. Medeiros (1995): *A Functional Classification Scheme for Beta-Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure*, *Antimicrob Agents Chemother* 39: 1211-1233. DOI: 10.1128/aac.39.6.1211.

C.L.S.I. (2012). *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – Eleventh Edition. Clsi Document M02-A11. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa, USA,* Abgerufen am: 08.08.2021 um 11:00 Uhr, von <https://www.researchgate.net/file.PostFileLoader.html?id=58139aa4615e27240754da03&ass etKey=AS%3A422233756704774%401477679780485>.

Cantón, R. and T. M. Coque (2006): *The Ctx-M Beta-Lactamase Pandemic*, *Curr Opin Microbiol* 9: 466-475. DOI: 10.1016/j.mib.2006.08.011.

Cantón, R., A. Novais, A. Valverde, E. Machado, L. Peixe, F. Baquero and T. M. Coque (2008): *Prevalence and Spread of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Europe*, *Clin Microbiol Infect* 14 Suppl 1: 144-153. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2007.01850.x.

Carattoli, A. (2011): *Plasmids in Gram Negatives: Molecular Typing of Resistance Plasmids*, *Int J Med Microbiol* 301: 654-658. DOI: 10.1016/j.ijmm.2011.09.003.

Carattoli, A., A. Garcia-Fernandez, P. Varesi, D. Fortini, S. Gerardi, A. Penni, C. Mancini and A. Giordano (2008): *Molecular Epidemiology of Escherichia Coli Producing Extended-*

Spectrum Beta-Lactamases Isolated in Rome, Italy, J Clin Microbiol 46: 103-108. DOI: 10.1128/JCM.01542-07.

Carmo, L. P., L. R. Nielsen, P. M. da Costa and L. Alban (2014): *Exposure Assessment of Extended-Spectrum Beta-Lactamases/Ampc Beta-Lactamases-Producing Escherichia Coli in Meat in Denmark*, Infect Ecol Epidemiol 4. DOI: 10.3402/iee.v4.22924.

Ceccarelli, D., A. Kant, A. van Essen-Zandbergen, C. Dierikx, J. Hordijk, B. Wit, D. J. Mevius and K. T. Veldman (2019): *Diversity of Plasmids and Genes Encoding Resistance to Extended Spectrum Cephalosporins in Commensal Escherichia Coli from Dutch Livestock in 2007-2017*, Front Microbiol 10: 76. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00076.

Chantziaras, I., F. Boyen, B. Callens and J. Dewulf (2014): *Correlation between Veterinary Antimicrobial Use and Antimicrobial Resistance in Food-Producing Animals: A Report on Seven Countries*, J Antimicrob Chemother 69: 827-834. DOI: 10.1093/jac/dkt443.

Coloe, P. J., T. J. Bagust and L. Ireland (1984): *Development of the Normal Gastrointestinal Microflora of Specific Pathogen-Free Chickens*, J Hyg (Lond) 92: 79-87. DOI: 10.1017/s0022172400064056.

Cortés, P., V. Blanc, A. Mora, G. Dahbi, J. E. Blanco, M. Blanco, C. López, A. Andreu, F. Navarro, M. P. Alonso, G. Bou, J. Blanco and M. Llagostera (2010): *Isolation and Characterization of Potentially Pathogenic Antimicrobial-Resistant Escherichia Coli Strains from Chicken and Pig Farms in Spain*, Appl Environ Microbiol 76: 2799-2805. DOI: 10.1128/aem.02421-09.

Costa, D., P. Poeta, Y. Sáenz, A. C. Coelho, M. Matos, L. Vinué, J. Rodrigues and C. Torres (2008): *Prevalence of Antimicrobial Resistance and Resistance Genes in Faecal Escherichia Coli Isolates Recovered from Healthy Pets*, Vet Microbiol 127: 97-105. DOI: 10.1016/j.vetmic.2007.08.004.

Costa, D., P. Poeta, Y. Sáenz, L. Vinué, B. Rojo-Bezares, A. Jouini, M. Zarazaga, J. Rodrigues and C. Torres (2006): *Detection of Escherichia Coli Harboring Extended-Spectrum B-Lactamases of the Ctx-M, Tem and Shv Classes in Faecal Samples of Wild Animals in Portugal*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy 58: 1311-1312. DOI: 10.1093/jac/dkl415.

Costa, D., L. Vinué, P. Poeta, A. C. Coelho, M. Matos, Y. Sáenz, S. Somalo, M. Zarazaga, J. Rodrigues and C. Torres (2009): *Prevalence of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Escherichia Coli Isolates in Faecal Samples of Broilers*, Vet Microbiol 138: 339-344. DOI: 10.1016/j.vetmic.2009.03.029.

Cressman, M. D., Z. Yu, M. C. Nelson, S. J. Moeller, M. S. Lilburn and H. N. Zerby (2010): *Interrelations between the Microbiotas in the Litter and in the Intestines of Commercial Broiler Chickens*, Appl Environ Microbiol 76: 6572-6582. DOI: 10.1128/aem.00180-10.

Cristóvão, F., C. A. Alonso, G. Igrejas, M. Sousa, V. Silva, J. E. Pereira, C. Lozano, G. Cortés-Cortés, C. Torres and P. Poeta (2017): *Clonal Diversity of Extended-Spectrum Beta-Lactamase Producing Escherichia Coli Isolates in Fecal Samples of Wild Animals*, FEMS Microbiol Lett 364. DOI: 10.1093/femsle/fnx039.

Daehre, K., M. Projahn, T. Semmler, U. Roesler and A. Friese (2018): *Extended-Spectrum Beta-Lactamase-/Ampc Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Broiler Farms: Transmission Dynamics at Farm Level*, Microb Drug Resist 24: 511-518. DOI: 10.1089/mdr.2017.0150.

Dahms, C., N. O. Hübner, A. Kossow, A. Mellmann, K. Dittmann and A. Kramer (2015): *Occurrence of Esbl-Producing Escherichia Coli in Livestock and Farm Workers in Mecklenburg-Western Pomerania, Germany*, PLoS One 10: e0143326. DOI: 10.1371/journal.pone.0143326.

Dame-Korevaar, A., E. A. J. Fischer, A. Stegeman, D. Mevius, A. van Essen-Zandbergen, F. Velkers and J. van der Goot (2017): *Dynamics of Cmy-2 Producing E. Coli in a Broiler Parent Flock*, Vet Microbiol 203: 211-214. DOI: 10.1016/j.vetmic.2017.03.024.

Dame-Korevaar, A., E. A. J. Fischer, J. van der Goot, A. Stegeman and D. Mevius (2019): *Transmission Routes of Esbl/Pampc Producing Bacteria in the Broiler Production Pyramid, a Literature Review*, Prev Vet Med 162: 136-150. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2018.12.002.

Dame-Korevaar, A., E. A. J. Fischer, J. van der Goot, F. Velkers, D. Ceccarelli, D. Mevius and A. Stegeman (2020a): *Early Life Supply of Competitive Exclusion Products Reduces Colonization of Extended Spectrum Beta-Lactamase-Producing Escherichia Coli in Broilers*, Poult Sci 99: 4052-4064. DOI: 10.1016/j.psj.2020.04.025.

Dame-Korevaar, A., J. G. Kers, J. van der Goot, F. C. Velkers, D. Ceccarelli, D. J. Mevius, A. Stegeman and E. A. J. Fischer (2020b): *Competitive Exclusion Prevents Colonization and Compartmentalization Reduces Transmission of Esbl-Producing Escherichia Coli in Broilers*, Front Microbiol 11: 566619. DOI: 10.3389/fmicb.2020.566619.

Datta, N. and P. Kontomichalou (1965): *Penicillinase Synthesis Controlled by Infectious R Factors in Enterobacteriaceae*, Nature 208: 239-241. DOI: 10.1038/208239a0.

Day, M. J., I. Rodríguez, A. van Essen-Zandbergen, C. Dierikx, K. Kadlec, A.-K. Schink, G. Wu, M. A. Chattaway, V. DoNascimento, J. Wain, R. Helmuth, B. Guerra, S. Schwarz, J. Threlfall, M. J. Woodward, N. Coldham, D. Mevius and N. Woodford (2016a): *Diversity of Sts, Plasmids and Esbl Genes among Escherichia Coli from Humans, Animals and Food in Germany, the Netherlands and the Uk*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy 71: 1178-1182. DOI: 10.1093/jac/dkv485.

Day, M. J., I. Rodriguez, A. van Essen-Zandbergen, C. Dierikx, K. Kadlec, A. K. Schink, G. Wu, M. A. Chattaway, V. DoNascimento, J. Wain, R. Helmuth, B. Guerra, S. Schwarz, J. Threlfall, M. J. Woodward, N. Coldham, D. Mevius and N. Woodford (2016b): *Diversity of Sts, Plasmids and Esbl Genes among Escherichia Coli from Humans, Animals and Food in*

Germany, the Netherlands and the UK, *J Antimicrob Chemother* 71: 1178-1182. DOI: 10.1093/jac/dkv485.

De Angelis, G., P. Del Giacomo, B. Posteraro, M. Sanguinetti and M. Tumbarello (2020): *Molecular Mechanisms, Epidemiology, and Clinical Importance of Beta-Lactam Resistance in Enterobacteriaceae*, *Int J Mol Sci* 21. DOI: 10.3390/ijms21145090.

de Been, M., V. F. Lanza, M. de Toro, J. Scharringa, W. Dohmen, Y. Du, J. Hu, Y. Lei, N. Li, A. Tooming-Klunderud, D. J. Heederik, A. C. Fluit, M. J. Bonten, R. J. Willems, F. de la Cruz and W. van Schaik (2014): *Dissemination of Cephalosporin Resistance Genes between Escherichia Coli Strains from Farm Animals and Humans by Specific Plasmid Lineages*, *PLoS Genet* 10: e1004776. DOI: 10.1371/journal.pgen.1004776.

de Kraker, M. E., M. Wolkewitz, P. G. Davey, W. Koller, J. Berger, J. Nagler, C. Icket, S. Kalenic, J. Horvatic, H. Seifert, A. Kaasch, O. Paniara, A. Argyropoulou, M. Bompola, E. Smyth, M. Skally, A. Raglio, U. Dumpis, A. Melbarde Kelmere, M. Borg, D. Xuereb, M. C. Ghita, M. Noble, J. Kolman, S. Grabljevec, D. Turner, L. Lansbury and H. Grundmann (2011): *Burden of Antimicrobial Resistance in European Hospitals: Excess Mortality and Length of Hospital Stay Associated with Bloodstream Infections Due to Escherichia Coli Resistant to Third-Generation Cephalosporins*, *J Antimicrob Chemother* 66: 398-407. DOI: 10.1093/jac/dkq412.

de Lagarde, M., J. M. Fairbrother and J. Arsenault (2020): *Prevalence, Risk Factors, and Characterization of Multidrug Resistant and Esbl/Ampc Producing Escherichia Coli in Healthy Horses in Quebec, Canada, in 2015-2016*, *Animals (Basel)* 10. DOI: 10.3390/ani10030523.

de Lagarde, M., C. Larrieu, K. Praud, C. Schouler, B. Doublet, G. Sallé, J. M. Fairbrother and J. Arsenault (2019): *Prevalence, Risk Factors, and Characterization of Multidrug Resistant and Extended Spectrum B-Lactamase/Ampc B-Lactamase Producing Escherichia Coli in Healthy Horses in France in 2015*, *Journal of veterinary internal medicine* 33: 902-911. DOI: 10.1111/jvim.15415.

de Rooij, M. M. T., G. Hoek, H. Schmitt, I. Janse, A. Swart, C. B. M. Maassen, M. Schalk, D. J. J. Heederik and I. M. Wouters (2019): *Insights into Livestock-Related Microbial Concentrations in Air at Residential Level in a Livestock Dense Area*, *Environmental science & technology* 53: 7746-7758. DOI: 10.1021/acs.est.8b07029.

Delgado-Valverde, M., J. Sojo-Dorado, A. Pascual and J. Rodríguez-Baño (2013): *Clinical Management of Infections Caused by Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae*, *Ther Adv Infect Dis* 1: 49-69. DOI: 10.1177/2049936113476284.

Dierikx, C., J. van der Goot, T. Fabri, A. van Essen-Zandbergen, H. Smith and D. Mevius (2013a): *Extended-Spectrum-B-Lactamase- and Ampc-B-Lactamase-Producing Escherichia Coli in Dutch Broilers and Broiler Farmers*, *J Antimicrob Chemother* 68: 60-67. DOI: 10.1093/jac/dks349.

Dierikx, C., A. van Essen-Zandbergen, K. Veldman, H. Smith and D. Mevius (2010): *Increased Detection of Extended Spectrum Beta-Lactamase Producing Salmonella Enterica*

and *Escherichia Coli* Isolates from Poultry, *Vet Microbiol* 145: 273-278. DOI: 10.1016/j.vetmic.2010.03.019.

Dierikx, C. M., J. van der Goot, A. van Essen-Zandbergen and D. J. Mevius (2018): *Dynamics of Cefotaxime Resistant Escherichia Coli in Broilers in the First Week of Life*, *Vet Microbiol* 222: 64-68. DOI: 10.1016/j.vetmic.2018.07.001.

Dierikx, C. M., J. A. van der Goot, H. E. Smith, A. Kant and D. J. Mevius (2013b): *Presence of Esbl/Ampc-Producing Escherichia Coli in the Broiler Production Pyramid: A Descriptive Study*, *PLoS One* 8: e79005. DOI: 10.1371/journal.pone.0079005.

Dierikx, C. M., E. van Duijkeren, A. H. Schoormans, A. van Essen-Zandbergen, K. Veldman, A. Kant, X. W. Huijsdens, K. van der Zwaluw, J. A. Wagenaar and D. J. Mevius (2012): *Occurrence and Characteristics of Extended-Spectrum-B-Lactamase- and Ampc-Producing Clinical Isolates Derived from Companion Animals and Horses*, *J Antimicrob Chemother* 67: 1368-1374. DOI: 10.1093/jac/dks049.

Dohmen, W., M. J. Bonten, M. E. Bos, S. van Marm, J. Scharringa, J. A. Wagenaar and D. J. Heederik (2015): *Carriage of Extended-Spectrum B-Lactamases in Pig Farmers Is Associated with Occurrence in Pigs*, *Clin Microbiol Infect* 21: 917-923. DOI: 10.1016/j.cmi.2015.05.032.

Dohmen, W., A. Dorado-García, M. J. Bonten, J. A. Wagenaar, D. Mevius and D. J. Heederik (2017): *Risk Factors for Esbl-Producing Escherichia Coli on Pig Farms: A Longitudinal Study in the Context of Reduced Use of Antimicrobials*, *PLoS One* 12: e0174094. DOI: 10.1371/journal.pone.0174094.

Dolejska, M., M. Matulova, L. Kohoutova, I. Literak, J. Bardon and A. Cizek (2011): *Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Escherichia Coli in Turkey Meat Production Farms in the Czech Republic: National Survey Reveals Widespread Isolates with Bla(Shv-12) Genes on Incfii Plasmids*, *Lett Appl Microbiol* 53: 271-277. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2011.03099.x.

Dolejska, M. and C. C. Papagiannitsis (2018): *Plasmid-Mediated Resistance Is Going Wild*, *Plasmid* 99: 99-111. DOI: 10.1016/j.plasmid.2018.09.010.

Dorado-Garcia, A., J. H. Smid, W. van Pelt, M. J. M. Bonten, A. C. Fluit, G. van den Bunt, J. A. Wagenaar, J. Hordijk, C. M. Dierikx, K. T. Veldman, A. de Koeijer, W. Dohmen, H. Schmitt, A. Liakopoulos, E. Pacholewicz, T. Lam, A. G. Velthuis, A. Heuvelink, M. A. Gonggrijp, E. van Duijkeren, A. van Hoek, A. M. de Roda Husman, H. Blaak, A. H. Havelaar, D. J. Mevius and D. J. J. Heederik (2018): *Molecular Relatedness of Esbl/Ampc-Producing Escherichia Coli from Humans, Animals, Food and the Environment: A Pooled Analysis*, *J Antimicrob Chemother* 73: 339-347. DOI: 10.1093/jac/dkx397.

Dorado-García, A., J. H. Smid, W. van Pelt, M. J. M. Bonten, A. C. Fluit, G. van den Bunt, J. A. Wagenaar, J. Hordijk, C. M. Dierikx, K. T. Veldman, A. de Koeijer, W. Dohmen, H. Schmitt, A. Liakopoulos, E. Pacholewicz, T. Lam, A. G. Velthuis, A. Heuvelink, M. A. Gonggrijp, E. van Duijkeren, A. van Hoek, A. M. de Roda Husman, H. Blaak, A. H.

Havelaar, D. J. Mevius and D. J. J. Heederik (2018): *Molecular Relatedness of Esbl/Ampc-Producing Escherichia Coli from Humans, Animals, Food and the Environment: A Pooled Analysis*, J Antimicrob Chemother 73: 339-347. DOI: 10.1093/jac/dkx397.

E.F.S.A. (2012): *Technical Specifications on the Harmonised Monitoring and Reporting of Antimicrobial Resistance in Salmonella, Campylobacter and Indicator Escherichia Coli and Enterococcus Spp. Bacteria Transmitted through Food*, EFSA Journal 10: 2742. DOI: 10.2903/j.efsa.2012.2742.

E.F.S.A. (2021): *The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in Zoonotic and Indicator Bacteria from Humans, Animals and Food in 2018/2019*, Efsa j 19: e06490. DOI: 10.2903/j.efsa.2021.6490.

E.M.A., C. f. M. P. f. V. Use, E. Panel o. B. Hazards, D. Murphy, A. Ricci, Z. Auce, J. G. Beechinor, H. Bergendahl, R. Breathnach, J. Bureš, J. P. Duarte Da Silva, J. Hederová, P. Hekman, C. Ibrahim, E. Kozuharov, G. Kulcsár, E. Lander Persson, J. M. Lenhardsson, P. Mačiulskis, I. Malemis, L. Markus-Cizelj, A. Michaelidou-Patsia, M. Nevalainen, P. Pasquali, J.-C. Rouby, J. Schefferlie, W. Schlumbohm, M. Schmit, S. Spiteri, S. Srčić, L. Taban, T. Tiirats, B. Urbain, E.-M. Vestergaard, A. Wachnik-Święcicka, J. Weeks, B. Zemann, A. Allende, D. Bolton, M. Chemaly, P. S. Fernandez Escamez, R. Girones, L. Herman, K. Koutsoumanis, R. Lindqvist, B. Nørrung, L. Robertson, G. Ru, M. Sanaa, M. Simmons, P. Skandamis, E. Snary, N. Speybroeck, B. Ter Kuile, H. Wahlström, K. Baptiste, B. Catry, P. S. Cocconcilli, R. Davies, C. Ducrot, C. Friis, G. Jungersen, S. More, C. Muñoz Madero, P. Sanders, M. Bos, Z. Kunsagi, J. Torren Edo, R. Brozzi, D. Candiani, B. Guerra, E. Liebana, P. Stella, J. Threlfall and H. Jukes (2017): *Ema and Efsa Joint Scientific Opinion on Measures to Reduce the Need to Use Antimicrobial Agents in Animal Husbandry in the European Union, and the Resulting Impacts on Food Safety (Ronafa)*, EFSA journal. European Food Safety Authority 15: e04666-e04666. DOI: 10.2903/j.efsa.2017.4666.

Egea, P., L. López-Cerero, E. Torres, C. Gómez-Sánchez Mdel, L. Serrano, M. D. Navarro Sánchez-Ortiz, J. Rodríguez-Baño and A. Pascual (2012): *Increased Raw Poultry Meat Colonization by Extended Spectrum Beta-Lactamase-Producing Escherichia Coli in the South of Spain*, Int J Food Microbiol 159: 69-73. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.002.

Evers, E. G., A. Pielaat, J. H. Smid, E. van Duijkeren, F. B. Vennemann, L. M. Wijnands and J. E. Chardon (2017): *Comparative Exposure Assessment of Esbl-Producing Escherichia Coli through Meat Consumption*, PLoS One 12: e0169589. DOI: 10.1371/journal.pone.0169589.

Ewers, C., A. Bethe, T. Semmler, S. Guenther and L. H. Wieler (2012): *Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing and Ampc-Producing Escherichia Coli from Livestock and Companion Animals, and Their Putative Impact on Public Health: A Global Perspective*, Clin Microbiol Infect 18: 646-655. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2012.03850.x.

Ewers, C., A. de Jong, E. Prenger-Berninghoff, F. El Garch, U. Leidner, S. K. Tiwari and T. Semmler (2021): *Genomic Diversity and Virulence Potential of Esbl- and Ampc-Beta-Lactamase-Producing Escherichia Coli Strains from Healthy Food Animals across Europe*, Front Microbiol 12: 626774. DOI: 10.3389/fmicb.2021.626774.

Ewers, C., M. Grobbel, A. Bethe, L. H. Wieler and S. Guenther (2011): *Extended-Spectrum Beta-Lactamases-Producing Gram-Negative Bacteria in Companion Animals: Action Is Clearly Warranted!*, Berl Munch Tierarztl Wochenschr 124: 94-101. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21462862>.

Ewers, C., M. Grobbel, I. Stamm, P. A. Kopp, I. Diehl, T. Semmler, A. Fruth, J. Beutlich, B. Guerra, L. H. Wieler and S. Guenther (2010): *Emergence of Human Pandemic O25:H4-St131 Ctx-M-15 Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-Producing Escherichia Coli among Companion Animals*, J Antimicrob Chemother 65: 651-660. DOI: 10.1093/jac/dkq004.

Fagerström, A., P. Mölling, F. A. Khan, M. Sundqvist, J. Jass and B. Söderquist (2019): *Comparative Distribution of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Escherichia Coli from Urine Infections and Environmental Waters*, PLOS ONE 14: e0224861. DOI: 10.1371/journal.pone.0224861.

Falgenhauer, L., C. Imirzalioglu, H. Ghosh, K. Gwozdziński, J. Schmiedel, K. Gentil, R. Bauerfeind, P. Kämpfer, H. Seifert, G. B. Michael, S. Schwarz, Y. Pfeifer, G. Werner, M. Pietsch, U. Roesler, B. Guerra, J. Fischer, H. Sharp, A. Käsbohrer, A. Goesmann, K. Hille, L. Kreienbrock and T. Chakraborty (2016): *Circulation of Clonal Populations of Fluoroquinolone-Resistant Ctx-M-15-Producing Escherichia Coli St410 in Humans and Animals in Germany*, International Journal of Antimicrobial Agents 47: 457-465. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.03.019>.

Falgenhauer, L., A. Zur Nieden, S. Harpel, J. Falgenhauer and E. Domann (2021): *Clonal Ctx-M-15-Producing Escherichia Coli St-949 Are Present in German Surface Water*, Front Microbiol 12: 617349. DOI: 10.3389/fmicb.2021.617349.

Fallschissel, K., K. Klug, P. Kämpfer and U. Jäckel (2010): *Detection of Airborne Bacteria in a German Turkey House by Cultivation-Based and Molecular Methods*, Ann Occup Hyg 54: 934-943. DOI: 10.1093/annhyg/meq054.

Feye, K. M., M. F. A. Baxter, G. Tellez-Isaias, M. H. Kogut and S. C. Ricke (2020): *Influential Factors on the Composition of the Conventionally Raised Broiler Gastrointestinal Microbiomes*, Poultry science 99: 653-659. DOI: 10.1016/j.psj.2019.12.013.

Franceschini, G., M. Bottino, I. Millet, E. Martello, F. Zaltron, A. R. Favretto, N. Vonesch, P. Tomao and A. Mannelli (2019): *Assessment of the Exposure of Turkey Farmers to Antimicrobial Resistance Associated with Working Practices*, Vet Sci 6. DOI: 10.3390/vetsci6010013.

Franco, A., P. Leekitcharoenphon, F. Feltrin, P. Alba, G. Cordaro, M. Iurescia, R. Tolli, M. D'Incau, M. Staffolani, E. Di Giannatale, R. S. Hendriksen and A. Battisti (2016): *Emergence of a Clonal Lineage of Multidrug-Resistant Esbl-Producing Salmonella Infantis Transmitted from Broilers and Broiler Meat to Humans in Italy between 2011 and 2014*, PLOS ONE 10: e0144802. DOI: 10.1371/journal.pone.0144802.

Friese, A., J. Schulz, L. Hoehle, A. Fetsch, B. A. Tenhagen, J. Hartung and U. Roesler (2012): *Occurrence of Mrsa in Air and Housing Environment of Pig Barns*, Vet Microbiol 158: 129-135. DOI: 10.1016/j.vetmic.2012.01.019.

Friese, A., J. Schulz, H. Laube, C. von Salviati, J. Hartung and U. Roesler (2013a): *Faecal Occurrence and Emissions of Livestock-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus (Lamrsa) and Esbl/Ampc-Producing E. Coli from Animal Farms in Germany*, Berl Munch Tierarztl Wochenschr 126: 175-180. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23540202>.

Friese, A., J. Schulz, K. Zimmermann, B. A. Tenhagen, A. Fetsch, J. Hartung and U. Rösler (2013b): *Occurrence of Livestock-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus in Turkey and Broiler Barns and Contamination of Air and Soil Surfaces in Their Vicinity*, Appl Environ Microbiol 79: 2759-2766. DOI: 10.1128/aem.03939-12.

Gao, L., Y. Tan, X. Zhang, J. Hu, Z. Miao, L. Wei and T. Chai (2015): *Emissions of Escherichia Coli Carrying Extended-Spectrum B-Lactamase Resistance from Pig Farms to the Surrounding Environment*, Int J Environ Res Public Health 12: 4203-4213. DOI: 10.3390/ijerph120404203.

Geser, N., R. Stephan and H. Hächler (2012): *Occurrence and Characteristics of Extended-Spectrum B-Lactamase (Esbl) Producing Enterobacteriaceae in Food Producing Animals, Minced Meat and Raw Milk*, BMC Vet Res 8: 21. DOI: 10.1186/1746-6148-8-21.

Gniadkowski, M. (2001): *Evolution and Epidemiology of Extended-Spectrum Beta-Lactamases (Esbls) and Esbl-Producing Microorganisms*, Clin Microbiol Infect 7: 597-608. DOI: 10.1046/j.1198-743x.2001.00330.x.

Greenpeace (2021): *Gefährliche Keime Aus Tierfabriken - Antibiotikaresistente Bakterien in Abwässern Von Schlachthöfen*. 25. https://www.greenpeace.de/sites/www.greenpeace.de/files/publications/report_schlachthof-abwaesser_final.pdf, abgerufen am: 13.05.2021 um 19:42 Uhr.

Greig, J., A. Rajić, I. Young, M. Mascarenhas, L. Waddell and J. LeJeune (2015): *A Scoping Review of the Role of Wildlife in the Transmission of Bacterial Pathogens and Antimicrobial Resistance to the Food Chain*, Zoonoses Public Health 62: 269-284. DOI: 10.1111/zph.12147.

Grünzweil, O. M., L. Palmer, A. Cabal, M. P. Szostak, W. Ruppitsch, C. Kornschöber, M. Korus, D. Misic, T. Bernreiter-Hofer, A. D. J. Korath, A. T. Feßler, F. Allerberger, S. Schwarz, J. Spargser, E. Müller, S. D. Braun, S. Monecke, R. Ehrlich, C. Walzer, H. Smodlaka and I. Lončarić (2021): *Presence of B-Lactamase-Producing Enterobacterales and Salmonella Isolates in Marine Mammals*, Int J Mol Sci 22. DOI: 10.3390/ijms22115905.

Guardia, S., B. Konsak, S. Combes, F. Levenez, L. Cauquil, J. F. Guillot, C. Moreau-Vauzelle, M. Lessire, H. Juin and I. Gabriel (2011): *Effects of Stocking Density on the Growth Performance and Digestive Microbiota of Broiler Chickens*, Poult Sci 90: 1878-1889. DOI: 10.3382/ps.2010-01311.

Guenther, S., K. Aschenbrenner, I. Stamm, A. Bethe, T. Semmler, A. Stubbe, M. Stubbe, N. Batsajkhan, Y. Glupczynski, L. H. Wieler and C. Ewers (2012a): *Comparable High Rates of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-Producing Escherichia Coli in Birds of Prey from Germany and Mongolia*, PLoS One 7: e53039. DOI: 10.1371/journal.pone.0053039.

Guenther, S., A. Bethe, A. Fruth, T. Semmler, R. G. Ulrich, L. H. Wieler and C. Ewers (2012b): *Frequent Combination of Antimicrobial Multiresistance and Extraintestinal Pathogenicity in Escherichia Coli Isolates from Urban Rats (Rattus Norvegicus) in Berlin, Germany*, PLoS One 7: e50331. DOI: 10.1371/journal.pone.0050331.

Guenther, S., M. Grobbel, J. Beutlich, A. Bethe, N. D. Friedrich, A. Goedecke, A. Lübke-Becker, B. Guerra, L. H. Wieler and C. Ewers (2010): *Ctx-M-15-Type Extended-Spectrum Beta-Lactamases-Producing Escherichia Coli from Wild Birds in Germany*, Environ Microbiol Rep 2: 641-645. DOI: 10.1111/j.1758-2229.2010.00148.x.

Guenther, S., T. Semmler, A. Stubbe, M. Stubbe, L. H. Wieler and K. Schaufler (2017): *Chromosomally Encoded Esbl Genes in Escherichia Coli of St38 from Mongolian Wild Birds*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy 72: 1310-1313. DOI: 10.1093/jac/dkx006.

Gundran, R. S., P. A. Cardenio, M. A. Villanueva, F. B. Sison, C. C. Benigno, K. Kreausukon, D. Pichpol and V. Punyapornwithaya (2019): *Prevalence and Distribution of Bla(Ctx-M), Bla(Shv), Bla(Tem) Genes in Extended- Spectrum B- Lactamase- Producing E. Coli Isolates from Broiler Farms in the Philippines*, BMC Vet Res 15: 227. DOI: 10.1186/s12917-019-1975-9.

Haberecht, H. B., N. J. Nealon, J. R. Gilliland, A. V. Holder, C. Runyan, R. C. Opiel, H. M. Ibrahim, L. Mueller, F. Schrupp, S. Vilchez, L. Antony, J. Scaria and E. P. Ryan (2019): *Antimicrobial-Resistant Escherichia Coli from Environmental Waters in Northern Colorado*, J Environ Public Health 2019: 3862949. DOI: 10.1155/2019/3862949.

Hammerum, A. M., J. Larsen, V. D. Andersen, C. H. Lester, T. S. Skovgaard Skytte, F. Hansen, S. S. Olsen, H. Mordhorst, R. L. Skov, F. M. Aarestrup and Y. Agersø (2014): *Characterization of Extended-Spectrum B-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*, J Antimicrob Chemother 69: 2650-2657. DOI: 10.1093/jac/dku180.

Han, Z., T. Willer, L. Li, C. Pielsticker, I. Rychlik, P. Velge, B. Kaspers and S. Rautenschlein (2017): *Influence of the Gut Microbiota Composition on Campylobacter Jejuni Colonization in Chickens*, Infect Immun 85. DOI: 10.1128/iai.00380-17.

Hansen, K. H., P. Damborg, M. Andreasen, S. S. Nielsen and L. Guardabassi (2013): *Carriage and Fecal Counts of Cefotaxime M-Producing Escherichia Coli in Pigs: A Longitudinal Study*, Appl Environ Microbiol 79: 794-798. DOI: 10.1128/aem.02399-12.

Hao, X. X., B. M. Li, C. Y. Wang, Q. Zhang and W. Cao (2013): *Application of Slightly Acidic Electrolyzed Water for Inactivating Microbes in a Layer Breeding House*, Poultry Science 92: 2560-2566. DOI: <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03117>.

Hartmann, A., L. Amoureux, A. Locatelli, G. Depret, C. Jolivet, E. Gueneau and C. Neuwirth (2012): *Occurrence of Ctx-M Producing Escherichia Coli in Soils, Cattle, and Farm Environment in France (Burgundy Region)*, Frontiers in Microbiology 3. DOI: [10.3389/fmicb.2012.00083](https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00083).

Hering, J., C. Fromke, C. von Munchhausen, M. Hartmann, B. Schneider, A. Friese, U. Rosler, L. Kreienbrock and K. Hille (2016): *Cefotaxime-Resistant Escherichia Coli in Broiler Farms-a Cross-Sectional Investigation in Germany*, Prev Vet Med 125: 154-157. DOI: [10.1016/j.prevetmed.2016.01.003](https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.01.003).

Hering, J., K. Hille, C. Fromke, C. von Munchhausen, M. Hartmann, B. Schneider, A. Friese, U. Roesler, R. Merle and L. Kreienbrock (2014): *Prevalence and Potential Risk Factors for the Occurrence of Cefotaxime Resistant Escherichia Coli in German Fattening Pig Farms--a Cross-Sectional Study*, Prev Vet Med 116: 129-137. DOI: [10.1016/j.prevetmed.2014.06.014](https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.06.014).

Hernandez, J., A. Johansson, J. Stedt, S. Bengtsson, A. Porczak, S. Granholm, D. González-Acuña, B. Olsen, J. Bonnedahl and M. Drobni (2013): *Characterization and Comparison of Extended-Spectrum B-Lactamase (Esbl) Resistance Genotypes and Population Structure of Escherichia Coli Isolated from Franklin's Gulls (Leucophaeus Pipixcan) and Humans in Chile*, PLoS One 8: e76150. DOI: [10.1371/journal.pone.0076150](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076150).

Hernández, J., J. Stedt, J. Bonnedahl, Y. Molin, M. Drobni, N. Calisto-Ulloa, C. Gomez-Fuentes, M. S. Astorga-España, D. González-Acuña, J. Waldenström, M. Blomqvist and B. Olsen (2012): *Human-Associated Extended-Spectrum B-Lactamase in the Antarctic*, Appl Environ Microbiol 78: 2056-2058. DOI: [10.1128/aem.07320-11](https://doi.org/10.1128/aem.07320-11).

Heuvelink, A. E., M. A. Gonggrijp, R. G. J. Buter, C. C. Ter Bogt-Kappert, G. van Schaik, A. G. J. Velthuis and T. Lam (2019): *Prevalence of Extended-Spectrum and Ampc B-Lactamase-Producing Escherichia Coli in Dutch Dairy Herds*, Vet Microbiol 232: 58-64. DOI: [10.1016/j.vetmic.2019.04.005](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.04.005).

Hille, K., I. Ruddat, A. Schmid, J. Hering, M. Hartmann, C. von Munchhausen, B. Schneider, U. Messelhäusser, A. Friese, R. Mansfeld, A. Käsbohrer, S. Hörmansdorfer, U. Roesler and L. Kreienbrock (2017): *Cefotaxime-Resistant E. Coli in Dairy and Beef Cattle Farms-Joint Analyses of Two Cross-Sectional Investigations in Germany*, Prev Vet Med 142: 39-45. DOI: [10.1016/j.prevetmed.2017.05.003](https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.05.003).

Hillenkamp, F. and M. Karas (1990): *Mass Spectrometry of Peptides and Proteins by Matrix-Assisted Ultraviolet Laser Desorption/Ionization*, Methods Enzymol 193: 280-295. DOI: [10.1016/0076-6879\(90\)93420-p](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)93420-p).

Hiroi, M., S. Matsui, R. Kubo, N. Iida, Y. Noda, T. Kanda, K. Sugiyama, Y. Hara-Kudo and N. Ohashi (2012): *Factors for Occurrence of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Escherichia Coli in Broilers*, J Vet Med Sci 74: 1635-1637. DOI: 10.1292/jvms.11-0479.

Hocquet, D., A. Muller and X. Bertrand (2016): *What Happens in Hospitals Does Not Stay in Hospitals: Antibiotic-Resistant Bacteria in Hospital Wastewater Systems*, J Hosp Infect 93: 395-402. DOI: 10.1016/j.jhin.2016.01.010.

Hooban, B., A. Joyce, K. Fitzhenry, C. Chique and D. Morris (2020): *The Role of the Natural Aquatic Environment in the Dissemination of Extended Spectrum Beta-Lactamase and Carbapenemase Encoding Genes: A Scoping Review*, Water Res 180: 115880. DOI: 10.1016/j.watres.2020.115880.

Hopkins, K. L., A. Deheer-Graham, E. J. Threlfall, M. J. Batchelor and E. Liebana (2006): *Novel Plasmid-Mediated Ctx-M-8 Subgroup Extended-Spectrum Beta-Lactamase (Ctx-M-40) Isolated in the UK*, Int J Antimicrob Agents 27: 572-575. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2006.03.003.

Hordijk, J., E. Farmakioti, L. A. M. Smit, B. Duim, H. Graveland, M. J. P. Theelen and J. A. Wagenaar (2020): *Fecal Carriage of Extended-Spectrum-B-Lactamase/Ampc-Producing Escherichia Coli in Horses*, Appl Environ Microbiol 86. DOI: 10.1128/aem.02590-19.

Hordijk, J., D. J. Mevius, A. Kant, M. E. Bos, H. Graveland, A. B. Bosman, C. M. Hartskeerl, D. J. Heederik and J. A. Wagenaar (2013): *Within-Farm Dynamics of Esbl/Ampc-Producing Escherichia Coli in Veal Calves: A Longitudinal Approach*, J Antimicrob Chemother 68: 2468-2476. DOI: 10.1093/jac/dkt219.

Hou, J. P. and J. W. Poole (1971): *Beta-Lactam Antibiotics: Their Physicochemical Properties and Biological Activities in Relation to Structure*, J Pharm Sci 60: 503-532. DOI: 10.1002/jps.2600600402.

Hu, Y., X. Yang, J. Li, N. Lv, F. Liu, J. Wu, Y. C. Lin Ivan, N. Wu, C. Weimer Bart, F. Gao George, Y. Liu, B. Zhu and C. A. Elkins (2016): *The Bacterial Mobile Resistome Transfer Network Connecting the Animal and Human Microbiomes*, Applied and Environmental Microbiology 82: 6672-6681. DOI: 10.1128/AEM.01802-16.

Hu, Y. J., A. Ogyu, B. J. Cowling, K. Fukuda and H. H. Pang (2019): *Available Evidence of Antibiotic Resistance from Extended-Spectrum B-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Paediatric Patients in 20 Countries: A Systematic Review and Meta-Analysis*, Bull World Health Organ 97: 486-501b. DOI: 10.2471/blt.18.225698.

Hu, Y. Y., J. C. Cai, H. W. Zhou, D. Chi, X. F. Zhang, W. L. Chen, R. Zhang and G. X. Chen (2013): *Molecular Typing of Ctx-M-Producing Escherichia Coli Isolates from Environmental Water, Swine Feces, Specimens from Healthy Humans, and Human Patients*, Appl Environ Microbiol 79: 5988-5996. DOI: 10.1128/aem.01740-13.

Huang, Y., L. Zeng, Y. Doi, L. Lv and J.-H. Liu (2020): *Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-Producing Escherichia Coli*, *The Lancet Infectious Diseases* 20: 404-405. DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30115-8.

Huijbers, P. M., H. Blaak, M. C. de Jong, E. A. Graat, C. M. Vandenbroucke-Grauls and A. M. de Roda Husman (2015): *Role of the Environment in the Transmission of Antimicrobial Resistance to Humans: A Review*, *Environ Sci Technol* 49: 11993-12004. DOI: 10.1021/acs.est.5b02566.

Huijbers, P. M., M. de Kraker, E. A. Graat, A. H. van Hoek, M. G. van Santen, M. C. de Jong, E. van Duijkeren and S. C. de Greeff (2013): *Prevalence of Extended-Spectrum B-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Humans Living in Municipalities with High and Low Broiler Density*, *Clin Microbiol Infect* 19: E256-259. DOI: 10.1111/1469-0691.12150.

Huijbers, P. M., E. A. Graat, A. P. Haenen, M. G. van Santen, A. van Essen-Zandbergen, D. J. Mevius, E. van Duijkeren and A. H. van Hoek (2014): *Extended-Spectrum and Ampc B-Lactamase-Producing Escherichia Coli in Broilers and People Living and/or Working on Broiler Farms: Prevalence, Risk Factors and Molecular Characteristics*, *J Antimicrob Chemother* 69: 2669-2675. DOI: 10.1093/jac/dku178.

Huijbers, P. M. C., E. A. M. Graat, A. van Hoek, C. Veenman, M. C. M. de Jong and E. van Duijkeren (2016): *Transmission Dynamics of Extended-Spectrum B-Lactamase and Ampc B-Lactamase-Producing Escherichia Coli in a Broiler Flock without Antibiotic Use*, *Prev Vet Med* 131: 12-19. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2016.07.001.

Huizinga, P., M. Kluytmans-van den Bergh, J. W. Rossen, I. Willemsen, C. Verhulst, P. H. M. Savelkoul, A. W. Friedrich, S. Garcia-Cobos and J. Kluytmans (2019): *Decreasing Prevalence of Contamination with Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae (Esbl-E) in Retail Chicken Meat in the Netherlands*, *PLoS One* 14: e0226828. DOI: 10.1371/journal.pone.0226828.

Ibekwe, A., L. Durso, T. F. Ducey, A. Oladeinde, C. R. Jackson, J. G. Frye, R. Dungan, T. Moorman, J. P. Brooks, A. Obayiuwana, H. Karathia, B. Fanelli and N. Hasan (2021): *Diversity of Plasmids and Genes Encoding Resistance to Extended-Spectrum B-Lactamase in Escherichia Coli from Different Animal Sources*, *Microorganisms* 9. DOI: 10.3390/microorganisms9051057.

Jiang, H. X., D. Tang, Y. H. Liu, X. H. Zhang, Z. L. Zeng, L. Xu and P. M. Hawkey (2012): *Prevalence and Characteristics of B-Lactamase and Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes in Escherichia Coli Isolated from Farmed Fish in China*, *J Antimicrob Chemother* 67: 2350-2353. DOI: 10.1093/jac/dks250.

Jiang, X., X. Cui, H. Xu, W. Liu, F. Tao, T. Shao, X. Pan and B. Zheng (2019): *Whole Genome Sequencing of Extended-Spectrum Beta-Lactamase (Esbl)-Producing Escherichia Coli Isolated from a Wastewater Treatment Plant in China*, *Front Microbiol* 10: 1797. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01797.

Johns, I., K. Verheyen, L. Good and A. Rycroft (2012): *Antimicrobial Resistance in Faecal Escherichia Coli Isolates from Horses Treated with Antimicrobials: A Longitudinal Study in Hospitalised and Non-Hospitalised Horses*, *Vet Microbiol* 159: 381-389. DOI: 10.1016/j.vetmic.2012.04.010.

Jones-Dias, D., V. Manageiro and M. Caniça (2016): *Influence of Agricultural Practice on Mobile Bla Genes: Inci1-Bearing Ctx-M, Shv, Cmy and Tem in Escherichia Coli from Intensive Farming Soils*, *Environ Microbiol* 18: 260-272. DOI: 10.1111/1462-2920.13021.

Jurburg, S. D., M. S. M. Brouwer, D. Ceccarelli, J. van der Goot, A. J. M. Jansman and A. Bossers (2019): *Patterns of Community Assembly in the Developing Chicken Microbiome Reveal Rapid Primary Succession*, *MicrobiologyOpen* 8: e00821. DOI: <https://doi.org/10.1002/mbo3.821>.

Kaesbohrer, A., K. Bakran-Lebl, A. Irrgang, J. Fischer, P. Kampf, A. Schiffmann, C. Werckenthin, M. Busch, L. Kreienbrock and K. Hille (2019): *Diversity in Prevalence and Characteristics of Esbl/Pampc Producing E. Coli in Food in Germany*, *Vet Microbiol* 233: 52-60. DOI: 10.1016/j.vetmic.2019.03.025.

Kaesbohrer, A., A. Schroeter, B. A. Tenhagen, K. Alt, B. Guerra and B. Appel (2012): *Emerging Antimicrobial Resistance in Commensal Escherichia Coli with Public Health Relevance*, *Zoonoses Public Health* 59 Suppl 2: 158-165. DOI: 10.1111/j.1863-2378.2011.01451.x.

Karanika, S., T. Karantanos, M. Arvanitis, C. Grigoras and E. Mylonakis (2016): *Fecal Colonization with Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae and Risk Factors among Healthy Individuals: A Systematic Review and Metaanalysis*, *Clin Infect Dis* 63: 310-318. DOI: 10.1093/cid/ciw283.

Karas, M. and F. Hillenkamp (1988): *Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10,000 Daltons*, *Anal Chem* 60: 2299-2301. DOI: 10.1021/ac00171a028.

Käsbohrer, A., B. Guerra, B. Tenhagen, A. Weiser, R. Helmuth, B. Appel and A. Schroeter (2013): *Antibiotikaresistenz Bei Kommensalen E. Coli in Der Tiermast–Eine Übersicht*, *UMID Umwelt und Mensch–Informationsdienst* 4: 25-30.

Kawamura, K., N. Nagano, M. Suzuki, J. I. Wachino, K. Kimura and Y. Arakawa (2017): *Esbl-Producing Escherichia Coli and Its Rapid Rise among Healthy People*, *Food Saf (Tokyo)* 5: 122-150. DOI: 10.14252/foodsafetyfscj.2017011.

Kim, D.-W. and C.-J. Cha (2021): *Antibiotic Resistome from the One-Health Perspective: Understanding and Controlling Antimicrobial Resistance Transmission*, *Experimental & molecular medicine* 53: 301-309. DOI: 10.1038/s12276-021-00569-z.

Klein, E. Y., T. P. Van Boeckel, E. M. Martinez, S. Pant, S. Gandra, S. A. Levin, H. Goossens and R. Laxminarayan (2018): *Global Increase and Geographic Convergence in*

Antibiotic Consumption between 2000 and 2015, Proceedings of the National Academy of Sciences 115: E3463. DOI: 10.1073/pnas.1717295115.

Kluytmans-van den Bergh, M. F., J. W. Rossen, P. C. Bruijning-Verhagen, M. J. Bonten, A. W. Friedrich, C. M. Vandenbroucke-Grauls, R. J. Willems and J. A. Kluytmans (2016): *Whole-Genome Multilocus Sequence Typing of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae*, J Clin Microbiol 54: 2919-2927. DOI: 10.1128/jcm.01648-16.

Kluytmans, J. A., I. T. Overdeest, I. Willemsen, M. F. Kluytmans-van den Bergh, K. van der Zwaluw, M. Heck, M. Rijnsburger, C. M. Vandenbroucke-Grauls, P. H. Savelkoul, B. D. Johnston, D. Gordon and J. R. Johnson (2013): *Extended-Spectrum B-Lactamase-Producing Escherichia Coli from Retail Chicken Meat and Humans: Comparison of Strains, Plasmids, Resistance Genes, and Virulence Factors*, Clin Infect Dis 56: 478-487. DOI: 10.1093/cid/cis929.

Knothe, H., P. Shah, V. Krcmery, M. Antal and S. Mitsuhashi (1983): *Transferable Resistance to Cefotaxime, Cefoxitin, Cefamandole and Cefuroxime in Clinical Isolates of Klebsiella Pneumoniae and Serratia Marcescens*, Infection 11: 315-317. DOI: 10.1007/BF01641355.

Ko, G., O. D. Simmons, 3rd, C. A. Likirdopulos, L. Worley-Davis, M. Williams and M. D. Sobsey (2008): *Investigation of Bioaerosols Released from Swine Farms Using Conventional and Alternative Waste Treatment and Management Technologies*, Environ Sci Technol 42: 8849-8857. DOI: 10.1021/es801091t.

Kozajda, A., K. Ježak and A. Kapsa (2019): *Airborne Staphylococcus Aureus in Different Environments-a Review*, Environmental science and pollution research international 26: 34741-34753. DOI: 10.1007/s11356-019-06557-1.

Laube, H., A. Friese, C. von Salviati, B. Guerra, A. Käsbohrer, L. Kreienbrock and U. Roesler (2013): *Longitudinal Monitoring of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase/Ampc-Producing Escherichia Coli at German Broiler Chicken Fattening Farms*, Appl Environ Microbiol 79: 4815-4820. DOI: 10.1128/aem.00856-13.

Laube, H., A. Friese, C. von Salviati, B. Guerra and U. Rösler (2014): *Transmission of Esbl/Ampc-Producing Escherichia Coli from Broiler Chicken Farms to Surrounding Areas*, Vet Microbiol 172: 519-527. DOI: 10.1016/j.vetmic.2014.06.008.

Lazarus, B., D. L. Paterson, J. L. Mollinger and B. A. Rogers (2015): *Do Human Extraintestinal Escherichia Coli Infections Resistant to Expanded-Spectrum Cephalosporins Originate from Food-Producing Animals? A Systematic Review*, Clin Infect Dis 60: 439-452. DOI: 10.1093/cid/ciu785.

Leverstein-van Hall, M. A., C. M. Dierikx, J. Cohen Stuart, G. M. Voets, M. P. van den Munckhof, A. van Essen-Zandbergen, T. Platteel, A. C. Fluit, N. van de Sande-Bruinsma, J. Scharinga, M. J. Bonten and D. J. Mevius (2011): *Dutch Patients, Retail Chicken Meat and Poultry Share the Same Esbl Genes, Plasmids and Strains*, Clin Microbiol Infect 17: 873-880. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2011.03497.x.

Lu, J., U. Idris, B. Harmon, C. Hofacre, J. J. Maurer and M. D. Lee (2003): *Diversity and Succession of the Intestinal Bacterial Community of the Maturing Broiler Chicken*, Appl Environ Microbiol 69: 6816-6824. DOI: 10.1128/aem.69.11.6816-6824.2003.

Ludden, C., K. E. Raven, D. Jamrozy, T. Gouliouris, B. Blane, F. Coll, M. de Goffau, P. Naydenova, C. Horner, J. Hernandez-Garcia, P. Wood, N. Hadjirin, M. Radakovic, N. M. Brown, M. Holmes, J. Parkhill and S. J. Peacock (2019): *One Health Genomic Surveillance of Escherichia Coli Demonstrates Distinct Lineages and Mobile Genetic Elements in Isolates from Humans Versus Livestock*, mBio 10: e02693-02618. DOI: 10.1128/mBio.02693-18.

Luiken, R. E. C., L. Van Gompel, P. Munk, S. Sarrazin, P. Joosten, A. Dorado-García, R. Borup Hansen, B. E. Knudsen, A. Bossers, J. A. Wagenaar, F. M. Aarestrup, J. Dewulf, D. J. Mevius, D. J. J. Heederik, L. A. M. Smit, H. Schmitt and E. consortium (2019): *Associations between Antimicrobial Use and the Faecal Resistome on Broiler Farms from Nine European Countries*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy 74: 2596-2604. DOI: 10.1093/jac/dkz235.

Luyckx, K., J. Dewulf, S. Van Weyenberg, L. Herman, J. Zoons, E. Vervae, M. Heyndrickx and K. De Reu (2015): *Comparison of Sampling Procedures and Microbiological and Non-Microbiological Parameters to Evaluate Cleaning and Disinfection in Broiler Houses*, Poultry Science 94: 740-749. DOI: <https://doi.org/10.3382/ps/pev019>.

Luyckx, K., E. Van Coillie, J. Dewulf, S. Van Weyenberg, L. Herman, J. Zoons, E. Vervae, M. Heyndrickx and K. De Reu (2017): *Identification and Biocide Susceptibility of Dominant Bacteria after Cleaning and Disinfection of Broiler Houses*, Poultry Science 96: 938-949. DOI: <https://doi.org/10.3382/ps/pew355>.

Machado, E., T. M. Coque, R. Cantón, J. C. Sousa and L. Peixe (2008): *Antibiotic Resistance Integrons and Extended-Spectrum {Beta}-Lactamases among Enterobacteriaceae Isolates Recovered from Chickens and Swine in Portugal*, J Antimicrob Chemother 62: 296-302. DOI: 10.1093/jac/dkn179.

Machado, E., T. M. Coque, R. Cantón, J. C. Sousa and L. Peixe (2013): *Commensal Enterobacteriaceae as Reservoirs of Extended-Spectrum Beta-Lactamases, Integrons, and Sul Genes in Portugal*, Front Microbiol 4: 80. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00080.

Maddox, T. W., P. D. Clegg, P. J. Diggle, A. L. Wedley, S. Dawson, G. L. Pinchbeck and N. J. Williams (2012): *Cross-Sectional Study of Antimicrobial-Resistant Bacteria in Horses. Part 1: Prevalence of Antimicrobial-Resistant Escherichia Coli and Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus*, Equine Vet J 44: 289-296. DOI: 10.1111/j.2042-3306.2011.00441.x.

Makowska, N., A. Philips, M. Dabert, K. Nowis, A. Trzebny, R. Koczura and J. Mokracka (2020): *Metagenomic Analysis of B-Lactamase and Carbapenemase Genes in the Wastewater Resistome*, Water Res 170: 115277. DOI: 10.1016/j.watres.2019.115277.

Martischang, R., M. E. Riccio, M. Abbas, A. J. Stewardson, J. Kluytmans and S. Harbarth (2020): *Household Carriage and Acquisition of Extended-Spectrum B-Lactamase-Producing*

Enterobacteriaceae: A Systematic Review, Infect Control Hosp Epidemiol 41: 286-294. DOI: 10.1017/ice.2019.336.

Massaccesi, L., E. Albini, F. R. Massacci, S. Orsini, S. Tofani, F. Blasi, L. Marchi, G. Pezzotti and C. F. Magistrali (2021): *Longitudinal Study on Antibiotic Susceptibility in Commensal E. Coli from Geese Raised in Free-Range Production Systems*, Poultry Science 100: 101230. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101230>.

Mc Ewen, S. A. and P. J. Collignon (2018): *Antimicrobial Resistance: A One Health Perspective*, Microbiol Spectr 6. DOI: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017.

McFarland, J. (1907): *The Nephelometer: An Instrument for Estimating the Number of Bacteria in Suspensions Used for Calculating the Opsonic Index and for Vaccines*, Journal of the American Medical Association XLIX: 1176-1178. DOI: 10.1001/jama.1907.25320140022001f.

Merle, R., Busse, M., Rechter, G., Meer, U. (2012): *Regionalisierung Deutschlands Anhand Landwirtschaftlicher Strukturdaten*, Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift 125: 52-59. DOI: 10.2376/0005-9366-125-52.

Mir, R. A., T. A. Weppelmann, L. Teng, A. Kirpich, M. A. Elzo, J. D. Driver and K. C. Jeong (2018): *Colonization Dynamics of Cefotaxime Resistant Bacteria in Beef Cattle Raised without Cephalosporin Antibiotics*, Front Microbiol 9: 500. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00500.

Mo, S. S., A. B. Kristoffersen, M. Sunde, A. Nødtvedt and M. Norström (2016a): *Risk Factors for Occurrence of Cephalosporin-Resistant Escherichia Coli in Norwegian Broiler Flocks*, Prev Vet Med 130: 112-118. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2016.06.011.

Mo, S. S., A. B. Kristoffersen, M. Sunde, A. Nødtvedt and M. Norström (2016b): *Risk Factors for Occurrence of Cephalosporin-Resistant Escherichia Coli in Norwegian Broiler Flocks*, Preventive Veterinary Medicine 130: 112-118. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.06.011>.

More, S. J. (2020): *European Perspectives on Efforts to Reduce Antimicrobial Usage in Food Animal Production*, Ir Vet J 73: 2. DOI: 10.1186/s13620-019-0154-4.

Mughini-Gras, L., A. Dorado-García, E. van Duijkeren, G. van den Bunt, C. M. Dierikx, M. J. M. Bonten, M. C. J. Bootsma, H. Schmitt, T. Hald, E. G. Evers, A. de Koeijer, W. van Pelt, E. Franz, D. J. Mevius and D. J. J. Heederik (2019): *Attributable Sources of Community-Acquired Carriage of Escherichia Coli Containing B-Lactam Antibiotic Resistance Genes: A Population-Based Modelling Study*, The Lancet Planetary Health 3: e357-e369. DOI: [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(19\)30130-5](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(19)30130-5).

Niero, G., V. Bortolaia, M. Vanni, L. Intorre, L. Guardabassi and A. Piccirillo (2018): *High Diversity of Genes and Plasmids Encoding Resistance to Third-Generation Cephalosporins and Quinolones in Clinical Escherichia Coli from Commercial Poultry Flocks in Italy*, Vet Microbiol 216: 93-98. DOI: 10.1016/j.vetmic.2018.02.012.

Nnadozie, C. F. and O. N. Odume (2019): *Freshwater Environments as Reservoirs of Antibiotic Resistant Bacteria and Their Role in the Dissemination of Antibiotic Resistance Genes*, Environmental Pollution 254: 113067. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113067>.

Nordmann, P. and M. Guibert (1998): *Extended-Spectrum Beta-Lactamases in Pseudomonas Aeruginosa*, J Antimicrob Chemother 42: 128-131. DOI: 10.1093/jac/42.2.128.

Olesen, I., H. Hasman and F. M. Aarestrup (2004): *Prevalence of Beta-Lactamases among Ampicillin-Resistant Escherichia Coli and Salmonella Isolated from Food Animals in Denmark*, Microb Drug Resist 10: 334-340. DOI: 10.1089/mdr.2004.10.334.

Overdevest, I., I. Willemsen, M. Rijnsburger, A. Eustace, L. Xu, P. Hawkey, M. Heck, P. Savelkoul, C. Vandenbroucke-Grauls, K. van der Zwaluw, X. Huijsdens and J. Kluytmans (2011): *Extended-Spectrum B-Lactamase Genes of Escherichia Coli in Chicken Meat and Humans, the Netherlands*, Emerging Infectious Disease journal 17: 1216. DOI: 10.3201/eid1707.110209.

Päivärinta, M., L. Pohjola, M. Fredriksson-Ahomaa and A. Heikinheimo (2016): *Low Occurrence of Extended-Spectrum B-Lactamase-Producing Escherichia Coli in Finnish Food-Producing Animals*, Zoonoses Public Health 63: 624-631. DOI: 10.1111/zph.12277.

Parker, D., M. K. Sniatynski, D. Mandrusiak and J. E. Rubin (2016): *Extended-Spectrum B-Lactamase Producing Escherichia Coli Isolated from Wild Birds in Saskatoon, Canada*, Letters in Applied Microbiology 63: 11-15. DOI: <https://doi.org/10.1111/lam.12589>.

Peirano, G., A. K. van der Bij, J. L. Freeman, L. Poirel, P. Nordmann, M. Costello, V. L. Tchesnokova and J. D. Pitout (2014): *Characteristics of Escherichia Coli Sequence Type 131 Isolates That Produce Extended-Spectrum B-Lactamases: Global Distribution of the H30-Rx Sublineage*, Antimicrob Agents Chemother 58: 3762-3767. DOI: 10.1128/aac.02428-14.

Persoons, D., F. Haesebrouck, A. Smet, L. Herman, M. Heyndrickx, A. Martel, B. Catry, A. C. Berge, P. Butaye and J. Dewulf (2011): *Risk Factors for Ceftiofur Resistance in Escherichia Coli from Belgian Broilers*, Epidemiol Infect 139: 765-771. DOI: 10.1017/S0950268810001524.

Pesciaroli, M., C. F. Magistrali, G. Filippini, E. M. Epifanio, C. Lovito, L. Marchi, C. Maresca, F. R. Massacci, S. Orsini, E. Scoccia, S. Tofani and G. Pezzotti (2020): *Antibiotic-Resistant Commensal Escherichia Coli Are Less Frequently Isolated from Poultry Raised Using Non-Conventional Management Systems Than from Conventional Broiler*, International Journal of Food Microbiology 314: 108391. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108391>.

Pfeifer, Y., A. Cullik and W. Witte (2010): *Resistance to Cephalosporins and Carbapenems in Gram-Negative Bacterial Pathogens*, Int J Med Microbiol 300: 371-379. DOI: 10.1016/j.ijmm.2010.04.005.

Philippon, A., R. Labia and G. Jacoby (1989): *Extended-Spectrum Beta-Lactamases, Antimicrob Agents Chemother* 33: 1131-1136. DOI: 10.1128/aac.33.8.1131.

Pitout, J. D. (2012): *Extraintestinal Pathogenic Escherichia Coli: A Combination of Virulence with Antibiotic Resistance, Front Microbiol* 3: 9. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00009.

Plaza-Rodríguez, C., K. Alt, M. Grobbel, J. A. Hammerl, A. Irrgang, I. Szabo, K. Stingl, E. Schuh, L. Wiehle, B. Pfefferkorn, S. Naumann, A. Kaesbohrer and B. A. Tenhagen (2020): *Wildlife as Sentinels of Antimicrobial Resistance in Germany?, Front Vet Sci* 7: 627821. DOI: 10.3389/fvets.2020.627821.

Plaza-Rodríguez, C., O. Mesa-Varona, K. Alt, M. Grobbel, B.-A. Tenhagen and A. Kaesbohrer (2021): *Comparative Analysis of Consumer Exposure to Resistant Bacteria through Chicken Meat Consumption in Germany, Microorganisms* 9: 1045. DOI: 10.3390/microorganisms9051045.

Projahn, M., K. Daehre, U. Roesler and A. Friese (2017): *Extended-Spectrum-Beta-Lactamase- and Plasmid-Encoded Cephamycinase-Producing Enterobacteria in the Broiler Hatchery as a Potential Mode of Pseudo-Vertical Transmission, Appl Environ Microbiol* 83. DOI: 10.1128/aem.02364-16.

Projahn, M., K. Daehre, T. Semmler, S. Guenther, U. Roesler and A. Friese (2018a): *Environmental Adaptation and Vertical Dissemination of Esbl-/Pampc-Producing Escherichia Coli in an Integrated Broiler Production Chain in the Absence of an Antibiotic Treatment, Microb Biotechnol* 11: 1017-1026. DOI: 10.1111/1751-7915.13040.

Projahn, M., E. Pacholewicz, E. Becker, G. Correia-Carreira, N. Bandick and A. Kaesbohrer (2018b): *Reviewing Interventions against Enterobacteriaceae in Broiler Processing: Using Old Techniques for Meeting the New Challenges of Esbl E. Coli?, Biomed Res Int* 2018: 7309346. DOI: 10.1155/2018/7309346.

Radhouani, H., N. Silva, P. Poeta, C. Torres, S. Correia and G. Igrejas (2014): *Potential Impact of Antimicrobial Resistance in Wildlife, Environment and Human Health, Front Microbiol* 5: 23. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00023.

Ramos, S., V. Silva, M. d. L. E. Dapkevicius, M. Caniça, M. T. Tejedor-Junco, G. Igrejas and P. Poeta (2020a): *Escherichia Coli as Commensal and Pathogenic Bacteria among Food-Producing Animals: Health Implications of Extended Spectrum B-Lactamase (Esbl) Production, Animals : an open access journal from MDPI* 10: 2239. DOI: 10.3390/ani10122239.

Ramos, S., V. Silva, M. L. E. Dapkevicius, M. Canica, M. T. Tejedor-Junco, G. Igrejas and P. Poeta (2020b): *Escherichia Coli as Commensal and Pathogenic Bacteria among Food-Producing Animals: Health Implications of Extended Spectrum Beta-Lactamase (Esbl) Production, Animals (Basel)* 10. DOI: 10.3390/ani10122239.

Randall, L. P., C. Clouting, R. A. Horton, N. G. Coldham, G. Wu, F. A. Clifton-Hadley, R. H. Davies and C. J. Teale (2011): *Prevalence of Escherichia Coli Carrying Extended-Spectrum B-Lactamases (Ctx-M and Tem-52) from Broiler Chickens and Turkeys in Great Britain between 2006 and 2009*, J Antimicrob Chemother 66: 86-95. DOI: 10.1093/jac/dkq396.

Randall, L. P., R. H. Horton, J. I. Chanter, F. Lemma and S. J. Evans (2021): *A Decline in the Occurrence of Extended-Spectrum B-Lactamase-Producing Escherichia Coli in Retail Chicken Meat in the Uk between 2013 and 2018*, J Appl Microbiol 130: 247-257. DOI: 10.1111/jam.14687.

Randall, L. P., M. P. Lodge, N. C. Elviss, F. L. Lemma, K. L. Hopkins, C. J. Teale and N. Woodford (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*, Int J Food Microbiol 241: 283-290. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.036.

Raseala, C. M., M. D. Ekwanzala and M. N. B. Momba (2020): *Shared Extended-Spectrum B-Lactamase-Producing Salmonella Serovars between Agricultural and Aquatic Environments Revealed through Inva Amplicon Sequencing*, Microorganisms 8. DOI: 10.3390/microorganisms8121898.

Reich, F., V. Atanassova and G. Klein (2013): *Extended-Spectrum B-Lactamase- and Ampc-Producing Enterobacteria in Healthy Broiler Chickens, Germany*, Emerg Infect Dis 19: 1253-1259. DOI: 10.3201/eid1908.120879.

Renschmidt, C., S. Schneider, E. Meyer, B. Schroeren-Boersch, P. Gastmeier and F. Schwab (2017): *Surveillance of Antibiotic Use and Resistance in Intensive Care Units (Sari)*, Dtsch Arztebl Int 114: 858-865. DOI: 10.3238/arztebl.2017.0858.

Reuland, E. A., N. Al Naiemi, A. M. Kaiser, M. Heck, J. A. Kluytmans, P. H. Savelkoul, P. J. Elders and C. M. Vandenbroucke-Grauls (2016): *Prevalence and Risk Factors for Carriage of Esbl-Producing Enterobacteriaceae in Amsterdam*, J Antimicrob Chemother 71: 1076-1082. DOI: 10.1093/jac/dkv441.

Robe, C., A. Blasse, R. Merle, A. Friese, U. Roesler and S. Guenther (2019): *Low Dose Colonization of Broiler Chickens with Esbl-/Ampc- Producing Escherichia Coli in a Seeder-Bird Model Independent of Antimicrobial Selection Pressure*, Front Microbiol 10: 2124. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02124.

Robé, C., K. Daehre, R. Merle, A. Friese, S. Guenther and U. Roesler (2021): *Impact of Different Management Measures on the Colonization of Broiler Chickens with Esbl- and Pampc- Producing Escherichia Coli in an Experimental Seeder-Bird Model*, PLoS One 16: e0245224. DOI: 10.1371/journal.pone.0245224.

Rodríguez-Baño, J., E. Picón, P. Gijón, J. R. Hernández, J. M. Cisneros, C. Peña, M. Almela, B. Almirante, F. Grill, J. Colomina, S. Molinos, A. Oliver, C. Fernández-Mazarrasa, G. Navarro, A. Coloma, L. López-Cerero and A. Pascual (2010): *Risk Factors and Prognosis of Nosocomial Bloodstream Infections Caused by Extended-Spectrum-Beta-*

Lactamase-Producing Escherichia Coli, J Clin Microbiol 48: 1726-1731. DOI: 10.1128/jcm.02353-09.

Roedel, A., S. Vincze, M. Projahn, U. Roesler, C. Robé, J. A. Hammerl, M. Noll, S. Al Dahouk and R. Dieckmann (2021): *Genetic but No Phenotypic Associations between Biocide Tolerance and Antibiotic Resistance in Escherichia Coli from German Broiler Fattening Farms*, Microorganisms 9. DOI: 10.3390/microorganisms9030651.

Roschanski, N., J. Fischer, B. Guerra and U. Roesler (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. DOI: 10.1371/journal.pone.0100956.

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. DOI: 10.1371/journal.pone.0100956.

Roth, N., A. Käsbohrer, S. Mayrhofer, U. Zitz, C. Hofacre and K. J. Domig (2019): *The Application of Antibiotics in Broiler Production and the Resulting Antibiotic Resistance in Escherichia Coli: A Global Overview*, Poult Sci 98: 1791-1804. DOI: 10.3382/ps/pey539.

Rubin, J. E. and J. D. Pitout (2014): *Extended-Spectrum B-Lactamase, Carbapenemase and Ampc Producing Enterobacteriaceae in Companion Animals*, Vet Microbiol 170: 10-18. DOI: 10.1016/j.vetmic.2014.01.017.

Ruiz del Castillo, B., L. Vinué, E. J. Román, B. Guerra, A. Carattoli, C. Torres and L. Martínez-Martínez (2013): *Molecular Characterization of Multiresistant Escherichia Coli Producing or Not Extended-Spectrum B-Lactamases*, BMC Microbiol 13: 84. DOI: 10.1186/1471-2180-13-84.

Rychlik, I. (2020): *Composition and Function of Chicken Gut Microbiota*, Animals (Basel) 10. DOI: 10.3390/ani10010103.

Salgado-Caxito, M., J. A. Benavides, A. D. Adell, A. C. Paes and A. I. Moreno-Switt (2021): *Global Prevalence and Molecular Characterization of Extended-Spectrum B-Lactamase Producing-Escherichia Coli in Dogs and Cats - a Scoping Review and Meta-Analysis*, One health (Amsterdam, Netherlands) 12: 100236-100236. DOI: 10.1016/j.onehlt.2021.100236.

Saliu, E.-M., W. Vahjen and J. Zentek (2017a): *Types and Prevalence of Extended-Spectrum Beta-Lactamase Producing Enterobacteriaceae in Poultry*, Animal Health Research Reviews 18: 46-57. DOI: 10.1017/S1466252317000020.

Saliu, E. M., W. Vahjen and J. Zentek (2017b): *Types and Prevalence of Extended-Spectrum Beta-Lactamase Producing Enterobacteriaceae in Poultry*, Anim Health Res Rev 18: 46-57. DOI: 10.1017/s1466252317000020.

Sauer, S., A. Freiwald, T. Maier, M. Kube, R. Reinhardt, M. Kostrzewa and K. Geider (2008): *Classification and Identification of Bacteria by Mass Spectrometry and Computational Analysis*, PLoS One 3: e2843. DOI: 10.1371/journal.pone.0002843.

Sauter, E. A., C. F. Petersen, E. E. Steele, J. F. Parkinson, J. E. Dixon and R. C. Stroh (1981): *The Airborne Microflora of Poultry Houses*, Poult Sci 60: 569-574. DOI: 10.3382/ps.0600569.

Savin, M., G. Bierbaum, J. A. Hammerl, C. Heinemann, M. Parcina, E. Sib, A. Voigt and J. Kreyenschmidt (2020): *Escape Bacteria and Extended-Spectrum-B-Lactamase-Producing Escherichia Coli Isolated from Wastewater and Process Water from German Poultry Slaughterhouses*, Appl Environ Microbiol 86. DOI: 10.1128/aem.02748-19.

Schmid, A., S. Hörmandorfer, U. Messelhäusser, A. Käsbohrer, C. Sauter-Louis and R. Mansfeld (2013): *Prevalence of Extended-Spectrum B-Lactamase-Producing Escherichia Coli on Bavarian Dairy and Beef Cattle Farms*, Appl Environ Microbiol 79: 3027-3032. DOI: 10.1128/aem.00204-13.

Schmitt, K., S. P. Kuster, K. Zurfluh, R. S. Jud, J. E. Sykes, R. Stephan and B. Willi (2021): *Transmission Chains of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae at the Companion Animal Veterinary Clinic-Household Interface*, Antibiotics (Basel, Switzerland) 10: 171. DOI: 10.3390/antibiotics10020171.

Schrijver, R., M. Stijntjes, J. Rodríguez-Baño, E. Tacconelli, N. Babu Rajendran and A. Voss (2018): *Review of Antimicrobial Resistance Surveillance Programmes in Livestock and Meat in Eu with Focus on Humans*, Clin Microbiol Infect 24: 577-590. DOI: 10.1016/j.cmi.2017.09.013.

Schubert, S. W., M. (2009): *8.3 Maldi-Tof-Ms-Basierte Verfahren Zur Differenzierung von Bakterien Und Pilzen*, Mikrobiologische Diagnostik. B. Neumeister, H. K. Geiss, R. W. Braun and P. Kimmig. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.

Schwaber, M. J. and Y. Carmeli (2007): *Mortality and Delay in Effective Therapy Associated with Extended-Spectrum Beta-Lactamase Production in Enterobacteriaceae Bacteraemia: A Systematic Review and Meta-Analysis*, J Antimicrob Chemother 60: 913-920. DOI: 10.1093/jac/dkm318.

Scott, A. M., E. Beller, P. Glasziou, J. Clark, R. W. Ranakusuma, O. Byambasuren, M. Bakhit, S. W. Page, D. Trott and C. D. Mar (2018): *Is Antimicrobial Administration to Food Animals a Direct Threat to Human Health? A Rapid Systematic Review*, Int J Antimicrob Agents 52: 316-323. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2018.04.005.

Shnaiderman-Torban, A., S. Navon-Venezia, Y. Paitan, H. Archer, W. Abu Ahmad, D. Bonder, E. Hanael, I. Nissan, G. Zizelski Valenci, S. J. Weese and A. Steinman (2020): *Extended Spectrum B Lactamase-Producing Enterobacteriaceae Shedding by Race Horses in Ontario, Canada*, BMC Vet Res 16: 479. DOI: 10.1186/s12917-020-02701-z.

Siller, P., K. Daehre, K. Rosen, S. Münch, A. Bartel, R. Funk, U. Nübel, T. Amon and U. Roesler (2021): *Low Airborne Tenacity and Spread of Esbl-/Ampc-Producing Escherichia Coli from Fertilized Soil by Wind Erosion*, Environ Microbiol. DOI: 10.1111/1462-2920.15437.

Siller, P., K. Daehre, N. Thiel, U. Nübel and U. Roesler (2020): *Impact of Short-Term Storage on the Quantity of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Escherichia Coli in Broiler Litter under Practical Conditions*, Poult Sci 99: 2125-2135. DOI: 10.1016/j.psj.2019.11.043.

Sirot, D., J. Sirot, R. Labia, A. Morand, P. Courvalin, A. Darfeuille-Michaud, R. Perroux and R. Cluzel (1987): *Transferable Resistance to Third-Generation Cephalosporins in Clinical Isolates of Klebsiella Pneumoniae: Identification of Ctx-1, a Novel Beta-Lactamase*, J Antimicrob Chemother 20: 323-334. DOI: 10.1093/jac/20.3.323.

Smet, A., A. Martel, D. Persoons, J. Dewulf, M. Heyndrickx, B. Catry, L. Herman, F. Haesebrouck and P. Butaye (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. DOI: 10.1128/aac.01285-07.

Stanley, D., M. S. Geier, R. J. Hughes, S. E. Denman and R. J. Moore (2014): *Highly Variable Microbiota Development in the Chicken Gastrointestinal Tract*, PLOS ONE 8: e84290. DOI: 10.1371/journal.pone.0084290.

Statistisches-Bundesamt. (2011). *Land- Und Forstwirtschaft, Fischerei; Viehhaltung Der Betriebe; Landwirtschaftszählung / Agrarstrukturhebung, Fachserie 3 Reihe 2.1.3.* Abgerufen am: 08.08.2020 um 15:05 Uhr, von https://www.statistischebibliothek.de/mir/servlets/MCRFileNodeServlet/DEHeft_derivate_00004135/2030213109004.pdf.

Stedt, J., J. Bonnedahl, J. Hernandez, J. Waldenström, B. J. McMahon, C. Tolf, B. Olsen and M. Drobni (2015): *Carriage of Ctx-M Type Extended Spectrum B-Lactamases (Esbls) in Gulls across Europe*, Acta Vet Scand 57: 74. DOI: 10.1186/s13028-015-0166-3.

Swift, B. M. C., M. Bennett, K. Waller, C. Dodd, A. Murray, R. L. Gomes, B. Humphreys, J. L. Hobman, M. A. Jones, S. E. Whitlock, L. J. Mitchell, R. J. Lennon and K. E. Arnold (2019): *Anthropogenic Environmental Drivers of Antimicrobial Resistance in Wildlife*, Sci Total Environ 649: 12-20. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.08.180.

Tadesse, D., S. Zhao, E. Tong, S. Ayers, A. Singh, M. Bartholomew and P. McDermott (2012): *Antimicrobial Drug Resistance in Escherichia Coli from Humans and Food Animals, United States, 1950–2002*, Emerging Infectious Disease journal 18: 741. DOI: 10.3201/eid1805.111153.

Tang, K. L., N. P. Caffrey, D. B. Nóbrega, S. C. Cork, P. E. Ronksley, H. W. Barkema, A. J. Polachek, H. Ganshorn, N. Sharma, J. D. Kellner and W. A. Ghali (2017): *Restricting the Use of Antibiotics in Food-Producing Animals and Its Associations with Antibiotic Resistance in Food-Producing Animals and Human Beings: A Systematic Review and Meta-Analysis*, Lancet Planet Health 1: e316-e327. DOI: 10.1016/s2542-5196(17)30141-9.

Tello, M., M. Ocejo, B. Oporto and A. Hurtado (2020): *Prevalence of Cefotaxime-Resistant Escherichia Coli Isolates from Healthy Cattle and Sheep in Northern Spain: Phenotypic and Genome-Based Characterization of Antimicrobial Susceptibility*, Appl Environ Microbiol 86. DOI: 10.1128/aem.00742-20.

Teshager, T., L. Dominguez, M. A. Moreno, Y. Saenz, C. Torres and S. Cardenosa (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. DOI: 10.1128/aac.44.12.3483-3484.2000.

Toombs-Ruane, L. J., J. Benschop, N. P. French, P. J. Biggs, A. C. Midwinter, J. C. Marshall, M. Chan, D. Drinković, A. Fayaz, M. G. Baker, J. Douwes, M. G. Roberts and S. A. Burgess (2020): *Carriage of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase- and Ampc Beta-Lactamase-Producing Escherichia Coli Strains from Humans and Pets in the Same Households*, Appl Environ Microbiol 86. DOI: 10.1128/aem.01613-20.

Valentin, L., H. Sharp, K. Hille, U. Seibt, J. Fischer, Y. Pfeifer, G. B. Michael, S. Nickel, J. Schmiedel, L. Falgenhauer, A. Friese, R. Bauerfeind, U. Roesler, C. Imirzalioglu, T. Chakraborty, R. Helmuth, G. Valenza, G. Werner, S. Schwarz, B. Guerra, B. Appel, L. Kreienbrock and A. Käbbohrer (2014): *Subgrouping of Esbl-Producing Escherichia Coli from Animal and Human Sources: An Approach to Quantify the Distribution of Esbl Types between Different Reservoirs*, Int J Med Microbiol 304: 805-816. DOI: 10.1016/j.ijmm.2014.07.015.

Valenza, G., S. Nickel, Y. Pfeifer, C. Eller, E. Krupa, V. Lehner-Reindl and C. Höller (2014): *Extended-Spectrum-B-Lactamase-Producing Escherichia Coli as Intestinal Colonizers in the German Community*, Antimicrob Agents Chemother 58: 1228-1230. DOI: 10.1128/aac.01993-13.

Van Boeckel, T. P., J. Pires, R. Silvester, C. Zhao, J. Song, N. G. Criscuolo, M. Gilbert, S. Bonhoeffer and R. Laxminarayan (2019): *Global Trends in Antimicrobial Resistance in Animals in Low- and Middle-Income Countries*, Science 365. DOI: 10.1126/science.aaw1944.

van Duijkeren, E., C. C. H. Wielders, C. M. Dierikx, A. van Hoek, P. Hengeveld, C. Veenman, A. Florijn, A. Lotterman, L. A. M. Smit, J. T. van Dissel, C. B. M. Maassen and S. C. de Greeff (2018): *Long-Term Carriage of Extended-Spectrum B-Lactamase-Producing Escherichia Coli and Klebsiella Pneumoniae in the General Population in the Netherlands*, Clin Infect Dis 66: 1368-1376. DOI: 10.1093/cid/cix1015.

van Elsas, J. D., A. V. Semenov, R. Costa and J. T. Trevors (2011): *Survival of Escherichia Coli in the Environment: Fundamental and Public Health Aspects*, The ISME journal 5: 173-183. DOI: 10.1038/ismej.2010.80.

van Hoek, A., C. Dierikx, T. Bosch, L. Schouls, E. van Duijkeren and M. Visser (2020): *Transmission of Esbl-Producing Escherichia Coli between Broilers and Humans on Broiler Farms*, J Antimicrob Chemother 75: 543-549. DOI: 10.1093/jac/dkz507.

van Hoek, A., C. Veenman, A. Florijn, P. M. C. Huijbers, E. A. M. Graat, S. de Greeff, C. M. Dierikx and E. van Duijkeren (2018): *Longitudinal Study of Esbl Escherichia Coli Carriage on an Organic Broiler Farm*, J Antimicrob Chemother 73: 3298-3304. DOI: 10.1093/jac/dky362.

van Hoek, A. H., L. Schouls, M. G. van Santen, A. Florijn, S. C. de Greeff and E. van Duijkeren (2015): *Molecular Characteristics of Extended-Spectrum Cephalosporin-Resistant Enterobacteriaceae from Humans in the Community*, PLoS One 10: e0129085. DOI: 10.1371/journal.pone.0129085.

Videnska, P., K. Sedlar, M. Lukac, M. Faldynova, L. Gerzova, D. Cejkova, F. Sisak and I. Rychlik (2014): *Succession and Replacement of Bacterial Populations in the Caecum of Egg Laying Hens over Their Whole Life*, PLoS One 9: e115142. DOI: 10.1371/journal.pone.0115142.

Vieira, A. R., P. Collignon, F. M. Aarestrup, S. A. McEwen, R. S. Hendriksen, T. Hald and H. C. Wegener (2011): *Association between Antimicrobial Resistance in Escherichia Coli Isolates from Food Animals and Blood Stream Isolates from Humans in Europe: An Ecological Study*, Foodborne Pathog Dis 8: 1295-1301. DOI: 10.1089/fpd.2011.0950.

Von Salviati, C., A. Friese, N. Roschanski, H. Laube, B. Guerra, A. Kasbohrer, L. Kreienbrock and U. Roesler (2014): *Extended-Spectrum Beta-Lactamases (Esbl)/Ampc Beta-Lactamases-Producing Escherichia Coli in German Fattening Pig Farms: A Longitudinal Study*, Berl Munch Tierarztl Wochenschr 127: 412-419. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25868169>.

von Salviati, C., H. Laube, B. Guerra, U. Roesler and A. Friese (2015): *Emission of Esbl/Ampc-Producing Escherichia Coli from Pig Fattening Farms to Surrounding Areas*, Vet Microbiol 175: 77-84. DOI: 10.1016/j.vetmic.2014.10.010.

von Tippelskirch, P., G. Golz, M. Projahn, K. Daehre, A. Friese, U. Roesler, T. Alter and S. Orquera (2018): *Prevalence and Quantitative Analysis of Esbl and Ampc Beta-Lactamase Producing Enterobacteriaceae in Broiler Chicken During Slaughter in Germany*, Int J Food Microbiol 281: 82-89. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.05.022.

W.H.O. (2017). *Global Priority List of Antibiotic—Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics*, Abgerufen am: 17.05.2021 um 15:30 Uhr, von https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf.

W.H.O. (2019). *Ten Threats to Global Health in 2019*, Abgerufen am: 07.08.2021 um 18:30 Uhr, von <https://www.who.int/news-room/spotlight/ten-threats-to-global-health-in-2019>.

Waade, J., U. Seibt, W. Honscha, F. Rachidi, A. Starke, S. Speck and U. Truyen (2021): *Multidrug-Resistant Enterobacteria in Newborn Dairy Calves in Germany*, PloS one 16: e0248291-e0248291. DOI: 10.1371/journal.pone.0248291.

Wang, J., Z.-B. Ma, Z.-L. Zeng, X.-W. Yang, Y. Huang and J.-H. Liu (2017): *The Role of Wildlife (Wild Birds) in the Global Transmission of Antimicrobial Resistance Genes*, *Zoological research* 38: 55-80. DOI: 10.24272/j.issn.2095-8137.2017.003.

Wasyl, D., H. Hasman, L. M. Cavaco and F. M. Aarestrup (2012): *Prevalence and Characterization of Cephalosporin Resistance in Nonpathogenic Escherichia Coli from Food-Producing Animals Slaughtered in Poland*, *Microb Drug Resist* 18: 79-82. DOI: 10.1089/mdr.2011.0033.

Wee, B. A., D. M. Muloi and B. A. D. van Bunnik (2020): *Quantifying the Transmission of Antimicrobial Resistance at the Human and Livestock Interface with Genomics*, *Clinical Microbiology and Infection* 26: 1612-1616. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.09.019>.

Wiedemann, B., C. Kliebe and M. Kresken (1989): *The Epidemiology of Beta-Lactamases*, *J Antimicrob Chemother* 24 Suppl B: 1-22. DOI: 10.1093/jac/24.suppl_b.1.

Wielders, C. C. H., A. H. A. M. van Hoek, P. D. Hengeveld, C. Veenman, C. M. Dierikx, T. P. Zomer, L. A. M. Smit, W. van der Hoek, D. J. Heederik, S. C. de Greeff, C. B. M. Maassen and E. van Duijkeren (2017): *Extended-Spectrum B-Lactamase- and Ampc-Producing Enterobacteriaceae among the General Population in a Livestock-Dense Area*, *Clinical Microbiology and Infection* 23: 120.e121-120.e128. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.10.013>.

Winokur, P. L., D. L. Vonstein, L. J. Hoffman, E. K. Uhlenhopp and G. V. Doern (2001): *Evidence for Transfer of Cm_y-2 Amp^c Beta-Lactamase Plasmids between Escherichia Coli and Salmonella Isolates from Food Animals and Humans*, *Antimicrob Agents Chemother* 45: 2716-2722. DOI: 10.1128/aac.45.10.2716-2722.2001.

Witte, W. and M. Mielke (2003): *B-Laktamasen Mit Breitem Wirkungsspektrum - Grundlagen, Epidemiologie, Schlussfolgerungen Für Die Prävention*, *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 46: 881-890. DOI: 10.1007/s00103-003-0693-3.

Woerther, P.-L., C. Burdet, E. Chachaty and A. Andremont (2013): *Trends in Human Fecal Carriage of Extended-Spectrum B-Lactamases in the Community: Toward the Globalization of Ctx-M*, *Clinical Microbiology Reviews* 26: 744. DOI: 10.1128/CMR.00023-13.

Woodford, N., A. Carattoli, E. Karisik, A. Underwood, M. J. Ellington and D. M. Livermore (2009): *Complete Nucleotide Sequences of Plasmids Pek204, Pek499, and Pek516, Encoding Ctx-M Enzymes in Three Major Escherichia Coli Lineages from the United Kingdom, All Belonging to the International O25:H4-St131 Clone*, *Antimicrob Agents Chemother* 53: 4472-4482. DOI: 10.1128/AAC.00688-09.

Wu, G., M. J. Day, M. T. Mafura, J. Nunez-Garcia, J. J. Fenner, M. Sharma, A. van Essen-Zandbergen, I. Rodriguez, C. Dierikx, K. Kadlec, A. K. Schink, M. Chattaway, J. Wain, R. Helmuth, B. Guerra, S. Schwarz, J. Threlfall, M. J. Woodward, N. Woodford, N. Coldham and D. Mevius (2013): *Comparative Analysis of Esbl-Positive Escherichia Coli Isolates from Animals and Humans from the Uk, the Netherlands and Germany*, *PLoS One* 8: e75392. DOI: 10.1371/journal.pone.0075392.

Yasugi, M., S. Hatoya, D. Motooka, Y. Matsumoto, S. Shimamura, H. Tani, M. Furuya, K. Mie, M. Miyake, S. Nakamura and T. Shimada (2021): *Whole-Genome Analyses of Extended-Spectrum or Ampc B-Lactamase-Producing Escherichia Coli Isolates from Companion Dogs in Japan*, PLoS One 16: e0246482. DOI: 10.1371/journal.pone.0246482.

Zhang, W. H., X. Y. Lin, L. Xu, X. X. Gu, L. Yang, W. Li, S. Q. Ren, Y. H. Liu, Z. L. Zeng and H. X. Jiang (2016): *Ctx-M-27 Producing Salmonella Enterica Serotypes Typhimurium and Indiana Are Prevalent among Food-Producing Animals in China*, Front Microbiol 7: 436. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00436.

Zhao, Y., A. J. A. Aarnink, M. C. M. De Jong and P. W. G. Groot Koerkamp (2014): *Airborne Microorganisms from Livestock Production Systems and Their Relation to Dust*, Critical Reviews in Environmental Science and Technology 44: 1071-1128. DOI: 10.1080/10643389.2012.746064.

Zurfluh, K., H. Hächler, M. Nüesch-Inderbinnen and R. Stephan (2013): *Characteristics of Extended-Spectrum B-Lactamase- and Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae Isolates from Rivers and Lakes in Switzerland*, Appl Environ Microbiol 79: 3021-3026. DOI: 10.1128/aem.00054-13.

Zurfluh, K., J. Wang, J. Klumpp, M. Nüesch-Inderbinnen, S. Fanning and R. Stephan (2014): *Vertical Transmission of Highly Similar Bla Ctx-M-1-Harboring Inc1 Plasmids in Escherichia Coli with Different Mlst Types in the Poultry Production Pyramid*, Front Microbiol 5: 519. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00519.

Alle Angaben sind freiwillig und werden streng vertraulich behandelt.

A Allgemeine Angaben zum Betrieb

A-1	Vollständige Adresse Tierarzt/Tierärztin Ansprechpartner	
A-2	Wie viele Mastputzen werden in Ihrem gesamten Betrieb gehalten? Putzen männliche weibliche
A-3	Wie lang ist die Mastdauer in Wochen? (männl.) (weibl.)
A-4	Werden die Tiere umgestallt?	<input type="checkbox"/> Umstallung nach ca. 5 Wochen <input type="checkbox"/> keine Umstallung <input type="checkbox"/> sonstiges: _____
A-5	Wie viele Ställe haben Sie im gesamten Betrieb? <i>Angabe der Stallbezeichnung.</i>	_____
A-6	Wie viele Herden (gemeinsame Tiergruppe in einem Stall/Stallteil) halten Sie? <i>ggf. Auflistung nach den einzelnen Ställen.</i>	_____
A-7	Zugehörigkeit des Betriebs?	<input type="checkbox"/> Integration/Erzeugergemeinschaft <input type="checkbox"/> freier Mäster <input type="checkbox"/> k.A.
A-8	Welche Rassen halten Sie?	_____ <input type="checkbox"/> k.A.
A-9	Durchschnittliche Tageszunahme	_____ g/Tag
A-10	Mastdurchgänge pro Jahr	_____ männl. _____ weibl.
A-11	Welche Brüterei(en) liefert Ihnen die Küken? <i>Freitext</i>	_____ <input type="checkbox"/> k.A.
A-12	Wenn Bezug aus mehreren Brütereien: Sind Tiere <u>unterschiedlicher Brütereien in einer Herde</u> (Tiergruppe in einem Stall-/teil) untergebracht?	<input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> k.A. <input type="checkbox"/> Nein
A-13	Sind Tiere <u>unterschiedlicher Eltern-tierherden in einer Herde</u> (Tiergruppe in einem Stall-/teil) untergebracht? Wenn ja: aus wie vielen Herden?	<input type="checkbox"/> Ja: _____ <input type="checkbox"/> k.A. <input type="checkbox"/> Nein

A-14 Welche und wie viele der folgenden Tierarten halten Sie außerdem auf diesem Betrieb? (wenn keine, dann „0“ eintragen)	Tierart Zuchtputzen	Anzahl Tiere	Kontakt zu Putzen		
			Ja	Nein	k.A.
A-15 Haben diese Tiere direkten Kontakt zu den Putzen?	Masthähnchen				
	div. Geflügel		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Schweine				
	Rinder		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Schafe		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Ziegen		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Pferde		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hunde		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Katzen		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
A-16	Welche Personen betreuen die Tiere?	<input type="checkbox"/> Fachkräfte mit Ausbildung <input type="checkbox"/> k.A. <input type="checkbox"/> ungelernete Kräfte			
A-17	Haben Personen Zutritt, welche nicht den Tierbestand betreuen (außer betreuender Tierarzt und wir)?	<input type="checkbox"/> ja: _____ <input type="checkbox"/> k.A. <input type="checkbox"/> nein			
A-18	Haben betreuende Personen Kontakt zu anderen Tieren?	<input type="checkbox"/> Ja, beruflich: _____ <input type="checkbox"/> k.A. <input type="checkbox"/> Ja, privat: _____ <input type="checkbox"/> Nein			
A-19	Nimmt Ihr Betrieb an einem Qualitätssicherungssystem teil	<input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> k.A. <input type="checkbox"/> Nein			

B Daten zur untersuchten Herde

	Stall 1 (junge Tiere)	Stall 2 (ältere Tiere)
B-1	Wie bezeichnen Sie den untersuchten Stall?
B-2	Wie viele Herden gibt es im untersuchten Stallgebäude? momentan Herden
B-3	Wie viele Tiere gibt es insgesamt im Stallgebäude? Tiere
B-4	Wie viele Tiere gibt es in der untersuchten Herde? Tiere
B-5	Stammen die Tiere der untersuchten Herde aus verschiedenen Brütereien?	<input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> k.A. <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/> k.A.

Anhang
Abbildung 7: Fragebogen zur Ermittlung betriebsspezifischer Risikofaktoren

ESBL@Pute
Betriebsfragebogen - Mastputen

B-6	Stammen die Tiere der untersuchten Herde aus verschiedenen Elterntierherden?	<input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> k.A.	<input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/> k.A.
B-7	Alter der untersuchten TiergruppeTageTage
B-8	Geschlecht der untersuchten Tiergruppe	<input type="checkbox"/> weiblich <input type="checkbox"/> beide	<input type="checkbox"/> männlich <input type="checkbox"/> k.A.
B-9	Ø Gewicht der untersuchten Tieregg
B-10	Datum der Einstallung/...../...../...../.....
B-11	Alter bei EinstallungTageTage
B-12	Datum der Umstallung/...../...../...../.....
B-13	Datum der Ausstallung/...../...../...../.....

C Bauliche Aspekte

C-1	Wann wurde das Stallgebäude zuletzt renoviert? (wenn abweichend: Stall 1: _____ Stall 2: _____)
C-2	Welche Lüftung ist vorhanden? (Mehrfachnennungen möglich)	<input type="checkbox"/> freie Lüftung <input type="checkbox"/> k.A. <input type="checkbox"/> Zwangslüftung Zuluft <input type="checkbox"/> Klappen <input type="checkbox"/> Offenstall <input type="checkbox"/> Fenster + Türen <input type="checkbox"/> k.A. <input type="checkbox"/> Anders: _____ (wenn abweichend: Stall 1: _____ Stall 2: _____)
C-3	Herkunft des Einstreumaterials?	<input type="checkbox"/> Stroh von eigenen Feldern (gedüngt mit Mist/Gülle? _____) <input type="checkbox"/> Stroh von fremden Feldern (gedüngt mit Mist/Gülle? _____) <input type="checkbox"/> zugekauft (Einstreuart: _____) <input type="checkbox"/> Sonstiges <input type="checkbox"/> k.A.
C-4	Wird die Einstreu nachgestreut?	<input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/> k.A. (wenn abweichend: Stall 1: _____ Stall 2: _____)
C-5	Wenn ja: Wie häufig?	<input type="checkbox"/> Alle Tage <input type="checkbox"/> Bei Bedarf <input type="checkbox"/> k.A. (wenn abweichend: Stall 1: _____ Stall 2: _____)

ESBL@Pute
Betriebsfragebogen - Mastputen

D Fütterung

D-1	Herkunft des Futters	<input type="checkbox"/> betriebseigenes <input type="checkbox"/> beides <input type="checkbox"/> Zukaufsfutter <input type="checkbox"/> k.A. (wenn abweichend: Stall 1: _____ Stall 2: _____)
D-2	Herkunft des Tränkwassers	<input type="checkbox"/> öffentliche Wasserversorgung <input type="checkbox"/> Brunnen mit Trinkwasserqualität <input type="checkbox"/> Brunnen ohne Untersuchung (Viehbrunnen) <input type="checkbox"/> k.A. (wenn abweichend: Stall 1: _____ Stall 2: _____)
D-3	Erhält das Tränkwasser einen Zusatz zur Hygienesierung?	<input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/> k.A. Wenn ja, was: _____ (wenn abweichend: Stall 1: _____ Stall 2: _____)

E Hygiene und Reinigung

E-1	Welche Hygienemaßnahmen werden vor Betreten des Tierstalles durchgeführt? (Mehrfachnennungen möglich)	<input type="checkbox"/> keine <input type="checkbox"/> betriebseigene Kleidung <input type="checkbox"/> stalleigene Kleidung <input type="checkbox"/> Einmalkleidung <input type="checkbox"/> Handschuhe <input type="checkbox"/> Handreinigung <input type="checkbox"/> Handdesinfektion <input type="checkbox"/> Stiefelreinigung <input type="checkbox"/> Stiefeldesinfektion <input type="checkbox"/> Stiefel werden NUR für diesen Stall benutzt und daher nicht jedes Mal gereinigt
E-2	Welche sonstigen Schutzvorkehrungen haben Sie? (Mehrfachnennungen möglich)	<input type="checkbox"/> keine <input type="checkbox"/> Umzäunung der Anlage <input type="checkbox"/> abschließbare Türen <input type="checkbox"/> Ladezone schwarz/weiß-Bereich <input type="checkbox"/> Andere:
E-3	Welche der folgenden Gegenstände benutzen Sie für mehrere Ställe ohne Zwischendesinfektion? (Mehrfachnennungen möglich)	<input type="checkbox"/> Waage <input type="checkbox"/> jeder Stall hat sein eigenes Material <input type="checkbox"/> Futterwagen <input type="checkbox"/> Reinigungsequipment <input type="checkbox"/> Einstreuwagen <input type="checkbox"/> Werkzeug <input type="checkbox"/> Sonstige:

E-4 Wann erfolgen Reinigung und Desinfektion der <i>Ställe</i> ?	Trockenreinigung	Nassreinigung	Desinfektion		
	<input type="checkbox"/> nach jedem Ausstallen <input type="checkbox"/> seltener als nach jedem Ausstallen <input type="checkbox"/> nie <input type="checkbox"/> k.A.	<input type="checkbox"/> nach jedem Ausstallen <input type="checkbox"/> seltener als nach jedem Ausstallen <input type="checkbox"/> nie <input type="checkbox"/> k.A.	<input type="checkbox"/> nach jedem Ausstallen <input type="checkbox"/> seltener als nach jedem Ausstallen <input type="checkbox"/> nie <input type="checkbox"/> k.A.		
E-5 Was schließt die Reinigung und Desinfektion der <i>Ställe</i> ein? (Mehrfachnennungen möglich)		Nassreinigung	Desinfektion	Weder noch	Trifft nicht zu
	Boden	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Wände	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Decke	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Lüftungsschächte	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Tränken	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Futtertröge / -automaten	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Außenanlagen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Windnetze	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
E-6 Womit reinigen Sie die <i>Ställe</i> ? (Mehrfachnennungen möglich)	<input type="checkbox"/> Hochdruckreiniger <input type="checkbox"/> kalt <input type="checkbox"/> Wasserschlauch <input type="checkbox"/> heiß <input type="checkbox"/> Sonstiges:.....				
E-7 Lassen Sie die Flächen nach der Reinigung trocknen?	<input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> k.A. <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/> k.A.				
E-8 Welche Desinfektionswirkstoffe benutzen Sie? (Mehrfachnennungen möglich) Produktname:	<input type="checkbox"/> Säuren <input type="checkbox"/> k.A. <input type="checkbox"/> Aldehyde <input type="checkbox"/> k.A. <input type="checkbox"/> Sauerstoffabspalter <input type="checkbox"/> Alkohole <input type="checkbox"/> Chlor und Chlorabspalter <input type="checkbox"/> Laugen <input type="checkbox"/> Phenole <input type="checkbox"/> quaternäre Ammoniumverbindungen <input type="checkbox"/> Andere, nämlich:.....				

E-9 Welches Desinfektionsverfahren wenden Sie an?	<input type="checkbox"/> Flüssigdesinfektion <input type="checkbox"/> Vernebelung (gasförmig) <input type="checkbox"/> Schaum		
E-10 Welche Schädlinge bekämpfen Sie?	Schadnager	Fliegen	Sonstige
	<input type="checkbox"/> regelmäßig <input type="checkbox"/> unregelmäßig	<input type="checkbox"/> regelmäßig <input type="checkbox"/> unregelmäßig	<input type="checkbox"/> regelmäßig <input type="checkbox"/> unregelmäßig
E-11 Wo wird der Mist gelagert? (Mehrfachnennungen möglich)	<input type="checkbox"/> innen <input type="checkbox"/> außen <input type="checkbox"/> auf betonierter Platte <input type="checkbox"/> in Behälter <input type="checkbox"/> Feld		
E-12 Wohin wird der Mist verbracht? (Mehrfachnennungen möglich)	<input type="checkbox"/> Biogasanlage: <input type="checkbox"/> eigene <input type="checkbox"/> nicht eigene → Gärrest: <input type="checkbox"/> Ackerfläche: <input type="checkbox"/> eigene <input type="checkbox"/> nicht eigene <input type="checkbox"/> Grünfläche <input type="checkbox"/> Kompost.		
	<input type="checkbox"/> Ackerfläche: <input type="checkbox"/> eigene <input type="checkbox"/> nicht eigene <input type="checkbox"/> Grünfläche <input type="checkbox"/> sonstiges:		

F Geographische Aspekte

Welche Flächen liegen direkt um die Tierhaltungen?	<input type="checkbox"/> Ackerfläche <input type="checkbox"/> k.A. <input type="checkbox"/> Grünfläche <input type="checkbox"/> Anderes:.....		
Bei Vorhandensein von Acker-/Grünflächen:			
1. Werden diese Flächen mit Mist/Gülle gedüngt?	<input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> k.A. <input type="checkbox"/> Nein		
→ wenn ja: Herkunft des Mist/Gülle?			
→ wenn ja: Datum letzter Düngung?			
Was liegt in der näheren Umgebung der Tierhaltung? (Radius ca. 1 km)	ja	nein	k.A.
schweinehaltende Betriebe	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
rinderhaltende Betriebe	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
masthähnchenhaltende Betriebe	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
putenhaltende Betriebe (außer eigener)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Haltungen von Schafen, Ziegen, Pferden	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Wild- und Zootierhaltungen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Gewässer mit Wasservögeln	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kläranlagen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Schlachtbetriebe	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Verarbeitungsbetriebe	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tierkörperbeseitigungsanlagen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Mülldeponien, Kompostierungsanlagen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Biogasanlagen (keine Hofeigenen)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Landwirtschaftliche Anbaufläche	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Wald	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Krankenhaus	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

G Medikamentöse Behandlungen der untersuchten Herden

	Stall 1	Stall 2
G-1 Wurde die untersuchte Herde antibiotisch behandelt? wenn nein, keine weiteren Fragen	<input type="checkbox"/> Ja, einmalig ALLE <input type="checkbox"/> Ja, einmalig EINZEL-TIERE <input type="checkbox"/> Ja, mehrmalig ALLE <input type="checkbox"/> Ja, mehrmalig EINZEL-TIERE <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/> k.A.	<input type="checkbox"/> Ja, einmalig ALLE <input type="checkbox"/> Ja, einmalig EINZEL-TIERE <input type="checkbox"/> Ja, mehrmalig ALLE <input type="checkbox"/> Ja, mehrmalig EINZEL-TIERE <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/> k.A.
Wenn ja, G-2 Welche(s) Antibiotikum? (Produktname oder Wirkstoff) + Datum der Behandlung	1)..... 2)..... 3)..... 4)..... 5)..... 6)..... 7)..... 8).....	1)..... 2)..... 3)..... 4)..... 5)..... 6)..... 7)..... 8).....

G-3 Welche Diagnose	1)..... 2)..... 3)..... 4)..... 5)..... 6)..... 7)..... 8).....	1)..... 2)..... 3)..... 4)..... 5)..... 6)..... 7)..... 8).....
G-4 Werden alle Tiere der Herde behandelt? → Wenn nein, wie viele?	<input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein: <input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein:	<input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein: <input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein:
G-5 Zeitraum der Behandlung in Tagen?	1)..... 2)..... 3)..... 4)..... 5)..... 6)..... 7)..... 8).....	1)..... 2)..... 3)..... 4)..... 5)..... 6)..... 7)..... 8).....
G-6 Wurden alle Medikamente über das Trinkwasser verabreicht? → Wenn nein, wie?	<input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein: <input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein:	<input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein: <input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein:
G-7 welche Dosierung pro Tier und Tag?	1).....g/1000l 2).....g/1000l 3).....g/1000l 4).....g/1000l 5).....g/1000l 6).....g/1000l 7).....g/1000l 8).....g/1000l	1).....g/1000l 2).....g/1000l 3).....g/1000l 4).....g/1000l 5).....g/1000l 6).....g/1000l 7).....g/1000l 8).....g/1000l

Tabelle 19: Referenzen zur Ermittlung der Schwerpunkte der Putenhaltungen in den Bundesländern (ohne Stadtstaaten, Rheinland-Pfalz und Saarland)

Bundesland	Titel der Veröffentlichung	Quelle	Schwerpunkte der Putenhaltungen
Baden-Württemberg	Landwirtschaftszählung 2010	Statistisches Landesamt Baden-Württemberg; Landesanstalt für Landwirtschaft, Ernährung und ländlichen Raum	Schwäbisch-Hall
Bayern	Bayerischer Agrarbericht 2012	Bayerisches Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten	Rosenheim, Dillingen a. d. Donau und Ansbach
Brandenburg	Statistischer Bericht C III 5 – u / 10, C III 1 – 3j / 10; Viehbestände im Land Brandenburg 1. März 2010	Amt für Statistik Berlin-Brandenburg	Märkisch-Oderland, Ostprignitz-Ruppin, Prignitz, Uckermark
Hessen	Kleine Anfrage des Abg. Daniel May (BÜNDNIS 90/DIE GRÜNEN) vom 24.03.2010 betreffend Geflügelmast in Hessen Teil I; Kleine Anfrage der Abg. Fuhrmann (SPD) vom 15.11.2011 betreffend Geflügel-Doping und Antworten der Ministerin für Umwelt, Energie, Landwirtschaft und Verbraucherschutz	Hessischer Landtag, Drucksache 18/4706 vom 17.02.2012 und Drucksache 18/2163 vom 04.06.2010	Fulda, Gießen, Schwalm-Eder-Kreis, Waldeck-Frankenberg
Mecklenburg-Vorpommern	Statistische Berichte Agrarstruktur, Ausgewählte Ergebnisse der Landwirtschaftszählung 2010 nach neuer Kreisstruktur in Mecklenburg-Vorpommern	Statistisches Amt Mecklenburg-Vorpommern	Vorpommern-Greifswald, Ludwigslust-Parchim, Vorpommern-Rügen
Niedersachsen	Die niedersächsische Landwirtschaft in Zahlen 2011	Niedersächsisches Ministerium für Ernährung, Landwirtschaft, Verbraucherschutz und Landesentwicklung	Cloppenburg, Oldenburg, Vechta
Nordrhein-Westfalen	Statistisches Jahrbuch Nordrhein-Westfalen 2008, Landwirtschaftliche Betriebe mit Viehhaltung und Viehbestand in Nordrhein-Westfalen am 1. März 2010	Landesbetrieb Information und Technik Nordrhein-Westfalen	Landkreise Düsseldorf, Köln, Münster, Kleve
Sachsen	Statistischer Bericht, Landwirtschaftszählung 2010 Viehbestände im Freistaat Sachsen, C/LZ 2010-2 und Teil 3 - Viehbestände	Statistisches Landesamt Freistaat Sachsen	Nordsachsen
Sachsen-Anhalt	Statistische Berichte, Land- und Forstwirtschaft, Fischerei 2010, C IV 3j/10 Landwirtschaftszählung Teil 3 Viehbestände, Ökologischer Landbau-Teil Viehzählung, Viehhaltungsverfahren, Wirtschaftsdünger	Statistisches Landesamt Sachsen-Anhalt	Altmarkkreis Salzwedel, Börde
Schleswig-Holstein	Statistische Berichte, Viehhaltung in Hamburg und Schleswig-Holstein 2010, Endgültige Ergebnisse der Landwirtschaftszählung 2010, Betriebe mit Tierhaltung in Hamburg und Schleswig-Holstein 2010 nach Kreisen, C IV - LZ 2010, Teil 2 Viehhaltung	Statistisches Amt für Hamburg und Schleswig-Holstein	Ostholstein, Schleswig-Flensburg
Thüringen	Statistischer Bericht C IV - unreg. / 10, Landwirtschaftszählung in Thüringen 2010 Struktur der Viehhaltung	Thüringer Landesamt für Statistik	Unstrut-Hainich-Kreis

Tabelle 20: Daten der Wetteraufzeichnung im Außenbereich

Termin	Mittlere Windgeschwindigkeit in m/s	Mittlere Windrichtung in °	Temperatur in °C		Relative Feuchte in %	
			Außen	Im Stall	Außen	Im Stall
LP1.1	1,65	67,60	4,46	20,87	82,79	46,33
LP1.2	1,52	72,35	27,82	25,33	40,63	48,67
LP1.3	1,40	79,11	23,06	26,07	57,56	56,93
LP2.1	2,39	231,82	10,03	22,97	48,14	45,70
LP2.2	1,57	225,59	20,58	20,93	48,39	63,60
LP2.3	1,53	216,00	22,40	21,60	55,31	55,10
LP3.1	Messung ausgefallen		13,30	28,60	28,60	48,57
LP3.2	1,92	181,71	16,04	18,40	73,12	52,40
LP3.3	1,63	241,88	4,46	15,70	73,82	49,20
LP4.1	1,84	156,61	10,45	29,27	64,76	53,30
LP4.2	1,13	64,56	0,97	17,10	73,94	48,20
LP4.3	0,73	126,46	11,13	15,70	43,38	43,30
LP5.1	2,19	321,07	14,40	20,23	56,78	45,63
LP5.2	1,51*	204,22*	17,31	18,40	52,15	40,07
LP5.3	3,04	150,60	15,20	19,17	74,36	47,77
LP6.1	2,04	70,58	10,76	18,20	53,96	46,03
LP6.2	1,97	174,20	20,56	22,37	52,64	47,63
LP6.3	0,06	137,41	21,31	22,16	47,27	49,53
LP7.1	0,00	46,69	14,58	25,10	36,21	48,73
LP7.2	1,64	265,17	14,84	18,37	49,54	46,17
LP7.3	1,26*	263,08*	20,47	24,47	53,85	59,00

*Windmessung mit nur wenigen Werten auf Grund technischer Probleme

Tabelle 21: Reaktionsansatz der konventionellen PCRs

Reagenz	CTX-M* / TEM		CMY2 / SHV	
	Konzentration in Stammlösung	Einsatz µl	Konzentration in Stammlösung	Einsatz µl
DreamTaq™ Green PCR Mastermix		12,5	2 x	12,5
Primer-F	10 pmol/µl	1	10 µM/µl	0,5
Primer-R	10 pmol/µl	1	10 µM/µl	0,5
H2O (nukleasefrei)		9,5		8,5
DNA		1		3
Gesamt		25		25

*CTX-M1, CTX-M2, CTX-M8, CTX-M9

Tabelle 22: Parameter für konventionelle PCRs

Programmschritt	Zeit CTX-M	Temp. CTX-M1 in °C	Temp. CTX-M* in °C	Zeit TEM	Temp. TEM in °C	Zeit CMY2	Zeit SHV	Temp. CMY2/SHV in °C
Initiale Denaturierung	5 min.	95	95	10 min.	94	5 min.	5 min.	94
Denaturierung	30 sec.	95	95	30 sec.	94	30 sec.	30 sec.	94
Primerhybridisierung	30 sec.	52	50	30 sec.	43	30 sec.	30 sec.	57
Amplifikation	60 sec.	72	72	70 sec.	72	80 sec.	60 sec.	72
Finale Amplifikation	10 min.	72	72	10 min.	72	5 min.	5 min.	72

*CTX-M2, CTX-M8, CTX-M9

Tabelle 23: Anzahl ESBL-/AmpC-bildender *E. coli* und Gesamt-*E. coli* der Umgebungs- und Einzeltierproben der sieben Betriebe der Langzeitstudie zu den verschiedenen Zeitpunkten

in KbE/g , $x^- geom$

Zeitpunkt	1		2		3	
	MC+	MC-	MC+	MC-	MC+	MC-
SK	-	-	1,89*10 ⁶ (n=4)	3,97*10 ⁷ (n=4)	7,67*10 ⁵ (n=3)	6,84*10 ⁶ (n=3)
ST	1,49*10 ⁶ (n=1)	-	3,91*10 ⁵ (n=6)	-	5,68*10 ⁴ (n=4)	-
SS	-	-	4,18*10 ² (n=2)	1,10*10 ⁴ (n=2)	5,00*10 ¹ (n=1)	5,75*10 ³ (n=1)
TW	-	-	1,59*10 ² (n=3)	2,67*10 ³ (n=3)	1,00*10 ¹ (n=2)	2,68*10 ² (n=2)
M	-	-	-	-	6,62*10 ² (n=2)	1,09*10 ⁴ (n=4)
F	-	-	5,23*10 ⁵ (n=1)	-	-	-
UT	-	-	7,50*10 ¹ (n=1)	-	1,84*10 ² (n=2)	-
KT	-	-	5,96*10 ³ (n=62)	1,56*10 ⁵ (n=62)	5,14*10 ³ (n=27)	2,50*10 ⁵ (n=27)
Gesamt						

SK-Sammelkot, ST-Sockentupfer, SS-Sammelstaub, KT-Kloakentupfer, TW-Trinkwasser, M-Mist, F-Futter, UT-Umgebungstupfer

Tabelle 24: Antibiotikaaanwendung in der Querschnittsstudie

Betriebsnr.	Altersgruppe	ESBL-/AmpC-Herden-Status	Beta-Laktam-Antibiotika Anwendung	Andere Antibiotika Anwendung
1	Aufzucht	positiv	Ja	Ja
1	Mast	positiv	Ja	Ja
2	Aufzucht	negativ	Ja	Ja
2	Mast	negativ	Ja	Ja
3	Aufzucht	negativ	Nein	Ja
3	Mast	positiv	Ja	Ja
4	Aufzucht	negativ	Nein	Ja
4	Mast	positiv	Ja	Ja
5	Aufzucht	negativ	Ja	Nein
5	Mast	negativ	Ja	Ja
6	Aufzucht	negativ	Ja	Nein
6	Mast	negativ	Ja	Ja
7	Aufzucht	positiv	Ja	Nein
7	Mast	negativ	Ja	Ja
8	Aufzucht	positiv	Nein	Nein
8	Mast	positiv	Ja	Ja
9	Aufzucht	positiv	Ja	Nein
9	Mast	positiv	Ja	Ja
10	Aufzucht	positiv	Ja	Ja
10	Mast	positiv	Ja	Ja
11	Aufzucht	negativ	Nein	Nein
11	Mast	positiv	Ja	Ja
12	Aufzucht	negativ	Ja	Ja
12	Mast	positiv	Ja	Ja
13	Aufzucht	negativ	Nein	Ja
13	Mast	negativ	Ja	Ja
14	Aufzucht	negativ	Nein	Nein
14	Mast	negativ	Ja	Ja
15	Aufzucht	positiv	Nein	Nein
15	Mast	positiv	Ja	Nein
16	Aufzucht	negativ	Nein	Nein
16	Mast	positiv	Ja	Ja
17	Aufzucht	positiv	Ja	Ja
17	Mast	negativ	Ja	Ja
18	Aufzucht	negativ	Ja	Nein
18	Mast	negativ	Ja	Ja
19	Aufzucht	positiv	Nein	Nein
20	Aufzucht	positiv	Ja	Ja
20	Mast	positiv	Ja	Ja
21	Aufzucht	negativ	Nein	Nein
21	Mast	positiv	Ja	Ja
22	Aufzucht	positiv	Ja	Nein
22	Mast	negativ	Ja	Ja
23	Aufzucht	negativ	Nein	Nein
23	Mast	negativ	Ja	Nein
24	Aufzucht	positiv	Ja	Ja
24	Mast	positiv	Ja	Ja
25	Aufzucht	negativ	Nein	Ja
25	Mast	negativ	Ja	Ja
26	Aufzucht	positiv	Nein	Nein
26	Mast	positiv	Nein	Ja

27	Aufzucht	negativ	Nein	Nein
27	Mast	negativ	Nein	Nein
28	Aufzucht	positiv	Ja	Ja
28	Mast	positiv	Ja	Ja
29	Aufzucht	negativ	Nein	Nein
29	Mast	negativ	Ja	Ja
30	Aufzucht	negativ	Ja	Nein
30	Mast	positiv	Ja	Ja
31	Aufzucht	negativ	Ja	Nein
31	Mast	negativ	Ja	Ja
32	Mast	positiv	Ja	Ja
33	Mast	positiv	Ja	Ja
34	Mast	negativ	Ja	Ja
35	Aufzucht	positiv	Nein	Nein
35	Mast	negativ	Ja	Ja
36	Aufzucht	positiv	Nein	Nein
36	Mast	positiv	Ja	Ja
37	Aufzucht	negativ	Nein	Ja
37	Mast	positiv	Ja	Ja
38	Aufzucht	negativ	Nein	Nein
38	Mast	positiv	Nein	Ja
39	Aufzucht	positiv	Nein	Nein
39	Mast	positiv	Ja	Ja
40	Aufzucht	negativ	Nein	Nein
40	Mast	positiv	Ja	Ja
41	Aufzucht	positiv	Ja	Nein
41	Mast	negativ	Ja	Ja
42	Aufzucht	positiv	Nein	Nein
42	Mast	positiv	Ja	Ja
43	Aufzucht	positiv	Nein	Nein
43	Mast	negativ	Nein	Nein
44	Aufzucht	negativ	Ja	Ja
44	Mast	negativ	Nein	Ja
45	Aufzucht	positiv	Nein	Ja
45	Mast	positiv	Ja	Ja
46	Aufzucht	negativ	Ja	Ja
46	Mast	positiv	Ja	Ja
47	Aufzucht	positiv	Nein	Nein
47	Mast	positiv	Ja	Ja
48	Aufzucht	negativ	Nein	Nein
48	Mast	negativ	Nein	Nein

Publikationen

Wissenschaftliche Artikel:

A. Friese, **H. M. Lu**, R. Merle, U. Roesler: Extended-spectrum beta-lactamase and AmpC beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in turkey fattening farms: a cross-sectional study; Berl Münch Tierärztl Wochenschr, DOI 10.2376/0005-9366-18025, © 2019 Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG, ISSN 0005-9366, online first: 06.03.2019, <http://vetline.de/facharchiv/158/3222>

Vorträge:

ISAH 2015, XVII International congress on animal hygiene: **H. M. Lu**, U. Roesler, A. Friese: Occurrence of ESBL-/AmpC-producing *Enterobacteriaceae* in turkey fattening farms in Germany; 07. – 11.07.2015, Košice, Slowakei; S. 95, Verlag der DVG-Service GmbH, Gießen, ISBN 978-3-86345-275-9

DVG Vet-Congress 2015, 2. Tagung der DVG-Fachgruppe Umwelt- und Tierhygiene: **Lu, H. M.**, Steinke, D., Roesler, U., Friese, A.: ESBL-/AmpC-bildende Enterobakterien in Putenmastbetrieben – Prävalenz, Bestandskinetik und Transmissionswege; 12. – 15.11. 2015, Berlin; S. 26, Proceedings, ISBN 978-80-8077-462-2

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir die Bearbeitung meines Projekts und die Fertigstellung der Dissertation ermöglichten.

Allen voran gilt mein herzlicher Dank Prof. Dr. Uwe Rösler für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, am Institut für Tier- und Umwelthygiene der Freien Universität Berlin zu promovieren und so für mich wertvolle Erfahrungen fürs Leben zu sammeln. Weiterhin danke ich ganz im Besonderen Dr. Anika Friese für die umfassende Betreuung, für ihre Anregungen, Unterstützung und andauernde Ermutigung in jeder Phase meiner Arbeit. Beiden danke ich außerdem für die schier unendliche Geduld während der Fertigstellung.

Frau PD Dr. med. vet. Roswitha Merle danke ich herzlich für Ihre Mithilfe bei der statistischen Auswertung.

Dankbar bin ich darüber hinaus allen Mitarbeitenden des Labors für ihre Unterstützung. Hier möchte ich ganz besonders Diana Steinke für ihre Assistenz in meinem Projekt sowie Dr. Jayaseelan Murugaiyan, Heike Rose, Maja Thieck, Susann Sellenthin, Michael Kühl und Sebastian Scheunemann danken. Ohne euch als Rückgrat des Instituts wäre die Laborarbeit nicht zu schaffen gewesen.

Tausend Dank auch meinen Mit-Doktorandinnen Katrin Dähre, Michaela Projahn und Taiyun Li für den Support bei den Ausfahrten zur Probenahme sowie im Labor und für viele schöne Stunden in Gemeinschaft und angenehmer Arbeitsatmosphäre.

Abschließend möchte ich meinen Freunden und meiner Familie für ihren wunderbaren Beistand, die Motivation und die vielen positiven Vibes bis zum Schluss danken. Therese Löhrich, Nele Güntheroth und Thea Ehlich für die Durchsicht und Anregungen, wenn der Wald vor lauter Bäumen nicht mehr zu sehen war sowie Christine Hackenberger für ihre Zeit, die sie der Korrektur gewidmet hat. Fühlt euch von mir gedrückt! Danke, meine liebe Mama, für deine fortwährende Unterstützung und deine Liebe.

Finanzierungshilfen

Die Untersuchungen wurden finanziert durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (Förderkennzeichen BLE 2808HS029).

Interessenskonflikte

Es bestehen keine Interessenskonflikte durch Zuwendungen Dritter.

Selbstständigkeitserklärung

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

Berlin, den 12.10.2022

Helene Morgenstern Lu

ISBN: 978-3-86345-652-8



Verlag der DVG Service GmbH

An der Alten Post 2 • 35390 Gießen

Tel.: 0641 984446-0 • Fax: 0641 984446-25

E-Mail: info@dvj.de • Web: www.dvj.de